



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Microbiologie et génétique

Présentée et soutenue par Stéphanie CAYMARIS
Le 14 décembre 2010 à 14h30

Titre :
Implication du ppGpp et du régulateur global CodY dans le déclenchement de la compétence chez
Streptococcus pneumoniae.

JURY

Emmanuelle BOUVERET	Rapporteur
Pascale SERROR	Rapporteur
Eric GUEDON	Examineur
Jean-Pierre CLAVERYS	Directeur de Thèse
Marc PRUDHOMME	Directeur de Thèse
Matthieu ARLAT	Professeur

Ecole doctorale : Biologie Santé Biotechnologies
Unité de recherche : Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaire, CNRS, UMR5100
Directeur(s) de Thèse : Marc PRUDHOMME et Jean-Pierre CLAVERYS

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Emmanuelle Bouveret et Pascale Serror d'avoir accepté de juger mon travail, ainsi que Eric Guedon et Mathieu Arlat pour avoir accepté d'être présents lors de ma soutenance.

Je tiens également à remercier mes directeurs de thèse Marc Prudhomme et Jean-Pierre Claverys qui m'ont conseillée et écoutée tout au long de ces années.

Je remercie également tous les membres de l'équipe qui ont contribué à ma formation et à la bonne ambiance dans le laboratoire. Un merci particulier à Chantal, notre super technicienne qui sait toujours comment faire et où trouver les choses, Nathalie et Bernard qui m'ont donné de très bons conseils au cours de ma thèse et surtout à la fin !

Pour finir, je remercie mes ami(e)s, ma famille et mon pacsou qui m'ont supportée (et le mot est faible) durant ces quelques années.

Résumé

Implication du ppGpp et du régulateur global CodY dans le déclenchement de la compétence chez *Streptococcus pneumoniae*.

Streptococcus pneumoniae (le pneumocoque) est une bactérie commensale, présente de façon asymptomatique dans le rhinopharynx de 20 % d'adultes et 50 % d'enfants. Cette bactérie peut devenir un pathogène majeur responsable de pneumonies, de méningites et de septicémies, et cause 1,5 million de morts chaque année dans le monde. Il existe deux méthodes de lutte : l'antibiothérapie et la vaccination. Ces deux stratégies se heurtent à la grande variabilité génétique du pneumocoque, essentiellement due à sa capacité à transformer naturellement. La transformation requiert le développement d'un état physiologique transitoire appelé compétence. Sa régulation met en jeu une boucle autocatalytique conduisant à l'expression des gènes de compétence. Mon travail de thèse a porté sur l'étude des mécanismes moléculaires responsables de l'initiation de la compétence.

Des études menées au laboratoire ont montré l'implication indirecte de Ami (transport d'oligopeptides) dans la répression de la compétence. Les acides aminés transportés par Ami pourraient servir de jauge métabolique sentie par RelA (réponse stringente) ou par CodY. Nos résultats montrent que le ppGpp est un activateur de la compétence, mais cette molécule n'est pas le seul signal aboutissant au développement de la compétence, et que CodY pourrait être un répresseur de la compétence. De plus, nous avons montré que *codY* est essentiel et que son inactivation peut aboutir à la formation de structures mérodiplôides. De plus, l'absence de CodY peut être compensée par la présence de 2 mutations, *fatC* et *amiC*, ou par d'autres mutations qui n'ont pas encore été identifiées.

Summary

Streptococcus pneumoniae (the pneumococcus) is found in the nasopharynx of 20% of adults and 50% of children. The pneumococcus is a major pathogen, causing pneumonia, otitis media, meningitis and bacteriemia. Every year, pneumococcal infections kill 1.5 million people worldwide. The two methods used to fight this pathogen (vaccination and antibiotherapy) can be bypassed by the high genetic variability of the pneumococcus. Natural genetic transformation is responsible for this variability and requires the pneumococcus to enter a transitory physiological state called competence. This state is based on an autocatalytic loop that induces the expression of the genes involved in competence. This thesis focusses on molecular mechanisms that lead to competence initiation in the pneumococcus.

Studies carried out in our lab have shown that the Ami transporter is involved in competence regulation. Amino acids (internalized through Ami) may be a metabolic gauge for competence regulation. Results show that ppGpp is involved in competence development activation but that other regulatory signals are also involved. The regulator CodY might be a competence repressor. On the other hand, this study has shown that *codY* is an essential gene and that its inactivation can lead to merodiploid formation. Furthermore, the absence of CodY can be compensated by the presence of two mutations, in the *fatC* and *amiC* genes, or by the presence of other mutations not yet characterized.

A. INTRODUCTION	1
I) <i>Streptococcus pneumoniae</i> , une bactérie commensale pathogène opportuniste	2
II) La transformation	3
II.1) Historique	3
II.2) Mécanisme de transformation chez le pneumocoque	5
II.2.1) Pore d'entrée	5
II.2.2) ADN processome	6
II.2.3) La recombinaison homologue	6
II.3) Quand les bactéries sont-elles transformables ?	7
III) La compétence	8
III.1) La cascade de régulation	8
III.1.1) Le CSP	8
III.1.2) Le système ComD/E	8
III.1.3) Les gènes induits lors de la compétence	9
III.2) Sortie de l'état de compétence	10
III.3) Initiation de la compétence	11
III.3.1) Effet des mutants <i>comAB</i> et <i>comDE</i>	11
III.3.2) Effet du milieu et du pH	11
III.3.3) Effet du métabolisme et de l'enveloppe	12
III.3.4) Effet des antibiotiques et des génotoxiques	12
IV) Problématique du travail	12
V) CodY est un régulateur global	14
V.1) Découverte	14
V.2) Fonction de CodY	15
V.2.1) Action directe de CodY	15
V.2.2) Effet du GTP	15
V.2.3) Effet des acides aminés branchés	16
V.2.4) Eléments de structure	16
V.2.5) Fixation à l'ADN	17
V.3) Les fonctions régulées par CodY	17
V.3.1) Métabolisme	18
V.3.2) Virulence	18
V.3.3) Processus cellulaires	18
V.4) Régulations croisées	19
V.5) Chez <i>Streptococcus pneumoniae</i>	20
VI) Le ppGpp : une alarmone	21
VI.1) Découverte	21
VI.2) Synthèse et dégradation du ppGpp	22
VI.3) La réponse stringente	23
VI.4) Structure des gènes responsables de la synthèse du ppGpp	25
VI.5) Chez <i>Streptococcus pneumoniae</i>	26
B. RESULTATS	27
Chapitre 1 : étude de l'effet de <i>rshA</i> et <i>rshQ</i> dans la régulation de la compétence.	28
I) Effet du ppGpp sur l'induction de la compétence chez <i>S. pneumoniae</i>	29
I.1) Mode d'action de la sérine hydroxamate	29
I.2) Effet de la sérine hydroxamate sur le développement de la compétence	30
II) Création de souches incapables de produire du ppGpp	32
II.1) Recherche des gènes impliqués dans la production de ppGpp chez <i>S. pneumoniae</i>	32
II.2) Création des mutants par mutagenèse <i>mariner</i>	33

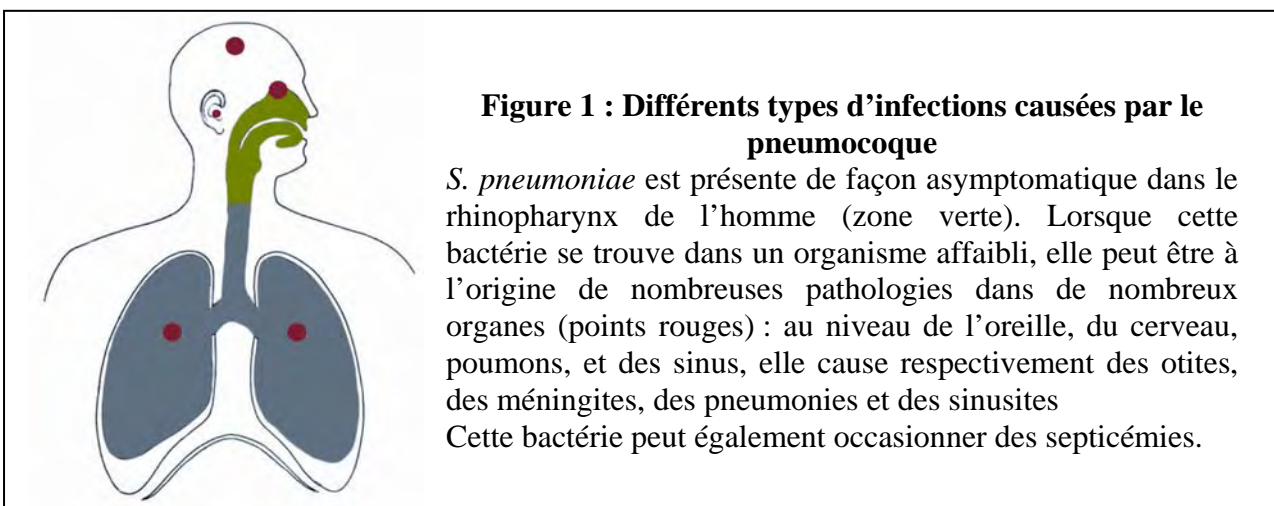
II.3)	Effet des mutations sur la croissance	35
II.4)	Retournement de la cassette des minitransposon insérés dans <i>rshA</i>	37
II.5)	Croissance des mutants <i>rshA</i> co-transcrits	38
II.6)	Analyse de la production de ppGpp chez <i>S. pneumoniae</i>	40
III)	Effet des mutations <i>rshA</i> et <i>rshQ</i> sur l'induction de la compétence.	42
III.1)	Induction spontanée de la compétence	42
III.2)	Compétence induite par le CSP	44
IV)	Effet de la sérine hydroxamate et des antibiotiques sur l'induction de la compétence chez les mutants <i>rshA rshQ</i>	47
IV.1)	Effet de la sérine hydroxamate	47
IV.2)	Effet de la streptomycine	49
V)	Discussions et perspectives	51
VI)	Matériel et méthodes	53
Chapitre 2 : le régulateur global CodY est une protéine essentielle chez le pathogène humain <i>Streptococcus pneumoniae</i>		60
Chapitre 3 : <i>fatC-amiC</i> n'est pas le seul contexte suppresseur		88
I)	Etude des différents contextes permettant d'accepter <i>codY</i>	89
I.1)	Analyse du transfert de <i>codY</i> dans le contexte génétique R1501	91
I.1.1)	Mérodiploïdes	91
I.1.2)	Catégories I et II	92
I.2)	Analyse du transfert de <i>codY</i> dans le contexte génétique D39	93
I.2.1)	Catégories III : <i>fat⁺ amiC⁻</i>	93
I.2.2)	Catégorie IV : <i>fat⁺ amiC⁺</i>	97
I.2.3)	Catégorie V : contexte <i>glnR⁻</i>	97
II)	<i>codY</i> est-il vraiment un répresseur de la compétence	98
II.1)	Discussion et perspectives	98
II.2)	CodY réprime-t-elle la compétence ? Utilisation de <i>comA::ery^A</i>	99
III)	Matériel et méthodes	102
C. CONCLUSION		110
I)	Rôle du ppGpp dans la régulation de la compétence	111
I.1)	Production de ppGpp chez <i>S. pneumoniae</i>	111
I.2)	ppGpp un activateur de la compétence	112
I.3)	Particularité du mutant <i>rshA</i>	112
I.4)	Différents modèles de mode d'action du ppGpp sur l'induction de la compétence	113
II)	Rôle de CodY dans la régulation de la compétence	114
II.1)	<i>codY</i> est un gène essentiel	114
II.2)	Viabilité des mutants <i>codY</i>	114
II.3)	Plusieurs contextes génétiques permettent de supprimer l'inviabilité des mutants <i>codY</i>	115
II.3.1)	Mérodiploïdie et essentialité de <i>codY</i>	115
II.3.2)	La mutation <i>fatC^{C496T}</i> n'est pas essentielle pour compenser l'absence de CodY en contexte D39 Δ <i>cps</i>	115
II.3.3)	Rôle de la compétence dans la suppression ?	116
II.3.4)	D'autres contextes possibles ?	116
II.4)	Effet de CodY sur la régulation de la compétence	116
D. ANNEXES		119
ANNEXE A : induction de la compétence par différentes concentrations de sérine hydroxamate		120
ANNEXE B Etude de la structure génique de la souche D39 Δ <i>cps</i> Δ <i>codY</i>		122

ANNEXE C : Etude de souches mérodiplloïdes	128
I) Qu'est que la mérodiplloïdie	129
II) Etude de la souche mérodiplloïde R2597	130
II.1) Etude PCR	130
II.2) Etude de la structure de la souche R2597 en champs pulsés	132
II.3) Etude par séquençage génomique	137
III) Formation de mérodiplloïdes.....	139
III.1) Etude PCR	140
III.2) Etude en champs pulsés.....	141
IV) Conclusion.....	146
ANNEXE D : Test de différents gènes candidats supresseurs.....	148
I) Transfert dans un contexte <i>glnR</i>	149
II) Transfert dans un contexte <i>rshA/rshQ</i>	151
III) Transfert dans un contexte <i>ccpA</i>	152
ANNEXE E : Abréviations et définitions	155
E. REFERENCES	157

A. INTRODUCTION

I) *Streptococcus pneumoniae*, une bactérie commensale pathogène opportuniste

La bactérie *Streptococcus pneumoniae*, aussi appelée *Diplococcus pneumoniae* ou pneumocoque, est un firmicute à Gram positif, commensale du rhinopharynx de l'homme. Ce germe a été découvert pour la première fois par Louis Pasteur et George Sternberg en 1881 (Pasteur, 1881 ; Sternberg, 1881). On estime que 30 à 50 % des enfants de moins de 6 ans et 4 à 12 % des adultes sont porteurs sains (pour revue (Lynch et Zhanel, 2009)). Mais lorsque les conditions lui sont favorables, cette bactérie peut devenir un pathogène majeur et provoquer des maladies non invasives comme la pneumonie, l'otite ou la sinusite, et des maladies invasives pouvant aller de la méningite à la septicémie (figure 1). L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que, chaque année dans le monde, environ 1,6 million de personnes dont 1 million d'enfants de moins de 5 ans meurent d'infections invasives causées par le pneumocoque (World Health Organization, 2007). Dans les pays développés, les enfants de moins de 2 ans et les personnes âgées sont les plus touchés par ces infections mortelles. La présence d'une infection par le VIH ou une immunodépression augmente le risque de contracter une pneumococcie. *S. pneumoniae* pose donc un problème de santé publique. Il existe aujourd'hui en France des organismes tels que les ORP (Observatoires régionaux du pneumocoque) qui procèdent deux fois par an à des études épidémiologiques et recensent les différents sérotypes et résistances aux antibiotiques rencontrés chez les patients atteints de pneumococcie.



S. pneumoniae possède une enveloppe polysaccharidique immunogène appelée capsule. Celle-ci est importante pour la virulence du pneumocoque, puisqu'on la trouve dans tous les isolats cliniques. Cette capsule peut être la cible de la réponse immunitaire (Johnston, 1991). La lutte contre ce pathogène peut se faire par vaccination. Il existe un vaccin

heptavalent ciblant 7 sérotypes capsulaires utilisé chez l'enfant, et un vaccin ciblant 23 sérotypes utilisé chez l'adulte. Cependant, ces deux vaccins ne ciblent qu'une petite partie des 91 sérotypes capsulaires répertoriés (Poolman, 2004). Il semble que l'utilisation de ces vaccins ait permis de réduire les infections à pneumocoques (Whitney *et al.*, 2006). De plus, certaines souches vaccinales virulentes ont échangé leur capsule avec celle d'une souche non vaccinale. Ce phénomène est appelé remplacement de sérotype (Hanage, 2007 ; Brueggemann *et al.*, 2007).

La lutte contre *S. pneumoniae* passe également par l'utilisation d'antibiotiques. Mais cette bactérie devient de plus en plus résistante aux antibiotiques, notamment aux pénicillines (Appelbaum, 1992). La résistance du pneumocoque aux pénicillines est due à des altérations des gènes des PBP (Penicillin Binding Proteins). Des mutations dans ces gènes peuvent diminuer leur affinité pour les pénicillines, ce qui les rend inefficaces (Hakenbeck *et al.*, 1980). L'analyse par séquençage des gènes des PBP montre que ces gènes sont organisés en blocs mosaïques très variables pouvant provenir d'échanges intra- et interspèces (Dowson *et al.*, 1993).

Les deux stratégies de lutte contre le pneumocoque (antibiothérapie et vaccination) se heurtent à la grande variabilité génétique de cette bactérie. Cette plasticité est essentiellement due à la transformation naturelle. En effet, *S. pneumoniae* est capable d'incorporer de l'ADN exogène et de l'intégrer dans son génome. Ainsi, le simple transfert de gènes codant pour les enzymes nécessaires à la production de la capsule peut permettre à la bactérie de changer de sérotype (Coffey *et al.*, 1991 ; Coffey *et al.*, 1999). De la même façon, de multiples événements de transformations interspèces au niveau des gènes des PBP sont à l'origine de la résistance de *S. pneumoniae* aux pénicillines (Chi *et al.*, 2007).

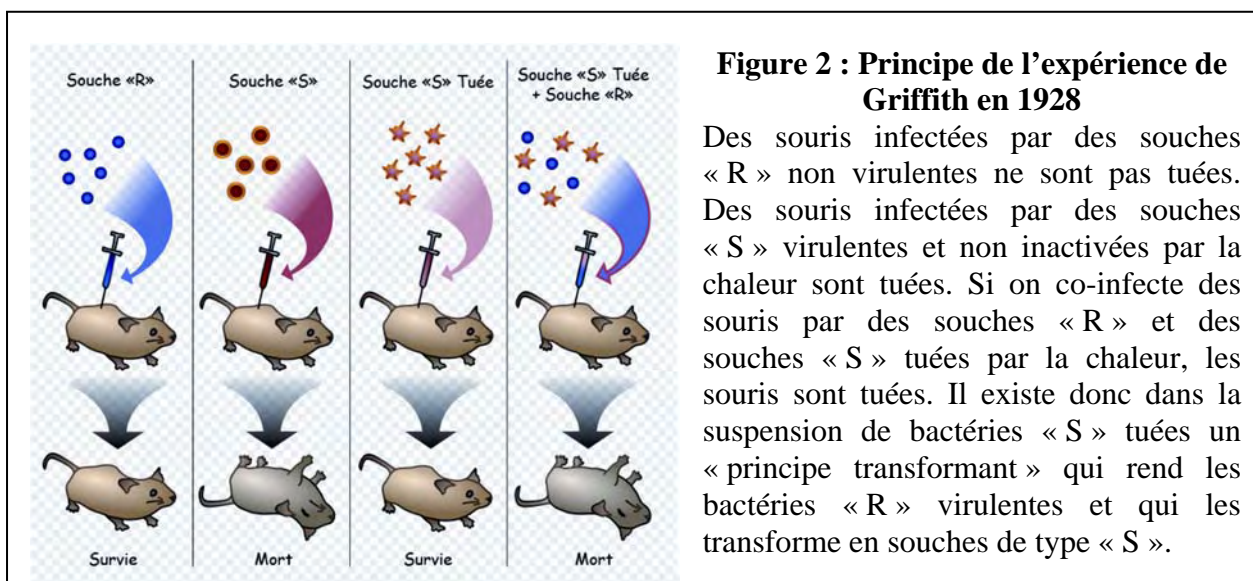
La variabilité génétique du pneumocoque est donc un atout majeur pour son évolution rapide, sa virulence et sa dissémination. Ainsi, l'utilisation simultanée d'un vaccin ciblant la capsule (ou d'un antibiotique) et d'un agent inhibant le processus de transformation pourrait être beaucoup plus efficace. Il semble donc crucial de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la transformation génétique naturelle.

II) La transformation

II.1) Historique

La transformation génétique naturelle a été observée pour la première fois par Frederick Griffith en 1928 chez *S. pneumoniae*. F. Griffith a utilisé deux souches de *S.*

pneumoniae. La première de caractère « S » (pour « smooth », lisse) est capsulée et virulente, la seconde de caractère « R » (pour « rough », rugueux) est décapsulée et avirulente. Son travail a montré que le caractère S et la virulence d'une souche tuée par la chaleur pouvaient être transmis à une souche de type R (figure 2). Griffith appela ce phénomène « la transformation » et en déduisit la présence d'un composant (« principe transformant ») contenu dans la suspension de bactéries « S » tuées, capable de transformer les bactéries de type « R » (Griffith, 1928). Oswald Avery et ses collaborateurs ont identifié ce principe transformant comme étant l'ADN et ont proposé l'ADN comme support de l'hérédité (Avery *et al.*, 1944).

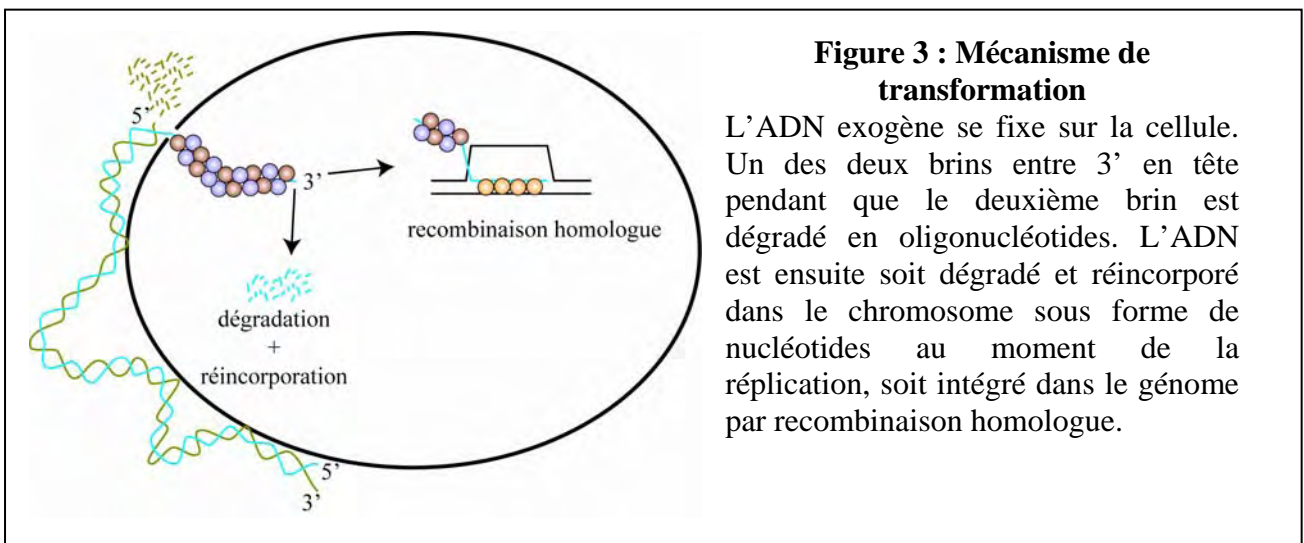


Après des années de travail, la capacité à transformer naturellement a été démontrée pour plus d'une quarantaine d'espèces bactériennes et archaebactériennes réparties dans tous les taxons et pouvant coloniser de nombreuses niches écologiques (Lorenz et Wackernagel, 1994). On peut penser que le nombre de bactéries identifiées comme étant naturellement transformables va continuer à augmenter. En effet, les conditions permettant la transformation de certaines espèces n'ont probablement pas encore été découvertes (Claverys et Martin, 2003).

Bien que très conservés, les mécanismes de transformation peuvent présenter des particularités spécifiques à chaque espèce. Par exemple, chez *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus influenzae*, des séquences spécifiques sont nécessaires pour l'internalisation de l'ADN. Ce n'est pas le cas pour *Bacillus subtilis* et *S. pneumoniae* (Smith *et al.*, 1999 ; Dubnau, 1999). Dans la suite de ce travail, le mécanisme et la régulation de la transformation chez *S. pneumoniae* seront développés.

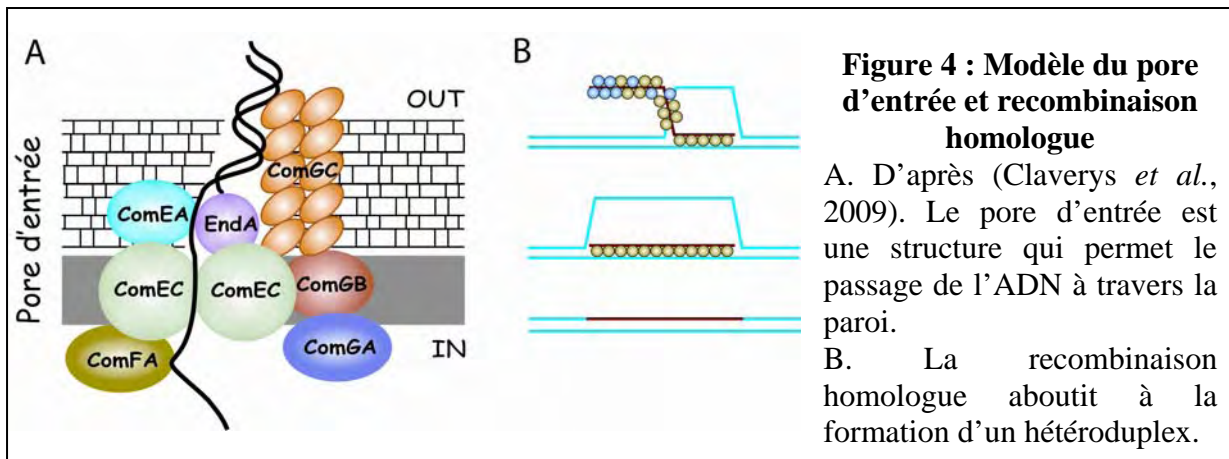
II.2) Mécanisme de transformation chez le pneumocoque

Lors de la transformation (figure 3), l'ADN exogène se fixe sur la cellule de manière non covalente (Lacks et Greenberg, 1976 ; Lacks, 1979 ; Morrison et Guild, 1973). L'ADN est transporté dans le cytoplasme au travers de la membrane via un complexe protéique appelé pore d'entrée. Cet ADN est internalisé sous forme simple brin dans le sens 3' vers 5' (Méjean et Claverys, 1988) pendant que l'autre brin est dégradé dans le sens inverse (Méjean et Claverys, 1993). L'ADN internalisé est soit détruit, soit intégré dans le génome s'il présente de l'homologie (Redfield, 2001 ; Johnsborg *et al.*, 2007).



II.2.1) Pore d'entrée

Le pore d'entrée de l'ADN (figure 4A) est constitué d'un pseudopilus apparenté aux systèmes de sécrétion de type IV (Dubnau, 1999) qui guide l'ADN à travers le peptidoglycane (Bergé *et al.*, 2002). Cette structure est un polymère de protéines homologues à des pilines (majoritairement ComGC mais également ComGD, ComGE, ComGG). De façon similaire aux pili de *Pseudomonas aeruginosa*, l'assemblage du pseudopilus se ferait grâce à la protéine polytopique ComGB et à la NTPase ComGA (Dubnau et Provvedi, 2000 ; Nunn *et al.*, 1990). ComEA présente l'ADN transformant à la nucléase EndA qui dégrade le brin non entrant en oligonucléotides (Bergé *et al.*, 2002). Enfin, le brin d'ADN entrant traverse la membrane plasmique par le canal transmembranaire ComEC grâce à la translocase ATP-dépendante ComFA (Dubnau, 1999).



II.2.2) ADN processome

Après son entrée dans la cellule, l'ADN simple brin est pris en charge par un ensemble de protéines appelé « ADN processome ». Tout d'abord, l'ADN entrant est protégé au sein d'un complexe nucléoprotéique appelé complexe d'éclipse (Ghei et Lacks, 1967 ; Morrison, 1977 ; Morrison, 1978). La protéine majeure du complexe d'éclipse est SsbB, une protéine induite en compétence capable de se fixer à l'ADN simple brin (Morrison *et al.*, 2007). Quatre autres protéines induites en compétence sont essentielles au « processing » de l'ADN : DprA, RadA, CoiA et RecA (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). RecA, DprA et SsbB sont impliquées dans la protection de l'ADN entrant (Bergé *et al.*, 2003 ; Attaiech, 2009). CoiA, RadA, DprA et RecA sont impliquées dans la recombinaison homologue (Desai et Morrison, 2007 ; Burghout *et al.*, 2007 ; Mortier-Barrière *et al.*, 1998).

II.2.3) La recombinaison homologue

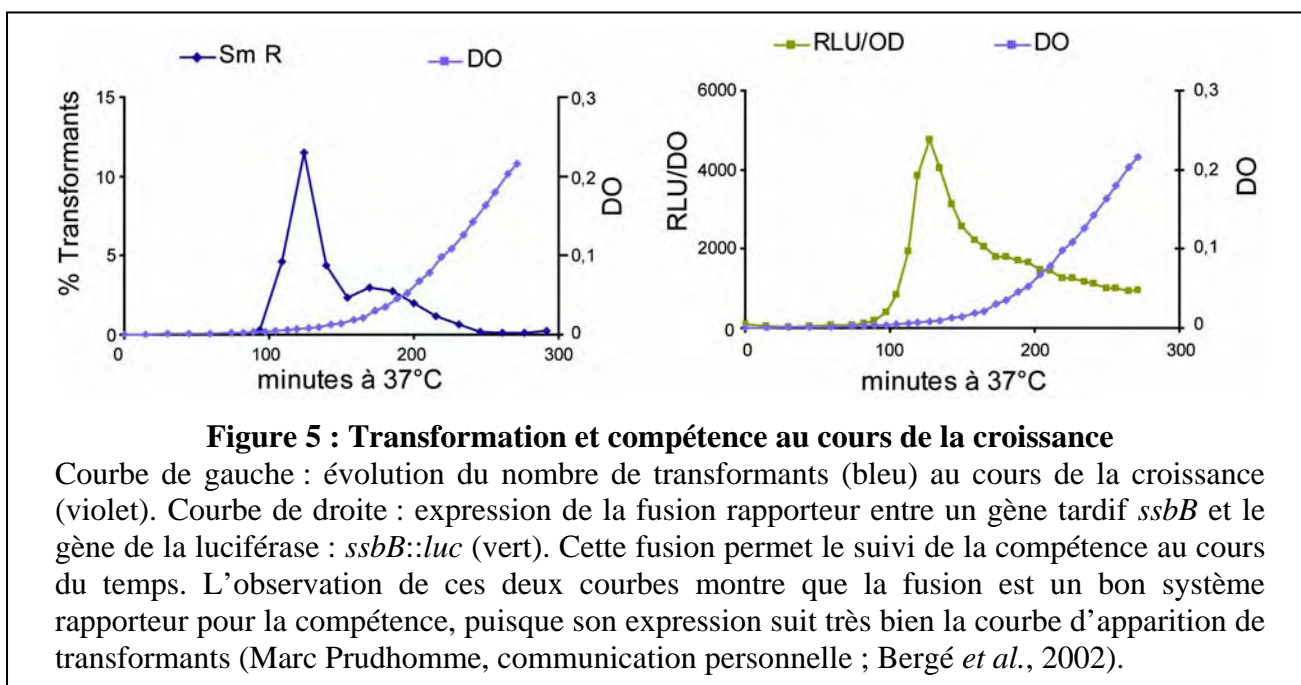
Lors de la transformation, un des brins de l'ADN du chromosome résident serait déplacé, et le brin d'ADN entrant s'apparierait dans cet espace, formant ainsi une D-loop. Le brin déplacé serait ensuite éliminé. Ceci aboutit à la formation d'un hétéroduplex contenant un brin d'ADN résident et un brin d'ADN transformant (figure 4B). Les principales étapes de la recombinaison homologue sont effectuées par RecA (Steffen et Bryant, 2000 ; Kowalczykowski, 2000 ; Cox, 2007). Le chargement de RecA sur l'ADN en éclipse recouvert de SsbB nécessiterait la présence de la protéine DprA qui jouerait le rôle de RMP (Recombination Mediator Protein) (Mortier-Barrière *et al.*, 2007).

L'hétéroduplex formé lors de la transformation subit les effets du système Hex (Heteroduplex Excision). Ce système est exprimé tout au long de la croissance de la bactérie

et limite les erreurs lors de la réplication (Claverys et Lacks, 1986). Lors de la transformation, certains marqueurs sont incorporés avec une haute efficacité (HE, pour « High Efficiency »), d'autres, avec une efficacité plus faible (LE, pour « Low Efficiency ») (Ephrussi-Taylor *et al.*, 1965 ; Lacks, 1966). Le système Hex est responsable de cette différence. En effet, les marqueurs dits HE portent un ou plusieurs mésappariements reconnus par la protéine HexA (G/T, A/C ou G/G) (pour revue Claverys et Lacks, 1986). Par analogie avec le système Mut d'*Escherichia coli*, la protéine HexA reconnaît et fixerait le mésappariement (Priebe *et al.*, 1988 ; Su et Modrich, 1986), puis HexB déterminerait lequel des deux brins est exogène (Guild et Shoemaker, 1976). Ce brin est ensuite dégradé, et l'ADN est réparé.

II.3) Quand les bactéries sont-elles transformables ?

Hormis chez *N. gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*, qui sont transformables tout au long de leur croissance (Sparling, 1966 ; Jyssum, 1966), la transformation naturelle est possible lors d'un changement d'état physiologique appelé compétence (Tomasz et Hotchkiss, 1964). Chez *S. pneumoniae*, la compétence se développe en phase exponentielle de croissance (figure 5). En revanche, *B. subtilis* est transformable uniquement en début de phase stationnaire en milieu pauvre (Dubnau, 1991).



Chez *S. pneumoniae*, la compétence est un phénomène transitoire qui apparaît dans toute la population comme un « pic » et qui disparaît après seulement une quarantaine de minutes (figure 5). Ceci suggère que l'état de compétence est un phénomène finement régulé.

La régulation de la compétence a été beaucoup étudiée chez *S. pneumoniae* et *B. subtilis*. Le mode de régulation n'est pas équivalent chez ces deux espèces (pour revue Claverys *et al.*, 2006). Seule la régulation de la compétence chez le pneumocoque sera abordée ici.

III) La compétence

III.1) La cascade de régulation

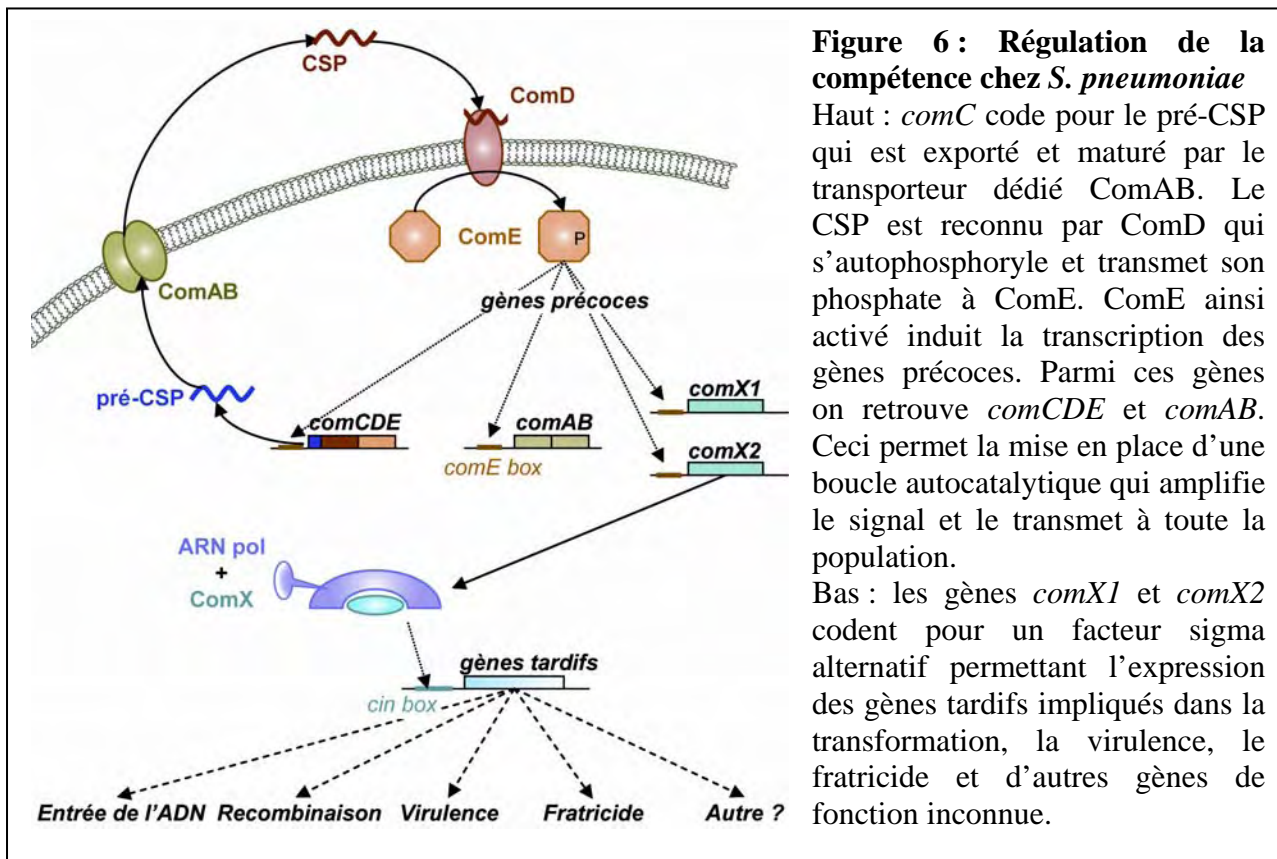
III.1.1) Le CSP

Dans les années 1960, il a été découvert que le surnageant de cultures compétentes contenait un composé de nature peptidique capable d'induire la compétence (Pakula et Walczak, 1963). Ce composé a été purifié et séquencé : le CSP (Competence Stimulating Peptide). Il s'agit d'un peptide de 17 acides aminés non modifié codé par le gène *comC* (Håvarstein *et al.*, 1995). En fait, le gène *comC* code un prépeptide de 41 acides aminés qui porte une séquence signal à double glycine (GG) (Pestova *et al.*, 1996). Ce pré-CSP est exporté et clivé au niveau du GG en CSP par un transporteur ABC qui lui est dédié, ComAB (Hui *et al.*, 1995 ; Pestova *et al.*, 1996 , Håvarstein *et al.*, 1995).

III.1.2) Le système ComD/E

Le gène *comC* est en opéron avec *comD* et *comE* (Cheng *et al.*, 1997) qui codent pour un système de transduction du signal à deux composants (TCS : Two-Component System) (Pestova *et al.*, 1996). Les TCS comportent une histidine kinase (ici ComD), qui perçoit un signal environnemental, et un régulateur de réponse (ici ComE), qui module l'expression de gènes en réponse à ce signal. Le senseur s'autophosphoryle sur un résidu histidine et transmet son phosphate au régulateur de réponse sur un résidu aspartate (Mitrophanov et Groisman, 2008). Il semble que le senseur ComD fixe le CSP. Il existe deux sortes de CSP (CSP1 et CSP2) qui sont capables d'activer la compétence uniquement des cellules qui portent l'allèle de *comD* correspondant (respectivement *comD1* et *comD2*) (Whatmore *et al.*, 1999 ; Håvarstein *et al.*, 1997).

Une fois phosphorylé, ComE se fixe aux promoteurs de *comCDE* et *comAB* pour activer leur transcription. Ceci améliore par conséquent la capacité à produire, à exporter et à répondre au CSP. Ainsi, la concentration extracellulaire du CSP augmente très vite et permet l'activation de la compétence dans l'ensemble de la population bactérienne (figure 6, haut) (Pestova *et al.*, 1996).



III.1.3) Les gènes induits lors de la compétence

Dans les années 1990, Geneviève Alloing et ses collaborateurs ont démontré que certains gènes de compétence n'avaient pas la même cinétique d'induction. En effet, l'opéron *comCDE* est induit environ 5 minutes plus tôt que le gène *recA* (Alloing *et al.*, 1998). Les laboratoires de Donald Morrison et Jean-Pierre Claverys ont étudié le régulon compétence. Ces études ont confirmé la présence de ces deux classes de gènes : précoces et tardifs, et ont permis de mettre en évidence une troisième classe : les gènes retardés (Peterson *et al.*, 2004 ; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). On dénombre 91 gènes induits en compétence communs aux deux études : 17 sont précoces, 60 sont tardifs et 14 sont retardés.

L'expression des gènes précoces atteint son maximum 5 minutes l'induction de la compétence par le CSP et est rapidement éteinte (Alloing *et al.*, 1998). Parmi ces gènes, on trouve *comCDE* et *comAB*, ainsi que les gènes *comX* et *comW*. Le gène *comX* est présent en

deux copies sur le génome de *S. pneumoniae* (Lee et Morrison, 1999) et code pour un facteur sigma alternatif activant la transcription des gènes tardifs portant une *cin*-box (ou *com*-box) (Luo et Morrison, 2003 ; Luo et Morrison, 2003). ComW stabilise l'interaction entre ComX et la polymérase et le protège de la dégradation par les protéases Clp (Sung et Morrison, 2005).

L'expression des gènes tardifs atteint son maximum au bout de 10 à 15 minutes puis diminue (Alloing *et al.*, 1998). Environ 15 gènes tardifs interviennent dans la transformation. Parmi les gènes restant, certains sont impliqués dans le fratricide et la virulence. Le fratricide est la capacité des pneumocoques compétents à lyser les cellules non compétentes. Les gènes tardifs *cibAB*, *lytA* et *cbpD* sont requis pour ce phénomène qui permet la libération de facteurs de virulence comme la pneumolysine (Guiral *et al.*, 2005 ; Claverys *et al.*, 2007).

L'expression des gènes retardés commence après 10 à 15 minutes et n'est pas directement dépendante de ComX (Peterson *et al.*, 2004). Ces gènes font partie des régulons de réponse au stress CiaR, HrcA, et CtsR (Peterson *et al.*, 2004 ; Dagkessamanskaia *et al.*, 2004). Leur expression permet probablement aux cellules de s'adapter au nouveau set de protéines induites par la compétence.

III.2) Sortie de l'état de compétence

Le suivi de l'induction de la compétence (figure 5) montre que la compétence est transitoire. De plus, il existe une période réfractaire d'une à deux générations durant laquelle la compétence ne peut pas être induite une deuxième fois (Morrison, 1997). Ceci suggère qu'il existe des mécanismes qui permettent d'inhiber l'expression des gènes de compétence.

L'arrêt de la transcription des gènes tardifs peut s'expliquer par la faible stabilité du facteur sigma alternatif ComX (Luo et Morrison, 2003). De plus, le facteur sigma de ménage RpoD est exprimé simultanément à ComX. Ces deux facteurs sigma pourraient entrer en compétition pour la fixation avec l'ARN polymérase (Peterson *et al.*, 2004 ; Claverys et Håvarstein, 2002).

En revanche, ComE est stable pendant plus de 80 minutes (Ween *et al.*, 1999). La fonction de ComE est probablement régulée par une variation de sa phosphorylation et/ou de sa multimérisation (Martin *et al.*, 2000).

III.3) Initiation de la compétence

L'induction de la compétence met en jeu une boucle autocatalytique qui aboutit à l'expression des gènes de compétence. Mais, à l'heure actuelle, les mécanismes qui permettent d'enclencher cette boucle ne sont pas encore élucidés.

Dans un premier temps, on pensait que le CSP s'accumulait de façon passive dans le milieu de culture (Pestova *et al.*, 1996). Ainsi, le CSP induirait la compétence en fonction de la densité cellulaire, phénomène appelé « quorum sensing » (Morrison, 1997). Cependant, il apparaît que certains paramètres influencent cette induction. Il a été proposé que le CSP pourrait être une alarmone temporairement augmentée en réponse à différents changements environnementaux (Claverys *et al.*, 2000 ; Martin *et al.*, 2000 ; Prudhomme *et al.*, 2006 ; Claverys *et al.*, 2006).

III.3.1) Effet des mutants *comAB* et *comDE*

Pour déterminer le mode de régulation de la compétence, un crible permettant de repérer des mutants capables de déclencher la compétence dans des conditions non favorables a été mis en place. Ces mutants ont été appelés « mutants *cup* » (Competence Upregulated) (Martin *et al.*, 2000).

L'analyse de ces mutants a permis de mettre en évidence qu'une surexpression de *comAB* augmente la capacité d'export du CSP et induit plus facilement la compétence (Martin *et al.*, 2000). Il en est de même si on augmente la quantité de CSP produite en surexprimant le gène *comC* (Alloing *et al.*, 1998). Cependant, si la surexpression est trop intense, alors la compétence est réprimée (Guiral *et al.*, 2006). La compétence, qui requiert un niveau basal de *comCDE* (Martin *et al.*, 2010), peut donc être régulée en modulant l'expression de *comAB* et *comCDE*. Il semble donc qu'un équilibre soit nécessaire pour une induction normale de la compétence.

III.3.2) Effet du milieu et du pH

Pour obtenir une induction de la compétence en laboratoire, il faut que le milieu contienne certains nutriments comme le CaCl₂, la BSA (Bovine Serum Albumin) et une concentration élevée en phosphate (Håvarstein et Morrison, 1999). En revanche, un faible pH initial est inhibiteur de la compétence (Chen et Morrison, 1987). Des travaux menés au laboratoire montrent que la compétence est induite de façon optimale à pH 7,6-8. Si le pH

diminue, la compétence est de moins en moins intense, jusqu'à être complètement inhibée (Marc Prudhomme, communication personnelle).

III.3.3) Effet du métabolisme et de l'enveloppe

Des travaux réalisés chez *S. pneumoniae* ont montré que le transporteur d'oligopeptides Ami/Obl était indirectement impliqué dans la répression de la compétence (Alloing *et al.*, 1994 ; Alloing *et al.*, 1998). De plus, l'étude des mutants *cup* obtenus par Bernard Martin et ses collègues en 2000 a également permis d'isoler des mutants dans les gènes *guaA* et *guaB* qui participent à la biosynthèse du GTP (Marc Prudhomme, communication personnelle). Le taux de peptides/acides aminés et le taux de GTP dans la cellule semblent importants pour la régulation de la compétence. Le métabolisme général pourrait donc être un acteur majeur de cette régulation.

Les mutants *cls* (impliqués dans la synthèse de la membrane plasmique) et les mutants *ciaRH* (TCS impliqué dans la réponse aux stress d'enveloppe) jouent également un rôle dans la régulation de l'induction de la compétence. Il semble donc que les stress d'enveloppe participent aussi à cette régulation.

III.3.4) Effet des antibiotiques et des génotoxiques

Le pneumocoque est capable d'induire la compétence en réponse à certains agents génotoxiques (par exemple la mitomycine C) ou en réponse à certains antibiotiques (notamment des molécules capables de bloquer le ribosome avec le site A libre) (Prudhomme *et al.*, 2006). La compétence pourrait donc être une réponse générale au stress chez *S. pneumoniae* qui ne possède pas de système SOS (Claverys *et al.*, 2006).

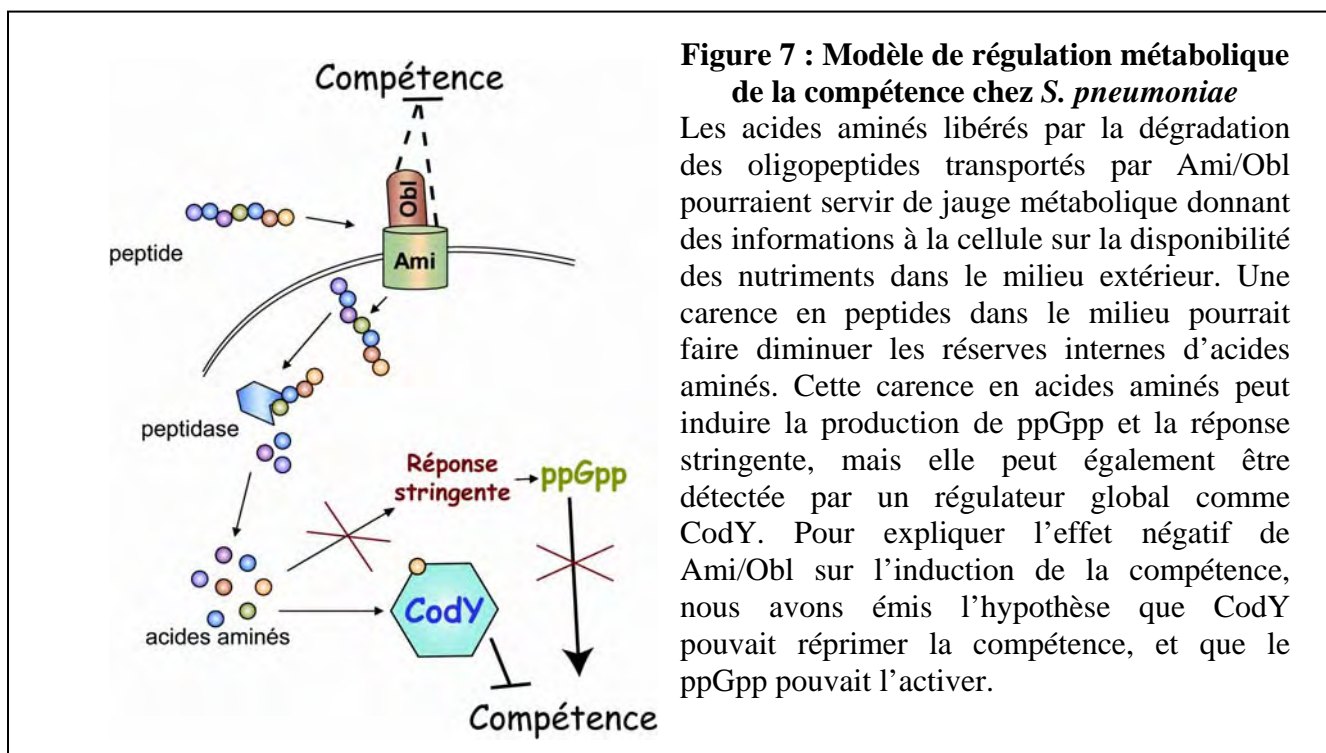
IV) Problématique du travail

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes permettant l'initiation de la boucle autocatalytique aboutissant à l'état de compétence, et plus particulièrement aux effets du métabolisme central sur ce phénomène.

Le transporteur d'oligopeptides Ami/Obl est impliqué dans la répression de la compétence. Cette observation nous a amené à penser que la compétence pourrait être régulée

de manière métabolique (Alloing *et al.*, 1998 ; Claverys *et al.*, 2000), et deux candidats ont été retenus : le ppGpp et CodY (figure 7).

Un autre argument est à prendre en considération. Certains agents génotoxiques et antibiotiques sont capables d'induire la compétence du pneumocoque. Certaines de ces molécules agissent au niveau du ribosome et bloquent la traduction (Prudhomme *et al.*, 2006). Sachant qu'un blocage du ribosome peut induire la production de ppGpp chez *E. coli* (cf. III), nous avons émis l'hypothèse que ces molécules pourraient également provoquer une augmentation de la concentration en ppGpp. Ceci pourrait être un signal conduisant à l'induction de la compétence.



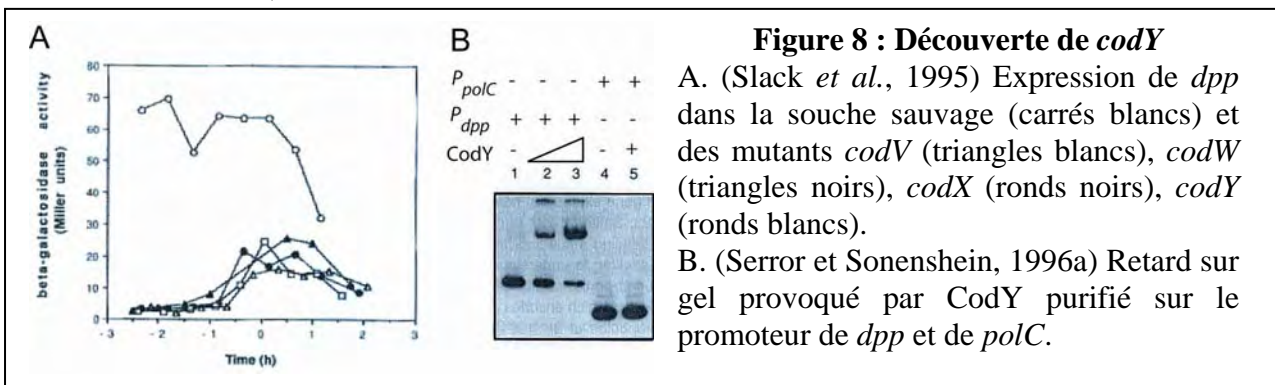
Dans la suite de cette introduction, je ferai une synthèse de ce qui est connu sur le ppGpp, la réponse stringente et CodY.

Ensuite, je présenterai mes résultats dans 3 chapitres. La première partie porte sur le rôle des protéines RshA et RshQ dans la production de ppGpp et dans la régulation de la compétence. La deuxième partie traite de l'essentialité du gène *codY* et des mutations suppressives qui permettent la survie du mutant D39 Δ *codY*. Pour finir, la troisième partie donne un aperçu des différents contextes mutants qui permettent de compenser l'absence de CodY.

V) CodY est un régulateur global

V.1) Découverte

Le régulateur CodY a été mis en évidence pour la première fois chez *B. subtilis* (Slack *et al.*, 1995) lors de l'étude de l'opéron *dpp* (*dciA*). Cet opéron qui code pour une perméase à dipeptides est réprimé durant la phase exponentielle de croissance et activé durant la phase précoce de la sporulation (Mathiopoulos et Sonenshein, 1989). L'expression de *dpp* au cours de la croissance exponentielle est réprimée en présence d'acides aminés dans le milieu de culture (Slack *et al.*, 1991 ; Slack *et al.*, 1993). En 1991, le suivi de l'expression de *dpp* dans différents mutants d'insertion a permis d'isoler quatre mutants de phénotype *cod* (control of *dciA*). Ces quatre souches portent ainsi une insertion dans un opéron de quatre gènes : *codWXYZ* (Slack *et al.*, 1995). L'effet de la délétion de chacun des gènes de cet opéron sur la transcription de *dpp* a permis de montrer que CodY pouvait réprimer l'expression de *dpp* en présence d'acides aminés (figure 8A) (Slack *et al.*, 1995). Cette répression est directe car CodY se fixe au promoteur de *dpp* au niveau des nucléotides -10 à +30 (figure 8B) (Serror et Sonenshein, 1996a).



La répression par CodY a ensuite été démontrée pour plusieurs autres loci : l'opéron *hut* (utilisation de l'histidine) (Fisher *et al.*, 1996 ; Serror et Sonenshein, 1996a), *comK* et *comS* (impliqués dans la régulation de la compétence chez *B. subtilis* ; ces gènes ne sont pas présent chez *S. pneumoniae*) (Serror et Sonenshein, 1996b), *gabP* (GABA perméase) (Ferson *et al.*, 1996), *ureABC* (uréase) (Wray *et al.*, 1997), *ilv-leu* (métabolisme des acides aminés) (Debarbouille *et al.*, 1999). La répression CodY-dépendante de tous ces loci est inversement proportionnelle à la croissance et est levée en cas de carence en acides aminés, en sources de carbone ou en azote (Fisher, 1999).

V.2) Fonction de CodY

CodY est un régulateur transcriptionnel exprimé en fonction de la croissance (Slack *et al.*, 1995). Sa fonction est dépendante de corépresseurs (Sonenshein, 2005).

V.2.1) Action directe de CodY

La plupart des gènes régulés par CodY sont réprimés. La fixation de CodY sur différents promoteurs a été démontrée chez différentes espèces bactériennes (Serror et Sonenshein, 1996a ; Serror et Sonenshein, 1996b ; den Hengst *et al.*, 2005 ; Dineen *et al.*, 2007 ; Bennett *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2009 ; Majerczyk *et al.*, 2010 ; Hendriksen *et al.*, 2007).

La protéine CodY est également capable d'activer l'expression de certains gènes, notamment d'un petit ARN, *bsrF* (Preis *et al.*, 2009), ou celle de *ackA* (Molle *et al.*, 2003). CodY se fixe avec une grande affinité à la région -60/-100 (par rapport au +1 de transcription) du promoteur de *ackA* (Shivers *et al.*, 2006).

V.2.2) Effet du GTP

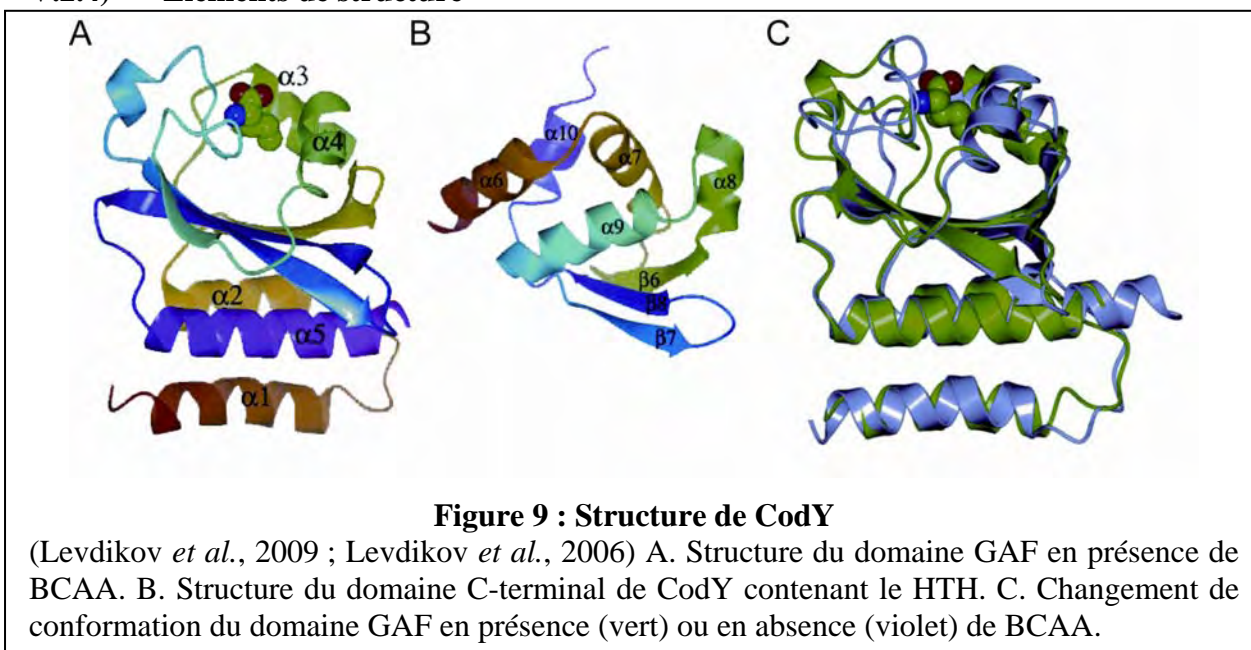
Pour répondre rapidement aux signaux environnementaux, l'activité de CodY est modulée par le GTP chez *B. subtilis* (Ratnayake-Lecamwasam, 2001). La fixation du GTP sur CodY augmente son affinité pour les promoteurs régulés *in vitro* (Handke *et al.*, 2007). Le GTP joue également un rôle de corépresseur chez *Bacillus anthracis* (Sonenshein, 2005), *Listeria monocytogenes* (Bennett *et al.*, 2007), *Clostridium difficile* (Dineen *et al.*, 2007) et *Staphylococcus aureus* (Majerczyk *et al.*, 2010). En revanche, il a été démontré que les protéines CodY de *Lactococcus lactis* et de *S. pneumoniae* ne sont pas sensibles au GTP (Petranovic *et al.*, 2004 ; Hendriksen *et al.*, 2007).

Chez les bactéries qui possèdent une protéine CodY réactive au GTP, on peut constater un phénomène d'interconnexion entre la réponse stringente et la répression par CodY. Lors de la réponse stringente, la protéine RelA produit du ppGpp à partir de GTP et ATP (cf. VI.2). Il a été proposé que ceci permettrait la diminution du taux de GTP dans la cellule et, par conséquent, la dérégulation des gènes sous le contrôle de CodY (Dworkin, 2001). Initialement, ce phénomène a été mis en évidence pour la régulation de la compétence chez *B. subtilis* (Inaoka et Ochi, 2002). Il a ensuite été observé pour la régulation de la production de bacilyline (Inaoka *et al.*, 2003) chez *B. subtilis*, ainsi que pour la biosynthèse des acides aminés chez *S. aureus* (Geiger *et al.*, 2010).

V.2.3) Effet des acides aminés branchés

Une carence en acides aminés permet de déréguler les gènes régulés par CodY chez *B. subtilis* (Slack *et al.*, 1995 ; Serror et Sonenshein, 1996b ; Fisher *et al.*, 1996). Au cours de la croissance exponentielle, les acides aminés branchés (BCAA) jouent le rôle de corépresseurs (Shivers et Sonenshein, 2004 ; Shivers *et al.*, 2006 ; Joseph *et al.*, 2005). On retrouve cette régulation directe de la fonction de CodY chez toutes les autres espèces (Guedon *et al.*, 2001 ; Chambellon et Yvon, 2003 ; den Hengst *et al.*, 2005 ; Malke *et al.*, 2006 ; Bennett *et al.*, 2007 ; Majerczyk *et al.*, 2010 ; Dineen *et al.*, 2010 ; Hendriksen *et al.*, 2007).

V.2.4) Eléments de structure



La première analyse de cristaux de CodY de *B. subtilis* a permis d'émettre l'hypothèse que cette protéine serait sous forme de monomère ou de dimère en présence de GTP (Blagova *et al.*, 2002). La protéine CodY est séparée en deux domaines : un domaine GAF dans sa partie N-terminale, où se fixent les BCAA, et un domaine C-terminal, qui contient un domaine HTH nécessaire à la fixation de l'ADN (figures 9A et 9B) (Levdikov *et al.*, 2006). La fixation des BCAA se fait au niveau d'une poche dans le domaine GAF (figure 9A) grâce aux acides aminés R61, F71 et F98 (Villapakkam *et al.*, 2009). La fixation du corépresseur induit un grand changement de conformation (figure 9C) qui est probablement transmis au domaine C-terminal de manière à réguler la fixation de CodY à l'ADN (Levdikov *et al.*, 2009). La fixation du deuxième corépresseur, le GTP, ne se fait pas au niveau du domaine

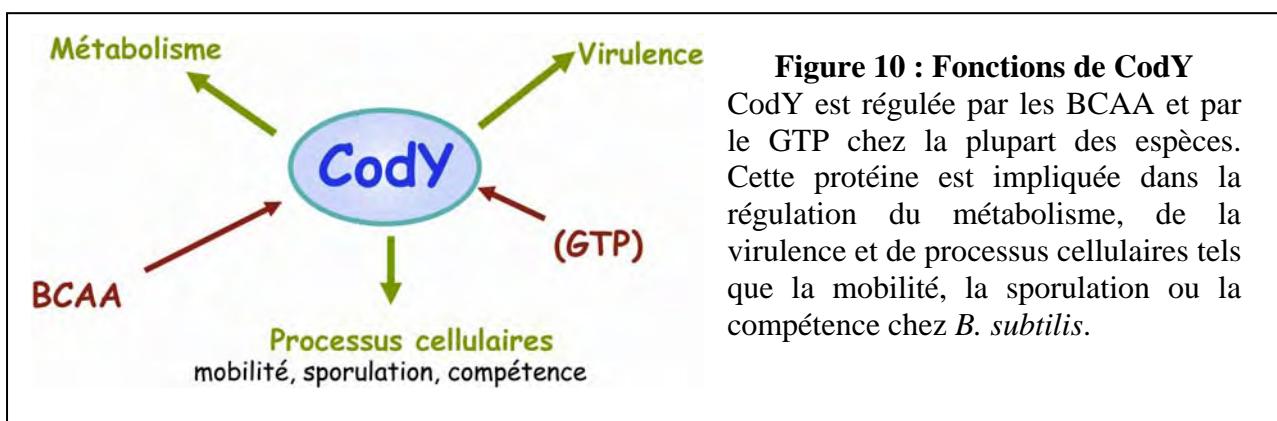
GAF, mais probablement au niveau du HTH (Levdikov *et al.*, 2009 ; Levdikov *et al.*, 2006). De plus, CodY peut être phosphorylée au niveau d'une sérine du HTH (S215), ce qui augmenterait son affinité pour les promoteurs (Macek *et al.*, 2007).

V.2.5) Fixation à l'ADN

La fixation de CodY à l'ADN des promoteurs des gènes cibles se fait via son domaine HTH (figure 9B) (Joseph *et al.*, 2005). Il a été montré que des mutations du site de fixation de CodY (-10/+30) permet d'abolir la répression des gènes *dpp* et *hut* par CodY (Slack *et al.*, 1995 ; Eda *et al.*, 2000). C'est chez *L. lactis* qu'une séquence consensus a été déterminée pour la première fois. Cette séquence, *codY*-box, AATTTTCNGAAAATT, est très dégénérée. Aucun promoteur régulé par CodY ne porte la séquence consensus parfaite. Chez *L. lactis* comme chez la plupart des espèces, on trouve une séquence proche de cette séquence à 2 ou 3 nucléotides près sur les promoteurs régulés par CodY (Guedon *et al.*, 2005 ; Belitsky et Sonenshein, 2007 ; Majerczyk *et al.*, 2010 ; Malke *et al.*, 2006 ; Lemos *et al.*, 2008 ; Hendriksen *et al.*, 2007). De plus, la répression via CodY est dépendante du nombre, de la position et de l'affinité de la *codY*-box par rapport au promoteur (den Hengst *et al.*, 2005 ; den Hengst *et al.*, 2006). En revanche, chez *L. monocytogenes*, aucune séquence consensus n'est rencontrée (Bennett *et al.*, 2007). L'absence d'une séquence consensus parfaite dans les différents régulons CodY et l'abondance de gènes régulés qui ne la portent pas suggère que CodY est capable de reconnaître des séquences même très éloignées du consensus, et que la conformation de l'ADN pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance (Belitsky et Sonenshein, 2007).

V.3) Les fonctions régulées par CodY

La figure 10 présente un schéma simplifié des différentes régulations effectuées par la protéine CodY.



V.3.1) Métabolisme

Les premiers gènes dont la régulation par CodY a été mise en évidence sont impliqués dans le métabolisme des acides aminés (Slack *et al.*, 1995 ; Fisher *et al.*, 1996 ; Debarbouille *et al.*, 1999). La généralisation des méthodes globales d'étude de l'expression génique a permis de déterminer le régulon CodY chez *B. subtilis* (Molle *et al.*, 2003), puis chez de nombreuses autres espèces (Guedon *et al.*, 2005 ; Bennett *et al.*, 2007 ; Dineen *et al.*, 2010 ; Pohl *et al.*, 2009 ; Lemos *et al.*, 2008 ; Hendriksen *et al.*, 2007).

Chez toutes ces bactéries, les gènes réprimés par CodY en présence de BCAA sont impliqués dans le métabolisme et le transport des acides aminés (notamment les BCAA) ou dans la recherche et le transport d'autres sources de carbone. Par exemple, l'expression d'enzymes impliquées dans le recyclage du peptidoglycane est réprimée par CodY.

Les gènes activés par CodY sont beaucoup moins nombreux et sont le plus souvent impliqués dans les processus nécessaires à une croissance rapide (*i.e.* dégradation des sucres, incorporation d'acides aminés libres). L'activation par CodY est probablement indirecte dans la plupart des cas. En effet, à ce jour, l'activation directe par CodY n'a pu être montrée que pour deux gènes (*ackA* (Shivers *et al.*, 2006) ; *brsF* (Preis *et al.*, 2009)).

V.3.2) Virulence

Chez *C. difficile*, *S. aureus* et *B. anthracis*, CodY est connue pour réguler la production de toxines (Dineen *et al.*, 2007 ; Karlsson *et al.*, 2008 ; Majerczyk *et al.*, 2008 ; Pohl *et al.*, 2009 ; van Schaik *et al.*, 2009). Chez *B. subtilis* et *L. monocytogenes*, CodY réprime la production de bactériocines (Inaoka *et al.*, 2003 ; Inaoka *et al.*, 2009 ; Bennett *et al.*, 2007 ; Dworkin, 2001).

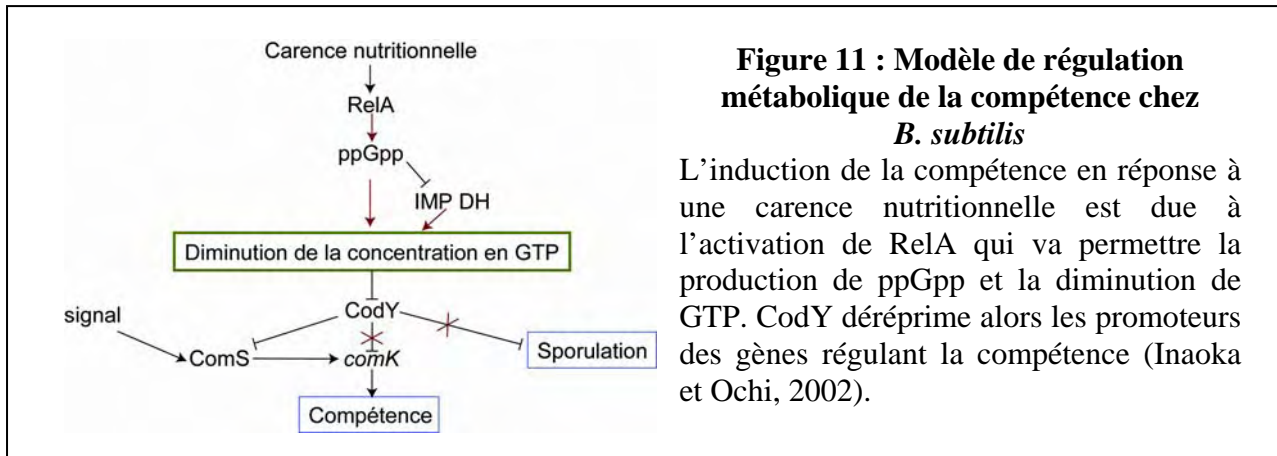
V.3.3) Processus cellulaires

L'étude des régulons CodY a permis de mettre en évidence l'implication de cette protéine dans différents processus cellulaires.

Chez *Bacillus cereus* et *S. aureus*, CodY est impliquée dans la régulation de la formation de biofilm (Hsueh *et al.*, 2008 ; Majerczyk *et al.*, 2008 ; Peters *et al.*, 2010).

Chez *B. subtilis*, l'opéron *hag* (impliqué dans la mobilité) (Mirel *et al.*, 2000) et les gènes codant pour les flagelles sont réprimés par CodY (Bergara *et al.*, 2003). Cette protéine est également impliquée dans le « swarming ». (Hamze *et al.*, 2009)

CodY est aussi impliquée dans le régulation du processus de sporulation (Ratnayake-Lecamwasam, 2001) et de la compétence au cours de la croissance exponentielle. Pour cela, elle se fixe directement sur les promoteurs des gènes *comS* et *comK* (figure 11) (Serror et Sonenshein, 1996b ; Maamar et Dubnau, 2005) et les réprime. Mais il existe d'autres mécanismes permettant de réguler la compétence de façon ComX-dépendante et pH-dépendante (Cosby *et al.*, 1998 ; Lazazzera *et al.*, 1999). CodY n'est pas impliquée dans ces régulations.



V.4) Régulations croisées

Les fonctions régulées par CodY sont pour la plupart aussi régulées par d'autres régulateurs (Sonenshein, 2007). La régulation du gène *comK* (régulateur de la compétence) est un bon exemple de régulations croisées. En effet, le gène *comK* est réprimé non seulement par CodY, mais aussi par un autre régulateur Rok et par AbrB. En outre, l'expression de ce gène est également sous le contrôle d'activateurs transcriptionnels : DegU et ComK lui-même. Pour finir, l'expression de ComK est également sous le contrôle de régulations post-traductionnelles. ComS active l'expression de ComK en empêchant sa dégradation par le complexe MecA/ClpC/ClpP (pour revue Hamoen *et al.*, 2003).

On remarque également que, chez *B. subtilis*, l'opéron *ilvB* (impliqué dans la biosynthèse des BCAA) est réprimé par CodY mais également par TrnA (Tojo *et al.*, 2004), et est activé par CcpA (Shivers et Sonenshein, 2005). En fonction de la disponibilité en nutriments dans le milieu, CcpA ou CodY se fixe sur le promoteur. En effet, leurs sites de fixation sont chevauchants, et leur fixation est exclusive (Tojo *et al.*, 2005). De la même façon, *citB* et *asnH* sont contrôlés à la fois par CodY et AbrB (Kim *et al.*, 2003 ; Morinaga *et al.*, 2010). Les gènes *ilv-leu* et *asnH* sont également la cible de régulation post-transcriptionnelles indépendantes de CodY (Mader *et al.*, 2004 ; Morinaga *et al.*, 2010).

Chez *S. aureus*, Agr contrôle la production de CodY qui à son tour régule les gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés (Batzilla *et al.*, 2006). De plus, la production d'alpha-toxine est également régulée par Agr et CodY (Majerczyk *et al.*, 2008).

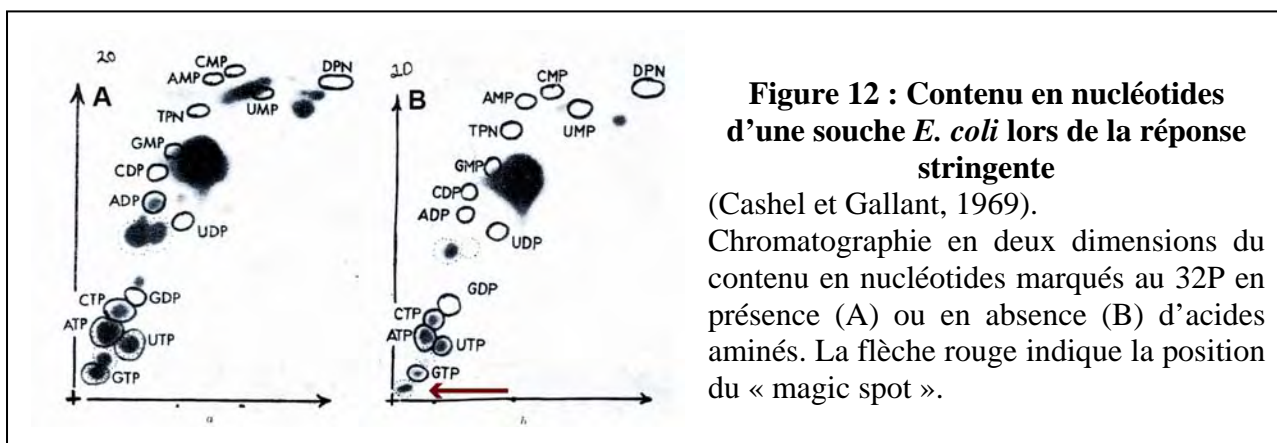
V.5) Chez *Streptococcus pneumoniae*

Deux études ont été menées chez *S. pneumoniae* (Kloosterman *et al.*, 2006 ; Hendriksen *et al.*, 2007). La première montre que CodY est capable de réprimer le gène *gdhA* (impliqué dans la synthèse du glutamate) indépendamment de GlnR (régulateur majeur de *gdhA* et du métabolisme de la glutamine), la seconde montre que le régulon CodY est équivalent à celui de *L. lactis* et *B. subtilis*, et que la *codY*-box de *L. lactis* est fonctionnelle chez *S. pneumoniae*. CodY réprime principalement les gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés.

VI) Le ppGpp : une alarmone

VI.1) Découverte chez *E. coli*

Au milieu du XX^e siècle, les scientifiques se demandaient si la synthèse de protéines et la synthèse d'acides nucléiques étaient liées. Pour répondre à cette question, des mutants auxotrophes pour un acide aminé ont été cultivés en son absence. Les différents radiomarquages effectués chez *E. coli* ont montré qu'en l'absence de l'acide aminé essentiel à la croissance, la synthèse protéique ainsi que la synthèse d'ARN étaient fortement réduite (Sands et Roberts, 1952). Néanmoins, si on réintroduit l'acide aminé (même en présence d'un inhibiteur de synthèse protéique), seule la synthèse d'acides nucléiques reprend (Pardee et Prestidge, 1956). Cet arrêt de la synthèse d'ARN (appelé stringence ou RNA control) n'est pas observé dans une souche mutante historique auxotrophe pour la méthionine. Ce mutant porte en réalité une mutation dite « relaxée », RC, qui permet d'éliminer le contrôle de la synthèse d'ARN par les carences en acides aminés (Stent et Brenner, 1961).



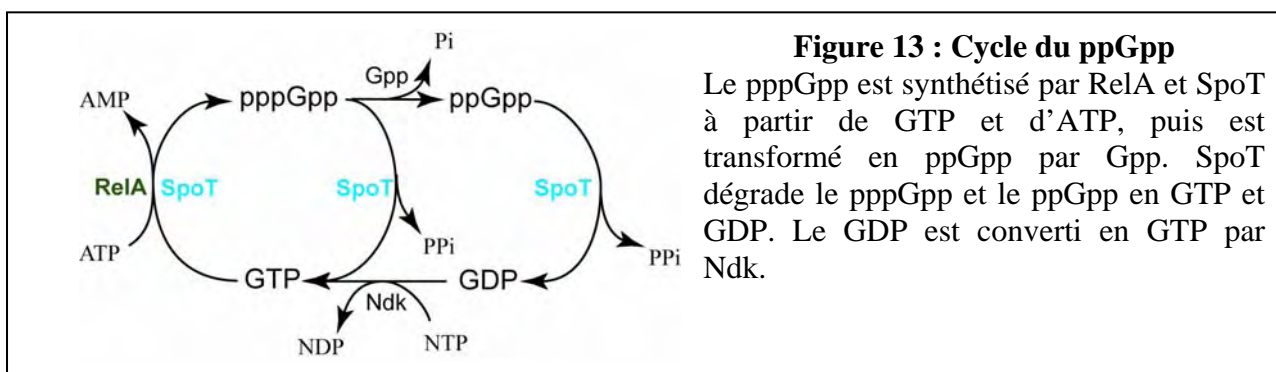
Plus tard, l'étude du contenu en nucléotides dans les souches stringentes en présence ou en l'absence d'acides aminés a permis de mettre en évidence deux composés présents essentiellement en cas de carence (figure 12). Ces composés ont été appelés « magic spots » (MSI et MSII) sont absents dans les souches RC et seraient synthétisés par une enzyme codée par le gène portant la mutation RC (*relA*) (Cashel et Gallant, 1969). Un an plus tard le MSI a été identifié comme étant un composé dérivé de guanosine : le ppGpp (Cashel et Kalbacher, 1970). Les composés MSI (ppGpp) et MSII (pppGpp) sont formés par transfert d'un groupement pyrophosphate de l'ATP au GDP et de l'ATP au GTP respectivement au niveau du ribosome lors d'une pause dans la traduction (Haseltine *et al.*, 1972 ; Haseltine et Block, 1973).

Il existe également une activité de dégradation du ppGpp portée par SpoT (Laffler et Gallant, 1974). Contrairement à l'activité de synthèse, cette activité n'est pas liée au ribosome (Sy, 1977). De plus, même dans les souches relaxées, du ppGpp est produit au cours de carences en sources de carbone (Lazzarini *et al.*, 1971 ; Atherly, 1979) ou en azote (Irr, 1972). Ceci montre que *relA* (RC) n'est pas le seul gène impliqué dans la production de ppGpp. Cette deuxième activité de synthèse est portée par SpoT, qui est donc une enzyme bifonctionnelle (Hernandez et Bremer, 1991 ; Xiao *et al.*, 1991). L'étude des séquences protéiques de RelA et SpoT d'*E. coli* montre que ces deux protéines sont très similaires et suggère qu'elles seraient issues de la duplication d'un gène puis de la spécialisation des deux gènes *relA* et *spoT* (Metzger *et al.*, 1989).

VI.2) Synthèse et dégradation du ppGpp chez *E. coli*

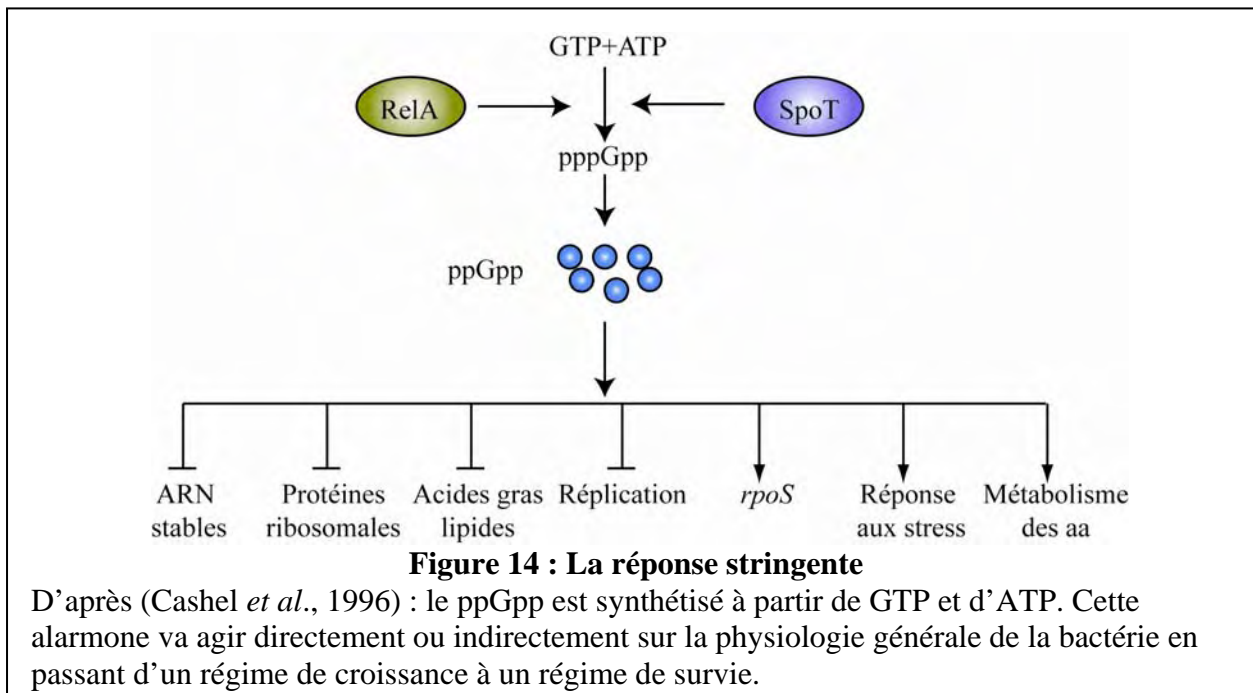
Comme décrit au paragraphe précédent, le ppGpp est synthétisé par les protéines RelA et SpoT et est dégradé par SpoT. Ceci peut être représenté par un cycle (figure 13).

La première étape de ce cycle est la synthèse du pppGpp, qui se fait grâce au transfert de deux phosphates depuis l'ATP vers le GTP (Sy et Lipmann, 1973). Cette étape peut être catalysée par RelA ou SpoT. Ensuite, le pppGpp est hydrolysé en ppGpp par la protéine Gpp (guanosine pentaphosphate phosphohydrolase) en quelques secondes (Weyer *et al.*, 1976). Lorsque les conditions redeviennent favorables (fin de la carence), SpoT prend alors en charge la dégradation du ppGpp (ou du pppGpp). Cette étape aboutit à la formation de GDP (ou GTP) (Sy, 1977). Enfin, le GDP est reconverti en GTP par la nucléotide diphosphokinase, Ndk. La régulation de l'augmentation de la concentration intracellulaire en ppGpp peut se faire de deux manières différentes : soit en activant la production de ppGpp par RelA et/ou SpoT, soit en inactivant sa dégradation (Xiao *et al.*, 1991).



VI.3) La réponse stringente chez *E. coli*

La réponse stringente se met en place en réaction à différents signaux. Le signal le mieux étudié est la carence en acides aminés. Cette carence est détectée par la présence d'un ARNt non chargé au site A du ribosome (Haseltine et Block, 1973). Chez *E. coli*, d'autres types de carences (en azote (Irr, 1972), en phosphate (Spira *et al.*, 1995), en acides gras (Seyfzadeh *et al.*, 1993), en fer (Vinella *et al.*, 2005) ou en sources de carbone (Xiao *et al.*, 1991)) peuvent être un signal.



La figure 14 répertorie les effets de la réponse stringente sur la physiologie d'*E. coli*. Lors de la réponse stringente, la transcription des ARN stables, la traduction, la réplication et la synthèse de l'enveloppe sont ralenties, alors que les gènes de résistance aux stress et les gènes de biosynthèse des acides aminés sont activés. Ceci permet de ralentir considérablement la croissance de manière à survivre aux carences.

Action sur la transcription

Le ppGpp interagit avec l'ARN polymérase (Chatterji *et al.*, 1998). Cette interaction pourrait affecter la fixation de la polymérase sur l'ADN et modifier ainsi la transcription de certains gènes (Artsimovitch *et al.*, 2004). Cette régulation dépend de la présence de la sous-unité ω de l'ARN polymérase et de la protéine DskA qui potentialise les effets du ppGpp sur la transcription (Paul *et al.*, 2004 ; Paul *et al.*, 2005 ; Vrentas *et al.*, 2005).

Chez *B. subtilis* et chez *S. aureus*, la production de ppGpp ferait diminuer le GTP qui est essentiel à l'initiation de la transcription des ARN ribosomiques (Krásný et Gourse, 2004 ;

Geiger *et al.*, 2010). Ce mécanisme met en jeu le mécanisme de synthèse du ppGpp et l'inhibition directe de la synthèse de GTP (inhibition de l'IMP déshydrogénase) par cette alarmone (Inaoka et Ochi, 2002).

Action sur la traduction

La transcription des ARN et des gènes codant pour les protéines ribosomiques est inhibée par le ppGpp. Le nombre de ribosomes actifs pour la traduction est donc plus faible et, par conséquent, la traduction est ralentie. De plus, le ppGpp est capable d'inhiber le facteur d'initiation de la traduction IF2 chez *E. coli* (Milon *et al.*, 2006).

Action sur la réplication

Chez *E. coli*, le ppGpp, en diminuant le taux de croissance, diminue l'expression de DnaA, protéine initiatrice de la réplication. Le ppGpp inhibe donc la réplication de façon indirecte (Chiaramello et Zyskind, 1989). Chez *B. subtilis*, le contrôle de la réplication se ferait plutôt au cours de l'élongation, puisque le ppGpp peut provoquer un arrêt des fourches de réplication en agissant sur la primase (Wang *et al.*, 2007).

Action sur rpoS et sur la réponse générale au stress

Le ppGpp peut aussi réguler la transcription des facteurs sigma alternatifs et par conséquent la réponse générale au stress (Durfee *et al.*, 2008). Par exemple, le ppGpp augmente la quantité de sigma-S dans la cellule (Gentry *et al.*, 1993) et est nécessaire à l'expression de gènes dépendants de sigma-S (Kvint *et al.*, 2000).

Action sur l'enveloppe

Chez *E. coli*, une carence en acides gras induit la production de ppGpp (Seyfzadeh *et al.*, 1993) qui pourrait être régulée par une interaction entre SpoT et ACP (Acyl Carrier Protein) (Battesti et Bouveret, 2006). Les gènes *fabH*, *fabD* et *fabG*, codant pour des enzymes de biosynthèse des acides gras, sont réprimés au cours de la réponse stringente (Podkovyrov et Larson, 1996). De plus, PlsB (enzyme catalysant la première étape de synthèse des phospholipides) est inhibée directement par le ppGpp (Heath *et al.*, 1994).

Action sur le métabolisme des acides aminés

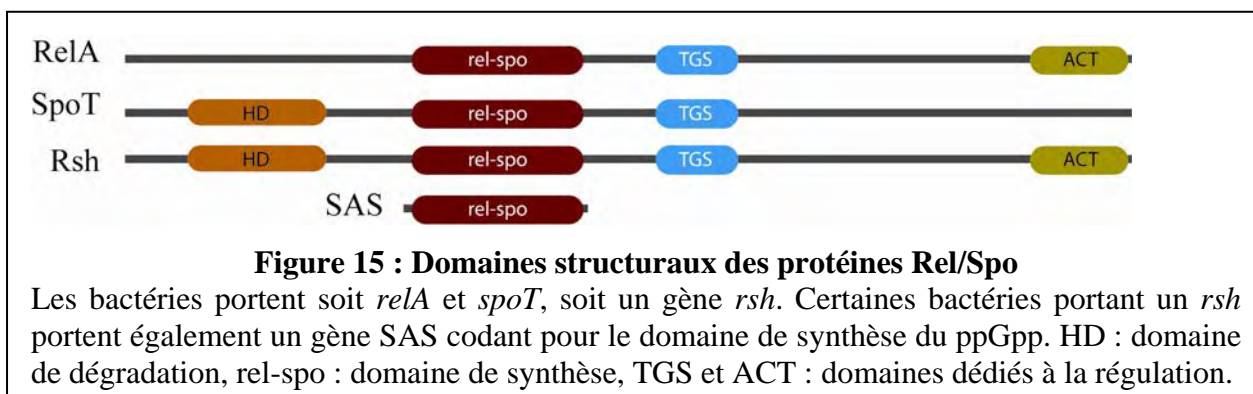
Le mécanisme permettant l'activation des gènes de biosynthèse des acides aminés par le ppGpp n'est pas direct. Cette activation serait une conséquence de la déstabilisation des complexes ouverts créés sur les promoteurs réprimés par le ppGpp. Ceci augmenterait la disponibilité de l'ARN polymérase pour les promoteurs des gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés (Barker *et al.*, 2001).

Chez *B. subtilis*, un autre mécanisme peut amplifier cet effet. La production de ppGpp limite la concentration de GTP (Inaoka et Ochi, 2002). Le GTP n'est alors plus disponible pour activer la répression des gènes de biosynthèse des acides aminés par CodY (Molle *et al.*, 2003 ; Tojo *et al.*, 2008).

VI.4) Structure des gènes responsables de la synthèse du ppGpp

L'étude systématique des gènes homologues de *relA* et *spoT* montre que ces gènes sont conservés dans le monde eubactérien et eucaryote photosynthétique. Remarquablement, seules les β et γ protéobactéries possèdent les deux gènes *relA* et *spoT* (Mittenhuber, 2001). Les autres bactéries ne portent qu'un seul gène, appelé *rsh* (pour *rel/spo* homologue), codant pour une protéine multifonctionnelle capable de synthétiser et de dégrader le ppGpp. Chez les eucaryotes photosynthétiques, il arrive que plusieurs gènes codent pour des Rsh adressées aux chloroplastes (*i.e.* *Arabidopsis thaliana* (van der Biezen *et al.*, 2000)). De façon surprenante, les firmicutes portent un *rsh* et possèdent aussi un ou plusieurs petits gènes codant pour le domaine de synthèse du ppGpp (Wolz *et al.*, 2010). Chez *B. subtilis*, deux gènes de ce genre ont été identifiés et nommés SAS1 et SAS2 (pour Small Alarmone Synthetase) (Nanamiya *et al.*, 2008). Chez *Streptococcus mutans*, ces gènes sont nommés *relP* et *relQ* (Lemos *et al.*, 2007).

Toutes les bactéries, qu'elles possèdent RelA et SpoT ou une Rsh, ont au moins une copie de chaque domaine (figure 15).



L'activité enzymatique de la protéine se trouve dans le domaine N-terminal. Les acides aminés H80 et D81 de Rel_{Mtb} (Rsh de *Mycobacterium tuberculosis*) du domaine HD sont conservés et nécessaires à la dégradation du ppGpp (Avarbock *et al.*, 2005), alors que la synthèse du ppGpp nécessite les acides aminés G241 et H344 (Rel_{Mtb} également conservés) du domaine rel-spo (Avarbock *et al.*, 2005). L'étude de la protéine Rsh cristallisée de

Streptococcus equisimilis a montré que les activités de synthèse et de dégradation ne sont pas actives en même temps. Il existe deux conformations : l'une où la synthèse est active et l'autre où elle est inactive (Hogg *et al.*, 2004).

Le domaine C-terminal de ces protéines est dédié à la régulation. Le domaine TGS pourrait être un domaine de liaison aux nucléotides, mais cette fonction n'a pas encore été démontrée (Wolf *et al.*, 1999). En outre, le domaine ACT est retrouvé dans des protéines dont la fonction est régulée par les acides aminés (Aravind et Koonin, 1999). Ceci semble cohérent, puisqu'on sait que RelA répond aux carences en acides aminés. Ainsi, le domaine C-terminal des protéines Rsh pourrait servir d'interface d'interaction avec différents partenaires protéiques (ou de dimérisation (Gropp *et al.*, 2001)) ou ligands qui permettraient de moduler l'activité de la protéine (Mechold *et al.*, 2002).

Les protéines SAS ne possèdent que le domaine de synthèse du ppGpp, et leur contribution à la synthèse de ppGpp a été démontrée (Lemos *et al.*, 2007 ; Nanamiya *et al.*, 2008).

VI.5) Chez *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae possède comme tous les firmicutes une protéine Rsh (nommée RshA dans mon travail) et une petite protéine codant pour une protéine SAS. Cette protéine est homologue de RelQ de *S. mutans* (Lemos *et al.*, 2007) et est capable de produire du ppGpp chez *E. coli* (Battesti et Bouveret, 2009). La régulation de la production de ppGpp en réponse à différents stress n'est pas encore comprise et ne semble pas se produire de la même façon que chez *E. coli*. En effet, aucune interaction entre RshA et ACP du pneumocoque n'a été détectée (Battesti et Bouveret, 2009). Néanmoins, une étude récente (parue après que mes travaux sur le rôle de *rshA* dans la réponse stringente et dans la régulation de la compétence aient été réalisés) a été publiée en 2009 (Kazmierczak *et al.*, 2009). Cette étude montre que RshA est la source principale de ppGpp en réponse à la mupirocine (inhibiteur du chargement de l'ARNt-isoleucine). De plus, l'analyse globale de la réponse stringente chez *S. pneumoniae* montre que cette réponse est similaire à celle retrouvée chez les autres bactéries, que certains facteurs de virulence sont induits au cours de la réponse stringente et que les gènes *comA* et *comC* pourraient être activés par le ppGpp (Kazmierczak *et al.*, 2009 : Matériel supplémentaire).

B. RESULTATS

***Chapitre 1 : étude de l'effet de rshA et rshQ dans la
régulation de la compétence.***

I) Effet du ppGpp sur l'induction de la compétence chez *S. pneumoniae*

Comme nous l'avons vu au cours de l'introduction, le ppGpp joue le rôle d'activateur de la compétence chez *B. subtilis*. Pour savoir si le ppGpp est un activateur de la compétence chez *S. pneumoniae*, nous avons décidé de suivre l'induction de la compétence en présence de sérine hydroxamate (SHX). En effet, chez *E. coli*, *B. subtilis* et chez d'autres microorganismes, la sérine hydroxamate induit une augmentation drastique de la concentration intracellulaire en ppGpp. Nous avons posé l'hypothèse que cette molécule pourrait avoir le même effet chez *S. pneumoniae*.

I.1) Mode d'action de la sérine hydroxamate

La sérine hydroxamate est un analogue d'acide aminé capable d'inhiber la croissance d'*E. coli*. Cet effet peut être réversé en ajoutant aux cultures un excès de sérine (Tosa et Pizer, 1971b). La SHX possède une affinité plus forte pour le tARN que la sérine elle-même et joue donc le rôle d'inhibiteur compétitif (Tosa et Pizer, 1971a). L'inhibition de la fixation de la sérine sur son tARN se traduit par un blocage de la traduction en créant une carence en tRNA-sérine. Le blocage du ribosome avec un ARNt non chargé dans son site A va induire la production massive de ppGpp par RelA et conséquemment la réponse stringente chez *E. coli* (Potrykus et Cashel, 2008) (figure 16).

Lorsque j'ai débuté mes travaux de thèse aucun article sur la réponse stringente chez *S. pneumoniae* n'était paru, j'ai donc émis l'hypothèse que la sérine hydroxamate serait également capable d'induire une production massive de ppGpp chez ce pathogène.

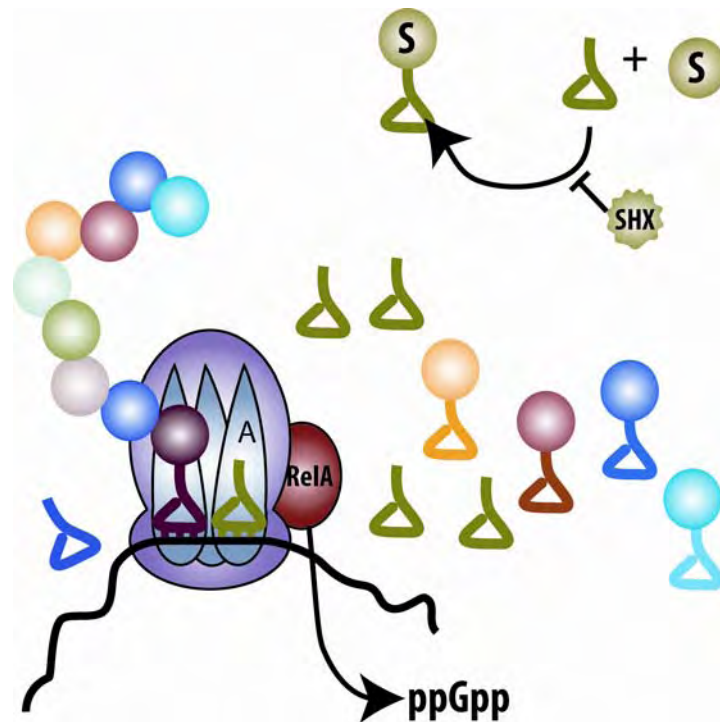


Figure 16 : Mode d'action de la sérine hydroxamate chez *E. coli*

La sérine hydroxamate (SHX), analogue de la sérine, est un inhibiteur compétitif de la seryl tARN synthase. Le ribosome est bloqué avec un ARNt non chargé dans le site A mimant ainsi une carence en acides aminés. La protéine RelA induit ensuite la production de ppGpp en réponse à cette carence. Le ribosome est représenté en violet, les cercles de couleur représentent les différents acides aminés et les épingle de couleur leur tARN respectifs.

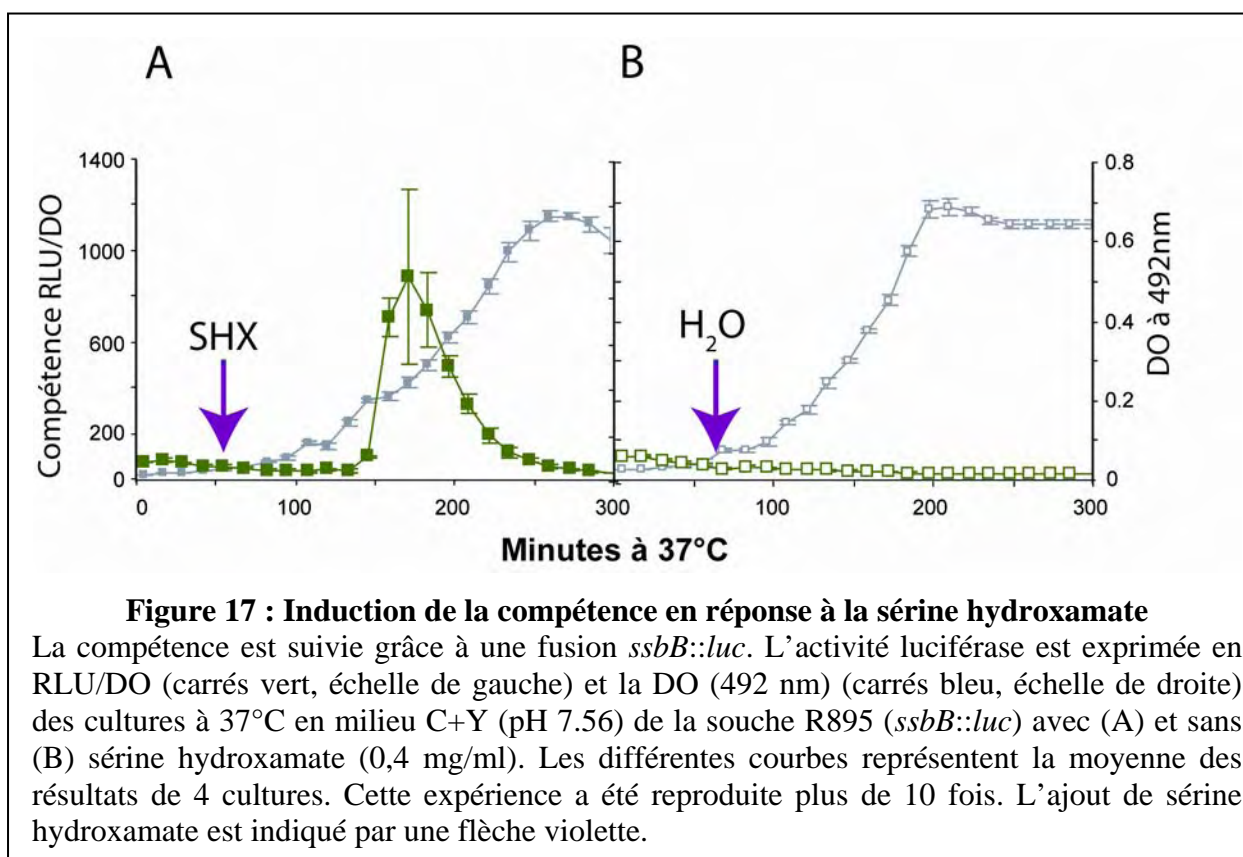
I.2) Effet de la sérine hydroxamate sur le développement de la compétence

Le ppGpp pourrait être un signal permettant le développement de la compétence. Nous avons donc utilisé la SHX pour vérifier cette hypothèse. En effet, en réponse à la SHX, la cellule devrait produire une grande quantité de ppGpp. Pour suivre le développement de la compétence, nous avons utilisé à une fusion transcriptionnelle entre le gène tardif de compétence *ssbB* et le gène rapporteur *luc* codant la luciférase (voir paragraphe VI matériel et méthodes). La compétence peut alors être suivie en mesurant l'émission de lumière dans un milieu de culture contenant le substrat de la luciférase (la luciférine) (Prudhomme et Claverys, 2007).

L'induction de la compétence en réponse à la sérine hydroxamate a été étudiée de la même façon que l'effet d'antibiotiques et d'agents génotoxique chez *S. pneumoniae* (Prudhomme *et al.*, 2006). Les cellules ont été cultivées dans un milieu C+Y dont le pH a été

ajusté à 7,56. Dans ce milieu, la souche sauvage est incapable d'induire la compétence. 70 minutes après ensemencement une gamme de sérine hydroxamate (de 0 à 1 mg/ml) a été ajoutée dans les cultures.

La figure 17 présente le suivi de l'induction de la compétence après ajout de 0,4 mg/ml de sérine hydroxamate (figure 17A) ou d'eau (figure 17B).



Le suivi de la croissance en présence de la gamme de sérine hydroxamate montre que cette molécule est capable d'inhiber la croissance de *S. pneumoniae* à forte concentration. En effet, la présence de 0,2 mg/ml de sérine hydroxamate n'a aucun effet sur la croissance mais lorsqu'on augmente cette concentration, on obtient une inhibition de la croissance de plus en plus prononcée (annexe A). La concentration de 0,4 mg/ml utilisée dans les cultures montrées sur la figure 17 apparaît comme la concentration qui permet un retard de croissance modéré mais un fort effet sur l'induction de la compétence (annexe A).

La compétence est induite environ 80 minutes après l'ajout de sérine hydroxamate et n'est pas induite après ajout d'eau (figure 17). La sérine hydroxamate est donc capable d'induire la compétence chez *S. pneumoniae* (comme la mitomycine C ou la streptomycine

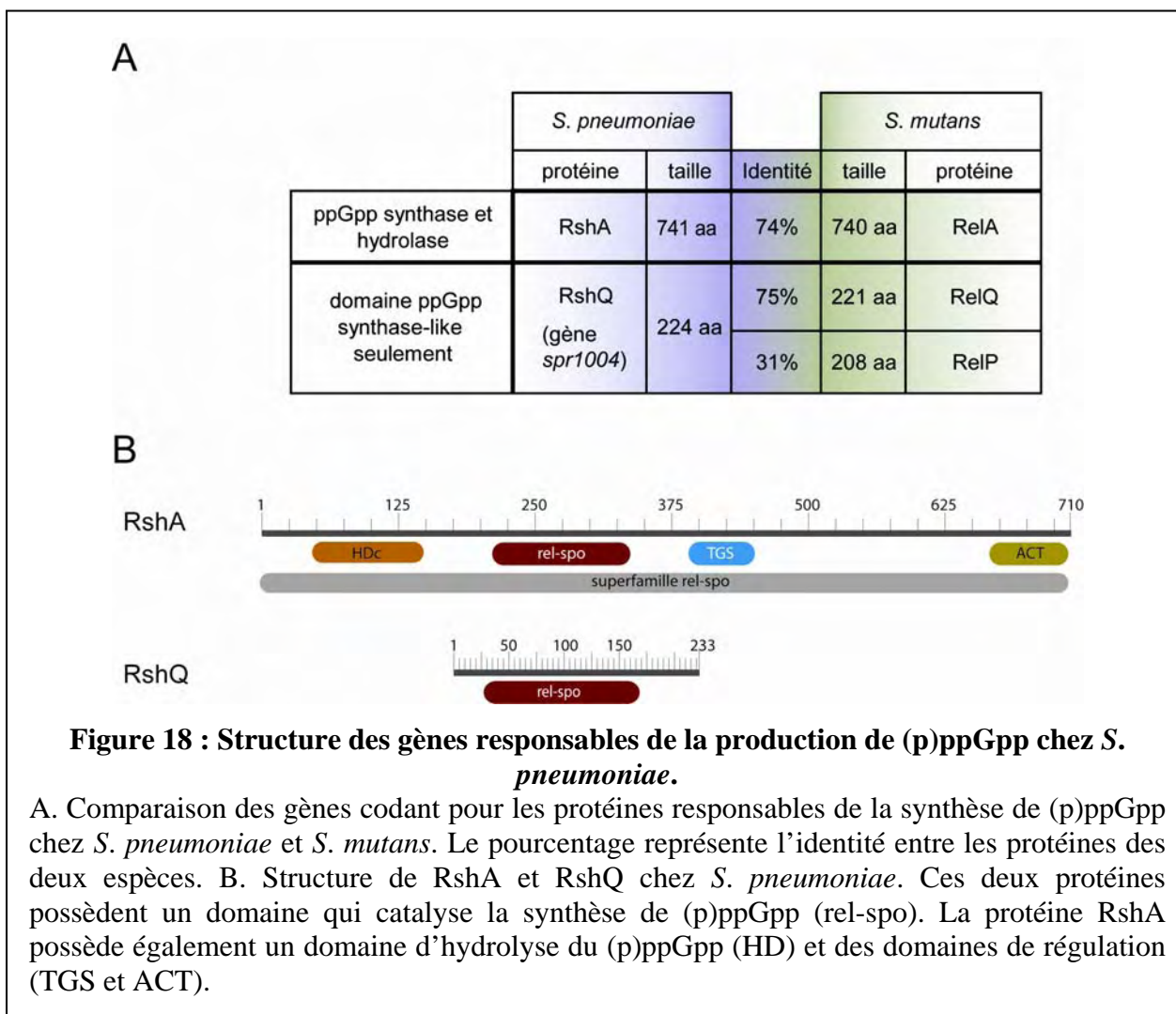
(Prudhomme *et al.*, 2006)). Ce résultat est en accord avec l'hypothèse selon laquelle le ppGpp pourrait être un des signaux permettant l'induction de la compétence.

II) Création de souches incapables de produire du ppGpp.

Pour tester l'hypothèse selon laquelle le ppGpp serait le signal permettant l'induction de la compétence, des mutants incapables de produire le ppGpp ont été construits.

II.1) Recherche des gènes impliqués dans la production de ppGpp chez *S. pneumoniae*.

Chez les bactéries à gram positif, il existe un gène nommé *relA* ou *rsh* capable de produire du ppGpp (voir chapitre VI.4 de l'introduction). Certaines espèces ont aussi un ou plusieurs autres gènes de taille réduite qui codent pour des protéines possédant un domaine dédié à la synthèse de ppGpp.



Pour créer des mutants incapables de produire du ppGpp chez *S. pneumoniae*, nous avons tout d'abord recherché les différents gènes possédant au moins le domaine de synthèse du ppGpp. Pour cela nous nous sommes appuyés sur les résultats de recherche obtenus sur *S. mutans* (Lemos *et al.*, 2004).

La recherche bioinformatique menée sur le génome de *S. pneumoniae* a mis en évidence un gène *rshA* (ou *relA*) codant une protéine possédant 74% d'identité avec son homologue chez *S. mutans* (figure 18A). Cette protéine est la protéine Rsh du pneumocoque. Elle possède les domaines de synthèse et de dégradation du ppGpp et les deux domaines de régulation (ATC et TGS) comme les autres Rsh des bactéries à gram positif (figure 18B et introduction paragraphe VI.4) (Cashel et Rudd, 1987). Mais, en ce qui concerne les autres gènes possédant seulement le domaine ppGpp synthase-like, il n'existe qu'un seul gène chez *S. pneumoniae* (*spr1004* renommé *rshQ*) au lieu de deux chez *S. mutans*. L'analyse du pourcentage d'identité entre les deux protéines de *S. mutans* et celle de *S. pneumoniae*, suggère que *rshQ* est probablement l'homologue de *relQ* (figure 18A). Ceci a été confirmé par une étude récente montrant un comparatif des différentes protéines RshP et RshQ de différents organismes (Lemos *et al.*, 2007).

Pour créer une souche incapable de produire du ppGpp, ces deux gènes ont été inactivés.

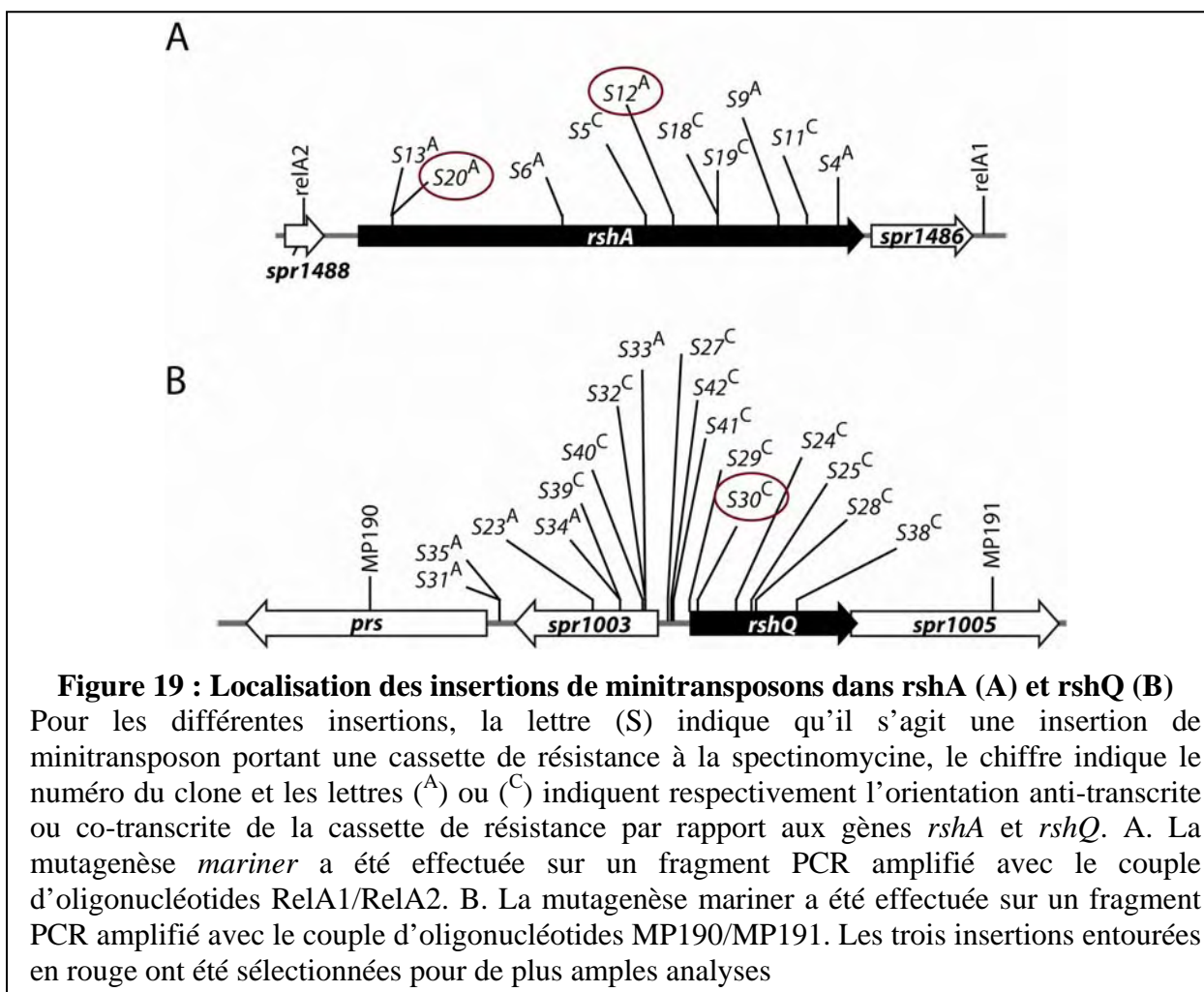
II.2) Création des mutants par mutagenèse *mariner*.

Les gènes *rshA* et *rshQ* ont donc été ciblés pour une mutagenèse de type *mariner*. Cette mutagenèse permet l'insertion aléatoire d'un minitransposon portant un gène de résistance à un antibiotique (Prudhomme *et al.*, 2007). Cette technique peut-être utilisée pour créer une banque de mutants sur le génome entier ou être utilisée de manière ciblée sur un fragment PCR contenant un gène d'intérêt. La transposition est réalisée *in vitro*. Puis les produits de mutagenèse sont transférés dans *S. pneumoniae* par simple transformation. On obtient ainsi de nombreux clones transformants portant une insertion de minitransposon dans la zone ciblée. Ces insertions peuvent ensuite être localisées et orientées par PCR grâce à des oligonucléotides spécifiques (voir VI Matériel et méthodes) (Prudhomme *et al.*, 2007). Cette mutagenèse aléatoire a été dirigée contre les gènes *rshA* et *rshQ* en utilisant des fragments PCR obtenus avec les oligonucléotides RelA1/RelA2 (pour *rshA*) et MP190/MP191 (pour

rshQ) en tant que cible de la mutagenèse. La mutagenèse *mariner* a été effectuée en présence du plasmide donneur pR412 contenant un minitransposon portant un gène de résistance à la spectinomycine (figure 30).

Pour la mutagenèse du gène *rshA*, de nombreux clones résistants à la spectinomycine ont été obtenus. Vingt d'entre eux ont été sélectionnés au hasard. Les insertions de 10 de ces clones ont été vérifiées, localisées et orientées par PCR à l'aide des oligonucléotides MP127/MP128/RelA1/RelA2. Les amplifications PCR de vérification ont les tailles attendues pour une insertion simple d'un minitransposon dans le fragment ciblé. La localisation et l'orientation des insertions de minitransposon *mariner* sont montrées dans la figure 19A.

Les différentes insertions obtenues pour le gène *rshA* se trouvent tout au long du fragment PCR utilisé comme cible. L'obtention d'insertions dans toute la longueur du fragment visé montre que le gène *rshA* peut être facilement inactivé et donc que ce gène n'est pas essentiel pour *S. pneumoniae*.



Pour le gène *rshQ*, de nombreux clones résistants à la spectinomycine ont été obtenus. Une quarantaine de clones ont été sélectionnés au hasard. Les insertions de 20 de ces clones ont été vérifiées, localisées et orientées par PCR à l'aide des oligonucléotides MP127/MP128/MP190/MP191. Les amplifications PCR de vérification ont les tailles attendues pour une insertion simple d'un minitransposon dans le fragment ciblé pour 17 de ces 20 clones. Les insertions sont localisées préférentiellement au centre du fragment ciblé. Le gène *rshQ* n'est donc pas un gène essentiel pour *S. pneumoniae*. Contrairement à *rshA*, toutes les insertions inactivant *rshQ* sont co-transcrites (figure 19B).

L'expression du gène de résistance à la spectinomycine porté par le minitransposon est capable d'influencer le niveau d'expression des gènes voisins. En effet, il a été montré que l'expression co-transcrite de la cassette de résistance à la spectinomycine en amont de *comCDE* augmente son expression (Martin *et al.*, 2000). De la même façon, un minitransposon portant une cassette de résistance à la spectinomycine insérée en aval d'un gène de résistance à l'érythromycine dans le sens « anti-transcrit » est capable d'inhiber sa transcription (Martin *et al.*, 2000). Ainsi, l'absence d'insertions anti-transcrites dans le gène *rshQ* suppose que l'insertion d'un minitransposon dans le sens anti-transcrit pourrait éteindre l'expression des gènes en aval dans l'opéron *rshQ*. Il y aurait donc un effet polaire de l'insertion suggérant qu'un des gènes en opéron avec *rshQ* est un gène essentiel.

L'opéron de *rshQ* est composé de 3 gènes *rshQ*, *spr1005*, et *rluD*. Le gène *spr1005* code pour une protéine hypothétique homologue à une kinase du NAD impliquée dans les voies métaboliques et dans la protection contre le stress oxydatif (Mori *et al.*, 2004). Ce gène ne semble pas être essentiel. Le gène *rluD* code pour une protéine homologue à la protéine RluD d'*E.coli*. Il a été montré chez *E. coli* que la pseudouridine synthase RluD joue un rôle majeur dans la maturation des ARN ribosomiaux. Cette protéine est essentielle pour la croissance normale de cette bactérie (Raychaudhuri *et al.*, 1998 ; Leppik *et al.*, 2007). L'effet polaire des mutants *rshQ* est donc probablement une conséquence de la diminution d'expression de *rluD*.

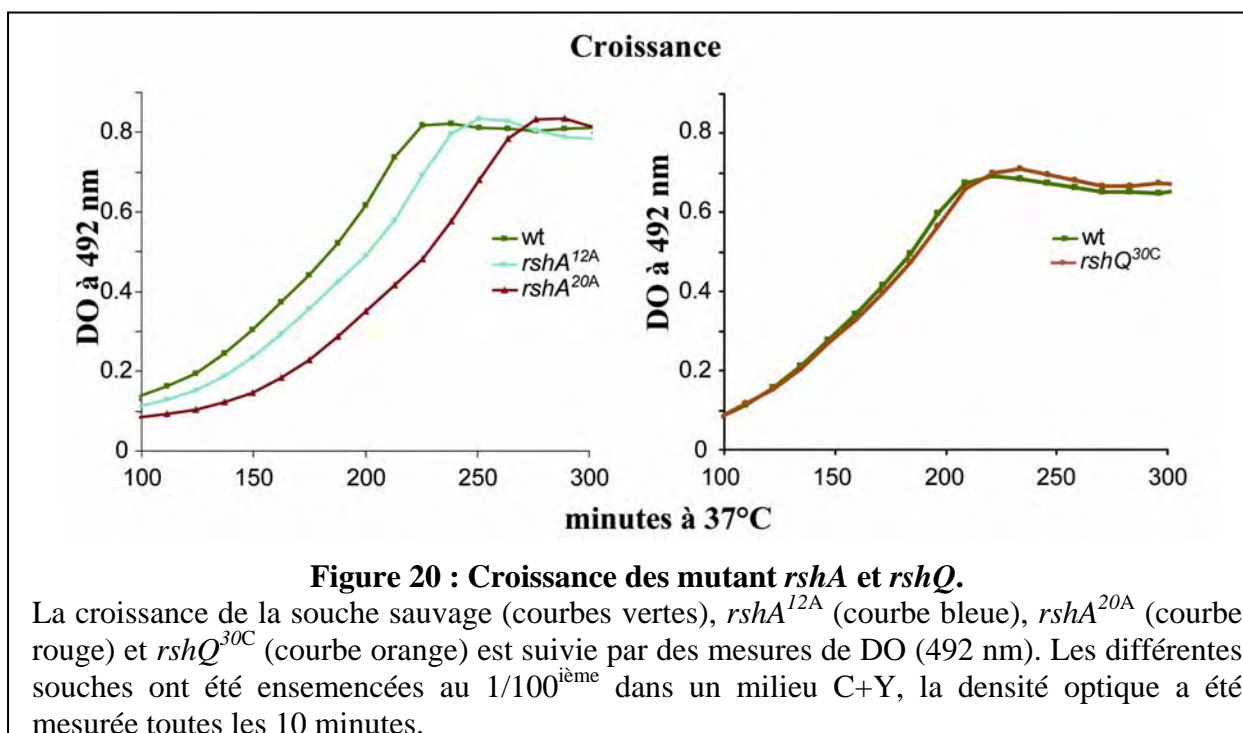
La première étape dans l'étude des ces mutants a été d'analyser leur croissance.

II.3) Effet des mutations sur la croissance

La croissance des différents mutants a été réalisée en milieu C+Y et a été suivie par mesure de la densité optique pendant 300 minutes. La croissance des mutants *rshQ* est

comparable à celle d'une souche sauvage. L'inactivation de *rshQ* n'a donc aucun impact sur la croissance, au moins dans ce milieu (figure 20).

En revanche, pour les mutants *rshA*, on remarque un retard de croissance. Les deux mutants *rshA*^{12A} et *rshA*^{20A} ont une croissance ralentie par rapport à la souche sauvage mais n'ont pas le même taux de croissance. En effet, *rshA*^{12A} a un retard de croissance moins important que *rshA*^{20A}.



La différence de taux de croissance entre ces mutants peut être due à deux causes différentes.

Les deux insertions ne se situent pas au même endroit dans la phase codante du gène *rshA*. Il est possible que dans ces mutants une protéine *rshA* tronquée soit produite. La protéine produite dans *rshA*^{20A} comporterait les premiers 59 acides aminés de RshA. Si cette protéine est produite, elle est probablement inactive puisqu'elle a perdu tous les domaines fonctionnels. La protéine produite dans *rshA*^{12A} comporterait 462 acides aminés et porterait les domaines de synthèse et de dégradation du ppGpp et le premier domaine de régulation TGS (figure 18B). Si cette protéine est produite, elle peut avoir gardé une certaine fonctionnalité qui expliquerait l'amélioration de la croissance par rapport à *rshA*^{20A}. En effet, il existe des protéines RelA tronquées encore capable de produire du ppGpp. Chez *L. lactis*, un mutant du gène *relA* produisant une protéine tronquée au niveau du domaine de régulation

TGS a été construit (Rallu *et al.*, 2000). Cette protéine tronquée est capable de surproduire considérablement le ppGpp (Rallu *et al.*, 2000). Une protéine mutante équivalente a également été construite chez *Streptomyces coelicolor* (Martínez-Costa *et al.*, 1998).

La différence de croissance observée entre les deux mutants *rshA* peut également être due à un effet polaire. Le gène *spr1486* est en opéron avec *rshA*. L'insertion de la cassette de résistance à la spectinomycine peut diminuer (voire éteindre) l'expression de ce gène. Le gène *spr1486* code pour une D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase. Chez *E. coli*, l'absence de ce gène appelé *tdt* augmente la toxicité de la D-tyrosine (Soutourina *et al.*, 2004). Le milieu de culture utilisé pour nos expériences contient des extraits de levure qui apportent probablement ce composé. Il est donc possible que la modification d'expression du gène *spr1486* affecte la croissance de *S. pneumoniae*.

Pour s'affranchir d'un effet polaire éventuel de l'insertion du transposon dans le gène *rshA* sur l'expression des gènes voisins, la cassette de résistance a été « retournée ».

II.4) Retournement de la cassette des minitransposon insérés dans *rshA*

Le protocole expérimental du « retournement de cassette » est expliqué dans le paragraphe VI Matériels et méthodes. La figure 21 montre les différents mutants que nous avons construits par cette méthode.



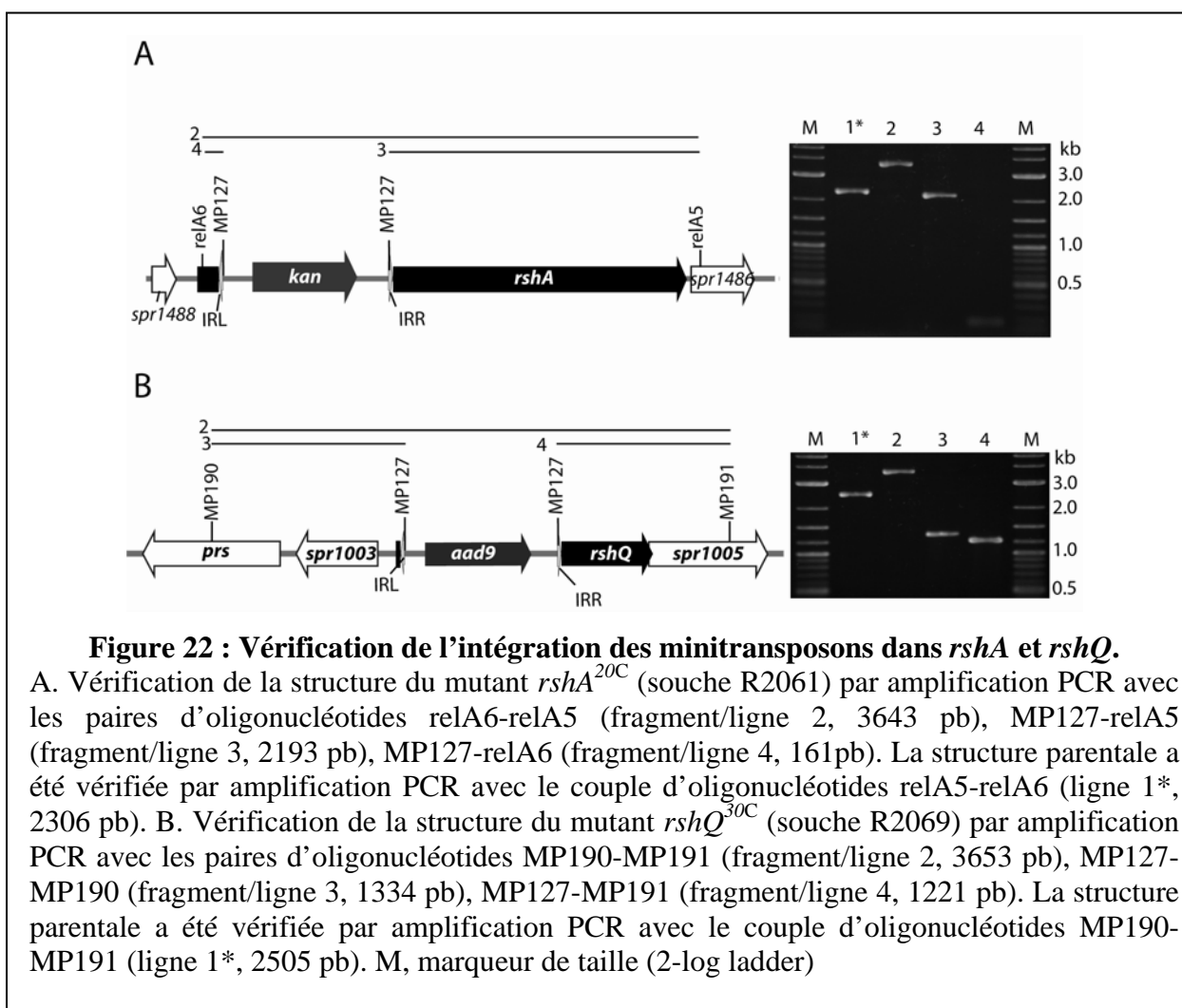
Figure 21 : Echange des cassettes de résistance dans les mutants *rshA*.

Pour les différentes insertions, la lettre (K) indique qu'il s'agit d'une insertion de cassette conférant la résistance à la kanamycine, le chiffre indique le numéro du clone et (^C) indique l'orientation co-transcrite de la cassette. La méthode permettant l'échange de cassette est répertoriée dans VI Matériels et méthodes.

Les différents échanges de minitransposons ont été vérifiés par PCR. La figure 22 expose la vérification de la structure des mutants *rshA*^{20C} et *rshQ*^{30C}. Les tailles des différents fragments PCR obtenus correspondent bien à celles attendues pour une insertion simple d'un minitransposon portant le gène de résistance à la kanamycine dans le cas des mutants *rshA*^{20C} (figure 22A). Il en est de même pour le gène *rshQ* dont la séquence est interrompue par

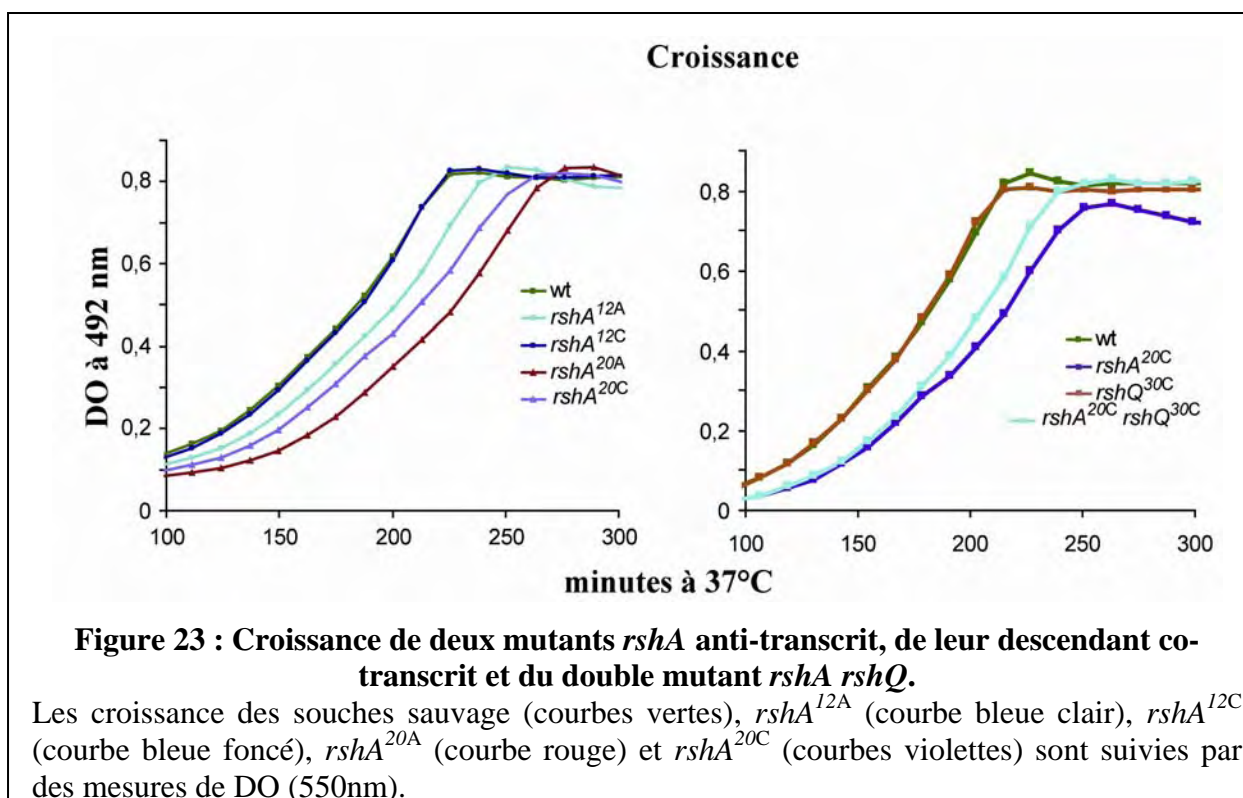
l'insertion d'un minitransposon portant un gène de résistance à la spectinomycine (figure 22B).

Il est à noter que les mutants *rshA* et *rshQ* ne portant pas la même cassette de résistance, nous avons pu combiner ces deux mutations pour obtenir une souche qui ne possède plus aucune protéine comportant un domaine de synthèse du ppGpp. Le double mutant *rshA rshQ* a été obtenu sans difficultés.



II.5) Croissance des mutants *rshA* co-transcrits

Pour tester l'hypothèse selon laquelle le retard de croissance révélé pour les deux mutants *rshA*^{12A} et *rshA*^{20A} serait due à un effet polaire sur le gène *spr1486*, la croissance des mutants *rshA*^{12C} et *rshA*^{20C} a été comparée avec celle leurs souches mères.



Contrairement à la souche *rshA*^{12A}, la croissance de la souche *rshA*^{12C} est comparable à celle de la souche sauvage (figure 23). Ce résultat montre qu'il y a bien un effet polaire de l'insertion anti-transcrite du minitransposon dans le gène *rshA*.

En revanche, le mutant *rshA*^{20C} n'a pas une croissance sauvage. Cette souche a tout de même une croissance améliorée par rapport au mutant *rshA*^{20A} (figure 23). L'ensemble de ces résultats est cohérent avec un effet polaire des insertions dans *rshA*.

Néanmoins, la souche *rshA*^{20C} a un temps de génération plus long que la souche *rshA*^{12C}. Cette différence de croissance ne semble pas être une conséquence de l'effet polaire puisque les cassettes de résistance à la kanamycine des minitransposons sont co-transcrites. Il est donc possible que cette différence de croissance soit due à la production d'une protéine RshA tronquée dans les mutants *rshA*¹² qui aurait gardé une activité partielle.

Pour tester cette hypothèse, il faudrait vérifier grâce à des anticorps spécifiques du domaine de synthèse du ppGpp de la protéine RshA de *S. pneumoniae*, qu'une protéine d'environ 460 acide aminés est détectée dans les extraits protéiques des mutants *rshA*^{12C} et *rshA*^{12A}. Si cette hypothèse est correcte, alors le retard de croissance du mutant *rshA*^{20C} est dû à la perte de fonction de synthèse et/ou de dégradation du ppGpp.

Nos résultats montrent que le mutant *rshA* a une croissance ralentie. Il est possible que dans le milieu C+Y que nous avons utilisé dans nos expériences, un composé soit limitant pour la croissance de ce mutant. En effet, récemment les travaux de Krystyna Kazmierczak et

ses collaborateurs ont montré que la croissance de mutants *rshA* en milieu riche est normale alors qu'en milieu pauvre (CDM), le mutant *rshA* est incapable de croître (Kazmierczak *et al.*, 2009). Alternativement, le ralentissement de la croissance observé pour le mutant *rshA* pourrait être la conséquence de l'inactivation de *rshA* et/ou de la modification de l'expression du gène *spr1486*. Une expérience de complémentation semble indispensable pour prouver que le phénotype observé en compétence pour ce mutant n'est pas une conséquence d'un changement d'expression du gène *spr1486*.

Le double mutants *rshA*^{20C} *rshQ*^{30C} présente une croissance intermédiaire par rapport aux simples mutants *rshA*^{20C} et *rshQ*^{30C} (figure 23). Le défaut de croissance de *rshA*^{20C} est donc en partie amélioré par la mutation *rshQ*^{30C}.

Pour la suite des expériences nous avons choisi de travailler avec le mutant *rshA*^{20C}. En effet, ce mutant a une croissance améliorée par rapport au mutant *rsh*^{20A} et permet de s'affranchir des effets polaires. De plus, les mutants *rshA12*^{A ou C} peuvent éventuellement produire une protéine RshA tronquée fonctionnelle qui pourrait être gênante pour l'analyse des résultats. Pour cette même raison, nous avons choisi une insertion qui interrompt *rshQ* au début de sa phase codante : *rshQ*^{30C}.

II.6) Analyse de la production de ppGpp chez *S. pneumoniae*.

La capacité des mutants *rshA* et *rshQ* à produire du ppGpp a été recherchée. Pour cela, les cellules ont été marquées par du phosphate inorganique ³²Pi, puis transférées dans un milieu contenant de la sérine hydroxamate et carencé en acides aminés (milieu induisant la réponse stringente). Le marquage au ³²Pi permet un marquage de l'ensemble des molécules contenant du phosphate. Les nucléotides ainsi marqués ont ensuite été séparés en chromatographie sur couche mince et révélés au PhosphorImager (voir VI Matériel et méthodes). Ce protocole expérimental a déjà été utilisé pour repérer des mutants incapables de produire du ppGpp chez *E. coli* (Cashel *et al.*, 1996). La figure 24 présente les résultats de cette expérience.

La souche sauvage est capable de produire du ppGpp mais pas ou peu de pppGpp. La souche *rshA*^{20C} comme la souche double mutante *rshA*^{20C} *rshQ*^{30C} ne produit plus de ppGpp ou en produit une quantité non détectable par cette méthode (figure 24). Il semble donc que RshA soit la seule protéine pouvant synthétiser du ppGpp chez *S. pneumoniae*, dans les conditions de culture utilisées (carence en acide aminés et sérine hydroxamate). La protéine RshQ ne semble pas être capable de produire du ppGpp dans les conditions utilisées.

Cependant, cette protéine de *S. pneumoniae* est capable de produire du ppGpp dans un système hétérologue chez *E. coli* (Battesti et Bouveret, 2009). Dans ce système, la protéine est surproduite. Ceci permet probablement de révéler sa faible activité. De plus, cette protéine est probablement impliquée dans la production de ppGpp en réponse à d'autres signaux que la carence en acides aminés. En effet, chez *E. coli*, les deux protéines responsables de la synthèse de ppGpp ne répondent pas au même genre de stress (Cashel *et al.*, 1996). Les conditions utilisées pour cette expérience ne sont probablement pas optimales pour révéler la fonctionnalité de RshQ.

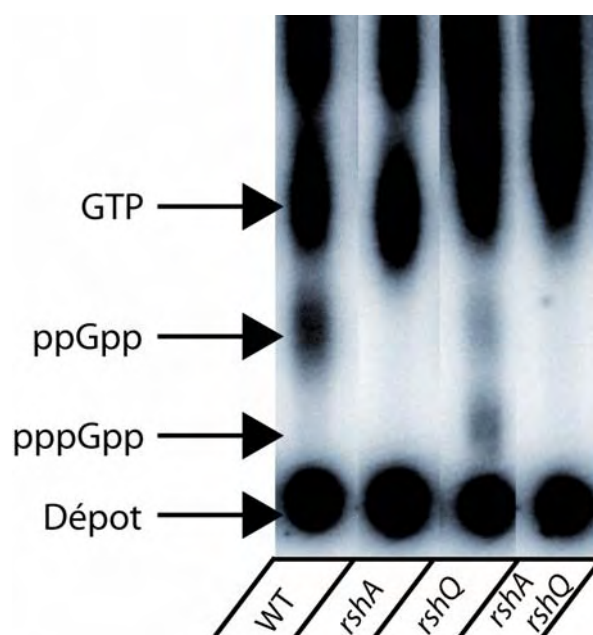


Figure 24 : Production de ppGpp par les souche *rshA* et *rshQ* en réponse à la sérine hydroxamate.

Les cellules ont été cultivées en milieu THY jusqu'à DO=0.6, concentrées 20 fois en milieu MOPS contenant 0.2mg/ml de sérine hydroxamate, puis transférées dans le même milieu contenant 1 mCi/ml de ^{32}P i. Les cellules ont été lysées par 7.5 M d'acide formique. Les extraits cellulaires ont été déposés sur couche mince (PEI-cellulose) et la migration a été réalisée en tampon K_2HPO_4 (pH3.4) 1.5M et ensuite révélée au PhosphorImager. ppGpp, pppGpp, GTP et ATP ont été identifiés par comparaison avec un standard GTP et des extraits d'une souche stringente d'*E. coli*. Souches : R985, WT ; R2061, *rshA* ; R2069, *rshQ* ; R2067, *rshA rshQ*.

La souche *rshQ*^{30C} produit du ppGpp et du pppGpp (figure 24). En revanche, la proportion de pppGpp est beaucoup plus importante dans le mutant *rshQ* par rapport à la souche sauvage. La protéine RshA est donc capable de produire du ppGpp et du pppGpp dans les conditions de culture utilisées. Dans un contexte où RshQ est présente (wt), le pppGpp disparaît et la quantité de ppGpp augmente.

Ceci est du soit à une hydrolyse plus rapide du pppGpp en ppGpp quand RshQ est présente, soit à un changement de spécificité (c'est-à-dire qu'en l'absence de RshQ, RshA serait plus active pour la synthèse de pppGpp à partir de GTP que pour la synthèse de ppGpp à partir de GDP). RshQ pourrait jouer un rôle dans la régulation de l'hydrolyse du pppGpp en ppGpp. Cette fonction est réalisée par la protéine Gpp chez *E. coli* (voir chapitre VI.2 de l'introduction). Aucun homologue de cette protéine n'est retrouvé chez *S. pneumoniae*. Cette dégradation pourrait être réalisée par une autre protéine ou se faire de manière spontanée. Cette étape pourrait peut-être être catalysée par la protéine RshQ elle-même. RshQ pourrait aussi jouer un rôle dans la régulation de la fonction de RshA, et ceci de manière directe ou indirecte (*e.g.* par interaction entre ces deux protéines).

III) Effet des mutations *rshA* et *rshQ* sur l'induction de la compétence.

III.1) Induction spontanée de la compétence

Pour observer l'induction spontanée de la compétence, une fusion rapporteur de la compétence *ssbB::luc* a été introduite dans les mutants *rshA*^{20C} et *rshQ*^{30C} (voir VI Matériel et méthodes). Ces mutants seront à présent appelés *rshA* et *rshQ*. Les différents mutants ont été cultivés dans un milieu C+Y à différents pH et la compétence a été suivie au cours de la croissance (figure 25).

La compétence de la souche sauvage est dépendante du pH initial. En effet, plus le pH est alcalin plus la compétence est induite précocement et intensément (figure 25). Chez *S. pneumoniae*, la compétence est induite de manière optimale en milieu C+Y à des pH compris entre 8,2 et 7,8 environ. Lorsqu'on diminue le pH, la compétence est de plus en plus tardive et de moins en moins intense jusqu'à être complètement inhibée (Marc Prudhomme communication personnelle). La souche sauvage est capable d'induire la compétence aux pH 7,27 et 7,20.

La souche *rshA* peut développer la compétence aux pH 7,27 et pH 7,20 comme la souche sauvage, mais également à un pH plus acide, pH 7,15. Cette souche est donc *cup* (*i.e.* elle est capable d'induire la compétence dans un milieu dans lequel la souche sauvage en est incapable ; voir paragraphe II.3.2 de l'introduction)

La souche *rshQ* est capable d'induire la compétence aux pH 7,27 et 7,20 comme la souche sauvage. Les amplitudes des pics de compétence sont similaires pour *rshQ* et la

souche sauvage. Ce phénotype étant très proche du phénotype sauvage, nous avons déduit que le mutant *rshQ* n'a probablement pas de phénotype *cup*.

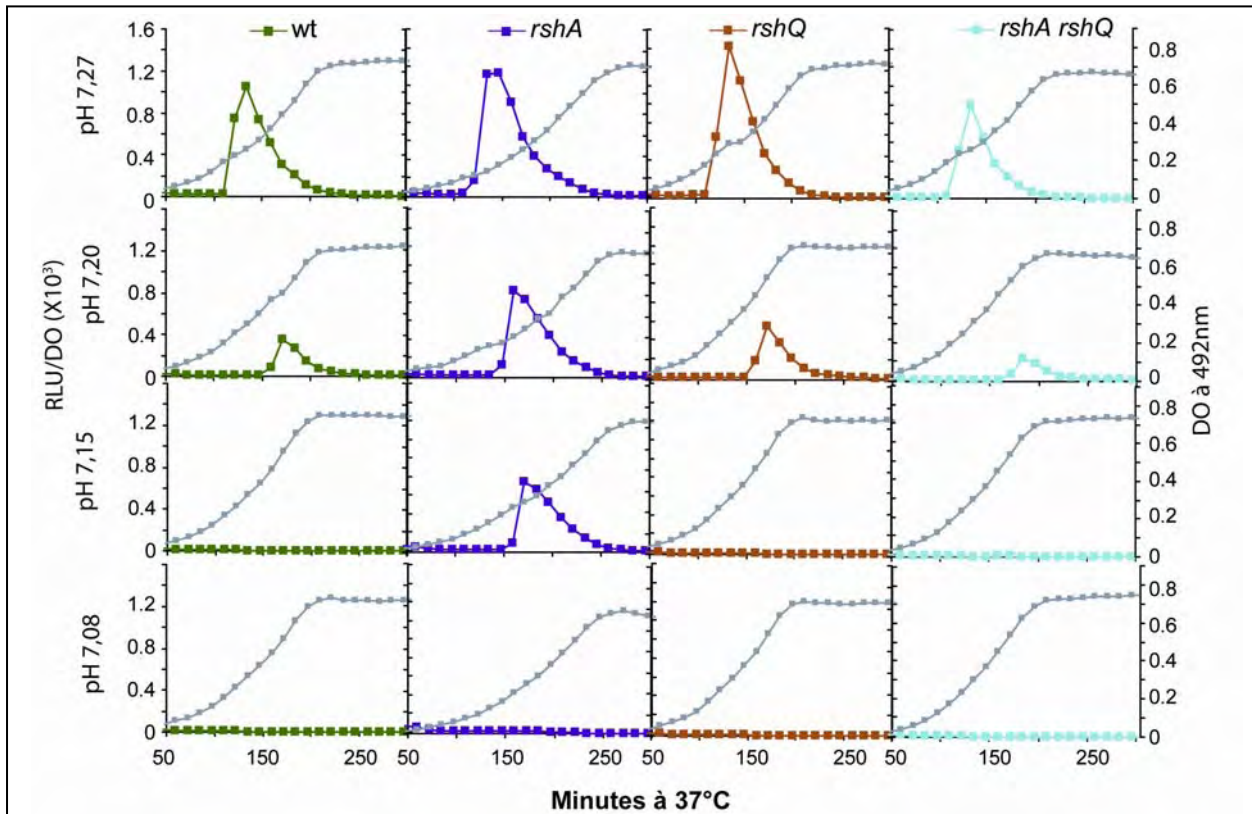


Figure 25 : Effet des mutations *rshA* et *rshQ* sur le développement spontané de la compétence.

L'activité luciférase est exprimée en RLU/DO (carrés, échelle de gauche) et la DO (492 nm) (carrés gris, échelle de droite) des cultures à 37°C en milieu C+Y à différents pH. Souches utilisées : R895 wt (carrés verts) ; R2061, *rshA* (carrés violets) ; R2069, *rshQ* (carrés oranges) ; R2067, *rshA rshQ* (carrés bleus). Ces quatre souches portent une fusion *ssbB::luc* qui rapporte la compétence. Cette figure présente les résultats d'une expérience représentative des 15 expérimentations menées dans les mêmes conditions.

Le double mutant *rshA rshQ* est capable d'induire la compétence aux pH 7,27 et 7,20 comme la souche sauvage. De plus, l'amplitude des pics de compétence est équivalente à celle observée pour la souche sauvage. Le mutant *rshA rshQ* n'a probablement pas de phénotype *cup*.

Nos résultats montrent que la souche *rshA* est *cup*. En revanche les mutants *rshQ* et *rshA rshQ* ne semblent pas être *cup*. Le phénotype de *rshQ* serait donc épistatique sur le phénotype *cup* de *rshA*. Seule la souche qui produit RshQ seul (*rshA*) a une compétence

dérégulée. Il est envisageable que les protéines RshA et RshQ travaillent ensemble pour répondre aux différentes conditions environnementales. En l'absence de RshA, RshQ pourrait produire du ppGpp qui ne sera pas dégradé (puisque RshQ ne porte pas de domaine de dégradation du ppGpp). Ceci pourrait aboutir à une accumulation de ppGpp dans la cellule. Si le ppGpp est un activateur de la compétence, alors dans un mutant *rshA*, l'induction de la compétence sera plus intense et plus fréquente. Le ppGpp pourrait agir directement sur la régulation des gènes *comCDE* ou *comAB* ou induire des changements physiologiques ou métaboliques qui pourraient être un signal pour l'induction de la compétence.

Dans les mutants incapables de produire du ppGpp, la compétence est toujours induite. Le ppGpp pourrait être un activateur de la compétence, mais cette molécule n'est pas le seul signal aboutissant au développement de la compétence.

III.2) Compétence induite par le CSP

L'effet des mutants *rshA* et *rshQ* sur la compétence induite par le CSP a été analysé. Pour cela, les mutations *rshA* et *rshQ* ont été insérées dans une souche de *S. pneumoniae* portant la fusion *ssbB::luc* et une délétion du gène *comC*. Dans une telle souche, le CSP ne peut pas être produit, il n'y a donc pas d'induction spontanée de la compétence, et l'initiation de la compétence ne peut se faire qu'en présence de CSP synthétique ajouté dans la culture. Ceci va permettre de s'affranchir de la compétence spontanée (voir VI. Matériel et méthodes).

Les différents mutants ont été cultivés en milieu C+Y. Après 120 minutes, 100 ng/ml de CSP ont été ajoutés aux cultures (voir VI. Matériel et méthodes). La figure 26 expose les résultats de cette expérience.

Quel que soit l'ensemencement utilisé, pour les 4 souches, la compétence est induite immédiatement après l'ajout de CSP. Cependant, on remarque que le niveau maximal de compétence atteint est plus fort pour les cultures ensemencées au $1/200^{\text{ième}}$. En effet, chez *S. pneumoniae*, au moment de l'induction, plus la densité optique est faible plus le pic de compétence est important (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004).

Nos résultats montrent que le niveau maximal atteint pour la souche *rshA* est plus fort que pour les 3 autres souches. Nous concluons que la mutation *rshQ* est épistatique sur la mutation *rshA* en compétence induite (figure 26) comme en compétence spontanée (figure 25). En l'absence de RshA, RshQ produit probablement du ppGpp qui n'est pas dégradé. Cette accumulation de ppGpp pourrait être responsable de la plus forte induction de la compétence en réponse au CSP.

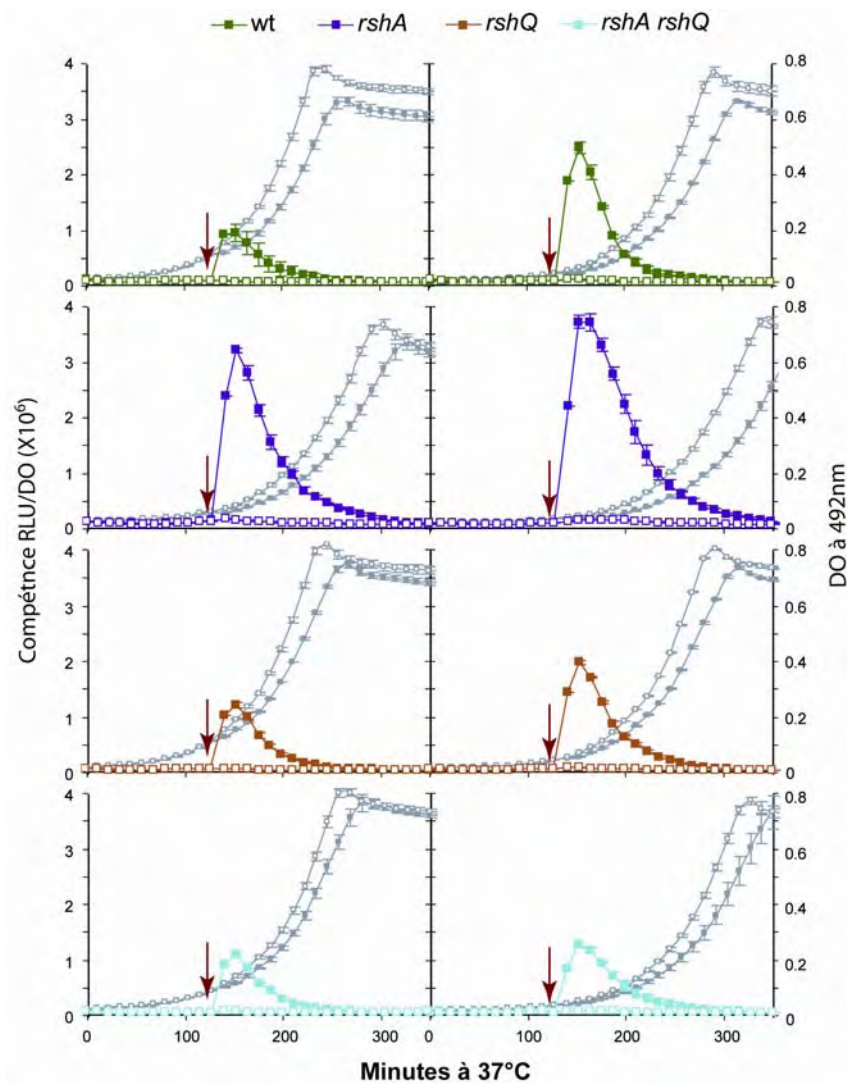


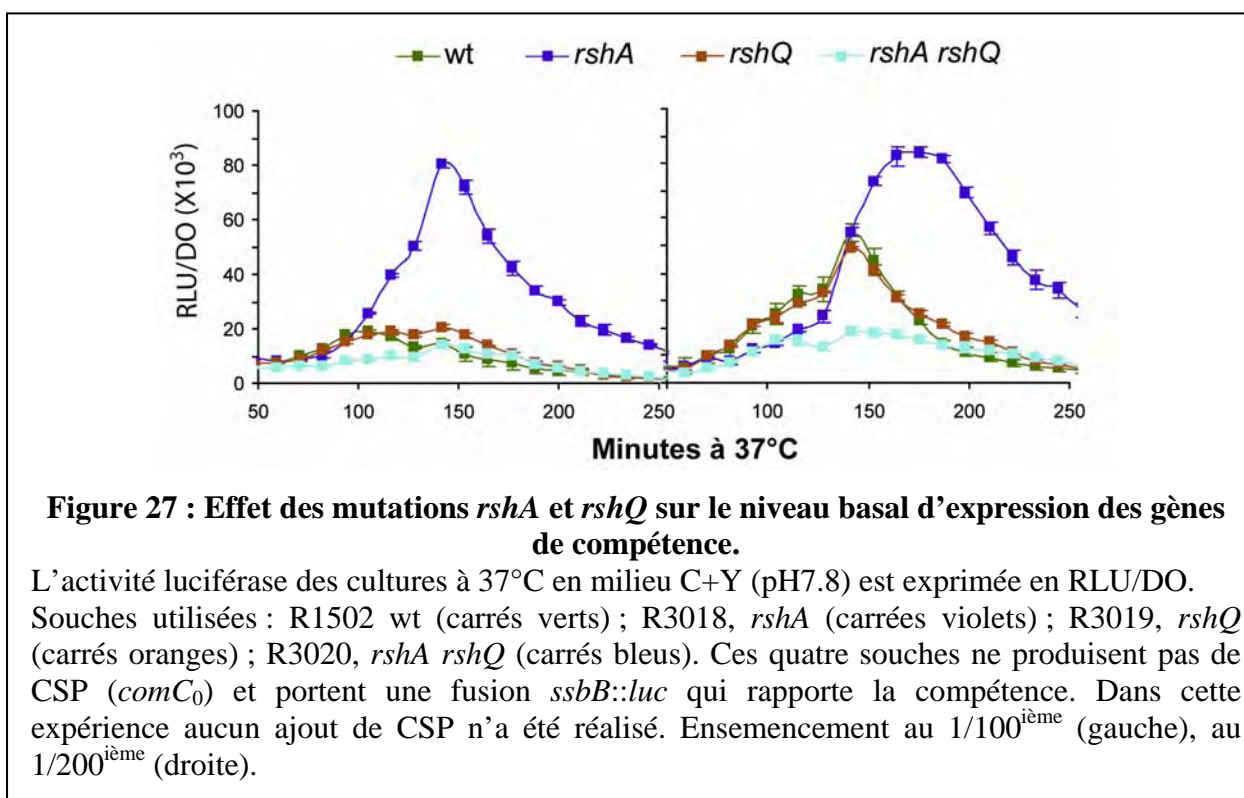
Figure 26 : Effet des mutations *rshA* et *rshQ* sur la compétence induite par le CSP.

L'activité luciférase est exprimée en RLU/DO (carrés, échelle de gauche) et la DO (492 nm) (carrés gris, échelle de droite) des cultures à 37°C en milieu C+Y (pH7.8). Souches utilisées : R1502 wt (carrés verts) ; R3018, *rshA* (carrés violets) ; R3019, *rshQ* (carrés oranges) ; R3020, *rshA rshQ* (carrés bleus). Ces quatre souches ne produisent pas de CSP (*comC*₀) et portent une fusion *ssbB::luc* qui rapporte la compétence. L'ajout de CSP dans les cultures (symboles fermés) est indiqué par une flèche rouge. Aucun ajout n'a été fait les cultures contrôle (symboles ouverts). Ensemencement au 1/100^{ième} (gauche) au 1/200^{ième} (droite). Les courbes représentent la moyenne de 4 cultures indépendantes. Cette expérience a été répétée 5 fois.

Ces résultats sont donc cohérents avec les résultats de l'expérience de compétence spontanée. La concentration en ppGpp affecterait donc la réponse au CSP.

Lors de cette expérience, le niveau basal d'expression de la compétence sans ajout de CSP a été comparé pour nos 4 mutants. La figure 27 présente le niveau basal d'expression des gènes de compétence au cours de la croissance.

Le niveau basal d'expression des gènes de compétence passe par un cycle avec un maximum à environ 150 minutes. L'expression basale de *ssbB::luc* est plus forte dans les souches ensemencées au $1/200^{\text{ième}}$ ce qui expliquerait l'induction plus forte en présence de CSP. En effet, il a déjà été démontré que l'induction de la compétence est plus intense dans des mutants où l'expression basale de *comCDE* est augmentée (Martin *et al.*, 2000). Dans notre expérience, c'est l'expression du gène tardif *ssbB* qui est observée. Le niveau basal d'expression de ce gène est directement lié au niveau basal d'expression de *comCDE* car ComE active la transcription de *comX* et *comW* et que ComX est responsable de la transcription de *ssbB* (Dagkessamanskaia *et al.*, 2004).



La souche *rshA* a un niveau basal d'expression des gènes de compétence beaucoup plus important que les 3 autres souches (figure 27). Ceci est en accord avec le phénotype *cup* observé en compétence spontanée et avec la réponse au CSP amplifiée en contexte *comC* (figures 25 et 26). En effet, ce phénomène a déjà été observé dans le cas de la mutation *comC*² où le gène *comC* est dupliqué. Dans ce mutant, le niveau basal d'expression de *comCDE* est augmenté ce qui rend ce mutant *cup* (Alloing *et al.*, 1998).

Le niveau basal d'expression de la compétence est légèrement réduit dans le double mutant *rshA rshQ* (figure 27). Cet effet est plus particulièrement prononcé dans les cultures ensemencées à des densités optiques plus faibles (figure 27 graphe droit). En l'absence de ppGpp, le gène rapporteur de la compétence serait légèrement réprimé. Ce résultat semble indiquer que le ppGpp joue un rôle activateur sur l'expression des gènes de compétence.

Dans le mutant *rshQ*, le niveau basal est comparable à celui de la souche sauvage. La protéine RshA semble capable à elle seule de produire la quantité de ppGpp nécessaire à la régulation correcte du niveau basal et de l'initiation de la compétence.

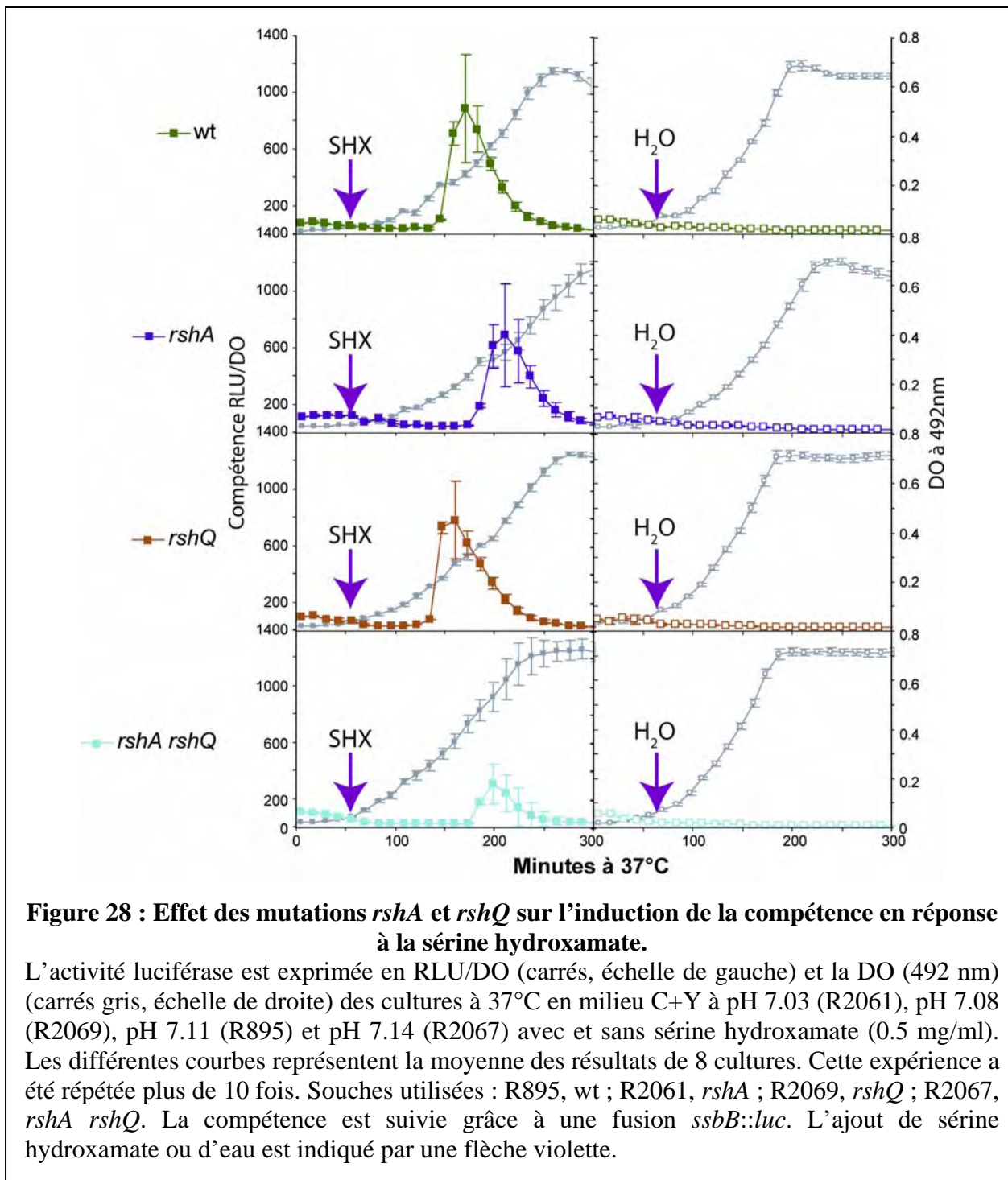
Rappelons que la sérine hydroxamate (connue pour augmenter le ppGpp dans la cellule) induit la compétence. De plus, l'absence de ppGpp réduit la compétence. Ceci est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle le ppGpp pourrait activer la compétence.

Pour savoir si l'induction par la sérine hydroxamate passe par une augmentation du ppGpp dans la cellule, l'effet de cette molécule a été testé sur les mutants *rshA* et *rshQ*.

IV) Effet de la sérine hydroxamate et des antibiotiques sur l'induction de la compétence chez les mutants *rshA rshQ*.

IV.1) Effet de la sérine hydroxamate

Pour tester l'effet des mutations *rshA* et *rshQ* sur l'induction de la compétence en réponse à la sérine hydroxamate nous nous sommes placés dans les mêmes conditions que précédemment (figure 17). La figure 28 montre les résultats obtenus pour les 3 mutants *rshA*, *rshQ* et *rshA rshQ*. Ces résultats montrent que l'ajout de sérine hydroxamate sur la souche sauvage provoque une induction de la compétence au bout d'environ 80 minutes.



Des résultats similaires ont été obtenus pour le mutant *rshQ*. En revanche, la réponse à la sérine hydroxamate ne se fait qu'après 120 minutes environ pour les mutants *rshA* et *rshA rshQ*. La mutation *rshA* est donc épistatique sur *rshQ* pour ce phénotype.

Les mutants *rshA* et *rshA rshQ* ne produisent pas de ppGpp en réponse à la sérine hydroxamate alors que le mutant *rshQ* en est capable. L'induction de la compétence en réponse à la sérine hydroxamate n'est donc pas seulement médiée par le ppGpp. En l'absence

de production de ppGpp, l'induction de la compétence est retardée. La présence de ppGpp dans la cellule semble donc « accélérer » d'une manière ou d'une autre l'induction de la compétence.

Le ppGpp peut induire un grand nombre d'effet sur les cellules comme par exemple une profil d'expression génique différent, une résistance accrue à différents stress ou un arrêt de réplication. Un arrêt de réplication pourrait être, lui-même, le signal conduisant à l'induction de la compétence en réponse à la SHX. En l'absence de ppGpp, la carence en sérine créée par la SHX doit par elle-même aboutir à un arrêt de réplication. En effet, les cellules traitées avec la SHX doivent avoir, indépendamment du ppGpp, des problèmes d'arrêts prématurés de traduction qui peuvent entraîner la production de protéines tronquées et/ou mal conformées (notamment des protéines nécessaires à la réplication). Tout ceci peut conduire à un arrêt de réplication qui pourrait être éventuellement le signal d'induction de la compétence.

En présence de ppGpp, les arrêts de réplication doivent apparaître plus précocement car il est connu que le ppGpp est capable de bloquer très rapidement la réplication chez *B. subtilis* (Wang *et al.*, 2007) ou *E. coli* (Chiaramello et Zyskind, 1989).

Le mutant *rshQ* induit la compétence de la même façon que la souche sauvage en réponse à la SHX. La protéine RshQ ne joue pas un rôle majeur dans ces conditions. La protéine RshA (présente dans le mutant *rshQ*) est probablement capable d'induire la production de ppGpp en réponse à la SHX. Ceci permet une induction précoce de la compétence comme dans la souche sauvage.

IV.2) Effet de la streptomycine

La streptomycine est un antibiotique qui agit au niveau du ribosome. Cette molécule se lie à la sous unité 30S du ribosome pour empêcher sa translocation et le bloque avec son site A vide (Hausner *et al.*, 1988). Une situation similaire est connue pour induire la production de ppGpp. En effet, la présence d'un ARNt non chargé dans le site A du ribosome active la production de ppGpp par RelA chez *E. coli* (Haseltine et Block, 1973). Cependant, la streptomycine ne provoquerait pas d'augmentation du ppGpp chez *E. coli* (Lund et Kjeldgaard, 1972).

Si la streptomycine n'induit pas d'augmentation du ppGpp dans la cellule, alors il serait intéressant de regarder l'effet de cet antibiotique sur l'induction de la compétence dans

les mutants *rshA* et *rshQ*. En effet, nos résultats suggèrent que le retard dans la réponse à la SHX observé pour les mutants *rshA* et *rshA rshQ* est probablement une conséquence de l'absence de ppGpp (figure 28). Ainsi, une molécule qui induit la compétence mais qui ne change pas le taux de ppGpp intracellulaire devrait induire la compétence au même moment dans la souche sauvage et les mutants *rshA rshQ*.

Comme pour la SHX, l'induction de la compétence par la streptomycine a été analysée.

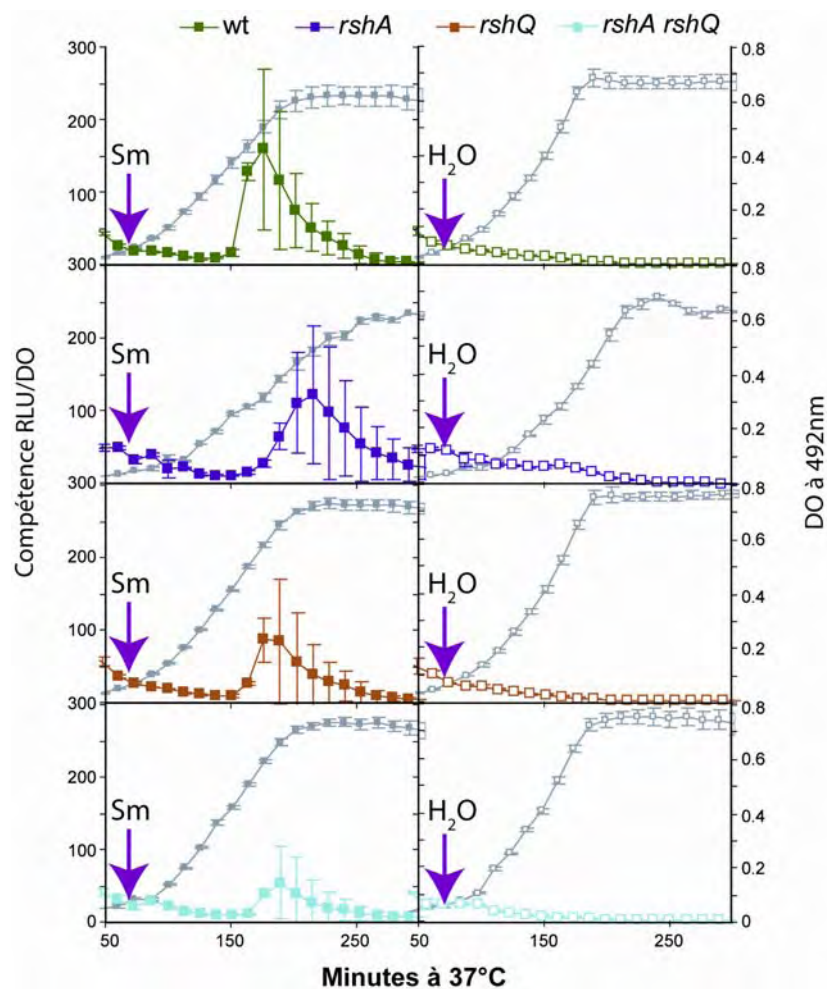


Figure 29 : Effet des mutations *rshA* et *rshQ* sur l'induction de la compétence en réponse à la streptomycine.

L'activité luciférase est exprimée en RLU/DO (carrés, échelle de gauche) et la DO (492 nm) (carrés gris, échelle de droite) des cultures à 37°C en milieu C+Y à pH 7,18 (R2061), pH 7,28 (R2069), et pH 7,32 (R895 et R2067) avec et sans streptomycine (1 µg/ml). Les différentes courbes représentent la moyenne des résultats de 4 cultures. Cette expérience a été répétée 10 fois. Souches utilisées : R895, wt ; R2061, *rshA* ; R2069, *rshQ* ; R2067, *rshA rshQ*. La compétence est suivie grâce à une fusion *ssbB::luc*. L'ajout de streptomycine est indiqué par une flèche violette.

La figure 29 montre que la streptomycine est capable d'induire la compétence dans la souche sauvage au bout d'environ 110 minutes (comme déjà observé (Prudhomme *et al.*, 2006)). Le délai d'induction est plus important d'environ 40 minutes par rapport à celui observé avec la SHX.

Les 3 mutants *rshA*, *rshQ* et *rshA rshQ* induisent la compétence de façon similaire à la souche sauvage. On remarque cependant un très léger retard dans l'induction de la compétence de *rshA* et *rshA rshQ* (induction après environ 120 minutes). Ce retard supplémentaire est probablement dû à l'absence totale de ppGpp dans ces mutants.

Dans l'ensemble, nos résultats montrent que, bien qu'il joue un rôle régulateur positif sur la compétence, le ppGpp n'est pas le seul signal permettant l'initiation de la compétence.

V) Discussions et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons vu que la sérine hydroxamate (activateur de synthèse de ppGpp) est capable d'induire la compétence chez *S. pneumoniae*. Nous avons donc émis l'hypothèse que le ppGpp pourrait être le signal inducteur de la compétence en réponse à cette molécule. Pour tester cette hypothèse, nous avons construit des mutants des deux gènes impliqués dans la production du ppGpp, *rshA* et *rshQ*. Lorsque la cellule est incapable de produire le ppGpp la compétence est encore induite. Le ppGpp n'est donc pas le seul signal perçu par la cellule pour initier la compétence.

L'induction de la compétence repose essentiellement sur la mise en route de la boucle autocatalytique. Une accumulation de CSP dans le milieu se fait grâce à l'expression basale de *comCDE* et *comAB*. Des signaux (comme le ppGpp) pourraient augmenter ou diminuer l'expression basale de ces gènes de manière à moduler l'initiation de la compétence en réponse à des changements environnementaux. Des expériences supplémentaires seront donc nécessaires pour découvrir tous les signaux mis en jeu dans la régulation de la compétence.

Ce travail montre que le ppGpp a un effet inducteur de compétence. Ceci est cohérent avec l'étude de 2009 (parue après que mes travaux aient été réalisés) qui montre que le ppGpp pourrait être impliqué dans l'activation de *comA* et *comC* (Kazmierczak *et al.*, 2009). L'effet inducteur du ppGpp est probablement indirect. Le ppGpp joue peut-être un rôle d'activateur sur les promoteurs des gènes *comAB* et/ou *comCDE* comme pour les gènes du métabolisme des acides aminés chez *E. coli* (Barker *et al.*, 2001). Cette hypothèse est

cohérente avec le niveau basal d'expression des gènes de compétence qui est légèrement diminué dans la souche incapable de produire du ppGpp.

Cette molécule pourrait également provoquer un changement d'état physiologique pouvant produire un signal d'activation de la compétence. Par exemple, le ppGpp est capable d'inhiber la réplication chez *E. coli* et *B. subtilis* (Chiaromello et Zyskind, 1989 ; Wang *et al.*, 2007). Les arrêts répliatifs pourraient jouer eux-mêmes le rôle de signal induisant la compétence. Des expériences préliminaires menées au laboratoire suggèrent que les arrêts répliatifs pourraient être impliqués dans l'induction de la compétence (Vanessa Khemeci, communication personnelle).

Des expériences de dosage cinétique du ppGpp au cours de la croissance en réponse à la sérine hydroxamate pourraient donner des informations sur la production éventuellement non maîtrisée de ppGpp dans les mutants *rshA*. De telles informations pourraient confirmer notre hypothèse selon laquelle une production de ppGpp non maîtrisée induirait un phénotype *cup*.

VI) Matériel et méthodes

Souches plasmides et oligonucléotides utilisés :

Souches	Génotype/description	Référence
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
R304	dérivé R800, <i>nov1</i> , <i>rif23</i> , <i>str41</i> ; Nov ^R , Rif ^R , Sm ^R	(Mortier-Barrière <i>et al.</i> , 1998)
R800	dérivé R6	(Lefevre <i>et al.</i> , 1993)
R895	R800 mais <i>ssbB::luc</i> (<i>ssbB+</i>); Cm ^R	(Chastanet <i>et al.</i> , 2001)
R1501	R800 mais <i>comC0</i>	(Dagkessama nskaiia <i>et al.</i> , 2004)
R1502	R1501 mais <i>ssbB::luc</i> (<i>ssbB+</i>) ; Cm ^R	(Dagkessama nskaiia <i>et al.</i> , 2004)
R2046	R1501 mais <i>rshA</i> ^{12A} ; Spc ^R	Ce travail
R2047	R1501 mais <i>rshA</i> ^{20A} ; Spc ^R	Ce travail
R2064	R1501 mais <i>rshQ</i> ^{30C} ; Spc ^R	Ce travail
R2051	R2046 mais <i>rshA</i> ^{12C} Kan ^R	Ce travail
R2052	R2047 mais <i>rshA</i> ^{20C} ; Kan ^R	Ce travail
R2061	R895 mais <i>rshA</i> ^{20C} ; Cm ^R , Kan ^R	Ce travail
R2062	R895 mais <i>rshA</i> ^{12C} ; Cm ^R , Kan ^R	Ce travail
R2067	R2062 mais <i>rshQ</i> ^{30C} ; Cm ^R , Kan ^R , Spc ^R	Ce travail
R2069	R895 mais <i>rshQ</i> ^{30C} ; Cm ^R , Spc ^R	Ce travail
R3018	R1502 mais <i>rshA</i> ^{20C} ; Cm ^R , Kan ^R	Ce travail

R3019	R1502 mais <i>rshA</i> ^{20C} ; Cm ^R , Kan ^R	Ce travail
R3020	R1502 mais <i>rshA</i> ^{20C} et <i>rshQ30C</i> ; Cm ^R , Kan ^R , Spc ^R	Ce travail
Plasmides		
pR410	Dérivé de pEMcat portant un minitransposon <i>mariner</i> Kan ^R (gène <i>kan</i>) ; Ap ^R , Kan ^R	(Sung <i>et al.</i> , 2001)
pR411	Dérivé de pEMcat portant un minitransposon <i>mariner</i> Kan ^R (gène <i>kan</i>) ; Ap ^R , Kan ^R	(Prudhomme <i>et al.</i> , 2007)
pR412	Dérivé de pEMcat portant un minitransposon <i>mariner</i> Spc ^R (gène <i>aad9</i> , aussi appelé <i>spc</i>) ; Ap ^R , Spc ^R	(Martin <i>et al.</i> , 2000)
Oligos		
	Séquence ; gène ; position	
MP127	CCGGGGACTTATCAGCCAACC ; transposon <i>mariner</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2000)
MP128	TACTAGCGACGCCATCTATGTG ; transposon <i>mariner</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2000)
MP190	TTGCGAATAGGGGAACAGTGAA ; <i>rshQ</i> ; -1275	Ce travail
MP191	TTAAGGCTGGCAATCTCCGTTA ; <i>rshQ</i> ; +1208	Ce travail
RelA1	ATTTTATGATCGATGAGAAAGACCAAGC ; <i>rshA</i> ; +2743	Ce travail
RelA2	TATGTGATACGAGTTCCACCGTTTAT ; <i>rshA</i> ; -237	Ce travail
RelA5	TTTTCCCTGAATCTGGCCTTCTA ; <i>rshA</i> ; +2318	Ce travail
RelA6	GTGAATTTAACAGGCGAAGAAGTTG ; <i>rshA</i> ; +12	Ce travail

Table 1 : Souche, plasmides et oligonucléotides utilisés au cours de cette étude.

Nov^R : résistance à la novobiocine, Rif^R : résistance à la rifampicine, Sm^R : résistance à la streptomycine, Spc^R : résistance à la spectinomycine, Kan^R : résistance à la kanamycine, Ap^R : résistance à l'ampicilline, Cm^R : résistance au chloramphénicol.

La position des oligonucléotides est exprimée en fonction de la distance entre le nucléotide en 3' et la position +1 du gène nommé. Le + indique que l'oligonucléotide est en aval du gène, et le - en amont.

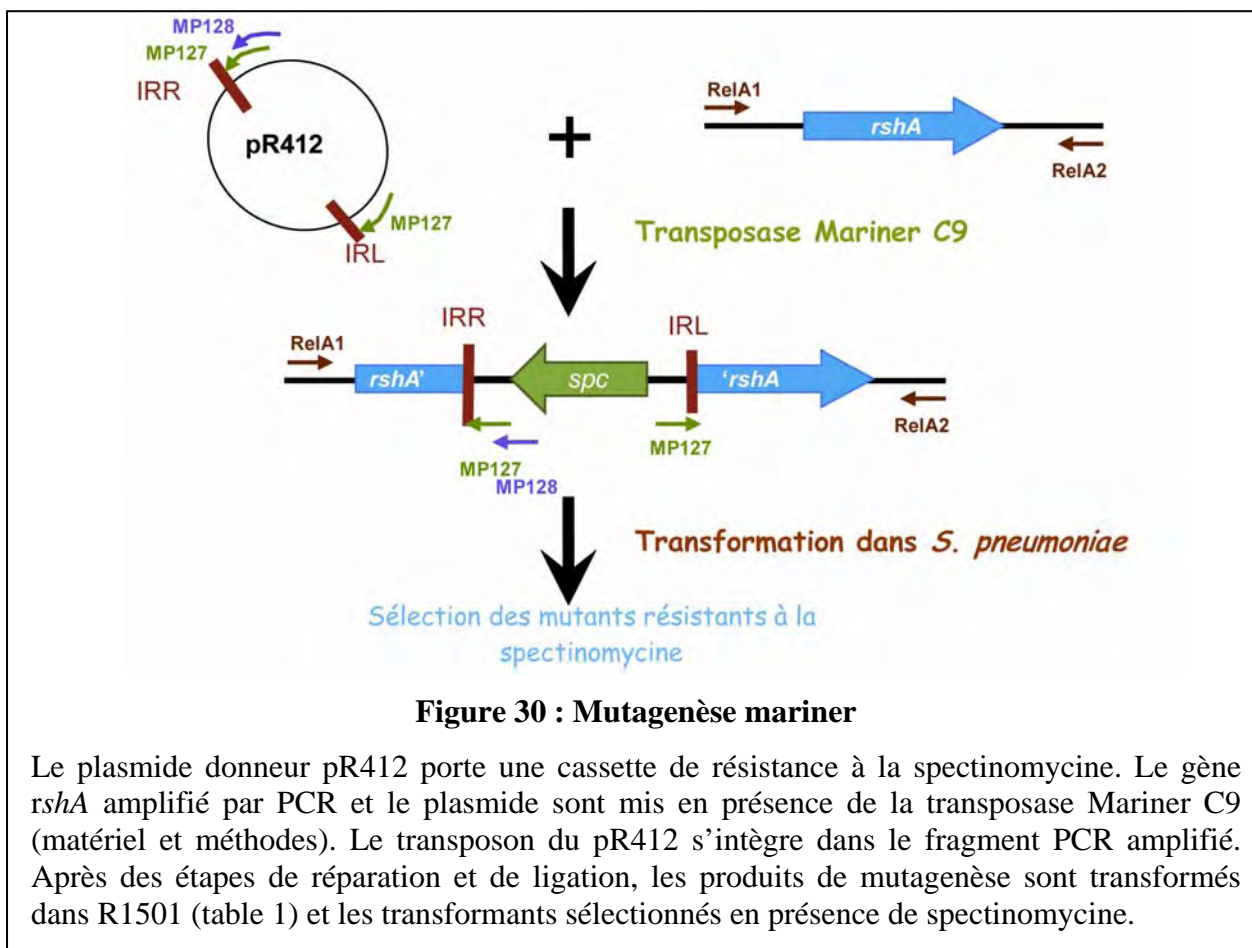
Milieux et conditions de culture :

La composition des milieux C+Y, THY (pH ajusté à 6.8) et Gélose D est décrite par G. Alloing (Alloing *et al.*, 1996) ; Luciférine (D-Luciferin firefly, Euromedex, ref 8240B) :

solution à 2.7 mg/mL préparée en milieu C+Y ; CSP : solution mère de CSP1 synthétique à 100 µg/mL en sodium acétate conservée à -20°C ; Antibiotiques : sélection sur boîte : kanamycine (SIGMA) utilisée en solution aqueuse à 250 µg/mL, spectinomycine (SIGMA) utilisée en solution aqueuse à 100 µg/mL, streptomycine (SIGMA) utilisée en solution aqueuse à 200 µg/mL ; Sérine hydroxamate : gamme préparée à partir d'une solution aqueuse mère à 2 mg/mL.

Mutagenèse mariner: (figure 30)

Les gènes d'intérêt : *rshA* et *rshQ*, ont été amplifiés par PCR fidèle avec la Phusion (Ozyme) et les couples d'oligonucléotides RelA1/RelA2, MP190/MP191 respectivement. Les produits PCR ont été purifiés et soumis à la mutagenèse *mariner* (Martin *et al.*, 2000 ; Prudhomme *et al.*, 2007). Les produits de mutagenèse ont ensuite été transformés dans la souche R1501 de *S. pneumoniae*.



Transformation :

La méthode de préparation des cellules utilisée a été décrite par Martin et ses collaborateurs (Martin *et al.*, 1995). Les cellules sont cultivées dans du milieu C+Y (ajusté à

pH6.8) jusqu'à une DO (à 550nm) d'environ 0.4, les cellules sont alors lavées et reprises dans du milieu C+Y (pH6.8) contenant 15 % de glycérol. La préculture est ensuite conservée à -80°C. La préculture est ensuiteensemencée au 1/100^{ième} dans du milieu C+Y (pH6.8) et la croissance est menée jusqu'à une DO (à 550nm) d'environ 0.15. La culture est ensuite concentrée 10 fois dans du milieu C+Y (pH6.8) contenant 15 % de glycérol. Les cellules précompétentes sont alors aliquotées et conservées à -80°C

La méthode de transformation de *S. pneumoniae* a été décrite par Martin et ses collaborateurs (Martin *et al.*, 2000). Les cellules précompétentes sont diluées 10 fois dans du milieu C+Y contenant 100ng/mL de CPS1 et incubées 10 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite mises en présence d'ADN et incubées pendant 20 minutes à 30°C. Une étape d'expression phénotypique est réalisée dans la masse de gélose D contenant 4.5 % de sang de cheval défibriné pendant 2h à 37°C. Ensuite une deuxième couche de gélose D contenant l'antibiotique adapté est ajoutée à la première. Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit à 37°C. Dans le cas d'une expression phénotypique liquide, après incubation des cellules en présence d'ADN, les cellules sont diluées 20 fois dans du milieu C+Y et incubées environ 4h à 37°C, puis étalées dans la masse de gélose D contenant 4,5% de sang et l'antibiotique adapté, et sont incubées toute la nuit à 37°C.

Localisation des insertions :

Les insertions des minitransposons sont localisées par PCR avec Taq Core (Q-biogen) et les oligonucléotides MP127/RelA1, MP127/MP190 pour les gènes *rshA*, *rshQ* respectivement. L'orientation du transposon est ensuite déterminée par PCR avec Taq Core et un couple d'oligonucléotides contenant MP128 et un des deux oligos ayant servi à amplifier le gène cible. Les produits PCR ont ensuite été séquencés et les insertions localisées précisément.

Retournement des cassettes de résistance : (figure 31)

Le plasmide pR411 a été linéarisé par digestion (*BsaI*) puis purifié sur gel (QIAQUICK PCR purification kit, Qiagen). L'ADN ainsi obtenu a été transformé dans les mutants d'intérêt et les transformants sélectionnés sur boîte (gélose D + 250 µg/mL de kanamycine).

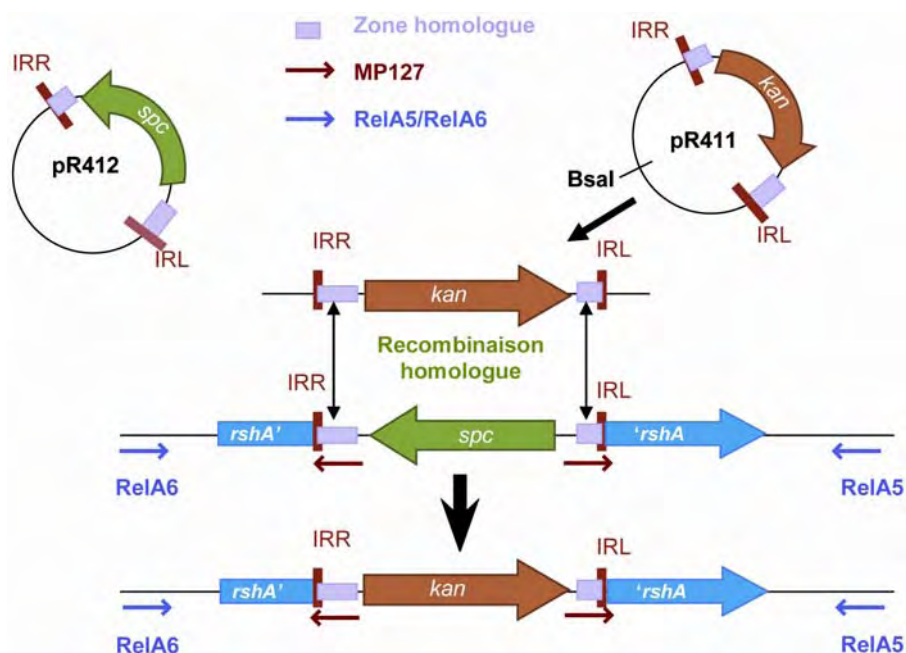


Figure 31 : Retournement de cassette de résistance.

Le plasmide pR411 a été digéré à l'aide de l'enzyme de restriction *BsaI*. La cassette de résistance à la kanamycine du plasmide linéaire va remplacer la cassette de résistance à la spectinomycine déjà en place dans le gène *rshA* grâce à deux événements de recombinaison homologue. Ceci est possible grâce aux deux courtes régions d'homologie qui existent entre les deux transposons des plasmides pR411 et pR412 (170 pb du côté IRR et 117 pb du côté IRL).

Dosage du ppGpp

La méthode de dosage du ppGpp est similaire à la méthode utilisée par (Cashel *et al.*, 1996). Chaque souche testée est mise en croissance en THY au $1/20^{\text{ième}}$ jusqu'à une DO à 550 nm d'environ 0.6. Les cellules sont concentrées 20 fois en milieu MOPS. Le marquage est réalisé en mettant en présence 20 μl de cellules concentrées avec 60 μl de MOPS contenant du phosphate inorganique radioactif (10 $\mu\text{Ci/ml}$). Le marquage est arrêté en transférant 20 μl de mélange dans 20 μl d'acide formique 13N au bout de 20 secondes.

5 μl de culture marquée et arrêtée à l'acide formique sont alors déposés sur plaque PEI-cellulose F (Merck). La migration se déroule en déposant la plaque dans 1 cm de tampon KH_2PO_4 à 1.5 M (pH ajusté à 3.4 par de l'acide phosphorique). La migration dure environ 45 min pour 10 cm de migration. La plaque est ensuite séchée et la partie haute de la plaque est découpée (environ 2cm contiennent toutes les molécules marquées qui ne nous intéressent pas et qui gênent la lecture du résultat). La plaque est ensuite exposée sur écran FUGI overnight et révélé au PhosphorImager.

Préparation de cellules T2 pour le suivi de l'expression de la fusion :

Les cellules sont cultivées en C+Y (pH6.8) (pouvant contenir 2µg/mL de trypsine) jusqu'à une DO_{550nm} comprise entre 0,17 et 0,25. Elles sont lavées et le culot cellulaire est ensuite repris respectivement dans du milieu C+Y (pH6.8) contenant 15% glycérol pour obtenir une $DO_{550nm}=0,4$, puis la suspension ainsi obtenue est stockée à $-80^{\circ}C$.

Expression de la fusion et suivi de croissance : Induction spontanée de la compétence

Les cellules T2 sontensemencées au $1/100^{ième}$ dans une gamme de du milieu C+Y (pouvant aller de pH 6,1 à 7,9), placées dans les puits d'une microplaque contenant 0,15 mg/ml (final) de luciférine. Les cellules sont incubées à $37^{\circ}C$ dans le luminomètre (Anthos lucy I) qui mesure, au cours du temps, la RLU (Relative Luminescence Unit) et la DO à 492 nm. Lorsque la fusion *ssbB::luc* est exprimée, une émission de photons par la luciférase (en présence de luciférine) est détectée par le luminomètre et exprimée en RLU.

Expression des fusions et suivi de croissance : compétence induite par le CSP

A



Figure 32 : organisation génétique de la fusion avec le gène rapporteur *luc*.

A : Organisation génétiques de la fusion *ssbB::luc*. Le gène de la luciférase a été placé sous le contrôle du promoteur tardif du gène *ssbB* par insertion-duplication du plasmide pR414. Ainsi, la souche porte à la fois la fusion transcriptionnelle et le gène *ssbB* sauvage. En vert : les gènes endogènes, en orange : le gène de la luciférase, en bleu : la cassette de résistance présente dans le plasmide inséré. P_{ssbB} promoteur du gène *ssbB*

Les cellules T2 sontensemencées au $1/100^{ème}$ ou au $1/200^{ème}$ dans du milieu C+Y pH 7,9), placées dans les puits d'une microplaque contenant 0,15 mg/ml (final) de luciférine. Les cellules sont incubées à $37^{\circ}C$ dans le luminomètre (Anthos lucy I) qui mesure, au cours du temps, la RLU et la DO à 492 nm. Au bout de 120 minutes 100 ng/ml de CSP synthétique (ou de l'eau) sont ajoutés aux différentes cultures.

Induction de la compétence par l'ajout d'antibiotiques:

Les cellules T2 sontensemencées au $1/50^{\text{ème}}$ dans du milieu C+Y, placées dans les puits d'une microplaque contenant 0,15mg/ml de luciférine. Les cellules sont incubées à 37°C dans le luminomètre. Au bout de 70 minutes, 10µL d'une gamme d'antibiotique (sérine hydroxamate : gamme comprise entre 0,05 et 2 mg/mL final ; streptomycine : gamme comprise entre 0,1 et 6 µg/ml final) sont ajoutés dans chaque puits. Le luminomètre mesure la RLU et la DO_{492nm} toutes les dix minutes pendant plus de 8 heures.

***Chapitre 2 : le régulateur global CodY est une protéine
essentielle chez le pathogène humain Streptococcus
pneumoniae***

The global nutritional regulator CodY is an essential protein in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*

Stéphanie Caymaris,^{1,2} Hester J. Bootsma,³
Bernard Martin,^{1,2} Peter W. M. Hermans,³
Marc Prudhomme^{1,2} and Jean-Pierre Claverys^{1,2,*†}

¹Centre National de la Recherche Scientifique, LMGM-UMR5100, F-31000 Toulouse, France.

²Université de Toulouse, UPS, Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, F-31000 Toulouse, France.

³Laboratory of Pediatric Infectious Diseases, Radboud University Nijmegen Medical Centre, 6500 HB Nijmegen, the Netherlands.

Summary

CodY is a global regulator highly conserved in low-G+C Gram-positive bacteria. It plays a key role in the adaptation of *Bacillus subtilis* to nutritional limitation through repression of a large gene set during exponential growth and relief of repression upon starvation. In several pathogenic bacteria, CodY regulates major virulence genes. Our interest in *Streptococcus pneumoniae* CodY originates from our observations that the oligopeptide permease Ami was involved in repression of competence for genetic transformation. We hypothesized that peptide uptake through Ami feeds amino acid pools, which are sensed by CodY to repress competence. As our initial attempts at inactivating *codY* failed, we launched an in-depth analysis into the question of the essentiality of *codY*. We report that *codY* cannot be inactivated unless a complementing ectopic copy is present. We obtained genetic evidence that a recently published D39 *codY* knock-out contains additional mutations allowing survival of *codY* mutant cells. Whole-genome sequencing revealed mutations in *fatC*, which encodes a ferric iron permease, and *amiC*. This combination of mutations was confirmed to allow tolerance of *codY* inactivation. The *amiC* mutation is in itself sufficient to account for the strong derepression

of competence development observed in D39 *codY* cells.

Introduction

CodY is a global regulator highly conserved in low-G+C Gram-positive bacteria (Sonenshein, 2005). In *Bacillus subtilis*, the CodY regulon is large, encompassing nearly 200 genes (Molle *et al.*, 2003), most of which are repressed during exponential growth and induced when cells experience nutrient deprivation. In several pathogenic bacteria, CodY regulates major virulence genes (for review, see Sonenshein, 2005; 2007). The repressor function of CodY (i.e. its DNA-binding activity) is activated by interaction with branched-chain amino acids (BCAAs), as originally shown *in vivo* in *Lactococcus lactis* (Guédon *et al.*, 2001). In species other than the streptococci, lactococci and enterococci, CodY is also activated by interaction with GTP as first demonstrated (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001) and further documented (Handke *et al.*, 2008) with the *B. subtilis* protein. In the latter bacterium, CodY is known to control not only metabolic pathways but also cellular processes, such as motility, sporulation and competence for genetic transformation (Sonenshein, 2005; 2007). In the latter case, CodY represses both *comK*, which encodes the master transcriptional activator of competence (*com*) genes, and *srfA*, a key operon for transcriptional activation of *comK* (Serror and Sonenshein, 1996).

Until recently, little was known regarding the role(s) of CodY in *Streptococcus pneumoniae*. Our interest in CodY stems from our previous observations that the oligopeptide permease Ami was, together with its dedicated oligopeptide-binding lipoproteins (Obl, i.e. AmiA, AliA and AliB) (Alloing *et al.*, 1994), indirectly involved in the regulation of competence (Claverys *et al.*, 2000; Claverys and Håvarstein, 2002). Competence development of an *obl* mutant thus occurred at a ~50-fold reduced cell density compared with wild type (Alloing *et al.*, 1998). We hypothesized that the uptake of oligopeptides plays a key role in metabolic regulation in *S. pneumoniae*, by providing information on nutrient availability (Claverys *et al.*, 2000). Exhaustion of nutrients would be sensed through a mechanism involving peptide uptake by the Ami-Obl oligopeptide permease, followed by peptidase digestion to

Accepted 2 August, 2010. *For correspondence. E-mail claverys@ibcg.biotoul.fr; Tel. (+33) 561 33 59 11; Fax (+33) 561 33 58 86. †Present address: Université Paul Sabatier-CNRS, LMGM, Bât. IBCG, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France.

release amino acids (aa) leading to replenishment of aa pools, which in turn affect a global regulatory protein such as CodY (Claverys *et al.*, 2000). The above-mentioned demonstration that BCAAs are effectors of CodY in several species would fit nicely with this hypothesis since *S. pneumoniae* Obl proteins have different but overlapping specificities for peptides including those containing BCAAs (Alloing *et al.*, 1994). Thus import of BCAAs (as part of oligopeptides) by the Ami-Obl permease could directly impact CodY activity. This situation would not be unprecedented since CodY-dependent repression of *comK* and *srfA* was lost in an *opp* (oligopeptide permease) mutant of *B. subtilis* (Serror and Sonenshein, 1996). To account for the negative impact of Ami-Obl on competence induction, we explicitly stated in our model that CodY should repress competence (Claverys *et al.*, 2000).

To test this model, we initiated experiments aimed at inactivating *S. pneumoniae codY*. Surprisingly, this gene turned out to be difficult to inactivate. However, *codY* inactivation had recently been achieved through insertion of a trimethoprim resistance gene (*trim*) in strain D39 (Hendriksen *et al.*, 2008). Microarray analysis using this mutant suggested that pneumococcal CodY functions mainly as a transcriptional repressor, as 43 of the 47 genes differentially expressed in the *codY::trim* mutant were found to be upregulated. The inefficiency in constructing a *codY* knock-out in strain R6 prompted us to launch an in-depth analysis of the question of the essentiality of *codY*. Here, we present our data establishing that *codY* is essential in our laboratory strains, as well as in *S. pneumoniae* R6 and encapsulated D39 strains. We provide genetic evidence that, in addition to the *codY* knock-out, the *codY::trim* mutant used for transcriptome analysis of the CodY regulon and for virulence studies (Hendriksen *et al.*, 2008) contains additional mutations (suppressors) allowing survival of *codY* mutant cells. We document a strong derepression of competence in such *codY* mutant cells. Finally, we use comparative whole-genome sequencing to identify suppressor mutations in *fatC*, which encodes a ferric iron permease, and *amiC*. We confirm that this combination of mutations allows tolerance of *codY* inactivation and discuss possible reasons for CodY essentiality in *S. pneumoniae* in light of these observations.

Results

Minitransposon insertion mutagenesis of S. pneumoniae codY is not possible

A *codY* PCR fragment amplified with the primer pair MP188–MP189 (Table 1) was used as target for *mariner* mutagenesis (*Experimental procedures*). Analysis of more than 50 minitransposon insertions through PCR

revealed that only six clones produced an MP188–MP189 fragment of which the size was consistent with that predicted for integration of the *kan^R* minitransposon (donated by plasmid pR410; Table 1). Localization of these six insertions indicated that none of them had inserted into the *codY* gene (Fig. 1A). Given our previous experience with *mariner* mutagenesis of the *ciaRH* (Martin *et al.*, 2000), *endA*, *comEAC*, *comFAC*, *comGAB* and *dprA* (Bergé *et al.*, 2002), as well as *cibABC* (Guiral *et al.*, 2005), *comM-lytR* (Håvarstein *et al.*, 2006) and *radC* (Attaiech *et al.*, 2008) loci, we concluded that the failure to isolate insertions in a locus occupying a central position on the targeted PCR fragment and the biased distribution observed were strongly indicative of the essentiality of *codY*, at least in the genetic background and under the plating conditions (CAT agar) used. [It is of note that a similar conclusion regarding the essentiality of *lytR* (*spr1759*) based on the failure to isolate *mariner* insertions in this locus (Håvarstein *et al.*, 2006) was confirmed in a further study (Johnsborg and Håvarstein, 2009).]

Construction of a strain harbouring a second (ectopic) copy of codY

The failure to inactivate *codY* through *mariner* mutagenesis prompted us to construct a strain harbouring a second copy of *codY* that should tolerate inactivation of one of the two copies. The second copy was inserted at CEP (chromosomal expression platform) (Guiral *et al.*, 2006) under the control of the maltose-inducible promoter, P_M (Fig. 1B). The resulting strain is referred to as *codY⁺⁺* hereafter. The duplication of *codY* had no detectable effect on growth and spontaneous competence induction when cells were grown with 1% maltose, i.e. under conditions leading to full induction of the P_M promoter (Guiral *et al.*, 2006), suggesting that the level of CodY attained with this induction system is not detrimental to the cell (data not shown).

Minitransposon insertions in codY are readily obtained in diploid (codY⁺⁺) cells

A *codY⁺⁺* strain (R2349) was then used as recipient for *mariner* mutagenesis of *codY* with plasmid pR412 as donor of minitransposon (*spc^R* cassette; Table 1). In contrast to the failure to inactivate *codY* using wild-type recipient cells, minitransposon insertions were readily obtained in cells grown in maltose. A *codY1-codY2* (Table 1) PCR fragment of which the size was consistent with that predicted for integration of the *spc^R* minitransposon was observed for 11 out of 20 randomly selected clones. Five of these insertions turned out to inactivate *codY* as judged from their location (Fig. 1C) and from the inability to introduce them at high frequency in a wild-type recipient (data not shown but see next section).

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

Strains	Genotype ^a /description	Source/reference
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
D39	Serotype 2	NCTC 7466
D39 Δ <i>codY</i>	D39 Δ <i>codY::trim (socY)^b</i> ; Trim ^R , (Mtx ^R) ^b	Hendriksen <i>et al.</i> (2008)
D39 Δ <i>cps</i>	D39 Δ <i>cps::kan</i> ; Kan ^R	Hendriksen <i>et al.</i> (2008)
D39 Δ <i>cps</i> Δ <i>codY</i>	D39 Δ <i>cps::kan</i> Δ <i>codY::trim (socY)^b</i> ; Kan ^R , Trim ^R , (Mtx ^R) ^b	Hendriksen <i>et al.</i> (2008)
R6	Unencapsulated derivative of D39	Burghout <i>et al.</i> (2007)
R246	R800 but <i>hexA</i> Δ 3: <i>ermAM</i> ; Ery ^R	Mortier-Barrière <i>et al.</i> (1998)
R304	R800 derivative, <i>nov1</i> , <i>rif23</i> , <i>str41</i> ; Nov ^R , Rif ^R , Sm ^R	Mortier-Barrière <i>et al.</i> (1998)
R800	R6 derivative	Lefèvre <i>et al.</i> (1979)
R895	R800 but <i>ssbB::luc (ssbB⁺)</i> ; Cm ^R	Chastanet <i>et al.</i> (2001)
R1501	R800 but <i>comC₀</i>	Dagkessamanskaia <i>et al.</i> (2004)
R1818	R1501 but <i>hexA</i> Δ 3: <i>ermAM</i> ; Ery ^R	This study
R2349	R1501 but CEP _M - <i>codY</i> (the resulting duplication of <i>codY</i> is denoted <i>codY⁺⁺</i>); Kan ^R	This study
R2350	R895 but <i>codY⁺⁺</i> ; Kan ^R , Cm ^R	This study
R2424	R2350 but genuine <i>codY</i> inactivated by <i>mariner</i> insertion <i>spc^{2A}</i> (the resulting <i>codY</i> combination is denoted <i>codY^{spc2A}</i>); Kan ^R , Cm ^R , Spc ^R	This study
R2425	R2350 but ectopic <i>codY</i> inactivated by <i>mariner</i> insertion <i>spc^{2A}</i> (the resulting <i>codY</i> combination is denoted <i>codY^{+/spc2A}</i>); Kan ^R , Cm ^R , Spc ^R	This study
R2427	R6 but <i>codY⁺⁺</i> ; Kan ^R	This study
R2428	R1818 but <i>codY⁺⁺</i> ; Ery ^R , Kan ^R	This study
R2430	R895 but <i>pmaiR</i> (pAPM22); Cm ^R , Ery ^R	This study
R2432	R2424 but <i>pmaiR</i> (pAPM22); Cm ^R , Ery ^R , Kan ^R , Spc ^R	This study
R2437	R2349 but <i>str41</i> ; Kan ^R , Str ^R	This study
R2438	R2437 but <i>codY^{spc2A}</i> ; Kan ^R , Spc ^R , Str ^R	This study
R2549	R895 but <i>amiC9</i> ; Cm ^R , Mtx ^R	This study
R2641	R895 but <i>kan⁹⁰⁰::codY⁺, str41</i> ; Cm ^R , Spc ^R , Str ^R	This study
R2644	R2641 but <i>spc⁹⁰⁰::codY⁺</i> ; Cm ^R , Spc ^R , Str ^R	This study
R2737	R895 but CEP _M ; Cm ^R , Kan ^R	This study
R3002	R246 but <i>fatC::cat²³⁰</i> (from TD131); Cm ^R , Ery ^R	This study
R3003	R246 but <i>amiC9</i> ; Ery ^R , Mtx ^R	This study
R3004	R3002 but <i>amiC9</i> ; Cm ^R , Ery ^R , Mtx ^R	This study
TD73	D39 but <i>codY⁺⁺</i> ; Kan ^R	This study
TD80	D39 Δ <i>cps</i> Δ <i>codY (socY)^b</i> but <i>str41</i> ; Kan ^R , Str ^R , Trim ^R	This study
TD81	TD80 but <i>codY::spc^{2A}</i> ; Kan ^R , Spc ^R , Str ^R	This study
TD82	D39 Δ <i>cps</i> but <i>ssbB::luc (ssbB⁺)</i> ; Cm ^R , Kan ^R	This study
TD83	D39 Δ <i>cps</i> Δ <i>codY</i> but <i>ssbB::luc (ssbB⁺)</i> ; Cm ^R , Kan ^R , Trim ^R	This study
TD84	TD80 but <i>amiC9</i> ; Cm ^R , Kan ^R , Mtx ^R	This study
TD95	TD83 but <i>spc⁹⁰⁰::codY⁺</i> ; Cm ^R , Kan ^R , Spc ^R	This study
TD96	TD95 but <i>codY⁺</i> ; Cm ^R , Kan ^R	This study
TD129	D39 Δ <i>cps</i> but <i>fatC::spc²³⁰</i> ; Kan ^R , Spc ^R	This study
TD130	TD129 but <i>amiC9</i> ; Kan ^R , Mtx ^R , Spc ^R	This study
TD131	TD129 but <i>fatC::cat²³⁰</i> ; Cm ^R , Kan ^R	This study
TD135	TD130 but <i>ssbB::luc (ssbB⁺)</i> ; Cm ^R , Kan ^R , Mtx ^R , Spc ^R	This study
TD138	TD129 but <i>ssbB::luc (ssbB⁺)</i> ; Cm ^R , Kan ^R , Spc ^R	This study
TD154	TD135 but Δ <i>codY::trim</i> ; Cm ^R , Kan ^R , Mtx ^R , Spc ^R , Trim ^R	This study
Plasmids	Description	Source/reference
pAPM22	pLS1 derivative carrying the <i>maiR</i> gene; Ery ^R	Puyet <i>et al.</i> (1993)
pCEP	pSC101 derivative (i.e. low-copy-number plasmid) carrying CEP; Spc ^R , Kan ^R	Guiral <i>et al.</i> (2006)
pCEP2	pKL147 derivative (i.e. high-copy-number plasmid) carrying an EcoRI/PstI fragment from pCEP; Spc ^R , Kan ^R , Ap ^R	This study
pCEP2- <i>codY</i>	pCEP2 derivative carrying <i>codY</i> under P _M control; Spc ^R , Kan ^R , Ap ^R	This study
pEMcat	ColE1 derivative carrying a Cm ^R <i>mariner</i> minitransposon; Ap ^R , Cm ^R	Akerley <i>et al.</i> (1998)
pKL147	pUS19 derivative containing <i>gfpmut2</i> fused to the 3' end of <i>dnaX</i> with a linker; Spc ^R , Ap ^R	Lemon and Grossman (1998)
pR410	pEMcat derivative carrying a Kan ^R (<i>kan</i> gene) <i>mariner</i> minitransposon; Ap ^R , Kan ^R	Sung <i>et al.</i> (2001)
pR412	pEMcat derivative carrying an Spc ^R (<i>aad9</i> gene, also called <i>spc</i>) <i>mariner</i> minitransposon; Ap ^R , Spc ^R	Martin <i>et al.</i> (2000)
Primers	Sequence; ^d gene; position ^e	Source/reference
ami1	GCGCAAACAGGCTCTAAGGG; <i>amiA</i> ; +1815	This study
ami2	TCAGGAATTCCTGCTGCCATTAT; <i>amiC</i> ; +1257	This study
ami4	CCTGACTCACCTACCAAGGCTA; <i>amiD</i> ; +712	This study
ami5	CCTTACCGAAGGAAATTTCTA; <i>amiE</i> ; +121	This study

Table 1. cont.

Strains	Genotype ^a /description	Source/reference
ami6	TTAGCTGACTTCAACCCACTACA; <i>amiF</i> ; +1027	This study
amiF1	GCCTTGCTTTTCAGCGGTACCAAT; <i>amiF</i> ; +789	This study
AM40	AGAGTTTCGGATGGTTTGGA; <i>treR</i> ; +347	This study
codY1	CAAGGATCAGTTTTCCCATATTTTCG; <i>codY</i> ; +1636	This study
codY2	CTTCGTGTCCTTCGTGACTTTA; <i>codY</i> ; -1004	This study
codYatg	tgaatc ATGaCACATTTATTAGAAAAAACTAG; <i>codY</i> ; 0	This study
codYstop	aaattgatccTTTGTCAATTAAGTAATCTCTTTTC; <i>codY</i> ; +797	This study
fat1	GCGAACGAATGATTTACTGG; <i>fatD</i> ; -659	This study
fat2	TCTCACAGTCTTTCCACCC; <i>fatB</i> ; +1388	This study
fatC1	TAAAGCAAACATACCAAGC; <i>fatC</i> ; -9	This study
fatC2	TAAAGAATAAGAAGCCACCC; <i>fatC</i> ; +909	This study
HBDamiCF1	ACGGCTGATAAACGTGATAA; <i>amiC</i> ; +145	This study
HBDamiCF2	GTCGTTGGTCTTGTCTTCAT; <i>amiC</i> ; +1381	This study
HBDamiCR1	TAAATTCTCCCAAAGTCCAA; <i>amiC</i> ; +343	This study
HBDamiCR2	CGCATCAATAGTTTCAGAGG; <i>amiC</i> ; +1568	This study
HBDfatCF	ACACTGATGAAGCAAGACCT; <i>fatC</i> ; +376	This study
HBDfatCR	CAATATCTGAGCCGTTTCTC; <i>fatC</i> ; +645	This study
kan1	ATCATGTCCTTTTCCCGTCCAC; <i>kan</i> ; +191	This study
MP127	CCGGGGACTTATCAGCCAACC; mariner transposon	Martin <i>et al.</i> (2000)
MP128	TACTAGCGACGCCATCTATGTG; mariner transposon	Martin <i>et al.</i> (2000)
MP188	TTCATTTTCACCAACCAGGTTAC; <i>codY</i> ; +1032	This study
MP189	ATTGGCTGCTGAGTTTACTCCAG; <i>codY</i> ; -618	This study
MP192	<u>ggatcc</u> ACGTCATCAACTAAATAGCG; <i>aliA</i> ; -343	This study
MP193	CAGAACTTTCTGGTTTGTT; <i>aliA</i> ; -539	This study
MP194	TTGGAATCCCTCTTCTGGAAC; <i>dexB</i> ; +908	This study
MP195	ttagtgtatgacgtggatccGCTTTTTATACAGTCTCTCC; <i>dexB</i> ; +1693	This study
rpsL_3	TGACATGGATACGGAAGTAG; <i>rpsL</i> ; -798	This study
rpsL_4	ATGGTAAGCTGAGTTATAGC; <i>rpsL</i> ; +1204	This study

a. Ap^R, ampicillin resistance; Cm^R, chloramphenicol resistance; Kan^R, kanamycin resistance; Mtx^R, methotrexate resistance; Spc^R, spectinomycin resistance; Str^R, streptomycin resistance; Trim^R, trimethoprim resistance.

b. *socY*^a refers to the presence of the *amiC23*, *amiC*^{A248C} or *amiC*^{G1459T} mutations as well as the *fatC*^{C496T} identified in this study and demonstrated to be required for tolerance of *codY* inactivation.

c. *socY* refers to the presence of the *amiC*^{G1459T} and *fatC*^{C496T} mutations.

d. Lower-case letters indicate nucleotide extensions to introduce convenient restriction sites (NdeI, BamHI and EcoRI, respectively, in *codYatg*, *codYstop* and MP192; underlined sequences) in the primers (note that the NdeI site in *codYatg* introduced a Ala→Thr change at the second aa position of *CodY*). The start and stop codons of *codY* are shown in bold. In MP195, lower-case letters indicate nucleotide extension complementary to MP192.

e. Position is given with respect to the ATG of the corresponding gene; - and + indicate upstream and downstream respectively.

^o and ^A indicate, respectively, the co-transcribed and the reverse orientation of an inserted minitransposon antibiotic resistance cassette with respect to the targeted gene.

The isolation of minitransposon insertions in the genuine copy of *codY* suggested that the ectopic copy placed at CEP was able to complement *codY* deficiency. This conclusion was further strengthened by the observation that upon transformation of *codY*^{+/+} cells with a PCR fragment carrying the *codY::spc*^{3A} insertion (generated with the primer pair *codYatg*-*codYstop*; Fig. 1C and Table 1), Spc^R transformants distributed about equally between the genuine *codY* (e.g. strain R2424 the genotype of which is denoted *codY*^{spc3+/+}; Fig. 2A) and the ectopic CEP_M-*codY* loci (e.g. strain R2425 the genotype of which is denoted *codY*^{+/spc3}; Fig. 2B).

Transformation frequencies of *codY*^{spc3+/+} in wild-type and *codY*^{+/+} cells confirm *codY* essentiality

To unambiguously demonstrate the essentiality of *codY* in our strains, we then used chromosomal DNA from a

codY^{spc3+/+} strain (R2438) as donor in transformation of a wild-type recipient. If *codY* is essential, the survival of transformants harbouring the *codY::spc*^{3A} knock-out mutation is predicted to rely on the simultaneous integration of CEP_M-*codY*-*kan* (i.e. a double transformation event occurring independently as the two loci are not genetically linked). On the other hand, a *codY*^{+/+} recipient should readily accept the *codY* knock-out. Transformation frequency should therefore be significantly reduced in wild-type cells compared with a *codY*^{+/+} recipient. In full agreement with this prediction, transformation of *codY::spc*^{3A} occurred in *codY*^{+/+} (strain R2350) cells with a frequency close to that of the *str41* (Str^R) reference marker (note that transformation of the *spc*^R cassette, which requires integration of ~1.1 kb heterologous DNA, is expected to occur with a two- to threefold reduced frequency compared with the point-mutation reference marker *str41*) (Fig. 3A). In contrast, ~20-fold reduction in

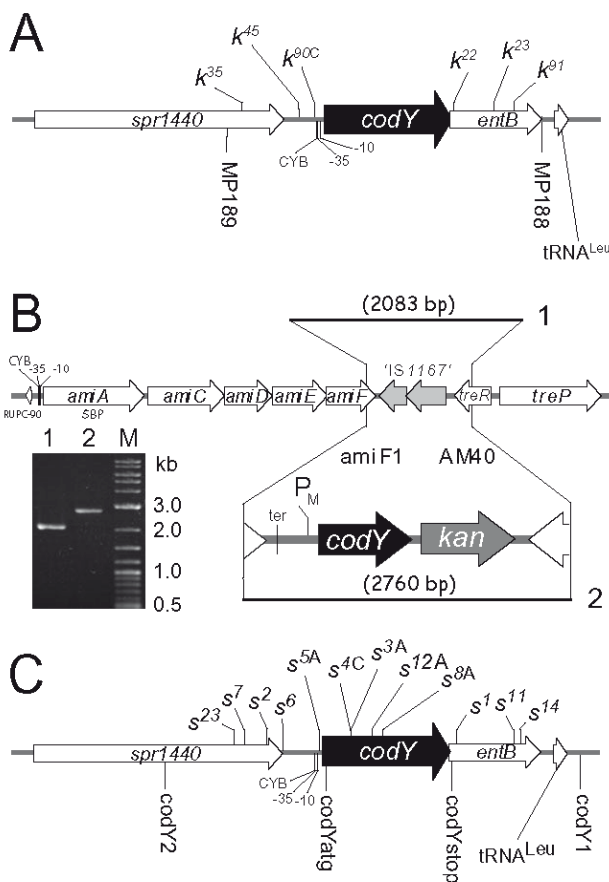


Fig. 1. Insertion mutagenesis of *codY* is not possible in *S. pneumoniae* R6 unless the strain carries an ectopic complementing copy of the gene.
A. Distribution of *mariner* insertions in the MP188–MP189 fragment obtained in wild-type cells.
B. Placement of a second copy of *codY* under the control of the maltose-inducible P_M promoter at CEP. The inset in (B) shows control PCRs with the primer pair *amiF1*–*AM40*: lane 1, 2083-bp-long wild-type fragment; lane 2, 2760-bp-long CEP_M –*codY*–*kan* fragment. M, kb ladder.
C. Recovery of *mariner* insertions at the *codY* locus in a recipient harbouring a complementing ectopic copy.
 The location of primers used to generate *codY* PCR fragments for *mariner* mutagenesis, MP188–MP189 (A) and *codY1*–*codY2* (C), is indicated. Insertion sites were located through DNA sequencing at position –100 for *kan*^{90C} (A) and –32, +163, +168, +300 and +365 for *spc*^{5A}, *spc*^{4C}, *spc*^{3A}, *spc*^{12A} and *spc*^{8A} respectively (C). Positions are given with respect to the first nucleotide of *codY* taken as +1; ^C and ^A indicate co-transcribed and reverse orientation of *spc* (*s*) or *kan* (*k*) cassette, respectively, with respect to *codY*. A *CodY* box (AatTTTCAGatAatT) previously identified in the promoter region of *codY* (Hendriksen *et al.*, 2008) is indicated as CYB. It is separated by 1 nt from the putative –35 promoter box of *codY*, itself separated by 17 nt from an extended –10 box with perfect match to the consensus (last nucleotide of this –10 located 26 nt upstream of the *codY* start).

the frequency of Spc^R transformants was observed with wild-type (R895) cells (Fig. 3A). The observed frequency was close to that calculated as the product of individual transformation frequencies of Spc^R and Kan^R . To verify

that Spc^R transformants obtained with the wild-type recipient had simultaneously acquired resistance to Kan , 10 Spc^R transformants were isolated. All of them turned out to carry the CEP_M –*codY*–*kan* construct (data not shown). Altogether, these data demonstrated that *codY* is an essential gene in *S. pneumoniae* R800 and its derivatives.

codY is also essential in R6 and in encapsulated D39

R800 was originally derived from R6 through introduction of a suppressor mutation (originating from strain Cl₃, another D39 derivative) (Tiraby *et al.*, 1975) that greatly improved growth of *ami* mutants (Lefèvre *et al.*, 1979). This led us to wonder whether the presence of this uncharacterized suppressor was responsible for the essentiality of *codY*. We therefore introduced the CEP_M –*codY* construct in R6 (generating strain R2427) and measured transformation frequencies of *codY*::*spc*^{3A} using *codY*^{*spc*3/+} chromosomal DNA as donor. Yield of Spc^R transformants was significantly lower in R6 than in its *codY*^{+/+} derivative indicating that *codY* is essential in this background as well (Fig. 3B).

Inactivation of *codY* was previously reported in the encapsulated *S. pneumoniae* D39 strain (Hendriksen *et al.*, 2008). To check whether our negative data could be explained by the use of unencapsulated strains, of different medium and/or plating conditions, we first tried to transform D39 with an *amiF1*–*kan1* PCR fragment carrying *codY*::*spc*^{3A} (Fig. 2B), using previously described conditions for plating of *codY*[–] transformants on Columbia base agar (Hendriksen *et al.*, 2008). No Spc^R transformants (i.e. < 10^{–6}) could be obtained (data not shown). We therefore adopted the same strategy as the one described above for R6. Transformation of *codY*::*spc*^{3A} using *codY*^{*spc*3/+} chromosomal DNA as donor yielded ~20-fold fewer Spc^R transformants in D39 than in its *codY*^{+/+} derivative (strain TD73) indicating that introduction of a *codY* knock-out in D39 also requires the simultaneous transfer of the complementing ectopic CEP_M –*codY* gene (Fig. 3C). In full agreement with this interpretation, Spc^R transformants were also Kan^R . We concluded that *codY* is also essential in encapsulated D39 and that this gene must therefore be added to the list of essential pneumococcal genes (Thanassi *et al.*, 2002).

Re-investigation of the previously described codY knock-out reveals the presence of additional suppressor mutations or a chromosomal rearrangement

We then re-examined the previously constructed *codY*::*trim* mutant, strain D39Δ*codY* (Hendriksen *et al.*, 2008), as the transformation frequency upon mutant generation was very low (W. Hendriksen, pers. comm.). PCR analysis of the *codY* chromosomal region of strain D39Δ*cps*Δ*codY*, which was derived from D39Δ*codY* by transformation with

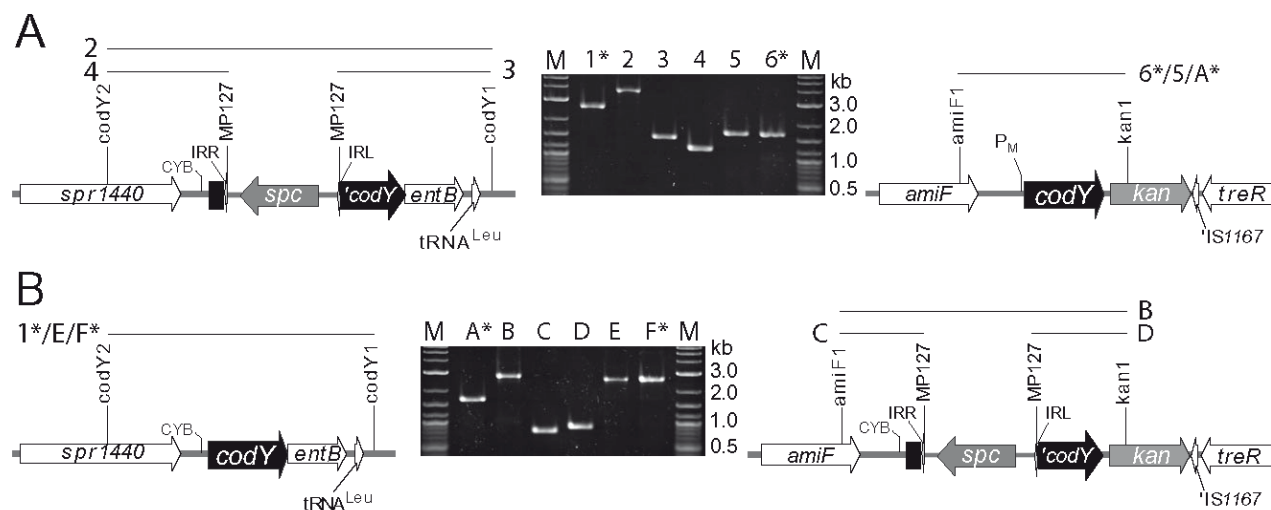


Fig. 2. Integration of *mariner* minitransposons can occur at either site in the chromosome of *codY*^{+/+} recipient cells. A. PCR probing of the structure of an *Spc*^R transformant (strain R2424) carrying the *codY*::*spc*^{3A} minitransposon at the genuine *codY* locus using the following primer pairs: *codY*1–*codY*2 (fragment/lane 2, 3787 bp), *codY*2–MP127 (fragment/lane 4, 1493 bp), MP127–*codY*1 (fragment/lane 3, 1196 bp) and *amiF*1–AM40 (fragment/lane 5, 1684 bp). Control PCR of the parental structure (strain R2350) using primer pairs *codY*1–*codY*2 (fragment/lane 1*, 2641 bp) and *amiF*1–*kan*1 (fragment/lane 6*, 1684 bp). B. PCR probing of the structure of an *Spc*^R transformant (strain R2425) carrying the *codY*::*spc*^{3A} minitransposon at the CEP–*codY* locus using the following primer pairs: *codY*1–*codY*2 (fragment/lane E, 2641 bp), *amiF*1–*kan*1 (fragment/lane B, 2830 bp), *amiF*1–MP127 (fragment/lane C, 815 bp) and MP127–*kan*1 (fragment/lane D, 917 bp). Control PCR of the parental structure (strain R2350) using primer pairs *codY*1–*codY*2 (fragment/lane F*, 2641 bp) and *amiF*1–*kan*1 (fragment/lane A*, 1684 bp). M, kb ladder.

a PCR fragment harbouring the Δ *cps*::*kan* cassette, as previously described (Bootsma *et al.*, 2007), confirmed the published structure (data not shown). Preliminary attempts using D39 Δ *cps* Δ *codY* chromosomal DNA as donor revealed that transformation of the *codY*::*trim* construct into R800 derivatives occurred only at very low frequency (data not shown). To facilitate the comparison with transformation experiments reported above, we

replaced the *codY*::*trim* construct with the *codY*::*spc*^{3A} insertion (using as donor a *codY*1–*codY*2 PCR fragment) and we introduced the *str41* reference marker (using as donor a PCR fragment amplified with the *rpsL*₃–*rpsL*₄ primer pair; Table 1) thus generating strain TD81. Then, using TD81 chromosomal DNA as donor, we compared transformation frequencies of *codY*::*spc*^{3A} in the same pairs of *codY*⁺ and *codY*^{+/+} derivatives of R800, R6 and D39 used in Fig. 3. Transformation frequencies in *codY*⁺ strains were reduced by 544-, 762- and 351-fold, respectively, in R800, R6 and D39, compared with their *codY*^{+/+} isogenic derivatives (Fig. 4A–C). These very large reductions in transformation frequency (compared with the ~20-fold reduction observed when the simultaneous transfer of *codY*::*spc*^{3A} and CEP_M–*codY* from a *codY*^{spc3A/+} donor was required; Fig. 3) indicated that transfer of the *codY*::*spc*^{3A} from strain TD81 must be accompanied by the transfer of more than one point mutation. Alternatively, the very low transformation frequency could be accounted for by the requirement for a simultaneous chromosomal rearrangement. We concluded that the original D39 Δ *cps* Δ *codY* strain either contained two additional suppressor mutations that are presumably acting together to compensate for the absence of CodY and restore cell viability, or harboured a chromosomal rearrangement allowing survival in the absence of CodY. We tentatively named it/them *socY* (for suppressor of codY).

To get a possible insight into the molecular nature of the mutation(s) involved, we carried out the same transforma-

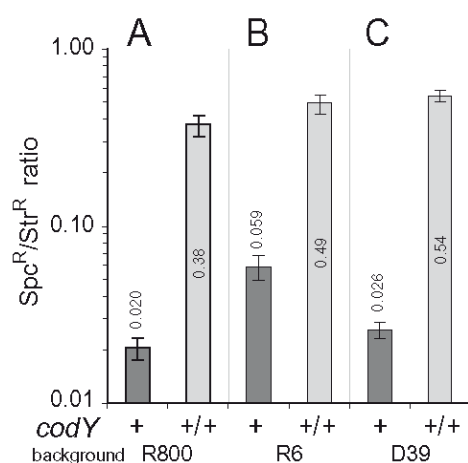


Fig. 3. Comparing transformation frequencies of *codY*^{spc3A} in wild-type and *codY*^{+/+} recipient cells. Chromosomal DNA of strain R2438 (*codY*^{spc3A/+} *str41*) was used as donor. Strains used: isogenic *codY*⁺ and *codY*^{+/+} derivatives of R800 (A), R6 (B) and D39 (C), respectively R895 and R2350, R6 and R2427, and D39 and TD73.

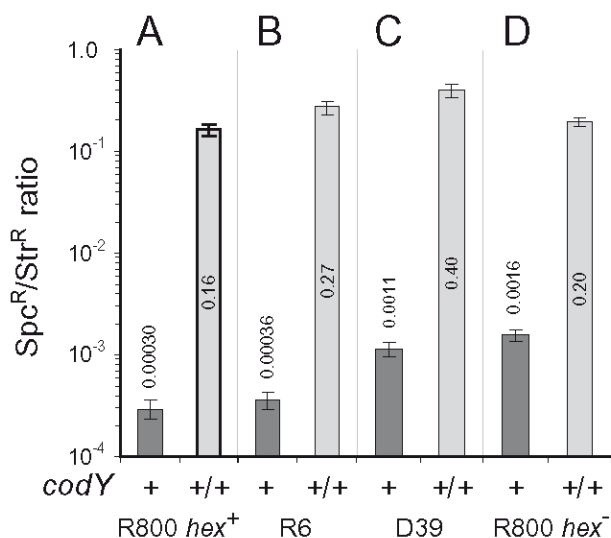


Fig. 4. Transformation data indicate the presence of two independent suppressor mutations or a chromosomal rearrangement in the previously described *codY* mutant. Chromosomal DNA of strain TD81 (*codY::spc^{3A} socY str41*) was used as donor. Strains used: isogenic *codY*⁺ and *codY*^{+/+} derivatives of R800-*hex*⁺ (A), R6 (B), D39 (C) and R800-*hex*⁻ (D), respectively R895 and R2350; R6 and R2427; D39 and TD73; R1818 and R2428.

tion experiments but with a pair of *hex* mutant derivatives of R800 (strain R1818 and its *codY*^{+/+} derivative, R2428). The Hex system of *S. pneumoniae* is known to correct out some mismatches at the donor–recipient heteroduplex stage in transformation (Claverys and Lacks, 1986). It is particularly efficient at correcting transition mismatches (i.e. A/C or G/T) as well as short frameshifts (Gasc *et al.*, 1989). Transformation frequencies with *hex*⁻ recipient cells were improved ~4.5-fold (125- versus 544-fold reduction in the *codY*⁺ parent compared with the *codY*^{+/+} derivative, in *hex*⁻ and *hex*⁺ strains respectively; Fig. 4D), which suggests that one of the *socY* mutations is recognized by the Hex system and is therefore possibly a transition or a short frameshift. Alternatively, the recombination event leading to the putative chromosomal rearrangement may involve the formation of a heteroduplex intermediate harbouring mismatches susceptible to the Hex system.

Effect of *codY* inactivation on spontaneous competence development

To characterize the role of *S. pneumoniae* CodY with respect to growth and the regulation of competence, we first tried to deplete CodY making use of a *codY*^{spc^{3A}} strain, i.e. a strain in which the only functional copy of *codY* was under the control of the P_M promoter. In the light of the failure to obtain a biologically significant depletion of CodY (supplementary results in *Supporting information*

and Fig. S1), we chose to characterize a *codY socY* strain with respect to spontaneous competence development and growth. Competence was monitored throughout incubation at 37°C by using a transcriptional fusion of the *luc* gene, which encodes luciferase, to the *ssbB* gene. The latter is known to be specifically induced at competence. The *ssbB::luc* fusion thus reports on competence through light emission by luciferase (Prudhomme and Claverys, 2007). We introduced the *ssbB::luc* transcriptional fusion (using R895 chromosomal DNA as donor) in strains D39Δ*cps* and D39Δ*cps*Δ*codY socY* thus generating strains TD82 and TD83 respectively (Table 1). We then compared competence profiles of strains TD82 and TD83 during growth in C+Y medium with initial pH values between 6.48 and 7.26, since spontaneous competence induction is known to be strongly dependent on the initial pH. For instance, initial pH values between 6.8 and 8.0 affected the timing of occurrence and the level of competence (Chen and Morrison, 1987). While the wild-type parent developed spontaneous competence only in cultures with initial pH values above 7.0 (Fig. 5A and B), the *codY* mutant could develop competence under acidic conditions, down to an initial pH value of 6.70 (Fig. 5C and D). It is of note that despite the presence of the *socY* suppressor, *codY* mutant cells grew more slowly than wild-type cells in C+Y medium (Fig. 5A–D). *codY* mutant cells thus entered the stationary phase of growth after ~270 min incubation compared with ~170 min for wild-type cells. This > 50% increase in generation time might indicate that CodY plays an important role in the regulation of pneumococcal growth. Despite the fact that *codY* mutant cells grew more slowly than wild type, they developed competence at about the same time (e.g. maximum competence after 87 versus 82 min incubation at pH 7.26; Fig. 5A and C), which corresponded to OD₄₉₂ values of 0.083 and 0.115 respectively. This observation was also consistent with upregulation of competence in the *codY* mutant. The strong competence-upregulated (*cup*) phenotype (Martin *et al.*, 2000) displayed by *codY* mutant cells would be consistent with the hypothesis that CodY normally represses competence under acidic conditions in wild-type cells. However, the uncharacterized suppressor mutations (*socY*) in strain TD83 could also be responsible for the observed *cup* phenotype. This prompted us to investigate the phenotype of *socY* (*codY*⁺) cells.

Impact of *socY* on spontaneous competence development

First, to establish whether restoration of *codY*⁺ would be tolerated in a *socY* genetic background, strain TD83 was transformed with R2644 chromosomal DNA. R2644 carries the *spc*^{90C} insertion immediately upstream of the *codY*⁺ gene (see *Experimental procedures*). Integration of

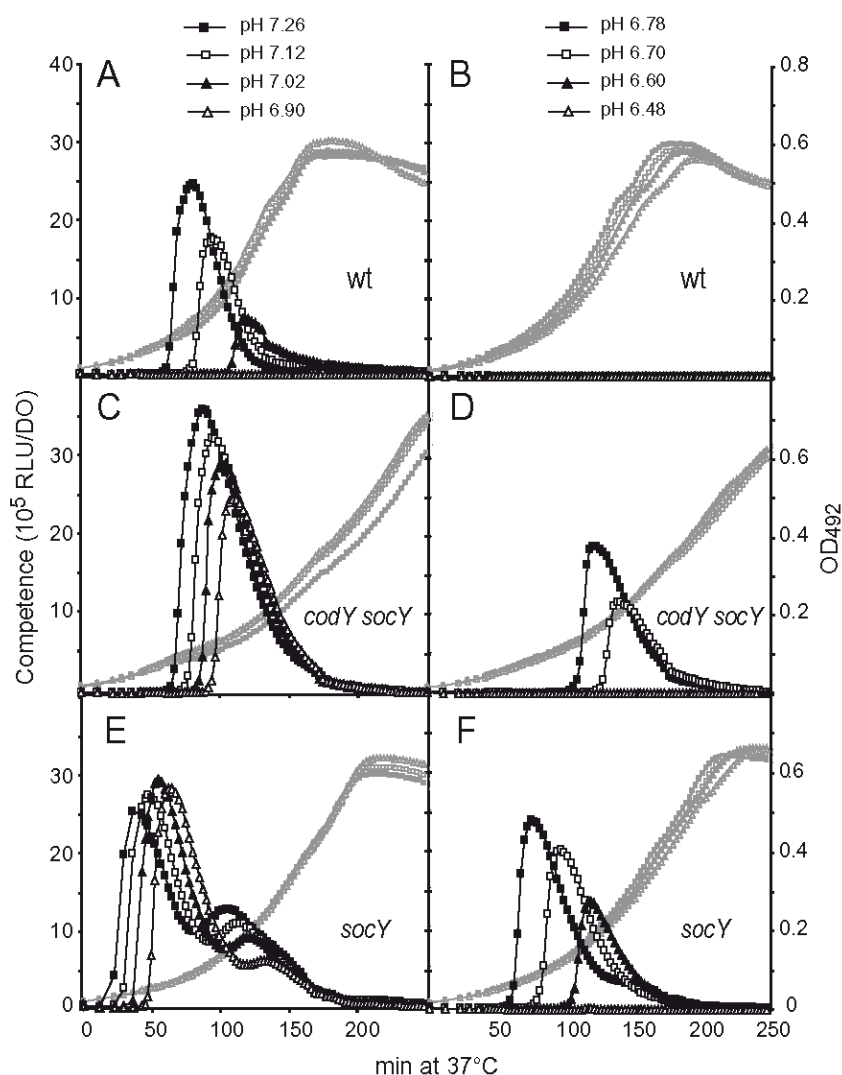


Fig. 5. Effect of *codY* inactivation and of *socY* on spontaneous competence development. Pre-cultures prepared as described in *Experimental procedures* were inoculated (1/50th dilution) in C+Y medium (containing 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ glutamine) and competence (black symbols and curves) and OD (grey symbols and curves) values were recorded throughout incubation at 37°C. Values correspond to individual cultures representative of three independent experiments. Strains used: *codY*⁺ TD82 (A and B); *codY socY* mutant TD83 (C and D); *socY* mutant TD96 (E and F).

the *spc*^R cassette by transformation could thus be accompanied by the removal of the adjacent *codY::trim* cassette. A failure to survive of Trim^S (i.e. *codY*⁺) excisants should result in a drastic reduction in the number of Spc^R transformants, since recombination events leading to *spc* integration without the simultaneous deletion of *trim* are rare due to the reduced distance between the two cassettes (105 bp). The high Spc^R to Str^R transformant ratio observed (average value 0.32 ± 0.06) was consistent with the simultaneous occurrence of both integration (of the *spc* cassette) and excision (of the *trim* cassette) events, and suggested that *socY* (*codY*⁺) cells are viable. To establish this, four of four randomly chosen Spc^R transformants were first checked to be Trim^S. Then, they were shown to readily re-accept *codY::trim* when transformed with TD80 chromosomal DNA (Trim^F/Str^R average ratio of 0.25 ± 0.08 over 15 independent cultures). These data confirmed that the Spc^R Trim^S transformants were still *socY* and indicated that none of the two suppressor muta-

tions or the putative chromosomal rearrangement is detrimental to pneumococcal cells when CodY is present. One of the Spc^R Trim^S clones was retained and named strain TD95. The *spc*^{90C} cassette was then removed from strain TD95 by transformation with a PCR fragment generated on R800 chromosomal DNA with the MP188–MP189 primer pair, followed by phenotypic expression and segregation in liquid culture (C+Y medium) for 4.5 h, and plating on CAT agar without antibiotic. Individual colony screening was carried out to isolate an Spc^S clone, TD96. Upon transformation of TD96 with TD80 chromosomal DNA, a Trim^F/Str^R ratio of 0.42 ± 0.07 was observed indicating that TD96 had remained *socY*.

The competence profile of TD96 during growth in C+Y medium with initial pH values between 6.48 and 7.26 was compared with that of TD82 (wild type) and TD83 (*codY::trim socY*). TD96 *socY* (*codY*⁺) cells grew more rapidly than parental *codY::trim socY* cells, but still more slowly than wild type (entry into stationary phase after ~210 min

versus ~170 min; Fig. 5E and F). Interestingly, *socY* cells displayed a stronger *cup* phenotype than *codY socY* cells as judged first from their ability to develop spontaneous competence at pH 6.60 (Fig. 5F) and second, from the very early development of competence (36 min at pH 7.26) compared with both wild-type and *codY socY* cells (Fig. 5). Thus, the *socY* mutations alone confer a strong *cup* phenotype. The net effect of *codY* inactivation in this background is to attenuate this *cup* phenotype. From these data, it is therefore difficult to conclude that CodY acts as a repressor of competence in pneumococcal cells.

Whole-genome sequence comparison suggests *fatC* and *amiC* mutations suppress inviability of *codY* mutants

In an attempt to identify the *socY* (suppressor) mutations, whole-genome resequencing of strains D39 and D39 Δ *codY* was performed (*Experimental procedures*). Compared with the previously published D39 NCTC 7466 genome (Lanie *et al.*, 2007), the D39 Δ *codY* strain had 14 mutations also found in its parent. As our D39 was obtained originally from NCTC (via T. Mitchell), these mutations presumably have arisen during laboratory cultivation. None of them appeared to alter an important function (Table S1), which is consistent with the fact that this D39 strain displayed full virulence in a mouse model (Hendriksen *et al.*, 2008).

The *codY* mutant had also mutations flanking the *trim* cassette [a C→T transition, a GT→AGC frameshift and a T→A transversion, respectively, at positions -175, +681/682 and +724 (positions are given with respect to the ATG of *codY*)]. The two point mutations occurred in between the *trim* cassette and the oligonucleotide primers used to amplify the *codY* region (Hendriksen *et al.*, 2008), and were presumably introduced during polymerase chain reaction. The transition mutation is in itself sufficient to lower the frequency of integration of the *codY::trim* cassette by approximately fivefold during transformation of mismatch-repair-proficient strains.

Most relevant with respect to the question of CodY essentiality, the *codY* mutant had, in addition, a mutation in *fatC* and a second, variable mutation in *amiC* (Fig. 6A). The former mutation (a C→T transition), *fatC*^{C496T} changed a CAA (Gln) codon into TAA (stop) in a gene belonging to the *fatD-fatC-fecE-fatB* operon (*spd_1649-1652* in D39; *spr1684-1687* in R6; *sp1869-1872* in TIGR4) (Fig. 6A, top). This operon [also called *piuBCDA* or *pit1* (Brown *et al.*, 2002)] encodes the major ferric iron/haem [*fatB* has been shown to bind haemin (Tai *et al.*, 2003)] transporter of *S. pneumoniae* (Ulijasz *et al.*, 2004). The *fatC*^{C496T} change is predicted to result in the synthesis of a truncated FatC protein (165 instead of 318 aa) and was detected in 100% of forward and reverse reads. As

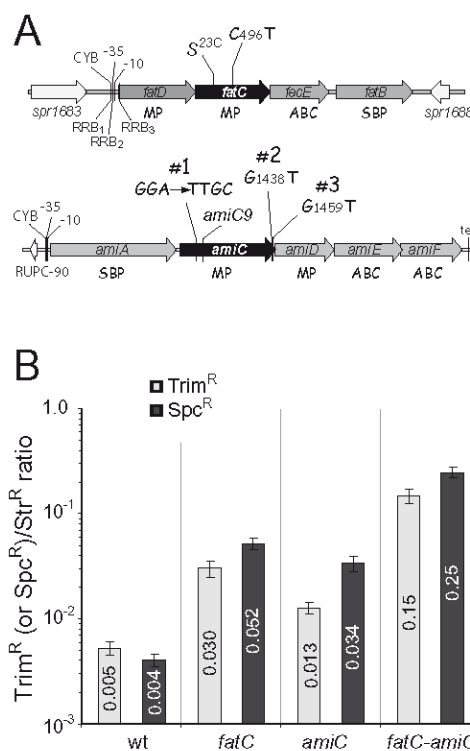


Fig. 6. Inactivation of *ami* and *fat* results in tolerance of *codY* inactivation.

A. Distribution of *fatC* and *amiC* mutations identified in strain D39 Δ *codY* by whole-genome sequence comparison. Positions are given with respect to the first nucleotide of *fatC* (top) and *amiC* (bottom), respectively, taken as +1. The location of the *fatC::spc*^{230C} mariner insertion and *amiC9* mutation used in (B) is also indicated. CYB, CodY binding sites identified in the promoter region of the *fat-fec* and *ami* operons (Hendriksen *et al.*, 2008); -35 and -10 promoter boxes; RRB1-3, Ritt binding sites identified in front of the *fatD* (also called *piuB*) gene (Ulijasz *et al.*, 2004). ABC, ATP-binding cassette protein; MP, membrane protein; SBP, substrate-binding protein.

B. The *fatC amiC* combination allows tolerance of *codY* inactivation. Chromosomal DNA of strain TD80 (*codY::trim str41*) and TD81 (*codY::spc*^{3A} *str41*) was used as donor and Str^R as well as, respectively, Trim^R and Spc^R transformants were scored. Strains used: wt, R246; *fatC::cat*^{230C} mutant, R3002; *amiC9* mutant, R3003; *amiC9-fatC::cat*^{230C} double mutant, R3004.

concerns the base variations in *amiC*, which encodes a 598 aa protein and belongs to the *amiACDEF* operon (*spd_1671-1667* in D39; *spr1707-1703* in R6; *sp1891-1887* in TIGR4), three types of mutations were observed: two single-base changes (#2 and #3 in Fig. 6A, bottom) and a more complex mutation (#1 in Fig. 6A, bottom). These variations were detected in only a fraction of sequence runs. Mutations #2 (*amiC*^{G1438T}) and #3 (*amiC*^{G1459T}) change a GAC (Asp) codon into TAC (Tyr) (aa 480 and 487 respectively); these mutations were detected in 30.8% of forward and 11.1% of reverse reads (total with variation: 19%), and in 57.1% of forward and 40.9% of reverse reads (total with variation: 47%) respectively. Interestingly, both changes affect an Asp aa

conserved in the entire family of Opp (oligopeptide), Dpp (dipeptide) and App (nickel) permeases (our observations), which suggests that they are functionally important and that the corresponding AmiC proteins may have lost their activity. The complex mutation #1 consisted of a G→TT frameshift (*amiC*^{G246TT}) and the almost adjacent A→C change (*amiC*^{A248C}); both mutations shared the same sequencing parameters (detection in 25.0% of forward and 33.3% of reverse reads), which strongly suggests that they resulted from a single mutational event (total with variation, 29%). This mutation could thus be described as a GGA→TTGC change. [In fact, this change had already been observed during analysis of mismatch repair specificity in *S. pneumoniae* and referred to as *amiA29* (at this time, the *ami* locus was thought to be a single gene, hence the name *amiA*) (Gasc *et al.*, 1989) (for a molecular explanation of this mutational event, see Fig. S2).] This complex mutation is predicted to result in the synthesis of a truncated protein harbouring the first 81 aa of AmiC fused to 13 'new' aa (resulting from the frameshift).

At first sight, the presence of changes #1, #2 and #3 in only a fraction of sequence runs appeared puzzling and suggested their late occurrence in an original $\Delta codY$ *fatC*^{C496T} clone. As a first attempt to establish whether an *ami* mutation was required for tolerance of *codY*, we analysed the *ami* locus of D39 $\Delta cps\Delta codY$, considering it a subclone of the original D39 $\Delta codY$ strain since it was generated by transformation of this strain with a PCR fragment harbouring the $\Delta cps::kan$ cassette. Taking advantage of the fact that *amiC-F* mutations normally confer resistance to methotrexate (Mtx^R), transformation of an Mtx^S strain (R1501) with a series of PCR fragments covering the *ami* region of strain D39 $\Delta cps\Delta codY$ was used to localize any *ami* mutation (Fig. S3). Transformation data were consistent with the presence of mutation #2 or #3 in strain D39 $\Delta cps\Delta codY$; DNA sequencing confirmed that this strain had inherited the latter mutation (*amiC*^{G1459T}). These data prompted us to directly confirm the mixed structure population with respect to *amiC* of the original D39 $\Delta codY$ strain. An aliquot of the original stock was plated, 16 individual clones were picked and *amiC* (and *fatC*) regions were sequenced (Table S2). All clones turned out to harbour one of the three *amiC* mutations identified during whole-genome sequencing (and 11 out of 11 clones sequenced carried the *fatC* mutation). Interestingly, the overall distribution between the three types was in very good agreement with that inferred from the analysis of genome sequence data (Table S2). It is also of note that three clones harboured change #1 (i.e. both *amiC*^{G246TT} and *amiC*^{A248C}), which provided support to the view that a single molecular event accounts for a complex change (Fig. S2). Altogether, these results strongly suggested that inactivation of *amiC* was required for toler-

ance of *codY* inactivation. We tentatively concluded from these observations that the combination of *fatC* and *amiC* mutations suppresses inviability of *codY* mutants.

The fatC amiC combination allows tolerance of codY inactivation

To confirm this conclusion, we generated *mariner* insertion mutants in *fatC* (Fig. S4). Then, taking advantage of the availability of the well-characterized *amiC9* mutation (*amiC*^{C355T}) [previously named *amiA9* (Gasc *et al.*, 1989)] which changes a CAA codon (Gln) into a TAA (stop) codon leading to the synthesis of a truncated AmiC protein (118 aa), we investigated the ability of recipient cells harbouring the *fatC::cat*^{23C} cassette and/or the *amiC9* mutation (Fig. 6A) to accept *codY* inactivation.

Strain (R246) and its *amiC9* (R3003), *fatC::cat*^{23C} (R3002) and *amiC9 fatC::cat*^{23C} (R3004) derivatives were used as recipients for the *codY::trim* or *codY::spc* cassettes, respectively, carried on TD80 and TD81 chromosomal DNA. These recipients contained a *hexA*⁻ mutation, which impairs mismatch repair, first to ensure similar integration frequency of the cassettes since transfer of the *trim* cassette is otherwise predicted to be reduced by the Hex system due to the presence of flanking mismatches (see above); second to equalize transformation frequencies of *amiC*^{G1459T} and *fatC*^{C496T} point mutations.

The *amiC fatC* double mutant derivative readily accepted the *codY* (*spc* or *trim*) cassette with the expected frequency relative to the reference marker *str41* (~0.20), while introduction of the cassette into its wild-type parent occurred with a ~45-fold reduced frequency (Fig. 6B). As expected, *amiC* and *fatC* single mutants displayed a ~5- to 10-fold reduction in transformation frequency of the *codY* cassette compared with *amiC fatC* cells. The latter reduction reflected the need for co-transformation of the *fatC::cat*^{23C} and *amiC9* mutation, respectively, while co-transformation of both *amiC* and *fatC* together with the *codY* cassette was required in wild-type cells. Altogether, these results demonstrated that the *amiC fatC* combination fully suppressed the inviability of *codY* mutant cells.

Growth and spontaneous competence development of wild type (TD82) and *amiC9* (TD84), *fatC::cat*^{23C} (TD138), *amiC9 fatC::cat*^{23C} (TD135) and *amiC9 fatC::cat*^{23C codY::trim} (TD154) mutant strains were then compared (Fig. S5). Both *fatC* and *amiC* mutant strains displayed a *cup* phenotype, consistent in the latter case with the phenotype of *obl* mutants (Alloing *et al.*, 1998). The *cup* phenotype of the double mutant was most similar to that observed with the *amiC* mutant (Fig. S5) and with the *socY* strain (Fig. 5E and F). Finally, while *codY* inactivation resulted in slower growth confirming the observation

in Fig. 5, it did not significantly attenuate the *cup* phenotype observed with the *amiC fatC* double mutant (compare TD135 and TD154, Fig. S5).

Discussion

CodY is a pleiotropic regulator in low-G+C Gram-positive bacteria involved in the control of different processes like aa uptake, competence, sporulation and virulence. We first established that *codY* is an essential gene in the D39 strain of *S. pneumoniae* and in several of its laboratory derivatives by using different genetic approaches (*mariner* mutagenesis, complementation, transfer of mutations in different genetic backgrounds; Figs 1–3). We then showed that a previously obtained *codY* mutant (D39 Δ *codY*) used to identify the CodY regulon (Hendriksen *et al.*, 2008) contains additional suppressor mutations, called *socY*, one of which was concluded to correspond to a transition mismatch or a frameshift (Fig. 4). We also showed that both the *codY socY* and *socY* strains displayed a competence upregulated or *cup* phenotype (Fig. 5).

Whole-genome sequencing of strains D39 and D39 Δ *codY* undertaken to identify the *socY* suppressors revealed the presence of mutations in *fatC* and *amiC*, which encode the membrane permease component of ferric iron/haem and oligopeptide ABC transporters respectively (Fig. 6A). This combination of mutations was unambiguously demonstrated to be required to allow tolerance of *codY* inactivation (Fig. 6B). These results fully confirm the conclusions from *codY*⁻ transfer experiments, including the presence of a mutation susceptible to mismatch repair (Fig. 4D), i.e. the *fatC*^{C496T} transition.

Proposed scenario for the initial stabilization/survival of D39 Δ *codY* cells

Genome sequence clearly indicated that the *fatC* mutation arose first. However, genome sequence data also strongly suggested that inactivation of *amiC* is absolutely required for tolerance of *codY* inactivation. The finding that three different *amiC* mutations occurred in the D39 Δ *codY* strain, as confirmed by individual subclone analysis (Table S2), implied a strong selection pressure (growth advantage) for *amiC* mutant derivatives. The *amiC* mutations presumably arose independently in an otherwise *codY fatC* lineage.

It is of note that the D39 Δ *codY* strain described in Hendriksen *et al.* (2008) was obtained by backcrossing D39 using chromosomal DNA isolated from an initial D39 Δ *codY::trim* transformant. Despite this careful strategy, D39 Δ *codY::trim* turned out to contain two additional mutations, as shown in this study. While a second round

of transformation normally eliminates unlinked mutations, it is obviously unable to do so when the unlinked mutations are absolutely required for survival. In addition, we noticed that the two suppressor mutations are not very distant. The two closest mutations (*fatC*^{C496T} and *amiC*^{G1459T}), located 17 987 nt apart, could frequently be carried by the same DNA fragment. Careful comparison of transformation frequencies with a well-characterized reference marker (preferably present on the same chromosomal DNA) is thus the only way to establish unambiguously that any construct is well tolerated and does not affect cell viability.

CodY, socY and competence

It was implicit in our working hypothesis connecting competence regulation to oligopeptide uptake via a global regulator (like CodY) sensing aa pools (see *Introduction*) that this regulator would act as a repressor of competence (Claverys *et al.*, 2000). Our data rather suggest that, in contrast to this expectation, inactivation of *codY* has no major effect on spontaneous competence, most of the effects seen being attributable to the *socY* mutations (Figs 5 and S5). In fact, the *amiC* mutation is in itself sufficient to account for the strong derepression of competence development observed in D39 Δ *codY* cells (Fig. S5). It is of note that despite the *cup* phenotype documented in this study for the D39 Δ *cps* Δ *codY* strain (Fig. 5), previous transcriptome analysis did not reveal induction of any *com* gene (Hendriksen *et al.*, 2008); presumably, culture conditions used for mRNA extraction did not lead to differential induction of the *com* regulon between the *codY* mutant and its parent, competence being either similarly induced or repressed for both strains. While normal Ami functioning somehow leads to competence repression, CodY either is neutral (Fig. S5) or possibly acts as an activator of competence, the latter conclusion being suggested by the attenuation of the *cup* phenotype of *amiC fatC* cells upon introduction of the *codY* knock-out (Fig. 5). If confirmed, the role of *S. pneumoniae* CodY with respect to competence regulation would thus differ from that of its *B. subtilis* orthologue, which represses competence (Serror and Sonenshein, 1996), suggesting that the impact of nutrient deprivation on competence induction is opposite in *B. subtilis* and *S. pneumoniae* or at least that nutritional signals are conveyed in a very different way in these two species. However, since the impact of *codY* inactivation on competence could so far be evaluated only in complex genetic backgrounds (i.e. mutant for both *amiC* and *fatC*), further work using different approaches, such as a transient depletion of CodY, would be necessary to evaluate the exact role of CodY in the regulation of pneumococcal competence.

CodY, socY and previous transcriptome studies

The finding that the D39 Δ *codY* strain used in a previous study (Hendriksen *et al.*, 2008) was in fact a *codY amiC fatC* triple mutant raises the question of the respective contribution of each mutation to the phenotypes previously attributed solely to the inactivation of *codY*. As concerns transcriptome data, upregulation of *aliA* (*aliB* was also upregulated but only 1.8-fold), *amiA-amiC-amiD* and *fatD-fatC-fecE-fatB* was reported in Δ *codY* (Hendriksen *et al.*, 2008). Binding of CodY to P_{*amiA*} (as well as to P_{*aliB*}) was consistent with a direct regulation of oligopeptide uptake by CodY. CodY thus exhibited a strong affinity for P_{*amiA*} although the effect of BCAA addition was limited (1.56-fold versus 2- to 20-fold enhancement for other promoters). On the other hand, the *K_ds* (the CodY concentration at which 50% of the fragment is shifted) for the P_{*fatD*} promoter was higher than the highest concentration tested (2000 nM) indicative of a rather weak affinity and was unaffected by addition of BCAAs, contrary to most other CodY-regulated promoters (Hendriksen *et al.*, 2008). Possibly, the binding of CodY to P_{*fatD*} is affected in the presence of other regulators (see below), as *fat* regulation is clearly multifactorial (Ulijasz *et al.*, 2009). Alternatively, since Δ *codY* cells used to prepare mRNA for transcriptome analysis were also mutant for *fatC* (i.e. they lacked the main iron transporter of *S. pneumoniae*), the upregulation of the *fatD-fatC-fecE-fatB* operon could be a reflection of (inefficient) attempts at iron homeostasis by increasing expression of this transporter rather than the consequence of a lack of repression in the absence of CodY. The same reasoning may apply to *dpr* gene expression. This gene (*spd_1402* in D39; *spr1430* in R6; *sp1572* in TIGR4) encodes a conserved iron storage-peroxide resistance protein (Ulijasz *et al.*, 2004) that is possibly essential (Pericone *et al.*, 2003). It was found to be downregulated in the *codY* mutant (Hendriksen *et al.*, 2008). Depletion of iron in *codY* mutant cells resulting from *fatC* inactivation could possibly account for the observed reduction in *dpr* expression without implying any direct regulation by CodY. This would be consistent with the failure to identify a sequence resembling the CodY box upstream of the *dpr* gene. Clearly, additional work is necessary to establish whether CodY regulates *dpr* expression directly or indirectly.

CodY, socY and previous virulence studies

Similarly, the presence of *amiC* and *fatC* mutations in the D39 Δ *codY* strain used in a previous study (Hendriksen *et al.*, 2008) raises the question of their respective contribution to the virulence phenotypes previously attributed solely to *codY* inactivation. The importance of iron for bacterial growth and virulence is well established. Thus,

signature-tagged mutagenesis (STM) screens for genes essential during pneumococcal pneumonia identified insertions in genes belonging to each of the three iron transporters characterized in *S. pneumoniae* (Brown *et al.*, 2001; 2002), *piuB* (i.e. *fatD*), *pitB* (*pitADBC* operon) and *piaA* (*piaBCD* operon) (Hava and Camilli, 2002). These iron uptake systems have been demonstrated to be important for full pneumococcal virulence, especially upon simultaneous mutation of two operons (Brown *et al.*, 2001; 2002). Single mutation of *piuB* resulted in only a mild reduction of virulence in a pneumonia model, while no attenuated phenotype was observed in systemic infection (Brown *et al.*, 2001).

Several studies have indicated a role for the Ami-AliA/AliB permease, encoded by the *amiACDEF* operon and the *aliA* and *aliB* genes, in pneumococcal virulence. Mutants in *amiA* and *amiC* displayed diminished adherence to pulmonary epithelial cells *in vitro* (Cundell *et al.*, 1995), and *aliB* and *amiACD* were identified in STM screens of pneumococcal pneumonia in a serotype 3 and 4 background respectively (Lau *et al.*, 2001; Hava and Camilli, 2002). Furthermore, using a collection of *aliA*, *aliB* and *amiA* single or triple mutants, the Ami-AliA/AliB permease was shown to be required for successful nasopharyngeal colonization, but not for pneumococcal pneumonia, with the most pronounced phenotype for the triple and the *aliA* and *amiA* single mutants (Kerr *et al.*, 2004).

Inactivation of *codY* was previously reported to result in reduced adherence to nasopharyngeal cells and reduced colonization in a mouse model of pneumococcal infection (Hendriksen *et al.*, 2008). However, no significant differences in bacterial loads between wild type and the *codY* mutant were observed in pneumonia and bacteraemia models of infection. In light of the above, we consider it unlikely that the truncation of *fatC* contributed to the virulence phenotype associated with *codY* inactivation. On the other hand, mutation of *amiC* may, at least partially, have been responsible for the observed attenuation during colonization, but further experiments are needed to exactly determine the impact of the *amiC* mutation on the virulence phenotype of the *codY* mutant.

Why is CodY essential in S. pneumoniae?

The finding that CodY is essential suggests that this regulator controls genes/functions that are crucial for *S. pneumoniae*. The demonstration that mutations in *fatC* and *amiC* fully restore viability of *codY* mutant cells may provide some clue as to these functions. As the genome sequence analysis of D39 Δ *codY* strongly suggested that the *fatC* mutation arose first during establishment of the *codY* mutant construct, it is tempting to speculate about a possible toxicity of iron in cells lacking CodY. If CodY is a

repressor of the *fatD-fatC-fecE-fatB* operon as previously concluded (Hendriksen *et al.*, 2008), derepression of iron uptake in its absence may lead to accumulation of toxic concentrations of iron within the cell, thus creating a strong selection pressure for the emergence of *fat* mutants. In this context, what could account for the concomitant accumulation of *amiC* mutations? Considering only *Ami* and *CodY*, it could be speculated that *codY* inactivation leading to derepression of the many transporters of aa controlled by *CodY* and of *Ami* results in lethal imbalance of amino acid pools. However, this explanation is not readily connected to the co-occurrence of *fatC* inactivation. In search of a possible direct connection, we came across the observation that the housekeeping dipeptide permease of *Escherichia coli* allows universal utilization of haem as an iron source (Létoffé *et al.*, 2006). Haem utilization has thus been shown to require a permease made up of DppBCDF (dipeptide inner membrane transporter) as the ABC transporter and either MppA (periplasmic L-alanyl- γ -D-glutamyl-meso-diaminopimelate-binding protein) or DppA (periplasmic dipeptide-binding protein) as the substrate-binding protein. As *S. pneumoniae* is devoid of a Dpp system, it is tempting to speculate that the *Ami-Obl* oligopeptide transporter homologous to Dpp could allow haem utilization as an iron source. The simultaneous involvement of *CodY* in *ami-obl* and *fat-fec* repression, and in *dpr* activation would, upon *codY* inactivation, generate a severe oxidative stress because of the simultaneous derepression of iron uptake via two transporters and depletion of the iron storage-peroxide resistance Dpr protein (Fig. 7), hence the observed accumulation of *fat* and *ami* mutations in the $\Delta codY$ background. It may not be a mere coincidence that the *ami* and *fat* mutations which restore viability of *codY* mutant cells lead to competence (X-state) derepression (Figs 5 and S5). Since X-state is considered a pneumococcal substitute for SOS (Claverys *et al.*, 2006; Prudhomme *et al.*, 2006), its induction may counteract oxidative stress in *codY* mutant cells. Further investigation should reveal whether induction of the X-state is required for tolerance of *codY* inactivation.

Transcriptome analysis revealed a striking parallel between *CodY* and *RitR*, an orphan two-component signal transduction response regulator. Increased transcription of *piuB* and *piuA* (i.e. *fatD* and *fatB*), as well as of *amiC* and decreased expression of *dpr* were reported in *ritR* mutant cells (Ulijasz *et al.*, 2004) suggesting that *CodY* and *RitR* share these targets (Fig. 7). *RitR* was shown to bind three sites (RRB1–3; Fig. 6A) in the promoter region of the *fat* operon (Ulijasz *et al.*, 2004). Recently, regulation of *RitR* binding at the *fat* promoter by a Ser–Thr kinase-phosphatase, *StkP*–*PhpP*, was documented (Ulijasz *et al.*, 2009). While *RitR* and *PhpP* jointly participate in complex formation at the *fat* promoter *in*

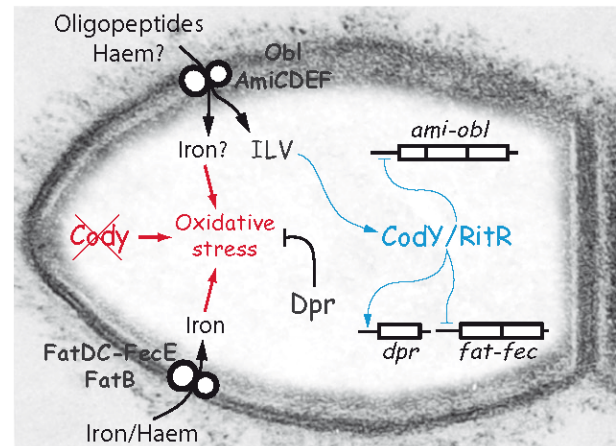


Fig. 7. Iron toxicity may account for inviability of *codY* mutant cells in *S. pneumoniae*. *CodY* and *RitR* share regulatory targets: *CodY* is a repressor of *ami*, *obl* and *fat-fec*, but activates *dpr*, which encodes an iron-storage peroxide resistance protein (Hendriksen *et al.*, 2008); *RitR* directly represses *fatD* (or *piuB*) and inactivation of *ritR* derepresses *amiC* while reducing *dpr* expression (Ulijasz *et al.*, 2004). We propose that inactivation of *codY* is not tolerated because it results in simultaneous derepression of iron uptake via *Fat-Fec* and possibly of haem utilization via *Ami* (see *Discussion*), as well as depletion of *Dpr*, which is required to protect cells from iron toxicity. ILV, isoleucine–leucine–valine (*CodY* activating branched-chain amino acids).

vitro, addition of *StkP* was shown to disrupt the complexes (Ulijasz *et al.*, 2009). This finding was consistent with DNA microarray analyses of transcripts from an *stkP* knock-out showing dependence of *fat* expression on *StkP* (Saskova *et al.*, 2007). The overlap between the *CodY* box (AAT-TGTCAGAAATT located three nucleotides upstream of the –35 promoter box) and the first *RitR* box (Fig. 6A) suggests that *CodY* may also interfere with *RitR* binding and adds a degree to the complexity of *fat* regulation. *CodY* may thus represent one of the additional *fat* regulators, the existence of which was proposed to account for the failure to detect the opposite effects predicted for the individual deletion of *phpP* and *stkP* (Ulijasz *et al.*, 2009). In line with the oxidative stress hypothesis (Fig. 7), *ritR* mutant cells were shown to display greatly increased susceptibility to streptonigrin, which requires the presence of intracellular iron, as well as to hydrogen peroxide (Ulijasz *et al.*, 2004). Iron overload due to derepression of *fat* could be responsible for the latter by increasing intracellular free iron concentration and therefore the potential for synthesis of reactive oxygen intermediates. If both *CodY* and *RitR* are important for iron homeostasis and the reason for *CodY* essentiality is to prevent oxidative stress, what about the viability of *ritR* mutant cells? As there was no mention of difficulty in generating and/or growing *ritR* mutants, *CodY* might be more important for *ami*, *fat* and *dpr* regulation than *RitR*. Alternatively, *RitR* and *CodY* could be equally important and the problematic viability of

ritR mutant cells has been overlooked. It would therefore be interesting to check whether a previously constructed *ritR* mutant is readily transferred by transformation.

Concluding remarks

Further work with other clinical isolates of *S. pneumoniae* is necessary to establish whether the essentiality of CodY is a general feature of this species. To the best of our knowledge, this is the first report in any bacterium that a member of the CodY family is essential. Is this situation unique to *S. pneumoniae*? It would be interesting to investigate whether CodY is essential in species closely related to *S. pneumoniae* and in streptococci in general. It is possible that CodY is also essential in other species but that the presence of suppressor mutation(s) has been overlooked. Our observations may thus prompt careful re-examination of the viability of the *codY* mutants previously constructed in other species. More generally, the above described tests of acceptance frequencies by transformation should be used routinely when working with 'important' genes, to prevent the presence of suppressors going undetected in the future. In any case, because of its essentiality in a major human pathogen, CodY constitutes a potentially interesting new therapeutic target.

Experimental procedures

Bacterial strains, culture and transformation conditions

Streptococcus pneumoniae strains and plasmids used in this study are described in Table 1. Stock cultures were routinely grown at 37°C in Todd-Hewitt plus yeast extract (THY) medium to OD₅₅₀ = 0.3; after addition of 15% glycerol, stocks were kept frozen at -70°C. To investigate spontaneous competence development, cells were gently thawed and aliquots were inoculated (1 into 25) in C+Y. The initial pH value was adjusted to 7.0 and trypsin (2 µg ml⁻¹) was added to prevent spontaneous competence induction in the pre-culture. After incubation at 37°C to OD₅₅₀ = 0.2, cultures were centrifuged and cells were concentrated to OD₅₅₀ of 0.4 in fresh medium containing 15% glycerol and kept frozen at -70°C. For the monitoring of growth and spontaneous competence development, these pre-cultures were gently thawed and aliquots were inoculated (1 into 50, unless otherwise indicated) in luciferin-containing C+Y medium and distributed into a 96-well microplate (300 µl per well). Measurement of competence involved the use of an *ssbB::luc* transcriptional fusion which reports on competence through light emission by luciferase (Prudhomme and Claverys, 2007). RLU (relative luminescence unit) and OD values were recorded throughout incubation at 37°C (in a Varioskan Flash luminometer; Thermo Electron Corporation).

CSP-induced transformation was performed as described previously (Martin *et al.*, 2000), using precompetent cells treated at 37°C for 10 min with synthetic CSP1

(100 ng ml⁻¹). After addition of transforming DNA, cells were incubated for 20 min at 30°C. Transformants were selected by plating on CAT agar supplemented with 4% horse blood, followed by challenge with a 10 ml overlay containing chloramphenicol (4.5 µg ml⁻¹), erythromycin (0.05 µg ml⁻¹), kanamycin (250 µg ml⁻¹), methotrexate (2.2 µg ml⁻¹), spectinomycin (100 µg ml⁻¹), streptomycin (200 µg ml⁻¹) or trimethoprim (20 µg ml⁻¹), after phenotypic expression for 120 min at 37°C.

Mutagenesis and duplication of *codY*

Insertions of *kan* (Kan^R) or *spc* (Spc^R) minitransposons were generated by *in vitro mariner* mutagenesis as described (Prudhomme *et al.*, 2007). Plasmids used as a source for the minitransposons were pR410 and pR412 respectively (Table 1). Briefly, plasmid DNA (-1 µg) was incubated with a target PCR fragment (indicated in the legend of Fig. 1) in the presence of purified *Himar1* transposase, leading to random insertion of the minitransposon within the fragment. Gaps in transposition products were repaired as described (Prudhomme *et al.*, 2007) and the resulting *in vitro* generated transposon insertion library was used to transform *S. pneumoniae*. Location and orientation of minitransposon insertions were determined as previously described (Prudhomme *et al.*, 2007) through PCR reactions using primers MP127 or MP128 in combination with either one of the primers used to generate *codY* PCR fragments (Table 1). Cassette-chromosome junctions were sequenced for some insertions as indicated in the legend of Fig. 1.

Placement of a second copy of *codY* under the control of the maltose-inducible P_M promoter at CEP was achieved by cloning into NcoI-BamHI-digested pCEP2 plasmid DNA a *codY* PCR fragment generated using the *codYatg-codYstop* primer pair (Table 1) and digested with BamHI and NdeI. The resulting recombinant plasmid pCEP-codY was used as donor in transformation of strain R1501 followed by selection for a Kan^R transformant, thus generating strain R2349 (Table 1). Plasmid pCEP2 was generated in this study as a high-copy-number derivative of plasmid pCEP (Guiral *et al.*, 2006). Briefly, an EcoRI-PstI fragment from pCEP was ligated to EcoRI-PstI-digested pKL147 (Table 1) to replace the pSC101 replication machinery of pCEP by the pBR replication machinery and Ap^R resistance gene of pKL147.

Reversion of *codY* knock-out by transformation

To replace *codY::trim* or *codY::spc* insertions by *codY*⁺, we took advantage of the *kan*^{90C} *mariner* insertion. This insertion is located immediately upstream the CodY binding site (CYB) in the *codY* promoter region (Fig. 1A) and does not inactivate *codY*; we used it as a marker to select for the re-introduction of the *codY*⁺ gene by co-transformation with Kan^R.

To allow the use of a similar strategy for replacement of *codY::trim* in *kan*^R strains (such as TD83), the *kan*^{90C} cassette was exchanged with the *spc*^R cassette by transformation of strain R2641 with plasmid pR412 DNA, selecting for Spc^R transformants to generate strain R2644 (genotype referred to as *spc*^{90C::codY}⁺; Table 1). The exchange is based on the presence of DNA homology at the borders of the synthetic

spc and *kan* minitransposons, allowing exchange of the resistance cassette genes by homologous recombination during transformation.

Whole-genome sequencing of D39 and D39 Δ *codY*

Roche 454 FLX whole-genome sequencing was performed by Agowa Genomics (Berlin, Germany) using genomic DNA isolated from mid-log cultures by the Genomic DNA kit (Qiagen). For each strain, a shotgun library and a 3 kb span paired end library were generated according to Roche standard protocols, mixed in equal parts (about 400 000 beads from each library) and sequenced using default settings on a one-fourth picotitre plate. A total of 240 496 reads of which 65 336 contained paired ends were obtained for D39 Δ *codY* (29-fold coverage), and 210 631 reads with 60 676 paired ends were obtained for D39 (25-fold coverage). *De novo* assembly was carried out using the Roche 454 Newbler software [Release 2.3 (091027_1459)], resulting in 68 contigs in five scaffolds for D39 Δ *codY*, and 85 contigs in five scaffolds for D39.

Data from the sequencing runs were mapped to the reference D39 strain (Accession No. NC_008533.1) and the variations thereto scored using the Roche 454 Reference Mapper software [Release 2.3 (091027_1459)].

Sequencing of *amiC* and *fatC* of individual D39 Δ *codY* clones

The *amiC* and *fatC* sequence of the D39 Δ *codY* population was verified by a PCR-sequencing approach. To this end, chromosomal DNA was isolated from individual clones by cetyl-trimethylammonium bromide (CTAB) extraction as described previously (van Soolingen *et al.*, 1994). The *amiC* and *fatC* loci were PCR-amplified under standard conditions using, respectively, primers HBDamiCF1 and HBDamiCR2 and HBDfatCF and HBDfatCR (Table 1). Subsequently, both strands were sequenced using the same primers used for PCR as well as internal primers HBDamiCR1 and HBDamiCF2 (Table 1) in case of *amiC*.

Acknowledgements

We thank Nathalie Campo and Calum Johnston for critical reading of the manuscript. We also wish to thank Chantal Granadel for expert technical assistance. This work was supported in part by the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007-2013 under Grant Agreement No. HEALTH-F3-2009-222983 (Pneumopath project). S.C. was the recipient of a PhD thesis fellowship from the Ministère de la Recherche (2007–2009) and from the Fondation pour la Recherche Médicale (2010).

References

Akerley, B.J., Rubin, E.J., Camilli, A., Lampe, D.J., Robertson, H.M., and Mekalanos, J.J. (1998) Systematic identification of essential genes by *in vitro* mariner mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 8927–8932.

Alloing, G., de Philip, P., and Claverys, J.P. (1994) Three

highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the Gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **241**: 44–58.

Alloing, G., Martin, B., Granadel, C., and Claverys, J.P. (1998) Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone auto-induction and control of quorum-sensing by the oligopeptide permease. *Mol Microbiol* **29**: 75–84.

Attaiech, L., Granadel, C., Claverys, J.P., and Martin, B. (2008) RadC, a misleading name? *J Bacteriol* **190**: 5729–5732.

Bergé, M., Moscoso, M., Prudhomme, M., Martin, B., and Claverys, J.P. (2002) Uptake of transforming DNA in Gram-positive bacteria: a view from *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **45**: 411–421.

Bootsma, H.J., Egmont-Petersen, M., and Hermans, P.W. (2007) Analysis of the *in vitro* transcriptional response of human pharyngeal epithelial cells to adherent *Streptococcus pneumoniae*: evidence for a distinct response to encapsulated strains. *Infect Immun* **75**: 5489–5499.

Brown, J.S., Gilliland, S.M., and Holden, D.W. (2001) A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Mol Microbiol* **40**: 572–585.

Brown, J.S., Gilliland, S.M., Ruiz-Albert, J., and Holden, D.W. (2002) Characterization of pit, a *Streptococcus pneumoniae* iron uptake ABC transporter. *Infect Immun* **70**: 4389–4398.

Burghout, P., Bootsma, H.J., Kloosterman, T.G., Bijlsma, J.J., de Jongh, C.E., Kuipers, O.P., and Hermans, P.W. (2007) Search for genes essential for pneumococcal transformation: the RADA DNA repair protein plays a role in genomic recombination of donor DNA. *J Bacteriol* **189**: 6540–6550.

Chastanet, A., Prudhomme, M., Claverys, J.P., and Msadek, T. (2001) Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *J Bacteriol* **183**: 7295–7307.

Chen, J.D., and Morrison, D.A. (1987) Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **133**: 1959–1967.

Claverys, J.P., and Håvarstein, L.S. (2002) Extra-cellular peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* **7**: 1798–1814.

Claverys, J.P., and Lacks, S.A. (1986) Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiol Rev* **50**: 133–165.

Claverys, J.P., Grossiord, B., and Alloing, G. (2000) Is the Ami-AliAB oligopeptide permease of *Streptococcus pneumoniae* involved in sensing environmental conditions? *Res Microbiol* **151**: 1–7.

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

Cundell, D.R., Pearce, B.J., Sandros, J., Naughton, A.M., and Masure, H.R. (1995) Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. *Infect Immun* **63**: 2493–2498.

Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Hénard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., *et al.* (2004) Interconnection of

- competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells. *Mol Microbiol* **51**: 1071–1086.
- Gasc, A.M., Sicard, A.M., and Claverys, J.P. (1989) Repair of single- and multiple-substitution mismatches during recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Genetics* **121**: 29–36.
- Guédon, E., Serror, P., Ehrlich, S.D., Renault, P., and Delorme, C. (2001) Pleiotropic transcriptional regulator CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **40**: 1227–1239.
- Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B., and Claverys, J.P. (2005) Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 8710–8715.
- Guiral, S., Hénard, V., Laaberki, M.-H., Granadel, C., Prudhomme, M., Martin, B., and Claverys, J.P. (2006) Construction and evaluation of a chromosomal expression platform (CEP) for ectopic, maltose-driven gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **152** (Special Issue on Pneumococcus): 343–349.
- Handke, L.D., Shivers, R.P., and Sonenshein, A.L. (2008) Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *J Bacteriol* **190**: 798–806.
- Hava, D.L., and Camilli, A. (2002) Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol* **45**: 1389–1406.
- Håvarstein, L.S., Martin, B., Johnsborg, O., Granadel, C., and Claverys, J.P. (2006) New insights into pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol* **59**: 1297–1307.
- Hendriksen, W.T., Bootsma, H.J., Estevão, S., Hoogenboezem, T., De Jong, A., De Groot, R., et al. (2008) CodY of *Streptococcus pneumoniae*: link between nutritional gene regulation and virulence. *J Bacteriol* **190**: 590–601.
- Johnsborg, O., and Håvarstein, L.S. (2009) Pneumococcal LytR, a protein from the LytR-CpsA-Psr family, is essential for normal septum formation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **191**: 5859–5864.
- Kerr, A.R., Adrian, P.V., Estevão, S., De Groot, R., Alloing, G., Claverys, J.P., et al. (2004) The Ami-Alia/B permease of *Streptococcus pneumoniae* is involved in nasopharyngeal colonization but not in invasive disease. *Infect Immun* **72**: 3902–3906.
- Lanie, J.A., Ng, W.L., Kazmierczak, K.M., Andrzejewski, T.M., Davidsen, T.M., Wayne, K.J., et al. (2007) Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6. *J Bacteriol* **189**: 38–51.
- Lau, G.W., Haataja, S., Lonetto, M., Kensit, S.E., Marra, A., Bryant, A.P., et al. (2001) A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol Microbiol* **40**: 555–571.
- Lefèvre, J.C., Claverys, J.P., and Sicard, A.M. (1979) Donor deoxyribonucleic acid length and marker effect in pneumococcal transformation. *J Bacteriol* **138**: 80–86.
- Lemon, K.P., and Grossman, A.D. (1998) Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* **282**: 1516–1519.
- Létoffé, S., Delepelaire, P., and Wandersman, C. (2006) The housekeeping dipeptide permease is the *Escherichia coli* heme transporter and functions with two optional peptide binding proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 12891–12896.
- Martin, B., Prudhomme, M., Alloing, G., Granadel, C., and Claverys, J.P. (2000) Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **38**: 867–878.
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R.P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., and Sonenshein, A.L. (2003) Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J Bacteriol* **185**: 1911–1922.
- Mortier-Barrière, I., de Saizieu, A., Claverys, J.P., and Martin, B. (1998) Competence-specific induction of *recA* is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **27**: 159–170.
- Pericone, C.D., Park, S., Imlay, J.A., and Weiser, J.N. (2003) Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction. *J Bacteriol* **185**: 6815–6825.
- Prudhomme, M., and Claverys, J.P. (2007) There will be a light: the use of *luc* transcriptional fusions in living pneumococcal cells. In *The Molecular Biology of Streptococci*. Hakenbeck, R., and Chhatwal, G.S. (eds). Norfolk, UK: Horizon Scientific Press, pp. 519–524.
- 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.
- Prudhomme, M., Camilli, A., and Claverys, J.P. (2007) *In vitro mariner* mutagenesis of *Streptococcus pneumoniae*: tools and traps. In *The Molecular Biology of Streptococci*. Hakenbeck, R., and Chhatwal, G.S. (eds). Norfolk, UK: Horizon Scientific Press, pp. 511–518.
- Puyet, A., Ibáñez, A.M., and Espinosa, M. (1993) Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* maltosaccharide regulator MalR, a member of the LacI-GalR family of repressors displaying distinctive genetic features. *J Biol Chem* **268**: 25402–25408.
- Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.W., and Sonenshein, A.L. (2001) *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev* **15**: 1093–1103.
- Saskova, L., Novakova, L., Basler, M., and Branny, P. (2007) Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **189**: 4168–4179.
- Serror, P., and Sonenshein, A.L. (1996) CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *J Bacteriol* **178**: 5910–5915.
- Sonenshein, A.L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* **8**: 203–207.
- Sonenshein, A.L. (2007) Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **5**: 917–927.

- van Soolingen, D., de Haas, P.E., Hermans, P.W., and van Embden, J.D. (1994) DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* **235**: 196–205.
- Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P., and Morrison, D.A. (2001) An *rpsL* cassette, Janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5190–5196.
- Tai, S.S., Yu, C., and Lee, J.K. (2003) A solute binding protein of *Streptococcus pneumoniae* iron transport. *FEMS Microbiol Lett* **220**: 303–308.
- Thanassi, J.A., Hartman-Neumann, S.L., Dougherty, T.J., Dougherty, B.A., and Pucci, M.J. (2002) Identification of 113 conserved essential genes using a high-throughput gene disruption system in *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **30**: 3152–3162.
- Tiraby, G., Fox, M.S., and Bernheimer, H. (1975) Marker discrimination in deoxyribonucleic acid-mediated transformation of various pneumococcus strains. *J Bacteriol* **121**: 608–618.
- Ulijasz, A.T., Andes, D.R., Glasner, J.D., and Weisblum, B. (2004) Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *J Bacteriol* **186**: 8123–8136.
- Ulijasz, A.T., Falk, S.P., and Weisblum, B. (2009) Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser-Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci. *Mol Microbiol* **71**: 382–390.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Supplementary Material

The global nutritional regulator CodY is an essential protein in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*

Stéphanie CAYMARIS^{1,2}, Hester J. BOOTSMA³, Bernard MARTIN^{1,2}, Peter W. M. HERMANS³,
Marc PRUDHOMME^{1,2}, Jean-Pierre CLAVERYS^{1,2,@}

¹Centre National de la Recherche Scientifique, LMGM-UMR5100, F-31000 Toulouse, France

²Université de Toulouse, UPS, Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, F-31000 Toulouse, France

³Laboratory of Pediatric Infectious Diseases, Radboud University Nijmegen Medical Centre, 6500 HB Nijmegen, The Netherlands

@Correspondence:

Mailing address : Université Paul Sabatier-CNRS, LMGM, Bât. IBCG, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

e-mail: claverys@ibcg.biotoul.fr; Tel: (33) 561.33.59.11; Fax: (33) 561.33.58.86; <http://www-lmgm.biotoul.fr/uk/equipes/grpclav/>

Content:

Results

Attempts at depleting CodY

Fig. S1. Attempt at depleting CodY and consequences on growth and competence in C+Y medium.

Table S1. Variations between the D39 NCTC 7466 isolate sequenced in this study and the previously published D39 NCTC 7466 genome sequence (Lanie *et al.*, 2007).

Fig. S2. Proposed unique mutational event responsible for the $amiC^{G246TT} amiC^{A248C}$ (or $amiC^{GGA \rightarrow TTGC}$) changes.

Fig. S3. Localization of *ami* mutation in strain D39 $\Delta cps \Delta codY$ via transformation.

Table S2. The original D39 $\Delta codY$ strain displays a mixed population structure with respect to *amiC*.

Fig. S4. Distribution of *spc mariner* minitransposon insertions in the *fat-fec* operon.

Fig. S5. Effect of *ami*, *fat* and *ami fat* inactivation on growth and spontaneous competence development.

Results

Attempts at depleting CodY

To characterize the role of *S. pneumoniae* CodY with respect to growth and the regulation of competence, we first tried to make use of a *codY*^{spc+} strain, i.e. a strain in which the only functional copy of *codY* was under the control of the P_M promoter. Pre-cultures prepared as described in the **Experimental procedures** were inoculated in C+Y medium containing 1.5% sucrose, i.e. under conditions resulting in maximum repression of P_M (Guiral *et al.*, 2006). To unravel a possible effect of CodY depletion on spontaneous competence induction, we varied the initial pH of the C+Y medium between 6.95 and 7.29. Whatever the initial pH used, we observed no difference in growth or competence between wildtype (R895) and *codY*^{spc+} (R2424) cells (**Fig. S1**, left-hand panels). The absence of growth defect suggested that maximum repression of P_M in the presence of 1.5% sucrose was not sufficient to reduce the cellular level of CodY below the (unknown) threshold critical for cell survival. There was also no indication of an effect of CodY depletion on spontaneous competence development.

To investigate whether increased repression of the P_M promoter in the presence of higher levels of the MalR repressor would allow depletion of CodY below this critical threshold, these experiments were reproduced with a pair of strains containing a recombinant plasmid carrying the *malR* gene (strains R2430 and R2432; **Table 1**). No indication that depletion of CodY sufficient to affect growth could be achieved with this system could be obtained (**Fig. S1**, right-hand panels), despite the previously documented reinforcement of P_M repression by an increase in MalR intracellular level (Guiral *et al.*, 2006). Under these conditions as well, there was no indication of a significant effect of CodY depletion on spontaneous competence induction.

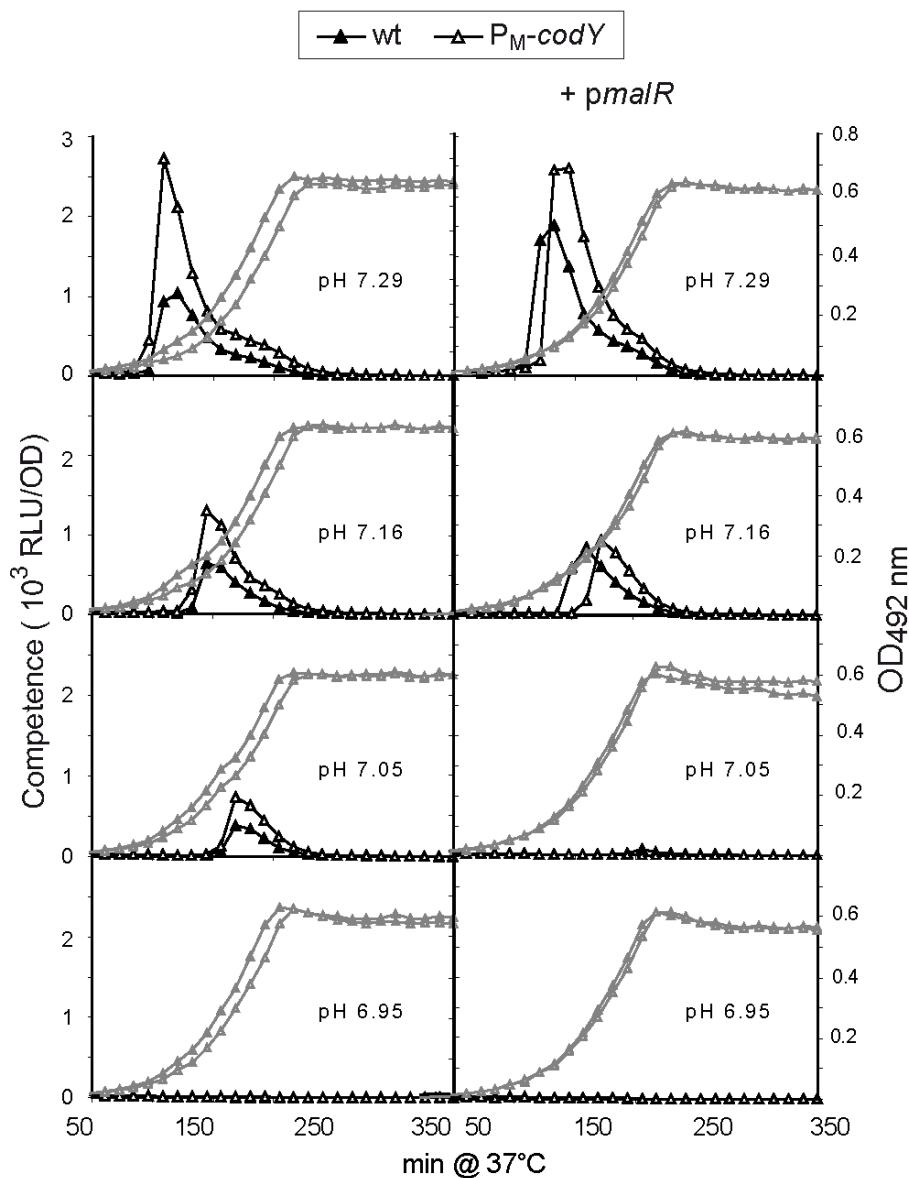


Fig. S1. Attempts at depleting CodY: examination of growth and competence in C+Y medium.

Cultures in C+Y medium containing 1.5% sucrose (at initial pH values of 6.95 to 7.29, as indicated in each panel) were inoculated (1/100th dilution) from precultures grown in the same medium and concentrated to OD=0.4. RLU and OD values were recorded (using a Lucy I luminometer; Anthos) throughout incubation at 37°C for the four strains run in parallel.

Left panels: strain R2424 (*codY^{spe/+}*) carrying a copy of *codY* under the control of the P_M promoter and its wildtype parent, strain R895

Right panels: strain R2432, a derivative of R2424 containing a recombinant plasmid carrying the *malR* (maltose repressor) gene, and its wildtype counterpart, R2430 (i.e. R895 containing *pmalR*)

Table S1. Variations between the D39 NCTC 7466 isolate sequenced in this study and the previously published D39 NCTC 7466 genome sequence (Lanie *et al.*, 2007).

D39 locus tag	Gene Name	Position	D39 (Lanie et al., 2007)	D39 This study	Notes
SPD_0170	<i>ruvA</i>	aa52	V(gtG)	V(gtA)	Holliday junction DNA helicase RuvA; silent mutation
SPD_0299	Hypothetical	aa9	ttttt-	tttttT	fusion SPD_0299-SPD_0300
SPD_0306	<i>pbp2X</i>	aa311	N(Aat)	D(Gat)	Cell division protein FtsI/penicillin-binding protein 2
IC 0450/0451 ^a		base 458118	atggaagC	atggaagT	Intergenic, upstream spd_0451
SPD_0453	<i>hsdS</i>	aa74	S(agT)	S(agC)	type I restriction-modification system, S subunit; silent mutation
SPD_0764	<i>sufS</i>	aa318	G(Gga)	R(Aga)	cysteine desulfurases, SufS subfamily protein
SPD_0921	Hypothetical	aa286	Q(cAg)	R(cGg)	Serine Recombinase family, site-specific recombinase
SPD_1016	<i>rexA</i>	aa961	A(gCt)	D(gAt)	AddAB, also called RexAB, substitutes for RecBCD in several bacterial lineages
SPD_1050	<i>lacD</i>	base 1080119	aacttaaa	aacttaa-	tagatose 1,6-diphosphate aldolase; SPD_1050 frameshift
SPD_1137	Hypothetical	aa431	H(cac)	Q(cag)	ABC transporter, ATP-binding protein D39 (Hendriksen & al.) = R6(spr1161) ^b
SPD_1660	Hypothetical	aa117	T(aCa)	I(aTa)	putative deoxyribonucleotide triphosphate pyrophosphatase, unknown domain fusion protein
SPD_1664	<i>treP</i>	aa359	G(gGc)	D(gAc)	PTS system, trehalose-specific IIABC components
SPD_2002	<i>dltD</i>	aa252	V(Gtc)	F(Ttc)	undecaprenol-phosphate-poly(glycerophosphate subunit) D-alanine transfer protein
SPD_2045	<i>mreC</i>	aa186	S(Tct)	P(Cct)	cell shape-determining protein MreC

^a IC, intercistronic region between the indicated locus tags in D39 (e.g., IC between SPD_0450 and SPD_0451).

^b The finding of the same sequence in the D39 NCTC 7466 isolate sequenced in this study and in the D39-derivative R6 implies that a mutation arose in the D39 NCTC 7466 strain sequenced by Lanie et al. (2007).

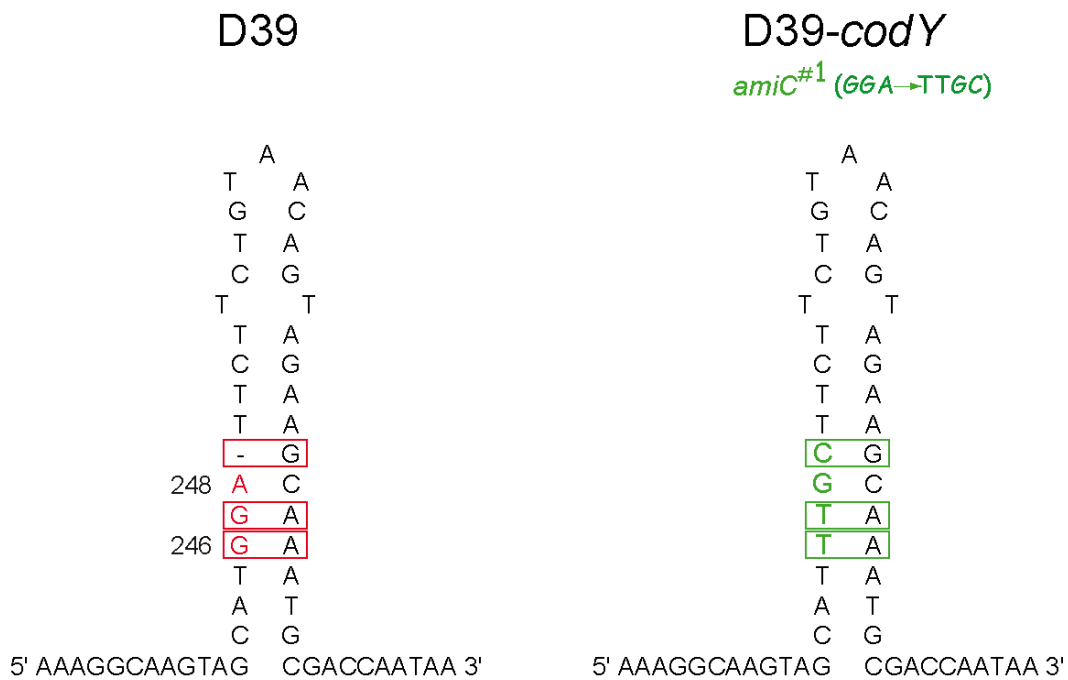


Fig. S2. Proposed unique mutational event responsible for the *amiC*^{G246TT} *amiC*^{A248C} (or *amiC*^{GGA→TTGC}) changes.

This mutation had been previously observed, described as a GGA→TTGC change and referred to as *amiA29* (Gasc et al., 1989). It was noticed that this change created a perfect 12 nt inverted repeat (right panel), which led to the proposal that this mutation occurred by so-called spontaneous sequence-directed mutagenesis (Golding and Glickman, 1985, *PNAS* **82**: 8577-8581).

This mechanism predicts multiple changes as a result of a single mutational event. These changes are proposed to result from a repair event overlapping the GGA segment using the downstream inversely repeated region as template, hence the replacement of GGA by TTGC. As a consequence the mismatched region (in the putative hairpin) boxed in red in the wildtype sequence becomes matched (green boxes) in the mutant sequence.

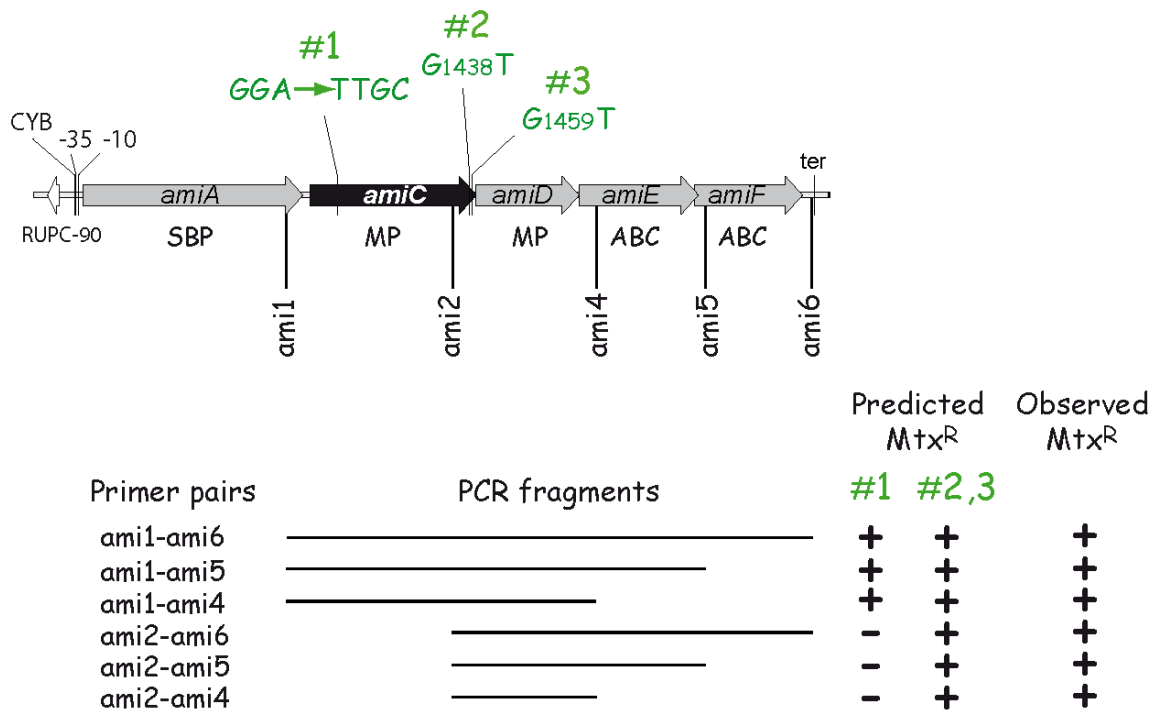


Fig. S3. Localization of *ami* mutation in strain D39Δ*cps*Δ*codY* via transformation.

The location of primers *ami1-6* (Table 1) used to generate fragments on D39Δ*cps*Δ*codY* template is indicated. PCR fragments used to localize Mtx^R mutations are indicated by horizontal lines.

+, efficient transformation (of strain R1501) to Mtx^R

-, no Mtx^R transformants above control

Transformation data are consistent with the presence of mutation #2 or #3 but not #1 in strain D39Δ*cps*Δ*codY*.

Table S2. The original D39 Δ *codY* strain displays a mixed population structure with respect to *amiC*.

Subclone	<i>amiC</i> mutation				Total	<i>fatC</i> mutation
	#1		#2	#3		C496T
	G246TT	A248C	G1438T	G1459T		
D39 Δ <i>codY</i> -cl1				x		x
D39 Δ <i>codY</i> -cl2				x		x
D39 Δ <i>codY</i> -cl3				x		x
D39 Δ <i>codY</i> -cl4	x	x				x
D39 Δ <i>codY</i> -cl5	x	x				x
D39 Δ <i>codY</i> -cl6				x		x
D39 Δ <i>codY</i> -cl7				x		x
D39 Δ <i>codY</i> -cl8				x		x
D39 Δ <i>codY</i> -cl9	x	x				x
D39 Δ <i>codY</i> -cl10			x			x
D39 Δ <i>codY</i> -cl11				x		x
D39 Δ <i>codY</i> -cl12				x		nd
D39 Δ <i>codY</i> -cl13			x			nd
D39 Δ <i>codY</i> -cl14			x			nd
D39 Δ <i>codY</i> -cl15				x		nd
D39 Δ <i>codY</i> -cl16				x		nd
Total number	3		3	10	16	11/11
% of total	19%		19%	63%	100%	100%
D39 Δ <i>codY</i> genome sequencing	29% ^a		19% ^a	47% ^a	95% ^b	

x, presence of the indicated nucleotide change.

nd, not determined.

^a % of total reads at the corresponding site

^b Cumulative frequencies lower than 100% because of the mode of calculation (see ^a)

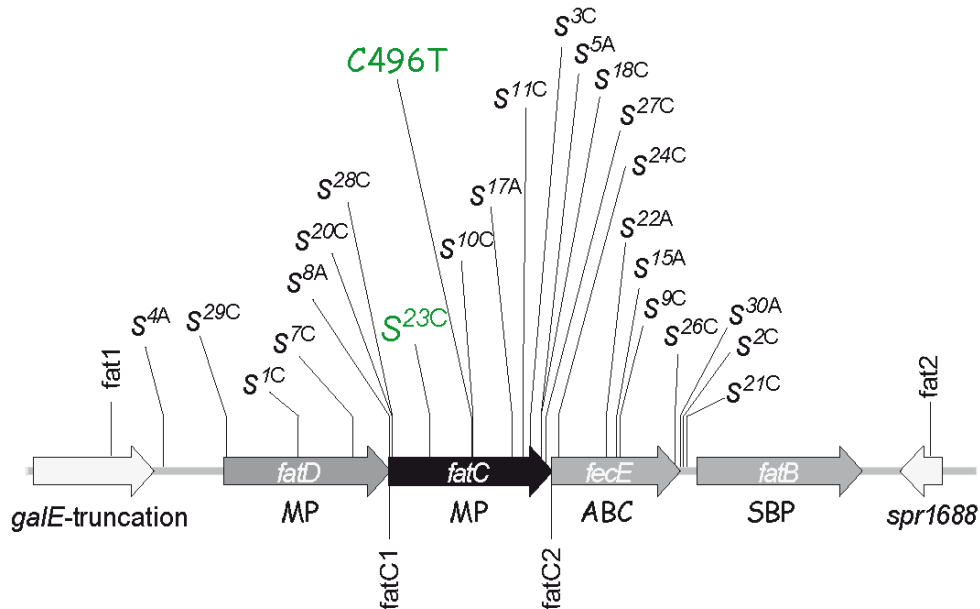


Fig. S4. Distribution of *spc mariner* minitransposon insertions in the *fat-fec* operon.

The location of primers used to generate *fat* PCR fragments for *mariner* mutagenesis (fat1-fat2) is indicated.

spc^{23C} insertion site was located through DNA sequencing (using the fatC1 and fatC2 primers) at position +241 with respect to the first nucleotide of *fatC* (taken as +1). The *spc*^{23C} cassette was then exchanged with the *cat* cassette by transformation of strain TD129 with plasmid pEM*cat* DNA, selecting for Cm^R transformants to generate strain TD131 (genotype referred to as *fatC::cat*^{23C}; Table 1).

The *fatC*^{C496T} mutation identified in strain D39Δ*codY* is also indicated.

^C and ^A indicate co-transcribed and reverse orientation of *spc* (*S*) cassette with respect to *fatC*.

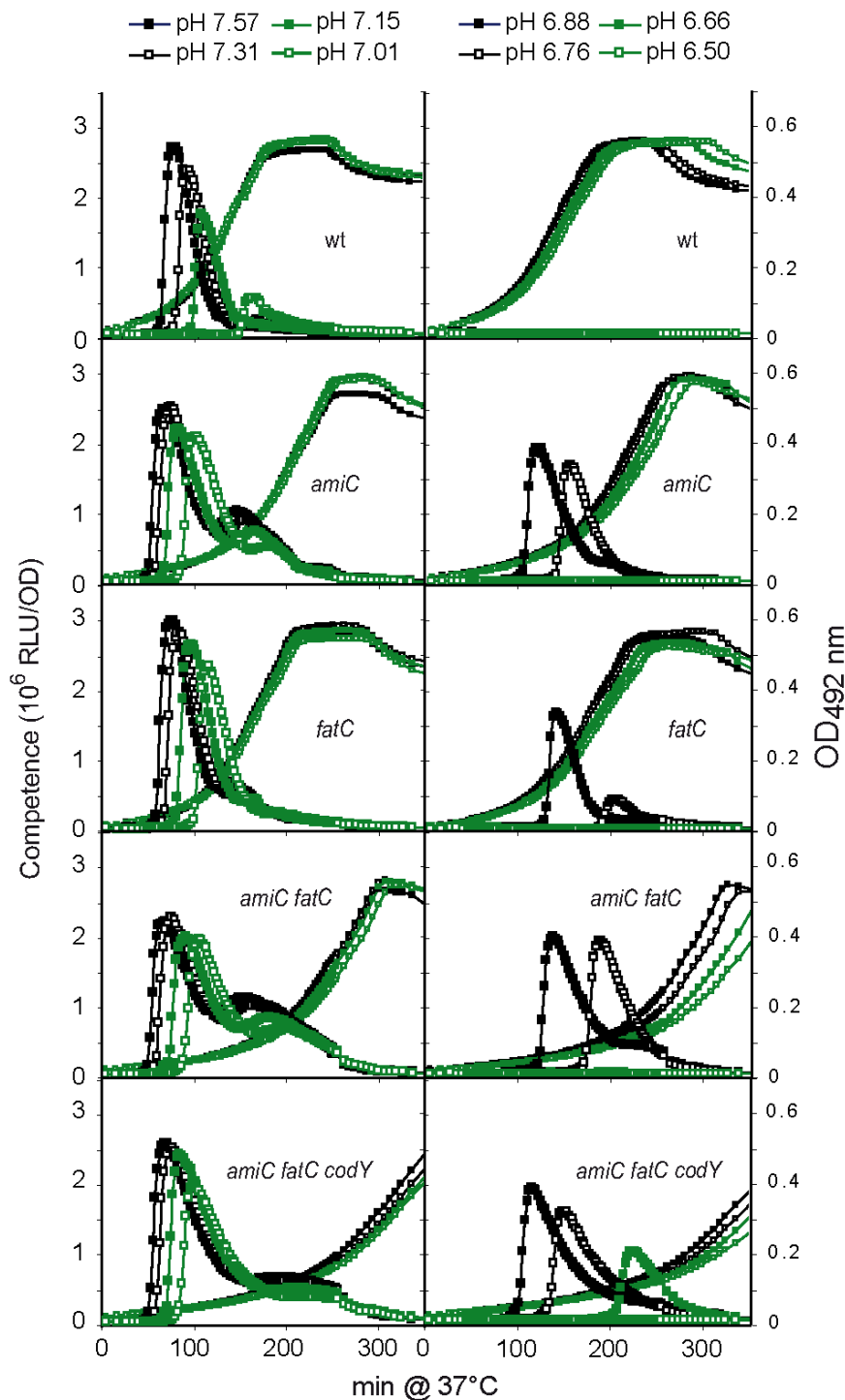


Fig. S5. Effect of *ami*, *fat* and *ami fat* inactivation on growth and spontaneous competence development.

Cultures in C+Y medium (at initial pH values of 6.50 to 7.57, as indicated at the top of each column) were inoculated ($1/50^{\text{th}}$ dilution) from precultures grown in the same medium and concentrated to $OD=0.4$. RLU and OD values were recorded throughout incubation at 37°C for the four strains run in parallel.

Strains used: wt, TD82; *fatC::spc^{23C}* mutant, TD138; *amiC9* mutant, TD84; *amiC9 fatC::spc^{23C}* double mutant, TD135; *codY::trim amiC9 fatC::spc^{23C}* triple mutant, TD154.

***Chapitre 3 : fatC-amiC n'est pas le seul contexte
suppresseur***

I) Etude des différents contextes permettant d'accepter *codY*

Après avoir prouvé que *codY* est un gène essentiel et qu'il existe au moins un contexte capable de compenser l'absence de ce régulateur, nous avons décidé d'analyser le transfert de *codY* dans différents contextes. Les souches R1501 et D39 Δ *cps* ont été transformées par l'ADN chromosomique des souche TD80 (*codY::trim amiC^{G1459T} fatC^{C496T} str41*) ou TD81 (*codY::spc amiC^{G1459T} fatC^{C496T} str41*) et 43 transformants ont été analysés (voir les deux lignes centrales de la table 2).

Le transfert de la mutation *codY::trim* (ou *codY::spc*) à la descendance a été vérifié par PCR. Sur les 43 clones analysés, tous portaient la mutation *codY*, mais 24 d'entre eux portaient aussi le gène *codY* sauvage (table 2). Ces 24 clones qui contiennent la structure *codY* mutante et la structure *codY* sauvage portent donc une duplication d'une région plus ou moins longue contenant *codY*. Ces clones sont donc mérodipléïdes (dipléïdes partiels). Ceci sera expliqué plus en détail au paragraphe I.1.1.

La stabilité génétique a été analysée pour les différents clones portant la structure *codY* mutante. En effet, des structures non stables comme la délétion, la duplication ou l'inversion d'une région du génome peuvent entraîner un changement dans l'expression globale du génomes ou de certains gènes. La présence de telles mutations pourrait permettre de compenser l'absence de CodY, même en l'absence de *codY* sauvage.

Pour tester la présence de structures non stables dans les mutants *codY*, nous avons décidé de transformer les 43 clones avec un fragment PCR contenant le marqueur *kan^{90C}::codY+* (ou *spc^{90C}::codY+* pour le contexte D39 Δ *cps(kan)*). Cette mutation correspond à une insertion *mariner* située en amont du promoteur de *codY*. Cette mutation n'inactive donc pas *codY* (voir chapitre 2). Les transformants Kan^R obtenus lors de la transformation d'une souche *codY* avec ce marqueur correspondent pour la plupart à des souches ayant co-transformé le gène *codY* sauvage et éliminé la mutation *codY::trim* (ou *codY::spc*). Ces transformants ont donc un phénotype *codY*⁺.

Ainsi, l'absence de la mutation *codY* pourrait permettre de s'affranchir des pressions de sélection qui stabilisent ce genre de structures. Les structures non stables (délétion, duplication, inversion) pourraient donc être perdues au cours des générations.

Si le contexte génétique permettant de compenser l'absence de CodY est stable, les transformants Kan^R (*codY*⁺) (ou Spc^R (*codY*⁺)) seront capables de réintégrer une mutation *codY::trim* à haute fréquence (ratio Trim/Str d'environ 0,15). Au contraire, si ce contexte est instable, il sera perdu dans les transformants Kan^R (*codY*⁺) et la réintégration de la mutation

codY::trim se fera à une fréquence beaucoup plus faible (comme dans une souche sauvage classique).

Sur les 43 clones testés (voir les 2 lignes centrales de la table 2), 24 ne permettent pas la réintégration de *codY* à haute fréquence. Ces 24 clones correspondent aux 24 mérodiplôides identifiés par PCR. Les 19 autres clones (qui ne portent pas de copie sauvage de *codY*) ont permis la réintégration de *codY*- à haute fréquence. Ces clones possèdent donc une structure « suppresseur stable ».

Les mutations suppressives présentes dans les souches donneuses TD80 et TD81 (*i.e.* *amiC*^{G1459T} et *fatC*^{C496T}) ont été recherchées par séquençage des locus *amiC* et *fatC* dans ces 19 clones. Pour cela, ces deux gènes ont été amplifiés par PCR avec les paires d'oligonucléotides Ami2/Ami4 et FatC1/FatC2 et séquencés.

Les résultats de ces différents tests sont exposés dans la table 2.

	Réceptrice	ADN chromosomique donneur	Nb de clones testés	Présence de <i>codY</i> ⁺	Re-transfert efficace de <i>codY</i> ⁻	Nb de clones	Présence de <i>amiC</i> ^{G1459T}	Présence de <i>fatC</i> ^{C496T}	Catégorie
I.1.1	R1502	<i>codY::trim</i>	1	+	-	1	nd	nd	mérodiplôides
I.1.2	R1501	<i>codY::trim</i> ou <i>codY::spc</i>	28	+	-	22	nd	nd	mérodiplôides
				-	+	5	+	+	I
						1	+	-	II
I.2.2	D39Δ <i>cps</i>	<i>codY::trim</i>	15	+	-	2	nd	nd	mérodiplôides
				-	+	10	+	-	III
						3	-	-	IV
I.2.3	D39 <i>glnR</i>	<i>codY::trim</i>	1	-	nd	1	-	-	V

Table 2 : Etude du transfert de *codY* dans différents contextes génétiques

I.1.1, I.1.2, I.2.2, I.2.3 représentent les paragraphes dans lesquels seront discutées ces catégories de mutants. + : présence de la mutation - : absence de l'allèle cité en haut de colonne. nd : non déterminé.

De façon surprenante, les résultats de ces expériences montrent qu'il existe des mutant *codY* génétiquement stables qui ne sont ni *amiC*^{G1459T} ni *fatC*^{C496T}. Sur les 19 clones testés, seulement 5 clones sont *amiC*^{G1459T} *fatC*^{C496T}. Il existe donc de nouveaux contextes « suppresseurs stables » qui permettent de compenser l'absence de CodY. Ces résultats seront discutés dans les paragraphes suivants.

Parce que nous avons obtenu un grand nombre de clones mérodiplôides et une très faible quantité de transformants *amiC*^{G1459T} et *fatC*^{C496T}, nous nous sommes demandé si la

structure génomique de la souche D39 Δ *cps* Δ *codY* (souche parentale des souches TD80 et TD81) était différente de la structure de la souche R6.

Une grande inversion ou duplication d'une partie du génome pourrait ne pas avoir été détectée dans les résultats du séquençage génomique du fait de la technique utilisée (voir chapitre 2). En effet, les différentes séquences ont été assemblées et organisées en contigs grâce à des alignements avec le génome publié de la souche R6 (parentale de la souche R800) (Hoskins *et al.*, 2001). Il est donc possible que les régions dupliquées ou inversées ne soient pas repérées par séquençage génomique. Pour déterminer si la souche D39 Δ *cps* Δ *codY* possède un réarrangement chromosomique de grande taille, la structure génomique de cette souche a été vérifiée par électrophorèse en champs pulsés (PFGE). Nos résultats montrent que cette souche ne porte pas de duplication, de délétion ou d'inversion (voir annexe B).

I.1) Analyse du transfert de *codY* dans le contexte génétique R1501

Dans cette partie, l'analyse des différents transformants *codY* obtenus dans un contexte R1501/R1502 (descendants de R800) est présentée.

I.1.1) Mérodiplôïdes

La plupart des clones transformants *codY*- obtenus (23/29) dans un contexte R800 portent une copie de *codY* mutée et une autre copie sauvage. Ces clones sont mérodiplôïdes.

Les différents clones ont été analysés par la méthode d'électrophorèse en champs pulsés et les résultats montrent que chaque clone mérodiplôïde porte une structure génique différente. Le mécanisme permettant la formation de telles structures reste encore à élucider. L'annexe C présente les résultats de l'analyse de la souche R2597 et de deux autres clones mérodiplôïdes. Cette étude montre que la duplication d'une région plus ou moins grande qui contient le gène *codY* permet l'intégration de la mutation *codY::trim*.

De plus, l'analyse génomique de la souche R2597 par deux méthodes différentes (électrophorèse en champs pulsés et séquençage génomique) montre que les structures mérodiplôïdes ne sont pas stables et qu'une partie de la duplication peut être perdue au cours des étapes de croissance.

I.1.2) Catégories I et II

Comme nous l'avons vu dans le premier paragraphe de ce chapitre, lorsqu'on transforme une souche R1501 par l'ADN des souches TD80 ou TD81 (c'est-à-dire un ADN portant une mutation *codY* et les deux suppresseurs *amiC*^{G1459T} et *fatC*^{C496T}), on obtient une majorité de transformants mérodiplôides. On obtient également des clones dont la structure génique est stable et qui ne portent pas de copie sauvage de *codY* dans leur génome. Ces clones se divisent en deux catégories. La première catégorie porte les deux mutations suppresseur *amiC*^{G1459T} et *fatC*^{C496T} comme on pouvait l'attendre. Cette catégorie est majoritaire. La seconde catégorie ne contient qu'un seul clone qui ne porte que la mutation *amiC*^{G1459T}. Il semble donc qu'il soit possible de compenser l'absence de *codY* en contexte *fatC*+. Nous avons proposé plusieurs hypothèses pour expliquer ces génotypes.

L'étude réalisée au chapitre 2 suggère que les mutations *amiC*^{G1459T} et *fatC*^{C496T} sont nécessaires pour réduire la quantité de fer incorporée. Ceci permettrait de compenser l'inviabilité des mutants *codY*.

La mutation *fatC*^{C496T} n'est peut-être pas la seule mutation de transporteur de fer capable de supprimer la létalité due à *codY* en réduisant la concentration intracellulaire en fer. En effet, chez *S. pneumoniae*, il existe trois opérons codant pour des transporteurs de fer, *pitADBC* (Brown *et al.*, 2002) et *piaBCD* (Brown *et al.*, 2001a) et *fatDCEB* (appelé aussi *piu* (Brown *et al.*, 2001b)). Un séquençage de l'intégralité des 3 loci impliqués dans le transport du fer pourrait éventuellement révéler la présence d'une autre mutation qui réduirait l'internalisation du fer. Une telle mutation serait probablement suppresseur.

Une autre hypothèse pourrait être qu'une mutation dans un autre gène qui n'est pas impliqué dans le transport du fer pourrait également être suppresseur. Dans une souche *amiC-codY- fatC*+, l'absence de CodY pourrait aboutir à une dérégulation de l'opéron *fat* (CodY réprime l'opéron *fat* (Hendriksen *et al.*, 2007)). L'augmentation de l'expression des systèmes de transport du fer augmenterait la quantité de fer dans la cellule. La cellule créerait alors beaucoup de radicaux libres nocifs pour la cellule (réaction de Fenton). Ce stress oxydatif pourrait être contré par une augmentation de la protéine Dpr (voir chapitre 2), protéine impliquée dans la prise en charge du fer et dans la résistance à l'H₂O₂ (Pulliainen, 2002).

En outre, il semble que le pneumocoque soit capable d'utiliser la compétence pour répondre aux stress environnementaux (Claverys *et al.*, 2006 ; Prudhomme *et al.*, 2006). La compétence pourrait donc jouer un rôle dans la résistance au stress oxydatif évoqué ci-dessus et par conséquent compenser l'absence de CodY lorsque le gène *fatC* est sauvage. En effet, le

mutant *amiC* présente un phénotype *cup* (« compétence up », voir introduction). Ce mutant est donc capable de déclencher la compétence dans des conditions normalement défavorables.

La souche réceptrice R1501 utilisée pour la transformation par les ADN TD80 et TD81 est mutée pour le gène *comC* et est donc incapable d'induire la compétence sans ajout de CSP dans la culture. Notre hypothèse selon laquelle une souche *amiC*- *codY*- *fatC*+ pourrait combattre un stress oxydatif éventuel en déclenchant la compétence suppose donc que cette souche serait capable d'induire la compétence indépendamment du CSP. Il existe des mutations dans *comD* et *comE* qui permettent une induction de la compétence CSP-indépendante (Martin *et al.*, 2000 ; Echenique *et al.*, 2000). On sait aussi que certaines mutations augmentent considérablement le niveau basal d'expression des gènes de compétence (par exemple, une mutation du gène *comE*, *comE*^{R120S} (Martin *et al.*, 2010) ou une mutation du gène *rshA* (comme montré au chapitre 1)). Un niveau basal d'expression des gènes de compétence élevé est peut-être suffisant pour produire une réponse au stress permettant de compenser l'absence de CodY. Il est donc envisageable que le double mutant *amiC*^{G1459T} *fatC*^{C496T} ait un niveau basal d'expression de la compétence suffisant pour résister au stress oxydatif généré par l'absence de CodY. De plus, le clone de la catégorie II (voir table 2) qui ne porte pas la mutation *fatC*^{C496T} est peut-être mutant pour un autre gène qui rendrait cette souche compétente indépendamment du CSP ou qui augmenterait considérablement le niveau basal d'expression des gènes de compétence.

Il serait donc intéressant pour mieux caractériser le mode de suppression dans la catégorie II, de séquencer les différents opérons impliqués dans le transport du fer. Si aucun d'eux n'est muté, l'observation du niveau de compétence dans ce mutant pourrait donner des arguments en faveur (ou en défaveur) d'un effet suppresseur de la compétence par rapport à l'inviabilité des mutants *codY*.

I.2) Analyse du transfert de *codY* dans le contexte génétique D39

I.2.1) Catégories III : *fat*⁺ *amiC*

15 clones issus de la transformation de la souche D39 Δ *cps* par l'ADN TD80 ont été étudiés (table 2). Parmi les 15 clones étudiés dans ce contexte, seulement 2 d'entre eux portent à la fois une copie sauvage du gène *codY* ainsi qu'une copie mutée. La stabilité génétique des 15 clones a été testée (voir Matériel et méthodes). Nos résultats montrent qu'à

l'exception des 2 clones mérodiplôides qui présentent un contexte génétique instable, les 13 autres clones sont capables de réintégrer la mutation *codY* avec une grande efficacité. Ces 13 clones portent donc une structure suppresseur « stable ». Nous avons donc décidé de rechercher dans le génome de ces clones, la présence des mutations *fatC*^{C496T} et *amiC*^{G1459T} (présentes dans l'ADN de la souche donatrice TD80). A notre grande surprise, aucun des clones transformants *codY::trim* ne porte la mutation *fatC*^{C496T}. Ceci semble indiquer que la mutation du gène *fatC* n'est pas nécessaire pour compenser l'absence CodY dans le contexte D39Δ*cps*.

En contexte R1501, nous avons montré que *amiC* seul n'est pas capable de compenser l'absence de CodY (chapitre 2). En effet, la mutation *fatC*^{C496T} ou une autre mutation (catégorie II) sont nécessaires en combinaison avec *amiC* pour supprimer l'inviabilité des mutants *codY*. Pour tester si la mutation *amiC* est suffisante pour compenser la mutation *codY*, nous avons transféré l'ADN des souches TD80 et TD81 (*codY-amiC-fatC-*) dans des souches dérivées de la souche D39Δ*cps* et mutées pour les gènes *fatC* et/ou *amiC*. Les résultats sont présentés sur la figure 33.

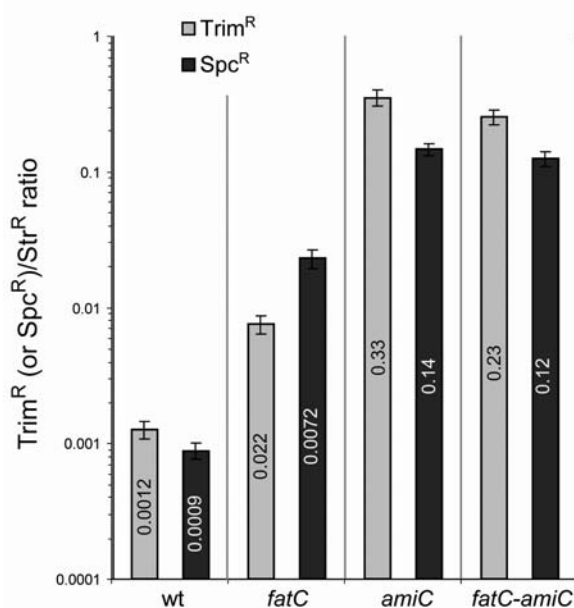


Figure 33 : Transfert de *codY* dans un contexte suppresseur reconstitué dans D39Δ*cps*.

Les ADN chromosomiques des souches TD80 (*codY::trim fatC*^{C496T} *amiC*^{G1459T} *str41*) et TD81 (*codY::spc fatC*^{C496T} *amiC*^{G1459T} *str41*) ont été utilisés en tant que donneurs pour la transformation des souches TD139 (wt), TD143 (*amiC*9), TD141 (*fatC*), TD142 (*fatC amiC*9).

Dans cette figure, on voit que l'intégration de *codY::trim* se fait avec une très faible efficacité comme attendu en contexte sauvage (voir chapitre 2). Le taux de transfert dans le mutant *fatC* est plus élevé, ce qui traduit le transfert simultané des mutations *amiC* et *codY::trim*.

Dans la souche *amiC*, le taux de transfert de *codY* est équivalent à celui que l'on observe pour la souche double mutante *amiC fatC*. Ce taux correspond à celui que l'on attend pour l'intégration du marqueur *codY::trim* seul dans une souche supprimée. La mutation *amiC* est donc suffisante pour compenser l'absence de CodY en contexte D39 Δ *cps*.

Cependant, nous avons constaté que le taux de transfert de *codY* dans la souche sauvage est plus faible que celui observé pour le mutant *fatC*. Si la mutation du gène *fatC* n'est pas nécessaire pour la suppression, alors le taux de transformation dans la souche sauvage devrait être équivalent à celui observé pour le mutant *fatC* (ce taux traduit le transfert simultané des mutations *codY::trim* et *amiC*). Sur milieu solide, la croissance d'un double mutant *fatC amiC* est meilleure que celle du simple mutant *amiC*. Il est possible que l'absence du gène *fatC* permette de stabiliser la mutation *amiC*.

Pourquoi la souche D39 Δ *codY* obtenue par W. Hendrisken est-elle *fatC*- puisque la mutation *amiC* seule est suffisante pour compenser l'absence de CodY dans une souche D39 Δ *cps* ?

La souche D39 Δ *codY* est une souche capsulée alors que la souche D39 Δ *cps* que nous avons utilisée pour ce travail est décapsulée. Cette différence pourrait expliquer pourquoi la mutation *fatC* semble indispensable pour la suppression de la mutation *codY* dans la souche capsulée D39 (voir chapitre 2). De plus, la délétion des gènes de la capsule (dans la souche D39 Δ *cps*) introduit une mutation dans le gène *aliA*. Il est possible que cette mutation associée à la mutation *amiC* soit suffisante pour compenser l'absence de CodY. Cette hypothèse est également appuyée par la différence d'effet suppresseur observé entre les souches D39 Δ *cps* et R1501. Bien que ces deux souches portent une délétion de la capsule, R1501 possède une copie sauvage du gène *aliA*.

Le gène *aliA* est impliqué dans le transport des petits peptides via le transporteur Ami (Alloing *et al.*, 1994). Ce gène code une des 3 lipoprotéines qui adressent les peptides au transporteur Ami (Alloing *et al.*, 1994). Comme *amiC*, ce gène pourrait également être indirectement impliqué dans la répression de la compétence (Alloing *et al.*, 1998). Un mutant *aliA*- pourrait donc avoir un phénotype *cup* dû à l'absence de transport des peptides ou à un

autre mécanisme. En association avec *amiC*-, *aliA*- pourrait augmenter le phénotype *cup* ce qui pourrait permettre de compenser l'absence de CodY.

Pour tester si le passage par l'induction de la compétence est nécessaire pour supprimer l'inviabilité des mutants *codY*, nous avons construit des souches incapables de développer la compétence spontanément. Pour cela, nous avons transformé la souche D39 Δ *cps* Δ *codY* et son dérivé *codY*+ par un ADN portant une mutation *comA::spc*. Les mutants ainsi obtenus sont incapables d'exporter le CSP et ne peuvent pas déclencher la compétence de façon spontanée.

Les résultats de cette expérience sont montrés sur la figure 34. Le taux de transfert de la mutation *comA::spc* est d'environ 0,40 pour la souche sauvage. Ce taux est similaire pour la souche D39 Δ *cps* Δ *codY* et son dérivé *codY*+. Nous pouvons donc conclure que la capacité à développer la compétence n'est pas nécessaire pour compenser la perte de viabilité des mutants *codY*-. Cependant, il est possible que le niveau basal d'expression des gènes *comCDE* soit modifié dans le mutant D39 Δ *cps* Δ *codY* *comA*. En effet, ce niveau pourrait être plus élevé que dans une souche sauvage et pourrait permettre aux mutant *comA*- de toujours développer la compétence. Pour le vérifier, il faudrait effectuer le suivi du niveau basal d'expression des gènes de compétence (en contexte *comC0* ou *comA::spc* avec la fusion transcriptionnelle *ssbB::luc*) dans cette souche et dans son dérivé *codY*+

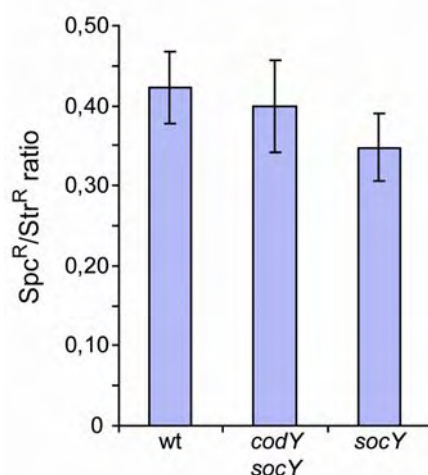


Figure 34 : Inactivation de la compétence dans le mutant *codY*.

L'ADN chromosomique de la souche R2994 (*comA::spc str41*) a été utilisé en tant que donneur pour la transformation des souches TD82, wt ; TD83, *codY-socY* (*fatC*^{C496T} ; *amiC*^{G1459T}) ; TD96, *socY* (*fatC*^{C496T} ; *amiC*^{G1459T}).

Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer si la délétion de la capsule, la mutation *aliA* ou d'autres différences génétiques des souches dérivées des

souches D39 ou R800 sont responsables de la capacité des mutants D39 Δ *cps* *amiC* à intégrer *codY* à haute fréquence.

I.2.2) Catégorie IV : *fat*⁺ *amiC*⁺

Trois mutants *codY* isolés en contexte D39 Δ *cps* (table 2 catégorie IV) ne portent ni la mutation *fatC*, ni la mutation *amiC*. Dans une souche D39 Δ *cps*, la mutation *amiC* seule permet de compenser l'absence de CodY. L'absence de la mutation *fatC* n'est donc pas surprenante. Il est possible que ces 3 clones de la catégorie IV portent simplement une mutation spontanée dans un autre gène du locus *ami*. Ainsi, au cours de la transformation de la souche D39 Δ *cps*, des mutants *ami* apparus spontanément auraient pu servir de cellules réceptrices à l'origine des 3 clones de la catégorie IV. Le séquençage de tous les gènes du locus *ami* permettrait de vérifier cette hypothèse. Dans le cas où l'opéron *ami* ne porterait aucune mutation, il faudra envisager qu'une autre mutation sur le chromosome dans un autre gène puisse être responsable de la suppression de l'inviabilité des mutants *codY*.

I.2.3) Catégorie V : contexte *glnR*⁻

T. Kloosterman a construit une souche *glnR*⁻ *codY*⁻ en transformant une souche *glnR*⁻ par l'ADN de la souche D39 Δ *codY* (Kloosterman *et al.*, 2006). Le séquençage des loci *amiC* et *fatC* a montré que cette souche ne porte pas les mutations suppressives *fatC*^{C496T} *amiC*^{G1459T} (Hester Bootsma, communication personnelle). Il est possible que cette souche porte d'autres mutations permettant de compenser l'absence de CodY. Par exemple, cette souche pourrait être mutée dans un autre gène responsable du transport du fer ou dans un autre gène du locus *ami*. Il est également possible que la mutation *glnR* soit capable à elle seule de compenser l'absence de CodY.

Avant d'avoir obtenu la séquence génomique de la souche D39 Δ *cps* Δ *codY*, nous avons testé certains gènes candidats pouvant compenser l'absence de CodY (voir annexe D). Parmi ces gènes, *glnR* a été analysé. Nos résultats ont montré que l'inactivation de *glnR* ne permet pas de compenser l'absence de CodY. Cependant, ce travail a été effectué en contexte R800 et non pas en contexte D39. Il est possible que dans le contexte D39 dans lequel T. Kloosterman a travaillé, *glnR* participe à la suppression de l'inviabilité de *codY*. Pour répondre à cette question, l'analyse du transfert de *codY::trim* dans la souche D39*glnR* (Kloosterman *et al.*, 2006) sera nécessaire.

II) *codY* est-il vraiment un répresseur de la compétence

II.1) Discussion et perspectives

Lors de l'étude des mécanismes permettant de réguler l'initiation de la compétence, l'effet de la protéine CodY a été recherché. Au cours de ce travail, nous avons montré que le gène *codY* est essentiel dans les contextes génétiques D39 et R800. De plus, le seul régulon CodY déterminé chez *S. pneumoniae* a été réalisé en contexte D39 et sur un triple mutant *codY fatC^{C496T} amiC^{G1459T}* (Hendriksen *et al.*, 2007) (chapitre 2). Ces deux gènes semblent être impliqués dans le transport du fer (voir chapitre 2). Une trop forte accumulation de fer dans les mutants *codY* ne permettrait pas la survie de ces mutants.

Cependant, l'étude de la descendance d'une transformation de la souche sauvage par l'ADN de la souche *codY* portant les deux suppresseurs montre qu'il existe d'autres catégories de mutants qui ne portent pas *fatC^{C496T}* et/ou *amiC^{G1459T}* et qui permettent de supprimer l'inviabilité des mutants *codY* (table 3).

L'ensemble de ces mutants et leur capacité à compenser l'absence de CodY en développant la compétence sont discutés dans la table 3.

Premièrement, certains mutants *codY* portent également une copie sauvage de *codY* qui restore la viabilité. Ces clones sont mérodiplôides.

Catégorie	<i>amiC</i>	<i>fatC</i>	contexte	remarques/perspectives
mérodiplôides	+	+	<i>comC</i> +/-	ces mutants portent au moins une copie de <i>codY</i> sauvage et une copie de <i>codY</i> mutée.
I	-	-	<i>comC</i> -	le phénotype <i>cup</i> conféré par <i>amiC</i> et <i>fatC</i> ne semble pas nécessaire à la suppression. Le niveau basal d'expression des gènes de compétence est peut-être important.
II	-	+	<i>comC</i> -	
III	-	+	<i>comC</i> + <i>aliA</i> -	aucun clone en contexte <i>aliA</i> - n'est <i>fatC</i> -, <i>aliA</i> - permet peut être la suppression grâce à l'association <i>amiC</i> - <i>aliA</i> -.
IV	+	+	<i>comC</i> +	Ces mutants pourraient être <i>cup</i> ou portent d'autres mutations suppressives
V	+	+	<i>comC</i> + <i>glnR</i> -	<i>glnR</i> pourrait induire un phénotype <i>cup</i> qui permettrait de supprimer ou <i>glnR</i> lui-même permet de supprimer.

Table 3 : Récapitulatif des contextes permettant de compenser l'absence de CodY

Le rôle de CodY dans la régulation de la compétence a été recherché grâce à la souche D39Δ*cps*Δ*codY* qui porte les deux mutations suppressives *fatC^{C496T}* et *amiC^{G1459T}* (chapitre 2). Les résultats de cette analyse ne sont pas très concluants. En effet, la comparaison du phénotype en compétence de la souche sauvage D39Δ*cps*, du mutant D39Δ*cps*Δ*codY* et de

son dérivé *codY*⁺ montre que les deux mutants ont un fort phénotype *cup*. Le rôle de *codY* dans cette expérience serait d'atténuer le phénotype *cup* de son dérivé *codY*⁺.

De plus, l'étude du développement spontané de la compétence dans le mutant *fatC::spc^{23C} amiC9 codY* et dans son dérivé *codY*⁺ montre un effet inverse.

Au vu de ces résultats, il est difficile de conclure sur une éventuelle répression de la compétence par *CodY*.

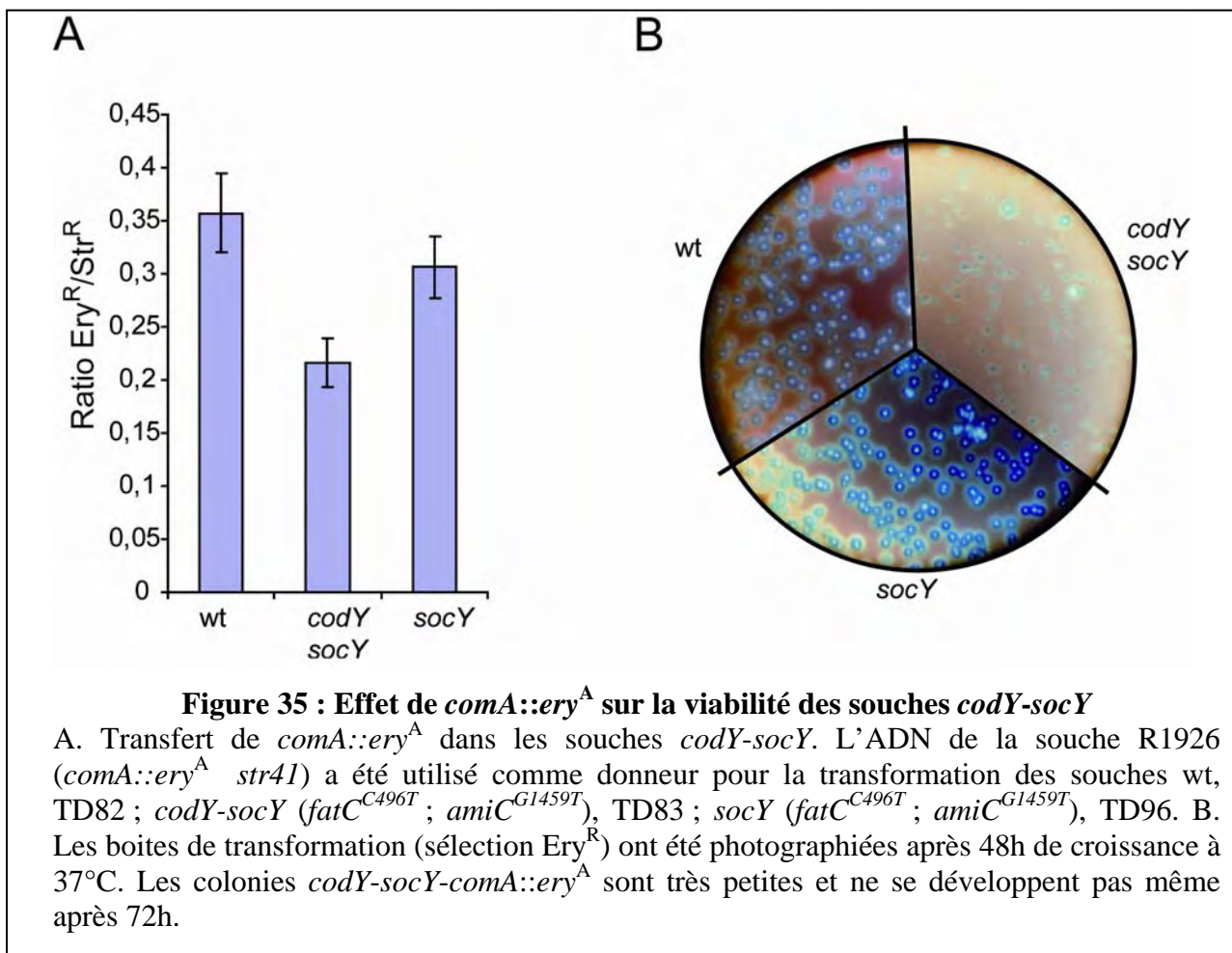
II.2) *CodY* réprime-t-elle la compétence ? Utilisation de *comA::ery^A*

Au début de ce travail, nous avons proposé que *CodY* pourrait réprimer la compétence. Malgré l'absence de *codY*-box devant les gènes *comAB* et *comCDE*, une régulation par *CodY* est possible. En effet, il a été montré chez *L. lactis*, *B. subtilis* et d'autres espèces que les promoteurs de certains gènes régulés directement par *CodY* ne portent pas la séquence consensus (Guedon et al., 2005 ; Guedon et al., 2005 ; Belitsky et Sonenshein, 2007 ; Majerczyk et al., 2010 ; Malke et al., 2006 ; Lemos et al., 2008 ; Hendriksen et al., 2007). Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé l'expérience préliminaire suivante.

La souche D39Δ*cps*Δ*codY* et son dérivé *codY*⁺ ont été transformées avec l'ADN d'une souche *comA::ery^A*. Dans cette souche le gène *comA* est inactivé par l'insertion d'une cassette de résistance à l'érythromycine (anti-transcrite par rapport à *comA*). Le promoteur de cette cassette de résistance est très faible et il a été montré que son expression était dépendante de l'expression du gène dans lequel il est inséré (Martin et al., 2000). Si *CodY* réprime la compétence, alors dans le mutant *codY*, le niveau d'expression des gènes précoces (dont *comA*) sera augmenté. Alors l'expression de la cassette de résistance à l'érythromycine sera diminuée, et les transformants *comA::ery^A* n'auront pas une croissance normale sur boîte contenant de l'érythromycine. La figure 35 présente les résultats obtenus.

La souche sauvage, la souche D39Δ*cps*Δ*codY* et son dérivé *codY*⁺ acceptent avec une fréquence équivalente la mutation *comA::ery^A*. Ceci confirme les résultats obtenus à la figure 34 et montre que l'induction de la compétence n'est pas nécessaire à la suppression. En revanche, on voit clairement que les colonies obtenues dans la souche D39Δ*cps*Δ*codY* sont extrêmement petites. Ce résultat indique que dans cette souche l'expression de la cassette de résistance à l'érythromycine est faible et par conséquent, celle de *comA* est augmentée. L'expression du gène *comA* est augmentée dans le mutant *codY*. En revanche, pour la souche qui porte les deux suppresseurs mais qui est *codY*⁺, la taille des colonies est équivalente à celles de la souche sauvage. Il semble donc que la réduction de l'expression du gène *comA*

soit essentiellement due à l'absence de CodY. Il semble donc que CodY ait un effet négatif sur l'expression du gène *comA*, et par conséquent sur la compétence.



Des expériences complémentaires seront nécessaires pour confirmer cet effet. Le suivi de l'expression de *comA* par une fusion transcriptionnelle entre *comA* et le gène de la luciférase pourrait permettre de confirmer les résultats de cette expérience. De plus l'expression du gène *comA* étant sous la dépendance de ComE, le suivi de l'expression de *comCDE* pourra nous permettre de savoir si cette régulation est dépendante de ComE et/ou du CSP.

Pour finir, il serait intéressant de savoir si la protéine CodY est capable de retarder sur gel une sonde portant la région promotrice des gènes *comA* et *comC*. Cette expérience permettrait de déterminer si le rôle répresseur de CodY est direct ou indirect.

La protéine CodY semble être un répresseur de la compétence. Ceci est en accord avec notre modèle de départ faisant intervenir le transport de peptides via Ami/Obl dans la régulation. Cependant, il reste encore beaucoup de travail pour démontrer cet effet.

III) Matériel et méthodes

Souches, plasmides et oligonucléotides utilisés :

Souche	Génotype/description	Référence
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
D39 Δ cps	D39 Δ cps:: <kan ;="" kan<sup="">R</kan>	(Hendriksen <i>et al.</i> , 2007)
D39 Δ cps Δ codY	D39 Δ cps:: <kan <math="">\DeltacodY::<trim (amic<sup="">G1459T fatC^{C496T}) ; Kan^R, Trim^R, (Mtx^R)</trim></kan>	(Hendriksen <i>et al.</i> , 2007)
R246	R800 mais hexA Δ 3::ermAM ; Ery ^R	(Mortier-Barrière <i>et al.</i> , 1998)
R304	dérivé R800, nov1, rif23, str41 ; Nov ^R , Rif ^R , Str ^R	(Mortier-Barrière <i>et al.</i> , 1998)
R800	dérivé R6	(Lefèvre <i>et al.</i> , 1979)
R1501	R800 mais comC ₀	(Dagkessamanskaia <i>et al.</i> , 2004)
R1502	R1501 mais ssbB::luc (ssbB ⁺) ; Cm ^R	(Dagkessamanskaia <i>et al.</i> , 2004)
R1926	R800 mais comA::ery ^A str41 ; Ery ^R , Str ^R	Ce travail
R2438	R1501 mais codY ^{spc/+} str41 ; Kan ^R , Spc ^R , Str ^R	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
R2597	R1502 mais codY ⁺ , ?::?codY::trim?::? ; Cm ^R , Trim ^R	Ce travail
R2641	R895 mais kan ^{90C} ::codY+ str41 ; Cm ^R , Kan ^R , Str ^R	Ce travail
R2644	R895 mais spc ^{90C} ::codY+ str41 ; Cm ^R , Spc ^R , Str ^R	Ce travail
R2994	R800 mais comA::spc ⁴² str41 ; Spc ^R , Str ^R ,	Ce travail
R3021	R1501 mais ccpA::kan ^{1A} ; Kan ^R	Ce travail
R3015	R1501 mais glnR::kan ^{22C} ; Kan ^R	Ce travail

R3022	R1501 mais <i>codY::trim, ?::?codY⁺?::?</i> ; Cm ^R , Trim ^R	Ce travail
R3023	R1501 mais <i>codY::trim, ?::?codY⁺?::?</i> ; Cm ^R , Trim ^R	Ce travail
TD80	D39Δ <i>cps</i> mais <i>aliA</i> ⁺	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
TD80	D39Δ <i>cps</i> Δ <i>codY</i> (<i>socY</i>) mais <i>str41</i> ; Kan ^R , Str ^R , Trim ^R	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
TD81	TD80 mais <i>codY::spc^{3A}</i> ; Kan ^R , Spc ^R , Str ^R	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
TD82	D39Δ <i>cps</i> mais <i>ssbB::luc</i> (<i>ssbB</i> ⁺) ; Cm ^R , Kan ^R	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
TD83	D39Δ <i>cps</i> Δ <i>codY</i> mais <i>ssbB::luc</i> (<i>ssbB</i> ⁺) ; Cm ^R , Kan ^R , Trim ^R	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
TD84	D39Δ <i>cps</i> mais <i>amiC9</i> ; Kan ^R , Mtx ^R	Ce travail
TD97	TD83 mais <i>codY</i> ⁺ ; Kan ^R	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
TD139	D39Δ <i>cps</i> mais <i>hexAΔ3::ermAM</i> ; Ery ^R , Kan ^R	Ce travail
TD129	D39Δ <i>cps</i> mais <i>fatC::spc^{23C}</i> ; Kan ^R , Spc ^R	Ce travail
TD130	TD129 mais <i>amiC9</i> ; Kan ^R , Mtx ^R	Ce travail
TD131	TD129 mais <i>fatC::cm^{23C}</i> ; Cm ^R , Kan ^R	Ce travail
TD132	TD129 mais <i>fatC::cm^{23C}</i> ; Cm ^R , Kan ^R , Mtx ^R	Ce travail
TD141	TD131 mais <i>hexAΔ3::ermAM</i> ; Cm ^R , Ery ^R , Kan ^R	Ce travail
TD142	TD132 mais <i>hexAΔ3::ermAM</i> ; Cm ^R , Ery ^R , Kan ^R , Mtx ^R	Ce travail
TD143	TD84 mais <i>hexAΔ3::ermAM</i> ; Ery ^R , Kan ^R , Mtx ^R	Ce travail
TD169	TD41 mais <i>codY^{ery/+}</i> ; Kan ^R , Ery ^R	Ce travail
TD170	D39Δ <i>cps</i> mais <i>str41</i> ; Kan ^R , Str ^R	Ce travail

oligonucléotides	Séquence ; gène ; position	
AmiF1	GCCTTGCTTTCAGCGGTACCAAT ; <i>amiF</i> ; +789	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
CodY1	CAAGGATCAGTTTTCCCATATTTTCG ; <i>codY</i> ; +1636	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
CodY2	CTTCGTGTCCTTCGTGACTTTA ; <i>codY</i> ; -1004	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
CodY4	CAGAGGAGCAGTTGCAGGATG ; <i>codY</i> ; +73	Ce travail
CodY6	GTTAAGAAGCTGAATCCCAACAAC ; <i>codY</i> ; +480	Ce travail
CodY10as	AATGCCGACAGTGAGGGCAG ; <i>codY</i> ; +5866	Ce travail
CodY10s	ATAGACCGCATGGTTTACCC ; <i>codY</i> ; -5074	Ce travail
CodYatg	tgaatc ATG aCACATTTATTAGAAAAACTAG ; <i>codY</i> ; 0	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
CodYstop	aaattggaatcTTTGTCATTAGTAATCTCTTTTC ; <i>codY</i> ; +797	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
CodYrbs	atcctcatGATTAAATTCGAGGTGAAAA ATG GC ; <i>codY</i> ; -20	Ce travail
CcpA1	CTCAAACGGAACACTATTCGAAACTA ; <i>ccpA</i> ; -530	Ce travail
CcpA2	GCTCAAAAATTAGAAAGCCTTCTG ; <i>ccpA</i> ; +1496	Ce travail
FatC1	TAAAAGCAAACATACCAAGC ; <i>fatC</i> ; +8	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
FatC2	TAAAGAATAAGAAGCCACCC ; <i>fatC</i> ; +928	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
GlnR1	ATGGACGCTATCGTGAAACAACC ; <i>glnR</i> ; -922	Ce travail
GlnR2	GCGTTATTTCTTCTGCATCAAAC ; <i>glnR</i> ; +1169	Ce travail
Kan1	ATCATGTCCTTTTCCCGTTCCAC ; <i>kan</i> ; +191	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
MP188	TTCATTTTCACCAACCAGGTTAC ; <i>codY</i> ; +1032	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)

MP189	ATTGGCTGCTGAGTTTACTCCAG ; <i>codY</i> ; -618	(Caymaris <i>et al.</i> , 2010)
Trim1	GGTTTGGTAAGGGCTTGCCTAT ; <i>dfr13</i> ; +187	Ce travail
Trim2	GGAGCCGAGGTATATGCGCT ; <i>dfr13</i> ; +309	Ce travail
s1440_1	CGACCTCCCTTAGCTTTACC ; <i>spr1440</i> ; +593	Ce travail
s1440_2	GTTGCGACAGACGTTGCAGC ; <i>spr1440</i> ; +93	Ce travail
scodY1	GGTGACAGCAGTACGACGAC ; <i>codY</i> ; +51	Ce travail
scodY2	TTACATCAATTTTGAAACGC ; <i>codY</i> ; +511	Ce travail
sentB1	CATTTTCACCAACCAGGTTA ; <i>entB</i> ; +1379	Ce travail
sentB2	GATGCCATTAGCAAGGTAAC ; <i>entB</i> ; +879	Ce travail
strim1	CCGGTACCGTTACGACGCGC ; <i>dfr13</i> ; +500	Ce travail
strim2	ATGA ACCCGGAATCGGTCCG ; <i>dfr13</i> ; 0	Ce travail

Table 4 : souches, plasmides et oligonucléotides utilisés dans cette étude

Ap^R, résistance à l'ampicilline ; Cm^R, résistance au chloramphénicol ; Ery^R, résistance à l'érythromycine ; Kan^R, résistance à la kanamycine ; Mtx^R, résistance au methotrexate ; Nov^R, résistance à la novobiocine ; Rif^R, résistance à la rifampicine. Spc^R, résistance à la spectinomycine ; Str^R, résistance à la streptomycine ; Trim^R, résistance au triméthoprim.

Les minuscules indiquent l'extension qui a permis l'introduction de sites de restriction (*NdeI*, *BamHI*, respectivement, dans *CodYatg* et *CodYstop*; séquence soulignée) dans l'oligonucléotide. Les codons d'initiation et les codons stop sont en gras. La position des oligonucléotides est donnée par rapport à l'ATG du gène correspondant ; - et + indique en amont et en aval respectivement. C et A indiquent, respectivement, l'orientation co-transcrite et antitranscrite de la cassette de résistance aux antibiotiques des transposons insérés par rapport au gène ciblé.

Milieux et conditions de culture :

La composition des milieux C+Y, THY (pH ajusté à 6.8) et Gélose D est décrite par G. Alloing (Alloing *et al.*, 1996) ; Luciférine (D-Luciferin firefly, Euromedex, ref 8240B) : solution à 2.7 mg/mL préparée en milieu C+Y ; CSP : solution mère de CSP1 synthétique à 100 µg/mL en sodium acétate conservée à -20°C ; Antibiotiques : sélection sur boîte : kanamycine (SIGMA) utilisée en solution aqueuse à 250 µg/mL, spectinomycine (SIGMA)

utilisée en solution aqueuse à 100 µg/mL, streptomycine (SIGMA) utilisée en solution aqueuse à 200 µg/mL ; Sérine hydroxamate : gamme préparée à partir d'une solution aqueuse mère à 2 mg/mL ; triméthoprime (SIGMA) utilisé en solution 100% DMSO à 20 µg/mL.

Mutagenèse mariner:

Les gènes d'intérêt : *ccpA* et *glnR* ont été amplifiés par PCR fidèle avec la Phusion (Ozyme) et les couples d'oligonucléotides CcpA1/CcpA2, GlnR1/GlnR2 respectivement *ccpA*, *glnR*. Les produits PCR purifiés ont été soumis à la mutagenèse *mariner* (Prudhomme *et al.*, 2007). Les produits de mutagenèse ont ensuite été transformés dans la souche R1501.

Transformation :

Les méthodes de préparation des cellules sont décrites dans (Martin *et al.*, 1995). Les cellules sont mis en croissance dans du milieu C+Y (ajusté à pH6.8) jusqu'à une DO (à 550nm) d'environ 0.4, les cellules sont alors lavées et reprises dans du milieu C+Y (pH6.8) contenant 15 % de glycérol. La préculture est ensuite conservée à -80°C. La préculture est ensuiteensemencée au 1/100^{ième} dans du milieu C+Y (pH6.8) et la croissance est menée jusqu'à une DO (à 550nm) d'environ 0.15. La culture est ensuite concentrée 10 fois dans du milieu C+Y (pH6.8) contenant 15 % de glycérol. Les cellules précompétentes sont alors aliquotées et conservées à -80°C. La transformation de *S. pneumoniae* est décrite dans (Martin *et al.*, 2000). Les cellules précompétentes sont diluées 10 fois dans du milieu C+Y contenant 100ng/mL de CPS1 et incubées 10 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite mis en présence d'ADN et incubées pendant 20 minutes à 30°C. Une étape d'expression phénotypique est réalisée dans la masse de gélose D contenant 4.5 % de sang de cheval défibriné pendant 2h à 37°C. Ensuite une deuxième couche de gélose D contenant l'antibiotique adapté est ajoutée à la première. Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit à 37°C. Dans le cas d'une expression phénotypique liquide, après incubation des cellules en présence d'ADN, les cellules sont diluées 20 fois dans du milieu C+Y et incubées environ 4h à 37°C, puis étalées dans la masse de gélose D contenant 4,5% de sang et l'antibiotique adapté, et sont incubées toute la nuit à 37°C.

Localisation des insertions :

Les insertions des minitransposons sont localisées par PCR avec Taq Core (Q-biogen) et les oligonucléotides MP127/CcpA1, MP127/GlnR1 pour les gènes *ccpA* et *glnR* respectivement. L'orientation du transposon est ensuite réalisée par PCR avec Taq Core et un

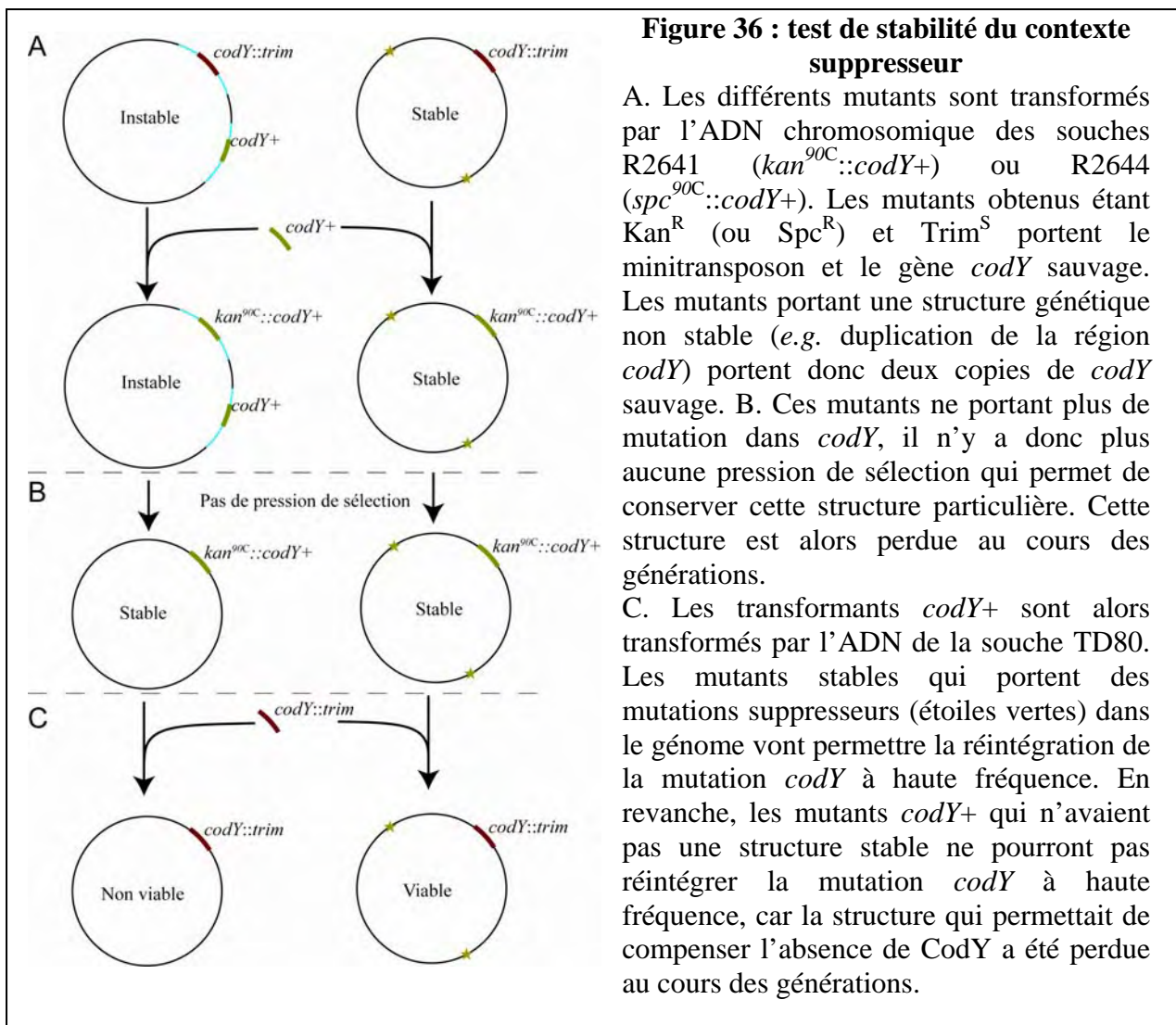
couple d'oligonucléotides contenant MP128 et un des deux oligos ayant servi à amplifier le gène à muter. Les produits PCR ont ensuite été séquencés et les insertions localisées précisément.

Echange de cassette de résistance

Le plasmide pR409 a été linéarisé par digestion (*Bsa*I) puis purifié sur gel (QIAQUICK PCR purification kit, Qiagen). L'ADN ainsi obtenu a été transformé dans la souche R2438 et les transformants sélectionnés sur boîte contenant de l'érythromycine.

Test de la stabilité génétique des différents contextes suppresseurs

Ce test est réalisé à partir des différents mutants obtenus par transformation des souches sauvages R1501 et D39Δ*cps* par l'ADN chromosomique des souches TD80 ou TD81



Construction de la souche TD97

La souche TD83 a été transformée avec un fragment PCR amplifié avec les oligonucléotides CodY1/CodY2 sur la souche R304. Les transformants ont été striés sur boîte contenant du triméthoprimine et sur boîte sans sélection. Les transformants sensibles au triméthoprimine ont été sélectionnés et vérifiés par PCR. Un de ces clones a été nommé TD97

Etude de la structure génomique par champs pulsés

Les souches ont été cultivées en THY jusqu'à une DO de 0,2, puis lavées dans un tampon TEE (Tris (pH9) 10mM, EDTA 100mM, EGTA 10mM) et concentrées à DO ~1,6 en TEE. Les cellules ont ensuite été mélangées (1V/1V) avec du LMP (Low Melting Point) agarose 2% (dans TEE) et déposées dans les moules rectangulaires d'environ 100µl. Une fois les blocs de cellules polymérisés, les blocs sont traités par 2.5ml (pour environ 10 blocs) de TEE contenant 0,05% de Sarcosyl et 0,2% de DOC (Déhydroxycholate) pendant 2 à 3h à 37°C. Les blocs sont ensuite transférés dans 2.5 ml de tampon de lyse (TEE, 1%SDS, 1mg/ml Protéinase K) et incubés toute la nuit à 55°C. La protéinase K est ensuite inactivée par un lavage des blocs pendant 1h à température ambiante dans un bain de 30 ml de TE1X (Tris pH8 100mM, EDTA 10mM) contenant 0.1 mM de PMSF (Phenyl Methyl Sulphonyl Fluoride). Les blocs sont ensuite dialysés 3 fois dans un bain de 30 ml de TE1X pendant 1h à température ambiante.

Un tiers de bloc (environ 35µl) a été transféré dans un tube contenant 250µl de Tampon NEB4 1X contenant 0,1 mg/ml de BSA et digérés par ajout de 250 U/ml de *SmaI*, *ApaI* ou *SacII* et incubés toute la nuit à 37°C (*SacII*) ou à 25°C (*SmaI*, *ApaI*). La réaction de digestion a été arrêtée par transfert des blocs dans 1ml de TE10/50 (Tris pH8 10mM, EDTA 50mM). Les blocs digérés ont été déposés dans un gel TBE (0.05M) 1% agarose. La migration a été réalisée à 275V en champs pulsé (CHEF : Contour-clamped Homogeneous Electric Field) 8s n/s, 8s e/w pendant 13h30, ou 4s n/s, 4s e/w pendant 13h. Les gels ont ensuite été colorés au BET.

Les gels ont été plongés dans un bain de 800 ml de NaOH 0,5 M, NaCl 0,15 M pendant 1h à température ambiante puis transférés dans un bain de Tris-Cl pH 7,5 ; 0,5 M, NaCl 0,15 M pendant 1h à température ambiante. Les gels ont ensuite été séchés pendant 45 min à 60°C et placés dans des bouteilles à hybridation contenant 25 ml de tampon d'hybridation (6X SSC, 5mM EDTA, 0.1%SDS, 2,5% lait, 50% Formamide) puis mis dans le four à hybridation pendant 45 min à 42°C. 25 ng de sondes sont marqués au ³²P α-dATP grâce au kit mégaprime DNA labelling system (Amersham). 25ng de sonde marquées (et 7-10

ng de marqueur lambda (Sigma) et gene ruler (Promega) marqués à la première hybridation) ont été ajoutés dans la bouteille contenant le gel et le tampon d'hybridation. L'hybridation se fait sur la nuit dans le four à hybridation à 42°C. Deux lavages sont effectués avec 30ml de SSC 2X, SDS 0,1% à température ambiante pendant 20 min. Et deux autres lavages sont effectués avec 30ml de SSC 0,1X, SDS 0,1% à 60°C pendant 20 min. Les gels hybridés sont alors révélés au PhosphorImager.

Les sondes ont été amplifiées par PCR sur la souche sauvage avec les paires d'oligonucléotides scodY1/scodY2 (sonde *codY*), s1440_1/s1440_2 (sonde *1440*), sentB1/sentB2 (sonde *entB*) et sur la souche TD80 avec la paire d'oligonucléotides strim1/strim2 (sonde *trim*).

C. CONCLUSION

La bactérie *Streptococcus pneumoniae* est un pathogène majeur qui provoque de nombreuses maladies (World Health Organization, 2007). La lutte contre *S. pneumoniae* passe par l'utilisation d'antibiotiques et la vaccination. Ces deux stratégies se heurtent à la grande variabilité génétique de cette bactérie due à la transformation naturelle. Chez *S. pneumoniae*, la transformation naturelle est possible lors d'un changement d'état physiologique transitoire finement régulé appelé compétence. (Claverys et Håvarstein, 2002).

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée aux mécanismes permettant l'initiation de la compétence, et plus particulièrement aux effets du métabolisme central sur ce phénomène. L'observation que le transporteur d'oligopeptides Ami/Obl est impliqué dans la répression de la compétence, nous a amené à penser que le métabolisme pourrait être perçu par les mécanismes déclenchant la compétence (Alloing *et al.*, 1998), et deux candidats ont été retenus : le ppGpp et CodY. Leur rôle dans la régulation de la compétence a été analysé.

I) Rôle du ppGpp dans la régulation de la compétence

Pour étudier le rôle du ppGpp dans la compétence, nous avons utilisé la sérine hydroxamate. Cette molécule étant capable chez *E. coli* d'induire une augmentation drastique de la concentration intracellulaire en ppGpp (Tosa et Pizer, 1971b ; Tosa et Pizer, 1971a), nous avons émis l'hypothèse que cette molécule aurait le même effet chez *S. pneumoniae*. Les résultats obtenus (chapitre 1) montrent que cette molécule est capable d'induire la compétence du pneumocoque.

I.1) Production de ppGpp chez *S. pneumoniae*

Quand mes travaux sur l'implication du ppGpp dans la régulation de la compétence ont été réalisés, aucun article n'était paru sur la réponse stringente chez *S. pneumoniae*. Nous avons remarqué que les deux gènes *rshA* et *rshQ* sont impliqués dans la synthèse de ppGpp comme publié récemment chez *S. mutans* (Lemos *et al.*, 2007). La protéine RshA, qui contient les domaines de synthèse et de dégradation du ppGpp ainsi que des domaines de régulation, est responsable de la synthèse majoritaire de ppGpp (Kazmierczak *et al.*, 2009). La protéine RshQ, qui est une protéine de petite taille qui contient uniquement le domaine de synthèse, est capable de produire du ppGpp (Battesti et Bouveret, 2009). Nous avons montré qu'en milieu carencé en présence de sérine hydroxamate à forte concentration, RshA synthétise du ppGpp. Dans ces conditions, aucune activité de synthèse de ppGpp n'a pu être

mise en évidence pour RshQ. Les conditions utilisées ne sont probablement pas optimales pour révéler l'activité de synthèse portée par RshQ. Des expériences complémentaires de dosage de ce nucléotide devront être menées dans différentes conditions de culture pour révéler l'activité de RshQ. Par exemple, le dosage du ppGpp au cours de la croissance du mutant *rshA* en milieu C+Y devrait pouvoir révéler la synthèse de ppGpp par RshQ.

I.2) ppGpp un activateur de la compétence

Nous avons également montré que l'induction de la compétence en réponse à la sérine hydroxamate n'est pas uniquement médiée par le ppGpp. En effet, la SHX est encore capable d'induire la compétence dans une souche double mutante *rshA rshQ*. Cependant l'observation que la cinétique d'induction de la compétence en réponse à la SHX est ralentie dans la souche incapable de produire du ppGpp montre que le ppGpp est un agent activateur de la compétence. Le ppGpp semble « accélérer » la réponse. En outre, le niveau basal d'expression des gènes de compétence est légèrement diminué dans le double mutant *rshA rshQ*.

Le ppGpp joue probablement un rôle activateur de la compétence en augmentant l'expression basale des gènes de compétence. Ceci est cohérent avec l'augmentation de l'expression des gènes *comA* et *comC* en réponse à la muporicine (Kazmierczak *et al.*, 2009). Or, il a été démontré qu'une augmentation du niveau basal d'expression des gènes de compétence est responsable de l'initiation de la compétence dans des milieux où la souche sauvage en est incapable (Martin *et al.*, 2000).

I.3) Particularité du mutant *rshA*

Le mutant *rshA* a un phénotype particulier. La croissance de ce mutant est ralentie. L'étude récente de mutants *rshA* montre qu'en milieu riche la croissance de *rshA* est sauvage. En revanche, en milieu minimum, ce mutant est incapable de croître (Kazmierczak *et al.*, 2009). Il est envisageable, que dans le milieu C+Y utilisé dans notre étude, un composé limite la croissance du mutant *rshA*.

En outre, ce mutant a un phénotype *cup* (competence up). Dans ce mutant *rshA*, seule la protéine RshQ est capable de produire du ppGpp. Cette protéine produit probablement du ppGpp en réponse à différents signaux au cours de la croissance. En l'absence de RshA, le ppGpp produit ne peut pas être dégradé (RshQ ne porte pas le domaine de dégradation). Ceci augmente la concentration en ppGpp dans la cellule. Le ppGpp étant un agent inducteur de la compétence, celle-ci est donc dérégulée dans le mutant *rshA*.

I.4) Différents modèles de mode d'action du ppGpp sur l'induction de la compétence

Lorsque la compétence est induite par la sérine hydroxamate, l'induction se fait de manière plus précoce dans la souche sauvage que dans la souche incapable de produire du ppGpp. Le ppGpp semble activer la boucle autocatalytique qui aboutit à l'induction de la compétence. Cette action peut être médiée de différentes manières : soit en activant l'expression de *comCDE* ou de *comAB*, soit en provoquant dans la cellule des changements qui engendrent à leur tour l'induction de la compétence.

Chez *E. coli*, le ppGpp est responsable de la diminution de la transcription des ARN ribosomiques (Krásný et Gourse, 2004). L'ARN polymérase est alors disponible pour la transcription d'autres gènes. Les gènes de compétence en font peut-être partie chez *S. pneumoniae*.

Le ppGpp est une alarmone capable de produire un changement global dans le profil d'expression des gènes et dans la physiologie de la cellule chez *E. coli* (Cashel *et al.*, 1996). Par exemple, la production de ppGpp a pour conséquence de faire diminuer la concentration de son précurseur le GTP. De plus, le ppGpp est capable d'inhiber la synthèse de GTP (inhibition de l'IMP déshydrogénase chez *B. subtilis* (Ochi *et al.*, 1982)). Dans des mutants de *S. pneumoniae* de gènes impliqués dans la synthèse de GTP : *guaA* et *guaB*, la compétence est déréprimée (Marc Prudhomme, communication personnelle). De plus, l'utilisation de décoyinine (agent permettant d'inhiber la synthèse de GTP) conduit à l'induction de la compétence. Le GTP pourrait donc être un signal permettant de réprimer la compétence.

En outre, le ppGpp est également capable de bloquer la réplication au niveau de l'initiation chez *E. coli* (Chiaramello et Zyskind, 1989) et de l'élongation chez *B. subtilis* (Wang *et al.*, 2007). Il est donc possible que le blocage de la réplication soit un signal permettant l'induction de la compétence. Des expériences préliminaires réalisées au laboratoire montrent que certaines molécules capables de bloquer les fourches de réplication sont capables d'induire la compétence (Vanessa Khemeci, communication personnelle).

Des expériences complémentaires seront nécessaires pour répondre à ces questions, des études de transcription *in vitro* en présence de ppGpp ou de GTP pourront être utiles pour élucider ce mécanisme.

Le ppGpp a donc un effet activateur de la compétence. Le mécanisme de cette régulation reste encore à élucider.

II) Rôle de CodY dans la régulation de la compétence

II.1) *codY* est un gène essentiel

Pour déterminer le rôle de CodY dans la régulation de la compétence, nous avons essayé d'obtenir un mutant *codY*. Mes travaux montrent que *codY* est un gène essentiel chez *S. pneumoniae* R800, et D39. R800 et D39 étant des descendants d'un même isolat clinique, il serait intéressant de savoir si cette propriété est commune à tous les contextes génétiques de *S. pneumoniae*. De plus, chez différentes espèces de microorganismes, des mutants de ce gène ont pu être obtenus.

Le régulon CodY a été déterminé chez *S. pneumoniae* à l'aide d'une souche mutante pour *codY* (Hendriksen *et al.*, 2007). Nous avons démontré que cette souche porte deux autres mutations dans les gènes *amiC* et *fatC* qui permettent de compenser l'absence de CodY. Il est donc envisageable que chez d'autres espèces assez proches de *S. pneumoniae*, le gène *codY* soit essentiel, mais que cette propriété ait été masquée par la présence de mutations supprimeuses dans les souches mutantes.

II.2) Viabilité des mutants *codY*

L'essentialité de *codY* suggère que ce régulateur contrôle des gènes dont la fonction est cruciale pour la survie de *S. pneumoniae*. CodY réprime *fat*, opéron impliqué dans le transport du fer (Hendriksen *et al.*, 2007). Dans un mutant *codY*, il y aura donc une dérégulation de l'import du fer (Hendriksen *et al.*, 2007). De plus, CodY réprime également *ami*, opéron impliqué dans le transport de peptides. Un transporteur de peptide homologue est également impliqué chez *E. Coli* dans l'utilisation du fer de l'hème (Létoffé *et al.*, 2006). Il est donc possible que le transporteur Ami de *S. pneumoniae* soit également impliqué dans ce processus. Dans un mutant *codY*, la dérégulation de ces deux opérons peut générer un grand stress oxydatif.

CodY est également impliqué dans l'activation du gène *dpr*. Dpr est une protéine impliquée dans la résistance au stress oxydatif (Pulliainen, 2002). Dans un mutant *codY*, la quantité de Dpr est diminuée. Si on considère la surexpression de l'export du fer et la diminution de la quantité de protéine Dpr dans un mutant CodY, le stress oxydatif engendré doit être suffisamment intense pour inhiber la croissance de *S. pneumoniae*. L'inactivation des opérons *fat* et *ami* semble donc être un moyen suffisant pour réduire l'import de fer et le stress oxydatif.

II.3) Plusieurs contextes génétiques permettent de supprimer l'inviabilité des mutants *codY*

L'étude de différents mutants *codY* obtenus par transformation d'une souche sauvage dans deux contextes génétiques différents (R1501 et D39 Δ *cps*) par l'ADN de la souche D39 Δ *cps* Δ *codY* montre que les mutations *amiC*^{G1459T} et *fatC*^{C496T} ne sont pas les seules mutations capables de compenser l'absence de CodY. En effet, la majorité des mutants obtenus par cette technique ne portent pas les mutations *fatC* et *amiC*.

II.3.1) Mérodiplôidie et essentialité de *codY*.

Une partie des mutants *codY* portent également une copie sauvage de *codY*. Ces mutants qui portent une duplication du locus *codY* sont mérodiplôïdes. Nous avons montré que les différents mutants mérodiplôïdes ont une structure génétique différente. De plus, l'étude de la structure chromosomique de la souche mérodiplôïde R2597 par deux méthodes montre que la duplication de la région *codY* contenue dans cette souche n'est pas stable et qu'elle peut être remaniée au cours de la croissance.

Le séquençage génomique de cette souche a permis de mettre en évidence l'étendue de la duplication. Une séquence répétée dans le génome de *S. pneumoniae*, IS861, est présente dans les régions qui bornent cette duplication. Il est possible que cette IS joue un rôle dans la formation de ces duplications. Des travaux supplémentaires seront nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

II.3.2) La mutation *fatC*^{C496T} n'est pas essentielle pour compenser l'absence de CodY en contexte D39 Δ *cps*.

L'observation qu'aucun clone issu de la transformation de la souche D39 Δ *cps* par l'ADN D39 Δ *cps* Δ *codY* ne porte pas la mutation *fatC*^{C496T}, suggère que cette mutation n'est pas essentielle pour compenser l'absence de CodY dans ce contexte. Ceci nous a conduit à vérifier si les deux mutations *fatC* et *amiC* sont nécessaires pour supprimer l'inviabilité de *codY* dans le contexte D39 Δ *cps*. Dans ce contexte, la mutation *amiC* est suffisante.

Alors pourquoi la souche D39 Δ *cps* Δ *codY* construite par W. Hendriksen porte-t-elle la mutation *fatC* ? Cette souche a été construite en transformant un fragment PCR contenant le marqueur Δ *cps*::*kan* dans la souche D39 Δ *codY*. C'est donc dans un contexte D39 que le mutant *codY* a été construit et non pas en contexte D39 Δ *cps*. Il est probable que dans le contexte D39, la mutation *fatC* soit nécessaire (voir chapitre 2). La différence entre ces deux contextes est la mutation Δ *cps*::*kan*. Cette mutation introduit 2 différences avec la souche D39 : une absence de capsule et une mutation dans le gène *aliA*. Comme démontré au chapitre

2, en contexte R800, les mutations *amiC* et *fatC* sont nécessaires. Or, la souche R800 est décapsulée tout comme D39 Δ *cps* mais ne porte pas de mutation *aliA*. La mutation *aliA* pourrait être responsable de ce phénotype particulier. Pour prouver cette hypothèse, il faudra déterminer l'effet des mutations *fatC* et *amiC* dans la suppression en contexte D39, D39 *aliA*, R800 *aliA*.

II.3.3) Rôle de la compétence dans la suppression ?

Les mutations *fatC* et *amiC*, qui compensent l'absence de CodY, dérèglent la compétence. La compétence étant considérée comme une réponse générale au stress (Prudhomme *et al.*, 2006 ; Claverys *et al.*, 2006), son activation pourrait contrer le stress oxydatif présent dans les mutants *codY*.

Au cours de ces travaux, nous avons montré que l'inactivation de l'export de CSP n'est pas délétère pour la survie des mutants *codY*. Mais, les mutants *fatC amiC codY* sont peut-être capables d'induire la compétence de manière CSP-indépendante. Ce genre de phénotype a déjà été observé pour des mutants *comD* et *comE* (Martin *et al.*, 2000 ; Echenique *et al.*, 2000). De plus, une augmentation du niveau basal d'expression des gènes de compétence est peut-être suffisante pour protéger la cellule du stress oxydatif.

II.3.4) D'autres contextes possibles ?

Cette analyse a également permis de mettre en évidence que certains mutants ne portent ni la mutation *fatC*^{C496T} ni la mutation *amiC*^{G1459T}. Ces clones sont peut-être mutants pour d'autres gènes du transporteur Ami et/ou pour d'autres gènes impliqués dans le transport du fer (chez *S. pneumoniae* 3 opérons sont impliqués dans l'import du fer).

De plus, au cours de ce travail, trois candidats supresseurs ont été testés : *ccpA*, *rshA/rshQ* et *glnR*. Aucun de ces trois mutants n'est capable de compenser l'absence de CodY en contexte R800. Or, un mutant *glnR codY* a été construit (Kloosterman *et al.*, 2006). Ce mutant ne porte pas les mutations *amiC*^{G1459T} et *fatC*^{C496T}. Il est donc possible que la mutation *glnR* soit suffisante pour compenser l'absence de CodY. Si c'est le cas, cette suppression n'est possible qu'en contexte D39. En effet, mes travaux montrent qu'en contexte R800, *glnR* n'est pas suffisant pour compenser l'invivabilité des mutants *codY*.

II.4) Effet de CodY sur la régulation de la compétence.

Les résultats contradictoires des expériences réalisées au chapitre 2 ne permettent pas de déterminer l'effet régulateur de CodY sur la compétence.

De plus, une expérience préliminaire montre que dans un mutant *amiC fatC codY*, mais pas dans un mutant *amiC fatC*, l'expression du gène *comA* est augmentée. Il semble donc que CodY soit impliqué dans la répression de l'opéron *comAB*. Le taux d'expression de cet opéron est essentiel pour la régulation de la compétence. En effet, lorsque son expression est diminuée, la compétence est réprimée, et quand son expression est augmentée la compétence est activée (Martin *et al.*, 2000). CodY semble donc être un répresseur de la compétence. Un suivi de l'expression de *comA* au cours de la croissance dans un mutant *codY* pourra confirmer ces observations préliminaires. De plus, des expériences de retard sur gel d'un fragment d'ADN portant le promoteur du gène *comA* en présence de la protéine CodY seront nécessaires pour déterminer si cette régulation est directe ou non.

Ce travail a permis de montrer que le ppGpp joue un rôle activateur de la compétence et que CodY la réprimerait. CodY et la réponse stringente sont toutes deux impliquées dans la réponse aux carences en acides aminés. Ces deux voies de régulation de la compétence sont probablement complémentaires de manière à réguler finement la compétence en fonction des différentes réserves en nutriments dans le milieu extérieur. Chez *B. subtilis* qui possèdent une protéine CodY réactive au GTP, la réponse stringente et la régulation par CodY sont interconnectées. En effet, la diminution du GTP induite par la réponse stringente permet la dérégulation des gènes sous la dépendance de CodY (Inaoka et Ochi, 2002). Chez *S. pneumoniae*, cette interconnection est impossible car CodY n'est pas sensible aux changements de concentrations en GTP. En outre, il a été montré chez *S. pyogenes* que certains gènes sont régulés à la fois par CodY et la réponse stringente. C'est probablement le cas des gènes de compétence chez *S. pneumoniae*.

Le ppGpp et CodY ne sont certainement pas les seuls signaux mis en jeu dans la régulation de l'initiation de la compétence. L'accumulation de CSP au cours de la croissance se fait probablement de manière plus ou moins passive, et certaines protéines régulatrices ou certains signaux comme le ppGpp ou CodY peuvent « accélérer » ou « freiner » cette accumulation. Ainsi, le niveau critique de CSP pour la mise en route de la boucle autocatalytique est atteint plus ou moins rapidement (figure 37). Ceci permet probablement une régulation multifactorielle de la compétence. De nombreux travaux supplémentaires seront probablement nécessaires pour établir une liste exhaustive des signaux impliqués dans la régulation de ce phénomène.

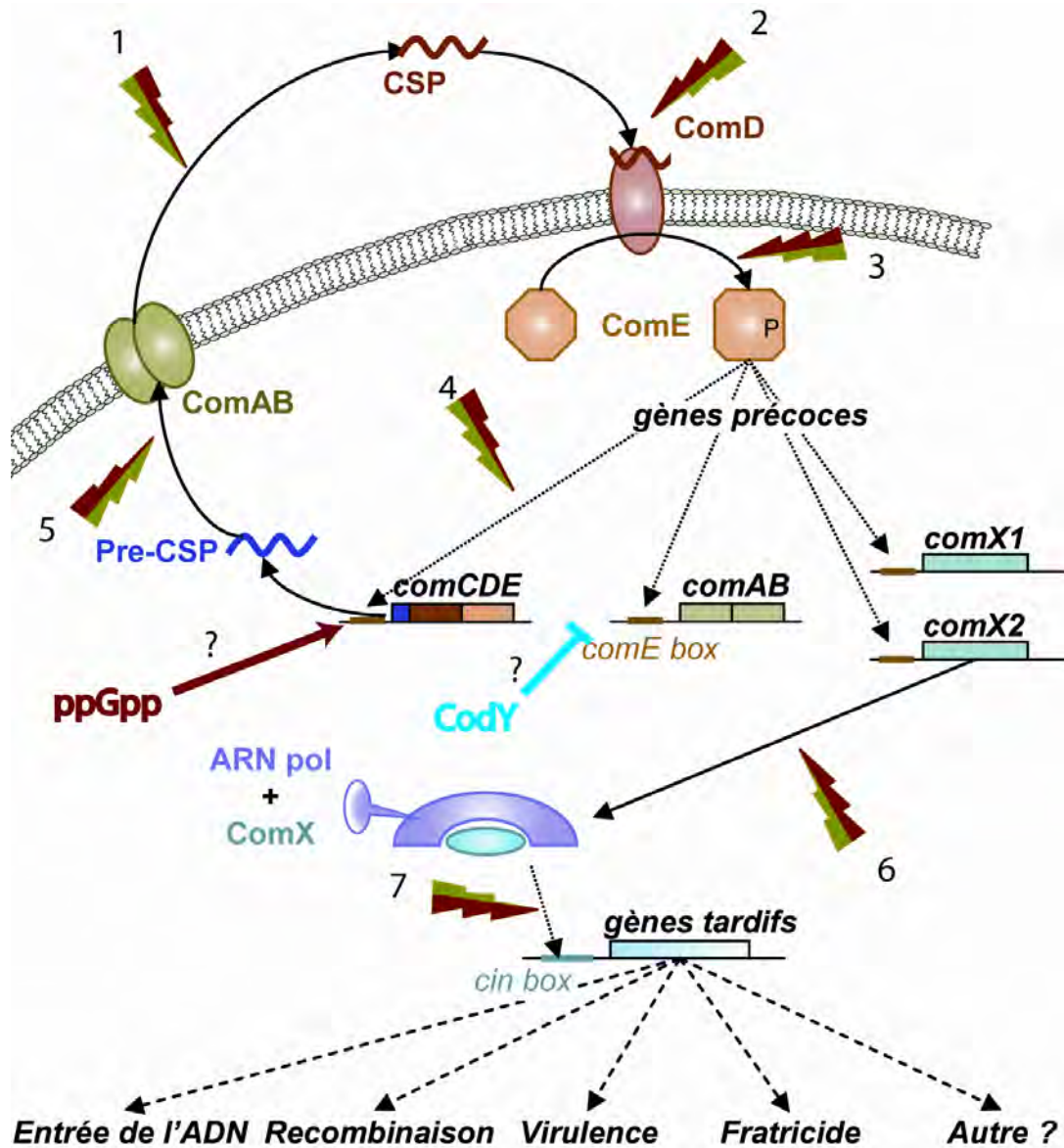


Figure 37 : signaux régulateurs de la compétence.

Une boucle autocatalytique induit l'expression des gènes précoces dont *comX*. ComX active ensuite l'expression des gènes tardifs de compétence. La régulation de l'initiation de la compétence peut se faire à plusieurs niveaux. Les signaux régulateurs (éclair rouge et vert) peuvent activer ou réprimer la compétence en agissant sur : 1 : la diffusion du CSP, 2 : la reconnaissance comD/CSP, 3 : la transduction du signal entre ComD et comE, 4 : l'activité d'activateur transcriptionnel de comE, 5 : la capacité de transport du CSP, 6 : la fixation du facteur sigma-X à l'ARN polymérase, 7 : l'activité transcriptionnelle du complexe ComX-ARN polymérase. Le ppGpp joue un rôle activateur de la compétence. Il pourrait agir sur le transfert de signal entre ComD et ComE, sur l'expression des opérons *comCDE* et *comAB*, ou sur l'export du CSP. CodY pourrait réprimer la compétence. Elle pourrait diminuer le niveau d'expression de l'opéron *comAB*.

D. ANNEXES

ANNEXE A : induction de la compétence par différentes concentrations de sérine hydroxamate

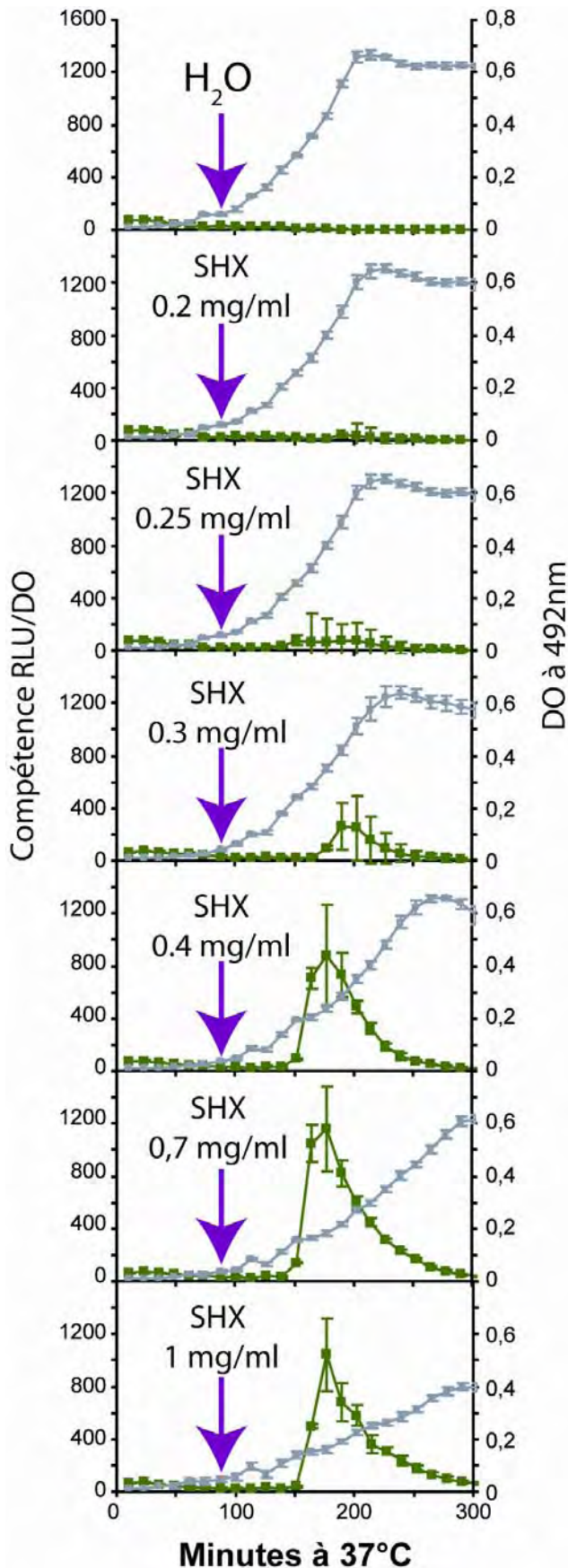


Figure A : Effet de l'ajout de différentes concentrations de sérine hydroxamate (SHX) sur l'induction de la compétence.

L'induction de la compétence en réponse à la SHX a été suivie (Prudhomme *et al.*, 2006).

Le suivi de la compétence est réalisé grâce à une fusion *ssbB::luc* et exprimé en RLU/DO (échelle de gauche ; courbes vertes). Le suivi de la croissance est réalisé en mesurant la densité optique de chaque culture (échelles de droite ; courbes grises). L'ajout de SHX est réalisé au bout de 70 minutes (indiqué par une flèche violette).

L'ajout de SHX à 0.2 mg/ml n'a pas d'effet sur la croissance. Plus on augmente cette concentration plus la croissance est ralentie.

L'ajout de SHX provoque une induction de la compétence très faible pour la concentration 0,2 mg/ml. Cette induction est plus forte quand on augmente la concentration de SHX.

***ANNEXE B Etude de la structure génique de la souche
D39 Δ cps Δ codY***

Les souches sauvage TD82 ($D39\Delta cps\ ssbB::luc$), mutante TD83 $D39\Delta cps\Delta codY\ ssbB::luc$ et son dérivé $codY+$ (TD97) ont été cultivées en milieu THY jusqu'à une DO de 0,2. Les cellules ont été lysées et leur ADN digéré par les enzymes *SmaI*, *ApaI* et *SacII*. Les différents fragments obtenus ont alors été soumis à une électrophorèse en champs pulsés et des sondes radioactives spécifiques du locus *codY* ont été utilisées pour visualiser les fragments contenant *codY* sauvage et/ou mutant.

Les résultats sont présentés à la figure B1.

Le profil observé en coloration au BET correspond à celui que l'on attend d'après les données de séquençage (souche D39 (Lanie *et al.*, 2006)) (voir figure B.2 présentant la carte génétique attendue pour la souche TD82 et son dérivé $codY-$). La seule différence que l'on note dans les profils sauvage et mutant est la disparition des bandes 4, 14 et 8 dans les digestions *SmaI*, *ApaI* et *SacII* respectivement au profit de l'apparition de bandes 4.1 et 4.2, 14.1 et 14.2, et 8.1 et 8.2 dans les digestions *SmaI*, *ApaI* et *SacII* respectivement (voir figure B2 et table B1).

TD82 sonde	codY			trim			entB			1440		
	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~
<i>SmaI</i>	4	224593	225000	-	-	-	4	224593	225000	4	224593	225000
<i>ApaI</i>	14	44627	45000	-	-	-	14	44627	45000	14	44627	45000
<i>SacII</i>	8	97504	97000	-	-	-	8	97504	97000	8	97504	97000

TD83 sonde	codY			trim			entB			1440		
	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~
<i>SmaI</i>	-	-	-	4.1	198858	200000	4.1	198858	200000	4.1	25726	25000
<i>ApaI</i>	-	-	-	14.2	35086	35000	14.2	9532	9000	14.2	35086	35000
<i>SacII</i>	-	-	-	8.1	78963	79000	8.1	78963	79000	8.1	18532	19000

TD97 sonde	codY			trim			entB			1440		
	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~
<i>SmaI</i>	4	224593	225000	-	-	-	4	224593	225000	4	224593	225000
<i>ApaI</i>	14	44627	45000	-	-	-	14	44627	45000	14	44627	45000
<i>SacII</i>	8	97504	97000	-	-	-	8	97504	97000	8	97504	97000

Table B1 : Taille des fragments attendus et obtenus à l'hybridation du gel en champs pulsé pour $D39\Delta cps$ et $D39\Delta cps\Delta codY$
 Obtenu : estimation sur gel, - : absence d'hybridation.

L'insertion de la cassette de résistance au triméthopime à la place du gène *codY* dans $D39\Delta cps\Delta codY$ induit l'apparition de nouveaux sites *SmaI*, *ApaI* et *SacII*. Dans le mutant

codY-, la bande de grande taille attendue pour *codY* est donc scindée en 2 fragments de taille inférieure au niveau du site de restriction introduit avec la cassette de résistance au triméthoprime. Ceci explique parfaitement les différences observées dans le profil de la souche D39 Δ *cps* Δ *codY*.

Si la structure du mutant D39 Δ *cps* Δ *codY* est correcte, alors, l'hybridation des différentes sondes révélant spécifiquement *codY* sauvage, *codY::trim* et les deux gènes adjacents devraient révéler la disparition d'une bande par rapport au sauvage et l'apparition de 2 autres fragments de taille inférieure.

La sonde *codY* révèle la présence de *codY* sauvage dans la souche D39 Δ *cps* et dans la souche D39 Δ *cps socY* dans des fragments dont la taille correspond à la taille théorique (table B.1). De la même façon, la sonde *trim* ne révèle la présence de *codY::trim* que dans le mutant D39 Δ *cps* Δ *codY*. Pour finir, l'hybridation des sondes spécifiques des gènes adjacents révèle bien les deux fragments que l'on attend dans le mutant D39 Δ *cps* Δ *codY*.

Ces résultats sont tout à fait cohérents avec l'analyse théorique de la structure génomique de ces souches. Il n'y a donc pas de réarrangement majeur dans la souche donatrice. Seul un réarrangement mineur (moins de 10 kb) pourrait échapper au crible de ce test.

Figure B.1 : Etude de la structure génomique de la souche D39 Δ *cps* Δ *codY*.

A. Structure schématique du locus *codY* dans la souche sauvage. B. Structure schématique du locus *codY* dans la souche D39 Δ *cps* Δ *codY*. En bleu est représenté la zone remplacée dans *codY::trim*. L'installation de la cassette de résistance au triméthoprime (*drf13*) ajoute au locus des sites de restriction *Sma*I, *Apa*I, et *Sac*II. Les traits de couleurs représentent les sondes qui ont été utilisées pour l'hybridation des gels en champs pulsés.

C. D. E. Etude de la structure génomique de différentes souches. L'ADN de différentes souches a été digéré par l'enzyme *Sma*I (C), *Apa*I (D), et *Sac*II (E). Les digestions ont été déposées sur gel TBE. Electrophorèse en champs pulsés a été réalisée sur 12h, 8s e/w, 8s n/s. M : marqueur de taille Lambda Hind. Lignes 1, 1C, 1T, 1E, 1S : TD82 (D39 Δ *cps*). Lignes 2, 2C, 2T, 2E, 2S : TD83 (D39 Δ *cps* Δ *codY*). Lignes 3, 3C, 3T, 3E, 3S : TD97 (D39 Δ *cps socY*). Lignes 1, 2, 3 : coloration du gel au BET. Lignes 1C, 2C, 3C : hybridation de la sonde *codY* (violet). Lignes 1T, 2T, 3T : hybridation de la sonde *trim* (bleu). Lignes 1E, 2E, 3E : hybridation de la sonde *entB* (orange). Lignes 1S, 2S, 3S : hybridation de la sonde *1440* (vert)

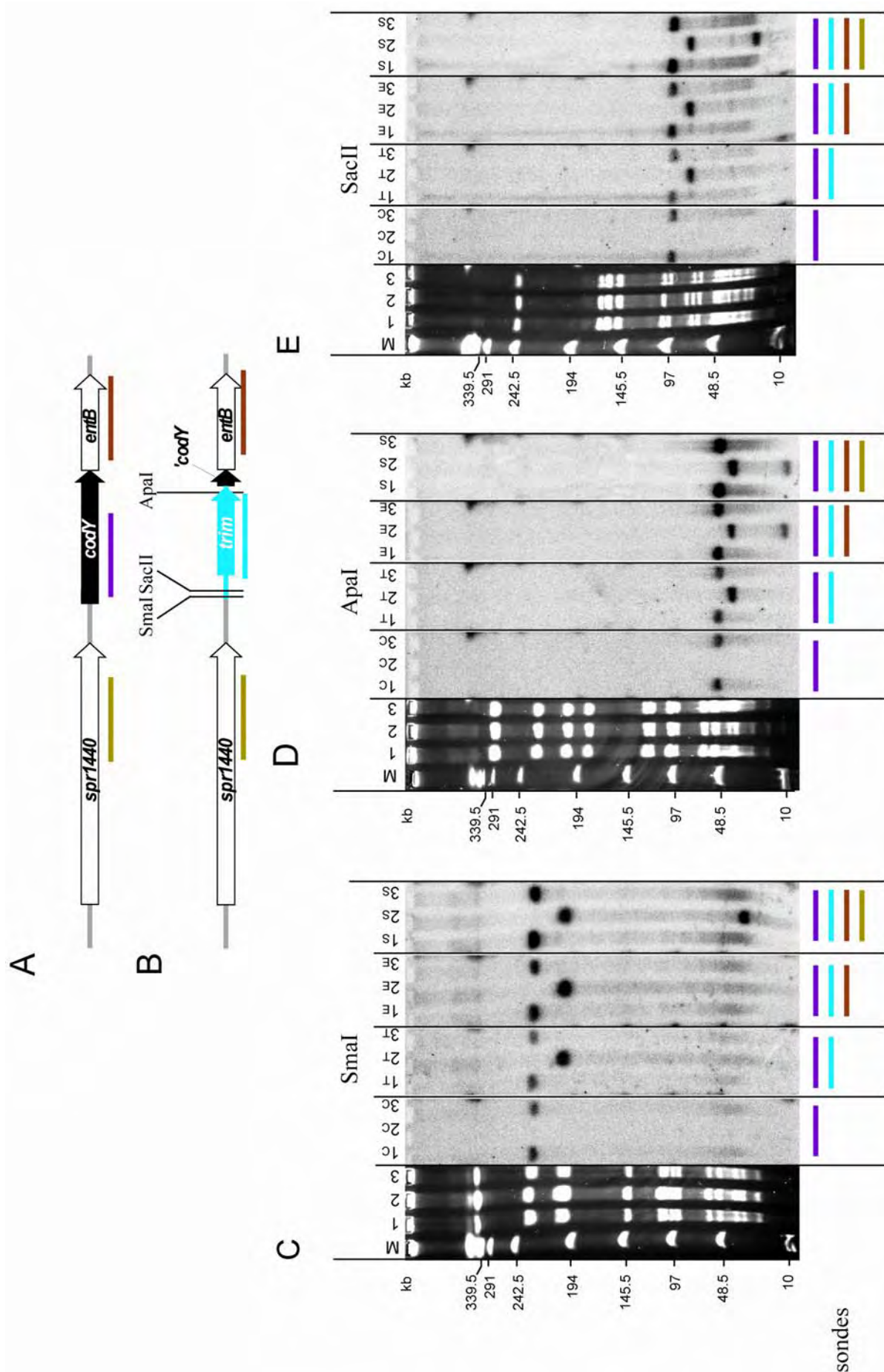
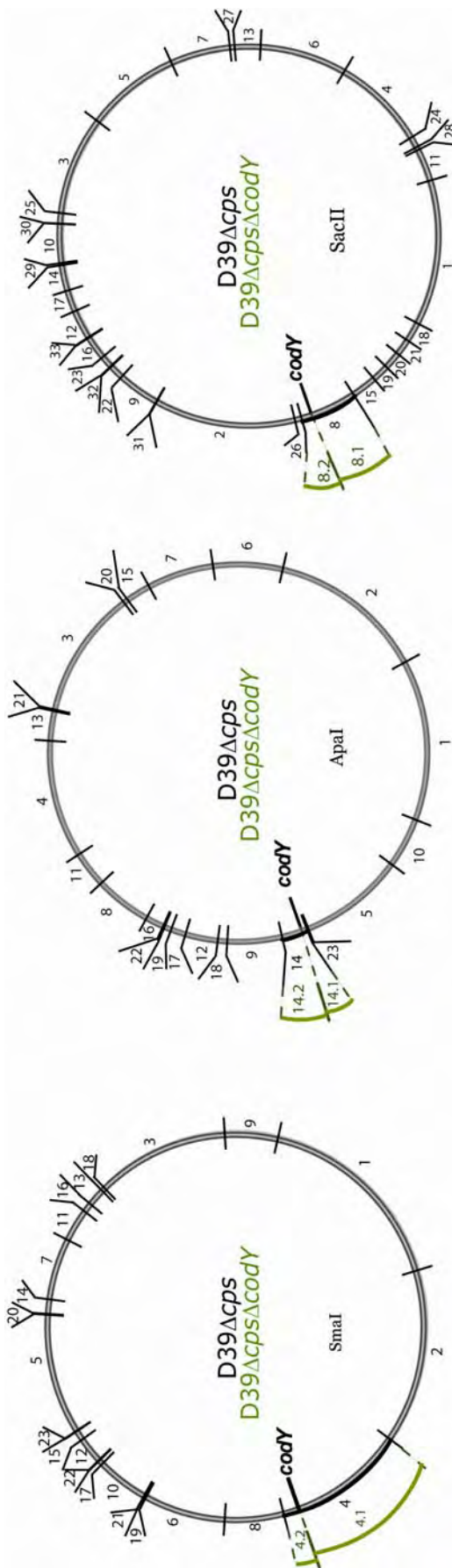


Figure B.1



SacII	
D39Δcps	D39Δcps Δcody
1	251307
2	242213
3	169687
4	162699
5	161730
6	150826
7	104044
8	97504
9	72064
10	63341
11	56187
12	50014
13	44463
14	44100
15	43537
16	40405
17	36929
18	34017
19	29680
20	29220
21	28341
22	24647
23	20680
24	18871
25	18021
26	11587
27	8085
28	5826
29	3760
30	840
31	840
32	840
33	840

ApaI	
D39Δcps	D39Δcps Δcody
1	279102
2	271655
3	222043
4	198948
5	181975
6	121026
7	115840
8	97551
9	93648
10	87103
11	61925
12	56345
13	50988
14	44827
15	42920
16	31610
17	25461
18	16532
19	11953
20	7749
21	2851
22	2729
23	2564

SmaI	
D39Δcps	D39Δcps Δcody
1	340914
2	296544
3	229914
4	224593
5	199856
6	140581
7	104605
8	101643
9	91583
10	89118
11	55704
12	44680
13	30385
14	24783
15	16320
16	15774
17	7508
18	5533
19	3407
20	925
21	925
22	925
23	925

Figure B.2

Figure B2 : Digestion de D39 Δ cps et D39 Δ cps Δ codY par SmaI, ApaI, et SacII.

Pour chaque enzyme, la carte de restriction est représentée en noir pour la souche D39 Δ cps. Les fragments générés par l'intégration de la mutation *codY::trim* sont représentés en vert. Chaque tableau représente le numéro et les tailles des fragments attendus pour les deux souches. Le fragment inscrit en noir est celui qui contient le gène *codY*. La valeur inscrite en noir représente la taille du fragment contenant *codY*, celles inscrites en vert représente la tailles des deux fragment de la région *codY::trim* dans le mutant TD83. La flèche indique le fragment contenant le gène *trim*.

ANNEXE C : Etude de souches mérodiplôïdes

I) Qu'est que la mérodiplôidie

Une souche mérodiplôide est une souche qui porte une duplication plus ou moins grande d'une partie de son génome soit sur la même molécule d'ADN soit répartie sur deux molécules.

Lors de l'étude de l'utilisation du lactose chez *E. coli*, un état hétérozygote spontané pour les gènes impliqués dans ce processus a été observé. Cette observation a conduit les auteurs à deux hypothèses : soit un état diploïde total soit un état hétérozygote partiel. L'étude du phénotype complet de ces souches et de leur descendance montre que cette hétérozygotie est partielle (mérodiplôide) et ne s'entend que sur un nombre limité de gènes (Lederberg, 1949).

L'état mérodiplôide peut être obtenu par conjugaison (notamment avec le plasmide F). Le transfert d'ADN de la souche *Hfr* vers une souche F- peut aboutir à la formation d'une souche portant 2 copies d'une région plus ou moins grande du génome (Herman, 1968a ; Herman, 1968b). La transduction phagique est aussi une source de formation de souches mérodiplôides (Hill *et al.*, 1969).

L'état mérodiplôide peut également être généré lors de transformations naturelles. Ceci a été démontré chez *H. influenzae* et *S. pneumoniae*. Ainsi, cet état permet à une souche de synthétiser une capsule de 2 types différents (Leidy *et al.*, 1953 ; Austrian et Bernheimer, 1959).

L'état mérodiplôide n'est pas stable. Dans le cas de souches résistantes à certains antibiotiques la mérodiplôidie est perdue en absence de pression de sélection (*e.g.* résistance aux sulfamides (Kashmiri et Hotchkiss, 1975) ; résistance à la streptomycine et à l'érythromycine (Ravin et Takahashi, 1970)).

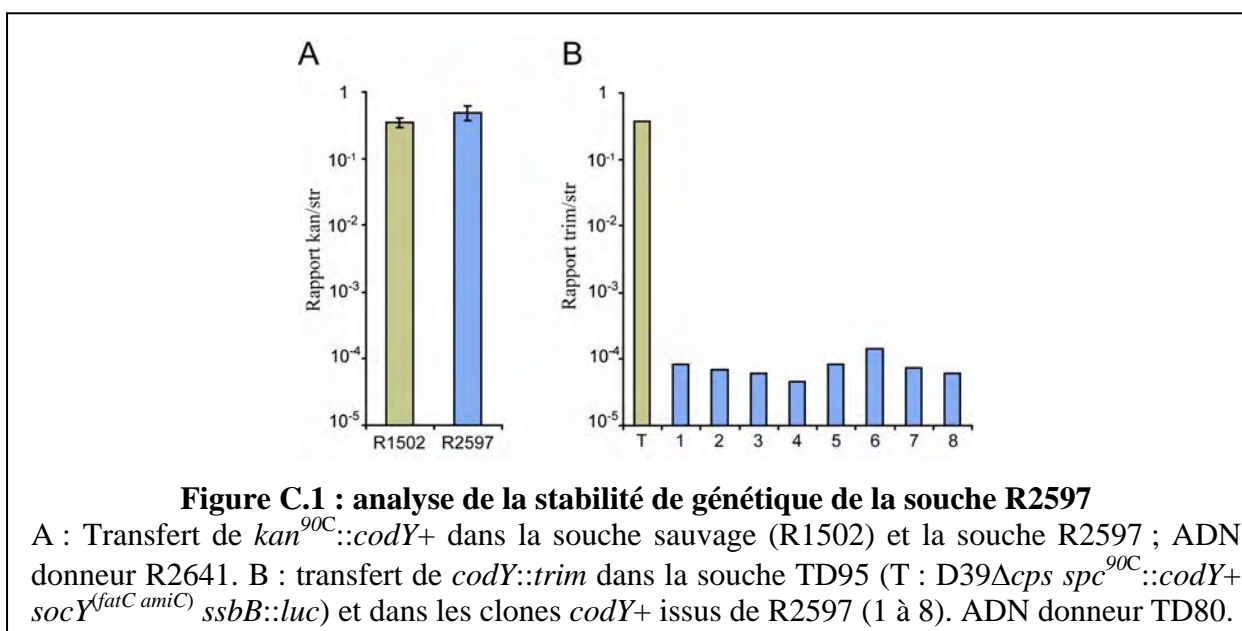
Des cas de mérodiplôidie sont également retrouvés dans des isolats naturels. C'est le cas de la souche de *Photobacterium leiognathii* mérodiplôide pour l'opéron *lux-rib* qui a été isolée dans les eaux du Japon (Ast *et al.*, 2007).

L'étude du mécanisme de transformation chez *B. subtilis* montre qu'il est possible de sélectionner des souches mérodiplôides lors de tentatives d'inactivation de gènes essentiels (Niaudet *et al.*, 1985). Dans cette étude, les auteurs montrent également que cet état mérodiplôide n'est pas stable au cours des générations si la pression de sélection n'est pas maintenue. Un modèle permettant la création de structures mérodiplôides instables qui seront ensuite résolues en mérodiplôides stables a même été proposé (Regamey *et al.*, 2000).

II) Etude de la souche mérodiplloïde R2597

Le premier clone issu du transfert de *codY::trim* en contexte R1502 s'est révélé être mérodiplloïde. Cette souche a été nommée R2597. La structure de cette souche a été analysée de manière plus poussée.

Pour déterminer la stabilité génétique de cette souche, elle a d'abord été transformée par un fragment PCR contenant le gène *kan^{90C}::codY+* (figure C.1 A).



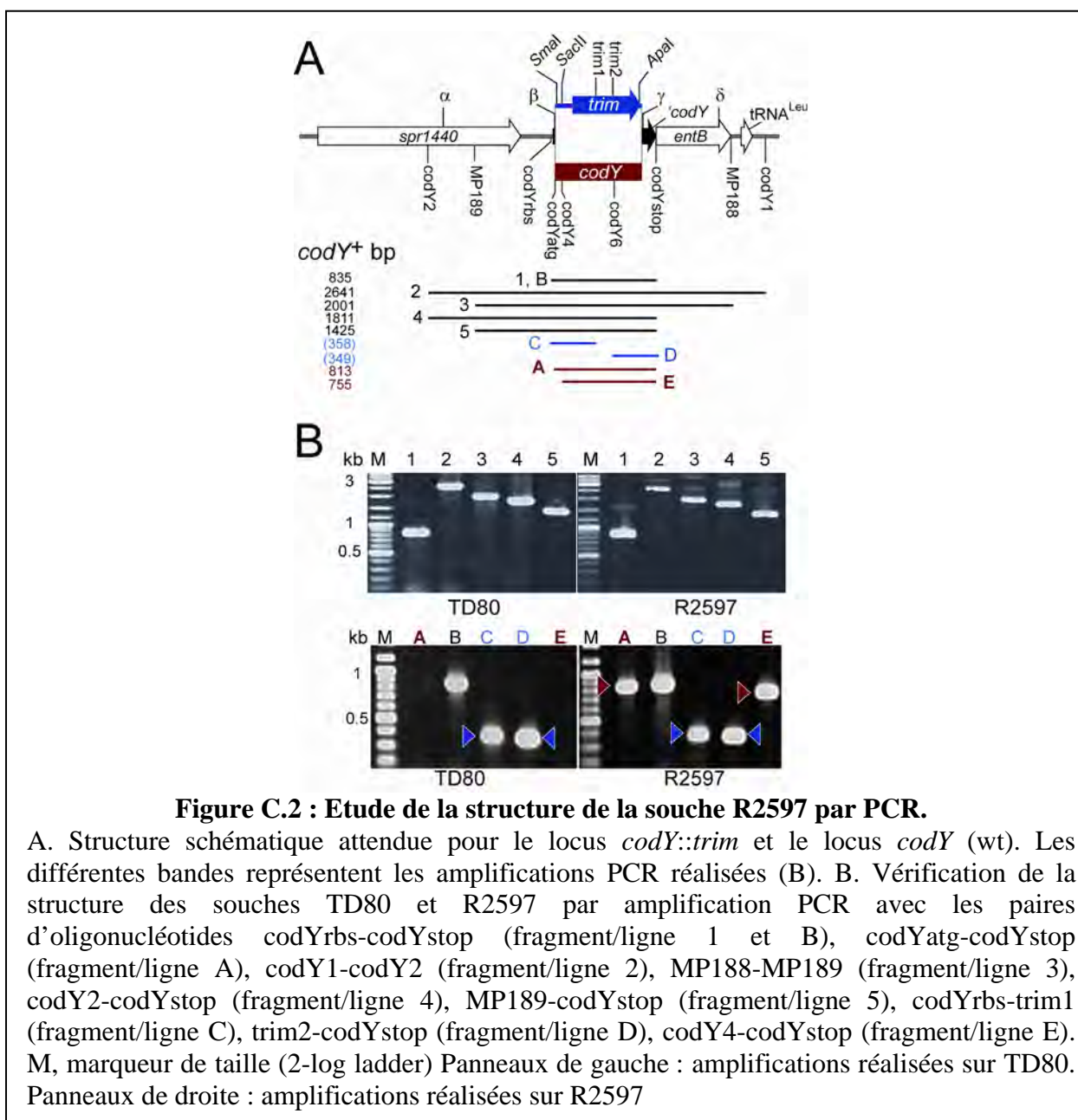
La souche R2597 accepte le marqueur *kan^{90C}::codY+* avec la même efficacité que la souche sauvage. La présence de *codY+* n'est donc pas délétère pour la souche R2597. Dix clones transformants ont été sélectionnés au hasard et 8 d'entre eux avaient incorporé le marqueur *kan^{90C}::codY+* et perdu *codY::trim*. Ces 8 transformants *codY+* ont ensuite été transformés par l'ADN de la souche TD80. Les résultats sont présentés à la figure C.1 B. Contrairement à la souche TD95 utilisée comme contrôle pour le transfert de *codY::trim*, les 8 clones *codY+* issus de R2597 sont incapables de réintégrer la mutation *codY* à haute fréquence. Le contexte suppresseur de la souche R2597 n'est donc pas stable en absence de la pression de sélection appliquée par la mutation *codY*.

La structure de cette souche a donc été étudiée plus en détails.

II.1) Etude PCR

La première étape de cette étude a été d'analyser R2597 par différentes amplifications PCR. La figure C.2 A expose les différents fragments amplifiés et la carte génétique des

structures *codY* sauvage et *codY::trim*. Lors de la construction de la délétion de *codY*, une partie de l'ORF de ce gène a été remplacée par une cassette de résistance au triméthoprime. La taille de la zone insérée est équivalente à celle déléetée à 6 paires de bases près. Ceci complique légèrement l'analyse. En effet, les amplifications par les oligonucléotides extérieurs aux zones remplacées ont une taille différente de seulement 6 nucléotides entre la structure *codY* sauvage et *codY::trim* et ne sont pas discernables sur gel d'agarose (figure C.2 B lignes 1, 3, 4, 5).



L'utilisation d'oligonucléotides spécifiques de *codY* sauvage et de la cassette de résistance au triméthopime permet de distinguer les deux types de structures (figure C.2 lignes 2, C, D, E).

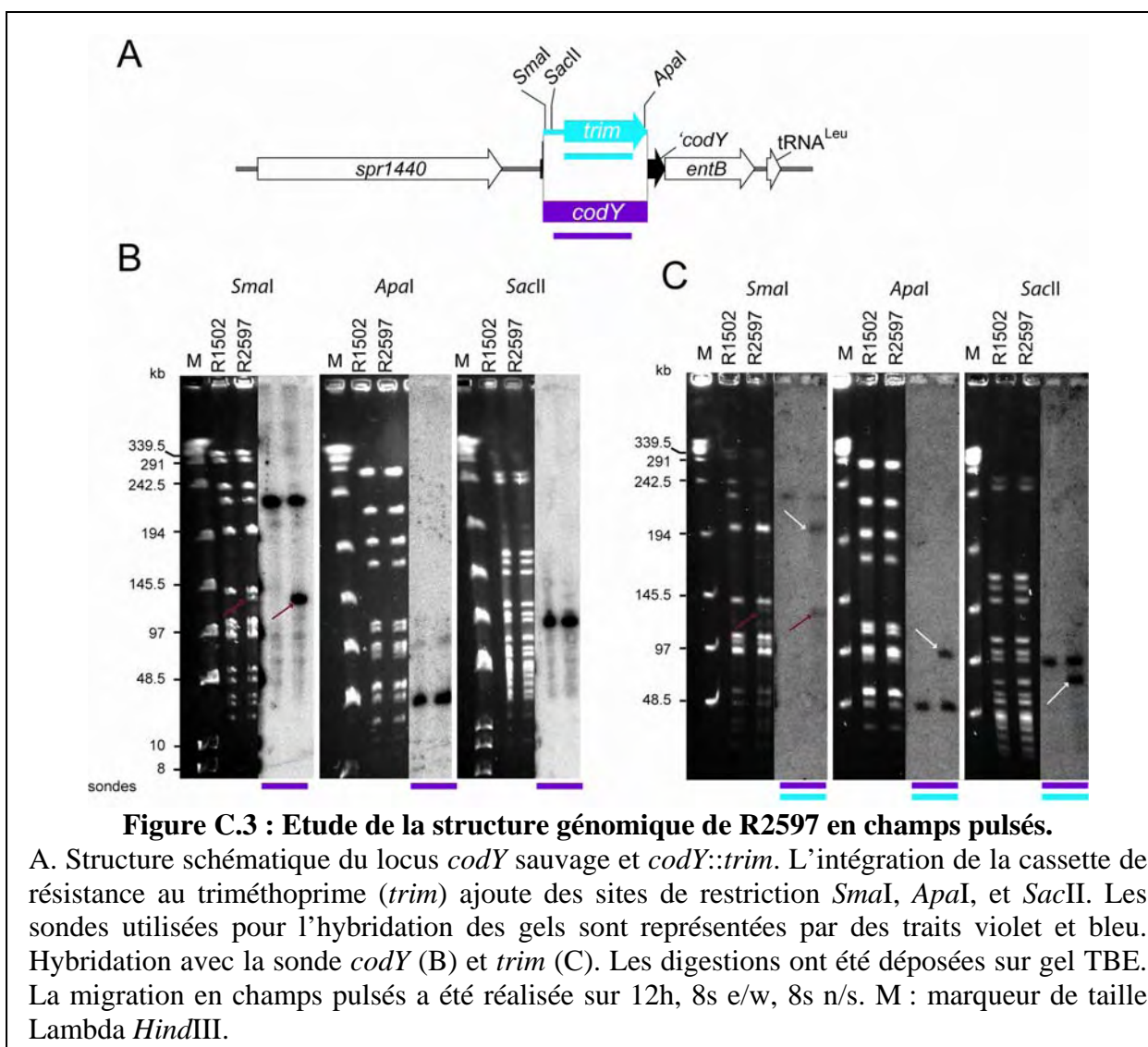
Lorsqu'on utilise la souche TD80 comme matrice pour les amplifications PCR, on obtient le profil caractéristique pour une insertion simple du marqueur *codY::trim* et la délétion de l'ORF *codY* sauvage. Les amplifications réalisées avec des oligonucléotides externes à la zone d'insertion-délétion ainsi que celles réalisées avec des oligonucléotides internes au gène *trim* donnent des fragments dont les tailles correspondent aux tailles théoriques attendues. En outre, les amplifications réalisées avec des oligonucléotides spécifiques de l'ORF de *codY* sauvage ne donnent aucun fragment. Ceci confirme que la souche TD80 porte la mutation *codY::trim* mais ne porte pas le gène *codY* sauvage et valide l'approche.

En revanche, les amplifications réalisées à partir de la souche R2597 donnent toutes des fragments dont la taille correspond à celles attendues pour la structure *codY::trim* et *codY* sauvage. La souche R2597 porte une copie de *codY* mutée et une copie de *codY* sauvage. Cette étude confirme que la souche R2597 est mérodipléide.

Une étude plus précise de cette structure a donc été réalisée en utilisant la méthode d'électrophorèse en champs pulsés de l'ADN chromosomique digéré. Cette méthode permettant de séparer de très grands fragments d'ADN devrait nous aider à résoudre la structure de cette souche.

II.2) Etude de la structure de la souche R2597 en champs pulsés

L'étude de la structure génomique a été réalisée sur la souche R2597 et sur sa parente R1502. Les cellules ont été cultivées en milieu THY jusqu'à une DO d'environ 0,2. Elles ont ensuite lysées. Leur ADN a été digéré par *SmaI*, *ApaI* et *SacII*. Les fragments ainsi générés ont été séparés sur gel d'agarose en champs pulsés (voir Matériel et méthode chapitre 3). Pour finir une hybridation sur gel a été réalisée avec des sondes spécifiques des gènes *codY* sauvage et *trim*. La figure C.3 présente la structure génomique des loci *codY::trim* et *codY* sauvage, ainsi que les résultats des gels d'électrophorèse en champs pulsés et des hybridations.



Les profils de digestion obtenus avec les trois enzymes correspondent aux fragments attendus pour la souche R1502 d'après les données de séquençage de la souche R6 (voir récapitulatifs des fragments attendus figure C.13 et table C.1). Mais si l'on compare les profils de R1502*codY::trim* avec le profil de la souche R2597 obtenus avec les trois digestions, on remarque que les fragments d'ADN n°4, 15 et 8 (pour *Sma*I, *Apa*I et *Sac*II respectivement) sont toujours présents chez le mutant R2597 alors que ces fragments devraient être remplacés par 2 fragments de taille inférieure.

De plus ces fragments sont révélés par hybridation avec la sonde *codY* sauvage (figure C.3 B et C). La souche R2597 porte une copie du gène *codY* sauvage comme nous l'avons déjà observé dans l'étude par PCR. Cette copie sauvage semble être au locus normal puisque les 3 fragments où hybride la sonde *codY* sont ceux que l'on attend pour un profil sauvage.

R1502	<i>codY</i>			<i>trim</i>		
	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~
<i>SmaI</i>	4	224593	225000	-	-	-
<i>ApaI</i>	15	44627	45000	-	-	-
<i>SacII</i>	8	97504	97000	-	-	-

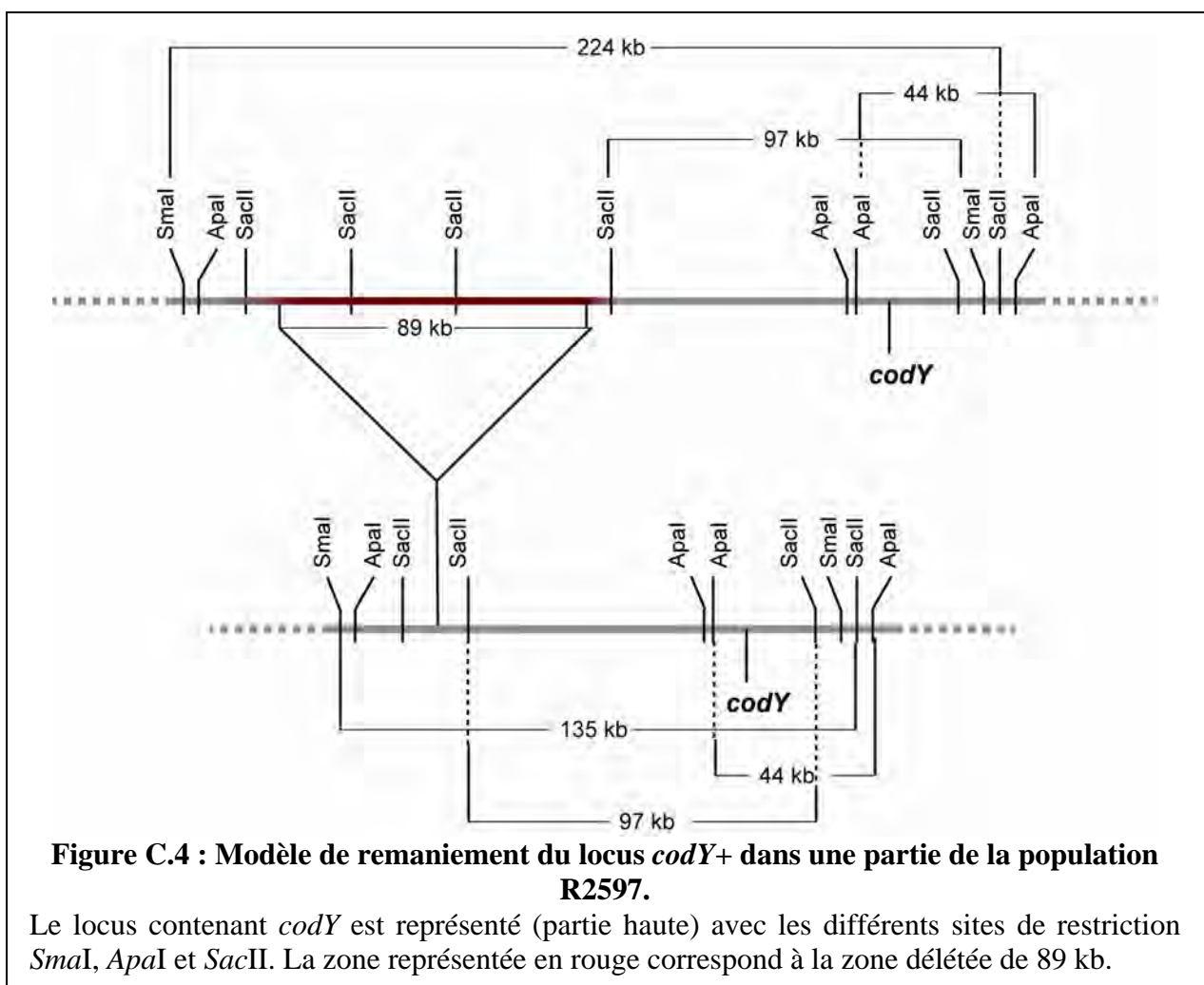
R1502 <i>codY::trim</i> /R2597	<i>codY</i>			<i>trim</i>		
	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~
<i>SmaI</i>	-	-	225000 135000	4,1	198858	200000
<i>ApaI</i>	-	-	45000	15,2	35086	95000
<i>SacII</i>	-	-	97000	8,1	78963	78000

Table C.1 : Taille des fragments attendus et observés à l'hybridation du gel en champs pulsé pour R1502 et R1502*codY::trim*

Les sondes utilisées sont inscrites en rouge. Les tailles des fragments sont indiquées en pb. La souche R1502*codY::trim*, est une souche théorique qui porterait une insertion simple de la mutation *codY::trim*.

En outre, on remarque également sur le profil *SmaI*, un fragment supplémentaire d'environ 135 kb (flèche rouge) non prédit dans la structure théorique d'une souche R1502*codY::trim* (figure C.13). Ce fragment est également révélé par l'hybridation avec la sonde *codY* sauvage. La souche R2597 porterait 2 copies sauvages de *codY* dans son génome. Cependant, ce fragment de 135 kb est beaucoup moins intense que les autres fragments du profil. Ce fragment supplémentaire n'est probablement pas présent dans l'ensemble de la population mais seulement dans une fraction ayant subi un remaniement génomique au cours de la croissance.

Le fragment à 224 kb révélé par l'hybridation par la sonde *codY* sauvage pour l'enzyme *SmaI* est beaucoup plus intense que celui de 135 kb (flèche rouge). Il est envisageable qu'une partie de 89 kb (= 224 kb – 135 kb) de ce locus soit spontanément délété au cours de la croissance (figure C.4). La partie conservée contient au minimum la zone comprise entre les sites *SacII* et *ApaI* autour de *codY*⁺ puisque qu'aucun fragment supplémentaire n'est révélé par hybridation de la sonde *codY*. La délétion de 89kb permet de « rapprocher » les deux sites *SmaI* autour de *codY* pour obtenir un fragment de 135kb.

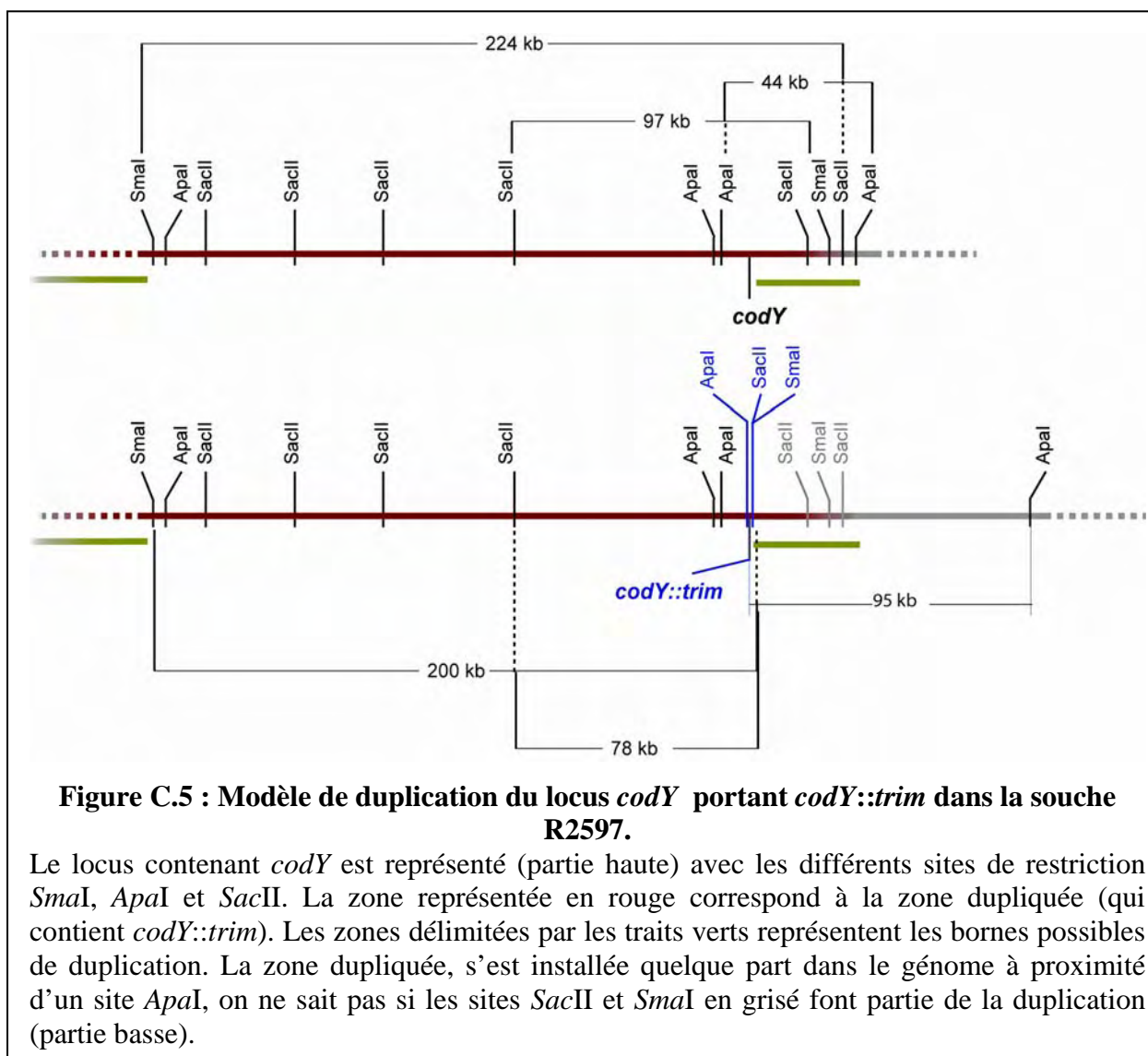


Les gènes contenus dans la partie de 89 kb délétés doivent être situés ailleurs dans le génome. En effet, un locus d'aussi grande taille contient très probablement des gènes essentiels et/ou des gènes très importants pour une croissance normale de *S. pneumoniae*.

L'hybridation par la sonde *trim*, révèle des fragments de 200 kb, 95 kb et 78 kb pour les digestions *SmaI*, *ApaI* et *SacII* respectivement (flèches blanches). Les fragments *SmaI* et *SacII* correspondent à ce que l'on attend si la mutation *codY::trim* est localisée au locus normal dans le génome. Cependant, nous venons de voir que le gène *codY* sauvage se trouve à ce locus. En outre, le fragment *ApaI* ne fait pas la taille attendue pour une localisation normale de *codY::trim*. Ceci confirme que la mutation *codY::trim* est délocalisée dans le génome.

Une grande portion d'ADN située autour de *codY* est dupliquée et délocalisée dans la souche R2597. Cette portion d'ADN porte la mutation *codY::trim* (figure C.5). La zone dupliquée contient au moins les deux sites *SmaI* et les deux sites *SacII* autour de *codY* (plus de 200 kb) puisque les tailles des fragments révélés par la sonde *trim* sont celles attendues pour

la structure normale de *codY::trim*. De plus, le fragment *ApaI* révélé par l'hybridation de la sonde *trim* est plus grand que la taille attendue pour la structure normale. Ceci montre qu'un des deux sites *ApaI* n'est pas compris dans la zone dupliquée. De plus, la zone dupliquée s'est insérée à proximité d'un site *ApaI* de manière à créer un fragment d'environ 95 kb (figure C.5).



En résumé, la souche R2597 porte une copie de *codY* sauvage et une duplication de plus de 224 kb du locus *codY* qui porte la mutation *codY::trim*.

Cette grande duplication vraisemblablement peu stable puisqu'au cours des générations, une zone de 89 kb est perdue. Cette zone a été déléetée au niveau de la localisation normale de *codY* et non pas dans la zone dupliquée.

De manière à étudier plus précisément le mécanisme qui a permis la formation de cette souche mérodipléide, nous avons recherché les bornes de cette duplication. Pour cela, l'ADN génomique de la souche R2597 a été séquencé.

II.3) Etude par séquençage génomique

Le séquençage génomique de la souche R2597 a été réalisé par une entreprise allemande (Agowa genomics) avec la méthode Roche 454 FLX whole-genome sequencing. Les différentes séquences ont été assemblées grâce au logiciel Roche 454 Newbler et organisées en contigs. Cette méthode permet le séquençage multiple de différents fragments de 3 kb permettant de couvrir plusieurs dizaines de fois le génome.

L'analyse des différents contigs obtenus pour la souche R2597, montre que cette souche porte à la fois une copie sauvage de *codY* et une copie mutante de ce gène (figure C.6). En effet, 2 contigs sont présents pour la région *codY*. Un contig contenant le gène *codY* sauvage, et un contig portant le gène *codY::trim*.

Ces deux régions de très petite taille ne sont pas assemblées ni en amont ni en aval avec le reste de la séquence. En fait, le logiciel assemble la séquence en l'alignant sur le génome publié de la souche R6 (Hoskins *et al.*, 2001). La séquence autour de *codY* sauvage et la séquence dupliquée contenant *codY::trim* sont homologues et ne forment qu'un seul et même contig. Mais lorsque l'assemblage arrive au niveau de *codY*, deux séquences sont possibles : soit *codY* sauvage ou soit *codY::trim*. A ce niveau, le logiciel n'arrive plus à assembler la séquence et met fin au contig. Deux nouveaux contigs sont alors assemblés : *codY* sauvage et *codY::trim*. Les bornes de ces deux contigs sont identiques et correspondent à deux mutations ponctuelles introduites par PCR au cours du clonage de *codY::trim* (figure C.6).

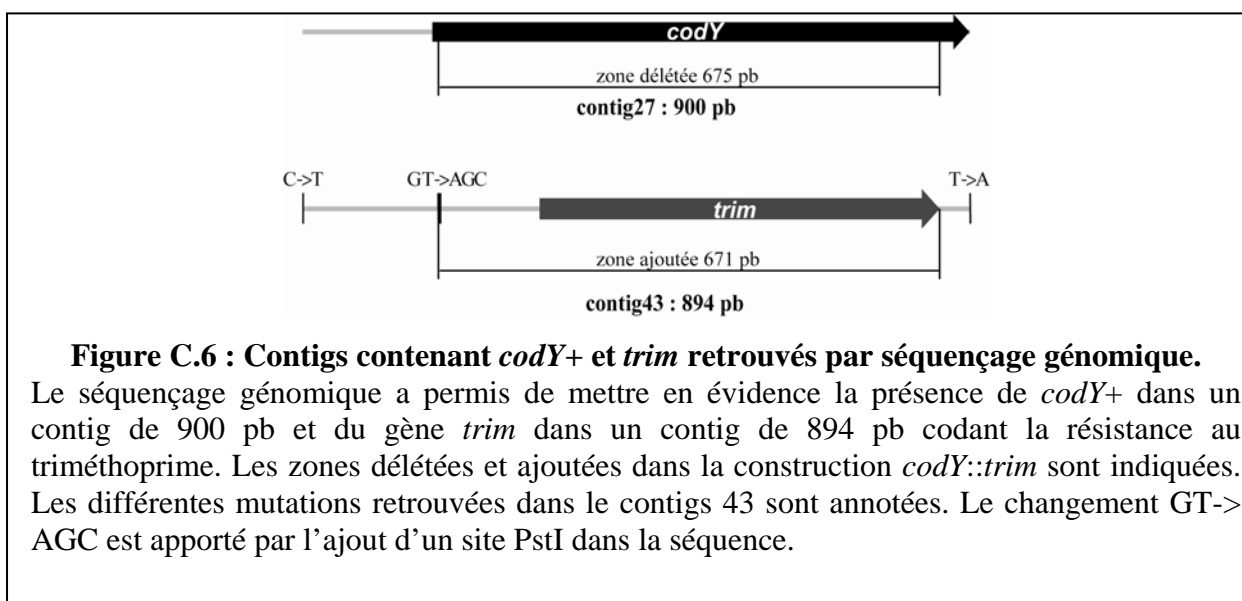


Figure C.6 : Contigs contenant *codY*+ et *trim* retrouvés par séquençage génomique.

Le séquençage génomique a permis de mettre en évidence la présence de *codY*+ dans un contig de 900 pb et du gène *trim* dans un contig de 894 pb codant la résistance au triméthopime. Les zones délétées et ajoutées dans la construction *codY::trim* sont indiquées. Les différentes mutations retrouvées dans le contigs 43 sont annotées. Le changement GT->AGC est apporté par l'ajout d'un site PstI dans la séquence.

L'analyse des contigs confirme la présence de deux copies de *codY* (une sauvage et une mutante) mais ne donne pas d'indications sur les bornes de la duplication.

Une autre analyse a donc été effectuée. Lors du séquençage génomique, chaque nucléotide du génome est séquençé plusieurs fois. On peut donc créer un graphique représentant le nombre lectures réalisées pour chaque nucléotide positionné par rapport au génome séquençé de la souche R6 (figure C.7). Si une partie du génome est dupliquée, alors le nombre de séquences réalisées sur les positions de la zone dupliquée sera doublé par rapport au reste du génome.

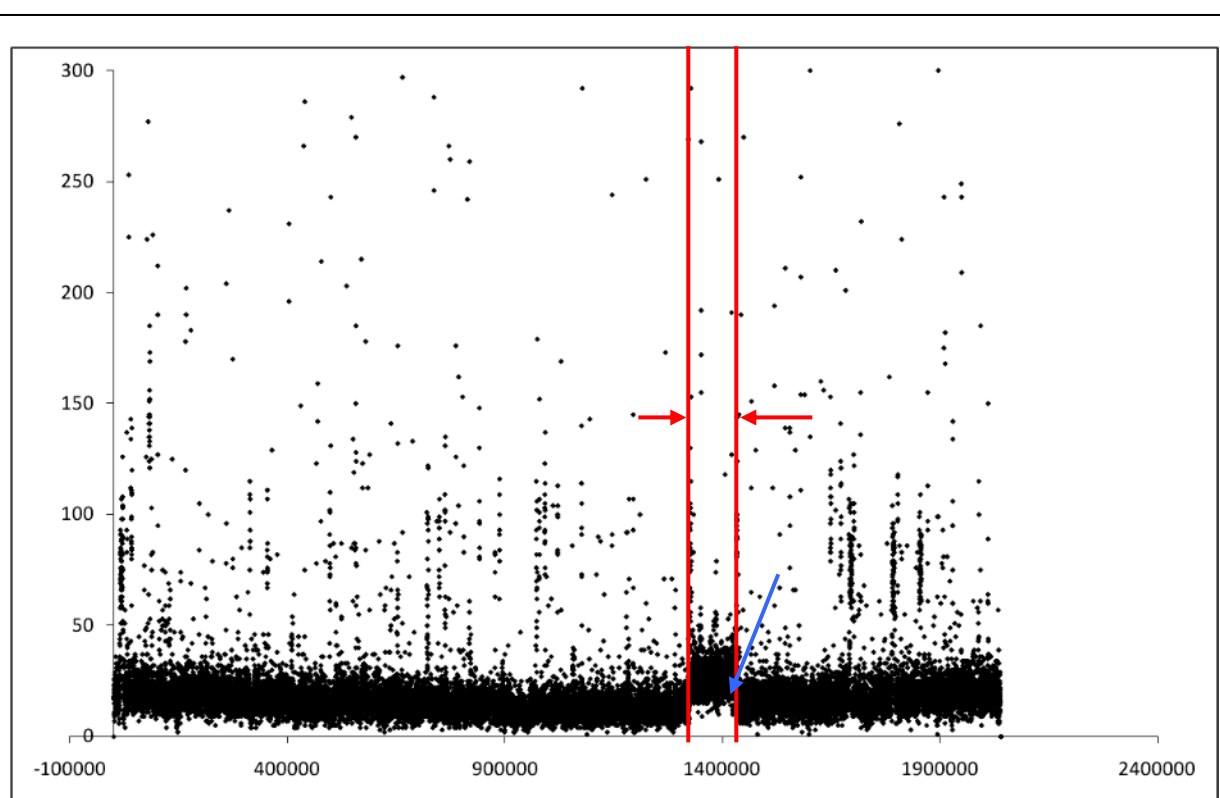


Figure C.7 : Séquençage génomique de la souche R2597

Graphique représentant le nombre de lecture en fonction de la position sur le génome de R6. Une position sur cent est représentée. Une région de 107 kb encadrée en rouge contenant *codY* fléché en bleu est surreprésentée. Cette région est dupliquée.

Sur le graphique de la figure C.7, le nombre de séquences réalisées aux différentes positions est assez stable sur le génome. Une partie de la séquence au niveau de la position 1400000 est lue environ deux fois plus souvent que le reste du génome. Cette région porte le locus *codY*. Cette approche permet donc de définir de manière précise la séquence dupliquée de 107 kb. De manière remarquable, on trouve aux extrémités de cette séquence, une séquence d'insertion IS861.

Cependant, la région dupliquée est de 107 kb alors que l'étude par électrophorèse en champs pulsés avait prédit une duplication beaucoup plus grande (au moins 200 kb).

Ceci peut s'expliquer par une instabilité de la duplication. En effet, nous avons vu au cours de l'étude génomique en champs pulsés que la duplication n'est pas stable et qu'un grand fragment de 89 kb est perdu au cours de la croissance. Pour réaliser ces deux études, le clone R2597 de départ a été cultivé de façon indépendante pendant un assez grand nombre de générations. Au cours de ces générations, la duplication portant la mutation *codY::trim* dans la souche R2597 de départ a pu être réduite jusqu'à 107 kb dans la culture ayant servi au séquençage génomique et passer de plus de 200 kb à environ 110 kb (= 200 kb – 90 kb) dans la culture ayant servi à l'étude en champs pulsés.

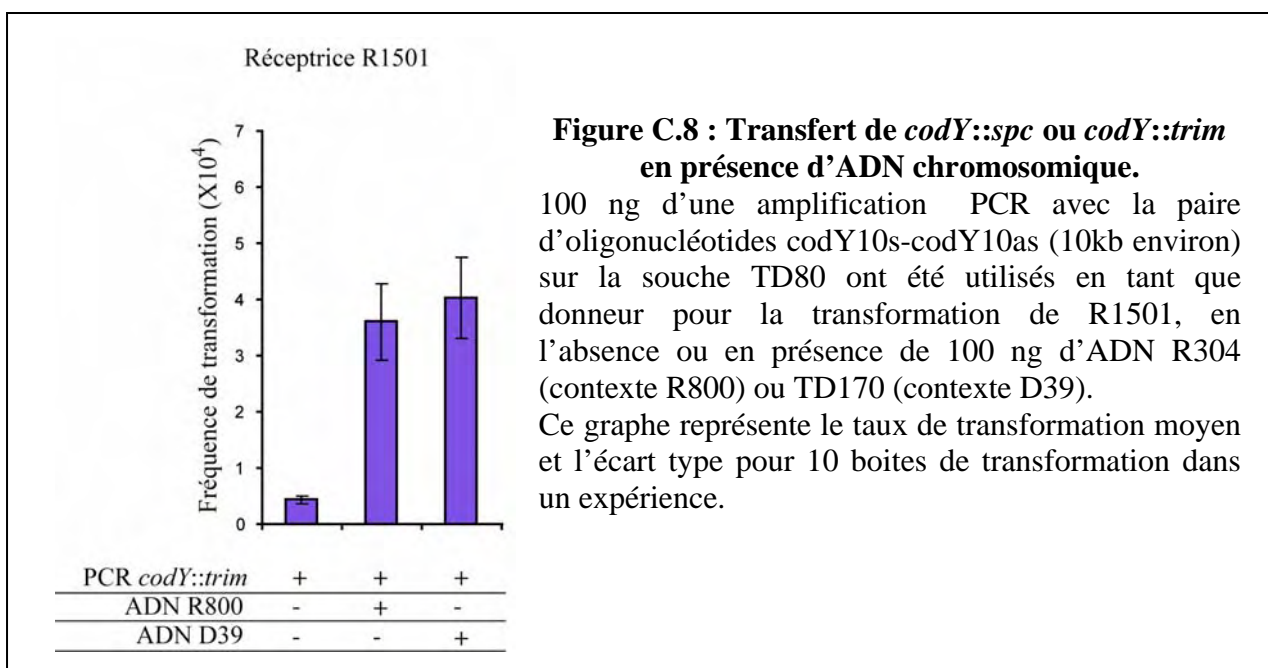
De plus, une des bornes de la duplication trouvée par le séquençage génomique se trouve dans la région entre *codY* et le site *ApaI* comme on l'avait prédit avec l'étude en champs pulsés (voir figure C.4).

Le séquençage génomique de la souche R2597 a permis de déterminer avec précision les bornes d'une duplication de la région contenant *codY*. Ce résultat ainsi que l'étude en champs pulsés d'autres clones mérodiplloïdes permettront peut-être de déterminer le mécanisme qui permet la formation de mérodiplloïdes.

III) Formation de mérodiplloïdes

Des souches mérodiplloïdes ont été obtenues par transformation avec l'ADN génomique des souches TD80 et TD81 (*codY::trim* et *codY::spc*) (25 mérodiplloïdes sur 45 clones). Il est donc possible que dans l'ADN donneur, un ou plusieurs fragments (qui ne portent pas les mutations *fatC* et *amiC*) induisent la formation de mérodiplloïdes.

Pour tester cette hypothèse, nous avons décidé de transformer la souche sauvage R1501 (contexte R800) avec un fragment PCR purifié de 10 kb comportant la mutation *codY::trim*. Cette expérience a été réalisée en absence ou en présence d'ADN sauvage R800, ou d'ADN sauvage D39 Δ *cps*. Les résultats sont présentés dans la figure C.8.



Lorsque l'on transforme la souche sauvage par un fragment PCR contenant la mutation *codY::trim*, on obtient un taux de transformation très faible d'environ $0,5 \cdot 10^{-4}$.

Cependant, lorsque l'on ajoute dans cette transformation de l'ADN sauvage (R800 ou D39), on obtient un taux de transformation 8 à 10 fois plus élevé. Cette expérience a été réalisée 4 fois en utilisant différents fragments PCR (taille de 3 kb à 10 kb) contenant *codY* et différentes concentrations d'ADN chromosomique sauvage. En présence d'ADN chromosomique sauvage, le taux de transformation est entre 2 et 10 fois supérieur à celui obtenu en son absence. Il semble donc que la présence de fragments d'ADN sauvage facilite l'intégration de la mutation *codY::trim* dans le génome. Les clones transformants obtenus avec un fragment PCR contenant la mutation *codY::trim* en présence (ou non) d'ADN chromosomique sauvage sont peut-être mérodiplloïdes. Ces clones ont été analysés par PCR et par électrophorèse en champs pulsés.

III.1) Etude PCR

Lors de la transformation de la souche sauvage avec la PCR *codY::trim* avec ou sans ADN R800, 10 transformants ont été sélectionnés au hasard avec (numéro 11 à 20) et sans (numéro 1 à 10) ADN chromosomique sauvage.

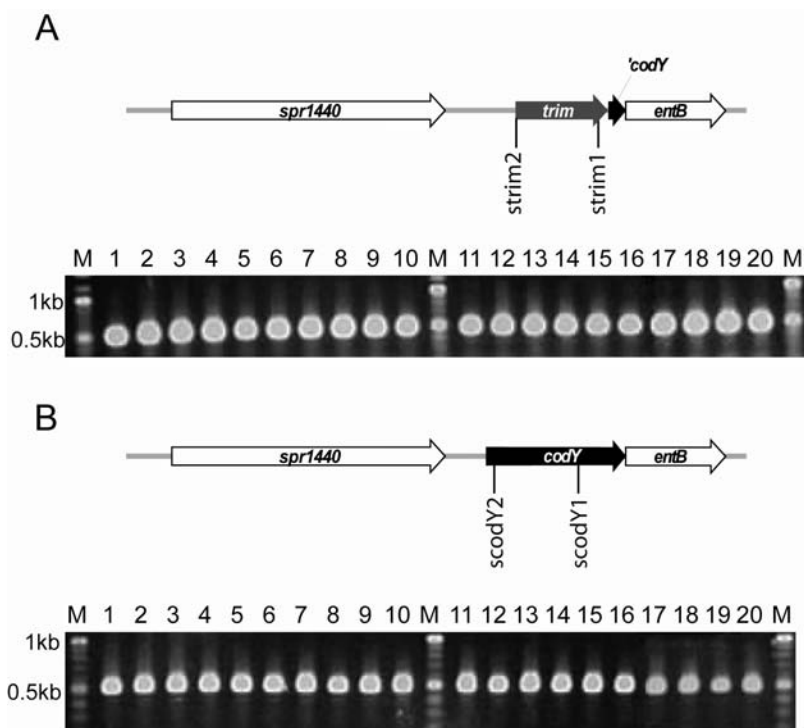


Figure C.9 : vérification des transformants Trim^R en contexte R1501.

Dix clones transformants Trim^R issus de la transformation par la PCR *codY::trim* seule (lignes 1 à 10) et dix clones transformants Trim^R issus de la transformation par la PCR *codY::trim* + ADN R800 (lignes 11 à 20) ont été testés en PCR pour la présence de *codY*⁺ (A) et *codY::trim* (B). Tailles attendues : scodY1-scodY2 (*codY*⁺ : 500 pb, *codY::trim* : 0pb) ; strim1-strim2 (*codY*⁺ : 0 pb, *codY*⁻ : 500 pb).

Ces 20 clones ont été testés pour la présence de *codY::trim* et *codY* sauvage. Pour cela nous avons effectué des amplifications PCR sur l'ADN de ces clones avec une paire d'oligonucléotides spécifiques du gène *trim* et une paire spécifique du gène *codY* sauvage. Les résultats sont présentés à la figure C.9. Les 10 clones sélectionnés dans les deux conditions portent tous la structure *codY* sauvage et la structure *codY::trim*. Ces clones ont tous un statut mérodipléide. Cependant, cette étude par PCR ne nous donne aucune information sur la nature de la duplication.

Le gène *codY* sauvage se situe au locus normal ou dans une zone dupliquée délocalisée. L'étude de la structure chromosomique de ces clones en champs pulsés devrait permettre de répondre à cette question.

III.2) Etude en champs pulsés

Pour effectuer l'étude de la structure chromosomique de ces souches, nous avons sélectionné 2 clones obtenus avec ou sans ADN R800. Les cellules ont été traitées de la même façon que la souche R2597. Les résultats sont présentés à la figure C.10.

Le profil obtenu pour la souche R1501 correspond au profil attendu pour cette souche (figure C.10 et C.13). L'hybridation de la sonde *codY* (sauvage) révèle les fragments 4 et 15 (fléchés en vert) pour les digestions *SmaI* et *ApaI* respectivement (table C.2). Pour les 2 clones mérodiplloïdes testés (R3022 et R3023), ces fragments disparaissent pour les deux enzymes. Il semble donc que la copie sauvage de *codY* dans ces mutants ne soit pas localisée au locus normal mais délocalisée à un autre endroit du génome.

R1501	<i>codY</i>			<i>trim</i>		
	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~
<i>SmaI</i>	4	224593	225000	-	-	-
<i>ApaI</i>	15	44627	45000	-	-	-

R1501 <i>codY::trim</i> /R3022	<i>codY</i>			<i>trim</i>		
	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~
<i>SmaI</i>	-	-	210000	4,1	198858	210000
<i>ApaI</i>	-	-	13000	15,2	35086	35000

R1501 <i>codY::trim</i> /R3023	<i>codY</i>			<i>trim</i>		
	n°	attendu	obtenu ~	n°	attendu	obtenu ~
<i>SmaI</i>	-	-	300000	4,1	198858	200000
<i>ApaI</i>	-	-	108000	15,2	35086	35000

Table C.2 : Tailles des fragments attendus à l'hybridation du gel en champs pulsés pour R1501 et R1502*codY::trim*.

Les sondes utilisées sont inscrites en rouge. Les tailles des fragments sont indiquées en pb. La souche R1502*codY::trim*, est une souche théorique qui porterait une insertion simple de la mutation *codY::trim*.

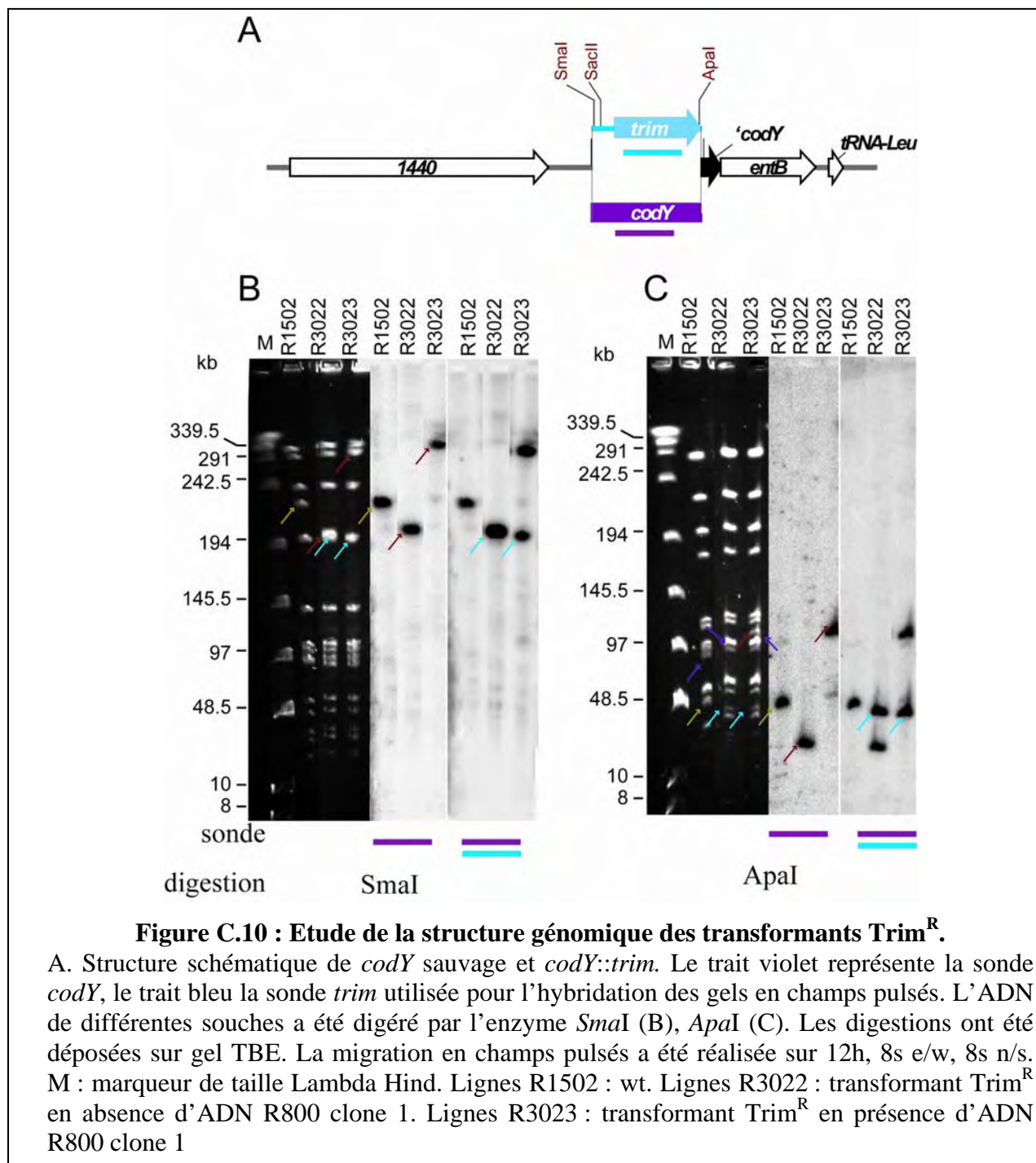
Analyse de la souche R3022.

La souche R3022 a été obtenue par transformation de la souche R1501 par le fragment PCR de 10 kb contenant *codY::trim*.

Dans la digestion *SmaI*, la bande aux alentours de 200 kb (fléchée en rouge) a une intensité beaucoup plus forte. L'hybridation de la sonde *codY* sauvage révèle la présence du gène *codY* sauvage dans cette bande (fléchée en rouge). La taille du fragment révélé par la sonde *codY* est d'environ 210 kb. L'hybridation de la sonde *trim* révèle également la présence de *codY::trim* dans un fragment d'environ 210 kb (fléché en bleu). Ce fragment a une taille légèrement plus grande que le fragment attendu pour un mutant *codY::trim* non mérodiplloïde.

Il est envisageable que *codY* sauvage et *codY::trim* se trouvent sur le même fragment *SmaI* ou sur deux fragments différents mais de taille équivalente. Si l'on regarde l'intensité en coloration BET de la bande révélée par les deux sondes, il semble qu'elle soit augmentée de 2

fois par rapport à la souche sauvage. Il semble donc que cette bande (fléchée en rouge et en bleu) contienne le fragment n° 5 (figure C.13) comme dans la souche sauvage et un autre fragment légèrement plus grand (portant *codY* sauvage et *codY::trim*). Le fragment *SmaI* contenant *codY::trim* (n°4.1) est augmenté d'environ 10kb, et porte *codY::trim* et *codY* sauvage.



Dans la digestion *ApaI*, un fragment d'environ 35 kb (fléché en bleu) apparaît. Cette bande est révélée par la sonde *trim* (fléchée en bleu) comme on l'attend pour une localisation

de la mutation *codY::trim* au locus normal dans le chromosome. Le fragment n°9 de 91 kb dans la souche sauvage est déplacé autour de 100 kb (flèches violettes). De plus, une nouvelle bande de 13 kb environ (fléchée en rouge) est révélée par l'hybridation avec la sonde *codY* sauvage.

La souche R3022 portent une duplication de *codY* assez proche de la mutation *codY::trim* (figure C.11) car elles se situent dans le même fragment *SmaI* (n°4.1). Ce fragment est chevauchant avec les fragments n°5, 10 et 23 de la digestion *ApaI* (figure C.13). Les fragments n°5 et 10 sont toujours à la bonne taille dans le mutant R3022, mais le fragment n°23 de 2 kb n'est pas visible sur ce gel. Il est envisageable qu'une duplication de 10-11 kb contenant le gène *codY* sauvage se soit insérée dans ce fragment pour créer un nouveau fragment de 13 kb révélé par la sonde *codY* sauvage (figure C.10 et C.11).

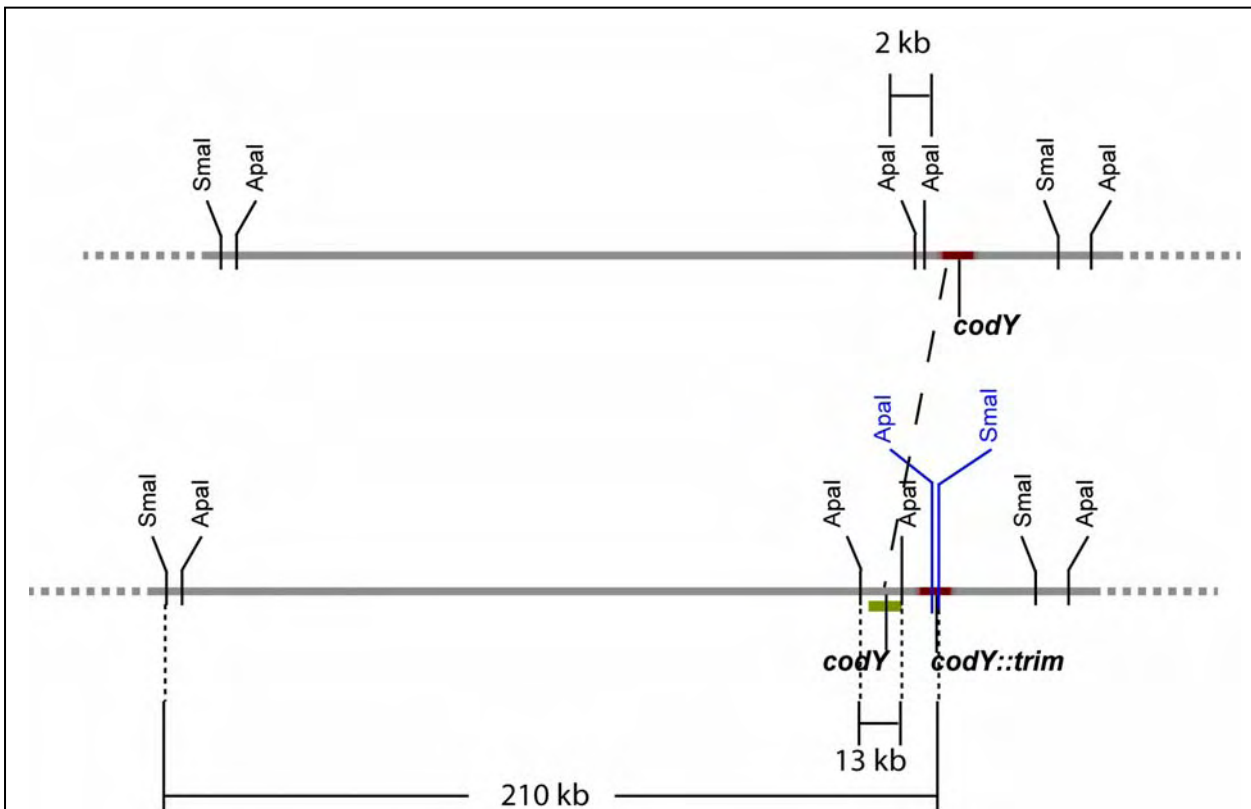


Figure C.11 : duplication du locus *codY* R3022

Haut : locus *codY* dans la souche sauvage. Bas : duplication de *codY* dans R3022. Une séquence d'environ 10 kb contenant *codY* sauvage a été dupliquée et délocalisée entre les sites *ApaI* (fragment n°23) en amont du locus *codY::trim*.

Analyse de la souche R3023.

La souche R3023 a été obtenue par transformation de la souche R1501 avec simultanément le fragment PCR de 10 kb contenant *codY::trim* et l'ADN chromosomique sauvage (R800).

Dans la digestion *Sma*I, le fragment n° 2 (fléché en rouge) d'environ 300 kb semble légèrement plus grand que celui observé pour la souche R1501 et est révélée par la sonde *codY* sauvage. L'hybridation de la sonde *trim* révèle un fragment d'environ 200 kb (fléché en bleu). Cette bande qui contient ce fragment est d'intensité double par rapport à la souche sauvage. Cette bande contient le fragment n°5 et le fragment n°4.1 contenant la mutation *codY::trim* (figure C.13). Il semble donc que la mutation *codY::trim* se trouve au locus normal et que le gène *codY* sauvage se trouve sur une duplication insérée dans le fragment n°2 de la digestion *Sma*I.

Dans la digestion *Apa*I, le fragment n°10 de 87 kb (fléché en violet sur le profil sauvage) semble se retrouver à environ 108 kb et est révélée par la sonde *codY* sauvage (fléché en violet). La sonde *trim* révèle le fragment n°15.2 de 35 kb (fléché en bleu) comme on attend pour une localisation de *codY::trim* au locus normal.

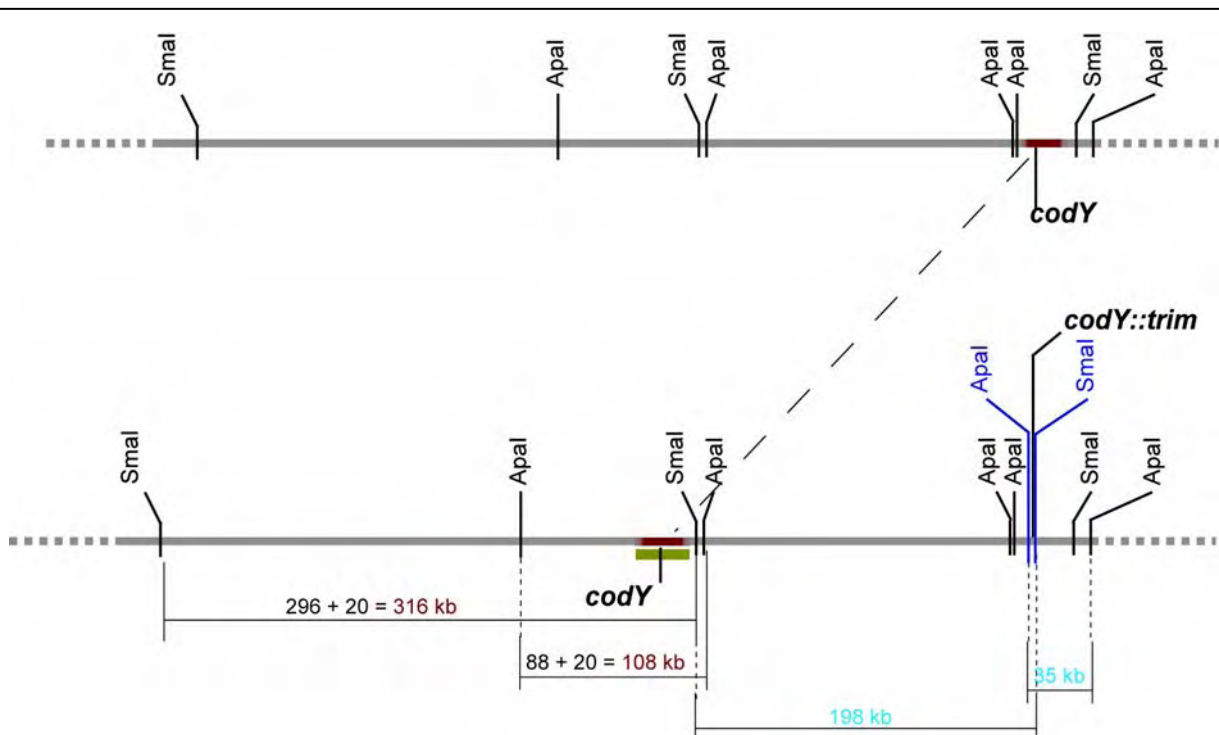


Figure C.12 : duplication du locus *codY* dans R3023

Haut : locus *codY* dans la souche sauvage. Bas : duplication de *codY* dans R3023. Une séquence d'environ 20 kb contenant *codY* sauvage a été dupliquée et délocalisée entre les sites *Apa*I (fragment n°10) en amont du locus *codY::trim*. Les fragments dont la taille est inscrite en bleu sont révélés par la sonde *trim*, ceux en rouge sont révélés par la sonde *codY*

Le mutant R3023 portent une duplication de *codY* sauvage qui est localisée dans le fragment *SmaI* n°2. Ce fragment est chevauchant avec les fragments n° 10 et 1 de la digestion *ApaI*. Le fragment *ApaI* n°10 à une taille augmentée d'environ 20-21 kb. La mutation *codY::trim* se soit insérée au locus normal et une duplication d'environ 20-21 kb contenant le gène *codY* sauvage s'est insérée dans le fragment n° 10 de la digestion *ApaI* (figure C.12).

IV) Conclusion

Cette étude de différents mutants mérodiplôides montre que la mutation *codY::trim* peut être intégrée sans létalité dans une souche portant deux copies de la région *codY* comme nous avons déjà vu en insérant de façon ciblée une duplication de *codY* à CEP (chapitre 2).

Nos expériences préliminaires semblent montrer que la présence d'ADN chromosomique augmente la formation de structures mérodiplôides. Ces expériences devront être répétées dans différentes conditions pour être vraiment exploitables (différentes tailles de fragment PCR donneur, différentes concentrations d'ADN chromosomiques et de PCR, différents contextes génétiques). En effet, dans les 4 expériences menées le facteur d'augmentation du nombre de transformants *codY::trim* en présence d'ADN sauvage varie de 2 à 10. Il faudra donc tester de nombreuses combinaisons pour obtenir un effet optimal.

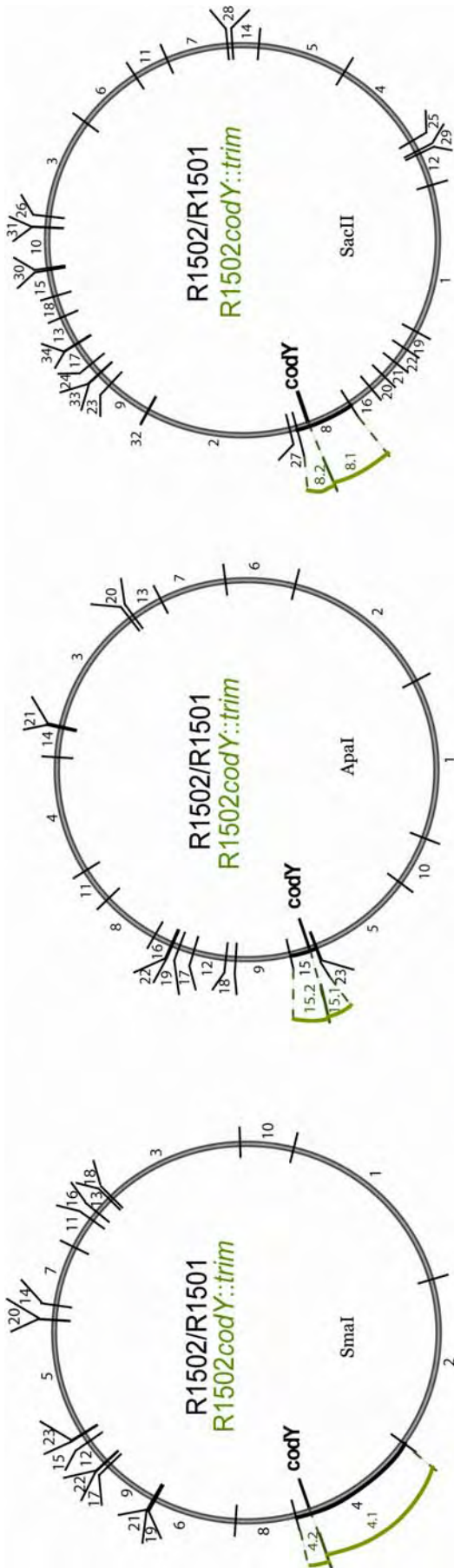
De plus, l'étude de la structure chromosomique de plusieurs souches mérodiplôides montre que ces structures ne sont pas stables. En effet, deux méthodes d'études différentes (champs pulsés et séquençage génomique) menées sur la souche de R2597 démontrent que la duplication d'une partie du génome peut être remaniée au cours de la croissance.

L'étude des souches mérodiplôides R2597, R3022 et R3023 montre que différentes duplications peuvent être obtenues.

Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer le mécanisme permettant la formation de ces structures. Les bornes de la duplication identifiée grâce au séquençage génomique (IS861) sont composées de séquences répétées sur le génome. Ces séquences pourraient jouer un rôle dans la formation de structures mérodiplôides au cours de la transformation.

Figure C.13 : Digestion de R1502 et R1502*codY::trim* par *SmaI*, *ApaI*, et *SacII*.

Pour chaque enzyme, la carte de restriction est représentée en noir pour la souche R1502. Les fragments générés par l'intégration de la mutation *codY::trim* sont représentés en vert. Chaque tableau représente le numéro et la taille des fragments attendus pour les deux souches. Le fragment inscrit en noir est celui qui contient le gène *codY*. Les fragments inscrit en vert correspondent aux deux fragments générés par l'introduction de la mutation *codY::trim*, celui pointé par une flèche est celui qui contient *codY::trim*.



R1502		R1502::codY::trim	
1	251307	1	251307
2	242213	2	242213
3	169667	3	169667
4	162700	4	162700
5	150825	5	150825
6	113686	6	113686
7	104043	7	104043
8	97504	8.1	78963
9	76015	8.2	18532
10	63341	9	76015
11	59485	10	63341
12	56186	11	59485
13	50014	12	56186
14	44463	13	50014
15	44102	14	44463
16	43537	15	44102
17	40405	16	43537
18	36959	17	40405
19	34017	18	36959
20	29680	19	34017
21	29220	20	29680
22	28341	21	29220
23	24647	22	28341
24	20680	23	24647
25	18871	24	20680
26	18021	25	18871
27	11587	26	18021
28	8085	27	11587
29	5826	28	8085
30	3760	29	5826
31	840	30	3760
32	840	31	840
33	840	32	840
34	840	33	840
		34	840

R1502		R1502::codY::trim	
1	279101	1	279101
2	271656	2	271656
3	221996	3	221996
4	198980	4	198980
5	181975	5	181975
6	121025	6	121025
7	115839	7	115839
8	101302	8	101302
9	93648	9	93648
10	87103	10	87103
11	61925	11	61925
12	56345	12	56345
13	54410	13	54410
14	50988	14	50988
15	44627	15.1	9532
16	31610	15.2	35086
17	25461	16	31610
18	16532	17	25461
19	11953	18	16532
20	7750	19	11953
21	2851	20	7750
22	2729	21	2851
23	2564	22	2729
		23	2564

R1502		R1502::codY::trim	
1	340914	1	340914
2	296544	2	296544
3	241355	3	241355
4	224593	4.1	198858
5	198888	4.2	25726
6	140581	5	198888
7	104605	6	140581
8	101643	7	104605
9	93069	8	101643
10	91582	9	93069
11	55704	10	91582
12	44680	11	55704
13	30385	12	44680
14	24783	13	30385
15	16320	14	24783
16	15773	15	16320
17	7508	16	15773
18	5533	17	7508
19	3407	18	5533
20	925	19	3407
21	925	20	925
22	925	21	925
23	925	22	925
		23	925

Figure C.13

***ANNEXE D : Test de différents gènes candidats
suppresseurs***

Au cours de ma thèse, avant d'avoir obtenu les résultats du séquençage génomique de la souche D39 Δ *codY*, plusieurs candidats de gènes suppresseurs ont été testés : *glnR*, *rshA/rshQ*, et *ccpA*.

I) Transfert dans un contexte *glnR*

Comme un double mutant *glnR codY* avait été construit (Kloosterman *et al.*, 2006), le gène *glnR* avait été choisi parmi les candidats.

Pour tester ce candidat, des mutants *glnR* ont été construits en contexte R800 par la méthode de mutagenèse *mariner* sur le fragment PCR GlnR1/GlnR2. Une quarantaine de clones ont été sélectionnés au hasard, et 13 clones ont été vérifiés par PCR et les insertions du minitransposon ont été localisées (pour ces 13 clones) et orientées (pour 7 d'entre eux) (voir Matériel et méthodes chapitre 3 et figure D.1 A). Les insertions se trouvent préférentiellement au centre du fragment ciblé. Le gène *glnR* ne semble donc pas essentiel. L'insertion *kan*^{22C} se trouve dans le gène *glnR* et l'inactive. Le mutant *glnR::kan*^{22C} a donc été utilisé pour la suite de ce travail (figure D.1 A).

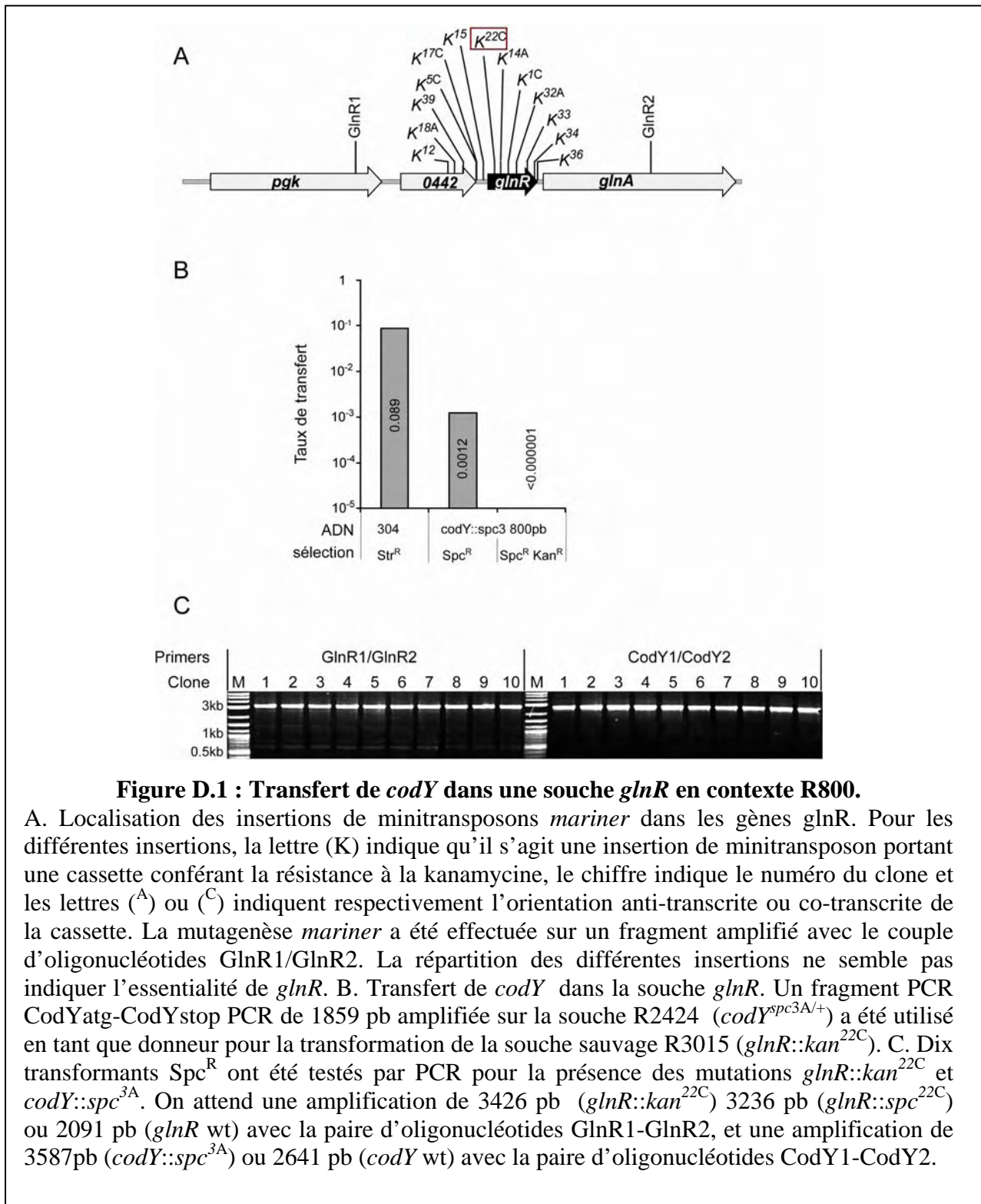
Ce mutant a été utilisé en tant que souche réceptrice pour une transformation avec un fragment PCR amplifié avec la paire d'oligonucléotide CodYatg/CodYstop contenant la mutation *codY::spc*^{3A} (figure D.1.B). Les transformants Spc^R ont été sélectionnés. Le taux de transfert observé pour le gène *spc* est 0,0012.

Si l'on sélectionne simultanément Spc^R (*codY*-) et Kan^R (*glnR*-), on n'obtient aucun clone transformant. La mutation *glnR* n'est donc pas capable de compenser l'absence de CodY.

Mais alors, que sont les clones transformants Spc^R ? Dix transformants Spc^R ont été sélectionnés au hasard et la présence des mutations *glnR::kan*^{22C} et *codY::spc*^{3A} a été vérifiée par PCR (figure D.1.C).

Les dix clones portent un gène *codY* sauvage et un gène *glnR* muté. La taille de l'amplification obtenue avec les oligonucléotides GlnR1/GlnR2 ne correspond pas à *glnR::kan* (3426 pb), mais à une structure *glnR::spc* (3236 pb). Les clones Spc^R obtenus ne sont donc pas des doubles mutants *glnR codY*, mais des mutants *glnR* dans lesquels le minitransposon *kan* a été substitué par le minitransposon *spc* contenu dans la PCR donneuse (*codY::spc*). Ce phénomène de remplacement de cassette a été utilisé pour changer l'orientation ou la nature de la cassette de résistance contenue dans des minitransposons insérés dans *rshA* et *codY* (voir Matériel et méthodes chapitre 1 et chapitre 3)

Dans le contexte R800, *glnR* ne permet pas de compenser l'absence de CodY.



Le mutant *glnR codY* de T. Kloosterman a été obtenu en contexte D39 (Kloosterman *et al.*, 2006), alors que les expériences décrites dans ce paragraphe ont été réalisées en contexte R800. Le gène *glnR* a peut-être une activité suppresseur dans le contexte D39. Il serait donc intéressant de tester l'effet suppresseur de ce gène dans un contexte D39 en transformant une

souche D39*glnR* par l'ADN de la souche TD80 et en analysant le taux de transfert de la mutation *codY* dans ce contexte comme nous l'avons fait au chapitre 2 avec les mutants *amiC* et *fatC*.

II) Transfert dans un contexte *rshA/rshQ*

Les mutants *rshA*, *rshQ* et *rshA rshQ* ont également été testés. Nous avons choisi ces candidats, car il existe des études chez *B. subtilis* qui montrent qu'un double mutant *relA codY* a une croissance améliorée par rapport à un mutant *relA* (Inaoka et Ochi, 2002). De plus, un phénomène similaire est observé chez *S. aureus* (Geiger *et al.*, 2010).

Les souches *rshA*, *rshQ* et *rshA rshQ* ont été transformées par un fragment PCR portant une mutation *codY::ery* (figure D.2 A).

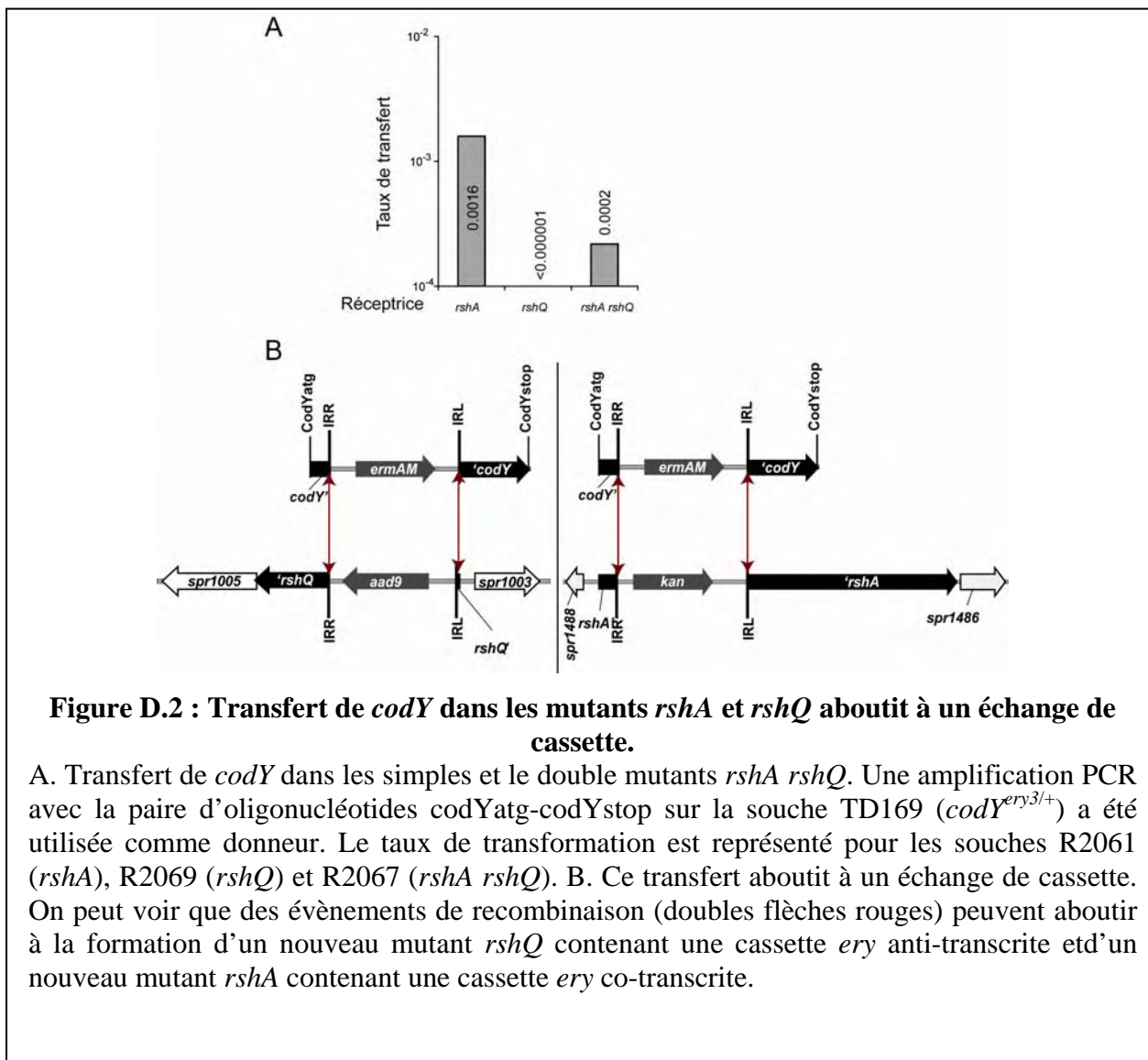


Figure D.2 : Transfert de *codY* dans les mutants *rshA* et *rshQ* aboutit à un échange de cassette.

A. Transfert de *codY* dans les simples et le double mutants *rshA rshQ*. Une amplification PCR avec la paire d'oligonucléotides *codYatg-codYstop* sur la souche TD169 (*codY^{ery3/+}*) a été utilisée comme donneur. Le taux de transformation est représenté pour les souches R2061 (*rshA*), R2069 (*rshQ*) et R2067 (*rshA rshQ*). B. Ce transfert aboutit à un échange de cassette. On peut voir que des événements de recombinaison (doubles flèches rouges) peuvent aboutir à la formation d'un nouveau mutant *rshQ* contenant une cassette *ery* anti-transcrite et d'un nouveau mutant *rshA* contenant une cassette *ery* co-transcrite.

Cette PCR portant une mutation *codY::ery* a été obtenue à partir de la souche TD169 (*codY^{ery/+}*). Cette souche a été construite par substitution du minitransposon *spc* par le minitransposon *ery* contenu dans le pR409 (voir Matériel et méthode : remplacement de cassette).

Lorsqu'on transforme la souche *rshA* on obtient un taux de transformation de 0,0016.

Lorsqu'on transforme la souche *rshQ* on n'obtient aucun transformant. Ceci montre que *rshQ* n'est pas capable de compenser l'absence de CodY.

Avec la souche double mutante *rshA rshQ*, on obtient un taux de transformation intermédiaire (figure D.2 A). Cependant, il est possible que les clones transformants Ery^R obtenus soient issus d'un remplacement de minitransposon. Ce remplacement n'est pas possible pour la souche *rshQ*, car le remplacement du minitransposon dans ce gène implique le retournement de la cassette de résistance (figure D.2 B). Ceci est impossible pour le gène *rshQ* car on a vu au chapitre 1 que les insertions dans ce gène ne peuvent être que co-transcrites.

Pour vérifier que les clones transformants Ery^R ont intégré la cassette *ery* au locus *rshA*, 10 clones transformants issus des souches *rshA* et *rshA rshQ* ont été sélectionnés. Tous ces clones sont Ery^R mais ont perdu la résistance à la kanamycine associée à la mutation *rshA*. Le minitransposon *kan* a donc été remplacé par la minitransposon *ery* comme nous l'avons déjà vu en contexte *glnR*-.

III) Transfert dans un contexte *ccpA*

Un autre candidat que nous avons testé est le gène *ccpA*. CcpA est tout comme CodY un régulateur métabolique global. Ces deux gènes régulent un grand nombre de gènes en commun. De plus, sur la plupart de ces gènes, la régulation par CcpA est une activation et la régulation par CodY est une répression chez *B. subtilis* (Shivers *et al.*, 2006 ; Shivers et Sonenshein, 2005). Il est donc possible qu'en absence de CodY, CcpA « active trop » certains gènes. Ceci peut être néfaste pour la croissance.

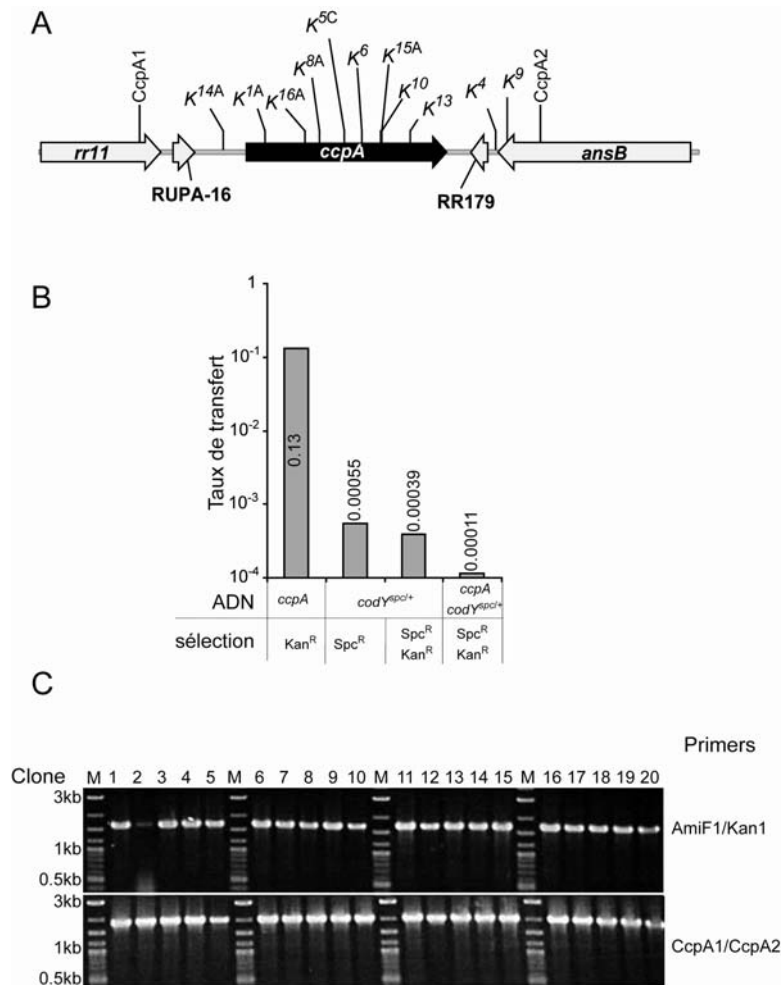


Figure D.3 : Transfert de *codY* et *ccpA* dans la souche sauvage.

A. Localisation des insertions de minitransposons *mariner* dans le gène *ccpA*. Pour les différentes insertions, la lettre (K) indique qu'il s'agit d'une insertion de cassette conférant la résistance à la kanamycine, le chiffre indique le numéro du clone et les lettres (A) ou (C) indiquent respectivement l'orientation anti-transcrite ou co-transcrite de la cassette. La mutagenèse *mariner* a été effectuée sur un fragment PCR amplifié avec le couple d'oligonucléotides *ccpA1/ccpA2*. La répartition des différentes insertions ne semble pas indiquer l'essentialité de *ccpA*. B. Transfert de *codY* et *ccpA* dans la souche sauvage. L'ADN des souches R3021 (*ccpA::kan^{1A}*) et R2438 (*codY^{spc3/+}*) a été utilisé en tant que donneur pour la transformation de la souche sauvage R1501 (*comC₀*). C. Vingt transformants Spc^R Kan^R obtenus avec les ADN R3021 et R2438 donnés simultanément ont été testés par PCR pour la présence de la mutation *ccpA::kan^{1A}* ou la présence de la plateforme CEP-*codY*+. On attend une amplification (1681 pb) avec la paire d'oligonucléotides AmiF1-kan1 seulement en présence de CEP-*codY*+ (panneau du haut). L'amplification avec la paire d'oligonucléotides *ccpA1-ccpA2* est attendue à 2026 pb pour *ccpA*+ et 3363 pb pour *ccpA::kan^{1A}*. M, marqueur de taille (2-log ladder)

Tout d'abord, le gène *ccpA* a été muté en utilisant la technique de mutagenèse *mariner* sur le fragment PCR CcpA1/CcpA2. Une vingtaine de clones a été sélectionnée au hasard et les insertions de 11 de ces 20 clones ont été vérifiées et localisées, et 6 ont été orientées par

PCR (figure D.3.A). Les insertions se situent tout le long du fragment ciblé. Ceci suggère que *ccpA* n'est pas un gène essentiel.

La souche *ccpA::kan^{IA}* a ensuite été sélectionnée pour la suite des expériences car le minitransposon est inséré dans le gène *ccpA* et l'inactive.

La souche sauvage a été transformée avec l'ADN chromosomique des souches *ccpA::kan^{IA}*, *codY^{spc/+}* ou les deux. Lorsqu'on transforme avec l'ADN *ccpA::kan^{IA}*, on obtient un taux de transfert élevé (0,13), ce qui confirme que *ccpA* n'est pas un gène essentiel chez *S. pneumoniae*.

Si on transforme avec l'ADN de la souche *codY^{spc/+}*, on obtient un taux de transfert beaucoup plus faible (0,00055). Ceci est en accord avec l'essentialité de *codY*. Ce taux de transfert correspond au transfert de *codY::spc* et de CEP-*codY-kan* contenus dans la souche donatrice *codY^{spc/+}*. Pour vérifier ceci, nous avons effectué la même transformation en sélectionnant Spc^R et Kan^R. Le taux de transfert observé est équivalent. Tous les mutants ayant intégré le marqueur *codY::spc* ont également intégré le marqueur CEP-*codY-kan*.

Lorsque la souche sauvage est transformée simultanément par les ADN chromosomiques de *ccpA::kan^{IA}* et *codY^{spc/+}*, on s'attend si *ccpA* est suppresseur à un taux de transfert équivalent à celui obtenu avec l'ADN *codY^{spc/+}* seul. En effet, pour intégrer *codY* il faudra le transfert simultané soit de CEP-*codY-kan* soit de *ccpA::kan^{IA}*. On observe, pour la transformation avec les ADN *ccpA::kan^{IA}* et *codY^{spc/+}*, un taux de transfert plus faible que pour l'ADN *codY^{spc/+}* seul. Ceci semble indiquer que *ccpA* est incapable de supprimer l'inviabilité des mutants *codY*. Ainsi, les mutants Spc^R et Kan^R obtenus par transformation avec les deux ADN portent probablement *codY::spc* et CEP-*codY-kan*. La diminution du taux de transfert observé est probablement due à une compétition à l'entrée de l'ADN CEP-*codY-kan* et de l'ADN *ccpA::kan^{IA}* (figure D.3.B).

Pour vérifier que les clones obtenus ne sont pas des doubles mutants *codY ccpA*, nous avons effectué des amplifications PCR sur 20 clones issus de la transformation avec les deux ADN (figure D.3.C). Ces amplifications montrent que tous les clones ont récupéré CEP-*codY-kan* et sont *ccpA* sauvage.

Le gène *ccpA* ne permet donc pas de compenser l'absence de CodY.

ANNEXE E : Abréviations et définitions

Abréviations :

aa : acide aminé
 ACP : Acyl Carrier Protein
 ACT : Aspartokinase, Chorismate mutase, TyrA Domain
 ADN : Acide Désoxyribonucléique
 Ap^R : résistant à l'Ampicilline
 ARN : Acide Ribonucléique
 ATP : Adenosine Triphosphate
 BCAA : Branched Chain Amino Acid ; acide aminé branché
 BET : Bromure d'Ethidium
 BSA : Bovin Serum Albumin
 CSP : Competence Stimulating Peptide
 DO : Densité Optique
 DOC : Désoxycholate
 DMSO : Diméthylsulfoxyde
 EDTA : Acide Ethylènediamine Tétracétique
 EGTA : Ethylèneglycol Tétracétique
 Ery^R : résistant à l'Erythromycine
 GAF : cGMP-stimulated phosphodiesterases, Adenylate cyclases, FhlA Domain
 GDP : Guanosine Diphosphate
 Cm^R : résistant au Chloramphénicol
 GTP : Guanosine Triphosphate
 HD : Hydrolyse Domain
 HE : High Efficiency
 Hex : Heteroduplex Excision ; système de réparation des mésappariements
 HTH : Helix-turn-Helix
 IF2 : Initiation Factor 2
 Kan^R : résistant à la Kanamycine
 LE : Low Efficiency
 LMP : Low Melting Point
 MSI : Magic Spot I ; ppGpp
 MSII : Magic Spot II ; pppGpp
 NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
 Nov^R : résistant à la Novobiocine
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 ORP : Observatoires Régionaux du Pneumocoque
 PBP : Penicillin Binding Protein
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PEI-cellulose : Polyéthylèneimine cellulose
 pH : potentiel Hydrogène
 Pi : Phosphate inorganique
 PMSF : Phenylmethanesulfonylfluoride
 ppGpp : Guanosine tetraphosphate
 PPi : Pyrophosphate
 pppGpp : Guanosine pentaphosphate
 RC : RNA Control
 Rel_{Mtb} : protéine Rel de *Mycobacterium tuberculosis*

rel-spo : Domaine homologue de RelA et SpoT ; synthèse du ppGpp
 Rif^R : résistant à la Rifampicine
 RLU : Relative Luminescence Unit
 RMP : Recombination Mediator Protein
 SAS : Small Alarmone Synthetase
 SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
 SHX : Sérine Hydroxamate
 Sm^R : résistant à la Streptomycine
 Spc^R : résistant à la Spectinomycine
 SSC : Saline-Sodium Citrate
 TAE : Tris Acetate EDTA
 tARN : ARN de transfert
 TBE : Tris Borate EDTA
 TCS : Two Component System ; système de transduction du signal à deux composants
 TGS : Thréonyl-tRNA synthetase, GTPase, SpoT Domain
 Trim^R : résistant au Triméthoprim
 WHO : World Health Organization
³²Pi : Phosphate radioactif

Définitions :

ADN processome : Ensemble de protéines prenant en charge l'ADN entrant

Compétence : Etat physiologique transitoire durant lequel les bactéries sont naturellement transformables

cup : Phénotype associé à des souches dans lesquelles la compétence est déréprimée

Pore d'entrée : Complexe multiprotéique permettant le passage de l'ADN au travers de l'enveloppe

Recombinaison homologue : Processus d'échange de brins

E. REFERENCES

- Alloing, G., Granadel, C., Morrison, D. A., et Claverys, J. P. (1996). Competence pheromone, oligopeptide permease, and induction of competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol* 21, 471-478.
- Alloing, G., Martin, B., Granadel, C., et Claverys, J. P. (1998). Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. *Mol. Microbiol* 29, 75-83.
- Alloing, G., de Philip, P., et Claverys, J. P. (1994). Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol* 241, 44-58.
- Appelbaum, P. C. (1992). Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. *Clin. Infect. Dis* 15, 77-83.
- Aravind, L., et Koonin, E. V. (1999). Gleaning non-trivial structural, functional and evolutionary information about proteins by iterative database searches. *J. Mol. Biol* 287, 1023-1040.
- Artsimovitch, I., Patlan, V., Sekine, S., Vassilyeva, M. N., Hosaka, T., Ochi, K., Yokoyama, S., et Vassilyev, D. G. (2004). Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. *Cell* 117, 299-310.
- Ast, J. C., Urbanczyk, H., et Dunlap, P. V. (2007). Natural merodiploidy of the *lux-rib* operon of *Photobacterium leiognathi* from coastal waters of Honshu, Japan. *J. Bacteriol* 189, 6148-6158.
- Atherly, A. G. (1979). *Escherichia coli* mutant containing a large deletion from *relA* to *argA*. *J. Bacteriol* 138, 530-534.
- Attaiech (2009). Déterminant de stabilité et de maturation de l'ADN internalisé lors de la transformation naturelle chez *Streptococcus pneumoniae*. Thèse de l'université Paul Sabatier Toulouse III
- Austrian, R., et Bernheimer, H. P. (1959). Simultaneous production of two capsular polysaccharides by pneumococcus. I. Properties of a pneumococcus manifesting binary capsulation. *J. Exp. Med* 110, 571-584.
- Avarbock, A., Avarbock, D., Teh, J., Buckstein, M., Wang, Z., et Rubin, H. (2005). Functional regulation of the opposing (p)ppGpp synthetase/hydrolase activities of Rel_{Mtb} from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* 44, 9913-9923.
- Avery, O. T., Macleod, C. M., et McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *J. Exp. Med* 79, 137-158.
- Barker, M. M., Gaal, T., Josaitis, C. A., et Gourse, R. L. (2001). Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation *in vivo* and *in vitro*. *J. Mol. Biol* 305, 673-688.

- Battesti, A., et Bouveret, E. (2009). Bacteria Possessing Two RelA/SpoT-Like Proteins Have Evolved a Specific Stringent Response Involving the Acyl Carrier Protein-SpoT Interaction. *Journal of Bacteriology* *191*, 616-624.
- Battesti, A., et Bouveret, E. (2006). Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol* *62*, 1048-1063.
- Batzilla, C. F., Rachid, S., Engelmann, S., Hecker, M., Hacker, J., et Ziebuhr, W. (2006). Impact of the accessory gene regulatory system (Agr) on extracellular proteins, *codY* expression and amino acid metabolism in *Staphylococcus epidermidis*. *Proteomics* *6*, 3602-3613.
- Belitsky, B. R., et Sonenshein, A. L. (2007). Genetic and Biochemical Analysis of CodY-Binding Sites in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* *190*, 1224-1236.
- Bennett, H. J., Pearce, D. M., Glenn, S., Taylor, C. M., Kuhn, M., Sonenshein, A. L., Andrew, P. W., et Roberts, I. S. (2007). Characterization of *relA* and *codY* mutants of *Listeria monocytogenes*: identification of the CodY regulon and its role in virulence. *Molecular microbiology* *63*, 1453–1467.
- Bergara, F., Ibarra, C., Iwamasa, J., Patarroyo, J. C., Aguilera, R., et Márquez-Magaña, L. M. (2003). CodY is a nutritional repressor of flagellar gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol* *185*, 3118-3126.
- Bergé, M., Mortier-Barrière, I., Martin, B., et Claverys, J. (2003). Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands. *Mol. Microbiol* *50*, 527-536.
- Bergé, M., Moscoso, M., Prudhomme, M., Martin, B., et Claverys, J. (2002). Uptake of transforming DNA in Gram-positive bacteria: a view from *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol* *45*, 411-421.
- van der Biezen, E. A., Sun, J., Coleman, M. J., Bibb, M. J., et Jones, J. D. (2000). *Arabidopsis* RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *97*, 3747-3752.
- Blagova, E. V., Levnikov, V. M., Tachikawa, K., Sonenshein, A. L., et Wilkinson, A. J. (2002). Crystallization of the GTP-dependent transcriptional regulator CodY from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* *59*, 155–157.
- Brown, J. S., Gilliland, S. M., et Holden, D. W. (2001a). A *Streptococcus pneumoniae* pathogenicity island encoding an ABC transporter involved in iron uptake and virulence. *Molecular microbiology* *40*, 572–585.
- Brown, J. S., Ogunniyi, A. D., Woodrow, M. C., Holden, D. W., et Paton, J. C. (2001b). Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infection and immunity* *69*,

6702.

- Brown, J. S., Gilliland, S. M., Ruiz-Albert, J., et Holden, D. W. (2002). Characterization of *pit*, a *Streptococcus pneumoniae* iron uptake ABC transporter. *Infect. Immun* 70, 4389-4398.
- Brueggemann, A. B., Pai, R., Crook, D. W., et Beall, B. (2007). Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog* 3, e168.
- Burghout, P., Bootsma, H. J., Kloosterman, T. G., Bijlsma, J. J. E., de Jongh, C. E., Kuipers, O. P., et Hermans, P. W. M. (2007). Search for genes essential for pneumococcal transformation: the RADA DNA repair protein plays a role in genomic recombination of donor DNA. *J. Bacteriol* 189, 6540-6550.
- Cashel, M., et Gallant, J. (1969). Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* 221, 838-841.
- Cashel, M., et Kalbacher, B. (1970). The control of ribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. V. Characterization of a nucleotide associated with the stringent response. *J. Biol. Chem* 245, 2309-2318.
- Cashel, M., Gentry, D. R., Hernandez, V. J., et Vinella, D. (1996). The stringent response. Dans *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology (Washington, DC: F. C. Neidhardt), p. pp. 1458-1496.
- Cashel, M., et Rudd, K. (1987). The Stringent Response. Dans *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology (In Neidhardt, F.C. (ed.)), p. p. 1410-1438.
- Caymaris, S., Bootsma, H. J., Martin, B., Hermans, P. W. M., Prudhomme, M., et Claverys, J. (2010). The global nutritional regulator CodY is an essential protein in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 78, 344-360.
- Chambellon, E., et Yvon, M. (2003). CodY-regulated aminotransferases AraT and BcaT play a major role in the growth of *Lactococcus lactis* in milk by regulating the intracellular pool of amino acids. *Appl. Environ. Microbiol* 69, 3061-3068.
- Chastanet, A., Prudhomme, M., Claverys, J. P., et Msadek, T. (2001). Regulation of *Streptococcus pneumoniae* *clp* genes and their role in competence development and stress survival. *Journal of Bacteriology* 183, 7295.
- Chatterji, D., Fujita, N., et Ishihama, A. (1998). The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Genes Cells* 3, 279-287.
- Chen, J. D., et Morrison, D. A. (1987). Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol* 133, 1959-1967.
- Cheng, Q., Campbell, E. A., Naughton, A. M., Johnson, S., et Masure, H. R. (1997). The *com* locus controls genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol*

- 23, 683-692.
- Chi, F., Nolte, O., Bergmann, C., Ip, M., et Hakenbeck, R. (2007). Crossing the barrier: evolution and spread of a major class of mosaic *pbp2x* in *Streptococcus pneumoniae*, *S. mitis* and *S. oralis*. *Int. J. Med. Microbiol* 297, 503-512.
- Chiaramello, A. E., et Zyskind, J. W. (1989). Expression of *Escherichia coli dnaA* and *mioC* genes as a function of growth rate. *J. Bacteriol* 171, 4272-4280.
- Claverys, J. P., Prudhomme, M., Mortier-Barrière, I., et Martin, B. (2000). Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Mol. Microbiol* 35, 251-259.
- Claverys, J. P., et Håvarstein, L. S. (2002). Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Bioscience* 7, 1798–1814.
- Claverys, J. P., Grossiord, B., et Alloing, G. (2000). Is the Ami-AliA/B oligopeptide permease of *Streptococcus pneumoniae* involved in sensing environmental conditions? *Research in microbiology* 151, 457–463.
- Claverys, J. P., Martin, B., et Håvarstein, L. S. (2007). Competence-induced fratricide in streptococci. *Molecular microbiology* 64, 1423.
- Claverys, J. P., et Lacks, S. A. (1986). Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 50, 133.
- Claverys, J., et Martin, B. (2003). Bacterial "competence" genes: signatures of active transformation, or only remnants? *Trends Microbiol* 11, 161-165.
- Claverys, J., Martin, B., et Polard, P. (2009). The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev* 33, 643-656.
- Claverys, J., Prudhomme, M., et Martin, B. (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* 60, 451-475.
- Coffey, T. J., Daniels, M., Enright, M. C., et Spratt, B. G. (1999). Serotype 14 variants of the Spanish penicillin-resistant serotype 9V clone of *Streptococcus pneumoniae* arose by large recombinational replacements of the *cpsA-pbp1a* region. *Microbiology (Reading, Engl.)* 145 (Pt 8), 2023-2031.
- Coffey, T. J., Dowson, C. G., Daniels, M., Zhou, J., Martin, C., Spratt, B. G., et Musser, J. M. (1991). Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes, and capsular biosynthetic genes, in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol* 5, 2255-2260.
- Cosby, W. M., Vollenbroich, D., Lee, O. H., et Zuber, P. (1998). Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *Journal of*

- bacteriology *180*, 1438.
- Cox, M. M. (2007). Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* *8*, 127-138.
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Hénard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J., et Claverys, J. P. (2004). Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of *ciaR* mutant cells. *Molecular microbiology* *51*, 1071–1086.
- Debarbouille, M., Gardan, R., Arnaud, M., et Rapoport, G. (1999). Role of *bkdR*, a transcriptional activator of the *sigL*-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* *181*, 2059.
- Desai, B. V., et Morrison, D. A. (2007). Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: formation of eclipse complex in a *coiA* mutant implicates CoiA in genetic recombination. *Mol. Microbiol* *63*, 1107-1117.
- Dineen, S. S., McBride, S. M., et Sonenshein, A. L. (2010). Integration of Metabolism and Virulence by *Clostridium difficile* CodY. *J Bacteriol.*
- Dineen, S. S., Villapakkam, A. C., Nordman, J. T., et Sonenshein, A. L. (2007). Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. *Mol. Microbiol* *66*, 206-219.
- Dowson, C. G., Coffey, T. J., Kell, C., et Whiley, R. A. (1993). Evolution of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*; the role of *Streptococcus mitis* in the formation of a low affinity PBP2B in *S. pneumoniae*. *Mol. Microbiol* *9*, 635-643.
- Dubnau, D. (1999). DNA uptake in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* *53*, 217-244.
- Dubnau, D. (1991). Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev* *55*, 395-424.
- Dubnau, D., et Provvedi, R. (2000). Internalizing DNA. *Res. Microbiol* *151*, 475-480.
- Durfee, T., Hansen, A., Zhi, H., Blattner, F. R., et Jin, D. J. (2008). Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* *190*, 1084-1096.
- Dworkin, J. (2001). Linking nutritional status to gene activation and development. *Genes & Development* *15*, 1051-1054.
- Echenique, J. R., Chapuy-Regaud, S., et Trombe, M. C. (2000). Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of *ciaRH* and *comCDE*. *Mol. Microbiol* *36*, 688-696.
- Eda, S., Hoshino, T., et Oda, M. (2000). Role of the DNA sequence downstream of the *Bacillus subtilis hut* promoter in regulation of the *hut* operon. *Biosci. Biotechnol. Biochem* *64*, 484-491.
- Ephrussi-Taylor, H., Sicard, A. M., et Kamen, R. (1965). Genetic Recombination in DNA-Induced Transformation of Pneumococcus. I. the Problem of Relative Efficiency of

- Transforming Factors. *Genetics* 51, 455-475.
- Ferson, A. E., Wray, L. V., et Fisher, S. H. (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* *gabP* gene is regulated independently in response to nitrogen and amino acid availability. *Mol. Microbiol* 22, 693-701.
- Fisher, S. H., Rohrer, K., et Ferson, A. E. (1996). Role of CodY in regulation of the *Bacillus subtilis* *hut* operon. *Journal of bacteriology* 178, 3779.
- Fisher, S. H. (1999). Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis* : vive la différence! *Molecular Microbiology* 32, 223-232.
- Geiger, T., Goerke, C., Fritz, M., Schäfer, T., Ohlsen, K., Liebeke, M., Lalk, M., et Wolz, C. (2010). Role of the (p)ppGpp synthase RSH, a RelA/SpoT homolog, in stringent response and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun* 78, 1873-1883.
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B., et Cashel, M. (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol* 175, 7982-7989.
- Ghei, O. K., et Lacks, S. A. (1967). Recovery of donor deoxyribonucleic acid marker activity from eclipse in pneumococcal transformation. *J. Bacteriol* 93, 816-829.
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 27, 113-159.
- Gropp, M., Strausz, Y., Gross, M., et Glaser, G. (2001). Regulation of *Escherichia coli* RelA requires oligomerization of the C-terminal domain. *J. Bacteriol* 183, 570-579.
- Guedon, E., Serror, P., Ehrlich, S. D., Renault, P., et Delorme, C. (2001). Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology* 40, 1227-1239.
- Guedon, E., Sperandio, B., Pons, N., Ehrlich, S. D., et Renault, P. (2005). Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiology* 151, 3895.
- Guild, W. R., et Shoemaker, N. B. (1976). Mismatch correction in pneumococcal transformation: donor length and *hex*-dependent marker efficiency. *J. Bacteriol* 125, 125-135.
- Guiral, S., Henard, V., Granadel, C., Martin, B., et Claverys, J. P. (2006). Inhibition of competence development in *Streptococcus pneumoniae* by increased basal-level expression of the ComDE two-component regulatory system. *Microbiology* 152, 323.
- Guiral, S., Mitchell, T. J., Martin, B., et Claverys, J. P. (2005). Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 8710.
- Hakenbeck, R., Tarpay, M., et Tomasz, A. (1980). Multiple changes of penicillin-binding

- proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother* *17*, 364-371.
- Hamoen, L. W., Venema, G., et Kuipers, O. P. (2003). Controlling competence in *Bacillus subtilis*: shared use of regulators. *Microbiology (Reading, Engl.)* *149*, 9-17.
- Hamze, K., Julkowska, D., Autret, S., Hinc, K., Nagorska, K., Sekowska, A., Holland, I. B., et Seror, S. J. (2009). Identification of genes required for different stages of dendritic swarming in *Bacillus subtilis*, with a novel role for phrC. *Microbiology* *155*, 398.
- Hanage, W. P. (2007). Serotype replacement in invasive pneumococcal disease: where do we go from here? *J. Infect. Dis* *196*, 1282-1284.
- Handke, L. D., Shivers, R. P., et Sonenshein, A. L. (2007). Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *Journal of Bacteriology* *190*, 798-806.
- Haseltine, W. A., et Block, R. (1973). Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *70*, 1564-1568.
- Haseltine, W. A., Block, R., Gilbert, W., et Weber, K. (1972). MSI and MSII made on ribosome in idling step of protein synthesis. *Nature* *238*, 381-384.
- Hausner, T. P., Geigenmüller, U., et Nierhaus, K. H. (1988). The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle. New insights into the inhibition mechanisms of aminoglycosides, thiostrepton, and viomycin. *J. Biol. Chem* *263*, 13103-13111.
- Håvarstein, L. S., Diep, D. B., et Nes, I. F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Mol. Microbiol* *16*, 229-240.
- Håvarstein, L. S., Hakenbeck, R., et Gaustad, P. (1997). Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change phenotype by interspecies recombinational exchanges. *J. Bacteriol* *179*, 6589-6594.
- Håvarstein, L. S., Coomaraswamy, G., et Morrison, D. A. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 11140.
- Håvarstein, L., et Morrison, D. (1999). Quorum sensing and peptide pheromones in streptococcal competence for genetic transformation. *Dans cell-cell signaling in bacteria (G.M. Dunny, S.C. Winans)*, p. 9-26.
- Heath, R. J., Jackowski, S., et Rock, C. O. (1994). Guanosine tetraphosphate inhibition of fatty acid and phospholipid synthesis in *Escherichia coli* is relieved by overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsB). *J. Biol. Chem* *269*, 26584-26590.
- Hendriksen, W. T., Bootsma, H. J., Estevao, S., Hoogenboezem, T., de Jong, A., de Groot, R., Kuipers, O. P., et Hermans, P. W. M. (2007). CodY of *Streptococcus pneumoniae*:

- Link between Nutritional Gene Regulation and Colonization. *Journal of Bacteriology* *190*, 590-601.
- den Hengst, C. D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., Van Sinderen, D., Kuipers, O. P., et Kok, J. (2005). Probing direct interactions between CodY and the *oppD* promoter of *Lactococcus lactis*. *Journal of bacteriology* *187*, 512.
- den Hengst, C. D., Groeneveld, M., Kuipers, O. P., et Kok, J. (2006). Identification and functional characterization of the *Lactococcus lactis* CodY-regulated branched-chain amino acid permease BcaP (CtrA). *Journal of bacteriology* *188*, 3280.
- den Hengst, C. D., van Hijum, S. A. F. T., Geurts, J. M. W., Nauta, A., Kok, J., et Kuipers, O. P. (2005). The *Lactococcus lactis* CodY regulon: identification of a conserved cis-regulatory element. *J. Biol. Chem* *280*, 34332-34342.
- Herman, R. K. (1968a). Identification of recombinant chromosomes and F-merogenotes in merodiploids of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* *96*, 173-179.
- Herman, R. K. (1968b). Transcription and intragenic recombination in polar mutants of *Escherichia coli*. *Science* *160*, 782-783.
- Hernandez, V. J., et Bremer, H. (1991). *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires spoT. *J. Biol. Chem* *266*, 5991-5999.
- Hill, C. W., Schiffer, D., et Berg, P. (1969). Transduction of merodiploidy: induced duplication of recipient genes. *J. Bacteriol* *99*, 274-278.
- Hogg, T., Mechold, U., Malke, H., Cashel, M., et Hilgenfeld, R. (2004). Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response. *Cell* *117*, 57-68.
- Hoskins, J. A., Alborn Jr, W. E., Arnold, J., Blaszczyk, L. C., Burgett, S., DeHoff, B. S., Estrem, S. T., Fritz, L., Fu, D. J., Fuller, W., et al. (2001). Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *Journal of bacteriology* *183*, 5709.
- Hsueh, Y., Somers, E. B., et Wong, A. C. L. (2008). Characterization of the *codY* gene and its influence on biofilm formation in *Bacillus cereus*. *Arch. Microbiol* *189*, 557-568.
- Hui, F. M., Zhou, L., et Morrison, D. A. (1995). Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcin A secretion genes. *Gene* *153*, 25-31.
- Inaoka, T., et Ochi, K. (2002). RelA protein is involved in induction of genetic competence in certain *Bacillus subtilis* strains by moderating the level of intracellular GTP. *Journal of bacteriology* *184*, 3923.
- Inaoka, T., Takahashi, K., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., et Ochi, K. (2003). Guanine nucleotides guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate and GTP co-operatively regulate the production of an antibiotic bacilysin in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem* *278*, 2169-2176.

- Inaoka, T., Wang, G., et Ochi, K. (2009). ScoC regulates bacilysin production at the transcription level in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol* *191*, 7367-7371.
- Irr, J. D. (1972). Control of nucleotide metabolism and ribosomal ribonucleic acid synthesis during nitrogen starvation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* *110*, 554-561.
- Johnsborg, O., Eldholm, V., et Håvarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res. Microbiol* *158*, 767-778.
- Johnston, R. B. (1991). Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev. Infect. Dis* *13 Suppl* *6*, S509-517.
- Joseph, P., Ratnayake-Lecamwasam, M., et Sonenshein, A. L. (2005). A region of *Bacillus subtilis* CodY protein required for interaction with DNA. *Journal of bacteriology* *187*, 4127.
- Jyssum, K. (1966). Genetic factors determining competence in transformation of *Neisseria meningitidis*. II. A reversible loss of competence. *Acta Pathol Microbiol Scand* *67*, 493-502.
- Karlsson, S., Burman, L. G., et Akerlund, T. (2008). Induction of toxins in *Clostridium difficile* is associated with dramatic changes of its metabolism. *Microbiology* *154*, 3430.
- Kashmiri, S. V., et Hotchkiss, R. D. (1975). Evidence of tandem duplication of genes in a merodiploid region of Pneumococcal mutants resistant to sulfonamide. *Genetics* *81*, 21-31.
- Kazmierczak, K. M., Wayne, K. J., Rechtsteiner, A., et Winkler, M. E. (2009). Roles of rel in stringent response, global regulation and virulence of serotype 2 *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol. Microbiol* *72*, 590-611.
- Kim, H. J., Kim, S. I., Ratnayake-Lecamwasam, M., Tachikawa, K., Sonenshein, A. L., et Strauch, M. (2003). Complex regulation of the *Bacillus subtilis* aconitase gene. *Journal of bacteriology* *185*, 1672.
- Kloosterman, T. G., Hendriksen, W. T., Bijlsma, J. J. E., Bootsma, H. J., van Hijum, S. A. F. T., Kok, J., Hermans, P. W. M., et Kuipers, O. P. (2006). Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem* *281*, 25097-25109.
- Kowalczykowski, S. C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem. Sci* *25*, 156-165.
- Krásný, L., et Gourse, R. L. (2004). An alternative strategy for bacterial ribosome synthesis: *Bacillus subtilis* rRNA transcription regulation. *The EMBO Journal* *23*, 4473-4483.
- Kvint, K., Farewell, A., et Nyström, T. (2000). RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(s). *J. Biol.*

- Chem 275, 14795-14798.
- Lacks, S. (1966). Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics* 53, 207-235.
- Lacks, S. (1979). Uptake of circular deoxyribonucleic acid and mechanism of deoxyribonucleic acid transport in genetic transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol* 138, 404-409.
- Lacks, S., et Greenberg, B. (1976). Single-strand breakage on binding of DNA to cells in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol* 101, 255-275.
- Laffler, T., et Gallant, J. (1974). *spoT*, a new genetic locus involved in the stringent response in *E. coli*. *Cell* 1, 27-30.
- Lanie, J. A., Ng, W., Kazmierczak, K. M., Andrzejewski, T. M., Davidsen, T. M., Wayne, K. J., Tettelin, H., Glass, J. I., et Winkler, M. E. (2006). Genome Sequence of Avery's Virulent Serotype 2 Strain D39 of *Streptococcus pneumoniae* and Comparison with That of Unencapsulated Laboratory Strain R6. *Journal of Bacteriology* 189, 38-51.
- Lazazzera, B. A., Kurtser, I. G., McQuade, R. S., et Grossman, A. D. (1999). An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology* 181, 5193.
- Lazzarini, R. A., Cashel, M., et Gallant, J. (1971). On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* 246, 4381-4385.
- Lederberg, J. (1949). Aberrant Heterozygotes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 35, 178-184.
- Lee, M. S., et Morrison, D. A. (1999). Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *Journal of bacteriology* 181, 5004.
- Lefevre, J. C., Faucon, G., Sicard, A. M., et Gasc, A. M. (1993). DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol* 31, 2724-2728.
- Leidy, G., Hahn, E., et Alexander, H. E. (1953). In vitro production of new types of *Hemophilus influenzae*. *J. Exp. Med* 97, 467-482.
- Lemos, J. A., Nascimento, M. M., Lin, V. K., Abranches, J., et Burne, R. A. (2008). Global Regulation by (p)ppGpp and CodY in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* 190, 5291-5299.
- Lemos, J. A., Brown Jr, T. A., et Burne, R. A. (2004). Effects of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity* 72, 1431.

- Lemos, J. A., Lin, V. K., Nascimento, M. M., Abranches, J., et Burne, R. A. (2007). Three gene products govern (p)ppGpp production by *Streptococcus mutans*. *Mol. Microbiol* 65, 1568-1581.
- Leppik, M., Peil, L., Kipper, K., Liiv, A., et Remme, J. (2007). Substrate specificity of the pseudouridine synthase RluD in *Escherichia coli*. *FEBS J* 274, 5759-5766.
- Létoffé, S., Delepelaire, P., et Wandersman, C. (2006). The housekeeping dipeptide permease is the *Escherichia coli* heme transporter and functions with two optional peptide binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 12891-12896.
- Levdikov, V. M., Blagova, E., Colledge, V. L., Lebedev, A. A., Williamson, D. C., Sonenshein, A. L., et Wilkinson, A. J. (2009). Structural rearrangement accompanying ligand binding in the GAF domain of CodY from *Bacillus subtilis*. *Journal of molecular biology* 390, 1007–1018.
- Levdikov, V. M., Blagova, E., Joseph, P., Sonenshein, A. L., et Wilkinson, A. J. (2006). The structure of CodY, a GTP- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in gram-positive bacteria. *J. Biol. Chem* 281, 11366-11373.
- Liu, F., Du, L., Du, P., et Huo, G. (2009). Possible promoter regions within the proteolytic system in *Streptococcus thermophilus* and their interaction with the CodY homolog. *FEMS Microbiol. Lett* 297, 164-172.
- Lorenz, M. G., et Wackernagel, W. (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 58, 563.
- Lund, E., et Kjeldgaard, N. O. (1972). Metabolism of guanosine tetraphosphate in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem* 28, 316-326.
- Luo, P., et Morrison, D. A. (2003). Transient association of an alternative sigma factor, ComX, with RNA polymerase during the period of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 185, 349.
- Lynch, J. P., et Zhanel, G. G. (2009). *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology, risk factors, and strategies for prevention. *Semin Respir Crit Care Med* 30, 189–209.
- Maamar, H., et Dubnau, D. (2005). Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state(competence) system requires a positive feedback loop. *Molecular microbiology* 56, 615–624.
- Macek, B., Mijakovic, I., Olsen, J. V., Gnad, F., Kumar, C., Jensen, P. R., et Mann, M. (2007). The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell Proteomics* 6, 697-707.
- Mader, U., Hennig, S., Hecker, M., et Homuth, G. (2004). Transcriptional organization and posttranscriptional regulation of the *Bacillus subtilis* branched-chain amino acid biosynthesis genes. *Journal of bacteriology* 186, 2240.
- Majerczyk, C. D., Sadykov, M. R., Luong, T. T., Lee, C., Somerville, G. A., et Sonenshein,

- A. L. (2008). *Staphylococcus aureus* CodY Negatively Regulates Virulence Gene Expression. *Journal of Bacteriology* 190, 2257-2265.
- Majerczyk, C. D., Dunman, P. M., Luong, T. T., Lee, C. Y., Sadykov, M. R., Somerville, G. A., Bodi, K., et Sonenshein, A. L. (2010). Direct targets of CodY in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol* 192, 2861-2877.
- Malke, H., Steiner, K., McShan, W. M., et Ferretti, J. J. (2006). Linking the nutritional status of *Streptococcus pyogenes* to alteration of transcriptional gene expression: the action of CodY and RelA. *International Journal of Medical Microbiology* 296, 259–275.
- Martin, B., García, P., Castanié, M. P., et Claverys, J. P. (1995). The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Mol. Microbiol* 15, 367-379.
- Martin, B., Prudhomme, M., Alloing, G., Granadel, C., et Claverys, J. P. (2000). Cross-regulation of competence pheromone production and export in the early control of transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol* 38, 867-878.
- Martin, B., Granadel, C., Campo, N., Hénard, V., Prudhomme, M., et Claverys, J. P. (2010). Expression and maintenance of ComD–ComE, the two-component signal-transduction system that controls competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 75, 1513–1528.
- Martínez-Costa, O. H., Fernández-Moreno, M. A., et Malpartida, F. (1998). The *relA/spoT*-homologous gene in *Streptomyces coelicolor* encodes both ribosome-dependent (p)ppGpp-synthesizing and -degrading activities. *J. Bacteriol* 180, 4123-4132.
- Mathiopoulos, C., et Sonenshein, A. L. (1989). Identification of *Bacillus subtilis* genes expressed early during sporulation. *Mol. Microbiol* 3, 1071-1081.
- Mechold, U., Murphy, H., Brown, L., et Cashel, M. (2002). Intramolecular regulation of the opposing (p) ppGpp catalytic activities of Rel_{Seq}, the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*. *Journal of bacteriology* 184, 2878.
- Méjean, V., et Claverys, J. P. (1993). DNA processing during entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem* 268, 5594-5599.
- Méjean, V., et Claverys, J. P. (1988). Polarity of DNA entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Gen. Genet* 213, 444-448.
- Metzger, S., Sarubbi, E., Glaser, G., et Cashel, M. (1989). Protein sequences encoded by the *relA* and the *spoT* genes of *Escherichia coli* are interrelated. *J. Biol. Chem* 264, 9122-9125.
- Milon, P., Tischenko, E., Tomsic, J., Caserta, E., Folkers, G., La Teana, A., Rodnina, M. V., Pon, C. L., Boelens, R., et Gualerzi, C. O. (2006). The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 13962-13967.

- Mirel, D. B., Estacio, W. F., Mathieu, M., Olmsted, E., Ramirez, J., et Márquez-Magaña, L. M. (2000). Environmental regulation of *Bacillus subtilis* sigma(D)-dependent gene expression. *J. Bacteriol* 182, 3055-3062.
- Mitrophanov, A. Y., et Groisman, E. A. (2008). Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes Dev* 22, 2601-2611.
- Mittenhuber, G. (2001). Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA and SpoT proteins). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* 3, 585-600.
- Molle, V., Nakaura, Y., Shivers, R. P., Yamaguchi, H., Losick, R., Fujita, Y., et Sonenshein, A. L. (2003). Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *Journal of bacteriology* 185, 1911.
- Mori, S., Yamasaki, M., Maruyama, Y., Momma, K., Kawai, S., Hashimoto, W., Mikami, B., et Murata, K. (2004). Crystallographic studies of Mycobacterium tuberculosis polyphosphate/ATP-NAD kinase complexed with NAD. *J. Biosci. Bioeng* 98, 391-393.
- Morinaga, T., Kobayashi, K., Ashida, H., Fujita, Y., et Yoshida, K. (2010). Transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *asnH* operon and role of the 5'-proximal long sequence triplication in RNA stabilization. *Microbiology (Reading, Engl.)* 156, 1632-1641.
- Morrison, D. A. (1997). Streptococcal competence for genetic transformation: regulation by peptide pheromones. *Microb. Drug Resist* 3, 27-37.
- Morrison, D. A. (1977). Transformation in pneumococcus: existence and properties of a complex involving donor deoxyribonucleate single strands in eclipse. *J. Bacteriol* 132, 576-583.
- Morrison, D. A. (1978). Transformation in pneumococcus: protein content of eclipse complex. *J. Bacteriol* 136, 548-557.
- Morrison, D. A., et Guild, W. R. (1973). Structure of deoxyribonucleic acid on the cell surface during uptake by pneumococcus. *J. Bacteriol* 115, 1055-1062.
- Morrison, D. A., Mortier-Barriere, I., Attaiech, L., et Claverys, J. (2007). Identification of the Major Protein Component of the Pneumococcal Eclipse Complex. *Journal of Bacteriology* 189, 6497-6500.
- Mortier-Barrière, I., de Saizieu, A., Claverys, J. P., et Martin, B. (1998). Competence-specific induction of *recA* is required for full recombination proficiency during transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol* 27, 159-170.
- Mortier-Barrière, I., Velten, M., Dupaigne, P., Mirouze, N., Piétrement, O., McGovern, S., Fichant, G., Martin, B., Noirot, P., Le Cam, E., et al. (2007). A key presynaptic role in transformation for a widespread bacterial protein: DprA conveys incoming ssDNA to

- RecA. *Cell* 130, 824-836.
- Nanamiya, H., Kasai, K., Nozawa, A., Yun, C. S., Narisawa, T., Murakami, K., Natori, Y., Kawamura, F., et Tozawa, Y. (2008). Identification and functional analysis of novel (p) ppGpp synthetase genes in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 67, 291–304.
- Niaudet, B., Janni re, L., et Ehrlich, S. D. (1985). Integration of linear, heterologous DNA molecules into the *Bacillus subtilis* chromosome: mechanism and use in induction of predictable rearrangements. *J. Bacteriol* 163, 111-120.
- Nunn, D., Bergman, S., et Lory, S. (1990). Products of three accessory genes, *pilB*, *pilC*, and *pilD*, are required for biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pili. *J. Bacteriol* 172, 2911-2919.
- Ochi, K., Kandala, J., et Freese, E. (1982). Evidence that *Bacillus subtilis* sporulation induced by the stringent response is caused by the decrease in GTP or GDP. *Journal of Bacteriology* 151, 1062.
- Pakula, R., et Walczak, W. (1963). On the nature of competence of transformable streptococci. *J. Gen. Microbiol* 31, 125-133.
- Pardee, A. B., et Prestidge, L. S. (1956). The dependence of nucleic acid synthesis on the presence of amino acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 71, 677-683.
- Pasteur, L. (1881). Note sur la maladie nouvelle provoquee par la salive d'un enfant mort de la rage. *Compt. rend. Acad. de sc.* 92 (4): 159.
- Paul, B. J., Barker, M. M., Ross, W., Schneider, D. A., Webb, C., Foster, J. W., et Gourse, R. L. (2004). DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* 118, 311-322.
- Paul, B. J., Berkmen, M. B., et Gourse, R. L. (2005). DksA potentiates direct activation of amino acid promoters by ppGpp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102, 7823-7828.
- Pestova, E. V., H avarstein, L. S., et Morrison, D. A. (1996). Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol. Microbiol* 21, 853-862.
- Peters, B. M., Jabra-Rizk, M. A., Scheper, M. A., Leid, J. G., Costerton, J. W., et Shirtliff, M. E. (2010). Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus* -*Candida albicans* dual-species biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* 59, 493-503.
- Peterson, S. N., Sung, C. K., Cline, R., Desai, B. V., Snesrud, E. C., Luo, P., Walling, J., Li, H., Mintz, M., Tsegaye, G., et al. (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays. *Mol. Microbiol* 51, 1051-1070.
- Petranovic, D., Gu don, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D., et Renault, P. (2004).

- Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol. Microbiol* 53, 613-621.
- Podkovyrov, S. M., et Larson, T. J. (1996). Identification of promoter and stringent regulation of transcription of the *fabH*, *fabD* and *fabG* genes encoding fatty acid biosynthetic enzymes of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 24, 1747-1752.
- Pohl, K., Francois, P., Stenz, L., Schlink, F., Geiger, T., Herbert, S., Goerke, C., Schrenzel, J., et Wolz, C. (2009). CodY in *Staphylococcus aureus*: a Regulatory Link between Metabolism and Virulence Gene Expression. *Journal of Bacteriology* 191, 2953-2963.
- Poolman, J. T. (2004). Pneumococcal vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 3, 597-604.
- Potrykus, K., et Cashel, M. (2008). (p)ppGpp: still magical? *Annu. Rev. Microbiol* 62, 35-51.
- Preis, H., Eckart, R. A., Gudipati, R. K., Heidrich, N., et Brantl, S. (2009). CodY Activates Transcription of a Small RNA in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 191, 5446-5457.
- Priebe, S. D., Hadi, S. M., Greenberg, B., et Lacks, S. A. (1988). Nucleotide sequence of the *hexA* gene for DNA mismatch repair in *Streptococcus pneumoniae* and homology of *hexA* to *mutS* of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol* 170, 190-196.
- Prudhomme, M., Camilli, A., et Claverys, J. (2007). In vitro *mariner* Mutagenesis of *Streptococcus pneumoniae* : Tools and Traps. Dans *Molecular Biology of Streptococci* (Norfolk: R. Hakenbeck and S. Chhatwal), p. 511-518.
- Prudhomme, M., et Claverys, J. (2007). There Will be a Light* : The Use of luc Transcriptional Fusions in Living Pneumococcal Cells. Dans *Molecular Biology of Streptococci* (Norfolk: R. Hakenbeck and S. Chhatwal), p. 519-524.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., et Claverys, J. (2006). Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313, 89-92.
- Pulliaainen, A. T. (2002). Molecular Basis of H₂O₂ Resistance Mediated by Streptococcal Dpr. *Journal of Biological Chemistry* 278, 7996-8005.
- Rallu, F., Gruss, A., Ehrlich, S. D., et Maguin, E. (2000). Acid- and multistress-resistant mutants of *Lactococcus lactis*: identification of intracellular stress signals. *Molecular Microbiology* 35, 517-528.
- Ratnayake-Lecamwasam, M. (2001). *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes & Development* 15, 1093-1103.
- Ravin, A. W., et Takahashi, E. A. (1970). Merodiploid ribosomal loci arising by transformation and mutation in pneumococcus. *J. Bacteriol* 101, 38-52.
- Raychaudhuri, S., Conrad, J., Hall, B. G., et Ofengand, J. (1998). A pseudouridine synthase

- required for the formation of two universally conserved pseudouridines in ribosomal RNA is essential for normal growth of *Escherichia coli*. *RNA* 4, 1407-1417.
- Redfield, R. J. (2001). Do bacteria have sex? *Nat. Rev. Genet* 2, 634-639.
- Regamey, A., Lazarevic, V., Hauser, P., et Karamata, D. (2000). Study of chromosome rearrangements associated with the *trpE26* mutation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol* 36, 1234-1249.
- Sands, M. K., et Roberts, R. B. (1952). The effects of a tryptophan-histidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 63, 505-511.
- van Schaik, W., Château, A., Dillies, M., Coppée, J., Sonenshein, A. L., et Fouet, A. (2009). The global regulator CodY regulates toxin gene expression in *Bacillus anthracis* and is required for full virulence. *Infect. Immun* 77, 4437-4445.
- Serror, P., et Sonenshein, A. L. (1996a). Interaction of CodY, a novel *Bacillus subtilis* DNA-binding protein, with the *dpp* promoter region. *Mol. Microbiol* 20, 843-852.
- Serror, P., et Sonenshein, A. L. (1996b). CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *Journal of bacteriology* 178, 5910.
- Seyfzadeh, M., Keener, J., et Nomura, M. (1993). *spoT*-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 90, 11004-11008.
- Shivers, R. P., Dineen, S. S., et Sonenshein, A. L. (2006). Positive regulation of *Bacillus subtilis ackA* by CodY and CcpA: establishing a potential hierarchy in carbon flow. *Molecular microbiology* 62, 811-822.
- Shivers, R. P., et Sonenshein, A. L. (2004). Activation of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY by direct interaction with branched-chain amino acids. *Mol. Microbiol* 53, 599-611.
- Shivers, R. P., et Sonenshein, A. L. (2005). *Bacillus subtilis ilvB* operon: an intersection of global regulons. *Mol. Microbiol* 56, 1549-1559.
- Slack, F. J., Mueller, J. P., et Sonenshein, A. L. (1993). Mutations that relieve nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *J. Bacteriol* 175, 4605-4614.
- Slack, F. J., Mueller, J. P., Strauch, M. A., Mathiopoulos, C., et Sonenshein, A. L. (1991). Transcriptional regulation of a *Bacillus subtilis* dipeptide transport operon. *Mol. Microbiol* 5, 1915-1925.
- Slack, F. J., Serror, P., Joyce, E., et Sonenshein, A. L. (1995). A gene required for nutritional repression of the *Bacillus subtilis* dipeptide permease operon. *Mol. Microbiol* 15, 689-702.
- Smith, H. O., Gwinn, M. L., et Salzberg, S. L. (1999). DNA uptake signal sequences in

- naturally transformable bacteria. *Res. Microbiol* 150, 603-616.
- Sonenshein, A. (2005). CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 8, 203-207.
- Sonenshein, A. L. (2007). Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol* 5, 917-927.
- Soutourina, O., Soutourina, J., Blanquet, S., et Plateau, P. (2004). Formation of D-tyrosyl-tRNA^{Tyr} accounts for the toxicity of D-tyrosine toward *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem* 279, 42560-42565.
- Sparling, P. F. (1966). Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. *J. Bacteriol* 92, 1364-1371.
- Spira, B., Silberstein, N., et Yagil, E. (1995). Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J. Bacteriol* 177, 4053-4058.
- Steffen, S. E., et Bryant, F. R. (2000). Purification and characterization of the RecA protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Arch. Biochem. Biophys* 382, 303-309.
- Stent, G. S., et Brenner, S. (1961). A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 47, 2005-2014.
- Sternberg, G. (1881). A fatal form of septicemia in the rabbit produced by the subcutaneous injection of human saliva. *Nat. Bd. Health Bull.* 2 (44): 781,
- Su, S. S., et Modrich, P. (1986). *Escherichia coli mutS*-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 83, 5057-5061.
- Sung, C. K., Li, H., Claverys, J. P., et Morrison, D. A. (2001). An *rpsL* cassette, Janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Applied and environmental microbiology* 67, 5190.
- Sung, C. K., et Morrison, D. A. (2005). Two distinct functions of ComW in stabilization and activation of the alternative sigma factor ComX in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol* 187, 3052-3061.
- Sy, J. (1977). *In vitro* degradation of guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 74, 5529-5533.
- Sy, J., et Lipmann, F. (1973). Identification of the synthesis of guanosine tetraphosphate (MS I) as insertion of a pyrophosphoryl group into the 3'-position in guanosine 5'-diphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 70, 306-309.
- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Yoshida, K. I., Hirooka, K., et Fujita, Y. (2004). Negative transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon for biosynthesis of branched-chain amino acids through the *Bacillus subtilis* global regulator TnrA. *Journal of bacteriology* 186, 7971.

- Tojo, S., Satomura, T., Kumamoto, K., Hirooka, K., et Fujita, Y. (2008). Molecular mechanisms underlying the positive stringent response of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon, involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids. *J. Bacteriol* *190*, 6134-6147.
- Tojo, S., Satomura, T., Morisaki, K., Deutscher, J., Hirooka, K., et Fujita, Y. (2005). Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. *Mol. Microbiol* *56*, 1560-1573.
- Tomasz, A., et Hotchkiss, R. D. (1964). Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *51*, 480-487.
- Tosa, T., et Pizer, L. I. (1971a). Biochemical bases for the antimetabolite action of L-serine hydroxamate. *J. Bacteriol* *106*, 972-982.
- Tosa, T., et Pizer, L. I. (1971b). Effect of serine hydroxamate on the growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* *106*, 966-971.
- Villapakam, A. C., Handke, L. D., Belitsky, B. R., Levnikov, V. M., Wilkinson, A. J., et Sonenshein, A. L. (2009). Genetic and Biochemical Analysis of the Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with Branched-Chain Amino Acids. *Journal of Bacteriology* *191*, 6865-6876.
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., et D'Ari, R. (2005). Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol* *56*, 958-970.
- Vrentas, C. E., Gaal, T., Ross, W., Ebright, R. H., et Gourse, R. L. (2005). Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev* *19*, 2378-2387.
- Wang, J., Sanders, G., et Grossman, A. (2007). Nutritional Control of Elongation of DNA Replication by (p)ppGpp. *Cell* *128*, 865-875.
- Ween, O., Gaustad, P., et Håvarstein, L. S. (1999). Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol* *33*, 817-827.
- Weyer, W. J., de Boer, H. A., de Boer, J. G., et Gruber, M. (1976). The sequence of ppGpp and pppGpp in the reaction scheme for magic spot synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* *442*, 123-127.
- Whatmore, A. M., Barcus, V. A., et Dowson, C. G. (1999). Genetic diversity of the streptococcal competence (*com*) gene locus. *J. Bacteriol* *181*, 3144-3154.
- Whitney, C. G., Pilishvili, T., Farley, M. M., Schaffner, W., Craig, A. S., Lynfield, R., Nyquist, A., Gershman, K. A., Vazquez, M., Bennett, N. M., et al. (2006). Effectiveness of seven-valent pneumococcal conjugate vaccine against invasive pneumococcal disease: a matched case-control study. *Lancet* *368*, 1495-1502.

- Wolf, Y. I., Aravind, L., Grishin, N. V., et Koonin, E. V. (1999). Evolution of aminoacyl-tRNA synthetases--analysis of unique domain architectures and phylogenetic trees reveals a complex history of horizontal gene transfer events. *Genome Res* 9, 689-710.
- Wolz, C., Geiger, T., et Goerke, C. (2010). The synthesis and function of the alarmone (p)ppGpp in firmicutes. *Int. J. Med. Microbiol* 300, 142-147.
- World Health Organization (2007). Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization--WHO position paper.
- Wray, L. V., Ferson, A. E., et Fisher, S. H. (1997). Expression of the *Bacillus subtilis ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA, and Spo0H. *Journal of bacteriology* 179, 5494.
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., et Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem* 266, 5980-5990.