HAL
open science

Potentiel de transformation de souches d'intérêt de Streptococcus salivarius pour l'étude du transfert d'Eléments Intégratifs et Conjugatifs

Yoann Perrin

To cite this version:

Yoann Perrin. Potentiel de transformation de souches d'intérêt de Streptococcus salivarius pour l'étude du transfert d'Eléments Intégratifs et Conjugatifs. Microbiologie et Parasitologie. 2014. hal-01843164

HAL Id: hal-01843164

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01843164

Submitted on 18 Jul 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Master Biotechnologie, Microbiologie, Aliment, Nutrition, Environnement

Spécialité Microbiologie Environnementale et Sanitaire

Deuxième année

Potentiel de transformation de souches d'intérêt de *Streptococcus salivarius* pour l'étude du transfert d'Eléments Intégratifs et Conjugatifs

Yoann PERRIN

Stage effectué du 13 janvier au 14 juin 2014

Directeurs de stage

Dr Virginie Libante et Dr Sophie Payot-Lacroix

Structure d'accueil

UMR1128 INRA-Université de Lorraine,
Dynamique des Génomes et Adaptation Microbienne (DynAMic)
Faculté des Sciences et Technologies,
BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France.

ABREVIATIONS

aa	:	acide aminé
ABC	:	ATP Binding Cassette
ADN	:	acide désoxyribonucléique
ARN	:	acide ribonucléique
ATP	:	adénosine triphosphate
att	:	site d'attachement
BET	:	bromure d'ethidium
CHU	:	Centre Hospitalier Universitaire
CSP	:	Competence Stimulating Peptide
C-ter	:	extrémité C-terminale
com. pers.	:	communication personnelle
DO	:	Densité Optique
ICE	:	Integrative Conjugative Element (élément conjugatif et intégratif)
kb	:	kilobase
kV	:	kiloVolts
Gly	:	glycine
LB	:	Luria-Bertani
Mb	:	Mégabase
MLST	:	Multi Locus Sequence Typing
N-ter	:	extrémité N-terminale
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
OriT	:	Origine de Transfert
QS	:	Quorum-sensing
UP	:	UltraPure
RifR	:	Rifampicine résistante
RM	:	Restriction-Modification
rpm	:	rotations par minute
U/mL	:	unité par millilitre
µF	:	microFarrad
µM	:	micromolaire
°C	:	degrès Celsius
%	:	pour cent
Ω	:	Ohm

SOMMAIRE

INTRODUCTION 1

1. Transfert horizontal 1

2. Les Eléments Intégratifs et Conjugatifs 2

2.1. Caractéristiques des éléments génétiques mobiles, cas des ICE 2

2.2. Mécanisme de transfert des ICE 3

2.3. Eléments de la famille ICE*St3* 3

3. Induction de l'état de compétence chez les streptocoques 4

3.1. Mise en place de la compétence chez *S. pneumoniae* 4

3.2. Induction de la compétence chez le groupe des streptocoques *viridans* 5

3.3. Acquisition de l'ADN exogène 6

3.3.1. Capture et internalisation de l'ADN 6

3.3.2. Devenir de l'ADN internalisé 7

3.4. Fonctions associées à l'état de compétence chez *S. pneumoniae* 8

3.4.1. Lyse fratricide 8

3.4.2. Arrêt de la division cellulaire 9

4. Présentation de l'organisme étudié : *Streptococcus salivarius* 9

5. Objectif du stage 10

MATERIEL ET METHODES 11

1. Souches bactériennes et conditions de culture. 11

2. Recherche in silico des gènes essentiels pour la transformation naturelle 11

3. Tests de transformation naturelle avec de l'ADN génomique 12

3.1. Etude du locus *rpoB* des souches d'intérêt et de la souche JIM8777 12

3.2. Extraction de l'ADN génomique des souches de *S. salivarius* 13

3.3. Fragmentation de l'ADN génomique extrait de *S. salivarius* 13

3.4. Production du CSP 14

3.5. Protocole de transformation naturelle de *S. salivarius* 14

3.6. Sélection des clones Rif^R et calcul des taux d'obtention de mutants 14

4. Transformation naturelle de *S. salivarius* par des plasmides 14

4.1. Extraction des ADN plasmidiques 14
4.2. Vérification des clones obtenus 15
4.2.1. Contrôle par extraction plasmidique 15
4.2.2. Contrôle par PCR 15

5. Electroporation des plasmides d'intérêt chez *S. salivarius* 15
5.1. Préparation des bactéries électrocompétentes 15
5.2. Electroporation chez *S. salivarius* 16
5.3. Vérification des clones obtenus 16

RESULTATS 17

1. Recherche in silico des gènes essentiels pour la transformation naturelle 17

2. Test de transformation naturelle 18
2.1. Intérêt du locus *rpoB* et étude comparative 18
2.2. Préparation de l'ADN génomique 19
2.3. Mise au point du protocole de transformation naturelle 19
2.3.1. Cinétique d'ajout du CSP et de l'ADN et taux de de transformation de la souche *S. salivarius* N20... 20
2.3.2. Impact de la quantité de CSP et d'ADN sur le taux de transformation de la souche *S. salivarius* N20 20
2.3.1. Impact du temps de régénération sur le taux de transformation sur les souches *S. salivarius* N20 et JIM8777 21
2.1. Potentiel de transformation des souches d'intérêt de *S. salivarius* 22

3. Transformation naturelle de *S. salivarius* par de l'ADN plasmidique 23

4. Electrotransformation de *S. salivarius* 23

DISCUSSION 25

1. Mise au point du protocole de transformation naturelle de *S. salivarius* 25
1.1. Intégrité du locus *rpoB* 25
1.2. Protocole de transformation naturelle 25
1.3. Modification de la fenêtre d'ajout du CSP 26
1.4. Maintien des concentrations d'ADN et de CSP 26
1.5. Temps de régénération 27

2. Transformation naturelle des souches d'intérêt de *S. salivarius* 27
2.1. Confrontation des capacités de transformation aux analyses in silico 28
2.2. Les contraintes du milieu chimiquement défini 29

3. Transformation par de l'ADN plasmidique des souches d'intérêt de *S. salivarius* 29

4. Perspectives **30**

BIBLIOGRAPHIE **31**

INTRODUCTION

1. *Transfert horizontal*

La comparaison du génome de différentes bactéries d'un environnement donné a permis de mettre en avant leur capacité d'adaptation. En effet, elles sont capables de modifier leur mode de vie et de coloniser un nouvel habitat (Ochman et Davalos, 2006). Les bactéries possèdent donc un énorme potentiel d'évolution illustré par le fait que différentes souches d'une même espèce diffèrent : par leurs propriétés métaboliques, la composition de leur surface cellulaire, leur niche écologique et leur spécificité d'hôte (Hacker et Carniel, 2001). Ceci est le résultat de la combinaison de deux mécanismes majeurs d'évolution du génome : apparition de variations aléatoires dans le génome (mutations) et acquisition de gènes par transfert horizontal (Juhas et al., 2009).

Le transfert horizontal est un mécanisme clé de l'évolution bactérienne. Il s'agit d'un processus par lequel une bactérie (dite réceptrice) intègre un fragment d'ADN provenant d'une autre bactérie (dite donatrice) qui n'est pas son ascendant et qui en est plus ou moins éloignée phylogénétiquement. Ce phénomène peut conduire à l'acquisition de gènes et donc de nouvelles fonctions chez la bactérie réceptrice. Trois étapes sont indispensables : l'entrée de l'ADN, l'intégration dans le génome et sa transmission à la descendance et enfin, le succès évolutif de ces cellules ; c'est-à-dire leur multiplication de façon plus importante que les cellules ne l'ayant pas reçu.

Il existe trois mécanismes principaux qui permettent le transfert de molécules d'ADN (Furuya and Lowy, 2006). La transformation, tout d'abord, correspond à la pénétration intracellulaire d'un fragment d'ADN exogène libre dans l'environnement et son intégration dans le génome de la bactérie réceptrice. Ce mécanisme nécessite l'expression de gènes de compétence de la cellule réceptrice suite à des signaux environnementaux (figure 1A). Le deuxième mécanisme est la transduction. Il s'agit du transfert d'ADN bactérien par l'intermédiaire d'un bactériophage (vecteur viral) (figure 1B). Enfin, le dernier des trois mécanismes est la conjugaison. Elle correspond à un transfert d'ADN unidirectionnel qui nécessite un contact entre les deux cellules (figure 1C).

Afin que le transfert horizontal soit observé, l'ADN acquis doit se maintenir dans la cellule réceptrice ainsi que chez sa descendance. Il peut rester sous forme

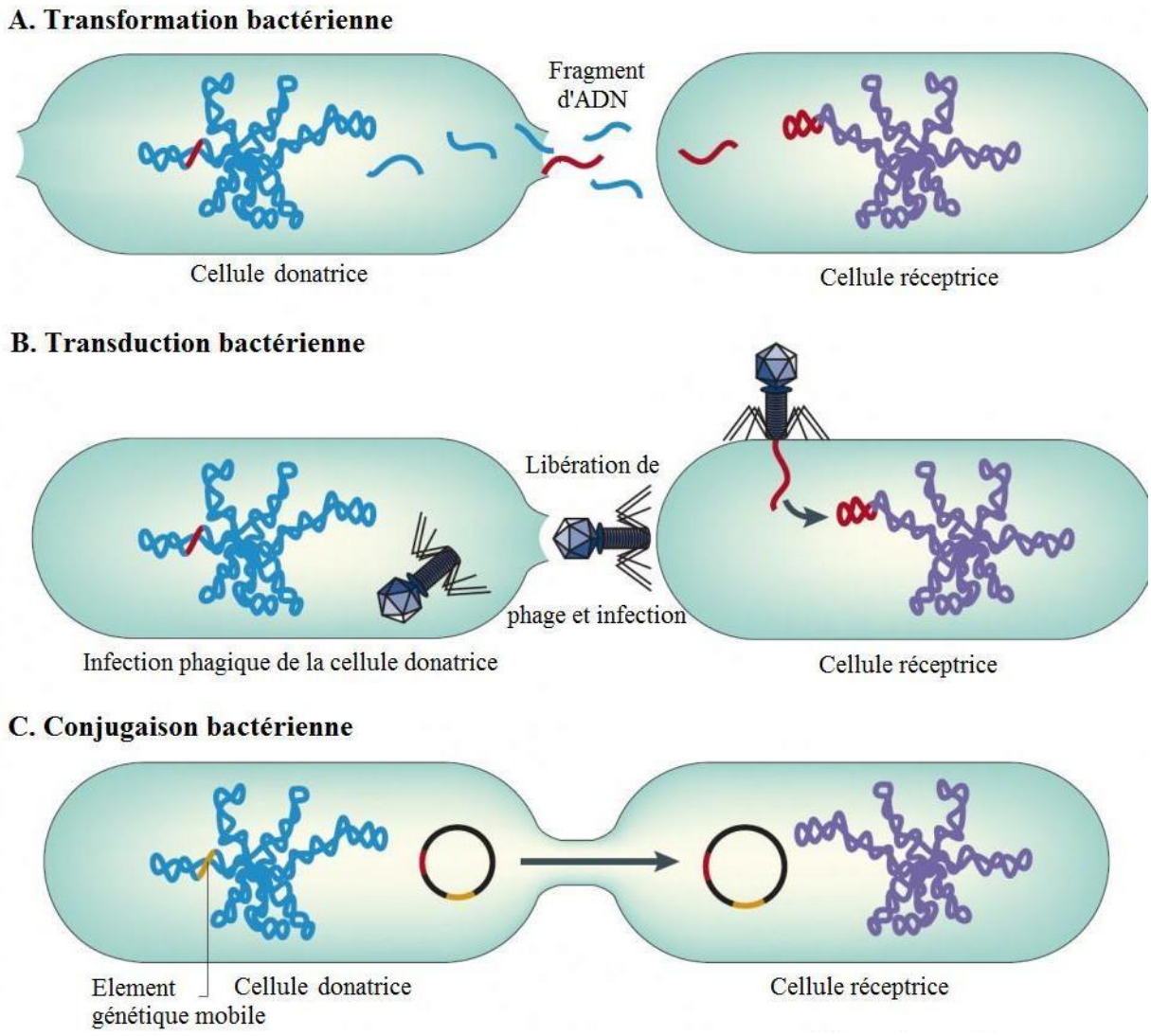


Figure 1 : Schéma des trois principaux mécanismes de transfert horizontal.
(d'après Furuya et Lowy, 2006)

A. La transformation bactérienne est possible lorsque des fragments d'ADN sont libérés par la lyse d'une cellule et sont captés par une cellule réceptrice avant intégration dans son génome.

B. La transduction bactérienne correspond au transfert d'ADN d'une cellule à une autre par l'intermédiaire d'une particule virale porteuse d'ADN bactérien et dite transductrice. L'acquisition de l'ADN est donc possible grâce à l'infection de la cellule réceptrice par cette particule transductrice.

C. La conjugaison bactérienne est un transfert d'information génétique lors d'un contact physique direct entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice. Durant ce transfert, l'ADN va se répliquer par cercle roulant. Ainsi, la cellule donatrice conserve toujours l'élément génétique malgré son transfert vers la cellule réceptrice.

extrachromosomique (plasmide) ou s'intégrer dans l'ADN génomique (recombinaison homologue, illégitime ou spécifique de site). Dans ce dernier cas, il sera transmis grâce à la réplication et la ségrégation chromosomique de l'hôte ; un plasmide quant à lui code pour ses propres fonctions de réplication et de partition.

2. *Les Eléments Intégratifs et Conjugatifs*

2.1. Caractéristiques des éléments génétiques mobiles, cas des ICE

Les évènements de transferts horizontaux impliquent fréquemment des éléments génétiques mobiles. Ce sont des fragments d'ADN portant un ensemble de gènes leur permettant de se déplacer dans un même génome ainsi que d'être transféré d'une cellule à une autre (Bellanger et al., 2013). Ils diffèrent du génome de l'hôte par leur pourcentage en G+C, un biais compositionnel en GC (« GC-skew ») et un usage de codons différent de celle du génome hôte (Hacker et Carniel, 2001). Ces caractéristiques permettent de conclure à une acquisition par transfert horizontal des éléments génétiques mobiles.

Ces éléments peuvent conférer un avantage sélectif à leur hôte dans un environnement donné (Wozniak et Waldor, 2010). Ainsi, l'élément *clc* de *Pseudomonas* sp. confère diverses fonctions cataboliques (Gaillard et al., 2006). L'ilot de pathogénicité ICE*Hin1056* a permis l'émergence de souches multi-résistantes d'*Haemophilus influenzae*, bactérie responsable de diverses pathologies (Dimopoulou et al., 2007). L'élément de symbiose R7A de *Mesorhizobium loti* porte tous les gènes impliqués dans la symbiose et dans la fixation d'azote (Ramsay et al., 2006).

Parmi ces éléments, certains sont capables de coder les fonctions nécessaires à leur excision sous forme circulaire libre dans l'organisme donneur, leur transfert par conjugaison puis leur intégration dans le génome de la bactérie réceptrice (figure 2). Ces ilots sont appelés Eléments Intégratifs et Conjugatifs (ICE). La fixation d'une intégrase sur ces séquences va permettre une recombinaison, dite « site spécifique », et entrainer l'excision ou l'intégration génomique de l'ICE (Bellanger et al., 2011). L'ensemble des gènes essentiels à la mobilité des ICE sont regroupés sous forme de modules, c'est-à-dire en groupes de gènes et de séquences conférant une même fonction. Ainsi, on peut identifier chez les ICE des modules de recombinaison, de conjugaison et de régulation.

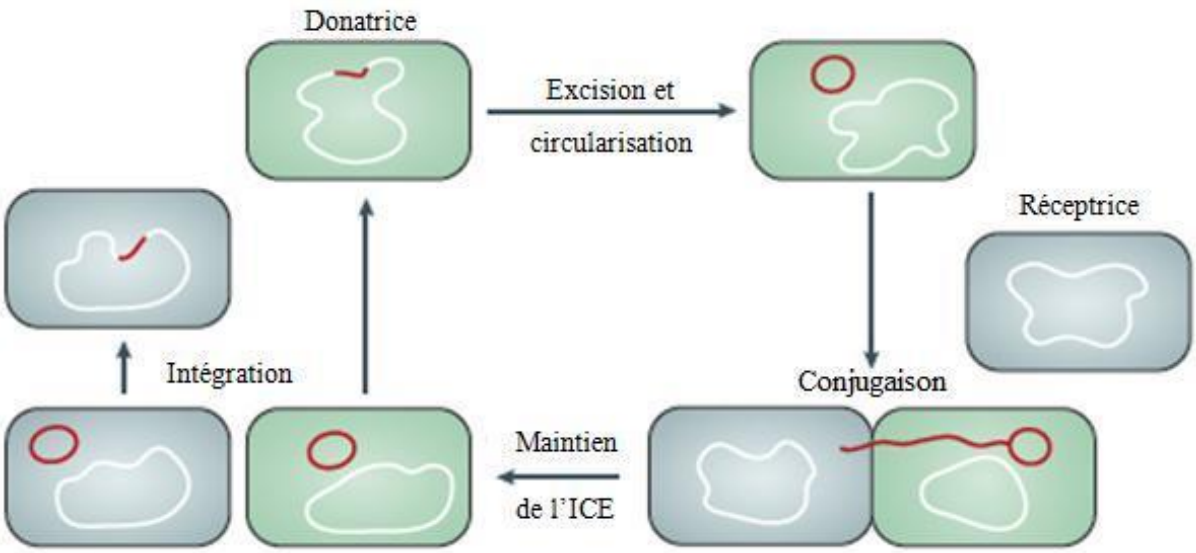


Figure 2 : Schéma de la propagation d'un ICE entre deux cellules.
(d'après Wozniak et Waldor, 2010).

Un ICE est intégré dans le chromosome de la cellule donatrice (cellule verte), il s'excise et se circularise par recombinaison site-spécifique. Ainsi, l'ICE se transfère par conjugaison dans une cellule ne le possédant pas. Il est nécessaire d'avoir un contact physique entre la cellule donatrice (verte) et la cellule réceptrice (grise). Un brin d'ADN de l'ICE se forme par réplication de type cercle roulant et est transféré dans la majorité des cas simultanément dans la cellule réceptrice. L'ADN simple brin de l'élément se circularise puis le brin complémentaire est obtenu grâce à la machinerie de l'hôte. La recombinaison site-spécifique permet l'intégration de l'ICE dans le chromosome de son nouvel hôte et dans celui de la cellule donatrice.

2.2. Mécanisme de transfert des ICE

Pour la majorité des ICE, une recombinase site spécifique à tyrosine, aussi nommée intégrase à tyrosine, codée par l'ICE, catalyse son excision sous forme circulaire. Elle reconnait des séquences identiques présentes dans les sites d'attachement (*att*) qui flanquent l'ICE, *attL* (à gauche) et *attR* (à droite) et conduit à la formation d'un site *attB* (bactérien) chromosomique et d'un site *attI* sur l'ICE (figure 3A).

Le mécanisme de transfert conjugatif des ICE est mal connu mais il semble que la plupart se transfèreraient sous forme simple brin, tout comme les plasmides conjugatifs. La conjugaison nécessite un contact physique entre la cellule donatrice et la cellule réceptrice pour la mise en place d'un pore de conjugaison (figure 4). Après la formation de ce dernier, l'ICE circulaire est clivé sur l'un de ces deux brins par une relaxase, formant ainsi le relaxosome. La prise en charge de ce complexe par une protéine de couplage permet le transfert de l'ICE simple-brin chez la cellule réceptrice (Bellanger et al., 2013; Llosa et al., 2002). Une fois transféré, l'ICE serait re-circularisé par la relaxase (Draper et al., 2005). Sa prise en charge par une primase de la cellule donatrice ou de la cellule réceptrice initie la synthèse du brin d'ADN complémentaire au moyen d'une amorce ARN et de la machine de réplication de l'hôte dans la cellule avant son intégration dans le génome.

L'évènement d'intégration chromosomique d'un ICE est catalysé par l'intégrase à tyrosine, tout comme l'excision, pour les ICE présentant ce type de recombinase. Elle permet la recombinaison site-spécifique entre le site *attB* de la bactérie réceptrice et le site *attI* de l'ICE sous forme circulaire (figure 3B). Ceci conduit donc à l'intégration de l'élément génétique mobile dans le génome de son nouvel hôte.

2.3. Eléments de la famille ICE*St3*

Les éléments de type ICE*St3* ont été découverts après une étude de l'extrémité 3' du gène *fda*, qui code une fructose 1,6-diphosphate aldolase putative, chez différentes souches de la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus*. Cette dernière est utilisée pour la fabrication de yaourt et appartient au phylum des firmicutes et plus précisément au groupe des streptocoques *viridans* avec *Streptococcus vestibularis* et *Streptococcus salivarius* (Facklam, 2002). Cette étude a révélé la présence d'un ensemble d'ICE dont les modules de recombinaison et de conjugaison présentent un pourcentage d'identité élevé (95% d'identité nucléotidique) (Bellanger, 2009; Carraro, 2011). Ces ICE ont ainsi été regroupés sous le

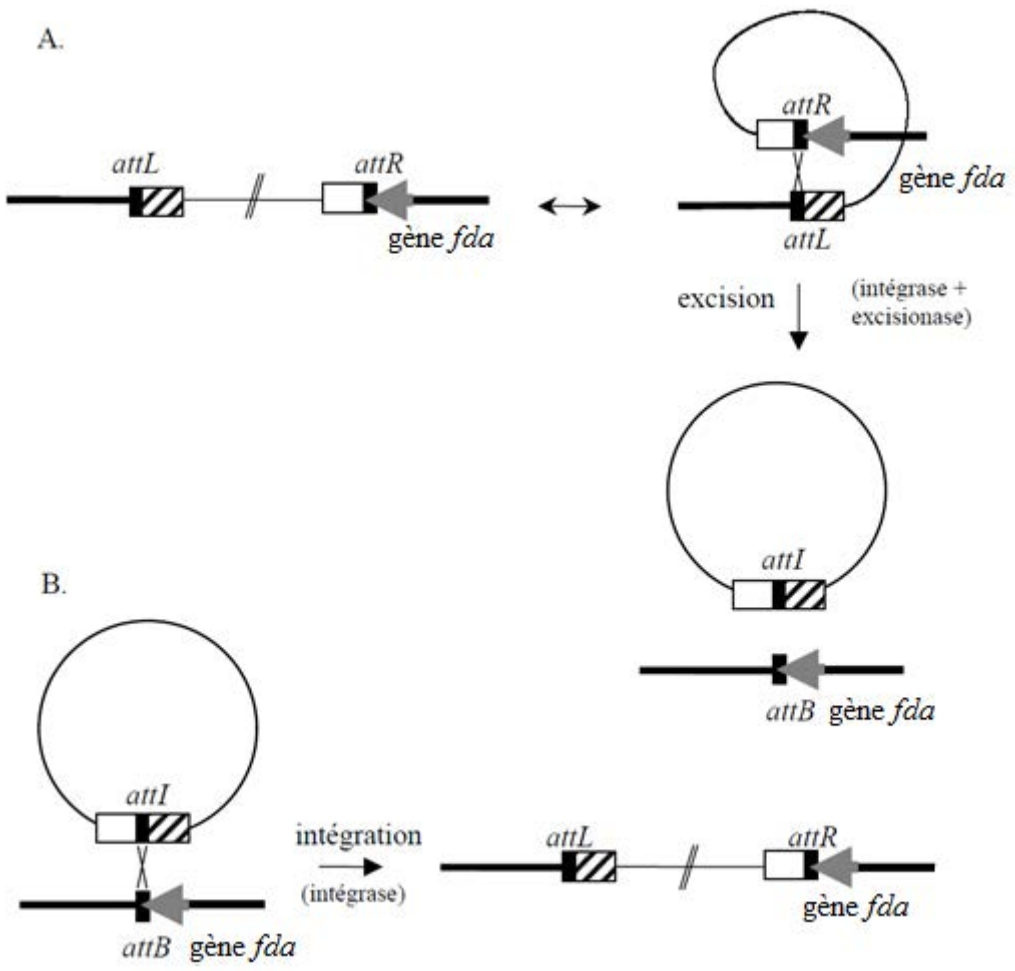


Figure 3 : Schéma de l'excision d'un ICE (A) et de l'insertion site spécifique (B) via l'activité d'une recombinase à tyrosine.
(d'après Bellanger, 2009)

Les ICE sont bornés par les sites d'attachement *attL* et *attR*. Ces derniers sont composés de séquences identiques directes ou inversées (représenté par un rectangle noir) ainsi que d'un bras spécifique au site (représentés par des rectangles : hachuré pour *attL* et blanc pour *attR*).

A. Excision. Suite à l'activité de la recombinase à tyrosine, les sites d'attachement *attL* et *attR* subissent la recombinaison site-spécifique. Il se produit alors l'excision de l'élément qui adopte une structure extrachromosomique circulaire. Celle-ci porte le site *attI,* formé à partir d'une séquence identique et des deux bras, et le chromosome porte le site *attB*, formé uniquement d'une séquence identique.

B. Intégration. L'intégrase à tyrosine catalyse la recombinaison entre les séquences identiques des sites *attI* et *attB* conduisant à l'intégration chromosomique de l'ICE et la reformation des sites *attL* et *attR*.

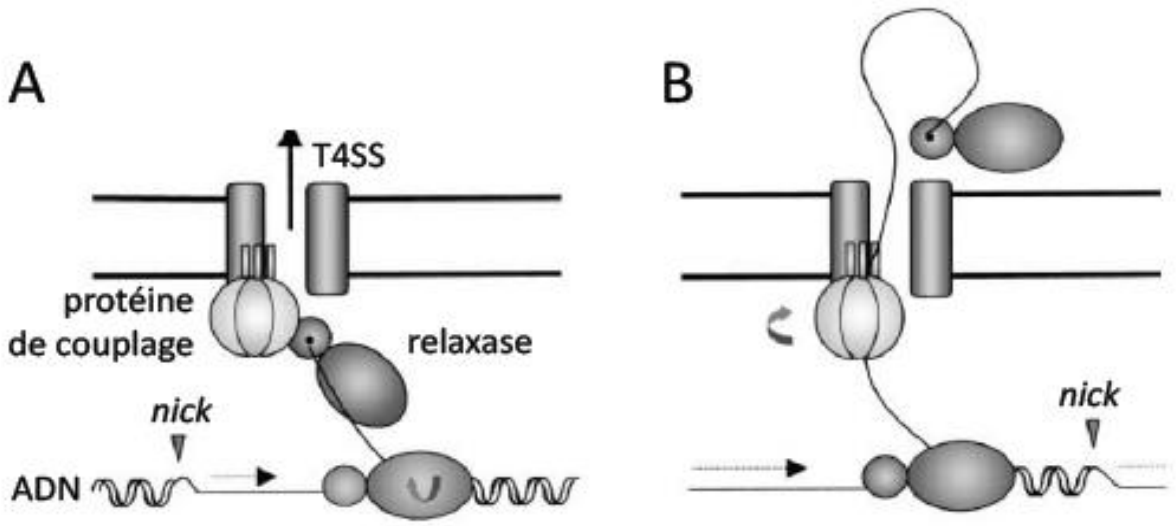


Figure 4 : Transfert conjugatif d'un élément génétique mobile.
(d'après Llosa et al., 2002)

A. La relaxase clive l'un des deux brins d'ADN (site *nick)* au niveau de l'*oriT* (site origine de transfert) et le déroule via une activité hélicase consommant de l'ATP. Dans un même temps, le deuxième brin se réplique par cercle roulant (représenté par une flèche). La relaxase fixée à l'ADN est recrutée par une protéine de couplage au niveau du pore de conjugaison qui est une machinerie de sécrétion de type IV (T4SS).

B. La protéine de couplage permet le passage de la relaxase et de l'ADN simple brin par le pore grâce à une activité ATPase. Une fois l'ADN simple brin dans la cellule réceptrice, il est re-circularisé par la relaxase, avant intégration.

terme d' « éléments de la famille ICE*St3* » (Pavlovic et al., 2004). ils sont capables de se transférer par conjugaison entre différentes souches de *S. thermophilus* mais aussi vers d'autres espèces telles que *Streptococcus pyogenes* et *Enterococcus faecalis* (Bellanger et al., 2009). Il a été aussi démontré que des éléments de la famille ICE*St3* pouvaient aussi s'intégrer à l'extrémité des gènes *rpsI*, codant pour une protéine de la sous-unité ribosomique 30S, et *rpmG*, codant pour une protéine de la sous-unité ribosomique 50S (com. pers., S. Payot et N. Leblond).

3. Induction de l'état de compétence chez les streptocoques

La compétence naturelle, ou transformation naturelle, a été découverte pour la première fois chez *Streptococcus pneumoniae* (Griffith, 1928) et définie comme un état physiologique transitoire durant la croissance bactérienne qui permet à une cellule d'internaliser un fragment d'ADN exogène, qui sera ensuite intégré ou non au génome. Celle-ci est induite par divers stimuli environnementaux : densité cellulaire (Havarstein et al., 1995), stress acide, oxydatif (Wen et al., 2005) ou antibiotique (Prudhomme et al., 2006) et ne touche qu'une partie de la population bactérienne. Ainsi, lors d'un stress, l'ADN exogène pourrait remplacer une séquence endogène endommagée. Ce mécanisme pourrait être un système de réparation d'ADN chez les streptocoques, comme *S. pneumoniae,* déficients en système SOS (Gasc et al., 1980; Shinagawa, 1996).

3.1. Mise en place de la compétence chez *S. pneumoniae*

Chez *S. pneumoniae,* l'état de compétence est induit par les opérons *comAB* et *comCDE*, gènes dits précoces et constitutifs de la compétence. Ils codent pour un système de quorum-sensing (QS) peptide dépendant (Figure 5).

Le gène *comC* code pour un peptide inactif de 45 acides aminés (aa), appelé pré-Competence Stimulating Peptide (pré-CSP) (Havarstein et al., 1995). Celui-ci est pris en charge par le système ComA-ComB, un transporteur ATP Binding Cassette (ABC) qui va cliver le pré-CSP au niveau d'un motif Gly-Gly conduisant à sa maturation en un peptide de 17 aa, CSP, qui est par la suite excrété par ce même transporteur (Johnsborg et Håvarstein, 2009). CSP est la molécule signal à la base de la régulation positive de l'état de compétence chez *S. pneumoniae*. Sa présence dans l'environnement extracellulaire est détectée par un système de transduction de signal à deux composants formé de ComD et ComE (Stock et al., 2000). Ainsi, les gènes *comC, comD* et *comE* forme un système de quorum-sensing (QS) qui

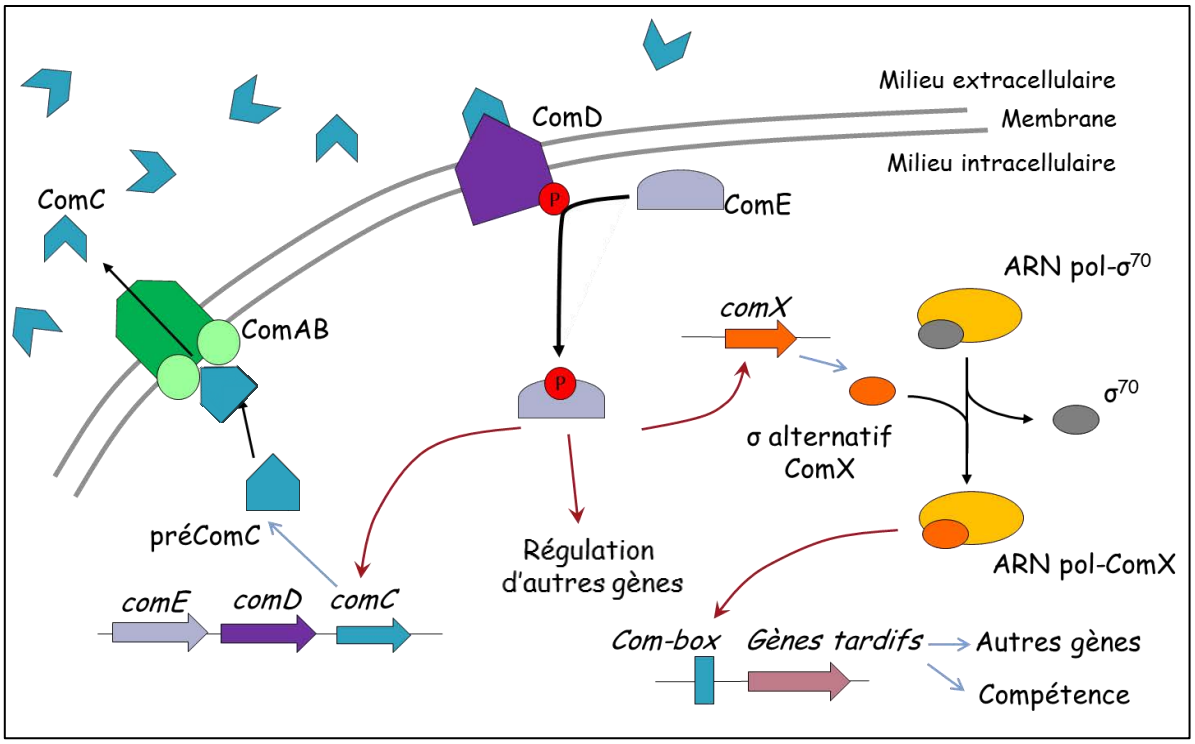


Figure 5 : Modèle de la mise en place de l'état de compétence chez *S. pneumoniae.*

(d'après Cvitkovitch, 2001)

→ Expression génique

→ Interaction protéique

→ Régulation transcriptionnelle

est un mécanisme de synchronisation de l'expression (ou répression) d'un ou de plusieurs gènes au sein d'une population bactérienne et ce en fonction de la densité cellulaire.

ComD présente deux domaines aux fonctions distinctes : un domaine senseur transmembranaire en N-ter et un domaine kinase intracellulaire en C-ter. Sa structure étant très proche de la majorité des histidine-kinases, ComD est classée comme telle (Iannelli et al., 2005). ComE est un régulateur transcriptionnel intracellulaire portant un domaine CheY-like en N-ter et un domaine de liaison à l'ADN de type HTH en C-ter (Nikolskaya et Galperin, 2002) .

Quand la concentration de CSP atteint une valeur seuil, il se fixe de façon spécifique à ComD conduisant à l'autophosphorylation de ce dernier au niveau de sa partie intracellulaire. Le groupement phosphate est ensuite transféré au régulateur ComE qui est ainsi activé. Ce dernier va se lier à une séquence spécifique de l'ADN situé dans la partie promotrice de ses gènes cibles. Une vingtaine de gènes sont ainsi ciblés dont les gènes des opérons *comAB* et *comCDE* et le gène *comX*, codant un facteur σ alternatif, sigmaX, qui peut substituer au facteur sigma « de ménage ».

Une fois lié à l'ARN polymérase, sigmaX permet la reconnaissance d'un ensemble de gènes qui présentent une séquence de liaison conservée au cours de l'évolution. Cette séquence (TAGCGAATA), appelé *combox* ou *cin-box*, correspond à la boite promotrice -10 des gènes ciblés. Ainsi, environ 60 gènes de compétence tardifs, d'acquisition d'ADN exogène, de la machinerie de recombinaison et de réparation de l'ADN vont être régulés positivement par sigmaX.

3.2. Induction de la compétence chez le groupe des streptocoques *viridans*

Des analyses de plusieurs génomes de *S. thermophilus* avait permis de mettre en évidence la présence du gène *comX* ainsi que de plusieurs gènes de compétence tardifs indispensables pour l'induction de la compétence naturelle (Hols et al., 2005). Cependant, aucun système de quorum-sensing orthologue à *comABCDE* de *S. pneumoniae* et *blpABCHR* de *S. mutans*, régulant les gènes de compétence, n'avait été identifié lors de cette étude.

L'identification de la phéromone du système QS gouvernant le développement de la compétence naturelle a permis de comprendre le mécanisme d'activation du gène *comX* de la souche *S. thermophilus* LMD-9 (Fontaine et al., 2010) (figure 6). Au cours de la croissance

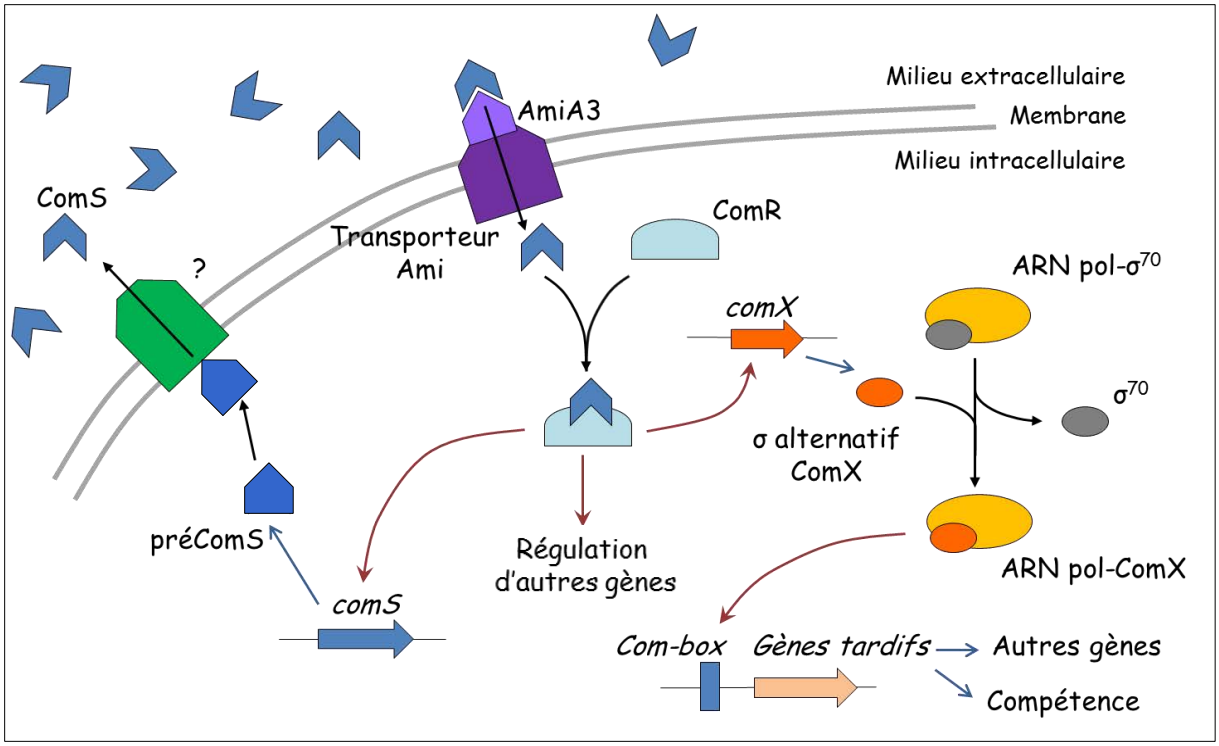


Figure 6 : Modèle de la mise en place de l'état de compétence chez *S. thermophilus.*

(d'après Gardan et al., 2013)

→ Expression génique

→ Interaction protéique

→ Régulation transcriptionnelle

ComS. Les mécanismes de maturation et d'excrétion n'ont cependant pas encore été identifiés bien qu'ils soient indispensables pour l'activation et l'activité de ComS (Gardan et al., 2013).

Il a été montré que l'opéron *ami* était essentiel pour l'induction de la transcription de *comX* et donc de l'état de compétence de *S. thermophilus* LMD-9 lors d'une croissance en milieu chimiquement défini (MCD) (Gardan et al., 2009). En effet, lorsque la concentration extracellulaire de ComS atteint un niveau critique, le peptide se lie à la protéine membranaire AmiA3 et est internalisé par le transporteur ABC Ami. Son interaction avec le régulateur cytoplasmique ComR va activer ce dernier lui permettant de se lier de façon spécifique aux promoteurs de type *com-box* et de réguler positivement ses gènes cibles dont *comX* (Gardan et al., 2013).

La transformation naturelle de *S. thermophilus* n'a été démontrée que chez la souche LMD-9. En effet, chez les souches CNRZ1066 et LMG18311, seul l'apport exogène du peptide signal permet l'entrée en état de compétence et l'activation de *comX* (Fontaine et al., 2010).

La présence d'un transporteur ABC Ami fonctionnel chez *S. salivarius*, et ayant le même rôle que chez *S. thermophilus,* n'a pas été démontrée. Cependant, Fontaine et al. supposent qu'il est fort possible que *S. salivarius* présente un opéron *amiCDE* jouant le même rôle étant donné l'induction de la compétence chez celle-ci par l'ajout de ComS et la forte proximité phylogénétique de *S. salivarius* et *S. thermophilus* (Fontaine et al., 2010).

3.3. Acquisition de l'ADN exogène

En plus de l'état de compétence, la transformation naturelle des bactéries repose sur la mise en place d'une structure protéique permettant la capture d'ADN exogène, son internalisation et son insertion dans le génome de la bactérie hôte. Ce mécanisme est codé par un ensemble d'opérons appartenant au régulon *com,* et donc exprimé uniquement par les cellules compétentes (figure 7).

3.3.1. Capture et internalisation de l'ADN

La capture de l'ADN exogène n'a été décrite que chez *S. pneumoniae* malgré la possibilité de transformer naturellement d'autres streptocoques. Elle repose sur l'expression des gènes d'un opéron conservé chez toutes les bactéries à coloration de Gram positive transformables, l'opéron *comG* (Chen and Dubnau, 2004). Ce dernier code pour des protéines qui sont fortement homologues à des protéines permettant l'assemblage d'un pili de type IV

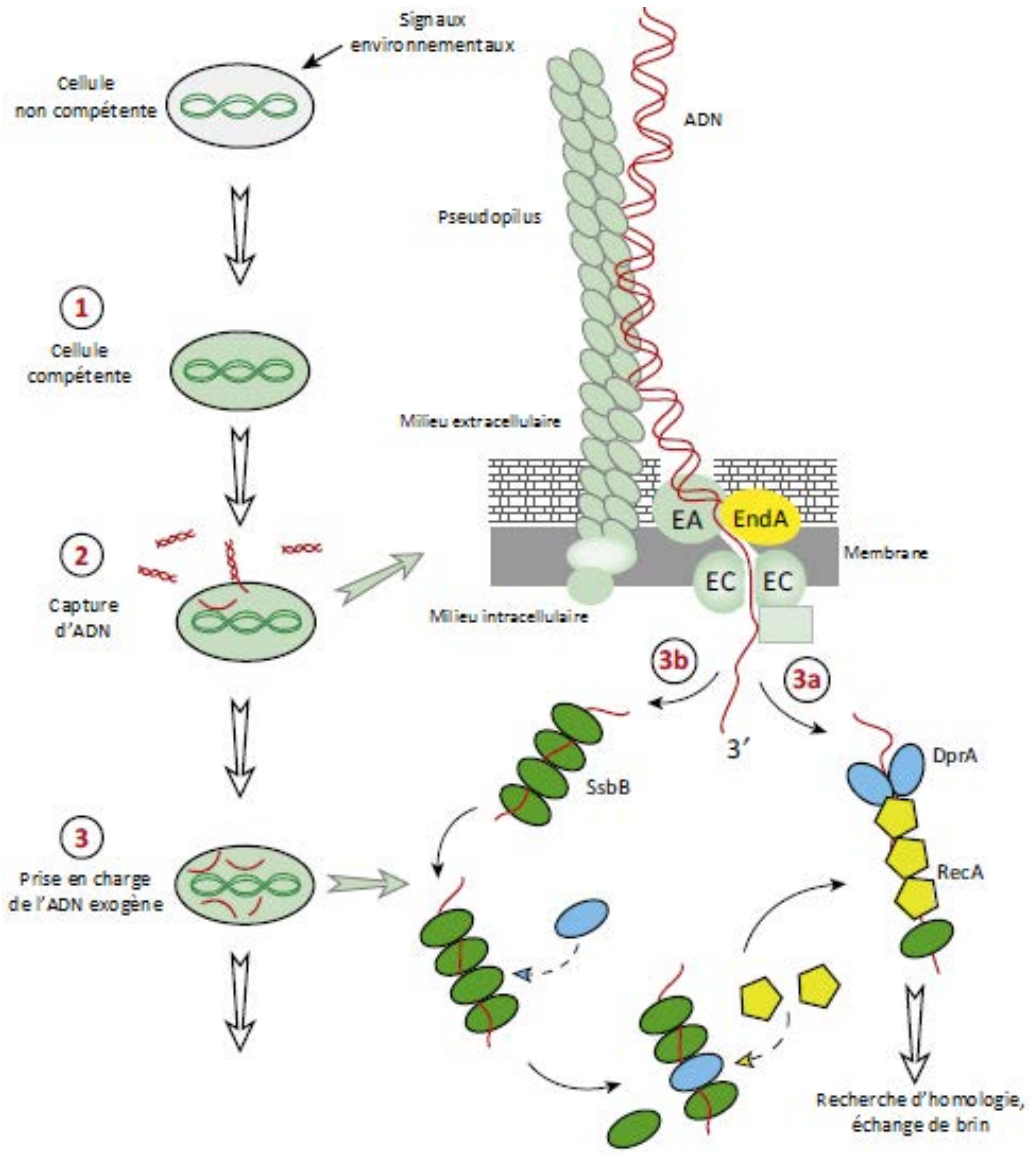


Figure 7 : Etapes initiales du processus de transformation naturelle chez *S. pneumoniae* (Johnston et al., 2014a)

Des signaux environnementaux induisent l'état de compétence chez un pneumocoque. Une fois compétente (1), la cellule peut capter un ADN double brin via un pseudo-pilus de type IV, formé par un ensemble de protéines codées par l'opéron *comG*. Après capture, il interagit avec le récepteur membranaire ComEA avant d'être transféré à la nucléase EndA (2). Celle-ci dégrade l'un des deux brins assurant ainsi l'internalisation d'un ADN simple brin par le pore transmembranaire ComEC. Une fois internalisé, DprA se lie à l'ADN, permettre la fixation et la polymérisation de RecA et la recombinaison homologue par recherche d'homologie et échange de brin (3a). De plus, des protéines SsbB peuvent se fixer à l'ADN simple brin afin de le protéger des nucléases cellulaires et de créer un réservoir d'ADN pour des recombinaisons homologues ultérieures (3b). Le chromosome de l'hôte est représenté en vert et l'ADN exogène en noir (simple ou double brin).

chez les bactéries Gram positif. Il permet l'expression d'une ATPase (ComGA), une protéine transmembranaire (ComGB), une prépiline majeure (ComGC) et cinq prépilines en plus faible proportion. Ces prépilines vont être clivées par ComC, une prépiline peptidase, puis assemblées en un pseudo-pilus via des ponts disulfures (Chen et al., 2006; Laurenceau et al., 2013).

Le type d'interaction du pseudo-pilus avec l'ADN reste encore inconnu et se ferait de façon non spécifique, mais ce dernier reste indispensable pour la capture d'ADN exogène (Chen and Dubnau, 2004; Laurenceau et al., 2013). Il est proposé que ce pseudo-pilus permettrait de limiter les forces de répulsion électrostatique entre l'ADN et la surface cellulaire et améliorerait donc la capacité de transformation des bactéries (Johnston et al., 2014a).

Suite à son interaction avec le pseudo-pilus, l'ADN se lie au récepteur membranaire ComEA avant d'interagir avec la nucléase EndA (Bergé et al., 2013). Cette dernière est exprimée constitutivement et est répartie uniformément dans la membrane. Lors de l'entrée en état de compétence, elle se relocalise au niveau de ComEA où elle va dégrader l'un des deux brins de l'ADN exogène via une activité exonucléase 5'→3'. L'ADN simple brin ainsi formé va être ensuite internalisé par le pore ComEC.

3.3.2. Devenir de l'ADN internalisé

Afin que l'ADN internalisé se maintienne dans son nouvel hôte, il doit être intégré par recombinaison homologue au génome de ce dernier. Cet évènement n'est possible qu'en présence de la recombinase bactérienne RecA qui, chez les streptocoques, est notamment surexprimée durant l'état de compétence (Claverys et al., 2009). Chez *Escherichia coli*, RecA n'est active qu'en présence du complexe RecBCD qui permet notamment la formation d'extrémités 3' libres sur l'ADN exogène (Dillingham and Kowalczykowski, 2008). Etant donné que l'ADN est incorporé sous forme simple brin, RecBCD n'a pas d'utilité lors de la transformation de *S. pneumoniae* (Claverys et al., 2009). Cependant, l'interaction de RecA avec l'ADN internalisé puis la recombinaison homologue ne peuvent se faire que si la nucléase interagit avec DprA, une protéine de chargement (Quevillon-Cheruel et al., 2012). Ainsi, RecA va se polymériser sur le simple brin d'ADN, permettre la recherche d'homologie sur l'ensemble du génome de l'hôte et enfin l'échange de brin.

De plus, l'ADN internalisé sous forme simple brin linéaire est fragile de par son état. Ainsi, SsbB, protéine de conservation de l'intégrité du génome, joue un rôle essentiel dans la

transformation. Premièrement, elle se lie à l'ADN simple brin internalisé et le protège des nucléases endogènes, avant de jouer un rôle dans la polymérisation de RecA, bien que ce rôle ne soit pas encore complètement défini. Troisièmement, SsbB permet de créer un réservoir d'ADN simple brin pour des évènements de recombinaison ultérieurs. Cette dernière fonction entraine de multiples évènements de recombinaison dans une même cellule, contribuant ainsi à une forte plasticité génomique (Johnston et al., 2014a).

3.4. Fonctions associées à l'état de compétence chez *S. pneumoniae*

Il a récemment été montré par une analyse de puces à ADN que le génome de *S. pneumoniae* contient plus de 100 gènes dont l'expression est sensible à la présence de CSP. Une soixantaine de ces gènes n'ont aucun impact sur la capacité de transformation de l'organisme, indiquant fortement que le régulon *com* intervient dans des fonctions autres que la transformation génétique.

3.4.1. Lyse fratricide

La lyse fratricide est un mécanisme impliquant des gènes induits par la compétence qui engendre une lyse des cellules non compétentes par des cellules génétiquement identiques ayant acquis ce dit état (Claverys and Håvarstein, 2007). Chez les bactéries Gram positives, ce mécanisme n'est clairement défini que chez *S. pneumoniae* et impliquerait quatre gènes appartenant au régulon *com*. Deux de ces gènes codent pour des facteurs de lyse de type muréine hydrolases, CbpD et LytA. Les deux autres codent pour une bactériocine de type IIb ; la présence des deux peptides, CibA et CibB, est essentielle à l'activité bactériocine.

Les bactéries produisant ces toxines ont besoin de se protéger afin d'éviter l'autolyse. Pour cela, *S. pneumoniae* produit deux facteurs d'immunité. Le premier est CibC, un peptide de 65 résidus aminés dont l'inactivation rend les cellules compétentes sensibles à leurs propres toxines. La deuxième immunité est codée par le gène précoce *comM*. Bien qu'il soit clairement montré que ces deux facteurs sont essentiels pour éviter l'autolyse, le mécanisme qui leur permet de conférer l'immunité reste encore inconnu.

Différentes hypothèses sont possibles quant à la raison d'être d'un tel mécanisme. En considérant le mode de vie de *S. pneumoniae* dans les voies respiratoires supérieures, la lyse fratricide libèrerait des facteurs de virulence qui permettraient d'échapper à l'action des neutrophiles. Elle pourrait également permettre d'avoir un plus large panel de fragments d'ADN potentiellement incorporables par transformation naturelle.

3.4.2. Arrêt de la division cellulaire

L'induction de la compétence entraine un arrêt transitoire de la croissance chez *S. pneumoniae*. Bien que cela n'ait pas encore était montré, cet arrêt de croissance pourrait améliorer la capture de l'ADN. En effet, le système ComE, qui permet l'internalisation de l'ADN exogène, se localise au milieu de la cellule à mi-distance des pôles, soit à l'endroit de la septation du cycle cellulaire. Johnston *et al.* supposent que l'absence de division permettrait d'éviter le désassemblage de la machinerie de capture de l'ADN (Johnston et al., 2014a). De plus, une septation durant la phase de recombinaison homologue pourrait engendrer un mauvais réarrangement chromosomique et nuirait à l'intégrité du chromosome.

4. Présentation de l'organisme étudié : Streptococcus salivarius

S. salivarius a été décrite pour la première fois par Andrewes et Horder en 1906. C'est une bactérie commensale particulièrement présente au niveau de la cavité buccale humaine. Elle est l'une des premières à coloniser les épithéliums buccaux et naso-pharyngés chez les nouveau-nés (Aas et al., 2005). Cette bactérie à coloration Gram positive est anaérobie facultative et ses cellules, en forme de coque, s'organisent en chainette.

Son génome possède un faible pourcentage en bases G et C (compris entre 35,7 et 39,8 %). Son chromosome est circulaire et sa taille est en moyenne de 2,2 Mb, avec 1979 gènes prédits comme codant pour une protéine chez la souche JIM8777 (Guedon et al., 2011). En plus de l'ADN chromosomique, on peut constater la présence d'un méga-plasmide chez certaines souches d'environ 185 kb avec une teneur en G+C avoisinant les 35% (Heng et al., 2011; Barretto et al., 2012).

Certaines souches telles que *S. salivarius* K12 sont mutualistes. En effet, celle-ci croît facilement dans la cavité orale (Roger et al., 2011) et en échange, elle produit des bactériocines protégeant son hôte contre des pathogènes tels que *Streptococcus pyogenes* (Tagg, 2004). D'autres souches sont des pathogènes opportunistes provoquant de graves infections nosocomiales comme des bactériémies lors d'interventions chirurgicales (Marron et al., 2000) ou bien des infections telles que des méningites (Conte et al., 2006) ou des endocardites (Abdul-Redha et al., 2010).

5. ***Objectif du stage***

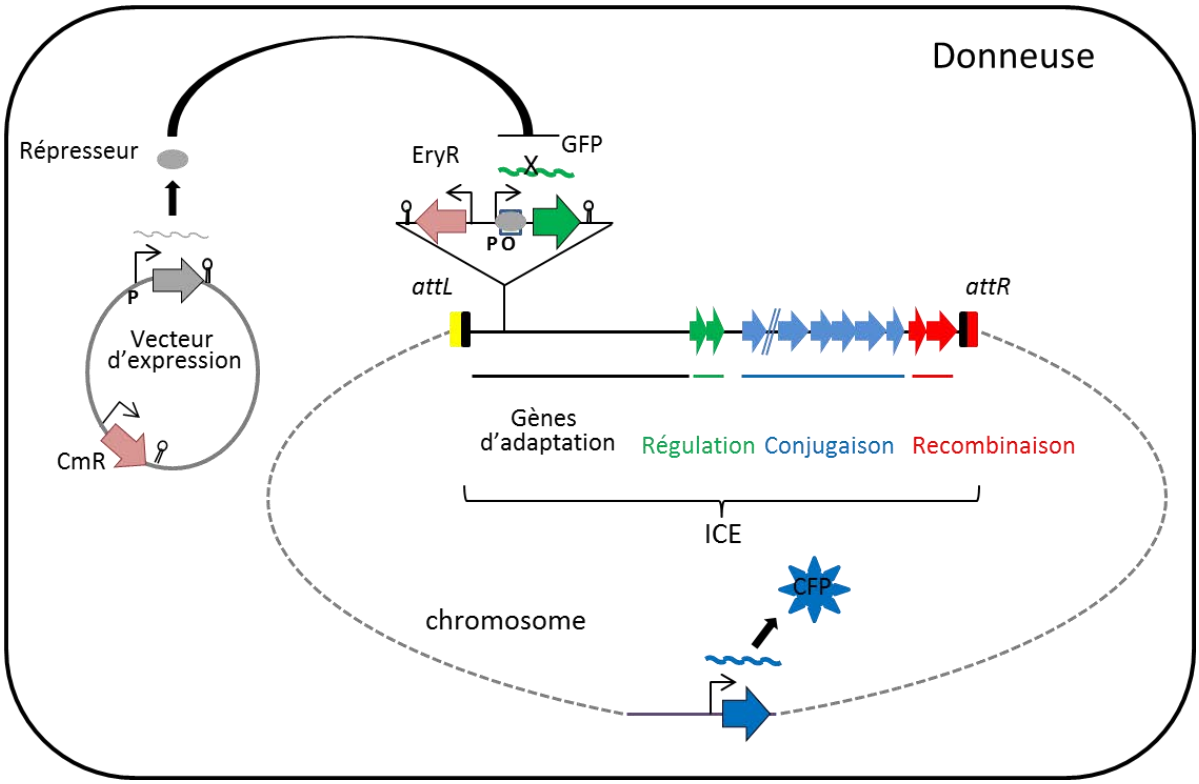
L'équipe ICE-TeA du Laboratoire DynAMic a comme thématique de recherche l'étude du rôle des ICE dans l'évolution du génome de *S. salivarius* et de leur impact potentiel dans l'émergence de souches pathogènes. Pour cela, elle dispose d'une collection de souches de *S. salivarius* commensales et cliniques.

La présence d'ICE putatifs de la famille ICE*St3* a été recherchée par PCR par détection des gènes d'intégrase, de relaxase et de protéine de couplage dans cette collection de *S. salivarius*. Ceci a conduit à la sélection d'un ensemble de souches dont le génome a été entièrement séquencé afin d'obtenir la séquence d'éléments de la famille ICE*St3* putativement fonctionnels. Ainsi, 16 souches présentant des éléments de la famille ICE*St3* ont été sélectionnées ainsi que la souche B63 qui n'en possède pas (Tableau 1A) afin d'être utilisées pour étudier le transfert d'ICE par conjugaison. Il est prévu d'étudier le transfert des ICE de ces souches en marquant ces éléments génétiques par un gène de résistance aux antibiotiques mais également par un gène codant une protéine fluorescente dont le promoteur est sous contrôle d'un répresseur (Figure 8). Cette stratégie de marquage repose sur la transformation des souches par compétence naturelle.

L'objectif de mon stage de master 2 était de déterminer le potentiel de transformation des 17 souches sélectionnées afin de permettre dans un second temps le marquage des ICE de ces souches pour l'analyse de leur transfert par conjugaison.

.

Figure 8 : Représentation schématique du système de suivi du transfert d'ICE chez la bactérie donneuse entre deux souches de *S. salivarius*



Les bactéries donneuses seront marquées par un gène de fluorescence (CFP : cyan fluorescent protein) exprimé de façon constitutive permettant de suivre l'évolution de cette population. L'ICE qu'elles portent sera marqué par un autre gène de fluorescence (GFP : green fluorescent protein), avec contrôle de l'expression par un répresseur. Ce dernier sera exprimé de façon constitutive grâce à un vecteur d'expression non intégrable au génome et non transférable. Lors du transfert par conjugaison de l'ICE, l'expression de la GFP ne sera plus réprimée. Ainsi, les bactéries donneuses et receveuses pourront être différenciées par microscopie à fluorescence.

MATERIEL ET METHODES

1. *Souches bactériennes et conditions de culture.*

Les souches d'intérêt de *S. salivarius*, ainsi que deux souches supplémentaires, utilisées lors de ces travaux utilisées, sont répertoriées dans le tableau 1 (page 11 bis). Elles appartiennent à une collection de souches de *S. salivarius* constituée de souches commensales qui ont été isolées au laboratoire à partir de prélèvements de salive (485 souches) et de fèces (430 souches) de cinq individus sains. De plus, elle comporte 105 souches cliniques, potentiellement pathogènes, isolées de prélèvements de patients atteints de diverses maladies, au sein de différents Centres Hospitaliers Universitaires (CHU) (Besançon, Limoges, Nancy et Tours).

Les cultures ont été réalisées à partir de cultures conservées à -80°C dans du milieu GM17 additionné de glycérol (20% final). La composition de ce milieu est détaillée dans le tableau 2A. Les souches cliniques ont été manipulées dans le secteur en confinement L2 du laboratoire.

Les différents plasmides utilisés ont été extraits de souches d'*Escherichia coli* DH5α électrotransformées (Tableau 3). Les cultures ont été réalisées à partir des stocks conservés à -80°C dans du milieu Luria Bertani (LB) additionné de glycérol (20% final). La composition de ce milieu est détaillée dans le tableau 2B.

Lors des expériences de transformation naturelle et d'électrotransformation de *S. salivarius*, les transformants ont été étalés sur milieu GM17 additionné de (ou des) antibiotiques nécessaires à leur sélection en fonction de l'ADN utilisé. A ces fins, la rifampicine est utilisée à une concentration de 75 µg/mL, le chloramphénicol à 20 µg/mL, la spectinomycine à 500 µg/mL et l'érythromycine à 5µg/mL.

2. *Recherche in silico des gènes essentiels pour la transformation naturelle*

Le séquençage des génomes des souches d'intérêt de *S. salivarius* a été réalisé avec un séquenceur Illumina Hiseq 2500 par Beckman Coulter Genomics avec la méthode dite de paired-end en amplifiant des régions de deux fois 100 pb. Le Phred Quality Score obtenu est égal ou supérieur à 30, indiquant une très grande qualité de séquence (99,9% de précision à minima à chaque position nucléotidique).

<u>Tableau 1 :</u> souches de *S. salivarius* d'intérêt

A. **Ensemble des souches dont le génome a été séquencé**

souches	type de souche	individu	provenance	élément d'intérêt
F1-4	Commensale	individu 1	Fèces	ICE*St3* au locus *fda*
F1-8				ICE*St3* au locus *rpmG*
F6-1		individu 6		ICE*St3* au locus *rpsI*
B35	Clinique		Besançon	ICE*St3* au locus *rpsI*
B50				dérivé d'ICE*St3* au locus *fda* et ICE*St3* au locus *rpsI*
B57				ICE*St3* défectif
B63				Aucun ICE présent
L11			Limoges	ICE*St3* au locus *fda*
L22				ICE*St3* au locus *fda*
L25				ICE*St3* au locus *fda*
L45				ICE*St3* au locus *rpsI*
L50				ICE*St3* au locus *rpsI*
L60				ICE*St3* au locus *rpsI*
L64				ICE*St3* au locus *fda*
N5			Nancy	ICE*St3* au locus *fda*
N20				ICE*St3* au locus *rpsI*
T93			Tours	ICE*St3* au locus *fda*

B. Souches supplémentaires utilisées

souche	type de souche	individu	provenance	Caractéristiques
JIM8777	Commensale			Souche de référence[1]
F1-37 Rifampicine résistante	commensale	individu 1	Fèces	Souche utilisée pour l'extraction d'ADN génomique

[1] : (Guedon et al., 2011)

<u>Tableau 2</u>: Composition des milieux de cultures utilisés

A. Milieu de culture M17 (Terzaghi and Sandine, 1975).

Composition du milieu GM17 (pour 1 L)	
Tryptone	5,0 g
Peptone de Soja	5,0 g
Extrait de viande en poudre	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Acide ascorbique	0,5 g
Sulfate de magnésium	0,25 g
Glycérophosphate disodique	19,0 g
Eau ultra-pure	qsp 1 L
pH	6,9 ± 0,2

L'obtention de M17 solide se fait par addition de 20 g d'agar pour 1L de M17 avant autoclave.

Le milieu GM17 est préparé à partir de milieu M17 autoclavé à 120°C et d'une solution de glucose 20% (200 g de glucose pour 1 L) préalablement autoclavée à 110°C. La solution de glucose est ajoutée au milieu M17 afin d'obtenir une concentration de glucose à 1% final.

B. Milieu de culture Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989)

Composition du milieu LB (pour 1 L)	
Tryptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
qsp H_2O	1 L
pH	7,2 - 7,5

C. Milieu de culture MCD (Otto et al., 1983)

Composition du milieu MCD (pour 1 L)			
Constituants	Concentration	Constituants	Concentration
Lactose	10 g	Cyanocobalamine	0,001 g
Na-acetate	1 g	Adenine	0,01 g
NH4-citrate	6 g	Guanine	0,01 g
KH2PO4	3 g	Uracile	0,01 g
K2HPO4	2,5 g	Xanthine	0,01 g
MgCl2, $6H_2O$	0,2 g	Acide aspartique	0,46 g
CaCl2, $2H_2O$	0,05 g	Asparagine	0,35 g
MnSO4, H_2O	0,028 g	Acide glutamique	0,4 g
FeCl2, $4H_2O$	0,005 g	Glutamine	0,39 g
ZnSO4, $7H_2O$	0,005 g	Lysine	0,44 g
CoCl2, $6H_2O$	0,0025 g	Arginine	0,13 g
CuSO4, $5H_2O$	0,0001 g	Histidine	0,15 g
Acide ascorbique	0,5 g	Proline	0,68 g
p- amino acide benzoique	0,01 g	Phenylalanine	0,28 g
Biotine	0,01 g	Tryptophane	0,05 g
Acide orotique	0,005 g	Methionine	0,13 g
2-Deoxythymidine	0,005 g	Alanine	0,24 g
Inosine	0,005 g	Valine	0,33 g
Pyridoxamine-HCl	0,005 g	Leucine	0,48 g
DL-6,8-acide thioctique	0,0025 g	Isoleucine	0,22 g
Pyridoxine-HCl	0,002 g	Glycine	0,18 g
Acide Nicotinique	0,001 g	Serine	0,34 g
Riboflavine	0,001 g	Threonine	0,23 g
Ca-pantothenate	0,001 g	Cysteine	0,25 g
Thiamine-HCl	0,001 g	Tyrosine	0,29 g
Acide folique	0,001 g	qsp H_2O ultra pure	1 L

<u>Tableau 3 :</u> Ensemble des plasmides utilisés comme ADN pour les transformations.

Plasmide	Souche hôte	Antibiotiques	Caractéristiques
pIB166-gntR	*DH5α*	Chloramphénicol	plasmide codant le répresseur GntR
pOri23-pgnt-gfp		Spectinomycine Erythromycine	plasmide portant le gène *gfp* sous le contrôle du promoteur du gène *gnt*

Les contigs (de taille supérieure à 200 pb) ont été générés pour chaque génome grâce au logiciel clc genomics workbench (clc bio) puis assemblés grâce au « Genome finishing module » de clc genomics workbench (clc bio) en utilisant le génome de la souche JIM8777 comme référence. Une analyse manuelle complémentaire a été réalisée afin d'inclure les contigs restants (annotation par RAST puis analyse par BlastX et BlastN pour rechercher la position des contigs dans le génome). Les génomes ont été annotés de façon automatique grâce à l'outil RAST (http://rast.nmpdr.org/).

La profondeur de séquençage des génomes est élevée avec une redondance minimale de 300 à 3000 X selon les génomes. La couverture des génomes (somme des contigs divisée par la taille complète du génome*100) est estimée supérieure à 95%.

Afin de mettre en évidence la capacité de transformation naturelle des souches d'intérêt de *S. salivarius*, les principaux gènes essentiels pour la mise en place de l'état de compétence, de capture et de l'intégration génomique de l'ADN ont été recherchés *in silico* dans le génome des 17 souches d'intérêt.

Les séquences nucléotidiques utilisées comme séquences comparatives proviennent du génome séquencé et complètement assemblé de la souche *S. salivarius* JIM8777 (Guedon et al., 2011). Elles correspondent à l'opéron *ami* permettant la reconnaissance du CSP, au gène de régulation *comR* (12911546), au gène codant le facteur sigma alternatif *comX* (12911430), ainsi qu'aux gènes *dprA* (12911185), *endA* (12910986), *ssbB* (12912528), *recA* (12911343) et aux opérons *comG* et *comE*, essentiels pour l'internalisation et l'insertion de l'ADN exogène. Les numéros ID GenBank des gènes sont indiqués entre parenthèse.

Les homologies de séquence ont été recherchées et détectées via le logiciel BioEdit (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/Bioedit.html). La base de données utilisée comme sujet d'alignement contient l'ensemble des génomes séquencés, et en cours d'assemblage, de l'équipe ICE-TeA. Seules les séquences présentant un alignement significatif sur la totalité de la séquence et avec une E-value strictement inférieure à 1.10^{-10} ont été analysées.

3. *Tests de transformation naturelle avec de l'ADN génomique*

3.1. Etude du locus *rpoB* des souches d'intérêt et de la souche JIM8777

Afin de vérifier le pourcentage d'identité du locus *rpoB* entre les souches d'intérêt et la souche de référence JIM8777, une région de 5,6 kb comportant ce gène (de 3,6 kb) et 1 kb

de part et d'autre pour l'ensemble des souches a été alignée via le logiciel BioEdit. Le pourcentage d'identité de chaque souche d'intérêt a été obtenu via l'outil Pairwise alignement de ce même logiciel.

3.2. Extraction de l'ADN génomique des souches de *S. salivarius*

La souche de *S. salivarius* F1-37 Rif^R a été incubée dans 50 mL de milieu M17G ensemencée au 1/100ème et incubée à 37°C sans agitation durant une nuit. La culture a été centrifugée à 5000 rpm durant 5 min à 4°C et lavée dans 20 mL d'une solution de TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH = 8). Elle a ensuite été re-suspendue dans 500 µL de TE 1X. On y a ajouté 60 µL de solution de lysozyme à 20 mg/mL et mutanolysine à 800 U/mL avant une incubation de 30 min à 37°C. Un volume de 60 µL de solution d'EDTA (à 0,5 M, pH = 8) et de 10 µL de protéinase K (à 20 mg/mL) a ensuite été ajouté avant incubation à 37°C durant 10 min. La solution a ensuite été incubée à 50°C durant 10 min après ajout de 60 µL de SDS à 10%. Un volume de 350 µL d'acétate de sodium (à 3 M d'acétate et 3 M de sodium à pH = 6) a ensuite été ajouté au mélange qui a été déposé sur glace durant 10 min après homogénéisation par retournement. Après une centrifugation de 10 min à 14 000 rpm à 4°C, on a ajouté au surnageant 4 µL de RNase (à 10mg/mL) avant de la placer 10 min à 37°C. Sous hotte chimique, un volume équivalent de phénol-chloroforme y a été additionné et le tout a été mélangé par inversion puis centrifugé à 10 000 rpm durant 8 min. Afin d'éliminer toute trace de phénol, l'opération a été répétée avec seulement du chloroforme sur le surnageant. Après ajout d'un volume équivalent d'isopropanol au surnageant, le tout a été homogénéisé par retournement puis centrifugé durant 10 min à 14 000 rpm à 4°C. Le culot a até lavé avec 400 µL d'éthanol à 70%. L'étape a été répétée afin d'éliminer tous les ions potentiellement présents. Puis, le culot a été séché en utilisant un speed-vac Eppendorf durant 15 min avant d'être remis en suspension dans 100 µL d'eau UP.

3.3. Fragmentation de l'ADN génomique extrait de *S. salivarius*

Afin d'obtenir un ADN assez fragmenté pour améliorer le taux de transformation lors de la transformation naturelle tout en ayant des fragments d'une taille suffisante pour rendre la recombinaison homologue possible, ce dernier a été traité par sonication durant 2 s. Pour cela, l'appareil Bioruptor de Digenode a été utilisé à puissance minimale. L'ADN obtenu a été stocké à -20°C.

3.4. Production du CSP

Le CSP utilisé pour l'ensemble des expériences de transformations naturelles présente une séquence peptidique de 8 acides aminés : H_2N – LPYFTGCL - COOH. Ce dernier a été synthétisé par la société Proteogenix avec une pureté supérieure à 95%. Il est stocké à une concentration molaire de 500 µM en aliquot de 50 µL à -20°C.

3.5. Protocole de transformation naturelle de *S. salivarius*

Le protocole initiale utilisé lors de ces travaux a été mis au point par l'équipe ComBac de l'Unité MICALIS (Véronique Monet, com. pers.). Une culture des souches de *S. salivarius* a été réalisée en milieu GM17 est incubée à 37°C sans agitation sur la nuit. A partir de ces pré-cultures, on a ensemencé une culture de milieu MCD (Tableau 2C) à Densité Optique (DO) = 0,05. A DO = 0,3-0,35 (temps variable selon les souches), on a ajouté à cette culture 1 µM de CSP ainsi que 1 µg d'ADN génomique soniqué de la souche F1-37 Rif^R pour100 µL de culture. La culture a été incubée 2 h avant d'être étalée sur milieu GM17 sélectif (75 µg/mL de rifampicine) pour sélectionner les transformants, ainsi que sur milieu GM17 dépourvu d'antibiotique afin d'établir une fréquence de transformation. Ce protocole a ensuite été modifié en fonction des tests réalisés et des résultats obtenus (cf partie résultats).

3.6. Sélection des clones Rif^R et calcul des taux d'obtention de mutants

Afin de sélectionner les clones Rif^R, les cultures ont été étalées sur milieu GM17 sélectif (75 µg/mL de rifampicine). Un aliquot a aussi été étalé sur milieu GM17 dépourvu d'antibiotique afin d'établir une fréquence de transformation. Le taux de transformation a été calculé en divisant le nombre de transformants par mL par le nombre de bactéries totales par mL. Des témoins négatifs ont été réalisés en omettant l'ajout d'ADN. A partir de ces derniers, le taux de mutation spontanée apportant la résistance à la rifampicine a été calculé en ramenant le nombre de mutants spontanés au nombre de bactéries totales par mL.

4. *Transformation naturelle de S. salivarius par des plasmides*

4.1. Extraction des ADN plasmidiques

Les plasmides utilisés font partie du système de suivi du transfert d'ICE mis en place *in vitro* au laboratoire. Ils sont répertoriés dans le Tableau 3. Afin d'obtenir une quantité assez importante de plasmide, l'extraction des plasmides a été réalisée à l'aide du kit E.Z.N.A. Endo – free Plasmid DNA Midi Kit de OMEGA bio-tek selon les recommandations du fournisseur.

4.2. Vérification des clones obtenus

Afin de vérifier la présence des plasmides d'intérêt chez les clones obtenus après transformation naturelle, des PCR ainsi que des extractions plasmidiques ont été réalisées. Pour cela, chaque clone a été cultivé dans 5 mL de milieu GM17, additionné de (ou des) antibiotiques permettant le maintien du plasmide, pendant une nuit à 37°C sans agitation.

4.2.1. Contrôle par extraction plasmidique

Le protocole d'extraction d'ADN total présenté dans la section 3.2 a été appliqué à 5 mL de suspension bactérienne obtenu pour chacun des clones. Afin de vérifier la présence de plasmide, 2 µL d'extraction ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8 % en tampon TBE 1x. La migration a été réalisée en cuve d'électrophorèse durant 1 h avec un voltage de 90 V. Les gels ont ensuite été colorés dans une solution de BET à 0,5µg/mL pendant 20 min, puis incubés dans de l'eau distillée pour la même durée avant d'être visualisés sous UV via le Gel Doc 1000 (Biorad).

4.2.2. Contrôle par PCR

Le mélange réactionnel utilisé pour ces PCR (volume final de 20 µL) contient 1 µL d'ADN total dilué au 1/100ème, en tampon 1X, 2 µL de dNTP à 2,5 mM chacun, 1 µL de chaque amorce à une concentration de 10 µM, ainsi que 0,25 unité de Dream Taq polymérase. Les amorces et les conditions utilisées pour les réactions de PCR sont présentées dans le tableau 4A. Les paramètres de cycles PCR sont présentés dans le tableau 4B.

5. *Electroporation des plasmides d'intérêt chez S. salivarius*

5.1. Préparation des bactéries électrocompétentes

A partir d'une pré-culture en milieu BHI (Référence 237500 marque BD) de *S. salivarius* pendant une nuit à 37°C sans agitation, on a ensemencé au centième 25 mL de milieu Todd Hewitt (référence 249240 marque BD) incubé à 37°C. Lorsque la DO_{600} a atteint 0,4 et 0,5, on a additionné 25 mL de solution I (glycine 5%, saccharose 1M) avant de laisser incuber encore 1 h à 37°C. Toutes les étapes suivantes doivent être réalisées sur glace pour conserver au maximum les cellules dans leur état physiologique. La culture a été centrifugée 10 min à 4500 rpm, le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu dans25 mL de tampon d'électroporation (NaH2PO4 7 mM, MgCl2 1 mM, saccharose 500 mM pH 7,4). Après une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions, le culot a été re-suspendu dans 12,5 mL de tampon d'électroporation additionné d'une solution

<u>Tableau 4</u> : Amplification du gène *gfp* et du gène codant le répresseur pour vérifier la présence des plasmides d'intérêt.

A. Caractéristiques des oligonucléotides

Nom	Séquence (de 5' à 3')	Taille de l'amplification	Tm	Utilisation
gfp-Fwd-ApaI	tttttgggcccCAAAAAGGAGAACGCATAA	893 pb	55°C	Amplification du gène *gfp* pour la détection des plasmides pOri23-pgnt-*gfp*
gfp-Rev-SalI	tttttgtcgacGATATAGTTCCTCCTTTCAGC		55°C	
gntR-Fwd-BamHI	tttttggatccCTTGAGTGAGGAAGGTGAGT	844 pb	58°C	Amplification du gène codant le répresseur pour la détection du plasmide PIB166-*gntR*
gntR-Rev-XbaI	ttttttctagaTGCTTGTCGTGCCGATATC		60°C	

B. Conditions utilisées pour les réactions de PCR

Etape	Température	Temps
Dénaturation initiale	95	10 min
Dénaturation de l'ADN	95	30 s
Hybridation des amorces	(Tm - 5°C)	30 s
Elongation de l'amplicon	72	1 min. 30
Elongation finale	72	10 min

35 cycles

de glycérol à 15% (mélange volume à volume). La solution a été centrifugée 10 min à 4500 rpm et le culot a été resuspendu dans 500 µL du même tampon d'électroporation glycérolé. Les cellules ont été finalement aliquotées en 6 tubes eppendorf de 80 µL.

5.2. Electroporation chez *S. salivarius*

Dans une cuve d'électroporation préalablement conservée à -20°C, 80 µL de cellules électrocompétentes et environ 500 ng d'ADN plasmidique ont été mélangés. L'électroporation est réalisée avec un voltage de 2,4 kV, une résistance de 600 Ω et une capacité de 10µF. Les cellules ont été directement reprises dans 1 mL de milieu Todd-Hewitt avant d'être incubées 2h à 37 °C. La culture a été ensuite étalée sur GM17 sélectif et incubée en condition anaérobie pendant 24-48 h à 37°C.

5.3. Vérification des clones obtenus

Les clones obtenus ont été incubés dans 5 mL de GM17 sélectif à 37 °C pendant une nuit. Afin de vérifier la présence des plasmides utilisés, une extraction d'ADN total a été réalisée et les PCR préalablement décrites (tableau 4) ont été réalisées.

Résultats

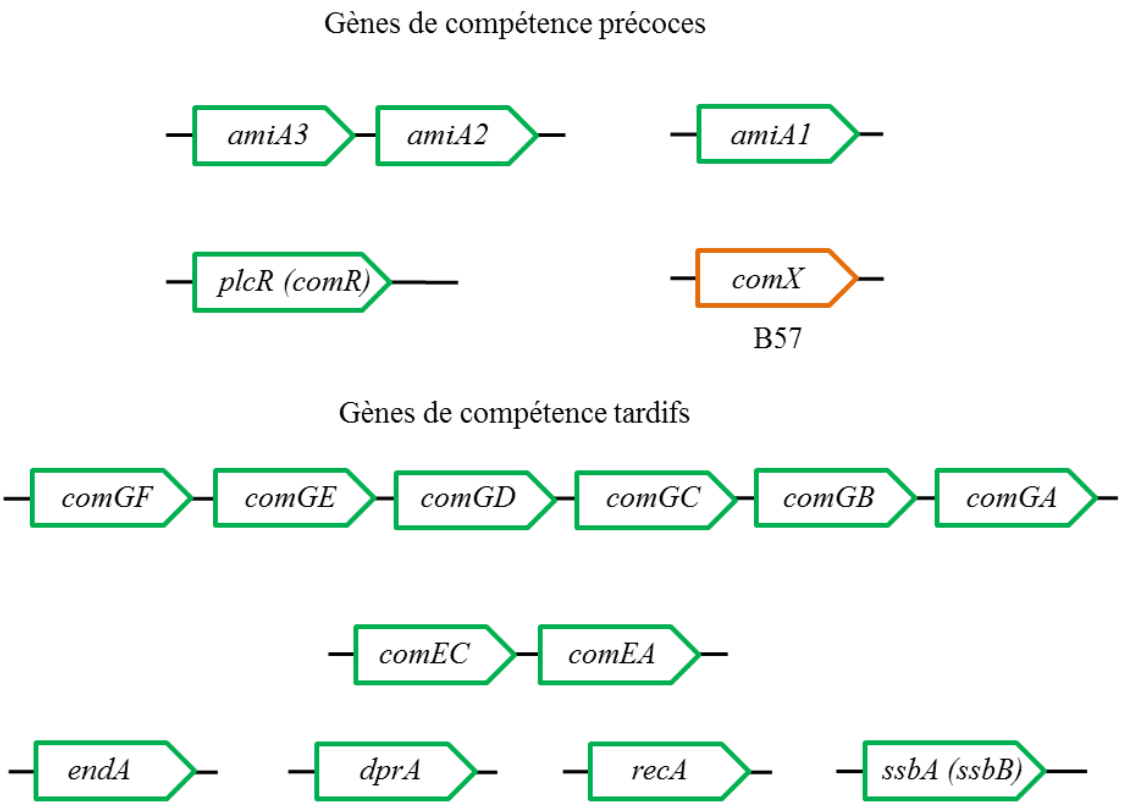
1. *Recherche in silico des gènes essentiels pour la transformation naturelle*

Un système de suivi basé sur des constructions présentant des gènes rapporteurs (antibiotiques et fluorescences) a été conçu afin de pouvoir suivre *in situ* et en temps réel le transfert d'ICE entre souches de *S. salivarius* et vers d'autres espèces. Les données obtenues pour *S. salivarius* JIM8777 suggèrent que l'introduction des constructions par transformation via la compétence naturelle des souches est une stratégie appropriée. Il est donc nécessaire de connaitre au préalable le potentiel de transformation naturelle des souches de *S. salivarius*. Pour cela, une recherche *in silico* des gènes essentiels pour la transformation naturelle a été effectuée sur les génomes séquencés des souches d'intérêt. L'ensemble des résultats est présenté dans la figure 9. La sélection de ces gènes essentiels est basée sur les études réalisées chez *S. thermophilus* (Fontaine et al., 2010)pour les gènes précoces et chez *S. pneumoniae* pour les gènes tardifs (Johnston et al., 2014a)

Les gènes *amiA1, amiA2, amiA3, comR* et *comX* de la souche JIM8777, permettant la mise en place de l'état de compétence, ont donc été recherchés. L'ensemble des pourcentages d'identité nucléotidique obtenus sont supérieurs à 92 % avec une E. value inférieure à 1.10^{-100}. Aucune autre séquence présentant un alignement significatif avec une E.value inférieure à 10^{-10} n'a été mise en évidence pour l'ensemble de ces gènes. L'étude des séquences codantes de ces gènes a mis en évidence une mutation délétère dans le gène *comX* de la souche d'intérêt de *S. salivarius* B57. En effet, à la position 116, une mutation spontanée conduit à l'apparition d'un codon stop entrainant ainsi la synthèse d'une protéine tronquée de 49 aa.

Les gènes *recA, dprA* et *endA* et les opérons *comG* et *comE* de la souche JIM8777, essentiels pour la capture et l'intégration de l'ADN exogène au génome, ont aussi été recherchés. Toutes les souches possèdent ces gènes avec un pourcentage d'identité supérieur à 89% avec une E. value inférieure à 1.10^{-100}. Aucune autre séquence présentant un alignement significatif avec une E.value inférieure à 10^{-10} n'a été mise en évidence pour l'ensemble de ces gènes. L'étude des séquences codantes de ces gènes n'a pas permis de mettre en évidence de décalage du cadre de lecture ou l'apparition de codon stop.

Figure 9 : Recherche *in silico de gènes essentiels pour la transformation naturelle de S. salivarius*



Cette figure présente l'ensemble des gènes et opérons recherchés chez les souches d'intérêt de *S. salivarius* à partir de ceux de la souche de *S. salivarius* JIM8777. Lorsque les dénominations sont différentes entre les génomes modèles et JIM8777, la fonction du gène est indiquée entre parenthèse. Ces recherches *in silico* ont été réalisées avec le logiciel BioEdit via l'outil Local Blast.

Dans un premier temps, cette étude a été réalisée avec les séquences nucléotidiques. Seules les séquences présentant un alignement significatif avec une valeur d'E.value inférieure à 10^{-10} ont été analysées. Par la suite, les séquences codantes de chacun des gènes ont été générées à partir du logiciel Artemis afin de mettre en évidence un éventuel décalage du cadre de lecture ou l'apparition de codon stop.

Un encadré vert correspond à un alignement nucléotidique et une séquence codante quasiment identique aux séquences de la souche JIM8777. Un encadré orange correspond à un alignement nucléotidique significativement identique mais à une séquence codante différente pour au moins une souche, dont le nom est indiqué en dessous du gène en question.

Tous les génomes ainsi analysés présentent les principaux gènes essentiels à l'acquisition de l'état de la compétence et à la capture et l'intégration chromosomique de fragment d'ADN.

2. *Test de transformation naturelle*

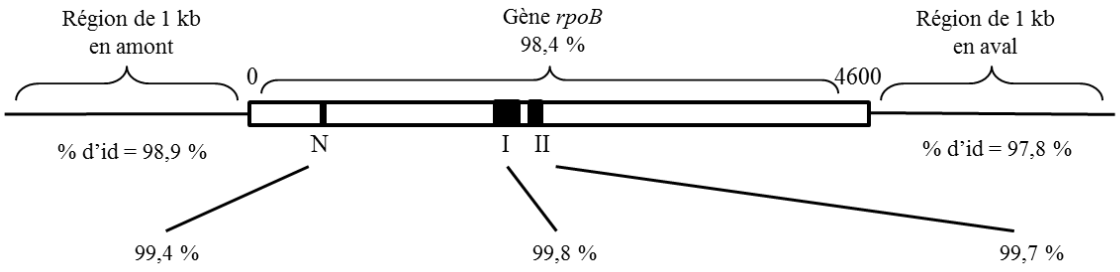
2.1. Intérêt du locus *rpoB* et étude comparative

Selon Johnston et *al.*, (2014) afin de déterminer si une espèce, ou une souche, est transformable, il est plus simple de démontrer la capacité de transformation d'une souche en utilisant un marqueur chromosomique, tel qu'un gène de résistance à un antibiotique par exemple. En effet, la transformation d'une bactérie via un plasmide présente une efficacité très faible. Après capture, le plasmide se retrouve sous forme linéaire et simple brin dans la cellule. Afin de se pérenniser dans la cellule et sa descendance, ce dernier doit se reconstituer sous forme circulaire double brin. Cependant, cet évènement est beaucoup moins fréquent que l'insertion chromosomique par recombinaison homologue d'un marqueur chromosomique. Afin de tester le niveau de transformation des souches d'intérêt de *S. salivarius,* une expérience de transformation avec de l'ADN génomique d'une souche de *S. salivarius* (F1-37 Rif^R) a été entreprise. Cette souche est un mutant spontané obtenu par étalement d'une suspension bactérienne concentrée sur boite sélective contenant de la rifampicine afin d'isoler des clones résistants (stage de M2 de Mylène Maury).

Le marqueur chromosomique utilisé est la résistance à la rifampicine. Cet antibiotique a une forte affinité de liaison à la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN-dépendante et inhibe sa fonction essentielle pour la croissance bactérienne. L'acquisition de la résistance est due à l'apparition de mutations dans des régions très conservées du gène *rpoB*. Chez *S. pneumoniae*, chez qui l'acquisition de mutations conférant la résistance à la rifampicine a été très étudiée (Ferrándiz et al., 2005), les régions concernées sont nommées clusters N, I, II et III et sont regroupées sur une portion nucléotidique de 1,2 kb.

Afin de vérifier si cette région de 1,2 kb pouvait être intégrée par recombinaison homologue, les séquences nucléotidiques d'1 kb de part et d'autre de ce dernier ont été alignées via le logiciel BLAST (figure 10). Afin de vérifier que les clusters N, I et II soient conservés chez *S. salivarius*, les séquences nucléotidiques de ces derniers ont été alignés séparément. L'alignement a permis de mettre en évidence que l'ensemble de cette portion

Figure 10 : Analyse des clusters N, I et II du gène *rpoB* et des régions amont et aval des souches d'intérêt de *S. salivarius.*



La séquence codante du gène *rpoB* est représentée par un rectangle montrant les clusters N, I et II (boites noires) ainsi que les régions de part et d'autre (traits noirs, amont ou aval). Les alignements ont été réalisés avec le logiciel BioEdit.

chromosomique est très conservé. Les régions flanquantes du gène *rpoB* qui pourraient intervenir dans la recombinaison homologue présentent des pourcentages d'identité nucléotidique de 98,9 % (en amont) et de 97,7 % (en aval).

2.2. Préparation de l'ADN génomique

Afin d'améliorer la disponibilité de l'ADN exogène pour sa capture et son intégration au génome de la cellule receveuse, et permettre l'acquisition de la résistance à la rifampicine, une cinétique de traitement par sonication de l'ADN génomique de F1-37 Rif^R a été réalisée.

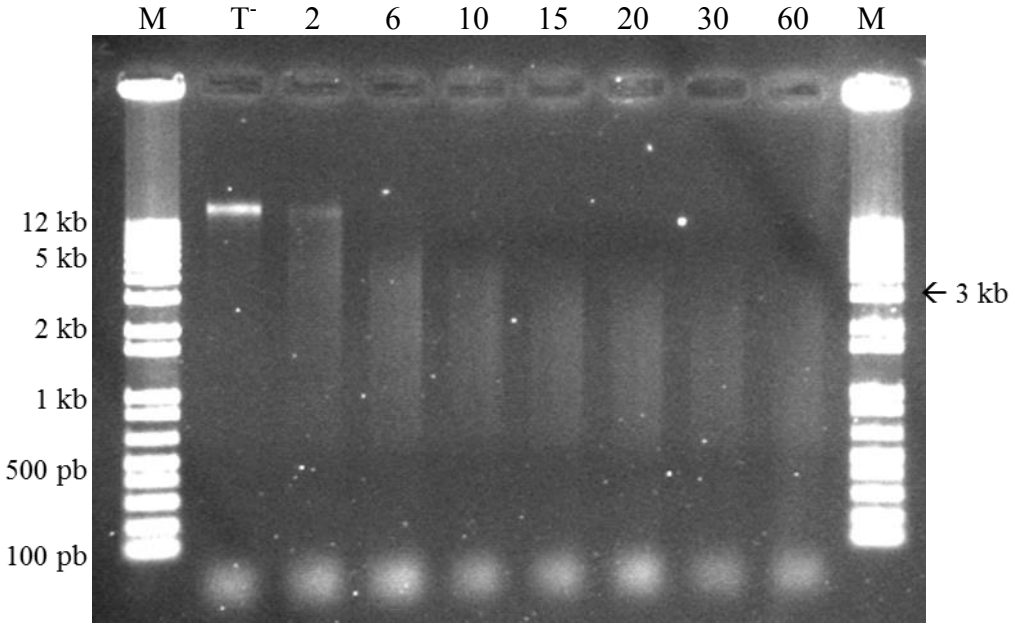
En effet, une taille trop importante des fragments d'ADN pourrait réduire la capacité de capture du fragment d'ADN d'intérêt (la région de 1,2 kb contenant les mutations putatives). D'un autre côté, des fragments de taille trop réduite pourraient limiter le taux de recombinaison homologue entre l'ADN génomique de la cellule receveuse et l'ADN nouvellement acquis. Différents temps de sonication ont pour but de déterminer le temps nécessaire à l'obtention d'une quantité optimale de fragments de 3 kb (région d'intérêt du gène *rpoB* et 1 kb de part et d'autre de cette région). Les résultats sont présentés dans la figure 11.

La fragmentation de l'ADN est visible à partir de 2 s de sonication. Une durée supérieure ou égale à 6 s engendre une dégradation trop importante puisque la majorité des fragments obtenus sont de taille inférieure à 3 kb. Ainsi, afin que l'ADN génomique de F1-37 Rif^R soit fragmenté en fragments de taille égale ou supérieure à 3 kb, la sonication ne doit pas excéder 2 s.

2.3. Mise au point du protocole de transformation naturelle

Après préparation de l'ADN génomique fragmenté, le protocole fourni par l'équipe ComBac de MICALIS (Véronique Monnet,com. pers.) a été testé pour les souches N20 et JIM8777. Cependant, aucune transformation naturelle n'a été observée en respectant ce protocole. Le taux d'apparition de mutants spontanés Rif^R était respectivement de $4{,}36 \cdot 10^{-7} \pm 1{,}36 \cdot 10^{-7}$ et de $2{,}02 \cdot 10^{-7} \pm 3{,}91 \cdot 10^{-8}$ pour les souches N20 et JIM8777. Suite à ces résultats, un ensemble d'expériences a été réalisé afin d'adapter le protocole de transformation naturelle aux souches d'intérêt de *S. salivarius* de l'équipe. Les tests ont été conduits avec la souche N20 et ont été réalisés une fois. Ces mises au point ont permis de proposer des modifications du protocole pour optimiser la transformation des souches d'intérêt de *S. salivarius.* Afin de valider ces modifications, des réplicats biologiques devront

Figure 11 : Cinétique de traitement par sonication de l'ADN génomique de la souche F1-37 Rif^R



Afin d'obtenir des fragments d'ADN génomique de la souche F1-37 Rif^R d'environ 3 kb pour une transformation de *S. salivarius* optimale, l'ADN préalablement extrait a été traité par sonication durant différents temps (2, 6, 10, 15, 20, 30, 60 s). La piste T$^-$ correspond à l'ADN génomique de F1-37 Rif^R non soniqué. M = marqueur de taille 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

être réalisés.

2.3.1. Cinétique d'ajout du CSP et de l'ADN et taux de de transformation de la souche *S. salivarius* N20

L'action du CSP étant transitoire au cours de la croissance bactérienne, une cinétique visant à sélectionner la phase de croissance optimale pour l'induction de la transformation naturelle a été réalisée. La souche N20, utilisée pour cette cinétique, ayant tendance à former des agglomérats cellulaires au cours de sa croissance en milieu Milieu Chimiquement Défini (MCD), la cinétique a été réalisée en fonction du temps et non de la DO.

Une culture des souches de *S. salivarius* a été donc réalisée en milieu M17 et incubée à 37°C sans agitation pendant une nuit. A partir de ces pré-cultures, du milieu MCD a été inoculé à DO = 0,05. L'ADN génomique soniqué de la souche F1-37 Rif^R (1 µg/100µL de culture) et 1 µM de CSP ont été ajoutés à la culture aux temps 0, 120, 135, 150, 165, 180 et 195 min. Les cultures correspondant à chaque temps ont été incubées 6 h après ensemencement à DO =0,05 avant d'être étalées sur milieu GM17 sélectif. Les résultats sont présentés dans la figure 12.

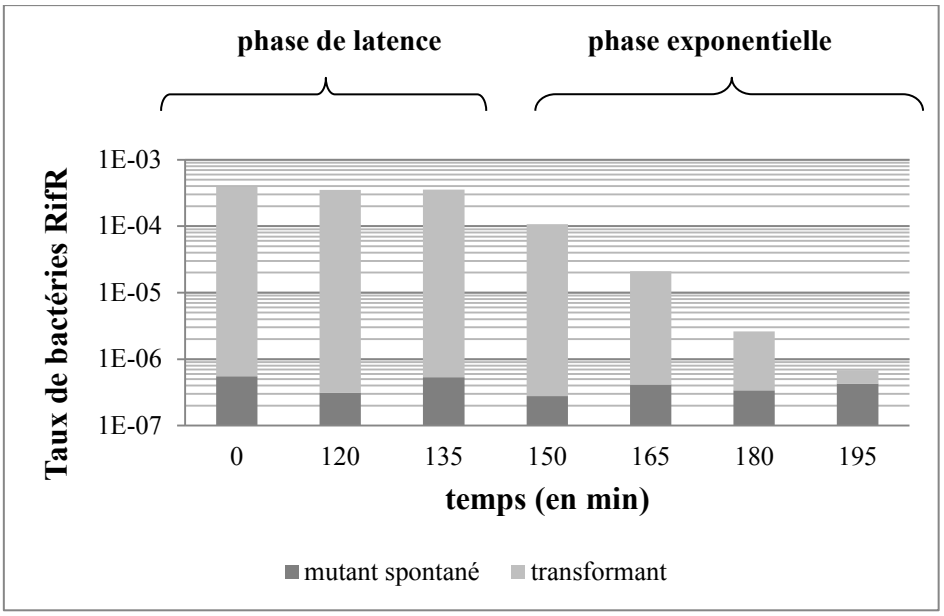
Ainsi, nous n'observons pas de différence dans le taux d'apparition de clones Rif^R, avec CSP et ADN, de la souche N20 quand le CSP est ajouté au temps t = 0, 120, 135 min (taux d'apparition de clones Rif^R de $3,67 .10^{-4} \pm 1,81 .10^{-5}$). A partir du temps t = 150, ce taux d'apparition décroit de $1,06 .10^{-4}$ à $2,27 .10^{-6}$ au temps t = 180. L'ajout de CSP au-delà d'un temps de croissance de 180 min ne permet pas d'obtenir un taux d'apparition de clones Rif^R différent d'une culture avec CSP et ADN et d'une culture sans.

En regard du nombre de mutants spontanés Rif^R, aucune corrélation n'a pu être établie entre le temps de contact de la culture bactérienne avec le CSP et le taux de mutants spontanés Rif^R. Celui-ci est de $4,08 .10^{-7} \pm 8,47 .10^{-8}$ sur l'ensemble de la croissance bactérienne.

2.3.2. Impact de la quantité de CSP et d'ADN sur le taux de transformation de la souche *S. salivarius* N20

La quantité de CSP et d'ADN ayant un impact direct sur le taux de transformation, ces derniers ont été testés à différentes concentrations lors d'une transformation naturelle de la souche N20. Ainsi, ces derniers ont été ajoutés à différentes concentrations dans une culture MCD à DO 0,05. Ainsi, le CSP a été ajouté à une concentration de 0,5 µM, 1 µM, 1,5 µM et 2 µM avec 1 µg d'ADN/100 µL de culture et d'autre part l'ADN a été ajouté à des

Figure 12 : Influence de l'ajout de CSP et ADN à différents temps de la croissance bactérienne sur la transformation naturelle de la souche *S. salivarius* N20



L'influence de la phase de croissance lors de l'ajout de CSP et de l'ADN sur le taux d'apparition de clones Rif^R a été testée sur la souche de *S. salivarius* N20. Plusieurs cultures en MCD à DO = 0,05 ont été incubées à 37°C. Pour chacune d'entre elles, le CSP a été ajouté à différents temps, soit à temps t = 0 min. puis, toutes les 15 min. à partir du temps t = 120 min. Aucune mesure n'a été faite entre les temps 0 et 120 min. puisque cette période correspond à la phase de latence de la croissance bactérienne. La sélection des clones Rif^R a été réalisée simultanément pour toutes les conditions, soit 6h après ensemencement des cultures. Les taux d'apparition de clones Rif^R correspondent au rapport du nombre de clones Rif^R par mL sur le nombre de bactéries totales par mL. Le taux de clones Rif^R avec CSP et ADN est indiqué en gris clair, le taux de clone Rif^R sans CSP et ADN est indiqué en gris foncé.

concentrations de 0,5 µg, 1 µg, 1,5 µg et 2 µg/100 µL de culture avec 1 µM de CSP. La culture a été incubée 6 h avant d'être étalée sur milieu GM17 sélectif. Les résultats sont présentés dans la figure 13.

La quantité de CSP pour laquelle nous avons un taux de transformation optimal est de 1 µM avec un taux de 5,06 $.10^{-4}$. Si le CSP est ajouté à des concentrations inférieures (0,5 µM), le taux de transformation décroit à 8,88 $.10^{-5}$. Si le CSP est ajouté à des concentrations supérieures (1,5 µM et 2 µM), le taux de transformation décroit plus lentement pour atteindre une valeur 1,12 $.10^{-4}$.

Les expériences réalisées en présence uniquement de CSP ou d'ADN montrent un taux de mutants spontanés Rif^R de 3,75 $.10^{-7}$ ± 1,17 $.10^{-7}$. Cette valeur n'est pas significativement différentes du taux de mutants spontanés des cellules seules

2.3.1. Impact du temps de régénération sur le taux de transformation sur les souches *S. salivarius* N20 et JIM8777

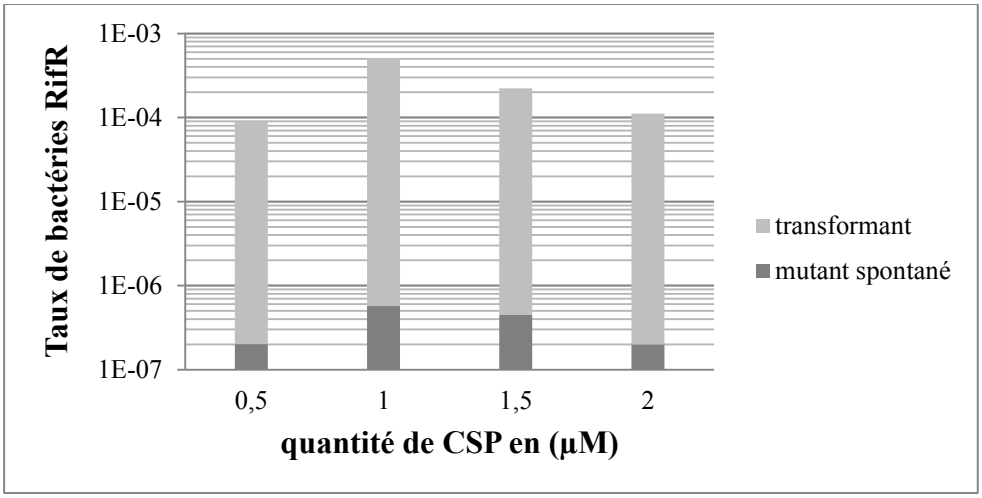
Afin d'établir le temps optimal de régénération des cellules, une culture en MCD des souches N20 et JIM8777 ensemencées à DO = 0,05 ont été mises en contact avec 1 µM de CSP et 1 µg d'ADN/100 µL de culture et ont été étalées sur GM17 sélectif après des temps de régénération allant jusqu'à 6 h avec des intervalles d'1 h. Une cinétique de croissance bactérienne a été réalisée en même temps en étalant une partie de la culture sur un milieu GM17 non sélectif à chaque temps. L'ensemble des résultats est présenté dans la figure 14.

Le temps de régénération où nous observons un taux de transformation le plus élevé est de 3h avec une valeur de 1,15 $.10^{-3}$. Un temps de régénération inférieur engendre une transformation de la souche N20 moins importante (taux de transformation de 6,03 $.10^{-5}$ pour un temps de régénération de 2 h). Un temps de régénération inférieur à 2h ne permet pas d'observer un taux de transformation différent du taux de mutations spontanées. Un temps de régénération supérieur à 3h conduit aussi à une baisse du taux de transformation à 7,83 $.10^{-4}$ après 6 h d'incubation à 37°C.

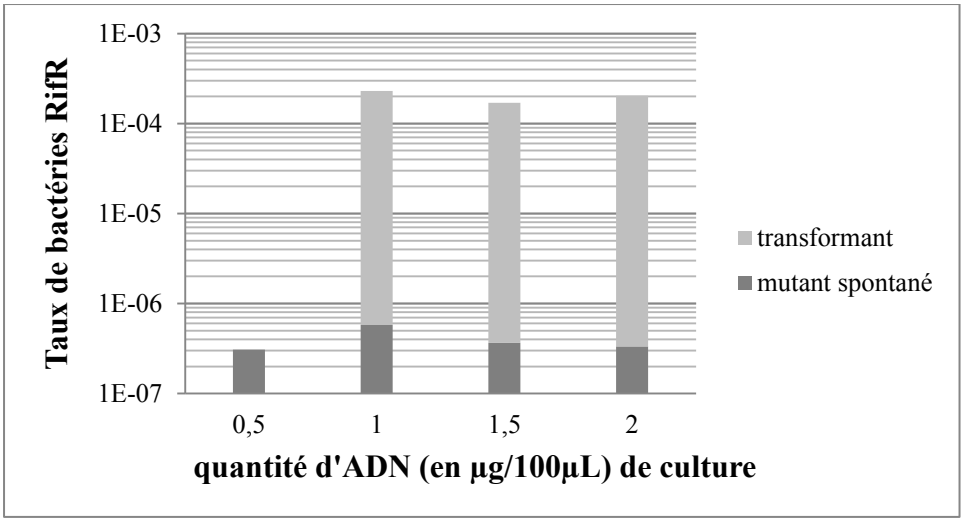
En étudiant la croissance de la souche N20 au cours du temps, on peut voir que la phase exponentielle ne commence réellement qu'après 3 h d'incubation à 37°C. Ainsi, le nombre de bactérie par mL au temps t = 3 h (1,21 $.10^{6}$ bactéries/mL) est très inférieur au nombre de bactéries par mL des temps 4 h et 6 h (respectivement de 3,40 $.10^{6}$ bactéries/mL et de 2,35 $.10^{7}$ bactéries/mL) expliquant la différence de taux de transformation. Au cours de la

Figure 13 : Impact de la quantité de CSP et d'ADN sur la transformation naturelle de la souche *S. salivarius* N20

A. Influence de la quantité de CSP



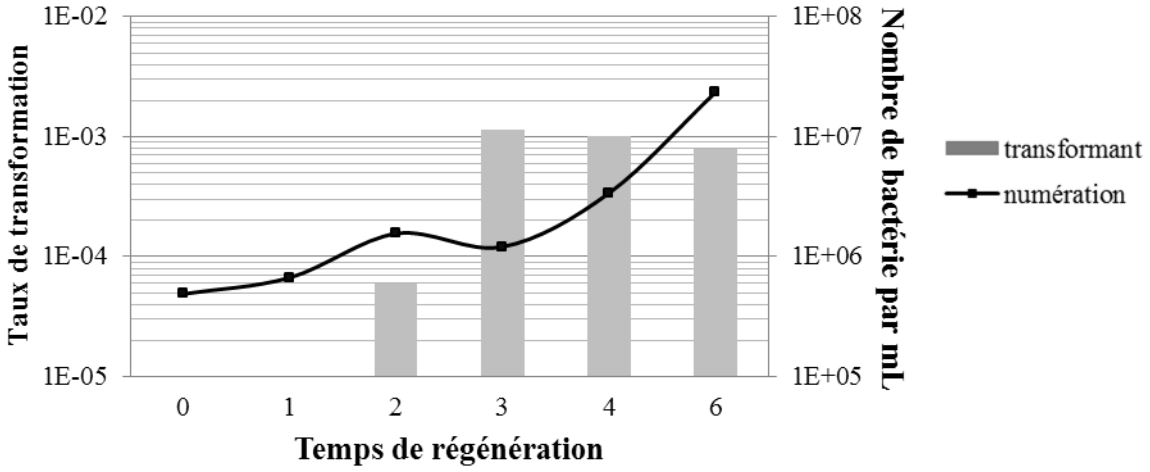
B. Influence de la quantité d'ADN



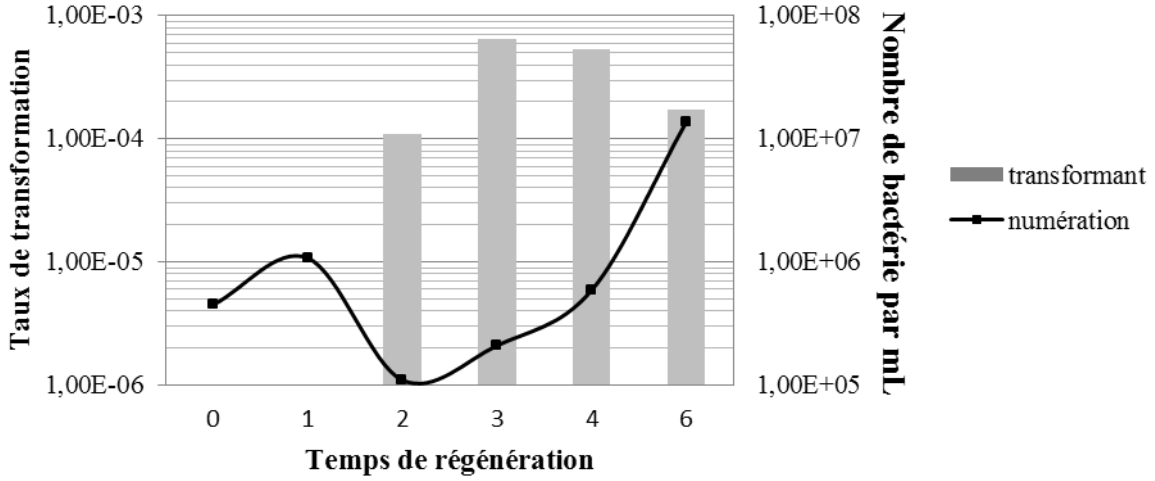
L'impact de la quantité de CSP et d'ADN sur le taux de transformation naturelle a été testé sur la souche de *S. salivarius* N20. Des cultures en MCD à DO = 0,05 de cette souche ont été mises en contact de concentrations de CSP différentes (0,5, 1, 1,5 ou 2 µM) et 1 µg d'ADN / 100 µL de culture, soit de concentrations d'ADN différentes (0,5, 1, 1,5 et 2 µg d'ADN / 100 µL de culture) et incubées à 37°C durant 6 h avant d'être étalées sur milieu GM17 sélectif. Les taux de clones Rif^R correspond au rapport du nombre de clones Rif^R par mL sur le nombre de bactéries totales par mL. Le taux de clones Rif^R avec CSP et ADN est indiqué en gris clair, le taux de clone Rif^R sans CSP et ADN est indiqué en gris foncé.

Figure 14 : Influence du temps de régénération sur la transformation naturelle des souches *S. salivarius* N20 et JIM8777

A. Résultats obtenus pour la souche N20



B. Résultat obtenus pour la souche JIM8777



L'impact du temps de régénération des cellules sur le taux de transformation naturelle a été testé chez les souches de *S. salivarius* N20 et JIM8777. Des cultures en MCD des différentes souches ensemencées à DO = 0,05 ont été mises en contact avec 1 µM de CSP et 1 µg d'ADN / 100 µL de culture et incubées à 37 °C durant 6 h. Des aliquots ont été prélevés toutes les heures pour étalement sur milieu GM17 sélectif (taux de transformation) et non sélectif (suivi de croissance). Le taux de clones Rif^R correspond au rapport du nombre de clones Rif^R par mL sur le nombre de bactéries totales par mL. Les histogrammes indiquent le taux de clones Rif^R avec CSP et ADN, la courbe correspond au nombre d'UFC par mL.

croissance bactérienne de la souche N20, on remarque également une chute de la densité cellulaire entre les temps t = 2 h et t = 3 h.

Des cultures en MCD ensemencées à DO = 0,05 avec les souches N20 ou JIM8777 ont été mises en contact avec 1 µM de CSP et 1 µg d'ADN/100 µL de culture et ont été étalées sur GM17 sélectif après des temps de régénération de 1, 2, 3, 4 ou 6 h. La courbe de croissance de chacune des souches a aussi été suivie au cours de cette expérience.

Afin de confirmer ces résultats, la même expérience a été réalisée avec la souche JIM8777. Le temps de régénération où nous observons le taux de transformation le plus élevé est aussi de 3 h avec un taux de transformation de $6,52 .10^{-4}$. Un temps de régénération de 2 h conduit à une chute du taux de transformation à $1,09 .10^{-4}$. Cette perte d'efficacité est cependant moins importante que celle observée chez la souche N20. Un temps de régénération supérieur à 3 h conduit à une baisse du taux de transformation à $1,74 .10^{-4}$ après 6h d'incubation à 37°C.

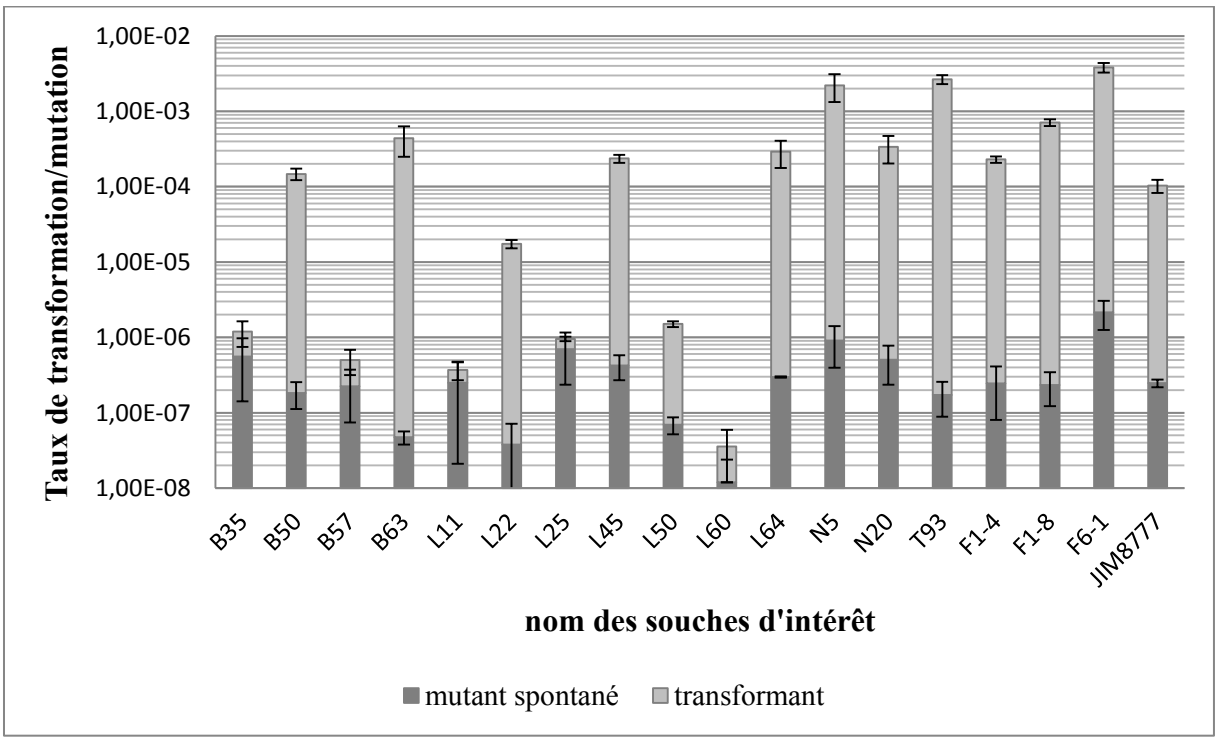
La courbe de croissance de JIM8777 présente la même tendance que celle de N20. En effet, sa phase exponentielle de croissance commence après environ 3 h d'incubation à 37°C. Un décrochement du nombre de bactérie par mL obtenu est aussi observé. Cependant dans le cas de la souche JIM8777, il est beaucoup plus important et apparait plus tôt au cours de la croissance.

2.1. Potentiel de transformation des souches d'intérêt de *S. salivarius*

Les mises au point précédentes ont permis d'établir un protocole permettant la transformation naturelle des souches de *S. salivarius*. Ainsi, l'ajout de CSP et d'ADN doit être fait lors de l'ensemencement à DO = 0,05 du milieu MCD par la souche utilisée. Leur concentration doit être respectivement de 1 µM et de 1 µg/100 µL de culture. Afin d'obtenir un grand nombre de transformants, la régénération des cellules doit être au minimum de 3 h.

L'ensemble des souches d'intérêt, ainsi que la souche JIM8777, a donc été transformé dans ces conditions avec de l'ADN génomique de la souche F1-37 Rif^R. Le taux de transformation a été calculé en divisant le nombre de transformants par mL par le nombre de bactéries totales par mL. Le taux de mutation spontanée apportant la résistance à la rifampicine a été calculé en divisant le nombre de mutants spontanés par le nombre de bactéries totales par mL. L'ensemble des résultats sont présentés dans la figure 15.

Figure 15 : Potentiel de transformation naturelle des souches d'intérêts par de l'ADN génomique



Après mise au point du protocole de transformation naturelle, le potentiel de transformation naturelle des souches d'intérêts a été mesuré. La moyenne de trois expériences indépendantes est présentée et des barres d'erreurs indiquent les déviations standards.

Sur l'ensemble des souches testées, les souches N5, T93 et F6-1 possèdent le meilleur taux de transformation avec une valeur supérieure à 1 $.10^{-3}$. Sept souches (B50, L45, L64, N20, F1-4, F1-8 et JIM8777) présentent un taux de transformation compris entre 1 $.10^{-4}$ et 1 $.10^{-3}$. Deux autres souches présentent un potentiel de transformation de moindre importance comparé aux précédents groupes. En effet, L22 et L50 révèlent des taux de transformation respectifs de 1,74 $.10^{-5}$ ± 2,18 $.10^{-6}$ et 1,44 $.10^{-6}$ ± 1,32 $.10^{-7}$. Les expériences sur les quatre dernières souches (B35, B57, L11 et L60) n'ont pas permis de mettre en évidence un taux d'apparition de clone Rif^R avec CSP significativement différent du taux d'apparition de clone Rif^R sans CSP.

3. ***Transformation naturelle de S. salivarius par de l'ADN plasmidique***

Les tests de transformation naturelle de *S. salivarius* par des plasmides ont été réalisés pour les souches B50, L64, N20, T93 et JIM8777 avec le protocole présenté dans la section 2.3. En effet, les tests permettant d'établir le potentiel de transformation des différentes souches ont mis en évidence qu'elles avaient un fort potentiel de transformation. Elles sont donc utilisées afin d'accroitre la probabilité d'obtenir des transformants.

Les clones obtenus ont été incubés une nuit dans 5 mL de GM17 à 37 °C et sous pression de sélection dépendant du plasmide utilisé (Tableau 3). L'ADN total a été extrait et la présence des plasmides d'intérêt a été analysée par électrophorèse en gel d'agarose TBE 1 x et coloration au BET. Aucun plasmide n'a été détecté.

Aucun plasmide n'étant visible après migration en gel d'agarose de l'ADN total extrait des clones, une PCR a été réalisée sur chaque extraction afin de vérifier leur présence. Cette détection est basée sur l'amplification du gène codant le pour le plasmide pIB166, ou l'amplification du gène *gfp* pour le plasmide pOri23. A nouveau, aucune amplification n'a été obtenue malgré un témoin positif valide. Les clones ne possédaient donc pas les plasmides d'intérêt.

4. ***Electrotransformation de S. salivarius***

Afin de trouver une alternative à la transformation naturelle, des expériences d'électroporation ont été réalisées avec les souches N20 et JIM8777 en utilisant les mêmes plasmides.

Après 24 h d'incubation à 37°C en anaérobiose, un fond de croissance était observé. Cependant, certaines colonies bactériennes présentaient un développement en taille plus important. Les deux types de colonies ont été incubés une nuit dans 5 mL de GM17 à 37 °C et sous pression de sélection dépendant du plasmide utilisé. Seules les bactéries provenant des colonies de taille importante ont crû.

La vérification de la présence des plasmides d'intérêt a été réalisée par extraction d'ADN génomique total puis par électrophorèse des extractions comme présenté précédemment. Aucun plasmide n'a été observé. Des PCR sur le gène *gfp* pour les plasmides pOri23 et sur le plasmide pIB166 ont aussi été réalisées. Aucune amplification n'a été obtenue malgré un témoin positif valide. Les clones ne possédaient donc pas les plasmides d'intérêt.

DISCUSSION

1. *Mise au point du protocole de transformation naturelle de S. salivarius*

1.1. Intégrité du locus *rpoB*

Chez *S. pneumoniae*, l'acquisition de la résistance à la rifampicine est due à une ou plusieurs mutations ponctuelles dans l'un des trois clusters N, I ou II regroupés dans une région génique de 1,2 kb du gène *rpoB* (figure 10). L'alignement des séquences nucléotidique du gène *rpoB* de l'ensemble des souches d'intérêt permet de mettre en évidence un pourcentage d'identité nucléotidique supérieur à 98%. De ce fait, les trois clusters sont présents et très conservés chez les différentes souches étudiées.

La recombinaison homologue d'un fragment d'ADN d'intérêt nécessite qu'il soit encadré par des régions présentant une forte homologie de séquence avec le génome receveur. L'alignement des deux régions encadrant *rpoB* (1 kb chacune) pour l'ensemble des souches d'intérêt, montre un pourcentage d'identité de 98,9% en amont et 97,75 % en aval. La conservation de ces séquences est favorable à une intégration par recombinaison homologue après transformation avec de l'ADN génomique d'une autre souche de *S. salivarius* (F1-37 Rif^R en particulier) .

1.2. Protocole de transformation naturelle

Lors de l'utilisation du protocole de transformation naturel fourni par V. Monnet, une apparition de colonies Rif^R chez les souches de *S.salivarius* N20 et JIM8777 a eu lieu avec des taux respectifs de $4,36 .10^{-7} \pm 1,36 .10^{-7}$ et de $2,02 .10^{-7} \pm 3,91 .10^{-8}$. Ces valeurs n'étant pas significativement différentes du taux d'apparitions de mutants spontanés, il est peu probable que les clones Rif^R ainsi obtenus soient des transformants. Ce protocole n'apparait donc pas optimal pour les souches d'intérêt de *S. salivarius* de l'équipe et pour la souche de référence JIM8777. De ce fait, pour palier à ce manque d'efficacité, diverses tentatives d'amélioration ont été effectuées.

Les différentes modifications apportées au protocole ont permis d'augmenter jusqu'à quatre log le taux d'obtention de clones Rif^R (de l'ordre de $1 .10^{-3}$). Nos résultats sont cohérents avec ceux obtenu par une autre équipe pour la souche de *S. salivarius* JIM8777 (Fontaine et al., 2010). Ainsi, il est vraisemblable que les clones Rif^R, obtenus avec une

fréquence augmentée de plus de 10 fois suite au contact avec le CSP et l'ADN, soient des transformants. Cependant, une vérification par séquençage du gène rpoB devra être réalisée pour s'assurer de remplacement allélique par *rpoB* muté issus de la souche F1-37 Rif^R.

1.3. Modification de la fenêtre d'ajout du CSP

Selon le protocole initial, le CSP doit être ajouté à une culture bactérienne d'une DO = 0,3- 0,4. Cependant, les souches de *S. salivarius* forment des agrégats cellulaires durant la phase exponentielle de croissance complexifiant la lecture de la DO par spectrophotométrie. La reconnaissance du CSP par les bactéries étant liée à un système QS, il est actif durant une phase transitoire de la croissance bactérienne où sa concentration extracellulaire atteint une valeur seuil. Ainsi, son ajout lors de l'ensemencement de la culture permet de s'affranchir de la prise en compte de la densité cellulaire.

1.4. Maintien des concentrations d'ADN et de CSP

L'ajout d'une quantité d'ADN supérieure à 1 µg / 100µL de culture n'a pas permis d'obtenir un taux de transformant supérieur. Ceci peut être relié au fait qu'une fois transformé, l'acquisition d'ADN supplémentaire sera inutile pour celle-ci. De plus, seule une fraction de la population bactérienne peut acquérir l'état de compétence (Claverys et al., 2006) et donc la capacité d'internaliser l'ADN exogène. Ceci associé au fait que l'action du CSP n'agit que transitoirement, très peu d'ADN est donc utilisé.

Une concentration d'ADN inférieure à 1 µg / 100 µL de culture engendre une diminution drastique du taux de transformants, dans le cas des tests avec de l'ADN génomique. Cette perte totale de la capacité de transformation des souches de *S. salivarius* peut être due à un manque de disponibilité de l'ADN. L'identification du temps après ensemencement où le CSP doit être ajouté nous montre que c'est durant le début de la phase exponentielle, donc très tôt dans la courbe de croissance bactérienne, que ce dernier agit. A ce moment la densité cellulaire est faible. Si l'ADN est également en faible concentration, il est peu probable que les bactéries captent un fragment d'ADN présent dans leur environnement.

Les tests de transformation de la souche *S. salivarius* N20 avec différentes concentrations de CSP et d'ADN valident les concentrations indiquées dans le protocole initial.

1.5. Temps de régénération

Le suivi de croissance a mis en évidence la phase où le CSP a un effet sur les cellules. Après un temps de contact de 1 h. pour la souche JIM8777 et de 2 h. pour la souche N20, une baisse respective du nombre d'UFC d'un facteur 2 et de 1 log a été observée. Ceci peut être relié à un évènement de lyse cellulaire. En effet, il existe des gènes de bactériocines sous le contrôle du facteur SigmaX qui sont donc exprimés par les cellules ayant acquis l'état de compétence. Cette diminution du nombre d'UFC (Fontaine et al., 2010) et la présence de gènes responsable de la production de bactériocines (Perry et al., 2009) ont été rapportées chez *S. thermophilus*. Cependant, aucune corrélation entre les deux n'a encore été établi chez cette espèce

Suite aux différents temps de régénération testés lors des mises au point, le taux de transformation le plus élevé a été retrouvé après 3 h d'incubation à 37°C après ensemencement (à DO = 0,05) en présence d'ADN et de CSP.

Un taux de transformation moins important a été observé lors d'une régénération des cellules inférieures à 3h. Précédemment, nous avons dit que le CSP a un impact au bout de 1 h pour la souche JIM8777 et de 2 h pour la souche N20. Les cellules venant à peine d'acquérir la capacité d'internaliser des fragments d'ADN exogène, elles n'ont pas encore eu le temps de l'intégrer à leur génome. Après 2 h d'incubation, le taux de transformation de la souche JIM8777 est plus élevé que celui de la souche N20. Ceci peut être relié au fait que l'action du CSP est plus précoce au cours de la croissance cellulaire de JIM8777 comparé à N20.

2. Transformation naturelle des souches d'intérêt de S. salivarius

A partir du protocole optimisé, la capacité de transformation naturelle de chaque souche d'intérêt a été établie. Nous pouvons observer quatre groupes de souches présentant des taux de transformation différents. Le premier groupe de trois souches (N5, T93 et F6-1) présentent un taux de transformation supérieur à 10^{-3}. La majorité des souches (9 souches : B50, B63, L22, L45, L64, N20, F1-4, F1-8, JIM8777) ont un taux de transformation compris entre 10^{-3} et 10^{-5}. La souche L22 est la seule souche présentant un taux de transformation proche de 10^{-6}. Cependant, ce taux reste significativement différent du taux d'apparition de mutants spontanés de cette souche. Enfin, le reste des souches (B35, B57, L11, L60) a un taux d'apparition de mutants Rif^R peu ou pas impacté par la présence d'ADN et de CSP. Ces souches sont donc considérées comme non compétentes.

2.1. Confrontation des capacités de transformation aux analyses in silico

Plusieurs raisons peuvent expliquer les différences significatives de capacité de transformation naturelle des souches d'intérêt de *S. salivarius.*

Les principaux opérons et gènes essentiels pour la mise en place de l'état de compétence et de l'acquisition d'ADN exogène ont été recherchés par BLAST sur l'ensemble des génomes des souches d'intérêt de *S. salivarius*. Cette analyse a permis de mettre en évidence des gènes potentiellement non fonctionnels.

Le gène *comX* de la souche d'intérêt *S. salivarius* B57 présente une mutation ponctuelle conduisant à l'apparition d'un codon stop. Cette modification de séquence engendre une troncature de 49 acides aminés sur 166. De par le rôle central et essentiel du facteur sigmaX, l'absence de capacité de transformation de cette souche pourrait s'expliquer par cette mutation. Les changements d'acides aminés aléatoire observés chez l'ensemble des souches ne permet pas de mettre en évidence de modifications entrainant une perte du taux de transformation, étant donné qu'ils sont observés à la fois chez les souches transformantes et non transformantes.

Les systèmes Restriction-Modification (RM) bactériens peuvent également être un frein à la mise en évidence de la transformation naturelle. La bactérie produit des enzymes de restriction qui permettent de dégrader les ADN exogènes. D'autre part, afin de protéger son propre ADN, des enzymes de modification ajoutent un groupement méthyle sur un ou plusieurs nucléotides des sites de restriction. Ce faisant, l'ADN hôte ainsi méthylé n'est pas dégradé alors que l'ADN nouvellement acquis, et donc non modifié, se retrouve clivé. Ainsi, l'ADN exogène issu de la souche F1-37 pourrait ne pas être compatible avec les souches de *S. salivarius* B35, B57, L11 et L60.

Le fait que certaines souches présentent un taux de transformation intermédiaire ne peut pas être relié à l'absence de gènes essentiels, la présence de codon stop précoce ou d'un décalage de la phase de lecture. Cependant, l'apparition de mutation peut entrainer un changement d'acide aminé modifiant par exemple une interaction protéine-protéine (dans le cas de la liaison CSP-ComR par exemple) ou protéine-ADN (cas de ComX). De plus, l'analyse *in silico* ne concerne que les gènes essentiels identifiés chez *S. thermophilus* et *S. pneumoniae*. L'absence ou la modification génique d'un facteur secondaire agissant au cours

de la mise en place de l'état de compétence ou de l'intégration de l'ADN exogène peut entrainer une perte de la capacité de transformation d'une souche.

2.2. Les contraintes du milieu chimiquement défini

S. salivarius est une bactérie généralement cultivé en milieu GM17. Ce milieu étant très riche, il permet de satisfaire aux exigences nutritionnelles de cette souche et d'obtenir un temps de génération d'environ 20 min. Cependant, l'acquisition de l'état de compétence, et par la suite la capture et l'intégration d'ADN exogène ne peut se faire qu'en milieu MCD (Fontaine et al., 2010), dépourvu de peptide. Ce milieu contient en faible quantité 51 composants différents dont 20 acides aminés, 15 vitamines, sept ions métalliques et les quatre bases de l'ADN (Otto et al., 1983).

Ainsi, il n'est pas impossible que certaines souches, bien qu'elles présentent une croissance en milieu MCD, ne développent pas leur état de compétence du fait du manque de nutriment et se focaliseraient donc sur les voies métaboliques essentielles à leur développement.

3. *Transformation par de l'ADN plasmidique des souches d'intérêt de S. salivarius*

Que ce soit par transformation naturelle, avec le protocole établi durant ce stage, ou par électroporation, aucun clone présentant les différents plasmides utilisés n'a pu être isolé.

Le fragment d'intérêt contenant le locus *rpoB* muté se trouve dans un mélange d'ADN génomique et est donc très minoritaire en comparaison de l'ensemble des fragments mis en contact avec les cellules. Cependant, nous observons un meilleur taux de transformation avec ce dernier qu'avec un plasmide purifié. Nous en concluons par ailleurs que l'étude de la capacité de transformation de souches de *S. salivarius* par l'acquisition d'un locus *rpoB* conférant une résistance Rif^R est une approche intéressante comme suggéré par l'équipe du Pr. Claverys (Johnston et al., 2014b).

Les plasmides utilisés dans ces travaux n'ont jamais été testés chez *S. salivarius.* Il n'est donc pas complètement exclu que ces derniers ne puissent pas se répliquer chez cette espèce. Cependant, cette hypothèse est peu probable étant donné que les plasmides pIB166 et pOri23 ont déjà été utilisés chez d'autres streptocoques (Biswas et al., 2008).

Comme expliqué précédemment, le clivage d'un plasmide, l'acquisition d'un des deux brins et la re-circularisation de ce dernier pour obtenir un réplicon fonctionnel après internalisation entraine une efficacité très faible. L'hypothèse de la non transformation du fait de la taille conséquente de l'ADN plasmidique (jusqu'à 8 kb) est écartée suite à des résultats récent de l'équipe. En effet, des expériences récentes réalisées au laboratoire ont permis d'obtenir des transformants en utilisant un ADN d'environ 16 kb (com. pers. V. Libante) (com. pers. V. Libante).

Comme expliqué précédemment, l'absence de transformant peut être lié à un système RM. Or, les extractions plasmidiques ont été obtenues à partir de la souche d'*E.coli* DH5α qui possède des systèmes RM différents de ceux de *S. salivarius*.

4. ***Perspectives***

Un protocole de transformation naturelle des souches d'intérêt de *S. salivarius* de l'équipe a été établi au cours de cette étude et a permis d'obtenir des transformants en utilisant de l'ADN génomique d'une souche résistance à la rifampicine. Il faudra confirmer la présence de mutations dans le gène *rpoB* chez ces transformants.

L'absence de résultats pour les transformations naturelles et d'électroporation de *S. salivarius* à partir d'ADN plasmidique (plasmides de type pOri23 et pIB166 prévus dans la stratégie de marquage des ICE) doit être confirmée et nécessitera vraisemblablement de changer la stratégie de marquage des cellules donneuses (double marquage chromosomique : sur l'ICE et à un endroit différent du chromosome).

Une fois les ICE des souches d'intérêt de *S. salivarius* marqués, des expériences de transfert en microplaque avec suivi de fluorescence et de microscopie confocale pourront être réalisées afin de visualiser *in situ* et en temps réel le transfert de l'ICE d'une souche à une autre et tester l'impact de différents facteurs sur le transfert (biofilm, présence d'antibiotiques, effet d'un stress,…).

BIBLIOGRAPHIE

Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I., and Dewhirst, F.E. (2005). Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. J. Clin. Microbiol. *43*, 5721–5732.

Abdul-Redha, R.J., Kemp, M., Bangsborg, J.M., Arpi, M., and Christensen, J.J. (2010). Infective Endocarditis: Identification of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci from Blood Cultures by Partial 16S rRNA Gene Analysis and by Vitek 2 Examination. Open Microbiol. J. *4*, 116–122.

Barretto, C., Alvarez-Martin, P., Foata, F., Renault, P., and Berger, B. (2012). Genome sequence of the lantibiotic bacteriocin producer *Streptococcus salivarius* strain K12. J. Bacteriol. *194*, 5959–5960.

Bellanger, X. (2009). Transfert, accrétion et mobilisation des éléments intégratifs conjugatifs et des îlots génomiques apparentés de "*Streptococcus termophilus*" : Un mécanisme clef de l'évolution bactérienne ? Thèse. Université Henri Poincaré (Nancy 1).

Bellanger, X., Roberts, A.P., Morel, C., Choulet, F., Pavlovic, G., Mullany, P., Decaris, B., and Guédon, G. (2009). Conjugative Transfer of the Integrative Conjugative Elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol. *191*, 2764–2775.

Bellanger, X., Morel, C., Gonot, F., Puymege, A., Decaris, B., and Guédon, G. (2011). Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to cis mobilization and gene capture. Mol. Microbiol. *81*, 912–925.

Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., and Guédon, G. (2013). Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. FEMS Microbiol. Rev.

Bergé, M.J., Kamgoué, A., Martin, B., Polard, P., Campo, N., and Claverys, J.-P. (2013). Midcell Recruitment of the DNA Uptake and Virulence Nuclease, *endA*, for Pneumococcal Transformation. PLoS Pathog *9*, e1003596.

Biswas, I., Jha, J.K., and Fromm, N. (2008). Shuttle expression plasmids for genetic studies in *Streptococcus mutans*. Microbiology *154*, 2275–2282.

Carraro, N. (2011). Analyse comparative de la dynamique de deux éléments intégratifs conjugatifs de *streptococcus thermophilus.* Thèse. Université Henri Poincaré (Nancy 1).

Chen, I., and Dubnau, D. (2004). DNA uptake during bacterial transformation. Nat. Rev. Microbiol. *2*, 241–249.

Chen, I., Provvedi, R., and Dubnau, D. (2006). A Macromolecular Complex Formed by a Pilin-like Protein in Competent *Bacillus subtilis*. J. Biol. Chem. *281*.

Claverys, J.-P., and Håvarstein, L.S. (2007). Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. Nat. Rev. Microbiol. *5*, 219–229.

Claverys, J.-P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. Annu. Rev. Microbiol. *60*, 451–475.

Claverys, J.-P., Martin, B., and Polard, P. (2009). The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. FEMS Microbiol. Rev. *33*, 643–656.

Conte, A., Chinello, P., Civljak, R., Bellussi, A., Noto, P., and Petrosillo, N. (2006). *Streptococcus salivarius* meningitis and sphenoid sinus mucocele. Case report and literature review. J. Infect. *52*, e27–30.

Cvitkovitch, D.G. (2001). Genetic competence and transformation in oral streptococci. Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol. *12*, 217–243.

Dillingham, M.S., and Kowalczykowski, S.C. (2008). RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR *72*, 642–671, Table of Contents.

Dimopoulou, I.D., Kartali, S.I., Harding, R.M., Peto, T.E.A., and Crook, D.W. (2007). Diversity of antibiotic resistance integrative and conjugative elements among haemophili. J. Med. Microbiol. *56*, 838–846.

Draper, O., César, C.E., Machón, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2005). Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 16385–16390.

Facklam, R. (2002). What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. Clin. Microbiol. Rev. *15*, 613–630.

Ferrándiz, M.J., Ardanuy, C., Liñares, J., García-Arenzana, J.M., Cercenado, E., Fleites, A., de la Campa, A.G., and Spanish Pneumococcal Infection Study Network (2005). New mutations and horizontal transfer of *rpoB* among rifampin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from four Spanish hospitals. Antimicrob. Agents Chemother. *49*, 2237–2245.

Fontaine, L., Boutry, C., de Frahan, M.H., Delplace, B., Fremaux, C., Horvath, P., Boyaval, P., and Hols, P. (2010). A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius.* J. Bacteriol. *192*, 1444–1454.

Furuya, E.Y., and Lowy, F.D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. Nat. Rev. Microbiol. *4*, 36–45.

Gaillard, M., Vallaeys, T., Vorholter, F.J., Minoia, M., Werlen, C., Sentchilo, V., Puhler, A., and van der Meer, J.R. (2006). The *clc* Element of *Pseudomonas sp.* Strain B13, a Genomic Island with Various Catabolic Properties. J. Bacteriol. *188*, 1999–2013.

Gardan, R., Besset, C., Guillot, A., Gitton, C., and Monnet, V. (2009). The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. J. Bacteriol. *191*, 4647–4655.

Gardan, R., Besset, C., Gitton, C., Guillot, A., Fontaine, L., Hols, P., and Monnet, V. (2013). Extracellular Life Cycle of ComS, the Competence-Stimulating Peptide of *Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol. *195*, 1845–1855.

Gasc, A.M., Sicard, N., Claverys, J.P., and Sicard, A.M. (1980). Lack of SOS repair in *Streptococcus pneumoniae*. Mutat. Res. *70*, 157–165.

Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. J. Hyg. (Lond.) *27*, 113–159.

Guedon, E., Delorme, C., Pons, N., Cruaud, C., Loux, V., Couloux, A., Gautier, C., Sanchez, N., Layec, S., Galleron, N., et al. (2011). Complete Genome Sequence of the Commensal *Streptococcus salivarius* Strain JIM8777 ▿. J. Bacteriol. *193*, 5024–5025.

Hacker, J., and Carniel, E. (2001). Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. EMBO Rep. *2*, 376–381.

Havarstein, L.S., Coomaraswamy, G., and Morrison, D.A. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 11140–11144.

Heng, N.C.K., Haji-Ishak, N.S., Kalyan, A., Wong, A.Y.C., Lovrić, M., Bridson, J.M., Artamonova, J., Stanton, J.-A.L., Wescombe, P.A., Burton, J.P., et al. (2011). Genome Sequence of the Bacteriocin-Producing Oral Probiotic *Streptococcus salivarius* Strain M18. J. Bacteriol. *193*, 6402–6403.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., et al. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. FEMS Microbiol. Rev. *29*, 435–463.

Iannelli, F., Oggioni, M.R., and Pozzi, G. (2005). Sensor domain of histidine kinase ComD confers competence pherotype specificity in *Streptoccoccus pneumoniae*. FEMS Microbiol. Lett. *252*, 321–326.

Johnsborg, O., and Håvarstein, L.S. (2009). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. FEMS Microbiol. Rev. *33*, 627–642.

Johnston, C., Campo, N., Bergé, M.J., Polard, P., and Claverys, J.-P. (2014a). *Streptococcus pneumoniae*, le transformiste. Trends Microbiol. *22*, 113–119.

Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., and Claverys, J.-P. (2014b). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. Nat. Rev. Microbiol. *12*, 181–196.

Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., and Crook, D.W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. Fems Microbiol. Rev. *33*, 376–393.

Laurenceau, R., Pehau-Arnaudet, G., Baconnais, S., Gault, J., Malosse, C., Dujeancourt, A., Campo, N., Chamot-Rooke, J., Le Cam, E., Claverys, J.-P., et al. (2013). A Type IV Pilus Mediates DNA Binding during Natural Transformation in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS Pathog. *9*.

Llosa, M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M., and de la Cruz Fd, F. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. Mol. Microbiol. *45*, 1–8.

Marron, A., Carratalà, J., González-Barca, E., Fernández-Sevilla, A., Alcaide, F., and Gudiol, F. (2000). Serious complications of bacteremia caused by *Viridans streptococci* in

neutropenic patients with cancer. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. *31*, 1126–1130.

Nikolskaya, A.N., and Galperin, M.Y. (2002). A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the *AlgR/AgrA/LytR* family. Nucleic Acids Res. *30*, 2453–2459.

Ochman, H., and Davalos, L.M. (2006). The nature and dynamics of bacterial genomes. Science *311*, 1730–1733.

Otto, R., ten Brink, B., Veldkamp, H., and Konings, W.N. (1983). The relation between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*. FEMS Microbiol. Lett. *16*, 69–74.

Pavlovic, G., Burrus, V., Gintz, B., Decaris, B., and Guédon, G. (2004). Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICE*St1*-related elements from *Streptococcus thermophilus*. Microbiology *150*, 759–774.

Perry, J.A., Jones, M.B., Peterson, S.N., Cvitkovitch, D.G., and Levesque, C.M. (2009). Peptide alarmone signalling triggers an auto-active bacteriocin necessary for genetic competence. Mol. Microbiol. *72*, 905–917.

Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., and Claverys, J.-P. (2006). Antibiotic Stress Induces Genetic Transformability in the Human Pathogen *Streptococcus pneumoniae*. Science *313*, 89–92.

Quevillon-Cheruel, S., Campo, N., Mirouze, N., Mortier-Barriere, I., Brooks, M.A., Boudes, M., Durand, D., Soulet, A.-L., Lisboa, J., Noirot, P., et al. (2012). Structure-function analysis of pneumococcal DprA protein reveals that dimerization is crucial for loading RecA recombinase onto DNA during transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, E2466–E2475.

Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Stuart, G.S., Lamont, I.L., and Ronson, C.W. (2006). Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase *IntS,* a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. Mol. Microbiol. *62*, 723–734.

Roger, P., Delettre, J., Bouix, M., and Béal, C. (2011). Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva. J. Appl. Microbiol. *111*, 631–641.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory).

Shinagawa, H. (1996). SOS response as an adaptive response to DNA damage in prokaryotes. EXS *77*, 221–235.

Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000). Two-component signal transduction. Annu. Rev. Biochem. *69*, 183–215.

Tagg, J.R. (2004). Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-*Streptococcus pyogenes* bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Streptococcus salivarius*. Indian J. Med. Res. *119 Suppl*, 13–16.

Terzaghi, B.E., and Sandine, W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. Appl. Microbiol. *29*, 807–813.

Wen, Z.T., Suntharaligham, P., Cvitkovitch, D.G., and Burne, R.A. (2005). Trigger Factor in *Streptococcus mutans* Is Involved in Stress Tolerance, Competence Development, and Biofilm Formation. Infect. Immun. *73*, 219–225.

Wozniak, R.A.F., and Waldor, M.K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. Nat. Rev. Microbiol. *8*, 552–563.

Streptococcus salivarius est une bactérie commensale de l'homme pouvant être un pathogène opportuniste. Le séquençage du génome d'une sélection de souches a permis de mettre en évidence la présence d'éléments génétiques mobiles de type éléments intégratifs et conjugatifs (ICE). Ces derniers présentent des parties variables pouvant donner un avantage sélectif à l'organisme porteur (résistances aux antibiotiques, aux phages ou encore un pouvoir pathogène). Afin d'étudier le transfert des ICE entre différentes souches de *S. salivarius*, un système de suivi, basé sur un ensemble de constructions plasmidiques a été conçu. Lors de mon stage de M2, j'ai réalisé une étude *in silico* et *in vitro* afin d'apprécier le potentiel de transformation naturelle (compétence) des souches d'intérêt de *S. salivarius* afin de marquer les ICE pour les expériences de transfert. La mise en place de la compétence chez les streptocoques étant liée à la présence d'un système de quorum-sensing, l'ajout du peptide signal et de l'ADN exogène a été réalisé à différents temps et différentes concentrations. Dans un but d'optimisation, une cinétique de régénération des cellules (temps nécessaire à l'intégration et expression de l'ADN acquis) a été testée. L'ensemble de ces expériences ont permis de mesurer le niveau de compétence de souches d'intérêt de *S. salivarius*.

Streptococcus salivarius is a human commensal bacteria that can be an opportunistic pathogen. Genomic sequencing of selected strains allowed us to highlight the presence of mobile genetic elements type Integrative and Conjugative Elements (ICE). They carry accessory loci that could confer selective advantage to its host (antibiotics or phage resistance or pathogenicity properties). In order to study ICE transfer between different strains of *S. salivarius*, a reporter system based on a set of plasmid construction was developed. During my M2 project I studied, *in silico* and *in vitro*, the potential of natural transformation (competence) of *S. salivarius* strains of interest to labeled the ICE for transfer experiments. As streptococci competence depend on quorum-sensing system, different times and quantities of signal peptide and DNA were tested. To increase competence level, recovery kinetic was done to fix the time for foreign DNA integration and expression. All of these experiments allowed us to measure competence level of *S. salivarius* interest strains.