



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Discipline ou spécialité :

Microbiologie et Génétique

Présentée et soutenue par :

Matthieu Bergé

le : 16 Novembre 2012

Titre :

Etude du recrutement de la nucléase EndA au sein du complexe de transport
de l'ADN transformant chez *Streptococcus pneumoniae*

Ecole doctorale :

Biologie, Santé, Biotechnologies (BSB)

Unité de recherche :

Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires

Directeur(s) de Thèse :

Jean-Pierre Claverys - Nathalie Campo

Rapporteurs :

Eric Cascales - Christophe Grangeasse - Vincent Méjean

Membre(s) du jury :

Eric Cascales - Christophe Grangeasse - Vincent Méjean

Jean-Pierre Claverys - Nathalie Campo

Didier Mazel - Bernard Martin

Remerciements

Je tiens à faire un petit clin d'œil non exhaustif ici aux personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la concrétisation de ce travail. Ces remerciements sont rédigés dans un moment de doux relâchement intellectuel sans véritable rigueur. Tout au long de la thèse, j'ai pensé à ce moment et maintenant que j'y suis devant... Chaque période de ma thèse aurait pu conduire à des remerciements différents mais c'est la mémoire chargée d'émotion par les événements récents que je me lance.

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury (Eric Cascales, Christophe Grangeasse, Vincent Méjean et Didier Mazel) qui ont accepté de passer du temps pour juger ce travail. Le thème de la transformation naturelle n'est pas forcément votre terrain de jeu mais vous avez su vous plonger dans ce travail pour créer une discussion que j'ai fortement souhaité pendant ces trois ans.

Un grand merci à toi, Nathalie, pour ces quatre années passées à tes côtés. Sans toi, rien n'aurait été possible et ton dévouement à l'encadrement m'impressionne encore. Tu m'as formé et accompagné sur différentes techniques diverses et variées. Tu as su me faire confiance et me laisser divaguer dans mes idées tout en me remettant sur le droit chemin quand cela fut nécessaire. J'espère que cette première expérience d'encadrement t'incitera à continuer malgré le stress que cela engendre...

Merci également à toi, Jean-Pierre, d'avoir accepté que j'explore ce projet, de m'avoir empêcher de "papillonner" et surtout de me l'avoir dit. Tu m'as appris la rigueur scientifique et des fois, c'est vrai que c'est dur parce qu'on a l'impression que ce n'est jamais bien...mais une fois fini, tes conseils s'avèrent très souvent précieux.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe qui m'a soutenu et surtout supporté pendant ces quatre ans passés en maintenant une très bonne ambiance. Quelques moments partagés remontent dans ma tête avec les pauses cafés (hein Bernardo !!!), les discussions animées dans le bureau au niveau politique... sans oublier les passages par le pôle biochimie où on est sûr de sortir avec une blague en tête.

Cette expérience professionnelle m'a permis de faire de belles rencontres scientifiques et plus que ce soit au niveau des doctorants (Mathieu Stouch, Benjamin, Kountèa, Aurore...), des post doc (Vanessa, Jean-Christophe...), et des titulaires (Jéjé, Philou, Pascal, les Christophe"s", Patricia, Marie-Pierre, Olivier...).

Je ne peux me passer de remercier le LMGM pour les excellentes conditions de travail au niveau matériel. De plus, les tâches très bien menées au niveau des services laverie et technique nous facilitent grandement la vie.

Et puis, parce qu'une thèse ne se fait tout seul, je remercie du fond du cœur Elodie qui m'a soutenu, a écouté pendant des heures mes nombreuses théories révolutionnant la science et a accepté mes infidélités avec les bactéries tout au long de ses 3 ans. Vraiment, un grand merci !

Je clos enfin ces remerciements en dédiant cette thèse à ma famille, d'un soutien à toute épreuve (malgré des choix difficiles à comprendre d'un point de vue extérieur) et à mes amis d'enfance (Régis, Yannick, Clément, La clim...) ou rencontré au cours de mon parcours universitaires (Julien, Alex, Pierre, Amélie...) que j'ai eus la chance d'avoir à mes côtés dans les moments difficiles que procurent la thèse.

RESUME

La transformation est un mécanisme largement répandu dans le monde bactérien permettant des échanges génétiques *via* la capture d'ADN exogène. Elle requiert généralement le développement d'un état physiologique transitoire, la compétence, au cours de laquelle sont néosynthétisées les protéines essentielles à la capture de l'ADN du milieu extérieur, à sa traversée de la paroi cellulaire, à son internalisation dans le cytoplasme sous forme simple brin et à son intégration dans le génome par recombinaison homologue. Collectivement, ces protéines définissent l'appareil de transformation génétique, l'ADN transformasome, dont la caractérisation est la plus avancée pour les bactéries modèles *Streptococcus pneumoniae* et *Bacillus subtilis*.

Mon projet de thèse visait à caractériser la dynamique de mise en place de la partie du transformasome en charge du transport de l'ADN exogène au travers de la membrane cytoplasmique chez *S. pneumoniae*. Pour cela, j'ai principalement utilisé (et adapté au pneumocoque) des techniques de biologie cellulaire permettant de suivre par épifluorescence l'assemblage de ce pore d'entrée de l'ADN transformant dans des cellules vivantes. Ainsi, j'ai pu mettre en évidence un retard du processus de septation cellulaire lors du premier événement de division qui suit l'induction de la compétence. Pour localiser le pore d'entrée du transformasome, j'ai étudié la localisation de l'endonucléase membranaire EndA, en charge de la dégradation à l'extérieur de la cellule du brin complémentaire de l'ADN transformant internalisé. Contrairement à toutes les autres protéines du transformasome, EndA est exprimée de manière constitutive. Mes résultats montrent que, d'une part, EndA localise de manière homogène dans la membrane des cellules non compétentes et, d'autre part, forme des foci dans les cellules compétentes. La formation des foci d'EndA est dépendante de la protéine membranaire ComEA du transformasome, dont le rôle est de recevoir l'ADN double-brin exogène au niveau du pore d'entrée. Lorsque la capacité de transformation est maximale, EndA et ComEA sont préférentiellement localisées au niveau de la zone équatoriale des cellules. Par ailleurs, j'ai pu montrer que l'ADN transformant marqué par des fluorophores se concentre aussi principalement à la zone équatoriale des cellules compétentes. Dans l'ensemble, ce travail suggère que l'assemblage du pore d'entrée de l'ADN transformant chez *S. pneumoniae* se ferait à la zone équatoriale des cellules compétentes. Chez *B. subtilis* il a été montré que la fixation de l'ADN a lieu aux pôles des cellules compétentes. Ainsi, bien que les composantes des transformasomes de *B. subtilis* et de *S. pneumoniae* soient très conservées, il semble qu'une (ou des) caractéristique(s) propre(s) à ces deux espèces bactériennes déterminent le site d'assemblage du pore d'entrée de l'ADN transformasome dans la membrane.

SUMMARY

Natural genetic transformation is widely distributed in bacteria, allowing genetics exchange. Transformation requires a specialized membrane-associated complex which forms a DNA entry pore allowing internalization of exogenous single-stranded DNA (ssDNA). It also requires dedicated cytosolic proteins to integrate internalised ssDNA into the chromosome by homologous recombination. This complex, named DNA Transformasome, has been intensively studied in the human pathogen *S. pneumoniae* and the soil bacteria *B. subtilis*.

The aim of my project was to characterize the membrane-associated complex in *S. pneumoniae*. I adapted two complementary cellular biology methods. To identify physical links between Transformasome components, I developed a method to purify membrane complexes in *S. pneumoniae*. Moreover, I performed fluorescence microscopy, which allows us to track and record individual bacterial cells of *S. pneumoniae* upon competence induction.

Using GFP (Green Fluorescent Protein) fused to a key division protein FtsZ, I demonstrated a delayed septation process in competent cells. To visualize the integration of components of the DNA entry pore, I focused on EndA. EndA is a sequence non-specific endonuclease bound to the membrane which is responsible for processing double-stranded DNA into single-stranded fragments that in turn enter the microbial cell. This nuclease has been identified only in the streptococcal system. Remarkably, EndA is the only known component of the DNA entry pore that is constitutively expressed in non-competent cells and is not induced in competence. I showed that EndA concentrates into localized foci upon competence induction. This specific localization depends on the presence of the DNA-receptor, ComEA. Moreover, EndA and ComEA appear preferentially located at midcell in cultures exhibiting optimal transformation efficiency. Similarly, binding of extracellular DNA was localized to the cell centre. Together, our results are consistent with a model in which the active entry pore for DNA transformation is located at the septum in pneumococcal cells.

In contrast, it appears that the entire process of DNA transformation localizes at the cell poles in *B. subtilis*. Although components of Transformasome are conserved between species, it appears that bacteria have adapted the transformation process according to their own physiology.

Table des matières

AVANT PROPOS- LA PLASTICITE GENETIQUE BACTERIENNE	1
PRESENTATION BIBLIOGRAPHIQUE	5
I. La compétence : la capacité à transformer	7
I. A Régulation de la compétence chez <i>S. pneumoniae</i>	7
I. A.1 Le déclenchement de la compétence médié par deux opérons essentiels : <i>comCDE</i> et <i>comAB</i>	7
I. A.2 Le déclenchement de la compétence	9
I. A.3 L'expression d'un facteur sigma alternatif spécifique de la compétence	11
I. A.4 Le X-state	11
I. A.5 Les gènes retardés de la compétence	13
I. A.6 La fermeture de la compétence	13
I. A.6. a L'arrêt de transcription des gènes tardifs	14
I. A.6. b L'arrêt de transcription des gènes précoces	14
I. B Régulation de la compétence chez les autres bactéries	14
I. B.1 Régulation de la compétence chez les autres streptocoques	14
I. B.2 Régulation de la compétence chez les autres bactéries	15
II. La Transformation génétique naturelle : son mécanisme	17
II. A Le voyage de l'ADN au cours de la transformation génétique	19
II. A.1 La capture de l'ADN dans le milieu	19
II. A.1. a Chez les bactéries à Gram positif	19
II. A.1. b Chez les bactéries à Gram négatif	19
II. A.2 Translocation au travers de la membrane externe, passage du peptidoglycane et de la membrane cytoplasmique	19
II. A.2. a Chez les bactéries à Gram positif	19
II. A.2. b Chez les bactéries à Gram négatif	20
II. A.3 L'intégration au génome par recombinaison homologue	20
II. A.4 L'origine de l'ADN exogène	21
II. B Les composantes de la machinerie de transformation, le Transformasome	21
II. B.1 La capture	23
II. B.1. a Chez les bactéries à Gram positif	23
II. B.1. b Chez les bactéries à Gram négatif	23

II. B.2 Traversée de la membrane externe et du peptidoglycane	23
II. B.2. a Chez les bactéries à Gram positif.....	23
II B.2. a. i Le pseudo-pilus	23
II B.2. a. i. A Composition	23
II B.2. a. i. B Une structure organisée.....	25
II B.2. a. i. C Le pseudo-pilus chez <i>S. pneumoniae</i> et les streptocoques	26
II B.2. a. i. D Modèle du fonctionnement	26
II B.2. a. ii Le récepteur de l'ADN double brin : ComEA.....	27
II. B.2. b Chez les bactéries à Gram négatif	27
II B.2. b. i Les sécrétines	27
II B.2. b. ii Le pseudo-pilus de compétence	29
II B.2. b. iii La fixation de l'ADN dans le périplasme	29
II. B.3 Le passage de la membrane cytoplasmique	31
II. B.3. a Linéarisation de l'ADNdb	31
II. B.3. b EndA : conversion de l'ADNdb en ADNsb.....	31
II. B.3. c Pénétration d'un brin d'ADN : le rôle de ComEC et ComFA	32
II B.3. c. i ComEC : le pore aqueux	32
II B.3. c. ii ComFA : un moteur pour tirer l'ADN.....	35
II. B.4 Le devenir de l'ADN dans la cellule.....	36
II. B.4. a Un système de recombinaison dédié à la transformation.....	36
II. B.4. b Le complexe d'éclipse	36
III. L'intégration du Transformasome au cours de la vie de la cellule	37
III. A Vers l'émergence d'une machinerie unique du Transformasome	37
III. A.1 Une localisation unique	37
III. A.2 La délocalisation du complexe	40
III. A.3 Est ce que les étapes sont couplées?	40
III. B Un lien entre la transformation et le cycle cellulaire	40
IV. Projet de thèse et organisation des résultats.....	42
CHAPITRE I- CAPTURE DE COMPLEXES PROTEIQUES MEMBRANAIRES CHEZ LE	
PNEUMOCOQUE	45
I. Introduction	46
II. Résultats	47
II. A Lyse cellulaire	47

II. B Solubilisation des complexes protéiques membranaires.....	49
II. C Capture de complexes protéiques membranaires – Choix de l'étiquette.....	51
II. C.1 Purification de complexes membranaires par la technique du Spa-tag	53
II. C.1. a Principe.....	53
II. C.1. b Application de la méthode du Spa-tag pour capturer le pore d'entrée	53
II. C.2 Purification de complexes membranaires par immunoprécipitation de fusions GFP	57
II. C.2. a Principe.....	57
II. C.2. b Préparation de la résine α -GFP.....	59
II C.2. b. i Production et purification de la GFP	59
II C.2. b. ii Production et purification des anticorps α -GFP.....	59
II. C.2. c Capture du pore d'entrée par immunoprécipitations de fusions GFP.....	59
II. D Solubilisation des constituants du pore d'entrée	61
III. Discussion.....	63
IV. Matériel et méthodes.....	67
IV. A Constructions de souches.....	67
IV. B Plasmides, oligonucléotides.....	67
IV. C Préparation de membranes.....	68
IV. D Fractionnement cellulaire.....	68
IV. E Purification en tandem (SPA-tag) des protéines membranaires chez <i>S. pneumoniae</i>	69
IV. F Co-immunoprécipitation α -GFP des protéines membranaires solubilisées par des détergents	69
IV. G Purification de la GFP	70
IV. H Purification par affinité des anticorps α -GFP	70
IV. I Couplage des anticorps à la protéine A.....	71
CHAPITRE II- SUIVI DE LA COMPETENCE PAR TIME LAPSE ET OPTIMISATION DE MICROBE TRACKER.....	73
I. Introduction	75
I. A Contraintes et Objectifs.....	75
I. A.1 Acquisition	75
I. A.2 Analyse.....	75
II. Résultat.....	77

II. A	Suivi de l'induction de la compétence en time lapse	77
II. A.1	Croissance des cellules.....	77
II. A.2	Choix du rapporteur de la compétence	79
II. A.3	Induction de la compétence	81
II. A.4	Validation.....	81
II. B	Adaptation de microbe Tracker pour l'analyse d'images de <i>S. pneumoniae</i>	82
II. B.1	Analyse d'image fixe	83
II. B.2	Analyse de time lapse	85
III.	Discussion	85
IV.	Matériel et méthodes.....	87
IV. A	Construction des plasmides.....	87
IV. B	Time lapse	87
IV. C	Analyse d'image par microbeTracker.....	89
CHAPITRE III- LOCALISATION DU COMPLEXE DE TRANSPORT DE L'ADN TRANSFORMANT.		91
I.	Introduction	93
II.	Midcell relocalization of transforming-DNA-uptake nuclease EndA during pneumococcal competence	95
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		115
I.	Le recrutement d'EndA dans les cellules compétentes	116
II.	Localisation septale du Transformasome	117
III.	Quelle est l'ancre qui permet le recrutement du Transformasome ?	117
IV.	Dégradation du pore d'entrée du Transformasome.....	118
V.	Raison d'être de la localisation septale du Transformasome.....	119
BIBLIOGRAPHIE.....		121

TABLE DES FIGURES

Figure 1- Augmentation de la résistance à la pénicilline G chez <i>S. pneumoniae</i> -----	2
Figure 2- Capacité du pneumocoque à transformer durant sa croissance -----	6
Figure 3- Boucle auto-catalytique de la compétence chez <i>S. pneumoniae</i> -----	8
Figure 4- Modèle du déclenchement de la boucle auto-catalytique -----	8
Figure 5- Répression du promoteur lors de l'induction de la compétence -----	10
Figure 6- Régulation de la compétence pour l'expression des gènes tardifs de compétence	12
Figure 7- Le développement de la compétence est différent entre <i>S. pneumoniae</i> et <i>B. subtilis</i> -----	16
Figure 8- Voyage de l'ADN au cours de la transformation génétique naturelle chez les bactéries à Gram positifs et à Gram négatif -----	18
Figure 9- Suivi du voyage de l'ADN donneur intégré au Transformasome -----	22
Figure 10- Comparaison des machineries formant les systèmes de sécrétion de type IV, les pilus de type IV et le pseudo-pilus de compétence. -----	24
Figure 11- Alignement du récepteur d'ADNdb ComEA de <i>S. pneumoniae</i> , <i>B. subtilis</i> , et ComE de <i>N. gonorrhoeae</i> . -----	28
Figure 12- Structure et fonction de la nucléase EndA. -----	30
Figure 13- De l'internalisation à la recombinaison homologue. -----	34
Figure 14- Localisation des composants du Transformasome chez <i>B. subtilis</i> et mise en évidence des interactions chez <i>B. subtilis</i> et <i>S. pneumoniae</i> .-----	38
Figure 15- Suivi de la protoplastisation par diminution de la densité optique au cours du temps sur des cellules compétentes ou non compétentes. -----	48
Figure 16- Fractionnement cellulaire de la souche exprimant la fusion SPA-EndA. -----	50
Figure 17- Représentation schématique de la purification des complexes en tandem (SPA-tag) adapté de Puig et al, 2001 -----	52
Figure 18- Les fusions EndA-SPA et SPA-EndA placées à CEP ou au locus naturel sont fonctionnelles en transformation -----	54
Figure 19- Vérification de l'expression des fusions EndA-SPA et SPA-EndA par immunoblot -----	54
Figure 20- Capture des partenaires d'EndA exprimée sous le contrôle d'un promoteur inductible en compétence -----	56
Figure 21- Purification des partenaires d'EndA dans des cellules compétentes ou dans des cellules non compétentes-----	56

Figure 22- Comparaison anticorps α -GFP commercial ou "fait maison" sur des extraits bruts cellulaires de <i>S. pneumoniae</i> -----	58
Figure 23- Suivi par immunoblot de la purification de la fusion GFP-EndA par co-immunoprécipitation α -GFP -----	60
Figure 24- Purification des partenaires d'EndA en utilisant la co-immunoprécipitation α -GFP -----	60
Figure 25- Fractionnement cellulaire de la souche exprimant la fusion GFP-ComEA -----	62
Figure 26- Fractionnement cellulaire de la souche exprimant la fusion GFP-ComEA avec une batterie de détergents -----	62
Figure 27- Solubilisation de la fusion GFP-ComEA par le LDAO selon différents paramètres de température, de concentration en détergent et de temps d'incubation -----	64
Figure 28 : Présentation de la localisation de FtsZ selon l'avancement dans le cycle cellulaire chez <i>S. pneumoniae</i> -----	76
Figure 29-Dynamique de la protéine FtsZ au cours du cycle cellulaire chez <i>S. pneumoniae</i>	78
Figure 30- Suivi du développement de la compétence par time lapse-----	78
Figure 31- La constriction est ralentie lors de l'induction de la compétence chez <i>S. pneumoniae</i> -----	80
Figure 32- Présentation des algorithmes pour le seuillage des cellules du pneumocoque par <i>microbeTracker</i> -----	84
Figure 33- Exemple d'analyse effectuée sur <i>microbeTracker</i> -----	86
Figure 34- Représentation en kymographe de la localisation de FtsZ-GFP dans une cellule non compétente et compétente -----	86
Figure 35- Localisation polaire et septale de la fusion GFP-ComGA dans des cellules compétentes -----	92

Avant propos

La plasticité génétique bactérienne

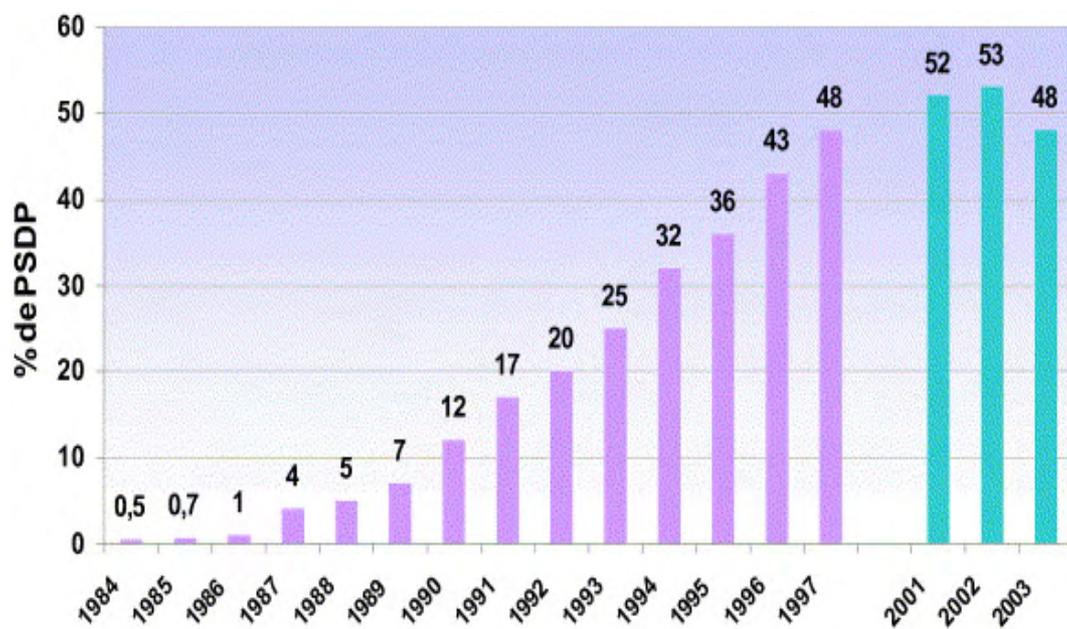


Figure 1- Augmentation de la résistance à la pénicilline G chez *S. pneumoniae* (PSDP, CMI \geq 0,064 mg/l) en France : évolution de 1984 à 2003, tous âges et prélèvements confondus. D'après Varon and Houssaye, 2006.

Malgré leur taille microscopique, les bactéries jouent un rôle important dans la nature et participent au maintien de l'écosystème. Utilisées à bon escient, elles présentent un potentiel puissant pour les biotechnologies (production d'énergie, dépollution). Elles sont présentes partout, aussi bien dans l'eau que dans la terre, à l'intérieur des végétaux et même dans le corps humain. On compte dans le corps humain environ 10 fois plus de bactéries que de cellules humaines (Lepage et al., 2012). Souvent considérées uniquement comme néfaste pour l'homme, elles sont cependant essentielles à sa survie. En revanche, certaines d'entre elles, dans des conditions particulières exercent une menace pour la santé humaine. Bien que l'on pensait avoir trouvé des solutions efficaces de lutte contre ces micro-organismes (antibiotiques, vaccins), des germes pathogènes font leur apparition, réduisant d'autant nos solutions disponibles pour les éliminer et guérir les maladies dont ils sont la cause.

Les bactéries apparaissent hautement organisées avec des systèmes de communication, des mécanismes de défense multiples et surtout une importante capacité d'adaptation rapide à des changements environnementaux pour survivre. Ce processus est illustré par l'adaptation des bactéries aux antibiotiques. L'utilisation massive de ces molécules a conduit à un phénomène de résistance des microorganismes par divers mécanismes. Le pathogène humain majeur *Streptococcus pneumoniae* constitue un cas concret de cette adaptation.

S. pneumoniae, ou pneumocoque, est un diplocoque à Gram positif dont la niche écologique est le rhinopharynx humain où il vit de manière commensale. Lorsque la bactérie est capable de coloniser d'autres niches écologiques tels que les poumons par exemple, elle peut devenir pathogène causant des pneumonies, des méningites et des otites (Cartwright, 2002). Le mécanisme de transition d'espèce commensale à pathogène n'est pas encore bien compris. Le pneumocoque possède un arsenal de facteurs de virulence, dont sa capsule, structure extérieure polysaccharidique, indispensable à la pathogénicité et un grand nombre d'enzymes nécessaires à sa colonisation (Kadioglu et al., 2008).

Les moyens de lutte utilisés contre cette bactérie repose sur l'utilisation d'antibiotiques (famille des β -lactames en général) et de vaccins. Ces derniers, dirigés contre des antigènes capsulaires, deviennent inefficaces car 93 sérotypes capsulaires différents ont été identifiés à l'heure actuelle (Pitsiou et Kioumis, 2011). De plus, ce pathogène humain devient un problème de santé public majeur puisque sa résistance aux antibiotiques est croissante. Ce phénomène est illustré par l'augmentation de streptocoques résistants à la pénicilline G, antibiotique de choix utilisé pour lutter contre le pneumocoque (**figure 1**) (Varon et Houssaye, 2006).

La résistance aux β -lactames passe par une modification de la cible : les PBPs (Penicillin Binding Proteins). Ces protéines sont impliquées dans la synthèse du peptidoglycane et les β -lactames bloquent leur activité. Parmi les isolats cliniques séquencés, les gènes codant ces enzymes montrent des modifications importantes des PBPs résultant d'une chorégraphie dite "mosaïque" (Hakenbeck et al., 2012). La puissance de la variabilité génétique du pneumocoque est également illustrée par deux études récentes. La première a montré que le génome d'une souche qui a colonisé un enfant a subi 23 événements de recombinaison en 7 mois, entraînant une substitution de 7,8% du génome (Hiller et al., 2010). La deuxième étude est basée sur le séquençage de 240 isolats cliniques de *S. pneumoniae* qui a répertorié 615 événements de recombinaison allant de 3 à 72038 paires de base (pb) avec une moyenne de 6,3Kb (Croucher et al., 2011, 2012).

Ces exemples illustrent la diversité génétique que peut acquérir le pneumocoque. Des analyses comparatives des génomes procaryotes montrent que l'acquisition de matériel génétique par transfert horizontal de gènes a été une force motrice majeure dans l'évolution du règne bactérien (Koonin et al., 2001). Les transferts horizontaux s'effectuent via trois mécanismes connus à l'heure actuelle : la conjugaison, la transduction et la transformation (Dorman, 2009). La transduction est un transfert d'ADN chromosomique ou extra-chromosomique vectorisé par des bactériophages (pour revue, voir Dreiseikelmann, 1994). La conjugaison est un processus durant lequel deux bactéries vont s'échanger de l'information génétique. Pour cela, une bactérie dite donneuse met en place un pilus de conjugaison avec une bactérie dite receveuse, permettant le passage d'ADN internalisé sous forme simple brin (pour revue, voir Chen et al., 2005; Burton et Dubnau, 2010). Cependant, des transferts chromosomiques par conjugaison ont été documentés seulement dans un petit nombre d'espèces bactériennes (Claverys et al., 2009). La transformation naturelle est un mécanisme qui permet la fixation d'ADN exogène, son internalisation dans le cytoplasme de la bactérie et son intégration dans le génome par recombinaison homologue si sa séquence présente suffisamment d'homologie avec le chromosome. Contrairement à la conjugaison et à la transduction qui nécessitent la présence d'éléments génétiques mobiles ou extra-chromosomiques, la transformation est un processus contrôlé génétiquement et fait donc partie intégrante de la physiologie de la bactérie possédant cette propriété. Je ne développerai ici que ce mécanisme sur lequel a porté ma thèse.

Présentation bibliographique

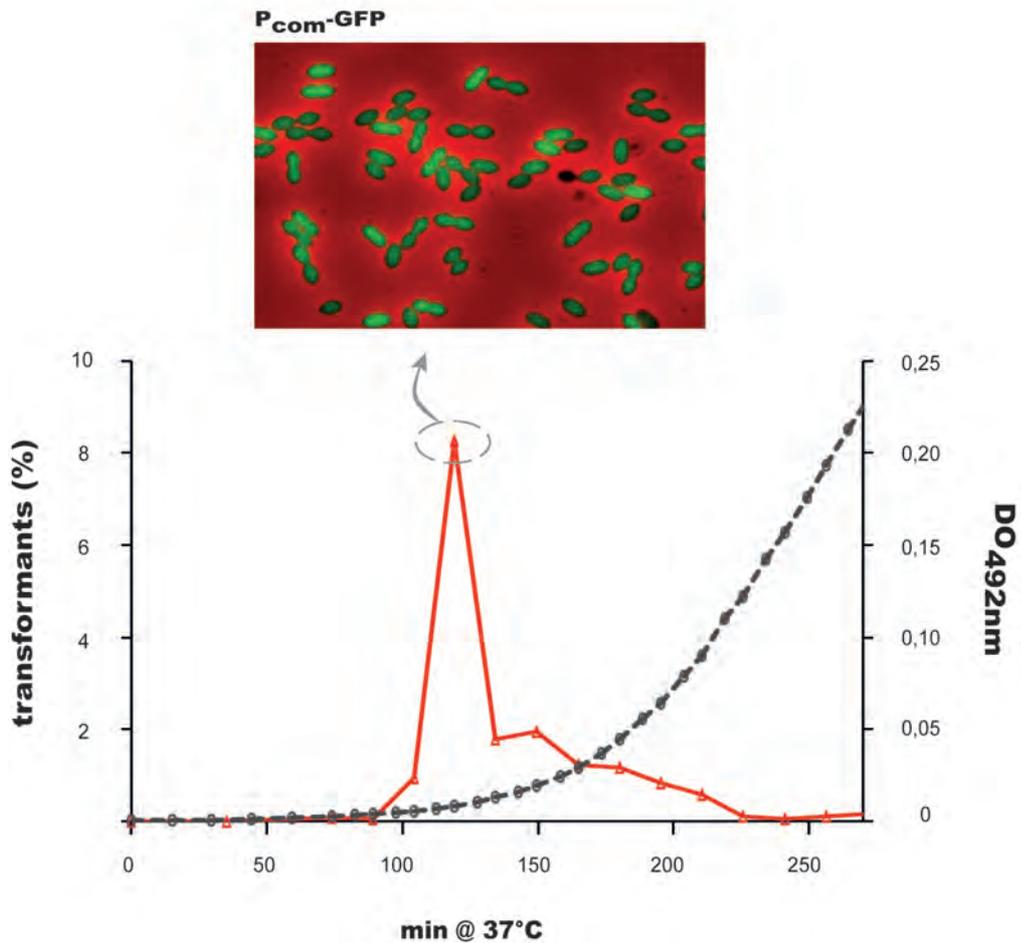


Figure 2- Capacité du pneumocoque à transformer durant sa croissance. Les cellules sont cultivées en milieu C+Y à 37°C. Des aliquots sont prélevés à différents temps au cours de la croissance en mesurant la densité optique (DO_{492nm}, courbe grise), puis mis en contact avec un ADN conférant la résistance à la streptomycine (R304). Le rapport entre le nombre de transformants et la numération permet d'obtenir le pourcentage de transformants (courbe rouge). Au niveau du pic de transformation, une souche exprimant la GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible en compétence montre que toutes les cellules de la population sont fluorescentes, montrant que toute la population est capable de développer la compétence et donc de transformer chez le pneumocoque.

La transformation a été découverte chez *S. pneumoniae* en 1928 par le bactériologiste Frederick Griffith (Griffith, 1928) sur la base d'un transfert de capsule entre streptocoques. Pour cela, deux types de colonies de *S. pneumoniae* ont été isolées suivant leur morphologie : une est avirulente, non capsulée formant des colonies de type rugueux (R pour Rough) et l'autre est virulente, capsulée de type lisse (S pour Smooth) causant la mort de la souris. En revanche, les souches de type R n'entraînent pas de signes pathologique chez la souris, de même que pour les bactéries de type S tuées par la chaleur. Cependant, lorsque les bactéries avirulentes de type R sont inoculées avec une culture de type S tuée par la chaleur, certaines bactéries survivent et provoquent la mort de la souris. Ces résultats ont indiqué que le caractère morphologique, appelé S porté par les bactéries S mortes a été transmis aux bactéries R. Griffith a appelé ce mécanisme "la transformation". Puis, en 1944, ces expériences ont été reprises en regardant quelle était la nature du "principe transformant". Il s'est avéré que seul l'ADN pur permet de redonner aux colonies de type R le phénotype S (Avery et al., 1944), montrant que l'ADN est le support de l'information génétique du pneumocoque, propriété fondamentale qui ensuite s'est avérée être quasi-universelle dans toutes les formes de vie.

I. La compétence : la capacité à transformer

I. A Régulation de la compétence chez *S. pneumoniae*

La capacité à transformer au cours de la croissance de *S. pneumoniae* a été testée en mesurant l'intégration d'un marqueur chromosomique conférant la résistance à la streptomycine (**figure 2**). Les bactéries sont aptes à intégrer de l'ADN en début de phase exponentielle de croissance, montrant que la capacité de transformer est transitoire et qu'elle dépend d'un état physiologique particulier nommé compétence. Il est à noter la différence entre la compétence qui permet la transformation et la transformation génétique qui correspond au processus d'internalisation de l'ADN. L'aspect transitoire de la compétence suggère fortement que ce mécanisme est finement contrôlé. Des données dans la littérature compléteront la brève description faite ici, cet aspect du sujet n'étant pas au cœur de ma thèse (pour revue, voir Claverys et Havarstein, 2002; Claverys et al., 2006; Johnsborg et Håvarstein, 2009).

I. A.1 Le déclenchement de la compétence médié par deux opérons essentiels : comCDE et comAB

L'induction de la compétence chez *S. pneumoniae* dépend d'une voie de signalisation comprenant un peptide nommé Competence Stimulating Peptide (CSP) codé par le gène

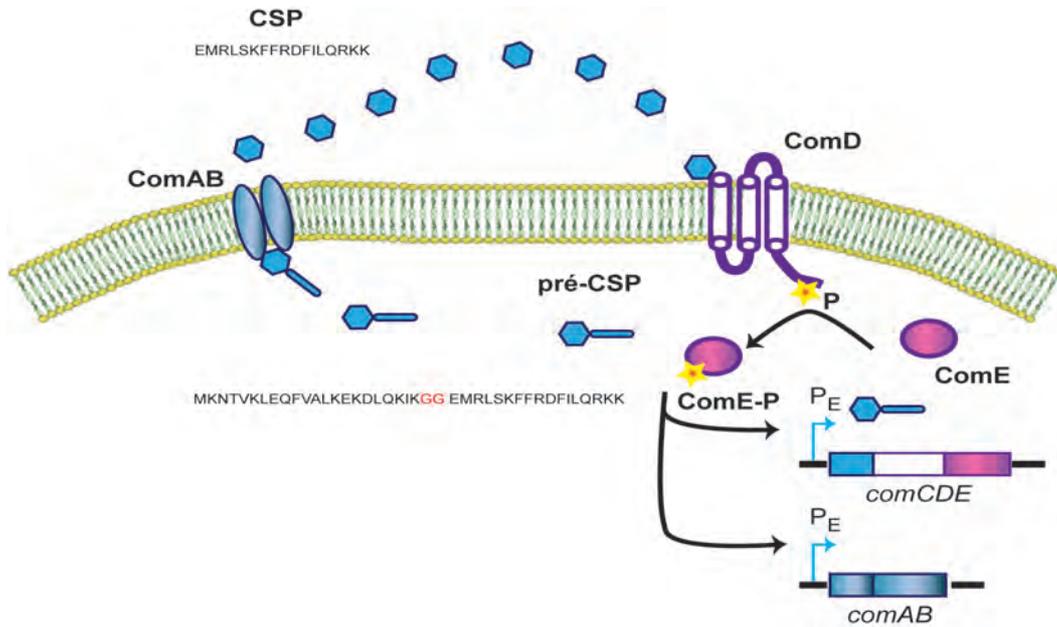


Figure 3- Boucle auto-catalytique de la compétence chez *S. pneumoniae*. Le pré-CSP codé par le gène *comC* (bleu clair) est mûri au niveau de son motif GG puis exporté dans le milieu extracellulaire par ComAB (bleu gris). Le CSP active l'histidine kinase membranaire ComD (violet), qui phosphorylerait l'activateur de transcription ComE (rose). ComE phosphorylée se fixerait sur un promoteur spécifique (P_E) augmentant la transcription de l'opéron *comCDE* et *comAB*. Cette boucle autocatalytique crée une amplification du signal.

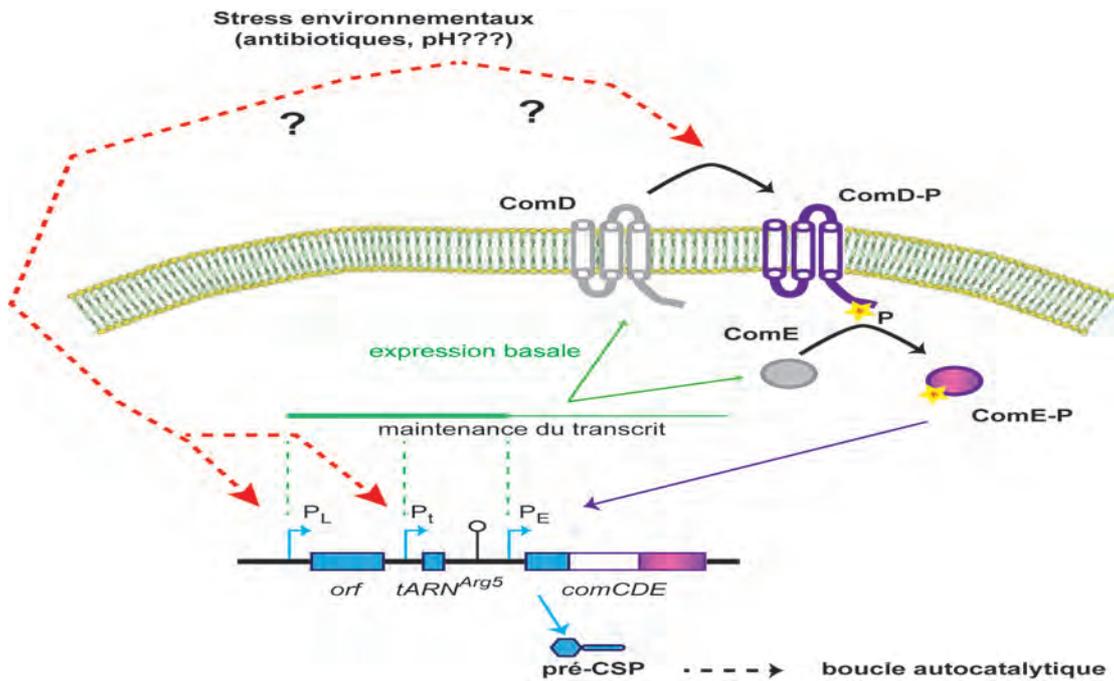


Figure 4- Modèle du déclenchement de la boucle auto-catalytique. Les promoteurs P_E et P_L et probablement P_t permettent de maintenir un niveau basal de ComD et ComE (ARNm en vert et protéines en grises). Des signaux environnementaux vont soit augmenter le niveau basal de ComD et ComE ou directement activer ComD (violet), entraînant une phosphorylation de ComE (rose). ComE phosphorylée va activer la boucle auto-catalytique. D'après Martin et al., 2010.

comC (Håvarstein et al., 1995) et un système à deux composantes : ComDE (Pestova et al., 1996). La purification du CSP a permis de pouvoir parfaitement maîtriser l'induction de la compétence au laboratoire. Les trois gènes *comC*, *comD* et *comE* codant ces protéines font partie du même opéron. L'interaction entre le CSP et l'histidine kinase membranaire ComD produirait un changement de conformation de cette protéine entraînant une auto-phosphorylation de ComD. ComD phosphorylée trans-phosphorylerait son régulateur de réponse ComE qui, dans cet état, agit comme un activateur transcriptionnel de gènes dont elle reconnaît spécifiquement la région promotrice. ComE ainsi activée induirait la transcription de 20 gènes dits précoces. Parmi ces gènes, on trouve les opérons *comCDE* et *comAB*. Ce dernier code pour un ABC transporteur et est indispensable à la maturation et au transport du pré-CSP en CSP (Hui et al., 1995). Ces deux opérons forment donc une boucle auto-catalytique d'amplification du signal (**figure 3**).

I. A.2 Le déclenchement de la compétence

Deux hypothèses non mutualistes sont proposées dans la littérature en réponse à cette question. La première émise est celle d'une transcription passive par fuite transcriptionnelle du tRNA^{arg} situé immédiatement en amont du gène *comC* codant le CSP (Pestova et al., 1996). Une alternative propose la transcription de l'opéron *comCDE* en réponse à des facteurs environnementaux (Claverys et al., 2000). Récemment des travaux ont été publiés sur l'expression basale de l'opéron *comCDE* (Martin et al., 2010) et permettent de proposer un modèle. Il est proposé que la transcription passive du tRNA^{arg} permet de maintenir un niveau basal de ComD et de ComE. Cependant, le CSP n'est pas requis pour cette expression basale. La petite quantité de ComD présente pourrait s'activer indépendamment du CSP par un mécanisme qui n'est pas encore connu et trans-phosphoryler ComE qui pourrait alors jouer son rôle de facteur de transcription (**figure 4**).

Des signaux environnementaux sont connus pour favoriser le déclenchement de la compétence. Ainsi, un pH extracellulaire acide empêche le développement de la compétence (Chen et Morrison, 1987). Par ailleurs, une découverte intéressante a montré que certains antibiotiques favorisaient le développement de la compétence (Prudhomme et al., 2006). Généralement, un antibiotique, la mitomycine C entraîne chez la plupart des bactéries l'induction d'un système de réparation, le système SOS. Hors, aucun mécanisme similaire n'est retrouvé chez le pneumocoque (Gasc et al., 1980; Prudhomme et al., 2006). Il est proposé que l'alternative au système SOS chez le pneumocoque soit le passage par la compétence en réponse à la mitomycine et plus généralement pour répondre à un stress environnemental comme la présence de certains antibiotiques (Claverys et al., 2006; Charpentier et al., 2012;).

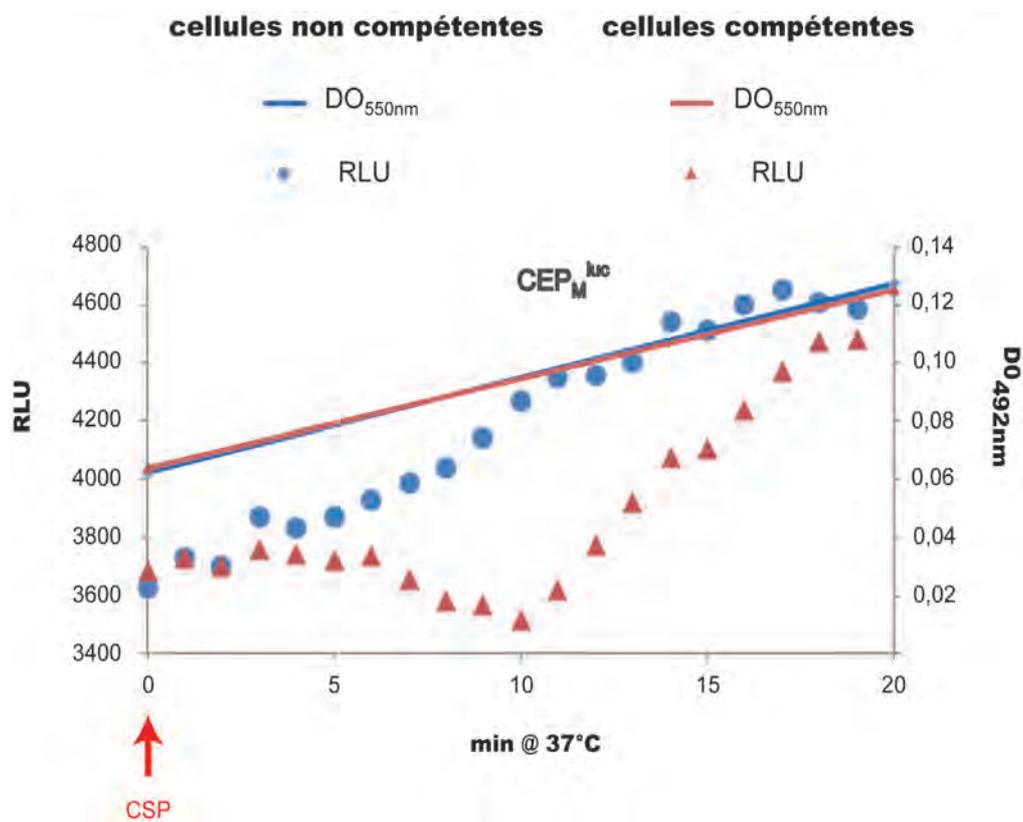


Figure 5- Répression du promoteur lors de l'induction de la compétence. L'expression du promoteur maltose est suivie par l'activité luciférase. Les cellules sont induites au temps 0 par du CSP (100ng.mL^{-1}) (courbes rouges) ou non (courbes bleues). La DO_{492nm} des cellules non compétentes (ligne continue bleue) et compétentes (ligne continue rouge) est montrée. En parallèle, la luminométrie représentant l'activité luciférase sous le contrôle du promoteur maltose des cellules non compétentes (rond bleu) et compétentes (triangle rouge) est mesurée pendant 20 minutes

I. A.3 L'expression d'un facteur sigma alternatif spécifique de la compétence

La plupart des gènes précoces transcrits par ComE n'ont pas de fonction caractérisée à l'heure actuelle. Cependant, deux autres gènes de ce régulon ont été caractérisés, le gène *comX*, dupliqué dans le génome, codant pour un facteur sigma alternatif σ^X (Lee et Morrison, 1999; Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004) et le gène *comW* (Sung et Morrison, 2005).

Le facteur σ^X a été co-purifié avec une sous unité de l'ARN polymérase dans des cellules compétentes et sa présence est nécessaire pour activer la transcription des gènes nécessaires au mécanisme de la transformation, confirmant son rôle de facteur sigma alternatif dédié à la compétence (Lee et Morrison, 1999). Deux rôles ont été attribués à ComW pour le fonctionnement du σ^X : elle permet d'une part de stabiliser le facteur σ^X et d'autre part de l'activer au sein de l'ARN polymérase (Sung et Morrison, 2005).

Lorsque le facteur σ^X est exprimé, une nette atténuation de l'expression des gènes constitutifs est observable au profit d'une très forte production des protéines spécifiques de compétence (Morrison et Baker, 1979). J'ai pu observer ce phénomène au cours de ma thèse en suivant l'expression du promoteur maltose lors de l'entrée en compétence. Le suivi de l'expression du promoteur maltose par le gène rapporteur codant la luciférase montre une répression du promoteur lors de l'induction de la compétence pendant 10 minutes entraînant une chute de 20% de transcription (**figure 5**). Par la suite, l'expression de ce promoteur redevient similaire à celle d'une souche non compétente. Cet exemple illustre bien le changement de facteur de transcription sur l'ARN polymérase lors de l'induction de la compétence. Il montre également que la physiologie cellulaire change lors de l'entrée en compétence.

Le σ^X permettrait la transcription spécifique de gènes, nommés gènes tardifs. Les gènes tardifs sont caractérisés par une signature promotrice différente, se traduisant par une séquence -10 conservée (TACGAATA) appelée "cin box". Cette séquence ne présente aucune homologie avec les boîtes reconnues par le facteur de transcription ComE.

I. A.4 Le X-state

Comme dit précédemment, l'expression des gènes tardifs est sous la dépendance du facteur σ^X . Ils commencent à être exprimés 5 minutes après l'induction de la compétence pour atteindre un maximum entre 10 et 15 minutes puis leur expression diminue rapidement. On trouve 81 gènes appartenant à 23 opérons dont 19 possèdent la signature

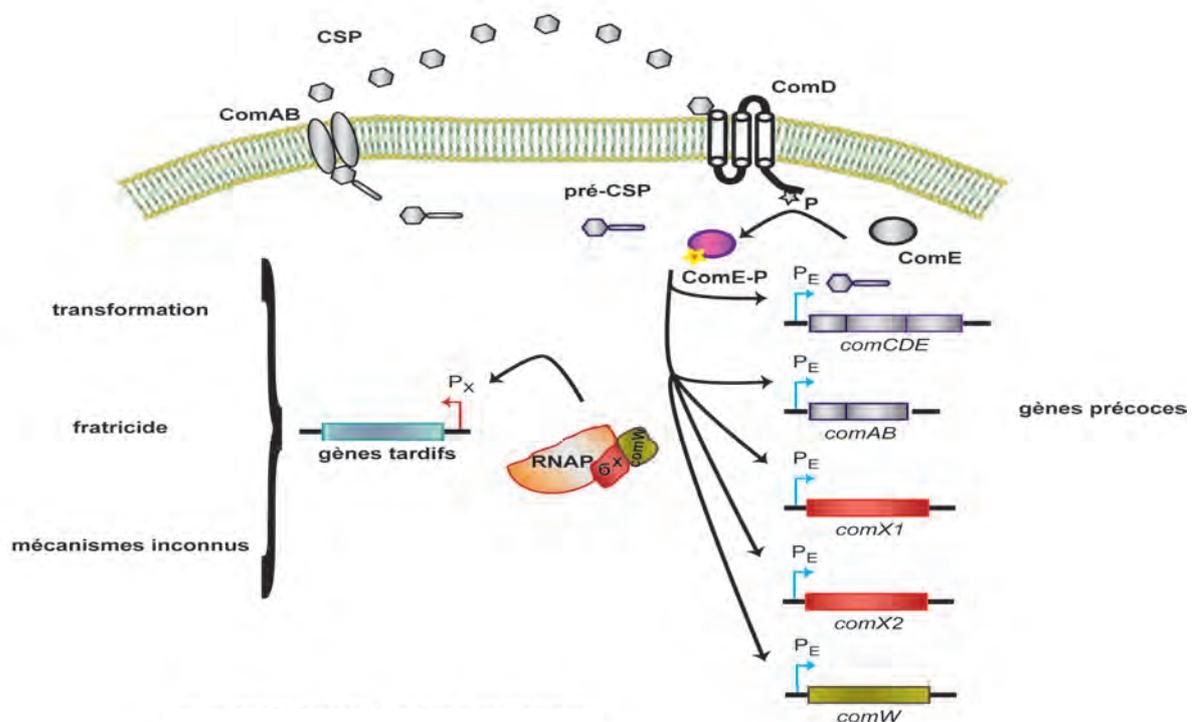


Figure 6- Régulation de la compétence pour l'expression des gènes tardifs de compétence. ComE phosphorylée se fixe sur les boîtes consensus spécifiques (P_E) et active la transcription des gènes précoces. En plus des gènes formant une boucle auto-catalytique du signal (*comCDE* et *comAB*), ComE active l'expression des gènes *comX* et *comW*. Respectivement, ces gènes codent pour un facteur σ^X et un co-facteur permettant de s'associer avec l'ARN polymérase pour transcrire les gènes tardifs de compétence, impliqués dans la transformation, le fratricide et des mécanismes inconnus.

conservée “cin box”, validant les méthodes de transcriptomiques utilisés (Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004). Parmi ces gènes se trouvent ceux qui sont nécessaires à la transformation (environ 20 gènes) mais aussi beaucoup d'autres gènes dont très peu ont été caractérisés fonctionnellement. C'est pourquoi on ne parle plus de compétence mais de X-state par rapport au facteur σ^X (Claverys et al., 2006). Ces gènes peuvent être classés en plusieurs groupes selon la fonction des protéines qu'ils codent (**figure 6**).

Premièrement, on trouve les gènes indispensables à la transformation génétique. Les protéines correspondantes permettent la fixation de l'ADN exogène, son internalisation au travers de la paroi et de la membrane cytoplasmique et son intégration si possible dans le chromosome de la bactérie.

Ensuite, on trouve un ensemble de gènes codant des protéines impliquées dans le mécanisme de fratricide. Brièvement, les cellules compétentes vont attaquer et lyser des cellules sœurs non compétentes présentes dans le même environnement grâce à l'induction en compétence de plusieurs hydrolases du pneumocoque comme LytA, LytC et CbpD ainsi que des bactériocines CibAB (pour revue Claverys et al., 2007).

Enfin, la dernière catégorie de gènes code pour des protéines qui ne sont pas essentielles au processus de transformation. Bien qu'il ne peut pas être exclu que ces protéines ont des fonctions redondantes, cette observation suggère fortement que le régulon de la compétence pourrait servir à d'autres fins que la transformation génétique naturelle.

I. A.5 Les gènes retardés de la compétence

Les derniers gènes induits lors de la compétence ont une cinétique dite retardée. En effet, leur expression augmente 10 à 15 minutes après l'induction de la compétence et n'est pas dépendante du facteur σ^X (Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004). Ces gènes codent pour des protéines de choc thermique et sont sous le contrôle de trois régulons (CiaR, HrcA et une partie de CtsR), comme GroESL, DnaK-GrpE-DnaJ, ClpL et HtrA. Ces régulons jouent un rôle important dans la réponse aux stress. Ces données indiquent que la différenciation engendrée par le développement de la compétence impose un stress temporaire (Seto et Tomasz, 1975) qui doit être pris en charge par ces systèmes de réponse au stress pour pouvoir sortir de la compétence.

I. A.6 La fermeture de la compétence

Si le régulon compétence est bien défini à l'heure actuelle, le mécanisme de fermeture de la compétence commence juste à être compris. Il existe au moins deux niveaux de régulation, l'un arrêtant la transcription des gènes tardifs et l'autre celle des gènes précoces.

I. A.6. a L'arrêt de transcription des gènes tardifs

Bien que la stabilité de σ^X et ComW explique en partie l'arrêt de transcription des gènes tardifs, un mécanisme de séquestration de ces protéines pourrait également conduire à un défaut d'activité du σ^X (Piotrowski et al., 2009). De manière intéressante, une induction du gène *rpoD*, codant le facteur sigma de ménage est concomitante avec l'expression des gènes tardifs (Peterson et al., 2000), suggérant un phénomène de compétition entre ces deux protéines pour la liaison avec l'ARN polymérase (Claverys et Havarstein, 2002).

I. A.6. b L'arrêt de transcription des gènes précoces

L'arrêt de transcription des gènes précoces ne passe pas par une déstabilisation de ComE puisque cette protéine est stable durant 80 minutes après l'induction de la compétence (Ween et al., 1999). Des données très récentes obtenues au sein de l'équipe montrent que l'état de phosphorylation de ComE dans la cellule pourrait jouer un rôle dans l'arrêt de transcription des gènes précoces (résultats non publiés).

I. B Régulation de la compétence chez les autres bactéries

Une soixantaine d'espèces sont aujourd'hui comptées comme naturellement transformables, que ce soit chez les bactéries à Gram positif, à Gram négatif ou encore les archaebactéries (Johnsborg et al., 2007). De nombreuses bactéries pathogènes ont la capacité de transformer comme par exemple *Vibrio cholerae*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae* ou encore *Listeria monocytogenes*. Un grand nombre de bactéries possèdent dans leur génome des homologues des gènes nécessaires à la transformation (Claverys et Martin, 2003). On peut donc penser que le nombre d'espèces ayant la capacité de transformer, bien qu'il ne cesse d'augmenter, est certainement sous estimé. Il a été montré que *E. coli* est capable de transformer naturellement sous la dépendance d'un régulateur Sxy, cependant les conditions naturelles d'induction de Sxy restent encore inconnues (Sinha et al., 2009; Sinha et Redfield, 2012).

Parmi toutes ces bactéries naturellement transformables, des modèles chez les bactéries à Gram positif comme *S. pneumoniae* et *Bacillus subtilis* et chez les bactéries à Gram négatif comme *N. gonorrhoeae*, *H. pylori* et *H. influenzae* ont émergé.

I. B.1 Régulation de la compétence chez les autres streptocoques

Bien que des homologues des gènes *comCDE* aient été identifiés chez les *Streptococcus mitis* et *Streptococcus anginosus* (Håvarstein et al., 1995), d'autres systèmes de régulation ont été découvert dans le genre des streptocoques. Le système ComRS régule la compétence chez *Streptococcus mutans* (Mashburn-Warren et al., 2010) et *Streptococcus*

pyogenes (Mashburn-Warren et al., 2012). Dans ce cas, *comS* code pour un peptide XIP qui va être maturé et va ainsi pouvoir interagir avec ComR. Ce complexe permet la transcription d'un homologue au facteur σ^X permettant la transcription des gènes tardifs de compétence.

Bien que les bactéries du groupe des streptocoques utilisent des voies de régulation très différentes (pour revue, voir Martin et al., 2006), il apparaît, d'après des résultats récents, que toutes ces signalisations convergent vers l'activation d'un orthologue spécifique de la compétence du facteur sigma alternatif σ^X codée par le gène *comX* (Gardan et al., 2009; Fontaine et al., 2010; Mashburn-Warren et al., 2010, 2012). Ce facteur serait le lien entre la partie de la régulation de la compétence qui est dépendante de chaque espèce et le mécanisme de transformation, très conservé entre les espèces.

I. B.2 Régulation de la compétence chez les autres bactéries

La régulation de la compétence peut passer par des mécanismes divers et variés selon l'espèce considérée. Chez *B. subtilis*, le développement de la compétence est dépendant de l'accumulation dans le milieu, selon la densité cellulaire, de ComX et du facteur de compétence ou sporulation (CSF pour Competence or Sporulation Factor). Ces deux protéines provoquent la phosphorylation du régulateur transcriptionnel ComA. ComA ainsi activée permet la transcription de *comS*. ComS se lie à l'appareil protéolytique pour libérer ComK de la dégradation. ComK peut alors activer sa propre expression ainsi que celle des gènes tardifs de compétence (pour revue, voir Tortosa et Dubnau, 1999). D'autre part, des bactéries expriment la compétence de manière constitutive, c'est le cas par exemple de *Neisseria gonorrhoeae* (pour revue, Hamilton et Dillard, 2006; Seitz et Blokesch, 2012).

Ces différents modes de régulations marquent également des réponses à des stress différents selon les bactéries. Le développement de la compétence chez *B. subtilis* est induit en réponse à des carences nutritionnelles ou en réponse à la présence d'antibiotiques chez *S. pneumoniae*. De plus, la visualisation directe de la GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible de compétence montre que seulement 10% de la population devient compétente chez *B. subtilis* (Hajjema et al., 2001) tandis que toute la population le devient chez *S. pneumoniae* (**figure 7**) (Martin et al., 2010).

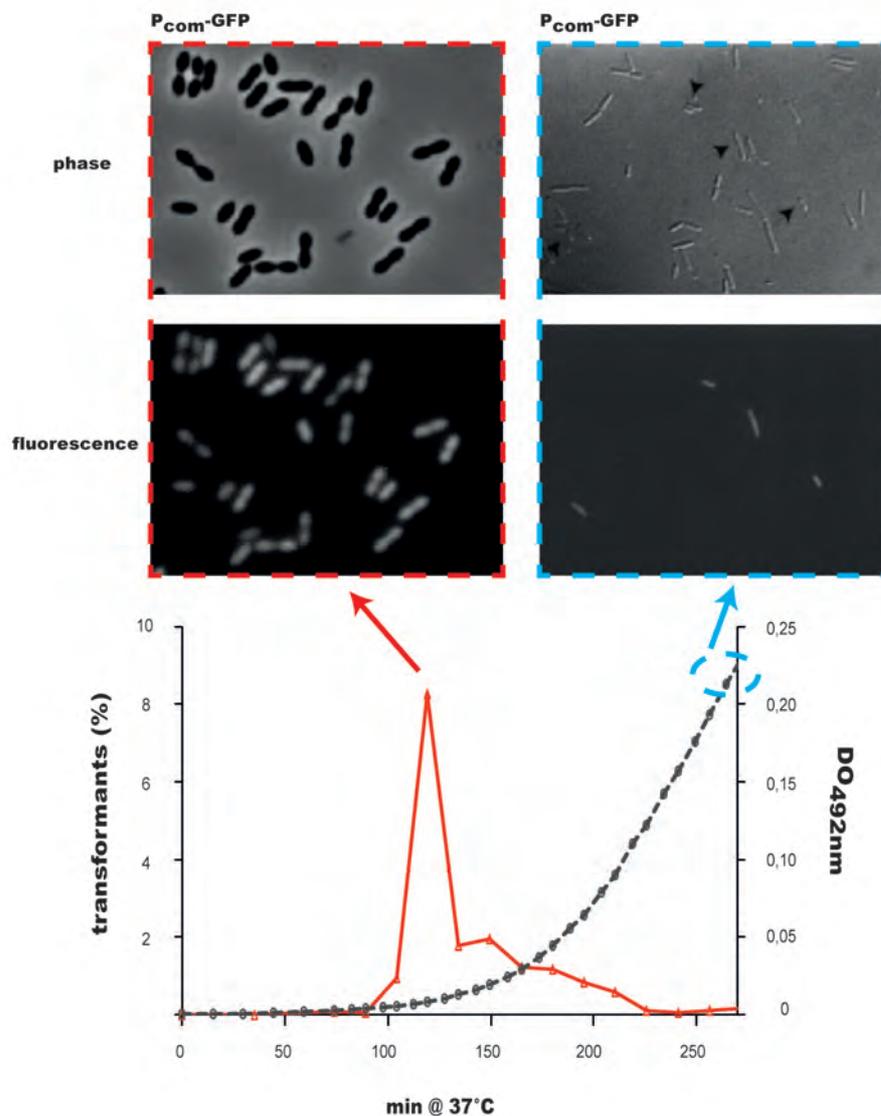


Figure 7- Le développement de la compétence est différent entre *S. pneumoniae* et *B. subtilis*. *S. pneumoniae* développe la compétence en début de phase exponentielle de croissance (courbe rouge) et *B. subtilis* développe la compétence en début de phase stationnaire (rond bleu). Le suivi de la GFP sous le contrôle d'un promoteur inductible en compétence montre que, au pic de transformation, toute la population devient compétente chez le pneumocoque (carré rouge pointillé) et seulement 10% de la population devient compétente chez *B. subtilis* (carré bleu pointillé) (Haijema et al., 2001).

Encadré 1- La transformation : dans quel but ?

Trois hypothèses non mutualistes ont été proposées pour expliquer la conservation au cours de l'évolution de la capacité à transformer (Chen et Dubnau, 2004; Seitz et Blokesch, 2012) :

- **Source nutritionnelle** : l'ADN servirait de source de carbone, de nitrogène et de phosphate.
- **Réparation de l'ADN** pour servir de matrice lorsque le génome est endommagé.
- **Diversité génétique** acquisition d'information génétique pouvant potentiellement conférer de nouvelles fonctions telles que des résistances aux antibiotiques ou de nouveaux facteurs de virulence.

Au laboratoire, nous pensons que la première hypothèse serait une solution alternative de secours. En effet, le développement de la compétence demande un certain coût énergétique et les fenêtres de compétence étant courtes chez le pneumocoque, le système n'est pas adapté à une entrée massive d'ADN. D'autre part, certaines bactéries régulent l'entrée de l'ADN selon sa séquence, mécanisme contradictoire dans un but purement nutritif. Bien que le mécanisme de transformation utilise une machinerie conservée, les bactéries transformables ont des circuits de régulation différents comme décrit dans cette première partie. D'autre part, une étude très récente a établi que *L. monocytogenes* développait la compétence à l'intérieur des macrophages et que l'expression des gènes servant à la transformation permettait à la bactérie de résister à la réponse immunitaire mais sans pour autant utiliser la transformation à proprement parler (Rabinovich et al., 2012).

Une hypothèse que la transformation ait évolué selon les espèces pour répondre à des besoins différents est envisageable.

II. La Transformation génétique naturelle : son mécanisme

Comme dit précédemment, le mécanisme de régulation de la compétence est dépendant de l'espèce. En revanche, le processus la transformation suit un mécanisme conservé qui requiert quatre étapes majeures (**figure 8**), i) la capture de l'ADN présent dans le milieu extracellulaire ii) sa traversée de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif et du peptidoglycane iii) sa translocation sous forme simple brin au travers de la membrane cytoplasmique et iv) son intégration par recombinaison homologue dans le chromosome de la bactérie. Ces étapes nécessitent la présence d'un ensemble de protéines regroupées sous le terme de Transformasome. Dans un premier temps, je décrirai le voyage de l'ADN depuis sa capture jusqu'à son internalisation puis une étude détaillée de chaque acteur du Transformasome sera présentée.

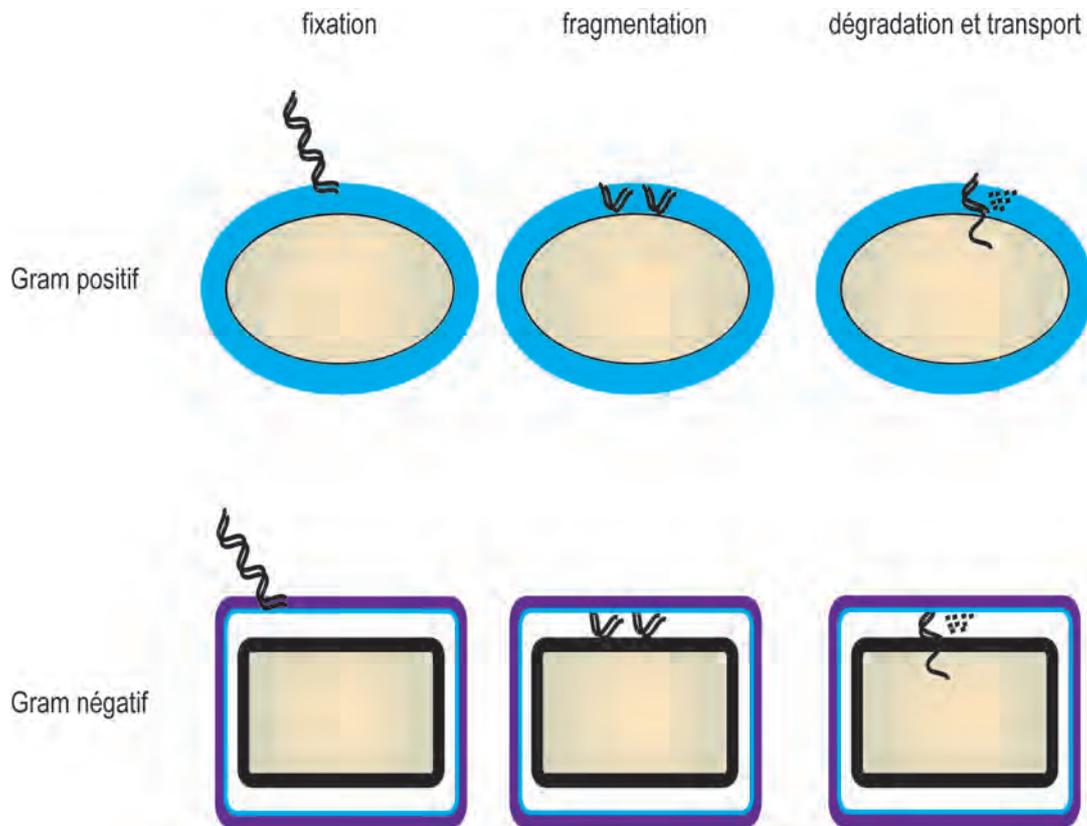


Figure 8- Voyage de l'ADN au cours de la transformation génétique naturelle chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'ADN est fixé à la surface des cellules de manière aspécifique chez les bactéries à Gram positif et dépendant de la séquence DUS chez quelques bactéries à Gram négatif (*H. influenzae*). Puis chez les bactéries à Gram positif, l'ADN va passer au travers du peptidoglycane (bleu). Chez les bactéries à Gram négatif, l'ADN passe la membrane externe (violet), le peptidoglycane (bleu) pour être fragmenté dans le périplasma. Enfin, dans les deux cas, un brin d'ADN est dégradé pendant que le brin complémentaire est internalisé sous forme simple brin dans le cytoplasme de la cellule (jaune pâle). D'après Dubnau, 1999.

II. A Le voyage de l'ADN au cours de la transformation génétique

II. A.1 La capture de l'ADN dans le milieu

II. A.1. a Chez les bactéries à Gram positif

L'ADN double brin (ADNdb) est le substrat de la transformation génétique. En effet, les cellules fixent de l'ADN double brin 200 fois mieux que de l'ADN simple brin (ADNsb) (Miao et Guild, 1970). Chez *S. pneumoniae*, l'ADN circulaire est aussi bien fixé que l'ADN linéaire (Lacks, 1979). Il en est de même pour l'ADN homologue ou hétérologue. Il a été montré chez *B. subtilis* que la fixation de l'ADN est un phénomène saturable, suggérant un nombre limité de sites de fixation sur les surfaces bactériennes. Il a été estimé que 50 sites de fixation étaient présents chez *B. subtilis* (Dubnau et Cirigliano, 1972; Singh, 1972) et entre 33 et 75 chez *S. pneumoniae* (Fox et Hotchkiss, 1957).

II. A.1. b Chez les bactéries à Gram négatif

Le substrat de la transformation (ADNsb ou ADNdb) chez les bactéries à Gram négatif est moins bien identifié et sujet à controverse (Hamilton et Dillard, 2006; Krüger et Stingl, 2011). Une autre particularité de quelques bactéries à Gram négatif est la fixation d'ADN contenant une séquence spécifique appelée DUS chez *N. gonorrhoeae*. (pour "DNA uptake sequence") et USS chez *H. influenzae* (pour "uptake Signal Sequence") (Krüger et Stingl, 2011). Cette séquence est différente selon les espèces et correspond à une séquence retrouvée fréquemment sur le chromosome de la bactérie. Par exemple, chez *Neisseria* spp, une séquence DUS est retrouvée toute les 1096pb sur le génome (Davidsen, 2004). Comme dit précédemment, *N. gonorrhoeae* est compétent tout au long de sa phase de croissance. Ce moyen de contrôle pourrait constituer le moyen de réguler l'entrée de l'ADN exogène.

Comme chez les bactéries à Gram positif, la fixation de l'ADN semble saturable. Chez *H. influenzae*, il est proposé que 4 à 8 sites soient actifs pouvant chacun transporter uniquement une molécule d'ADN (Deich et Smith, 1980).

II. A.2 Translocation au travers de la membrane externe, passage du peptidoglycane et de la membrane cytoplasmique

II. A.2. a Chez les bactéries à Gram positif

Au cours de son passage au travers du peptidoglycane, l'ADN devient résistant aux nucléases extérieures. L'entrée d'ADN portant deux marqueurs nécessite plus de temps que si il n'y a qu'un seul marqueur, montrant que l'ADN rentre sous forme linéaire (Gabor et Hotchkiss, 1966). De ce fait, un ADN circulaire doit d'abord subir une coupure double brin

pour le linéariser. Chez *S. pneumoniae*, un premier clivage de l'ADN est réalisé sous l'action d'une nucléase inconnue dont l'action est indépendante de la présence d'ion dans le milieu (Lacks, 1976) suivi d'une deuxième coupure sur le brin complémentaire, possiblement en face du premier clivage (Lacks, 1979). Les fragments générés ont une longueur moyenne d'environ 8Kb (Morrison et Guild, 1973).

L'ADN subit une deuxième maturation conduisant à la dégradation d'un brin d'ADN pour générer le substrat de la recombinaison homologe, l'ADNsb. Chez *S. pneumoniae*, des produits de dégradations solubles dans l'acide sont libérés dans le milieu de façon concomitante avec l'entrée de l'ADNsb dans la cellule (Lacks et Greenberg, 1973). Ces produits de dégradations correspondent à des oligonucléotides allant de 1 à 10 nucléotides (Lacks et al., 1974). L'ADN sous forme simple brin peut être transloqué dans la cellule.

La polarité d'entrée a été déterminée grâce à des fragments d'ADN hétérologue marqués à une seule extrémité sur un seul brin, en 3' ou en 5'. Seul l'ADN marqué en 5' est incorporé dans le chromosome de la bactérie donc l'ADN rentre avec une polarité 3'→5' et le brin complémentaire est dégradé avec une polarité inverse (Méjean et Claverys, 1988). De plus, *via* le suivi de l'ADN, il a été établi que la vitesse d'entrée a été déterminée à environ 100 nucléotides.sec⁻¹ à 31°C avec une vitesse de dégradation du brin complémentaire équivalente, suggérant que la dégradation et l'entrée sont couplées (Méjean et Claverys, 1993). Chez *B. subtilis*, de manière étonnante, aucune polarité n'a été démontrée, l'ADN pourrait rentrer dans les deux sens (Vagner et al., 1990). Les vitesses d'entrée mesurées à l'heure actuelle sont équivalentes à celle du pneumocoque, environ 80 nucléotides.sec⁻¹ (Maier et al., 2004).

II. A.2. b Chez les bactéries à Gram négatif

Lorsque l'ADNdb exogène passe la membrane externe, il arrive dans l'espace périplasmique. L'ADNdb est alors protégé des nucléases extérieures. Comme chez les bactéries à Gram positif, l'ADN subit également une maturation puisque l'ADN circulaire est retrouvé sous forme linéaire après qu'il soit résistant aux nucléases extérieures (Biswas et al., 1986). De plus, que ce soit chez *H. influenzae* ou *N. gonorrhoeae*, l'ADN serait également converti en ADNsb pour passer la membrane interne (Hamilton et Dillard, 2006). Comme chez le streptocoque, l'ADNsb rentre avec une polarité 3'→5' (Barany et al., 1983).

II. A.3 L'intégration au génome par recombinaison homologue

Le processus d'intégration est commun à toutes les bactéries naturellement transformables. L'ADN internalisé reste sous forme simple brin car après son extraction de la cellule, il ne peut pas être réutilisé pour transformer une nouvelle souche. On parle d'ADN en

éclipse pour définir cet état (Morrison, 1977). Si il y a de l'homologie avec le chromosome, l'ADN pourra être intégré en moins de 10 minutes dans le chromosome de la bactérie par recombinaison homologue (Claverys et al., 2009). Si l'ADN n'est pas protégé par des protéines à son entrée dans la cellule, il est rapidement dégradé par des nucléases endogènes (Bergé et al., 2003).

II. A.4 L'origine de l'ADN exogène

La plupart des descriptions de transformation naturelle commencent avec la capture de l'ADN. Plusieurs études ont pu montrer que l'ADN extracellulaire était retrouvé dans tous les environnements naturels, provenant de cellules mortes, de particules virales ou enfin d'un mécanisme de sécrétion des cellules vivantes. Cependant, cet ADN doit être protégé de la dégradation bactérienne et n'est donc probablement pas directement accessible par les bactéries compétentes (Morrison et Guild, 1973).

Il y a des évidences que plusieurs espèces bactériennes n'effectuent pas la transformation à partir de libération accidentelle de l'ADN dans l'environnement mais procèdent à un mécanisme actif de libération. Chez *S. pneumoniae*, la libération implique la lyse d'une fraction de la population non compétente par des bactéries compétentes par le mécanisme du fratricide, impliquant des auto-lysines induites en compétence (pour revue, voir Claverys et al., 2007). Ce mécanisme est conservé chez d'autres streptocoques naturellement transformables (Johnsborg et al., 2008). Un mécanisme similaire a été reporté chez *N. gonorrhoeae*, mais qui ne passe pas par une lyse bactérienne. *N. gonorrhoeae* utilise son système de sécrétion de type IV pour libérer de l'ADNsb (Hamilton et al., 2005). *N. gonorrhoeae* est capable d'utiliser l'ADNdb ou l'ADNsb comme substrat de la transformation (Stein, 1991). De plus, la fixation de l'ADNdb montre une préférence pour un seul brin, dont l'affinité est augmenté par la présence d'une séquence DUS (Duffin et Seifert, 2012).

II. B Les composantes de la machinerie de transformation, le Transformasome

Les étapes du passage de l'ADN au travers de la membrane externe, du peptidoglycane, de la membrane cytoplasmique et son intégration dans le chromosome nécessitent plusieurs protéines exprimées uniquement en compétence. Celles-ci sont actuellement au nombre de 16, dont l'association physique et/ou fonctionnelle définit une machinerie dédiée à la transformation génétique nommée Transformasome (**figure 9**). Deux grands sous ensembles fonctionnels distincts composent le Transformasome, le premier est membranaire ou associé à la membrane tandis que l'autre est situé dans le cytoplasme. Les

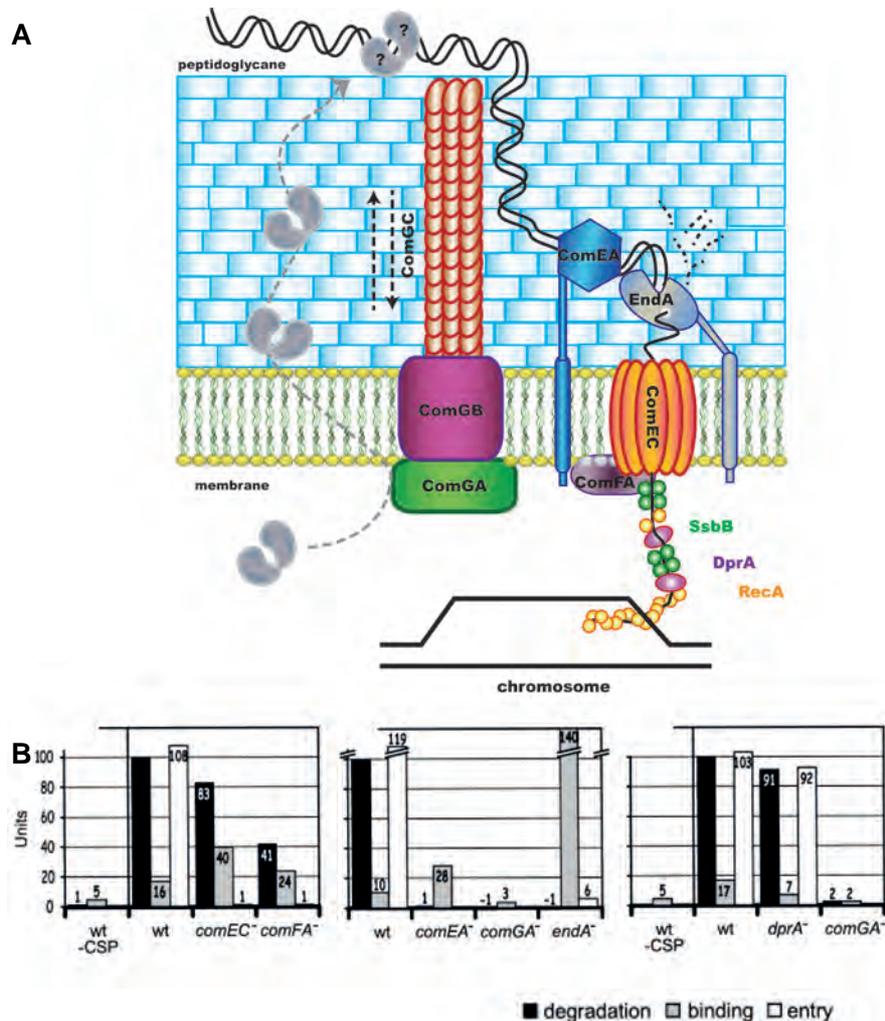


Figure 9- Suivi du voyage de l'ADN donneur intégré au Transformasome A/ Modèle du Transformasome chez les bactéries à Gram positif. L'ADN_{db} est capté à la surface des cellules par un récepteur inconnu mis en place par ComGA. Ce récepteur permet une fixation primaire réversible de l'ADN_{db}. Puis, le pseudo-pilus de compétence formé par les protéines ComGs forme une structure permissive au passage de l'ADN_{db} au travers du peptidoglycane. L'ADN_{db} est fixé par le récepteur d'ADN_{db}, ComEA, de manière irréversible. L'ADN_{db} est convertit en ADN_{sb} *via* le recrutement et l'activité de la nucléase EndA. Sous cette forme, l'ADN franchirait la membrane cytoplasmique au travers du canal transmembranaire ComEC via l'action de la translocase ComFA. Une fois internalisé, l'ADN_{sb} est pris en charge par un ensemble de protéines solubles, notamment DprA, RecA et SsbB qui permettraient son intégration, si il y a homologie, par recombinaison homologue dans le chromosome de la bactérie. B/ *Suivi du devenir d'un ADN donneur (dégradation, fixation et entrée).* L'ADN radioactif est mis en contact avec les cellules compétentes sauvages (WT) ou mutantes pour des composants du Transformasome. Le surnageant est retiré et la radioactivité est comptée pour mesurer le dégradation (noir). Les cellules sont incubées avec de la DNaseI permettant de déterminer la fixation (gris). Enfin les cellules sont lysées pour quantifier l'ADN internalisé (blanc). D'après Bergé et al., 2002.

différents acteurs de ce complexe seront présentés dans cette partie en tenant compte des différences entre les bactéries.

II. B.1 La capture

II. B.1. a Chez les bactéries à Gram positif

De manière étonnante, dans un mutant du récepteur de l'ADN double brin ComEA (voir ci après), il reste une fixation résiduelle de l'ADNdb (dite fixation primaire), suggérant qu'il existe une autre fixation indépendante de ComEA (Bergé et al., 2002). Des résultats récents similaires ont été montrés chez *B. subtilis*. Chez cette bactérie, il a été montré que cette fixation primaire s'explique par la présence d'un récepteur protéique inconnu, dont la mise en place est dépendante de l'ATPase ComGA. L'hydrolyse de l'ATP semble indispensable à la fixation de l'ADNdb qui n'est pas irréversible (Briley Jr et al., 2011a).

II. B.1. b Chez les bactéries à Gram négatif

La fixation de l'ADN chez une partie des bactéries à Gram négatif est dépendante d'une séquence spécifique DUS. La protéine responsable de la capture spécifique de cette séquence n'a été identifiée dans aucun système étudié. Cependant, chez *N. gonorrhoeae*, deux acteurs jouant un rôle dans ce processus ont été identifiés. La protéine ComP, une pseudo-pilline, permet d'augmenter la transformation, en augmentant la fixation de l'ADN d'une manière dose dépendante (Aas et al., 2002b). Elle permettrait de stabiliser le récepteur DUS. D'autre part, PilV agit comme un antagoniste de ComP en agissant sur sa stabilité ou sa localisation (Aas et al., 2002a). Bien que le récepteur ne soit pas encore découvert, cet exemple montre un nouveau mécanisme par lequel la transformation peut être modulée.

II. B.2 Traversée de la membrane externe et du peptidoglycane

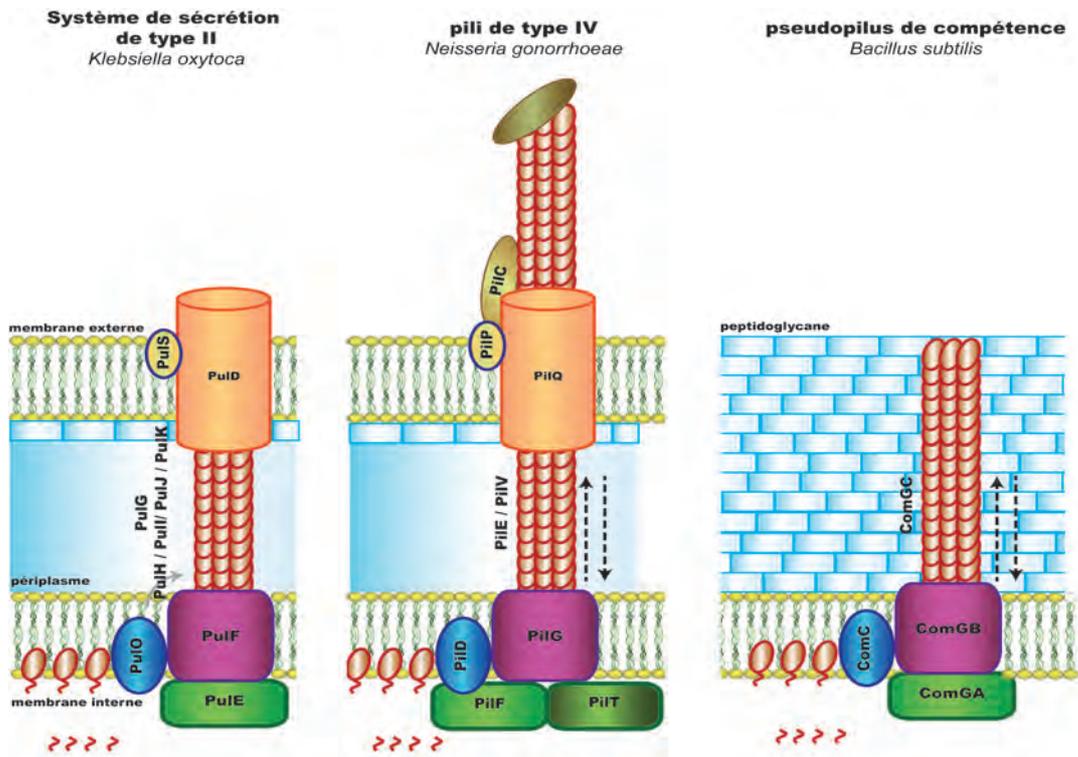
II. B.2. a Chez les bactéries à Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, l'ADNdb doit traverser le peptidoglycane avant d'être fixé. Cette étape est assurée par un pseudo-pilus de compétence et un récepteur de l'ADNdb.

II B.2. a. i Le pseudo-pilus

II B.2. a. i. A Composition

La plupart des informations proviennent de *B.subtilis*. L'opéron *comG*, codant pour 7 protéines chez *B. subtilis* (*comGA*, *comGB*, *comGC*, *comGD*, *comGE*, *comGF*, *comGG*) et le



fonction protéine	<i>Pseudopilus de compétence</i>		T4P	T2SS
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>K. oxytoca</i>
ATPase	ComGA	ComGA	PilF PilT	PulE
plateforme	ComGB	ComGB	PilG	PulF
pilines	ComGC ComGD ComGE	ComGC ComGD ComGE ComGG	PilE PilV	PulG PulH PulI PulJ PulK
peptidase	ComC	CclA	PilD	PulO
sécretine	Non applicable	Non applicable	pilQ PilP	PulD PulS

Figure 10- Comparaison des machineries formant les systèmes de sécrétion de type IV, les pilus de type IV et le pseudo-pilus de compétence. Les modèles de *Klebsiella oxytoca*, *N. gonorrhoeae* et *B. subtilis* ou *S. pneumoniae* ont été choisis pour illustrer respectivement le système de sécrétion de type II, le pilus de type IV et le pseudo-pilus de compétence. D'après Chen and Dubnau, 2004.

gène *comC* sont indispensables pour la fixation stable de l'ADNdb. La délétion d'un seul gène de l'opéron *comG* entraîne une perte totale de la capture de l'ADN exogène, montrant que chaque protéine codée par cet opéron est essentielle au passage du peptidoglycane (Chung et Dubnau, 1998). Il est proposé que le pseudo-pilus formerait une structure qui permettrait l'accès de l'ADN à son récepteur, ComEA au travers du peptidoglycane (description ci dessous). Cette hypothèse est appuyée par le fait que ComEA est capable de fixer l'ADN sur des protoplastes (bactéries dépourvues de leur paroi) chez *B. subtilis* (Proveddi et dubnau, 1999). Pour réaliser cette tâche, il faut comprendre la structure adoptée par ces protéines.

II B.2. a. i. B Une structure organisée

L'opéron *comG* code pour une machinerie multiprotéique apparentée aux systèmes de sécrétion de type II (T2SS) qui permet l'export de facteurs de virulence dans le milieu extérieur et aux pilus de type IV (T4P) impliqués dans l'adhésion cellulaire et/ou la motilité (**figure 10**). Ces appareils protéiques ont une organisation protéique similaire (Ayers et al., 2010).

On trouve une ATPase souvent sous forme hexamérique, ComGA chez *B. subtilis*, qui fournirait l'énergie au système. ComGA est associée à la membrane cytoplasmique et serait donc à la base du pseudo-pilus. Puis, il y a une protéine polytopique membranaire, ComGB dans le pseudo-pilus de compétence, servant de plateforme d'assemblage et de désassemblage du pilus. Ensuite, il y a des protéines formant le pilus nommées pillines majeures et mineures représentées respectivement par ComGC et ComGD, ComGE, ComGG chez *B. subtilis*. Ces protéines partagent des propriétés communes, notamment une extrémité clivable N-terminale hydrophobe (pour revue, voir Proft et Baker, 2009). Pour former ces structures, ces protéines codées sous forme de prépillines doivent être maturées par une peptidase au niveau de leur séquence N-terminale. ComC a été montré nécessaire à leur maturation pour cliver les protéines comGC, comGD, ComGE et ComGG au niveau de leur motif KGFT (Chung et Dubnau, 1995; Chung et al., 1998). Les protéines ComGC peuvent former des multimères de 40 à 100 sous unités, dépendant de la présence de toutes les autres pillines (ComGD, ComGE et ComGG) (Chen et al., 2006). De plus, les protéines ComGC contiennent des ponts disulfures dont la formation dépend de l'oxydoréductase BdbDC qui permettrait une stabilisation de la structure (Meima et al., 2002). Des expériences de gel filtration ont permis de déduire que cette structure aurait une longueur comprise entre 40 et 100nm qui permettrait de traverser le peptidoglycane qui a une longueur d'environ 55nm chez *B. subtilis* (Chen et al., 2006). Cette taille est petite par rapport aux pili de type IV, c'est pourquoi le terme pseudo-pilus est employé.

On peut noter que le pseudo-pilus de compétence, contrairement au pilus de type IV, ne comporte pas de sécrétine et de protéine pilote car il n'y a pas de membrane externe à traverser chez les bactéries à Gram positif. D'autre part, dans les systèmes de type IV, il y a deux ATPases, l'une permettant l'assemblage et l'autre permettant le désassemblage du pilus. Au contraire, dans le pseudo-pilus de compétence, seul ComGA a été identifiée.

II B.2. a. i. C Le pseudo-pilus chez S. pneumoniae et les streptocoques

Une organisation chromosomique en opéron des gènes *comGs* homologues à ceux de *B. subtilis* présentant un phénotype similaire suite à leur inactivation individuelle est retrouvé chez plusieurs bactéries à Gram positif naturellement transformables, notamment *S. pneumoniae* (**figure 9**) (Pestova et Morrison, 1998; Bergé et al., 2002), *S. gordonii* (Lunsford et Roble, 1997) et *S. mutans* (Merritt et al., 2005). Chez le pneumocoque, il y a 5 prépillines potentielles nommées ComGC, ComGD, ComGE, ComGF et ComGG. De plus, un homologue à ComC de *B. subtilis* est présent et induit en compétence. Aucun travail n'a été publié sur la maturation des prépillines. On peut noter la présence d'un motif de maturation KAFT (au lieu de KGFT chez *B. subtilis*) à l'extrémité N-terminale des prépillines. Il existe peut être des différences entre *B. subtilis* et *S. pneumoniae*, notamment au niveau de la taille des pilus. En effet, *S. pneumoniae* est une bactérie capsulée dans la nature. Il est donc possible que la taille du pseudo-pilus soit plus importante chez le pneumocoque que chez *B. subtilis*. Cependant, la conservation des différentes protéines du pseudo-pilus suggère un fonctionnement similaire.

II B.2. a. i. D Modèle du fonctionnement

Le mode d'action du pseudo-pilus de compétence est encore mal compris et pose encore beaucoup de questions. Deux hypothèses peuvent être émises. Soit les pillines peuvent fixer l'ADN pour le tirer au travers du peptidoglycane ou le pseudo-pilus jouerait un rôle passif, formant une structure permissive au passage de l'ADN au travers du peptidoglycane. Aucune interaction entre la pilline majeure ComGC et l'ADN n'a pu être détectée. Des données de molécules uniques montrent que la force exercée par le pseudo-pilus est équivalente aux pili de type IV (Maier et al., 2004; Stingl et al., 2010), suggérant une action par assemblage et désassemblage des pillines (Mattick, 2002; Burrows, 2005) cohérente avec les différentes tailles de pseudo-pilus observées lors d'expériences de gel filtration (Chen et al., 2006). Cependant, il n'y a pas assez de place au cœur des pili de type IV (1,2nm) pour permettre le passage d'un ADNdb (2,4nm). De plus, l'hydrophobicité présente à l'intérieur du pilus n'est pas favorable au passage de l'ADN qui est hydrophile

(Keizer et al., 2001). Le mécanisme d'action du fonctionnement du pseudo-pilus pour la transformation reste à découvrir.

II B.2. a. ii Le récepteur de l'ADN double brin : ComEA

ComEA est une protéine codée par l'opéron *comE* chez *B. subtilis* composé de trois gènes en opéron *comEA*, *comEB* et *comEC* et d'un quatrième gène *comER* transcrit avec une orientation inverse de l'opéron (Inamine et Dubnau, 1995). Ces auteurs ont également montré que seules ComEA et ComEC sont requises pour le processus de transformation. Le gène *comEA* code pour une protéine membranaire intégrale, avec un domaine intracellulaire, un domaine transmembranaire (résidus 10 à 30) et l'extrémité C-terminale localisée à l'extérieur de la cellule (**figure 11**) (Inamine et Dubnau, 1995). La délétion de la partie C-terminale de ComEA, fixant l'ADN *in vitro*, entraîne une abolition de la transformation, et plus particulièrement de la fixation de l'ADN (Provvedi et Dubnau, 1999). Comme dit précédemment, la présence des protéines ComGs est indispensable à la fixation de l'ADN par ComEA *in vivo*.

Des homologues des protéines ComEA et ComEC sont présents chez *S. pneumoniae* (Campbell et al., 1998; Pestova et Morrison, 1998). ComEA jouerait également le rôle de récepteur de l'ADN double brin entrant lors du transport de l'ADN chez *S. pneumoniae* (Bergé et al., 2002).

II. B.2. b Chez les bactéries à Gram négatif

La transformation chez les bactéries à Gram négatif requiert une étape supplémentaire, le passage de la membrane. Le passage de la membrane externe requiert des protéines nommées sécrétines. Puis l'ADN passe dans l'espace périplasmique *via un pseudo-pilus* ou il est fixé.. *H. pylori* et *C. jejuni* utilisent leur système de sécrétion de type IV et donc constituent une particularité qui ne sera pas développée ici (pour revue Hofreuter et al., 2000; Krüger et Stingl, 2011).

II B.2. b. i Les sécrétines

Cette famille de protéines forme des multimères créant une cavité centrale de 6,5nm pour le passage de l'ADN double brin (2,4nm) (Collins et al., 2004). Ces protéines sont un constituant essentiel des pili de type IV. Récemment, il a été montré que PilQ, la sécrétine de *N. gonorrhoeae*, fixe l'ADN de manière indépendante de la séquence (Assalkhou et al., 2007).

```

Spn      MEAIIIEKIKEYKIIVICTGLGLLVGGFFLLKPAPQTPVKETNLQAEVAAVSKDLVSEKEV 60
Bsu      MNWLNQHKKA--IILAASAAVFTAIMIFLATGKNKEPVKQA-----VPTETENTVVKQEA 53
Ngo      -----

Spn      NKEEKEEPLEQDLITVDVKGAVKSPGIYDLPVGSRVNDAVQKAGGLTEQADSKSLNLAQK 120
Bsu      NNDESNE-----TIVIDIKGAVQHPGVYEMRTGDRVSQAIEKAGGTSEQADEAQVNLAEI 108
Ngo      -----

Spn      VSDEALVYVPTKGEEAVSQQTGLGTASSIS-KEKKVNLNKASLEELKQVKGLGGKRAQDI 179
Bsu      LQDGTVVYIPKKGEETAVQQGGGGSVQSDGGKALVNINTATLEELQGISGVGPSKAEAI 168
Ngo      MKKMFVLF-----MLFSCAFSLAAVNINAASQOELEALPGIGPAKAKAI 45
      ...  :::                               * . .   **: * * : **: : * : *  : * : *
      : *  ** * : : : : : ** . ***   : * : * .  : *

Spn      IDHREANGFKFSVDELKKVSGIGGKTIEKLKDYVTVD----- 216
Bsu      IAYREENGRFQTIEDITKVSIGIGEKSFEEKSSITVK----- 205
Ngo      AEYRAQNGAFKSVDDLKVKGIGPAVLAKLKDQASVGAPAPKGPAPKPVLPVAVKK 99
      : *  ** * : : : : : ** . ***   : * : * .  : *

```

Figure 11- Alignement du récepteur d'ADNdb ComEA de *S. pneumoniae*, *B. subtilis*, et ComE de *N. gonorrhoeae*. Le segment transmembranaire présent chez *S. pneumoniae* et *B. subtilis* est marqué (gras) et le domaine hélice-tour-hélice assurant la fixation de l'ADN est également présenté (gras rouge).

II B.2. b. i Le pseudo-pilus de compétence

La plupart des bactéries à Gram négatif naturellement transformables étudiées possèdent également un pilus de type IV. Est ce que le passage de l'ADN exogène est médié par cette machinerie ou existe-t'il un pilus dédié à la transformation ? Plusieurs bactéries naturellement transformables montrent qu'un pilus de type IV fonctionnel est nécessaire pour la transformation naturelle (Mattick, 2002; Hamilton et Dillard, 2006). Cependant, chez *N. gonorrhoeae*, la duplication en tandem de *pilE* codant pour la pilline majeure entraîne la formation de pili longs et provoque un défaut de transformation (Gibbs et al., 1989). Ces expériences suggèrent que le pilus de type IV est nécessaire à la transformation mais peut ne pas être dans sa forme pleinement étendue. Il est donc tentant d'établir un modèle qui utiliserait le pilus de type IV avec des modifications spécifiques pour la compétence, comme par exemple l'insertion du récepteur DUS, ComP et PilV dans la structure.

II B.2. b. ii La fixation de l'ADN dans le périplasme

De manière intéressante, un homologue de ComEA est présent chez *N. gonorrhoeae*, nommé ComE (Chen et Gotschlich, 2001). Cependant, l'organisation chromosomique est différente car on ne retrouve pas ce gène en opéron avec *comEC*. De plus, quatre copies chromosomiques identiques de ce gène sont retrouvées dans le génome de la bactérie. Il a été montré que seule la délétion des quatre gènes entraînait un phénotype nul en transformation, suggérant une redondance fonctionnelle des protéines (Chen et Gotschlich, 2001). ComE est également capable de fixer l'ADNdb sans spécificité de séquence. Les structures de ComEA et de ComE sont différentes car la protéine ComE ne possède que le site de fixation à l'ADN et n'est pas ancré dans la membrane (**figure 11**). Il est proposé que ComE fixerait l'ADN dans le périplasme après l'étape de fixation séquence spécifique. De plus, ComE pourrait être suffisant pour exercer une force qui guiderait l'ADN au travers de la membrane externe par analogie avec la protéine VirE2 du système de sécrétion de type IV (Grange et al., 2008). Des homologues à ComE sont présents chez d'autres bactéries à Gram négatif comme *Campylobacter jejuni* (Jeon et Zhang, 2007) ou *Pasteurella multocida* (Mullen et al., 2008).

Encadré 2- Origine commune du pseudo-pilus de compétence

Le pseudo-pilus de compétence présente de fortes analogies avec les systèmes de sécrétion de type II et des pili de type IV au niveau protéique et structural. Ces structures sont retrouvées chez des bactéries phylogénétiquement éloignées, suggérant que ces machineries devaient être présentes dans le génome de l'ancêtre commun et qu'elles auraient par la suite évolué selon l'espèce pour donner les différentes fonctions décrites actuellement.

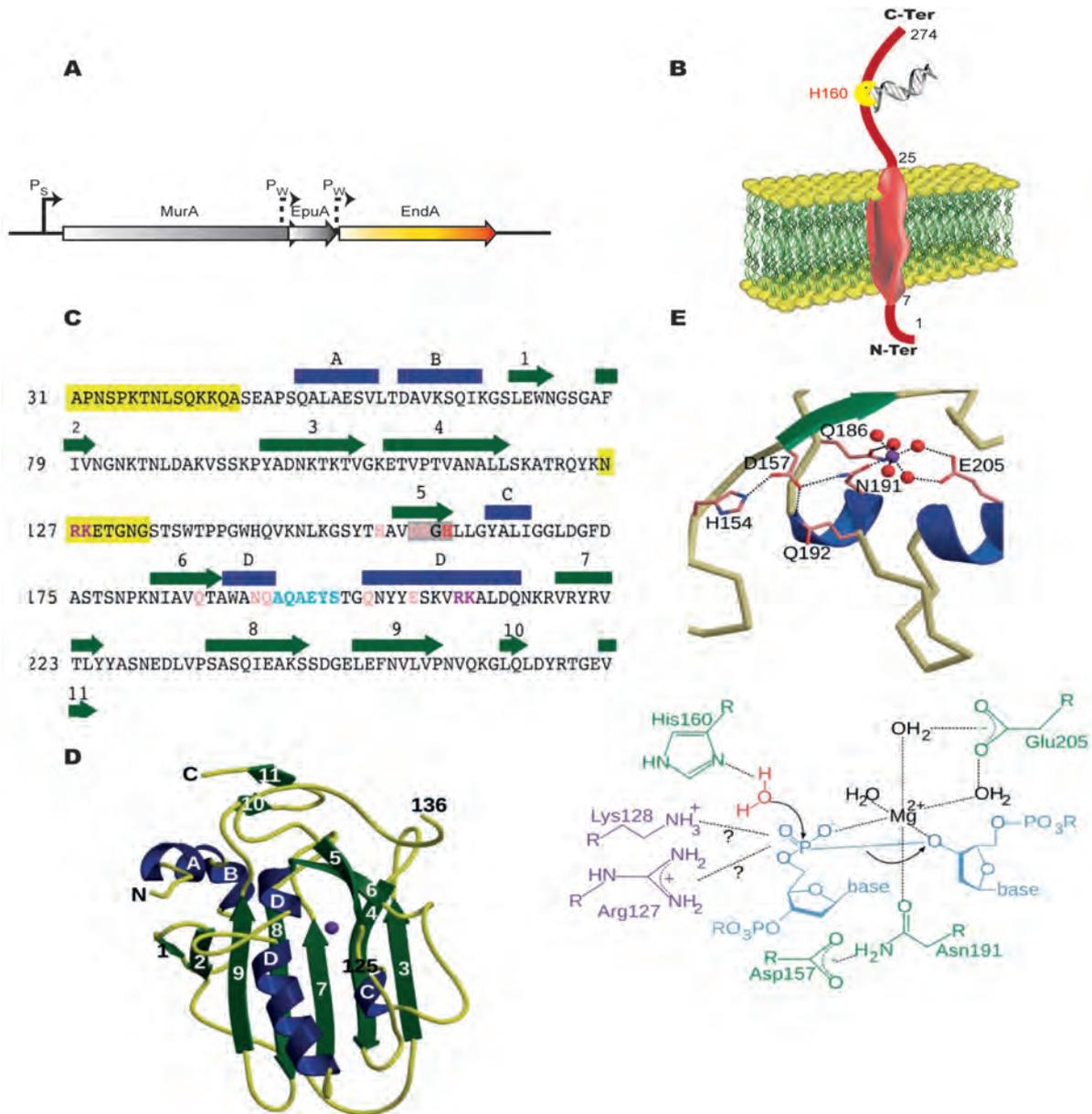


Figure 12- Structure et fonction de la nucléase EndA. A/ organisation chromosomique de l'opéron contenant endA. endA est le troisième et dernier gène de l'opéron qui ne contient pas de signature "cin box". D'après Puyet et al., 1990. B/ Représentation schématique de la topologie d'EndA. EndA possède un segment transmembranaire entre les acides aminés 7 et 25 puis son extrémité C-terminale portant l'activité nucléasique est à l'extérieur de la cellule. C/ Structure secondaire de la protéine EndA. Les hélices α (rectangle bleu) et les feuillets β (flèches vertes) sont montrés. Le site catalytique est surligné en gris et l'histidine catalytique est en rouge. D/ Structure tertiaire de la protéine EndA. La structure montre la face avant de la protéine. Les mêmes codes de couleur sont utilisés. E/ Mécanisme d'action de la nucléase EndA. Les figures C, D et E ont été réalisées d'après Moon et al., 2011.

II. B.3 Le passage de la membrane cytoplasmique

II. B.3. a Linéarisation de l'ADNdb

Chez *B. subtilis*, la nucléase membranaire NucA induite en compétence permet la maturation de l'ADNdb. Elle serait responsable du clivage initial de chaque brin d'ADN mais n'est pas responsable de la conversion de l'ADNdb en ADNsb (Provvedi et al., 2001). Son absence n'entraîne pas un déficit total de transformation, suggérant qu'elle n'est pas essentielle au processus de transformation mais qu'elle catalyse l'entrée de l'ADN en facilitant son transport. Son homologue chez *S. pneumoniae* n'a pas encore été identifié.

II. B.3. b EndA : conversion de l'ADNdb en ADNsb

Dans la plupart des modèles étudiés, aucune nucléase qui convertit l'ADNdb entrant en ADNsb n'a été identifiée dans le système. Cette enzyme clé permettant de délivrer le substrat de la recombinaison a été découverte uniquement dans un modèle, *S. pneumoniae*. Il s'agit de la nucléase majeure EndA dont la mutation entraîne une diminution de l'efficacité de transformation d'un facteur 100 à 1000 (Lacks et al., 1974; Puyet et al., 1990). EndA est impliquée dans le transport de l'ADN mais pas dans l'étape de fixation (**figure 9**). Historiquement, c'est un des premiers composants clés du Transformasome découvert (Claverys et al., 2009).

EndA est une protéine membranaire de 25kDa qui est constituée de deux domaines : la partie N-terminale qui est un segment transmembranaire et la partie C-terminale qui porte l'activité nucléase (**figure 12B**). Le mécanisme d'action d'EndA a été peu étudié, peut être à cause de la difficulté à travailler avec cette protéine (Puyet et al., 1990; Midon et al., 2010; Moon et al., 2011). Récemment, une stratégie a été développée pour définir la structure de cette protéine ainsi que son mécanisme d'action (Midon et al., 2010; Moon et al., 2011). EndA appartient à la famille des nucléases à motif DRGH proche de la nucléase d'*Anabaena*, de *Serratia marcescens* ou de l'endonucléase G mitochondriale. C'est l'histidine du motif DRGH, compris entre les feuillets $\beta 5$ et $\beta 6$ et l'hélice αD qui est responsable de la coupure double brin (**figure 12C et 12D**). D'autres acides aminés ont été déterminés comme indispensables à la coupure ou à la fixation de l'ADN. Ceci a permis d'établir un modèle de coupure de cette nucléase (**figure 12E**). EndA agit comme une endonucléase sans spécificité de substrat puisqu'elle est capable de dégrader l'ADN double brin comme l'ADN simple brin ou l'ARN *in vitro*.

Dans le processus de transformation, EndA constitue une exception dans le système. Contrairement à toutes les autres protéines du Transformasome, c'est la seule protéine qui n'est pas contrôlée par le σ^X et n'est donc pas induite en compétence (Dagkessamanskaia et

al., 2004; Peterson et al., 2004). *endA* est le troisième et dernier gène d'un opéron constitué des gènes *murA* et *epuA* dont le promoteur ne contient pas la signature "cin box". (**figure 12A**) (Puyet et al., 1990). En dehors de la compétence, une implication d'EndA dans la virulence de *S. pneumoniae* a été établie. Lors d'une infection au pneumocoque, les neutrophiles emploient plusieurs mécanismes comme la phagocytose ou la dégranulation pour lutter contre cette bactérie. Récemment, un troisième mécanisme a été mis en évidence : les pièges de neutrophile (NETs pour Neutrophil Extracellular Traps) (pour revue, Papayannopoulos et Zychlinsky, 2009). Ces structures sont composées de chromatine décondensée recouverte de granules et de protéines cytoplasmiques. Les NETs permettraient de piéger les bactéries qui ne peuvent pas être phagocytées et de les tuer par un effecteur inconnu à l'heure actuelle. Un des moyens utilisé par différentes bactéries pour contourner ce moyen de défense est de dégrader ces matrices comme il a été montré pour le groupe A des streptocoques (Walker et al., 2007). *S. pneumoniae* utilise un mécanisme similaire dépendant de la présence de la nucléase EndA (Beiter et al., 2006). En clivant ces pièges d'ADN, EndA permet à *S. pneumoniae* d'échapper à la réponse immune lors d'une infection chez l'homme, permettant ainsi à la bactérie de se multiplier. Cependant, le mode d'action d'EndA pour dégrader ces pièges d'ADN n'est pas connu actuellement. Un mécanisme actif de dégradation doit être mis en place car lors de la transformation, EndA n'a pas un accès direct à l'ADN (Bergé et al., 2002).

Le mécanisme de recrutement d'EndA en compétence n'est pas connu bien que certains contextes génétiques nécessaires à son recrutement aient été déterminés (Bergé et al., 2002). Pour cela, le suivi de l'ADN transformant a été réalisé en mesurant sa fixation, sa dégradation et son entrée en utilisant un ADN radioactif. La dégradation du brin non transporté est abolie en l'absence de ComGC ou ComGA, donc la présence du pseudo-pilus est indispensable pour que EndA ait accès à l'ADN en accord avec sa localisation membranaire. De plus, la dégradation est également abolie en l'absence de ComEA, suggérant que ComEA pourrait délivrer l'ADN double brin à EndA. En revanche l'ADN est toujours dégradé en l'absence de ComEC ou ComFA suggérant que le pseudo-pilus et le récepteur de l'ADN fonctionnent de manière indépendante au système de translocation de l'ADN.

II. B.3. c Pénétration d'un brin d'ADN : le rôle de ComEC et ComFA

II B.3. c. i ComEC : le pore aqueux

A ma connaissance, toutes les bactéries naturellement transformables possèdent dans leur génome un homologue à la protéine ComEC. Par exemple, des homologues de la

protéine ComEC de *B. subtilis* sont présents chez *S. pneumoniae* (Campbell et al., 1998), *N. gonorrhoeae* (Facijs et Meyer, 1993), *H. influenzae* (Clifton et al., 1994) et *H. pylori* (Stingl et al., 2010).

comEC, troisième et dernier gène de l'opéron *comE* chez *B. subtilis* et deuxième gène chez *S. pneumoniae* code pour une protéine indispensable pour l'internalisation de l'ADN mais pas pour la capture de l'ADN (**figure 9**) (Inamine et Dubnau, 1995; Bergé et al., 2002). ComEC est une protéine de grande taille (746 acides aminés) avec de nombreux segments transmembranaires prédits. L'analyse de la topologie de ComEC, basée sur des activités de dosage de fusions reportrices a mis en évidence que les deux extrémités de la protéine étaient intracellulaires et qu'elle contiendrait deux boucles extracellulaires au cœur de la protéine. De plus, il a été montré que des ponts disulfures étaient présents dans la boucle N-terminale de la protéine, dont la formation est dépendante de l'oxydoréductase BcDBD et permettant de stabiliser la protéine (Draskovic et Dubnau, 2005). Cependant, les cystéines engagées dans ces ponts disulfures ne sont pas présentes chez *S. pneumoniae* et les homologues de *bcdB* et *bcdD* sont absents chez *S. pneumoniae* suggérant que ce pont disulfure jouerait un rôle structural uniquement chez *B. subtilis*.

Il est proposé que ComEC formerait un homo-dimère avec 14 segments transmembranaires créant un canal aqueux au travers de la membrane cytoplasmique dans lequel pourrait passer l'ADN (Draskovic et Dubnau, 2005). Des variations au niveau des boucles pourraient refléter des adaptations de la protéine aux différents partenaires qu'elle pourrait avoir selon l'espèce bactérienne considérée. Notamment, la boucle N-terminale serait différente entre les espèces pour s'adapter aux homologues du récepteur ComEA (ou ComE chez les bactéries à Gram négatif) qui peut être localisé dans l'espace périplasmique chez *N. gonorrhoeae* ou ancré dans la membrane cytoplasmique chez *B. subtilis*.

De manière intéressante, des prédictions bioinformatiques montrent que l'extrémité C-terminale de ComEC code pour un domaine métallo- β -lactamases (Pfam 00753). Ce domaine pourrait porter une activité catalytique sur l'ADN transformant lors de son entrée sous forme simple brin. Le rôle de ce domaine a été testé *in vivo* et *in vitro* chez *S. pneumoniae*. Bien qu'il soit capable de fixer l'ADNsb, aucune activité DNase n'a été mise en évidence. De plus, l'ADNsb entrant n'est pas stabilisé en l'absence de ce domaine, suggérant qu'il ne jouerait pas le rôle de la nucléase responsable de la dégradation de l'ADN dans le cytoplasme observé dans certains mutants ($\Delta recA$, $\Delta dprA$, $\Delta sssB$; voir ci après) (Attaiech, 2009).

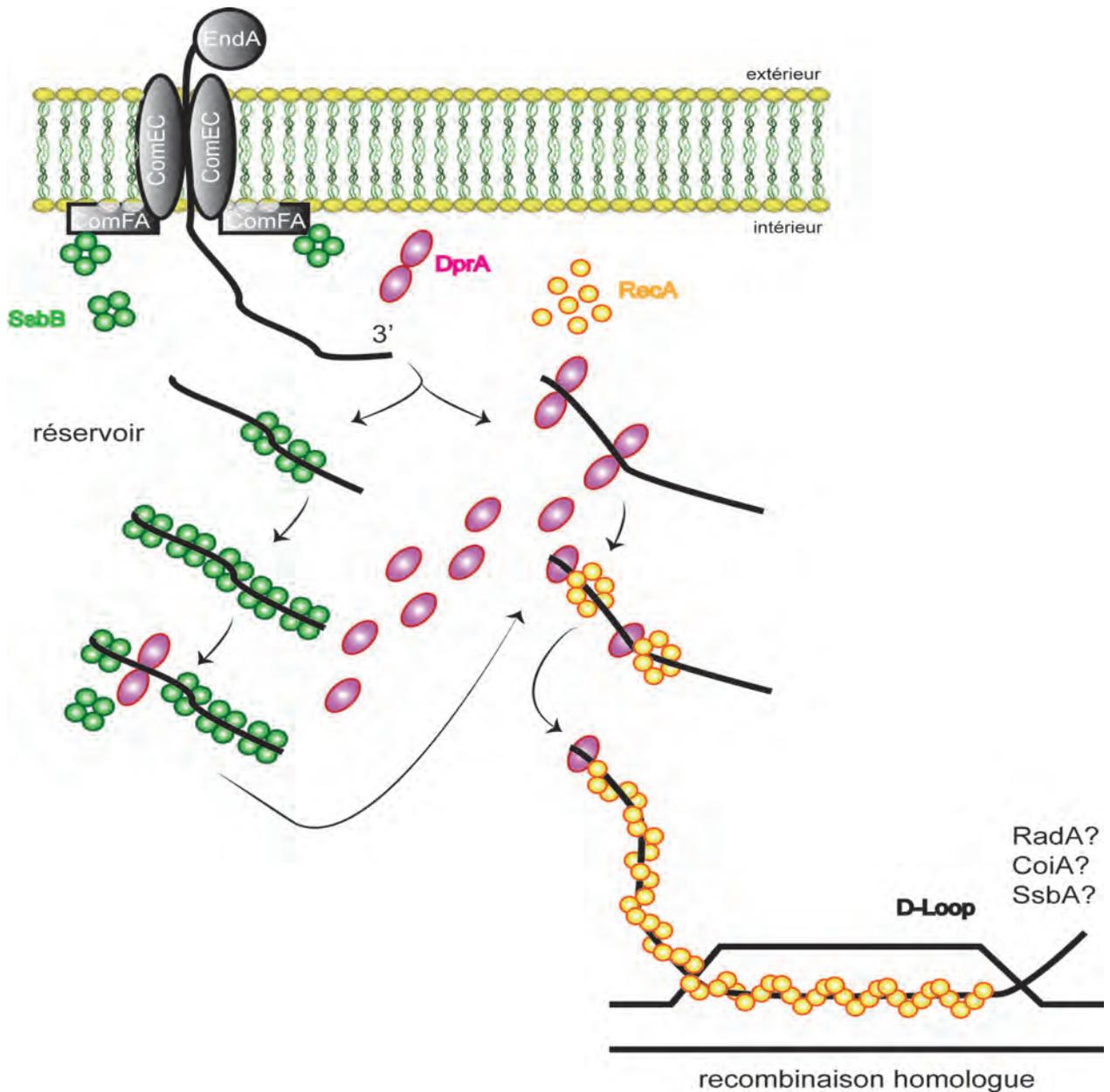


Figure 13- De l'internalisation à la recombinaison homologue. Une fois internalisé sous forme simple brin, l'ADN est pris en charge par SsbB, DprA et RecA. L'ADN peut alors suivre 2 voies, soit il est pris en charge par le complexe DprA-RecA pour être recombiné dans le chromosome de la bactérie si il y a homologie, soit l'ADN simple brin est protégé des nucléases par SsbB en attendant d'être pris en charge par le complexe pré-synaptique. Le rôle de CoiA et RadA n'est pas encore compris ainsi que celui de SsbA. D'après Claverys et al., 2009.

Encadré 3- ComEC, la signature des bactéries naturellement transformables

Toutes les bactéries naturellement transformables étudiées jusqu'à présent possèdent dans leur génome un homologue à *comEC* de *B. subtilis*. Ceci suggère que l'ancêtre commun des bactéries à Gram positif et à Gram négatif devait posséder dans son génome ce gène. Pour identifier de nouvelles espèces transformables, la présence de ce gène dans le génome de la bactérie en question est un bon critère.

II B.3. c. ii ComFA : un moteur pour tirer l'ADN

Une protéine appartenant à la famille des translocases/hélicases ARN/ADN à motifs DEAD, ComFA, est induite en compétence que ce soit chez *B. subtilis* ou *S. pneumoniae*. La délétion de ComFA n'a pas d'impact sur la fixation ou la conversion de l'ADNdb en ADNsb (Bergé et al., 2002). Bien que l'ADN soit toujours fixé, cette délétion entraîne une perte totale d'entrée de l'ADN chez *S. pneumoniae* (**figure 9**) (Bergé et al., 2002) et une diminution de transformabilité d'un facteur 1000 chez *B. subtilis* (Londoño-Vallejo et Dubnau, 1993). La sur-expression de la protéine entraîne également un effet négatif en transformation, suggérant que la stœchiométrie du système est importante (Londoño-Vallejo et Dubnau, 1994). Les hélicases de cette famille sont actives en monomère ou en dimère (Cordin et al., 2006).

La quantité de ComFA est diminuée dans un mutant *comEC*, suggérant une stabilisation de ComFA par ComEC par une interaction protéine-protéine (Kramer et al., 2007). Son activité prédite de translocase, sa localisation membranaire ainsi que son phénotype en transformation en font un candidat idéal pour jouer le rôle de pompe qui entrainerait l'ADN à l'intérieur de la cellule. Chez *S. pneumoniae*, ComFA est en opéron avec ComFC et chez *B. subtilis*, ComFA est en opéron avec ComFB et ComFC. La délétion de ComFC engendre un déficit de transformation, mais aucun rôle ne lui a encore été attribué.

De manière étonnante, aucun homologue de ComFA n'est retrouvé chez les bactéries à Gram négatif. Une hypothèse envisageable est qu'une autre translocase puisse jouer ce rôle. Cette translocase pourrait être induite en compétence ou la cellule pourrait recruter une translocase constitutive pour l'intégrer dans son système de transformation (Kline et Seifert, 2005).

II. B.4 Le devenir de l'ADN dans la cellule

II. B.4. a Un système de recombinaison dédié à la transformation

La recombinaison universelle RecA est essentielle au processus de transformation puisque sa délétion ne permet plus l'intégration de l'ADN dans le chromosome de la bactérie. Chez le pneumocoque, son absence entraîne une abolition totale de la transformation (Bergé et al., 2003). RecA permet de catalyser la recherche d'homologie et les échanges de brins nécessaires pour la recombinaison (pour revue, voir Forget et Kowalczykowski, 2012; Hiom, 2012). RecA, bien que présente à un niveau basal dans les cellules du pneumocoque, est induite 4 et 5 fois lors de l'induction de la compétence. L'absence d'induction de ce gène se traduit par une diminution de 20 fois de la transformation par rapport à une souche sauvage. Tout le système est mis à intégrer une recombinaison dans une machinerie spécialisée de la transformation (**figure 13**).

L'absence de DprA, protéine induite en compétence, ne permet plus la recombinaison homologe (**figure 9**) (Bergé et al., 2002, 2003). Il a été montré que DprA interagit avec RecA, avec l'ADNsb et lève l'inhibition formée par SsbB (paralogue de SsbA), montrant que cette protéine est une RMP (Recombinaison Mediator Protein) spécifique de la transformation (Mortier-Barrière et al., 2007; Quevillon-Cheruel et al., 2012). Deux protéines exprimées en compétence, codées par les gènes *coiA* et *radA* sont aussi impliquées dans le processus de recombinaison (Burghout et al., 2007; Desai et Morrison, 2007). Elles agissent aux étapes terminales du processus mais leur rôle reste à définir. Il semble donc qu'une machinerie spécialisée pour la recombinaison homologe soit mise en place durant la compétence (**figure 13**).

II. B.4. b Le complexe d'éclipse

Si l'ADN entrant n'est pas protégé par des protéines, il est rapidement dégradé par une (des) nucléase(s) inconnue(s) (Bergé et al., 2003). La plupart des travaux exposés proviennent de *S. pneumoniae*. L'ADN entrant est pris en charge par un complexe protéique nommé "complexe d'éclipse" qui permettrait d'augmenter la résistance à différentes nucléases, entre 50 et 1000 fois selon la DNase considérée (Morrison et Mannarelli, 1979). Lorsque cet ADN est extrait des cellules qui viennent juste d'être transformées et qu'il sert d'ADN donneur pour une nouvelle transformation, l'efficacité de transformation est très faible. Il a ensuite été établi que l'ADN du complexe d'éclipse était sous forme simple brin, qui n'est pas le bon substrat de la transformation, entraînant le déficit observé (Fox et Hotchkiss, 1960). Il a été montré qu'une partie du complexe d'éclipse pouvait effectivement être un intermédiaire dans le processus d'intégration avant la recombinaison homologue

(Vijayakumar et Morrison, 1983). Le complexe d'éclipse contient la protéine SsbB (Morrison et al., 2007). SsbB est, avec SsbA, un des deux paralogues de la protéine SSB d'*E. coli*. Chez le pneumocoque, SsbA est exprimée de manière constitutive et code pour une protéine de ménage essentielle, tandis que SsbB est exprimée uniquement lors du développement de la compétence. SsbB est exprimée abondamment dans la cellule et pourrait permettre de couvrir jusqu'à 1,15Mb d'ADN simple brin (Attaiech et al., 2011), suggérant que SsbB pourrait jouer le rôle de réservoir de l'ADNsb entrant.

Etonnamment, un mutant Δ ssbB présente seulement, selon la concentration d'ADN donneur utilisée, un déficit de transformation maximum d'environ 15 fois par rapport à la souche sauvage (Attaiech et al., 2011) suggérant que d'autres protéines sont capables de protéger l'ADN entrant. En effet, il a été montré que deux autres protéines sont capables de protéger l'ADN entrant : RecA et DprA car en leur absence, l'ADN entrant est dégradé 1 minutes après l'entrée (Bergé et al., 2003).

Chez *B. subtilis*, de manière similaire au pneumocoque, deux paralogues de SSB ont également été identifiés. Cependant, la protéine de ménage SsbA est également induite (Berka et al., 2002; Hamoen et al., 2002). SsbA peut former des nucléofilaments avec SsbB sur de l'ADNsb, suggérant qu'elle pourrait avoir un rôle actif en transformation (Yadav et al., 2012). De manière intéressante, une seule SSB induite en compétence est retrouvée chez plusieurs bactéries à gram négatif comme *H. influenzae* (Redfield et al., 2005), *H. pylori* et *C. jejuni* (Lindner et al., 2004). Dans ce cas, on peut penser que le rôle de cette protéine est redondant à celui de SsbB (Claverys et al., 2009).

III. L'intégration du Transformasome au cours de la vie de la cellule

III. A Vers l'émergence d'une machinerie unique du Transformasome

III. A.1 Une localisation unique

La majorité des éléments impliqués dans l'internalisation et l'intégration de l'ADN dans le chromosome de la bactérie ont été identifiés et permettent d'établir un modèle fonctionnel du Transformasome (**figure 14**). Le but maintenant est de déterminer les interactions physiques et fonctionnelles entre les constituants pour déterminer la mécanistique de cette machinerie. Les avancées récentes de la microscopie à fluorescence ont permis durant les dernières années de montrer que la cellule bactérienne est hautement organisée avec un ciblage des protéines à des sites spécifiques de la cellule essentiel pour des processus tel que le placement du site de division et l'organisation du chromosome (pour revue, voir Shapiro et al., 2009; Rudner et Losick, 2010).

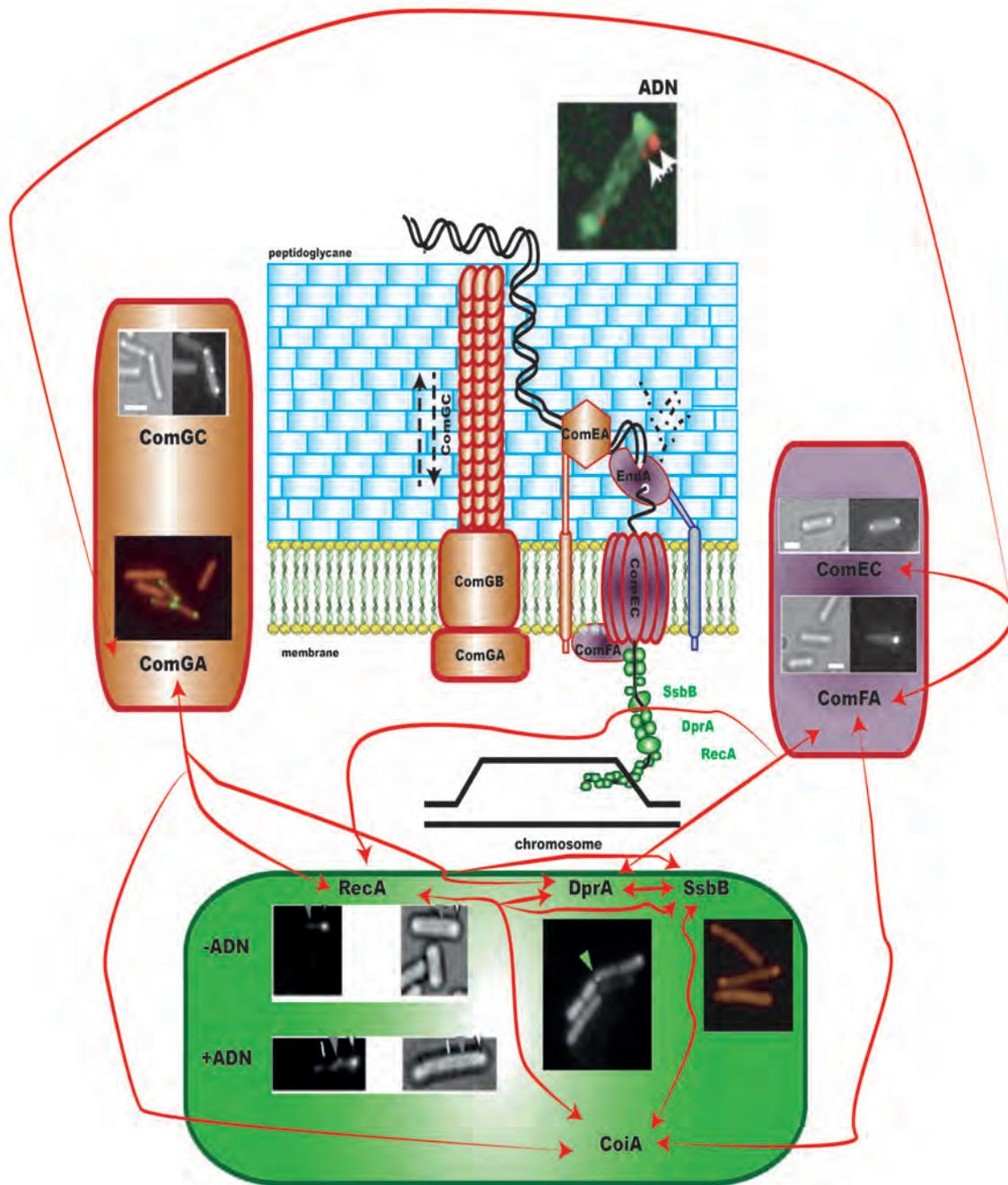


Figure 14- Localisation des composants du Transformasome chez *B. subtilis* et mise en évidence des interactions chez *B. subtilis* et *S. pneumoniae*. Les constituants du Transformasome ont été localisés par microscopie à fluorescence chez *B. subtilis* et montrent tous, excepté ComEA, une localisation polaire. De plus, des interactions montrés par différentes techniques comme le pull-down, l'immunoprécipitation, le double hybride ont été mises en évidence (flèches rouges). D'après Hahn et al., 2005; Kidane and Graumann, 2005; Kramer et al., 2007; Tadesse and Graumann, 2007; Claverys et al., 2009; Kaufenstein et al., 2011.

Les protéines du Transformasome, localisées par microscopie à fluorescence, s'accumulent au niveau des pôles des cellules compétentes de *B. subtilis* par un mécanisme de diffusion-capture (Hahn et al., 2005; Kidane et Graumann, 2005; Kramer et al., 2007; Tadesse et Graumann, 2007; Kaufenstein et al., 2011). Cependant, même si la protéine ComGA est localisée aux deux pôles, RecA est majoritairement localisée à un seul pôle, suggérant qu'un seul pôle est actif pour la transformation (Kaufenstein et al., 2011). De plus, la localisation de RecA en présence d'ADN exogène apparaît comme une structure en forme de comète connectée aux foci polaires qui s'étend dans le cytoplasme et dont la présence est nécessaire pour qu'il y ait transformation. Il est proposé que ces structures représentent la dynamique du nucléofilament RecA/ADNsb qui scannerait le chromosome pour rechercher une éventuelle homologie (Kidane et Graumann, 2005). Ces observations suggèrent que le fonctionnement des sous-ensembles du Transformasome est coordonné dans le temps et l'espace, c'est à dire au niveau des pôles. Cependant, de manière étonnante, la localisation du récepteur de l'ADN double brin ComEA montre une distribution de la protéine à plusieurs endroits distincts dans la membrane (Hahn et al., 2005; Kaufenstein et al., 2011). Les auteurs proposent que ComEA pourrait charger l'ADN tout autour de la membrane. Cette hypothèse est pourtant en désaccord avec des expériences de marquage d'un ADN fluorescent qui suggèrent que la fixation de l'ADN se fait au niveau des pôles des cellules compétentes (Hahn et al., 2005). Si ces observations constituent une présomption intéressante quant à l'existence du Transformasome, elles ne sont pas suffisantes car elles ne sont généralement accompagnées d'aucune donnée fonctionnelle (présence d'ADN transformant) ou cinétique.

Cependant, en plus des localisations similaires, des interactions entre différentes protéines du Transformasome ont été identifiées chez *B. subtilis* mais également chez *S. pneumoniae* par diverses méthodes comme le FRET (Kramer et al., 2007), la stabilité de protéines en contexte mutant (Kramer et al., 2007), le double hybride bactérien (Mortier-Barrière et al., 2007) et des expériences d'immuno-précipitation (Quevillon-Cheruel et al., 2012) (**figure 14**). Bien que beaucoup d'interactions aient été démontrées entre les protéines solubles ou associées à la membrane, on peut noter que la partie membranaire est la moins bien connue du système. L'ensemble de ces études suggère que les protéines du Transformasome forment une machinerie unique dans la cellule.

Peu d'expériences équivalentes ont été réalisées sur les bactéries à Gram négatif. Une étude a permis de montrer que l'ADN était également fixé au niveau du pôle chez *H. pylori* (Stingl et al., 2010). Cependant, l'ADNdb marqué s'accumule dans le périplasme et ne peut franchir que la membrane externe. Cette démonstration indirecte ne permet pas de dire si le passage de la membrane interne s'effectue également aux pôles. Ces expériences ont

permis de montrer que plusieurs sites de fixation étaient actifs en même temps dans une cellule pour la transformation.

III. A.2 La délocalisation du complexe

Chez *B. subtilis*, la délocalisation des protéines du Transformasome est un mécanisme actif. En effet, il est proposé que les protéines du Transformasome soient dégradées par un complexe protéolytique formé par McsA/McsB et ClpP, en complexe avec ClpC ou ClpE (Hahn et al., 2009). On peut noter que les cinétiques de délocalisation sont différentes selon les protéines considérées. Ceci suggère que chaque sous unités du Transformasome a une régulation temporelle qui lui ait propre.

III. A.3 Est ce que les étapes sont couplées

Bien que toutes les protéines du Transformasome semblent localisées au même endroit dans la cellule chez *B. subtilis*, est ce que cela implique forcément que leur fonctionnement est dépendant les unes des autres ?

Chez *S. pneumoniae*, le suivi de l'ADN montre que la dégradation de cet ADN s'effectue en l'absence des protéines du pore d'entrée (ComEC et ComFA) (Bergé et al., 2002). D'autre part, la fixation et la dégradation de l'ADN ont bien lieu lorsque les protéines solubles de la recombinaison sont absentes. Chez *B. subtilis*, ComEA est capable de fixer l'ADN en l'absence du pseudo-pilus sur des protoplastes. Enfin, chez *H. pylori*, l'ADN peut franchir la membrane externe même si l'ADN ne peut pas être internalisé dans le cytoplasme de la bactérie (Stingl et al., 2010).

Tous ces éléments suggèrent que bien qu'elles fonctionnent au même endroit dans la cellule, les sous unités sont capables de fonctionner indépendamment les unes des autres.

III. B Un lien entre la transformation et le cycle cellulaire

Le développement de la compétence chez *S. pneumoniae* s'effectue en milieu de phase exponentielle de croissance et s'accompagne d'un blocage transitoire de croissance. Chez *B. subtilis*, la compétence se développe au début de la phase stationnaire. De manière intéressante, chez *B. subtilis*, lorsque les cellules compétentes sont remises en culture, un retard de croissance et de division est également observé. Ce phénomène est la résultante de deux mécanismes. Dans un premier, le ralentissement est causé par la protéine ComGA qui empêcherait la formation de l'anneau FtsZ (Haijema et al., 2001), GTPase permettant d'assembler le divisome indispensable au processus de cytotocinèse (pour revue, voir Kirkpatrick et Viollier, 2011; Lutkenhaus et al., 2012). ComGA permet également de séquestrer Maf, une protéine conservée induite en compétence. Lors de la fermeture de la

compétence, ComGA est inactivée par un mécanisme inconnu et libère Maf. Maf est une protéine conservée qui inhibe la division cellulaire (Butler et al., 1993), jouant un deuxième point de contrôle de la division.

Des interactions entre Maf et deux protéines de la division DivIVA et FtsW ont été détectées (Briley Jr et al., 2011b). DivIVA s'accumule au niveau du site de division et des pôles cellulaires en fonction de la courbure des membranes (Lenarcic et al., 2009; Ramamurthi et Losick, 2009). DivIVA permet de former un piège pour plusieurs protéines fonctionnant au niveau du site de division cellulaire ou des pôles comme par exemple le système MinCD (Edwards et Errington, 1997). DivIVA permettrait de localiser Maf au niveau du site de division qui pourrait alors interagir avec FtsW, mécanisme par lequel la division serait bloquée. FtsW assure la translocation du lipide II, précurseur du peptidoglycane, au travers de la membrane (Mohammadi et al., 2011). Il est proposé que Maf, au niveau du site de division, inhibe l'activité de FtsW et donc bloque le processus de septation lors de la division cellulaire. Dans le cadre de la compétence chez *B. subtilis*, l'inhibition de la division par Maf est inactivée par un mécanisme inconnu pour permettre la reprise du cycle cellulaire.

Bien que très conservée chez les bactéries à Gram positif (Hamoen, 2011), un homologue de Maf est absent chez *S. pneumoniae*, suggérant que le mécanisme de blocage de division lors de l'induction de la compétence est différent entre les deux bactéries. D'autre part, aucune étude n'a montré de lien entre ComGA et la division chez *S. pneumoniae*.

Encadré 4- Est ce que les arrêts de division passent toujours par une inhibition de l'anneau FtsZ ?

En réponse à des stress génotoxiques, un arrêt de division est souvent observé qui peut se traduire par une inhibition de la formation de l'anneau FtsZ, protéine cruciale pour la division. Par exemple, dans la réponse SOS, SulA inhibe la polymérisation de FtsZ. Mais est ce que d'autres points de contrôles, ne passant pas par FtsZ, servent à bloquer la division ?

L'exemple présenté ci dessus montre deux mécanismes pour inhiber la division cellulaire. L'un passe par ComGA empêchant la polymérisation de FtsZ, un mécanisme identique au SOS. L'autre passe par une protéine conservée, Maf, qui inhiberait l'activité de FtsW. D'autres exemples apparaissent dans la littérature comme la protéine SidA chez *Caulobacter crescentus*. Cette protéine membranaire permet de bloquer la division cellulaire en se fixant à FtsW (Modell et al., 2011). Cette inhibition ne passe pas par une déstabilisation de l'anneau septal mais par une modulation de son activité également. Chez *S. pneumoniae*, un blocage de division lors du déclenchement de la compétence est également présent alors que l'anneau septal est correctement formé (Nathalie Campo, communication personnelle), suggérant qu'il passe également par un mécanisme inhibant une activité d'une protéine de la division (chapitre II).

Il est possible qu'il soit plus facile d'inhiber l'action d'une protéine plutôt que de démanteler l'anneau septal déjà formé. On peut imaginer que chez *S. pneumoniae*, un tel mécanisme soit préférable pour permettre un blocage de division très court lors du développement de la compétence qui ne dure que 20 minutes

IV. Projet de thèse et organisation des résultats

Mon projet de thèse concerne l'étude de l'assemblage fonctionnel du Transformasome chez le pneumocoque. Il s'agit de caractériser la mise en place du complexe de transport de l'ADN transformant. Je me suis focalisé principalement sur la nucléase du système identifiée uniquement chez *S. pneumoniae*, EndA. Il est important de rappeler qu'EndA est la seule protéine du système dont l'expression n'est pas induite en compétence. Il est proposé qu'EndA soit associée à proximité du pore et que la dégradation d'un brin pourrait se produire par des clivages successifs lorsque l'ADN passe dans le site actif de la nucléase. De manière intéressante, EndA est recrutée au sein d'un complexe de 250kDa dans des cellules compétentes avec des partenaires non identifiés (Rosenthal et Lacks, 1980). Nous avons cherché, en particulier i) à définir un éventuel changement partenarial au cours de la compétence, ii) à localiser les molécules d'EndA directement impliquées dans l'internalisation de l'ADN transformant. Ce projet implique la mise en œuvre d'approches de biologie cellulaire et de biochimie, couplées à la génétique moléculaire. Le manuscrit est organisé en trois chapitres, les deux premiers présentant l'adaptation des approches pour l'étude du recrutement de la protéine EndA, et enfin, le dernier chapitre regroupe l'ensemble des résultats obtenus sur le recrutement d'EndA au cours du développement de la compétence.

La première partie de cette thèse présente une approche de biochimie pour caractériser les partenaires d'EndA en dehors et pendant la compétence. Cette approche a nécessité l'adaptation d'un protocole d'immuno-précipitation pour les protéines membranaires chez le pneumocoque.

La deuxième partie de cette thèse sera consacrée à l'adaptation de la vidéo-microscopie pour suivre le développement de la compétence par microscopie à fluorescence chez *S. pneumoniae*. Cette méthodologie a pu être intégrée à un projet du laboratoire qui a pour but d'étudier les arrêts de division lors de l'induction de la compétence. J'ai pu directement observer ce retard par un suivi de la protéine FtsZ, protéine indispensable à la cytokinèse, fusionnée à la GFP. Ces observations ont mis en évidence un retard du processus de septation lors de la première génération après induction de la compétence. Cette technique nous a également permis de montrer que EndA, localisée dans la membrane de cellules non compétentes, se concentre sous forme de foci dans des cellules compétentes.

Le troisième chapitre est consacré à l'étude du recrutement d'EndA observé par microscopie à fluorescence. Ces résultats sont présentés sous forme d'un manuscrit. Nos résultats montrent que le lieu d'internalisation de l'ADN transformant pourrait s'effectuer à la zone équatoriale chez *S. pneumoniae*.

Chapitre I

Capture de complexes protéiques membranaires chez le pneumocoque

I. Introduction

Pour identifier les liens fonctionnels existant entre les différents partenaires du Transformasome, nous avons cherché à établir le réseau d'interactions protéiques existant au sein de la machinerie d'entrée de l'ADN et de la partie soluble du Transformasome.

Il existe actuellement un grand nombre de méthodes pour identifier les partenaires d'une protéine donnée *in vivo* (par exemple, la co-immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse, le FRET) ou *in vitro* (le double hybride, la résonance des plasmons de surface (ou "Surface Plasmon Resonance" ou le pull-down) (pour revue Dziembowski et Séraphin, 2004; Kuroda et al., 2006). Chaque technique présente des avantages et des inconvénients. Cependant, les analyses *in vitro* nécessitent souvent de confirmer les interactions *in vivo* pour vérifier leur pertinence biologique.

L'approche du double hybride de levure est couramment utilisée au laboratoire en partenariat avec l'équipe de Philippe Noirot (INRA, Jouy-en-Josas) pour tester des interactions binaires entre plusieurs protéines de compétence solubles (protéines de régulation de la compétence et protéines solubles du Transformasome). Cette technique a permis de détecter en particulier une interaction directe entre les protéines DprA et RecA (Mortier-Barrière et al., 2007) et d'identifier les surfaces d'interaction entre ces deux protéines (Quevillon-Cheruel et al., 2012). Plusieurs composants du pore d'entrée (ComGA, ComEA, EndA, ComEC, ComFA) ont été testés par cette approche, mais aucune interaction entre ces protéines n'a pu être mise en évidence. Il est possible que la méthode du double hybride de levure ne soit pas adaptée pour l'étude des protéines membranaires. En effet, une interaction positive détectée en double hybride de levure suppose que l'interaction entre les deux protéines soit possible dans le noyau de la levure. Cette contrainte peut limiter la détection d'interaction avec des protéines ancrées ou intégrées à la membrane. Une alternative est le double hybride bactérien (Karimova et al., 1998). Cette méthode s'est avérée fructueuse pour déterminer l'interaction entre des protéines membranaires intégrales, notamment les protéines de la division chez *E. coli* (Karimova et al., 2005). Cependant, ce système pourrait ne pas être adapté pour l'étude du Transformasome puisque plusieurs protéines du pore d'entrée se sont révélées toxiques lors de leur expression chez *E. coli*, notamment la nucléase du système EndA (Puyet et al., 1990).

Nous avons choisi d'étudier l'assemblage multiprotéique du Transformasome par des techniques de co-immunoprécipitation permettant la capture de complexes *in vivo*. Parmi les avantages de ces méthodes figurent, en tout premier lieu, leur mise en œuvre dans l'hôte d'origine, la rapidité de leur exécution (limitant ainsi les pertes des partenaires de la protéine cible), et leur utilisation avec des protéines cytoplasmiques ou membranaires. Une technique

de purification par affinité en tandem dérivée du TAP-tag, le SPA-tag (Zeghouf et al., 2004; voir ci-dessous), est maîtrisée et validée au laboratoire pour analyser les complexes de protéines solubles du Transformasome. Cette méthode a permis en particulier de montrer que la protéine RecA interagissait avec la protéine DprA dans des cellules compétentes de *S. pneumoniae* (Quevillon-Cheruel et al., 2012). Cependant, au début de ma thèse, aucun protocole n'était disponible pour extraire des complexes de protéines membranaires chez le pneumocoque. Pour l'étude du pore d'entrée du Transformasome, j'ai adapté les protocoles disponibles au laboratoire en optimisant les étapes de lyse des cellules, de solubilisation des membranes, et de spécificité des étiquettes pour limiter la détection d'interactions non spécifiques.

II. Résultats

II. A Lyse cellulaire

Dans les protocoles de biologie moléculaire, le but de la lyse cellulaire est de "casser" les cellules pour en libérer le matériel nucléaire et protéique avant de poursuivre avec les étapes suivantes. La difficulté consiste à obtenir une lyse efficace pour libérer le matériel en quantité suffisante tout en maintenant l'intégrité des structures macromoléculaires. Les lyses mécaniques comme la sonication ont été proscrites au profit d'une lyse douce. En effet, la sonication peut engendrer des interactions artéfactuelles ou même induire la formation d'agrégats dans le lysat cellulaire. La lyse par choc osmotique, lyse douce, a été choisie comme une alternative intéressante pour garder l'intégrité des complexes.

La lyse par choc osmotique est obtenue par dilution des bactéries dépourvues de leur paroi (protoplastes) en milieu aqueux. En effet, la pression osmotique interne est contenue par le peptidoglycane de la paroi bactérienne. S'il est retiré, les bactéries forment des protoplastes, sensibles à la pression osmotique extérieure. La dégradation du peptidoglycane est assurée principalement par une enzyme, le lysozyme qui est une hydrolase acide permettant de catalyser l'hydrolyse des liaisons covalentes $\beta 1 \rightarrow 4$ glucosidique entre le N-acétyl-muramique et le N-acétyl-glucosamine, constituants majeurs du peptidoglycane bactérien. La sensibilité des bactéries au lysozyme est un des premiers moyens de défense utilisé par l'homme contre les bactéries (Wiesner et Vilcinskas, 2010). Cependant, le pathogène *S. pneumoniae* ne semble pas sensible à cette enzyme (Cottagnoud et Tomasz, 1993). En revanche, une lyse complète du pneumocoque est observée lorsque l'auto-lysine majeure du pneumocoque, LytA, est sécrétée (Howard et

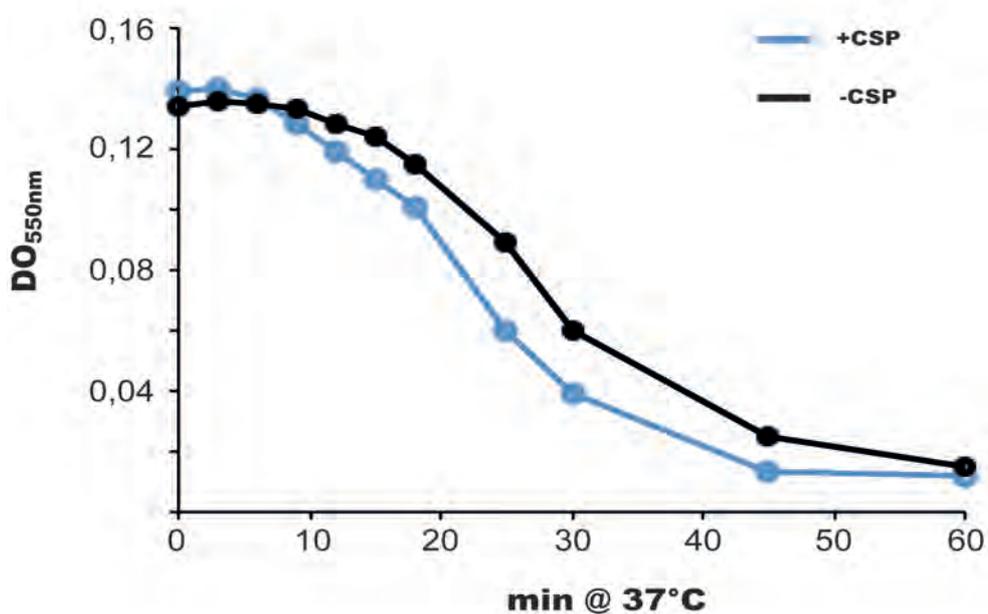


Figure 15- Suivi de la protoplastisation par diminution de la densité optique au cours du temps sur des cellules compétentes ou non compétentes. Un culot cellulaire est repris dans un tampon hypertonique permettant la protoplastisation des cellules. La formation des protoplastes est suivi par la sensibilité des cellules au choc osmotique en mettant les cellules au contact de l'eau qui se traduit par une diminution de la DO_{550nm} au cours du temps. Le suivi de la chute est réalisé dans une culture où la compétence a été induite (+CSP, courbe bleue) ou non (-CSP, courbe noire). On considère que la culture est complètement sous forme de protoplaste lorsque la DO_{550nm} est inférieure à 0,02.

Gooder, 1974). LytA est une amidase qui se fixe sur le peptidoglycane naissant, provoquant la lyse des cellules. En phase exponentielle de croissance, LytA est présente dans le cytoplasme des cellules et par conséquent inactive. En phase stationnaire, elle est sécrétée dans le milieu extérieur (Mellroth et al., 2012). Ceci explique l'autolyse observée en phase stationnaire dans les cultures de *S. pneumoniae*. En phase exponentielle, l'ajout dans le milieu de pénicilline (Tomasz et Waks, 1975), de déoxycholate (Goebel et Avery, 1929) et d'une solution hypertonique (Lacks et Neuberger, 1975) permettent la sécrétion de LytA.

Pour préparer des protoplastes de *S. pneumoniae* dans une culture en phase exponentielle, nous avons incubé les cellules à 37°C dans une solution hypertonique contenant 1M de sucrose, du tris-HCl, du MgCl₂ et du β-mercaptoéthanol. Pour suivre la protoplastisation dans la culture, nous avons mesuré la sensibilité au choc osmotique des cellules dépourvues de leur paroi qui se traduit par une chute de la densité optique lorsque la suspension bactérienne est mélangée avec de l'eau (**figure 15**). La chute de DO_{550nm} montre qu'il faut environ 45 minutes pour obtenir plus de 90% de cellules sous forme de protoplastes à partir d'une culture de cellules compétentes alors qu'il faut environ 60 minutes pour les former à partir d'une culture non compétente. Des résultats similaires ont déjà été décrits dans la bibliographie (Lacks et Neuberger, 1975; Seto et Tomasz, 1975), suggérant des différences physiologiques au niveau des parois des cellules compétentes et non-compétentes. Pour essayer d'accélérer le mécanisme de protoplastisation, différentes concentrations de déoxycholate ont été ajoutées mais aucun changement significatif n'a été remarqué.

Les protoplastes obtenus ont été incubés dans un milieu hypotonique. La lyse osmotique des protoplastes libère des vésicules membranaires et les composants du cytoplasme. Les vésicules membranaires montrent une orientation identique à celle des cellules entières (Konings et al., 1973). Les protéines solubles cytoplasmiques localisées à proximité des membranes dans la cellule peuvent par conséquent se retrouver emprisonnées dans ces vésicules. Pour étudier l'assemblage du pore d'entrée de l'ADN qui constitue un complexe multiprotéique ancré dans la membrane, nous avons isolé les vésicules membranaires (fraction insoluble) en les séparant du contenu cytoplasmique des cellules (fraction soluble) par une étape d'ultra-centrifugation.

II. B Solubilisation des complexes protéiques membranaires

La difficulté majeure de la solubilisation des protéines membranaires provient de leur propriété particulière de solubilité, assurée *in vivo* par les lipides de la membrane. Pour tenir compte de l'hydrophobicité intrinsèque de nombre des composants du pore d'entrée, le protocole d'extraction du complexe protéique comporte l'utilisation de détergents.

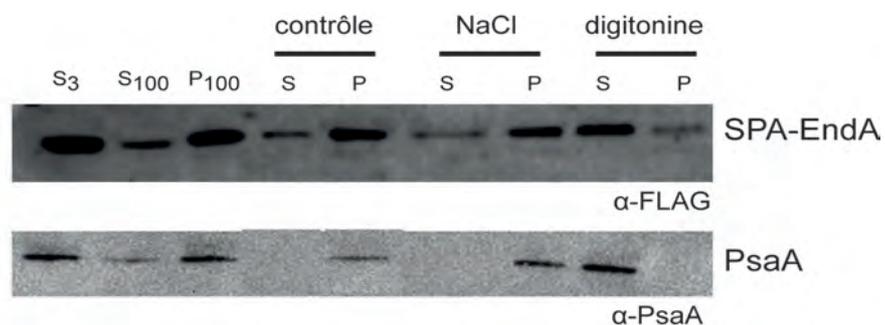


Figure 16- Fractionnement cellulaire de la souche exprimant la fusion SPA-EndA. A partir de vésicules membranaires préparées à partir de protoplastes (S₃), la fraction membranaire (P₁₀₀), séparée de la fraction soluble (S₁₀₀), puis incubée avec du tampon de resuspension ou du NaCl qui permet de solubiliser les protéines associées à la membrane ou de la digitonine. Après ultracentrifugation, le surnageant qui contient la fraction soluble (S) est séparée du culot (P). Les différentes étapes du fractionnement sont analysées par western blot avec un anticorps α -FLAG et α -PsaA. La protéine PsaA constitue un témoin de solubilisation des protéines membranaires.

Les détergents sont des molécules présentant un groupe polaire et un groupe non polaire. De par leur caractéristique à former des micelles dans un environnement aqueux, les détergents sont capables de solubiliser des protéines membranaires intégrales. Le choix d'un détergent est empirique. Cependant, il existe différentes classes de détergents (ioniques, non ioniques ou switterioniques). Les détergents ioniques, par exemple le SDS, sont des détergents forts qui rompent les interactions protéine-protéine et dénaturent les protéines. Les détergents non ioniques, au contraire, sont des détergents doux, non dénaturants. Ils se substituent aux lipides au contact des régions hydrophobes des protéines engagées dans des complexes sans perturber les interactions protéine-protéine.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un détergent doux non ionique, la digitonine, pour solubiliser les protéines contenues dans les vésicules membranaires. La digitonine est utilisée avec succès pour solubiliser les complexes de protéines membranaires chez *B. subtilis*, une autre bactérie à Gram-positif (Campo et Rudner 2006; Campo et al., 2008). Nous avons d'abord vérifié par des tests de fractionnement cellulaire que ce détergent était bien capable de solubiliser des protéines membranaires chez *S. pneumoniae* comme la fusion SPA-EndA (souche R2529) et la lipoprotéine PsaA. Il est à noter que PsaA, comme la plupart des lipoprotéines, ne contient pas de segment transmembranaire intégral, et se trouve simplement ancrée à la membrane cytoplasmique par une modification lipidique de son extrémité N-terminale (Lawrence et al., 1998).

Les vésicules membranaires obtenues à partir de protoplastes (S_3) ont été incubées en présence d'un tampon de solubilisation contenant de la digitonine. Après une deuxième étape d'ultracentrifugation, la fraction soluble (S_{100}) et non-soluble (P_{100}) ont été analysées par immunoblot (**figure 16**). Le résultat montre que la fusion est bien ancrée dans la membrane car elle n'est pas solubilisée par un traitement au NaCl qui permet de solubiliser les protéines associées à la membrane. En revanche, la majorité de la fusion SPA-EndA est solubilisée après une incubation avec la digitonine. Une proportion de cette fusion est cependant retrouvée dans la fraction non soluble. De même, le contrôle PsaA est majoritairement retrouvé dans la fraction insoluble (P_{100}) et est complètement solubilisé par la digitonine. La digitonine est donc capable de solubiliser les protéines membranaires testées et sera utilisée par la suite.

II. C Capture de complexes protéiques membranaires – Choix de l'étiquette

Le choix de l'étiquette utilisée est un paramètre important de l'immuno-précipitation. La spécificité de l'étiquette permet de diminuer le nombre de contaminants. De plus, un compromis est nécessaire pour trouver une étiquette dont la taille n'est pas trop importante favorisant une protéine de fusion fonctionnelle mais suffisamment exposée pour être

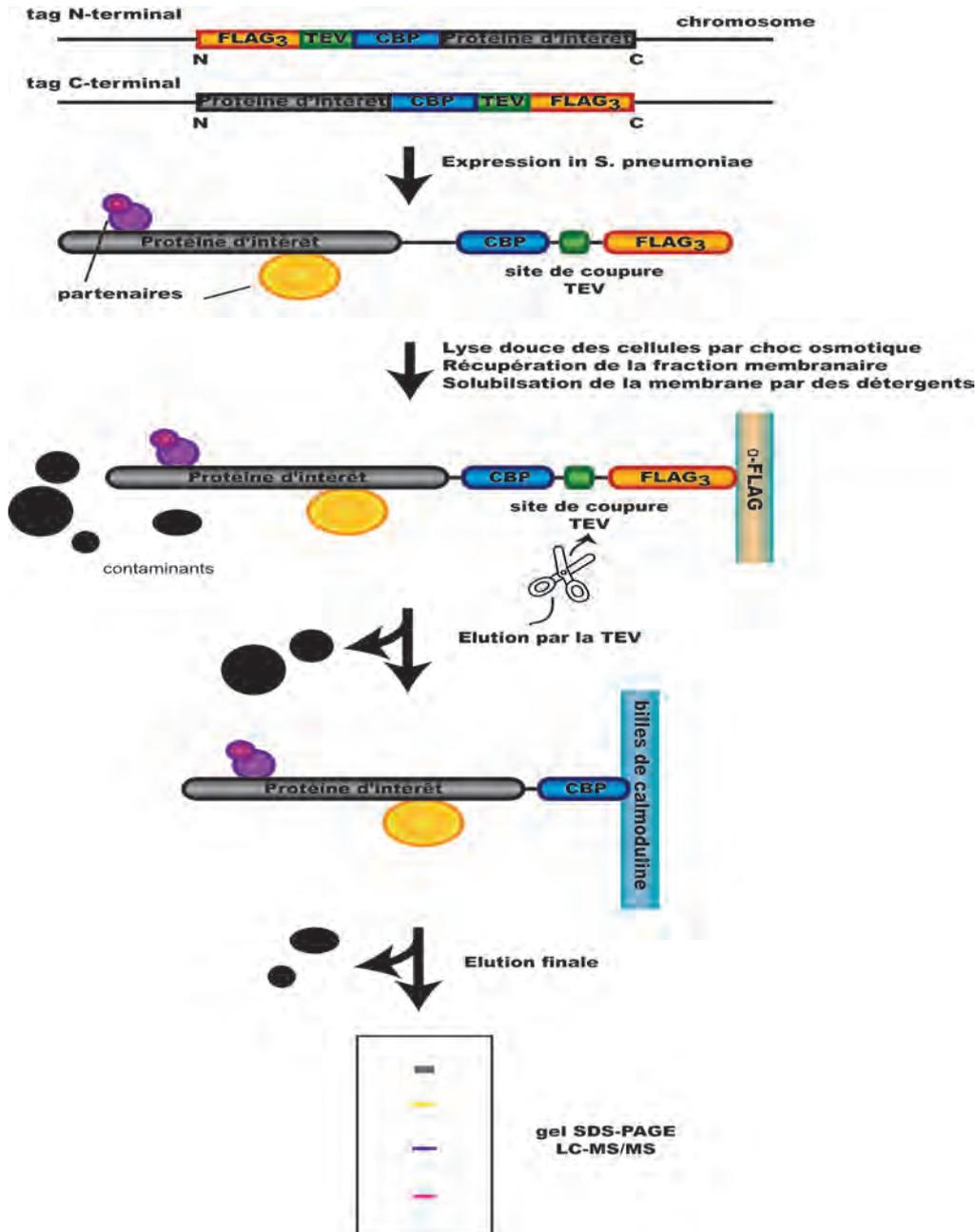


Figure 17- Représentation schématique de la purification des complexes en tandem (SPA-tag) adapté de Puig *et al*, 2001. La protéine d'intérêt est étiquetée avec un tag SPA à l'extrémité N ou C terminale. La fusion est exprimée *in vivo* chez *S. pneumoniae*. Les cellules sont ensuite transformées en protoplaste suivi d'une lyse par choc osmotique. La fraction membranaire est isolée et solubilisée par des détergents et incubée avec l'anticorps α -FLAG. L'étiquette FLAG va ainsi être retenue par la colonne. L'éluat est effectué par une coupure par la protéase TEV puis l'éluat est incubée avec des billes de calmoduline qui fixe spécifiquement le CBP. L'éluat est réalisé par compétition avec de l'EDTA. L'éluat est précipité puis les différents partenaires de la protéine d'intérêt sont séparés par électrophorèse sur un gel SDS-PAGE et identifiés par spectrométrie de masse (LC-MS/MS).

reconnue par l'anticorps. Nous avons développé deux stratégies basées sur deux étiquettes différentes, la méthode du SPA-tag et l'immuno-précipitation α -GFP.

II. C.1 Purification de complexes membranaires par la technique du Spa-tag

II. C.1. a Principe

Cette méthode de détection d'interactions protéine-protéine, appliquée récemment avec succès à 1000 protéines de la bactérie *E. coli* (Butland et al., 2005), est dérivée du "Tap-tag" (Rigaut et al., 1999). Elle permet la purification en deux étapes d'une protéine en interaction stable avec ses partenaires (**figure 17**). Pour cela, la protéine d'intérêt est d'abord fusionnée à un motif synthétique composé de deux étiquettes permettant une purification hautement sélective (respectivement la séquence de liaison à la calmoduline et un triplet de l'épitope de reconnaissance de l'anticorps monoclonal commercial anti-Flag) séparées par un site de coupure par la protéase TEV. Cette construction permet une purification par affinité sur un support spécifique de la première étiquette, suivie d'une libération par action de la protéase TEV, puis d'une re-capture immédiate de l'ensemble sur un support spécifique de la deuxième étiquette. L'identité des protéines du mélange élué de ce deuxième support est établie par spectrométrie de masse : soit après séparation des protéines du mélange sur gel dénaturant, coloration au bleu de Coomassie et traitement individuel de chaque bande protéique détectée (à l'aide d'un Maldi-ToF) ; soit par injection directe du mélange dans un LC-MSMS, qui sépare les composants puis les identifie par deux spectromètres de masse placés en tandem.

Chez le pneumocoque, le SPA-tag a été employé dans des conditions natives avec succès au laboratoire pour l'isolation de complexes constitués de protéines solubles uniquement (Quevillon-Cheruel et al., 2012). De plus, une étude récente utilisant cette technique a montré une interaction entre deux protéines membranaires, PcsB et FtsEX_{SP} (Sham et al., 2011).

II. C.1. b Application de la méthode du Spa-tag pour capturer le pore d'entrée

Pour mettre au point le protocole, nous avons choisi, dans un premier temps, de travailler dans des conditions de sur-expression de la protéine d'intérêt. Pour cela, nous avons construit deux fusions de la protéine EndA contenant l'étiquette SPA à l'extrémité N ou C-terminale et exprimées sous le contrôle d'un promoteur inductible en compétence (P_X). Ces fusions sont fonctionnelles en transformation (**figure 18**). L'expression de la fusion N-terminale a été vérifiée par immunoblot en utilisant un anticorps reconnaissant l'étiquette FLAG (**figure 19**). Il est à noter que la quantité de la protéine qui contient l'étiquette SPA à l'extrémité N-terminale (cytoplasmique) est plus élevée que celle de la fusion où

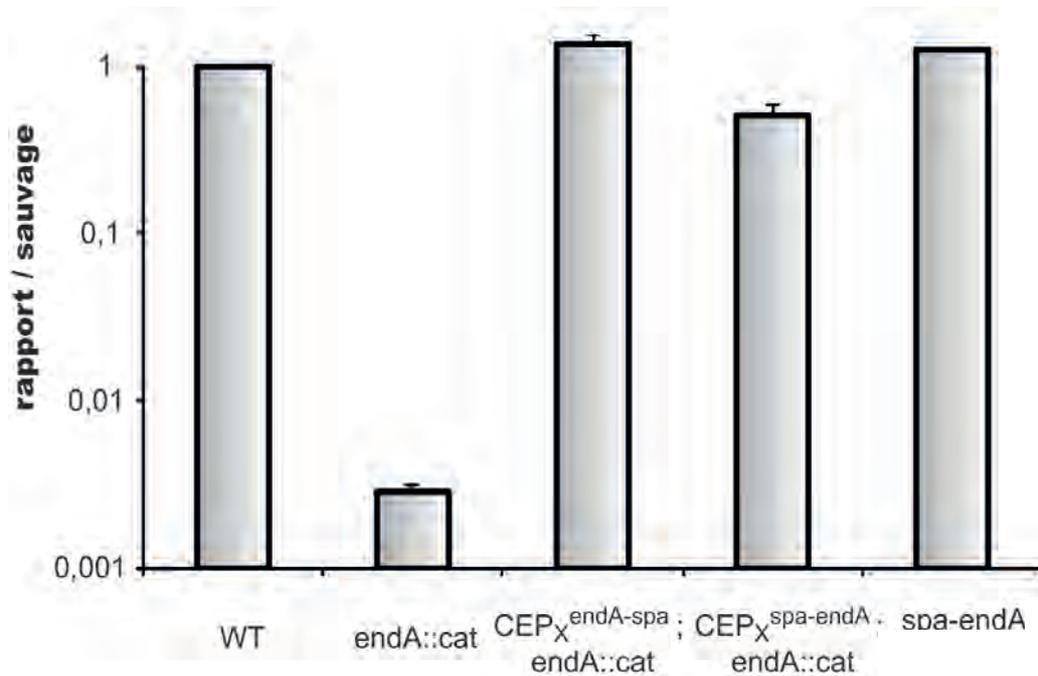


Figure 18- Les fusions EndA-SPA et SPA-EndA placées à CEP ou au locus naturel sont fonctionnelles en transformation. Des cellules compétentes exprimant les fusions ectopiques EndA-SPA (R2527) ; SPA-EndA (R2529) sous le contrôle du promoteur des gènes tardifs de compétence (P_X) à CEP et SPA-EndA (R2763) au locus naturel du gène sont mises en contact avec le l'ADN chromosomique conférant la résistance à la streptomycine (R304) pendant 20 minutes. Les transformants sont dénombrés. Les ratios du nombre de transformants des souches portant les fusions par rapport à la souche sauvage sont présentés. En contrôle, les transformants d'une souche Δ endA (R2811) sont montrés.

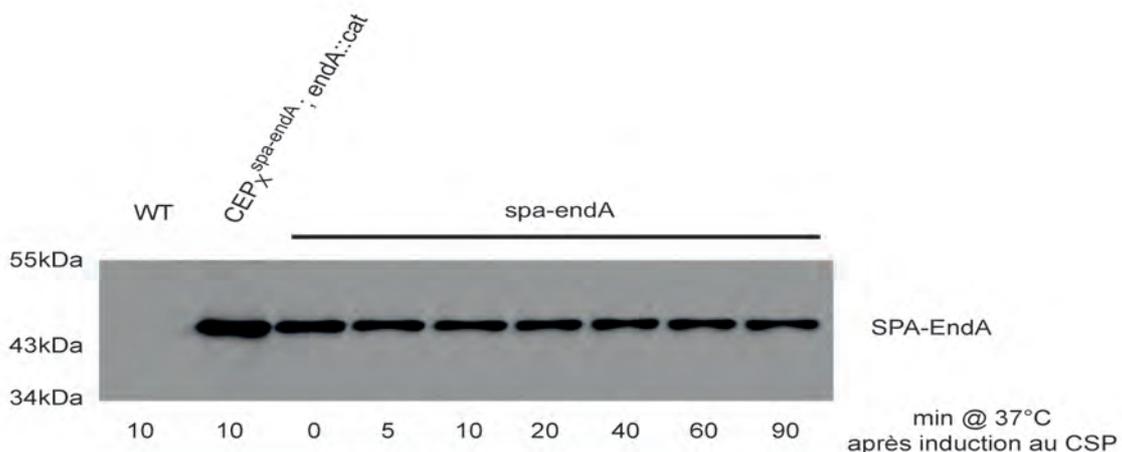


Figure 19- Vérification de l'expression des fusions EndA-SPA et SPA-EndA par immunoblot. Les extraits bruts, préparés à partir de la souche sauvage (WT) ou des souches exprimant la fusion ectopique SPA-EndA (R2529) sous le contrôle du promoteur des gènes tardifs de compétence (P_X) à CEP et SPA-EndA (R2763) au locus naturel du gène, sont réalisés à différents temps après l'induction de la compétence par du CSP (100ng.mL^{-1}). Le western blot est réalisé avec des dépôts à $\text{DO}_{550\text{nm}}$ constant et révélé par un anticorps α -FLAG.

l'étiquette est placée à l'extrémité C-terminale (extracellulaire) (résultat non montré). La capture de complexes protéiques à partir de vésicules membranaires solubilisées par la digitonine a été réalisée sur deux souches différentes : une souche contrôle ne codant pas d'étiquette SPA dans son génome et une souche contenant la protéine de fusion SPA-EndA. Les complexes purifiés ont été analysés sur gel SDS-PAGE colorés au Coomassie (**figure 20**). Le résultat montre plusieurs bandes contaminantes dans la piste correspondant à la souche contrôle. En revanche, pour la souche exprimant la fusion SPA-EndA, des bandes additionnelles aux contaminants observés pour la souche sauvage sont détectées, suggérant l'existence d'interactions spécifiques de protéines avec EndA. Ces bandes ont été découpées et analysées par spectrométrie de masse. La présence de protéines membranaires, de plus exprimées en compétence valide le protocole.

Il est bien connu que la surexpression de la protéine d'intérêt dans les expériences de capture de complexe entraîne souvent des interactions artefactuelles. Aussi, nous avons construit une souche produisant la protéine EndA étiquetée avec l'étiquette SPA sous ses propres signaux d'expression. Cette souche contient le gène qui code pour la protéine de fusion au locus naturel d'*endA*. L'expression de la fusion a été vérifiée à différents temps après l'induction de la compétence par immunoblot en utilisant un anticorps α -FLAG (**figure 19**). Comme attendu, EndA n'est pas surexprimée lors de l'induction de la compétence et son niveau reste stable au cours de la compétence. De plus, la fonctionnalité de la fusion a été contrôlée par un test de transformation. Alors qu'une souche mutée pour le gène *endA* présente un déficit de transformation de 100 à 1000 comme précédemment observé (Bergé et al., 2002), la souche exprimant la fusion SPA-EndA présente un pourcentage de transformation équivalent à celui de la souche sauvage (**figure 18**), montrant que la fusion SPA-EndA est fonctionnelle en transformation.

Pour analyser un changement éventuel de partenariat d'EndA lorsque les cellules développent la compétence, des expériences de SPA-tag sur la souche exprimant la fusion SPA-EndA ont été réalisées en parallèle à partir de cellules compétentes (au pic de transformation) ou non en suivant le protocole décrit ci dessus et présenté dans le matériel et méthodes. Les immuno-précipitats ont été déposés sur un gel d'acrylamide (**figure 21**) et les pistes entières ont été analysées par spectrométrie de masse (plateforme PAPPSO). Les peptides identifiés ont été comparés par rapport à la souche de *S. pneumoniae* R6 séquencée (Hoskins et al., 2001). La piste de la souche sauvage, n'exprimant aucun tag, a été également analysée pour éliminer le "bruit de fond" (contaminants). Parmi ces protéines, on trouve une phosphopyruvate hydratase (NP_358630.1), une protéine ribosomale (NP_357783.1) et RecA (NP_359349.1) en petite quantité.

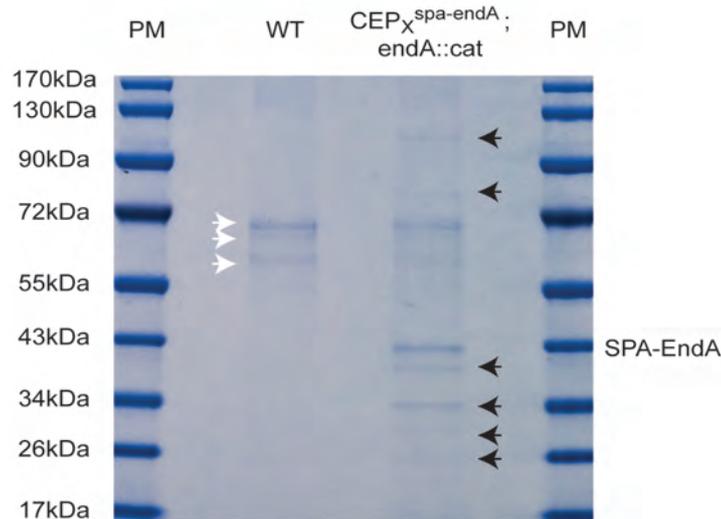


Figure 20- Capture des partenaires d'EndA exprimée sous le contrôle d'un promoteur inducible en compétence. La co-immunoprécipitation est réalisée à partir d'une souche sauvage (WT) ou d'une souche exprimant la fusion SPA-EndA exprimée en ectopique sous le contrôle d'un promoteur inducible en compétence (P_x) ($CEP_x^{spa-endA}$; $endA::cat$). Les cellules sont transformées en protoplaste, puis la fraction membranaire est solubilisée avec de la digitonine. La partie soluble est utilisée pour une purification en tandem. Les complexes sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE et le gel est coloré au bleu de Coomassie. Les bandes contaminantes (flèche blanche) et les bandes spécifiques (flèche noire) sont marquées.

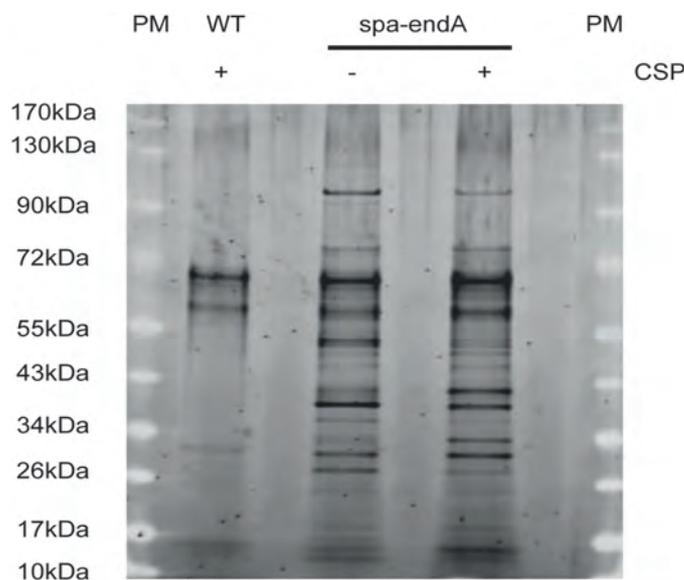


Figure 21- Purification des partenaires d'EndA dans des cellules compétentes ou dans des cellules non compétentes. La co-immunoprécipitation en tandem (SPA-tag) est réalisée à partir d'une souche sauvage (WT) ou d'une souche exprimant la fusion SPA-EndA sous ses propres signaux d'expression. La compétence est induite pendant 10 minutes (+CSP) ou non (-CSP). A partir de protoplastes, la fraction membranaire est récupérée puis solubilisée par la digitonine. La fusion SPA-EndA est purifiée en tandem et le précipitât est déposé sur un gel SDS-PAGE puis coloré au SYPRO orange. Les différentes pistes ont été analysées en spectrométrie de masse.

En dehors de la compétence, on peut noter que le partenariat spécifique d'EndA est assez pauvre malgré la présence de nombreux partenaires (**figure 21**). On peut retrouver la présence de protéines qui sont connues pour être des contaminants couramment retrouvés lors des co-immunoprécipitations, notamment SecA (Delumeau et al., 2011) ainsi que des protéines ribosomales.

On peut noter des évolutions dans le partenariat d'EndA 15 minutes après l'induction de la compétence (**figure 21**). Les protéines majoritairement identifiées sont impliquées dans la régulation de la compétence. Les protéines ComD (NP_359633.1) et ComA (NP_357637.1) ont été identifiées. Dans les cellules compétentes, EndA est également retrouvée en partenariat avec quelques protéines du Transformasome, ComGA (NP_359455.1) et RecA (NP_359349.1). En effet, alors que le nombre de peptides de RecA est équivalent dans la souche contrôle (non-taguée) et dans la souche non induite en compétence (6 et 7 respectivement), ce nombre augmente dans des cellules compétentes (13 peptides).

Cependant, les interactants directs que l'on pouvait attendre comme ComEA, ComFA ou ComEC n'ont pas été détectés. Trois hypothèses peuvent expliquer ce résultat i) il est possible qu'une minorité d'EndA soit recrutée au niveau du pore. Dans ce cas, les protéines du pore d'entrée interagissant avec EndA seraient minoritaires dans les complexes purifiés et par conséquent difficiles à détecter ii) le recrutement d'EndA au pore d'entrée pourrait être très transitoire et formerait un complexe avec le Transformasome peu stable iii) EndA ne serait pas un partenaire des protéines du pore et jouerait son rôle en transformation sans s'associer au complexe du Transformasome.

II. C.2 Purification de complexes membranaires par immunoprécipitation de fusions GFP

II. C.2. a Principe

L'immunoprécipitation nécessite d'avoir un anticorps très spécifique pour la protéine d'intérêt ou pour le tag auquel elle est fusionnée pour éviter de capturer des contaminants. Nous avons constaté que l'anticorps monoclonal anti-FLAG reconnaît de nombreuses cibles non spécifiques dans les extraits bruts de pneumocoques. Nous avons donc cherché à utiliser un autre tag. Nous avons choisi la protéine GFP pour plusieurs raisons. Bien que de taille supérieure à l'étiquette SPA (6kDa), l'étiquette GFP (30 KDa) ne semble pas affecter la fonctionnalité de la plupart des protéines auxquelles nous l'avons fusionné. La possibilité d'observer ces protéines par microscopie à fluorescence permet de réaliser en parallèle des expériences de localisation avec des expériences de capture de complexes. Enfin, l'utilisation d'un anticorps polyclonal α -GFP peut permettre une meilleure reconnaissance de

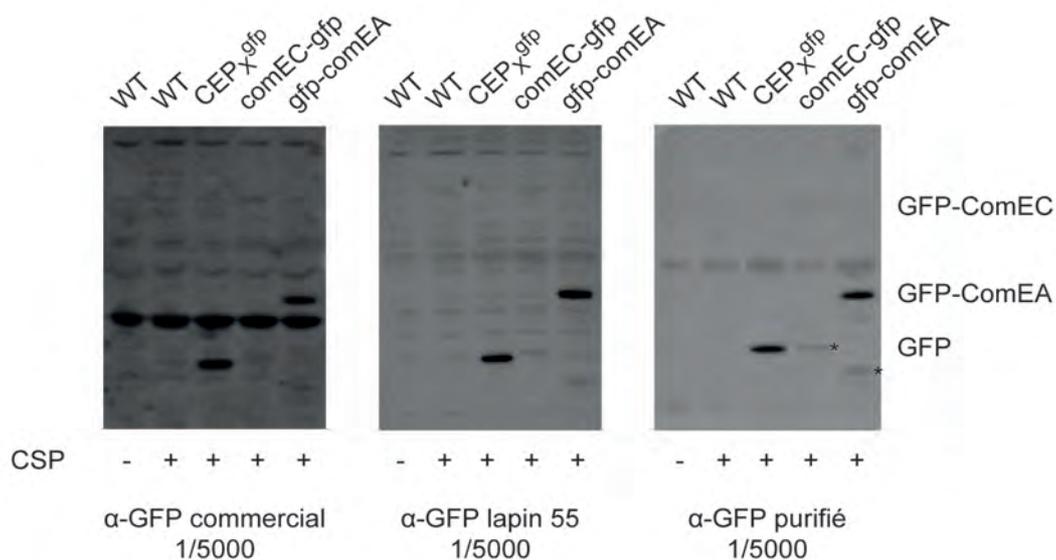


Figure 22- Comparaison anticorps α-GFP commercial ou “fait maison” sur des extraits bruts cellulaires de *S. pneumoniae*. Des extraits bruts sont préparés avec la souche sauvage (WT) induite en compétence (+CSP) ou non (-CSP), une souche exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur des gènes tardifs de compétence P_x (R2400) et deux souches exprimant les fusions ComEC-GFP (R2490) et GFP-ComEA (R2940). Ces extraits bruts sont déposés sur un gel SDS-PAGE et analysés par immunoblot avec un anticorps α-GFP commercial (partie gauche), α-GFP produit au laboratoire (partie centrale) et le même anticorps après purification par affinité (partie droite) au 1/5000^{ème}. Les traces de dégradation des fusions GFP sont représentées (*).

l'étiquette grâce à la fixation de plusieurs anticorps sur ses différents épitopes. Une étude publiée en 2005 a cependant montré que les anticorps α -GFP commerciaux étaient peu spécifiques et inadaptés pour les expériences d'immuno-précipitation (Cristea et al., 2005). Nous avons donc décidé de produire au laboratoire des anticorps dirigés contre la GFP. Pour cela, j'ai d'abord produit et purifié la protéine GFP.

II. C.2. b Préparation de la résine α -GFP

II C.2. b. i Production et purification de la GFP

Le gène codant la GFP avec un tag histidine à l'extrémité C-terminale a été placé dans le plasmide pET21d sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'IPTG. Ce plasmide a été utilisé pour transformer *E. coli*. Après avoir vérifié la solubilité de la protéine recombinante, la GFP a été purifiée par affinité à l'aide d'une colonne histidine puis par une chromatographie échangeuse d'anion (résultat non montré).

II C.2. b. ii Production et purification des anticorps α -GFP

La protéine purifiée a servi d'antigène pour infecter deux lapins différents. Suite à l'immunisation, les anticorps ont été récupérés puis purifiés par affinité avec la protéine GFP purifiée comme décrit dans le matériel et méthodes. Les différents anticorps ont été testés en western blot (**figure 22**). L'anticorps commercial reconnaît des bandes contaminantes, contrairement à l'anticorps produit au laboratoire, montrant que ce dernier est plus adapté pour les expériences de co-immunoprécipitation. L'anticorps purifié a ensuite été couplé à des billes recouvertes de protéine A comme décrit dans le matériel et méthodes pour générer une résine α -GFP utilisée dans les expériences de co-immunoprécipitation.

II. C.2. c Capture du pore d'entrée par immunoprécipitations de fusions GFP

Des captures à partir d'une souche exprimant la fusion GFP-EndA sous ses propres signaux d'expression ont été réalisées. Les cellules en culture ont été transformées en protoplaste puis les membranes ont été solubilisées par la digitonine de manière identique au protocole utilisé pour les expériences de SPA-tag. La fraction membranaire a été incubée avec la résine portant l'anticorps α -GFP. Les protéines composant l'immuno-précipitât ont été séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide.

Les différentes étapes de l'expérience ont été analysées par western blot en utilisant un anticorps α -GFP pour suivre la purification d'EndA (**figure 23**). EndA est retrouvée

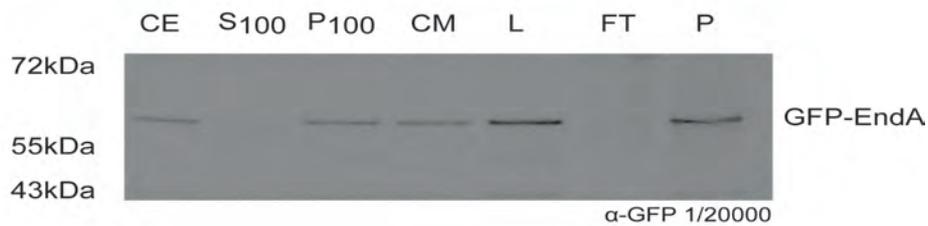


Figure 23- Suivi par immunoblot de la purification de la fusion GFP-EndA par co-immunoprécipitation α -GFP. Les échantillons de chaque étape de la co-immunoprécipitation sont analysés par western blot avec un anticorps α -GFP. Crude Extract (CE) : extrait protéique total ; S100 : fraction soluble après ultracentrifugation ; P100 : fraction membranaire après ultracentrifugation ; Crude Membrane (CM) : extrait protéique membranaire total ; Load (L) : extrait protéique membranaire après solubilisation ; Flow-Trough (FT) ; Purification (P).

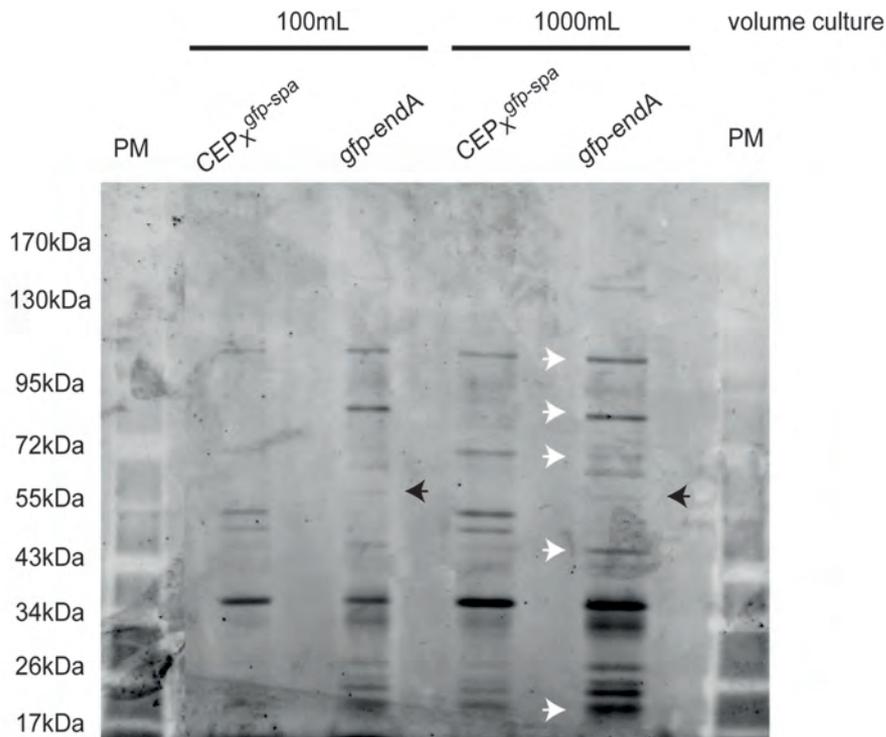


Figure 24- Purification des partenaires d'EndA en utilisant la co-immunoprécipitation α -GFP. La co-immunoprécipitation est réalisée à partir de culture de 100mL ou de 1000mL d'une souche contrôle exprimant la fusion GFP-SPA (R2400) ou d'une souche exprimant la fusion GFP-EndA (R2762) comme décrit dans le matériel et méthodes. La fusion GFP-EndA est marquée (flèche noire) et les partenaires identifiés lors du SPA-tag sont identifiés (flèche blanche).

principalement dans la fraction solubilisée par la digitonine (L), suggérant que ce détergent solubilise très bien cette protéine membranaire. Il est important de noter qu'EndA n'est pas détectée dans la fraction non retenue par la résine (flow-trough, FT) montrant que toute la fusion a été capturée par la résine. Enfin, EndA est présente dans l'immuno-précipât (P).

L'immuno-précipât séparé par électrophorèse a également été coloré au sypro orange (**figure 24**). Les bandes détectées n'ont pas été analysées par spectrométrie de masse mais on peut noter que le profil obtenu est similaire à celui obtenu par la technique du SPA-tag suggérant que les partenaires sont identiques. Nous avons remarqué que les profils de capture obtenus avec l'équivalent de 100mL et 1L de culture sont similaires. Cette technique permet donc de diminuer les volumes de culture utilisés pour purifier EndA par la technique du Spa-tag. Au final, cela permet aussi de diminuer la quantité de contaminants.

II. D Solubilisation des constituants du pore d'entrée

De manière surprenante, aucune des protéines membranaires du pore d'entrée n'a été identifiée lors des captures des partenaires d'EndA. Nous avons alors tenté de réaliser des captures de complexes à partir de souches exprimant les fusions de GFP-ComEA et ComEC-GFP. Comme décrit ci-dessus, des protoplastes ont été préparés à partir de cellules compétentes et des vésicules membranaires ont été isolées après lyse hypotonique. La solubilisation de ces vésicules membranaires par la digitonine mais aussi d'autres détergents doux (DDM et Triton X₁₀₀) montre qu'aucun de ces détergents n'est capable de solubiliser la protéine GFP-ComEA alors que PsaA, témoin de solubilisation de protéines membranaires, est solubilisée (**figure 25**). Des résultats similaires ont été obtenus avec la fusion ComEC-GFP suggérant que aucun des détergents testés ne permet de solubiliser la fraction membranaire du Transformosome.

Le choix d'un détergent est empirique, c'est pourquoi nous avons essayé de solubiliser la fusion par une batterie de détergents. La fraction membranaire d'une culture a été incubée avec 13 détergents différents et les résultats obtenus sont présentés (**figure 26**). Dans la majorité des cas, GFP-ComEA est retrouvée dans la fraction insoluble. Cependant, on peut noter que deux détergents sont capables de solubiliser en petite quantité la fusion : le lauryldiméthylamine-oxide (LDAO) et le Brij 35.

Ces deux détergents permettent une solubilisation partielle des protéines du pore d'entrée du Transformosome. Pour augmenter le rendement de solubilisation, nous avons tenté d'optimiser trois paramètres i) le ratio entre la concentration de protéine et de détergent ii) la température d'incubation et iii) le temps d'incubation de la protéine avec le détergent. Les résultats du fractionnement par le LDAO selon la variation de ces trois paramètres sont

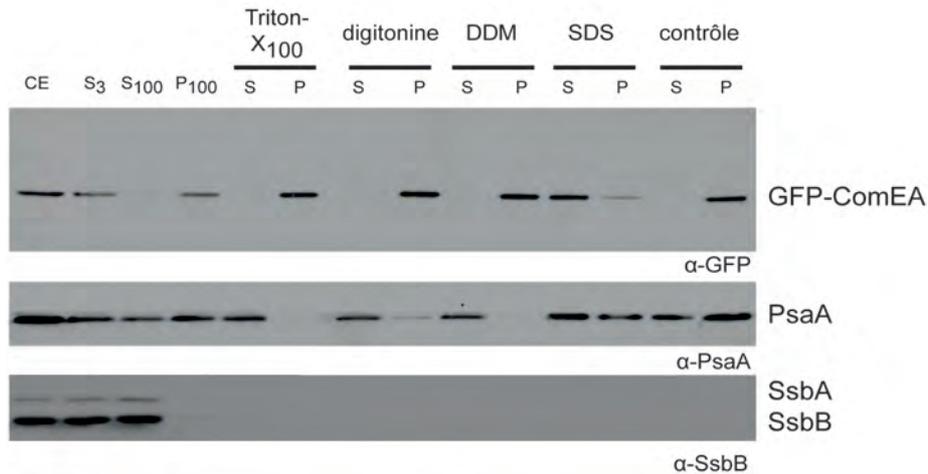


Figure 25- Fractionnement cellulaire de la souche exprimant la fusion GFP-ComEA. Les cellules (CE) exprimant la fusion GFP-ComEA (R2940) sont transformées en protoplaste (S_3). La fraction membranaire (P_{100}) est séparée de la fraction soluble (S_{100}), puis elle est incubée avec du triton-X100 ou de la digitonine ou du DDM ou du SDS ou du tampon (contrôle négatif). La partie solubilisée (S) est séparée de la fraction insoluble (P) par ultracentrifugation. Les différentes étapes du fractionnement sont analysées par western blot avec un anticorps α -GFP, α -PsaA et α -SsbB. Les protéines PsaA et SsbB constituent respectivement des témoins membranaires et solubles.

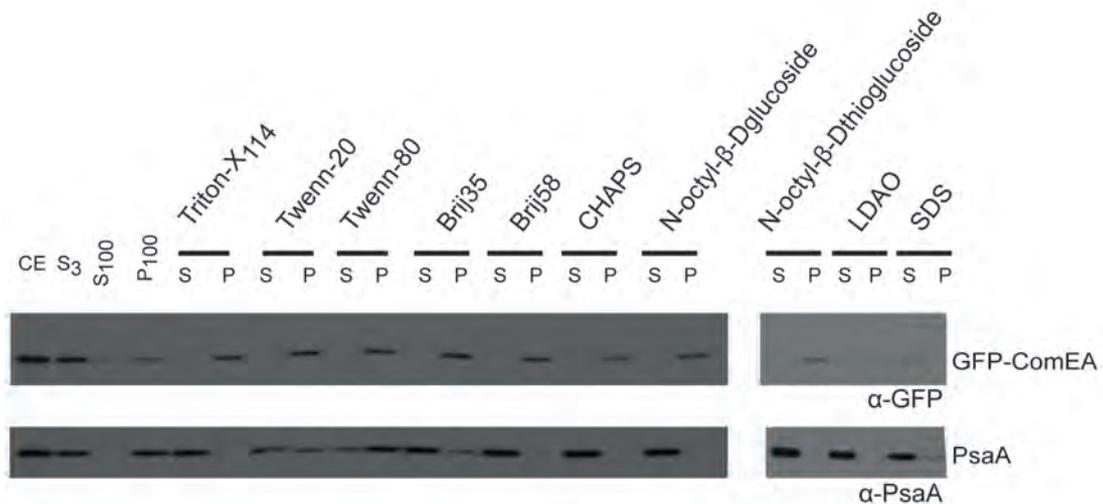


Figure 26- Fractionnement cellulaire de la souche exprimant la fusion GFP-ComEA avec une batterie de détergents. Les cellules (CE) exprimant la fusion GFP-ComEA (R2940) sont transformées en protoplaste (S_3). La fraction membranaire (P_{100}) est séparée de la fraction soluble (S_{100}), puis elle est incubée avec une batterie de détergents. La partie solubilisée (S) est séparée de la fraction insoluble (P) par ultracentrifugation. Les différentes étapes du fractionnement sont analysées par western blot avec un anticorps α -GFP et α -PsaA. La protéine PsaA constitue un témoin de solubilisation des protéines membranaires.

présentés (**figure 27**). Le LDAO permet de mieux solubiliser la fusion GFP-ComEA que le Brij35 (résultat non montré). Après 5H d'incubation à température ambiante, le LDAO utilisé à une concentration de 4% final permet de solubiliser environ 30% de la fusion GFP-ComEA.

Ce résultat est encourageant et ces conditions seront utilisées pour essayer d'effectuer les captures à partir de la fusion GFP-ComEA. Malheureusement, pour une question de temps, je n'ai pas pu continuer à développer cette approche.

III. Discussion

Cette partie de ma thèse avait pour but de mieux comprendre l'organisation du pore d'entrée du Transformasome en étudiant le partenariat protéique d'EndA dans des cellules compétentes par co-immunoprécipitation. Dans un premier temps, il a fallu adapter les protocoles disponibles au laboratoire pour les protéines membranaires. Des protocoles permettant la purification en tandem (SPA-tag) ou la co-immunoprécipitation en utilisant le tag GFP de protéines membranaires ont été développés et validés. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients. L'anticorps α -GFP poly-clonal généré et purifié au laboratoire est plus spécifique que l'anticorps monoclonal α -FLAG utilisé pour le SPA-tag. De plus, les fusions avec la protéine GFP permettent également la localisation de la protéine dans les cellules vivantes.

Les protocoles que nous avons développés nous ont permis de purifier des complexes de protéines contenant EndA à partir de cultures de *S. pneumoniae* compétentes et non compétentes (**figure 21**). Les résultats montrent un changement du partenariat d'EndA lors du développement de la compétence. Notamment, on peut souligner l'apparition de protéines exprimées spécifiquement en compétence comme la protéine de régulation ComD ainsi que ComA. Ces résultats préliminaires suggèrent que les protéines de régulation de la compétence seraient en complexe avec les protéines du pore d'entrée de l'ADN. Il faut cependant préciser que la concentration de ComD a été estimée à 40000 molécules par cellule compétente de *S. pneumoniae* (Martin *et al*, en préparation), Il y aurait donc un apport massif de ComD dans la membrane qui pourrait polluer la capture (tout comme les protéines ribosomales, contaminants fréquents des co-immunoprécipitations, estimées à 20000 copies chez *E. coli*). On ne peut tout de même pas rejeter l'hypothèse que ComD serait liée au Transformasome dans un contexte sauvage. Il serait donc intéressant d'effectuer une expérience réciproque, c'est à dire de co-immunoprécipiter ComD pour voir si il y a une interaction avec des protéines du Transformasome.

En revanche, de manière étonnante, la capture d'EndA dans des cellules compétentes n'a pas permis de la rattacher au niveau du pore d'entrée. Les conditions de

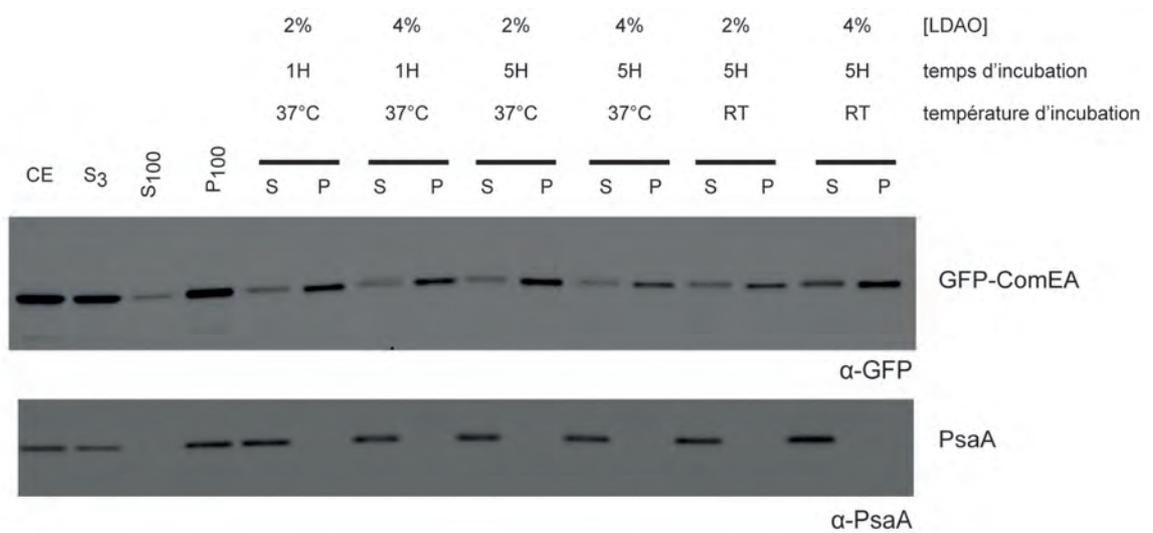


Figure 27- Solubilisation de la fusion GFP-ComEA par le LDAO selon différents paramètres de température, de concentration en détergent et de temps d'incubation. Les cellules (CE) exprimant la fusion GFP-ComEA (R2940) sont transformées en protoplaste (S₃). La fraction membranaire (P₁₀₀) est séparée de la fraction soluble (S₁₀₀), puis elle est incubée avec du LDAO selon différents paramètres de température, de temps d'incubation et de concentration. La partie solubilisée (S) est séparée de la fraction insoluble (P) par ultracentrifugation. Les différentes étapes du fractionnement sont analysées par western blot avec un anticorps α-GFP et α-PsaA. La protéine PsaA constitue un témoin de solubilisation des protéines membranaires.

solubilisation utilisées pour EndA ne permettent pas de solubiliser les protéines du pore d'entrée, représentées par ComEA ou ComEC (**figure 25**). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par Rosenthal et Lacks qui avaient montré par des expériences de gel filtration que le complexe dans lequel est contenu EndA de 250000Da était résistant à tous les traitements de solubilisation, hormis les traitements par du SDS ou des dégradations protéolytiques (Rosenthal et Lacks, 1980). Ces résultats suggèrent que le complexe membranaire du Transformasome se situe au sein de lipides particuliers.

Les membranes bactériennes sont constituées de trois lipides majoritaires, un lipide zwitterionique (le phosphatidyléthanolamine) et deux lipides anioniques (le phosphatidylglycérol et la cardiolipine). La concentration de ces lipides est différente selon les classes bactériennes (Gram positif et négatif) et selon les espèces (Rotem et al., 2008). Ces lipides s'organisent en domaine lipidique, de manière similaire aux membranes eucaryotes (Mileykovskaya et Dowhan, 2000; Kawai et al., 2004; Matsumoto et al., 2006; Barák et al., 2008). De plus, la nature des lipides ainsi que la courbure des membranes ont été montrées indispensable à la localisation correcte en un site précis de la cellule de plusieurs protéines, notamment DivIVA et SpoIVM (Ramamurthi et al., 2006, 2009; Lenarcic et al., 2009; Ramamurthi et Losick, 2009; Huang et Ramamurthi, 2010; Kumaran S, 2010).

Chez le pneumocoque, il a été montré que certains changements environnementaux, comme la présence de peroxyde d'hydrogène dans le milieu, pouvaient induire des changements de composition lipidique de la membrane (Pesakhov et al., 2007). Le passage des cellules en compétence entraîne également de nombreux changements physiologiques, parmi lesquels une modification de la paroi et de la membrane comme le montre la différence de vitesses de protoplastisation entre des cellules compétentes et non compétentes (**figure 15**). De manière intéressante, un lipide particulier, le poly- β -hydroxybutyrate (PHB), est accumulé dans les membranes de plusieurs espèces naturellement transformables comme *B. subtilis*, *H. influenzae* (Reusch et Sadoff, 1983) et *S. pneumoniae* (Clavé et Trombe, 1988). Il a été proposé que ce lipide jouerait un rôle structural en permettant des structures permissives au transfert des molécules d'ADN au travers de la membrane cytoplasmique. On peut imaginer que la fusion GFP-ComEA ainsi que les éléments du Transformasome se situent dans un îlot lipidique particulier, peut être formé par le PHB. Il serait donc intéressant d'étudier la localisation du PHB dans des cellules compétentes pour vérifier si sa distribution dans les membranes coïncide avec celle des protéines du Transformasome. Ce raft de lipide pourrait jouer le rôle d'ancre moléculaire pour la localisation correcte des protéines du Transformasome.

souches	génotypes	références
R304	Dérivée de R800 ; <i>nov1, rif23, str41</i> (NovR, rifR, StrR)	Mortier-Barrière et al., 1998
R800	Dérivée de R6	Lefevre et al., 1979
R1501	Dérivée de R800 ; <i>comC₀</i>	Dagkessamanskaia et al., 2004
R2529	Dérivée de R800 ; <i>comC₀, CEP_M^{spa-endA}</i> ; <i>endA ::cat</i> (KanR, CmR)	Cette étude
R2762	Dérivée de R800 ; <i>comC₀, gfp-endA</i> (aucune)	Cette étude
R2763	Dérivée de R800 ; <i>comC₀, spa-endA</i> (aucune)	Cette étude
R2940	Dérivée de R800 ; <i>comC₀, gfp-comEA</i> (aucune)	Cette étude
amorces	description	Séquences*
OCN42	amorce sens amplification <i>endA</i> sur ATG avec site <i>XhoI</i>	5' gcgctcgagat gaacaaaaaacaagacagacac 3'
OCN6	amorce antisens amplification <i>endA</i> avec site <i>BamHI</i>	5' gcggatcc ataagtgacataggagt 3'
OCN44	amorce sens amplication étiquette N- terminale <i>spa</i>	5' cgg tacctcggaatgcatctag 3'
OCN45	amorce antisens amplication étiquette N- terminale <i>spa</i>	5' gccaagctt gcatgcaggcctctgc 3'
OCN22	amorce sens amplication <i>gfp</i> sur ATG avec un site <i>NcoI</i>	5' ggcccatggg taaaggagaagaactttcactggag 3'
OCN25	amorce antisens amplication <i>gfp</i> avec un site <i>NcoI</i>	5' ccactcggag cggccgaaccttgtatagttcatcc 3'
OMB13	amorce sens amplification amont <i>endA</i> (400nucléotides) avec un site <i>BamHI</i>	5' ccgggatcc gggagcacaaccgtcccttgattgccaagtt acttgaaat 3'
OMB14	amorce antisens amplification amont <i>endA</i> avec extension pour amplifier 5' du <i>spa</i>	5' ccgtcatggtctt gtagtccatatttctccttatcttagaaaa ggctggt 3'
OMB15	amorce sens amplification <i>spa</i> avec extension pour amplifier région amont <i>endA</i>	5' accagcctttt ctaaagataaggagaaatggactacaa agaccatgacgg 3'
OMB16	Amorce antisens amplification des 400 premiers nucléotides d' <i>endA</i> avec un site <i>HindIII</i>	5' ggcaagctt cccaggctgtctgaacagcaatgttttaggat tgcttgt 3'

Table I – tableau des souches

Table II – tableau des oligonucléotides. * les sites de restriction sur les amorces sont marqués en gras

IV. Matériel et méthodes

IV. A Constructions de souches

Les souches utilisées dans cette étude, dérivée de la souche séquencée R6 (Hoskins et al., 2001), sont listées dans la table I. Elles contiennent toutes une délétion du gène *comC*, notée *comC₀*, pour empêcher le déclenchement naturel de la compétence et pouvoir ainsi le contrôler artificiellement. La souche R1501 a été transformée par les plasmides présentés ci dessous.

IV. B Plasmides, oligonucléotides

pMB7 (CEP_x^{spa-endA}) a été généré par une ligation à trois fragments. Le fragment PCR endA a été amplifié avec les oligonucléotides OCN6 et OCN42 à partir de l'ADN chromosomique R304 et le produit PCR spa a été amplifié avec les oligonucléotides OCN44 et OCN45 sur une matrice du plasmide pUC57-SPA puis digérés respectivement par les enzymes de restriction *NcoI/EcoRI* et *EcoRI/BamHI*. Ces fragments sont insérés dans le plasmide pCEP_x ouvert entre les sites *NcoI/BamHI*. Le mélange de ligation est directement transformé dans *S. pneumoniae* car le clonage du gène endA est toxique chez *E. coli* (Puyet et al., 1990). Les clones sont analysés par PCR et le produit PCR est séquencé pour vérifier l'absence de mutation.

pMB12 (gfp-endA) voir la construction dans le chapitre III

pMB13 (spa-endA) a été généré par une ligation à deux fragments. L'amplification de l'amont d'*endA* est réalisée avec les oligonucléotides OMB13 et OMB14 sur de l'ADN chromosomique R304 et la fusion spa-endA est amplifiée avec les oligonucléotides OMB15 et OMB16 sur la souche R2526. Ces PCR servent à générer par cross-over PCR l'insert du pMB13 avec les oligonucléotides OMB13 et OMB16. Le fragment PCR est digéré par les enzymes *BamHI/HindIII* et insérés dans un plasmide pGDBU, digéré au préalable par les mêmes enzymes de restriction. La ligation est transformée directement dans *S. pneumoniae*. Les clones sont analysés par PCR et le produit PCR est séquencé pour vérifier l'absence de mutation.

pMB14 (gfp-comEA) voir la construction au chapitre III

pMB20 (GFP-his₆) a été généré par une ligation à deux fragments. Le fragment PCR *gfp* a été amplifié avec les oligonucléotides OCN21 et OCN25 à partir de la matrice, puis digéré par les enzymes de restriction et inséré dans le plasmide pET21d ouvert par les mêmes

enzymes de restriction. Le mélange de ligation sert à transformer *E. coli* LE392. Les plasmides sont séquencés pour vérifier l'absence de mutation.

IV. C Préparation de membranes

Une culture de 200mL en C+Y (inoculée au 1 /100^{ième} par une pré culture de cellules à DO_{550nm} de 0,3) est incubée à 37°C jusqu'à une DO_{550nm} de 0,13. Si nécessaire, les cellules sont alors induites par du CSP synthétique (100ng.mL⁻¹) 12 minutes à 37°C. Les cellules sont centrifugées à 5000RPM pendant 15 minutes à 4°C. Pour former les protoplastes, le culot cellulaire est repris par 20mL de tampon de protoplastisation (Tris-HCl 100mM ; MgCl₂ 1mM ; β-mercaptoéthanol 3mM ; sucrose 1M ; pH 7,6) puis incubé à 37°C. Le suivi de la protoplastisation se fait par chute de la DO_{550nm} en mélangeant 100µL de cellules avec 1mL d'H₂O. On considère que la potoplastisation est totale lorsque les cellules ont une DO_{550nm} inférieure à 0,02. Les protoplastes sont récupérés par centrifugation durant 30 minutes à 5000RPM à température ambiante. Le culot est gardé à -80°C pendant 1 nuit. Puis, les cellules sont lysées par choc osmotique dans le tampon H (10mM Tris pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 1mM DDT ; 1mM MgCl₂ ; 1mM PMSF) contenant de la DNaseI (10µg.mL⁻¹ final) (Sigma), de la RNaseA (20 µg.mL⁻¹ final) (Sigma) et de la benzonase (8 unités.mL⁻¹ final) (Eurogentec) pendant 30 minutes à 4°C (CE). Ce dernier est centrifugé 10 minutes à 3000G pour séparer les cellules non lysées (culot) de l'extrait protéique (S₃). Le lysat est centrifugé à 100000g pendant 30 minutes à 4°C pour séparer les protéines cytoplasmiques dans le surnageant (S₁₀₀) des protéines membranaires dans le culot (P₁₀₀) (protéines membranaires, agrégats) qui sont dans le culot. Le surnageant est retiré et le culot (P₁₀₀) est repris par 1mL de tampon de resuspension (20mM Tris pH 7,5 ; 300mM NaCl ; 5mM EDTA ; 1mM PMSF ; 1mM DDT).

IV. D Fractionnement cellulaire

La fraction membranaire d'une culture cellulaire de 200mL est partagée en aliquote de volume équivalent. Un aliquote contrôle est additionné de tampon de resuspension (v/v), et les autres sont additionnés de tampon (v/v) contenant le détergent à la concentration voulue (20mM Tris pH 7,5 ; 300mM NaCl ; 5mM EDTA ; 1mM PMSF ; 1mM DDT ; détergent) pour solubiliser les protéines intégrales membranaires. Les traitements sont effectués pendant 60 minutes à 4°C en vortexant toutes les 15minutes sauf condition particulière. Les échantillons sont alors centrifugés à 100000g pendant 60 minutes à 4°C. Les fractions solubles (S) et insolubles (P) sont analysées par Western Blot.

IV. E Purification en tandem (SPA-tag) des protéines membranaires chez *S. pneumoniae*

Le SPA-tag est réalisé selon la procédure décrite précédemment (Quevillon-Cheruel et al., 2012) avec des modifications. Les purifications sont réalisées à partir de la fraction membranaire (notées CM dans les figures) de 1L de culture, exprimant la fusion SPA-EndA, préparée comme décrit précédemment. La fraction membranaire solubilisée par la digitonine à 0,5% final (L) est incubée 3H à 4°C avec 200µL de billes d'agarose α-FLAG M2 (Sigma). La résine est culotée par centrifugation 2 minutes à 5000g. Le surnageant correspond au Flow-trough (FT). Les billes sont chargées sur un colonne Bio-Spin (Biolabs), lavées 4 fois avec 400µL de tampon G2-D (10mM Tris-HCL pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 10% glycérol ; 1 mM DDT ; 0,5% digitonine) et 1 fois avec 400µL de tampon TEV-D (50mM Tris-HCL pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 200µM EDTA ; 1 mM DDT ; 10% glycérol ; 0,5% digitonine). Les billes sont incubées avec 200µL de tampon TEV contenant 50U de protéase AcTEV (Invitrogen) toute la nuit avec agitation. Les protéines ainsi éluées sont alors incubées avec 400µL de tampon TEV supplémenté avec 5µL de CaCl₂ 240mM et 50µL de billes sépharose-calmoduline (Amersham Biosciences) pendant 2H à 4°C. Les billes sont alors lavées avec 500µL de tampon CBB-D (10mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 100mM CaCl₂ ; 10% glycérol ; 10mM β-mercaptoéthanol ; 0,5% digitonine) puis 100µL de tampon CWB-D (10mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 2mM CaCl₂ ; 10mM β-mercaptoéthanol ; 10% glycérol ; 0,5% digitonine). Puis, les complexes sont élués par 500µL de tampon CEB-D (50mM Tris-HCl pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 3mM EGTA ; 10% glycérol ; 10mM β-mercaptoéthanol ; 0,5% digitonine) puis précipités par la méthode TCA/acétone. Le complexe purifié est séparé par un gel SDS-PAGE sur un gradient allant de 4 à 12%. Le gel de protéine est coloré au Sypro orange puis au bleu de Coomassie en suivant les recommandations des fournisseurs. Le gel est découpé en bande de 1mm². Chaque bande est ensuite analysée par spectrométrie de masse (PAPSSO, Jouy en Josas) par LC-MS/MS.

IV. F Co-immunoprécipitation α -GFP des protéines membranaires solubilisées par des détergents

Les purifications sont réalisées à partir de la fraction membranaire (notées CM dans les figures) de 1L ou de 100mL de culture préparée comme décrit précédemment. La fraction membranaire solubilisée par la digitonine à 0,5% (L) est incubée 4H à 4°C avec 200µL de billes d'agarose α-GFP. La résine est culotée par centrifugation à 5000g pendant 2 minutes. Le surnageant correspond au Flow-trough (FT). La résine est ensuite lavée 4 fois avec du tampon G2-D (10mM Tris-HCL pH 7,5 ; 150mM NaCl ; 10% glycérol ; 1 mM DDT ; 0,5% digitonine). L'éluion des protéines immuno-précipitées est réalisée en ajoutant 90µL de

tampon de charge (250mM Tris-HCl pH 6,8 ; 10mM EDTA ; quelques cristaux de bleu de bromophénol ; 20% glycérol ; 4% SDS) pendant 15 minutes à 50°C. L'immunoprécipitat est centrifugé 3 minutes à 5000g. Le surnageant est récupéré et mélangé avec 9,5µL de β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont alors déposés sur un gel d'acrylamide avec un gradient 4-12% (Invitrogen), suivi d'une coloration au sypro orange (Sigma) et à l'InstantBlue (Expedeon).

IV. G Purification de la GFP

Le gène codant pour la GFP a été fusionné à un tag His₆ (pMB20) et est exprimée dans *E. coli* BL21. Les cellules sont cultivées dans 1L de LB à 37°C jusqu'à une DO_{550nm} de 0,5. Elles sont alors induites par l'addition d'IPTG à une concentration de 1mM final pendant 2H à 37°C puis centrifugées à 5000RPM durant 30 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est repris par 50mL de tampon de lyse (50mM Tris pH 8 ; 300mM NaCl ; 10mM imidazole ; 5mM β-mercaptoéthanol). Un extrait brut est préparé par un « flash-freeze » des cellules (congélation dans l'azote liquide) suivi de l'addition de lysozyme (100µg.mL⁻¹) et de PMSF (1mM final), d'une incubation à 20 minutes à 4°C et enfin d'une sonication. La fraction soluble est récupérée par centrifugation à 20000RPM pendant 1H à 4°C puis filtrée et chargée sur une colonne Histrap FF (5mL, GE Healthcare) équilibrée par le tampon A (50mM Tris pH 8 ; 300mM NaCl ; 5mM β-mercaptoéthanol ; 10% glycérol). Des lavages successifs sont réalisés avec le tampon A. Un gradient d'un tampon B (20mM Tris pH 8 ; 300mM NaCl ; 1M imidazole ; 5mM β-mercaptoéthanol ; 10% glycérol) permet d'éluer la protéine GFP-his₆. Les fractions composant le pic d'élution sont identifiées par la mesure de l'absorbance à 280nm, déposées sur gel d'acrylamide 12% pour vérifier la pureté de la préparation et poolées. La concentration de la protéine est déterminée par la méthode de Bradford (Biorad) et estime une concentration de la protéine à environ 2,1mg.mL⁻¹. La protéine est mélangée avec du glycérol (50% final) et conservées à -20°C. Cette protéine a été injectée dans deux lapins différents pour la production d'anticorps en 28 jours selon la méthode speedy-rabbit (Eurogentec).

IV. H Purification par affinité des anticorps α-GFP

Le protocole de couplage est réalisé selon la procédure décrite précédemment (Campo et Rudner, 2006) avec quelques modifications. Environ 5mg de GFP purifiée est dialysée contre un tampon de couplage (20mM Hepes pH 7,6 ; 100mM NaCl ; glycérol 10%) et couplée à 2mL de résine Affigel-10 (BioRad) comme décrit par le fabricant. Après le couplage, la résine d'antigène est lavée avec 100mM de glycine à pH 2,5 (à vérifier) pour éliminer toute la GFP non fixée puis cette réaction est neutralisée par du PBS 1X. 20mL de

l'antisérum (fraction SAB) sont mis en contact sur la nuit à 4°C avec la résine d'antigène. La résine est chargée sur une colonne Econopak (BioRad), lavée avec 10mL de PBS 1X puis 50mL de PBS 1X ; 500mM NaCl ; 0,1% Tween-20 et 10mL de PBS 0,2X. Les anticorps purifiés par affinité sont ensuite élués avec 100mM de glycine pH 2,5. Les fractions "pic" contenant les anticorps dont la concentration a été déterminée par Bradford (Biorad) sont mélangées et dialysées immédiatement contre du PBS 1X ; glycérol 50%. Les anticorps purifiés par affinité sont conservés à -20°C.

IV. I Couplage des anticorps à la protéine A

Le protocole de couplage est réalisé selon la procédure décrite précédemment (Campo et Rudner, 2006) avec quelques modifications. Les anticorps α -GFP purifiés par affinité (5 à 10mg) sont mélangés avec 5mL de protéine A-sépharose (Healthcare) pendant 1H à 4°C. La résine d'anticorps a été lavée 2 fois avec du PBS 1X et l'anticorps est cross-linké avec la protéine A-sépharose par l'addition de Disuccinimidyl Suberate (Fisher scientific) à une concentration finale de 2,7mM. Après 1H de réaction à température ambiante, la réaction est stoppée en ajoutant du Tris-HCl pH 7,5 à une concentration finale de 50mM. La résine d'anticorps purifiée est lavée avec 20mL de PBS 1X, 10mL de PBS 0,2X, 10mL de glycine 100mM pH 2,5 pour éliminer les anticorps non liés et 30mL de PBS 1X pour neutraliser la glycine. La résine est gardée à 4°C en ajoutant de l'azide de sodium à une concentration finale de 0,02%.

Chapitre II

Suivi de la compétence par time lapse et optimisation de Microbe Tracker

Ce chapitre présente des adaptations de techniques pour le pneumocoque de microscopie à fluorescence (vidéo microscopie) et le traitement automatisé de ces images par MicrobeTracker. J'ai choisi d'intégrer ces travaux à mon manuscrit car il m'a paru important de détailler la démarche expérimentale, qui permet au final de visualiser directement l'induction de la compétence par microscopie à fluorescence. Ces résultats s'intègrent dans un article en préparation qui montre un lien entre le développement de la compétence et le cycle cellulaire. Ma contribution à ce travail a été d'observer ce phénomène par vidéo microscopie.

I. Introduction

Les bactéries adoptent une organisation bien définie dans la cellule qui passe par l'adressage de protéines en des sites spécifiques (Rudner et Losick, 2010). Il apparaît par exemple vital que le divisome -ensemble de protéines formant une machinerie moléculaire assurant la division de la cellule- soit localisé de manière précise à la zone équatoriale pour permettre la naissance de deux cellules viables. Les protéines de la compétence doivent s'intégrer dans cette organisation. En effet, *S. pneumoniae* induit la compétence en début de phase exponentielle, dans des cellules actives en division. Il faut donc notamment que la cellule soit capable, en adaptant son cycle cellulaire, de mettre en place une machinerie multi-protéique permettant le transport de l'ADN. Pour étudier l'intégration du Transformasome dans la cellule, une approche de microscopie à fluorescence a été développée.

I. A Contraintes et Objectifs

I. A.1 Acquisition

L'étude de la localisation des protéines chez les procaryotes s'avère difficile car la taille des objets à étudier est à la frontière de la limite de résolution de la microscopie optique. L'évolution des techniques de microscopie à fluorescence, notamment au niveau des rapporteurs fluorescents et des microscopes durant les dernières années a permis de mieux comprendre l'organisation cellulaire des bactéries. Nous avons voulu regarder à l'échelle de la cellule comment la machinerie du Transformasome s'intègre au cours du développement de la compétence. Des techniques de vidéo-microscopie (time lapse) sont maintenant utilisées pour étudier les bactéries. Cette méthode permet par exemple de visualiser la dynamique des protéines dans le temps et l'espace. Il est possible de suivre à l'échelle d'une cellule la localisation d'une ou plusieurs protéines au cours de l'avancement dans le cycle cellulaire. Dans notre cas, une contrainte majeure de cette approche concernait la capacité des cellules à développer la compétence sur lame d'agarose. La première partie de ce chapitre s'intéresse à la mise au point de cette technique.

I. A.2 Analyse

Un autre défi de la microscopie optique est l'analyse des données. L'analyse des données permet d'extraire des mesures quantitatives objectives d'une image numérique. Les microscopes automatisés actuels sont capables de générer de plus en plus de données qui nécessitent une automatisation d'analyse. Depuis plusieurs années, différents logiciels d'analyse permettant une automatisation des analyses des images de microscopie sont disponibles comme par exemple les logiciels NisElement (Nikon), Metamorph (Photometrics)

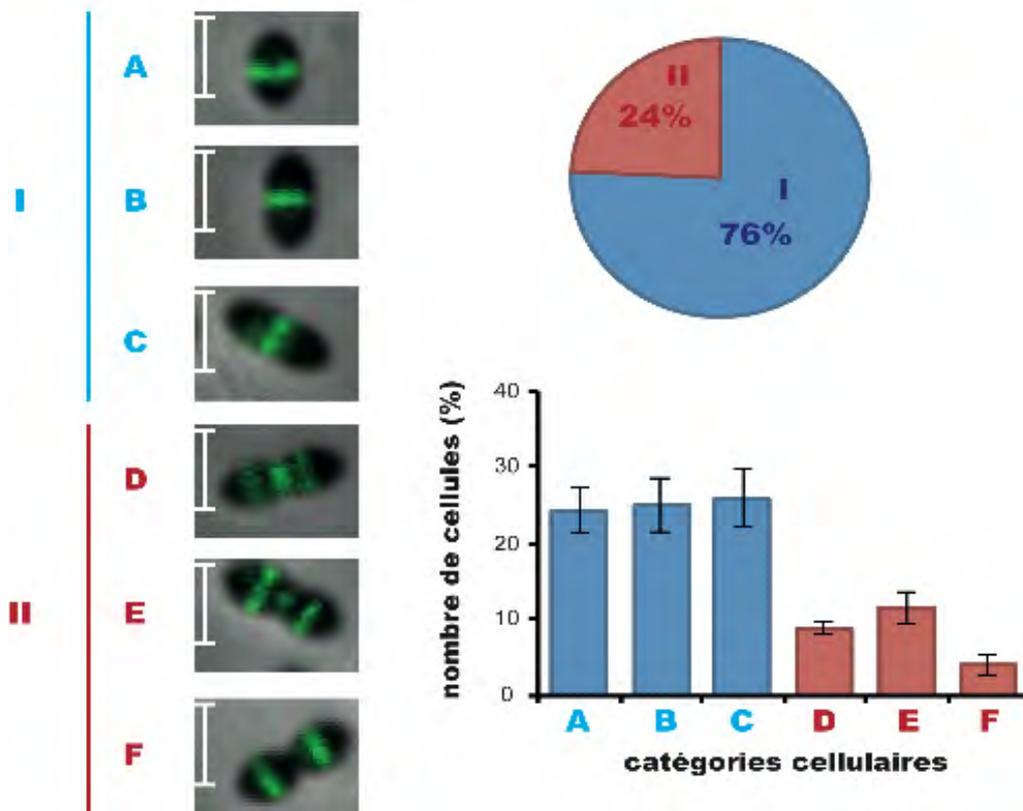


Figure 28 : Présentation de la localisation de FtsZ selon l'avancement dans le cycle cellulaire chez *S. pneumoniae*. Les cellules sont classées selon leur morphologie cellulaire et la localisation de FtsZ en deux classes notées I (cellule sans constriction avec FtsZ localisée au septum de division) et II (cellule avec constriction et FtsZ localisé au futur site de division). La répartition dans la population de chaque classe de cellules en phase exponentielle de croissance est présentée. Chaque classe est sous divisée en trois catégories respectivement A, B, C et D, E, F selon l'avancement dans le cycle cellulaire. La répartition au sein de la population de chaque catégorie a été analysée et présentée sous forme de graphique. Barre d'échelle= 1,28 μ m.

et un logiciel gratuit imageJ (NIH). MicrobeTracker est un logiciel développé par un laboratoire travaillant sur *Caulobacter crescentus* qui est libre d'accès et permet une automatisation totale de l'analyse (Sliusarenko et al., 2011).

Ce chapitre est composé de deux parties méthodologiques pour l'adaptation de nouveaux outils de microscopie à fluorescence pour *S. pneumoniae*. Dans une première partie, la mise au point du time lapse pour suivre l'induction de la compétence chez *S. pneumoniae* est présentée. Dans une deuxième partie, l'adaptation du logiciel MicrobeTracker pour l'analyse des images de microscopie à fluorescence du pneumocoque est montré.

II. Résultat

II. A Suivi de l'induction de la compétence en time lapse

II. A.1 Croissance des cellules

Alors que le time lapse est utilisé pour étudier la division cellulaire chez les bactéries modèles depuis presque 10 ans (Bejerano-Sagie et al., 2006; Veening et al., 2006), cette technique commence juste à être utilisée chez *S. pneumoniae* (De Jong et al., 2011; Beilharz et al., 2012). Dans un premier temps, nous avons vérifié que dans nos conditions de laboratoire, la croissance des cellules sur une lame d'agarose était comparable à leur croissance en culture liquide. Pour vérifier ce paramètre, la protéine FtsZ a été utilisée comme rapporteur du cycle cellulaire. L'anneau septal formé par FtsZ marque le futur site de division et le temps d'assemblage et de positionnement de cette structure est important pour la détermination du lieu et du moment où s'effectue la division cellulaire (Adams et Errington, 2009).

Une souche exprimant la fusion FtsZ-GFP placée sur la plateforme d'expression ectopique CEP (Giral et al., 2006) sous le contrôle du promoteur inductible au maltose a été construite. L'expression de la protéine a été vérifiée par western blot en utilisant un anticorps α -GFP (résultat non montré) puis sa localisation a été déterminée dans des cellules vivantes par microscopie à fluorescence. Comme attendu, la fusion FtsZ-GFP est localisée au site de division ou au futur site de division. La localisation de FtsZ a pu être étudiée dans diverses catégories cellulaires définies en fonction de l'avancement dans le cycle cellulaire (**figure 28**). Les cellules sont classées selon six catégories allant de A à F. Les catégories A, B et C forment un premier groupe nommé « I » qui sont des cellules sans constriction, montrant une localisation de FtsZ au septum de division. Les catégories D, E et F, regroupées en « II » exhibent une constriction. Dans ce cas, la protéine FtsZ est déjà relocalisée au niveau de la zone équatoriale des deux futures cellules filles. La répartition de chaque classe et de

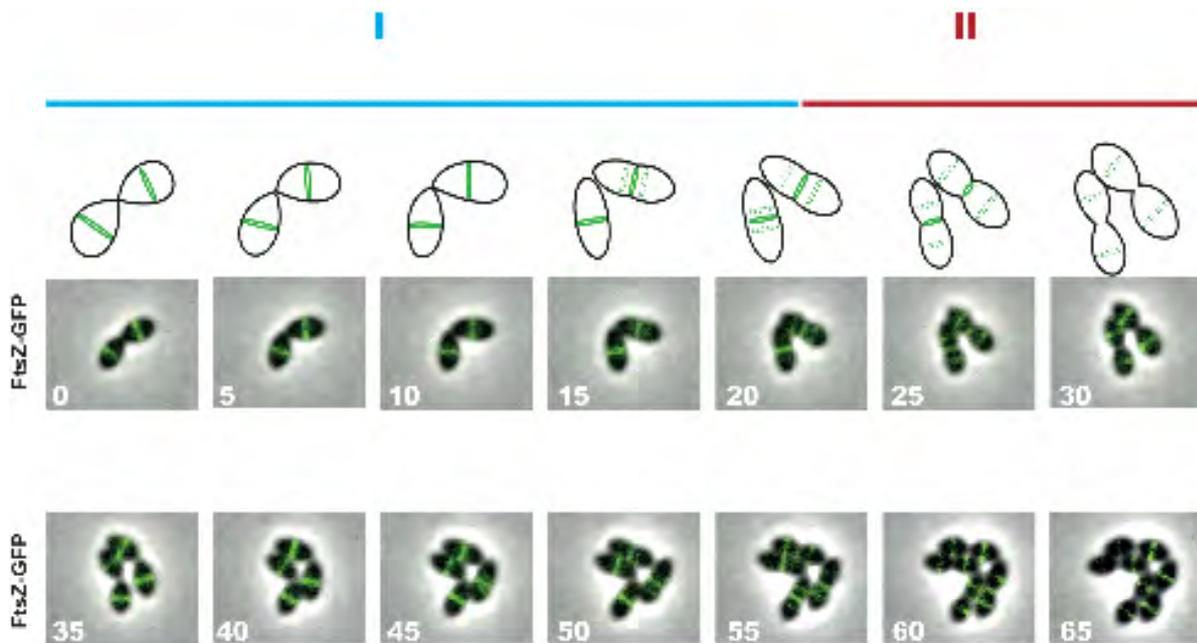


Figure 29 : Dynamique de la protéine FtsZ au cours du cycle cellulaire chez *S. pneumoniae*. Observation réalisée par microscopie à fluorescence en time lapse de la souche exprimant la fusion FtsZ-GFP (R3136) à 37°C sur lame de C+Y agarose (cf matériel et méthode). La superposition entre le contraste de phase (gris) et la fluorescence (vert) sont montrées. Les images sont capturées toutes les 5 minutes. Le temps (en minutes) est indiqué sur chaque image. Une représentation schématique de chaque image pour les premières 30 minutes est présentée pour montrer la correspondance avec les catégories cellulaires.

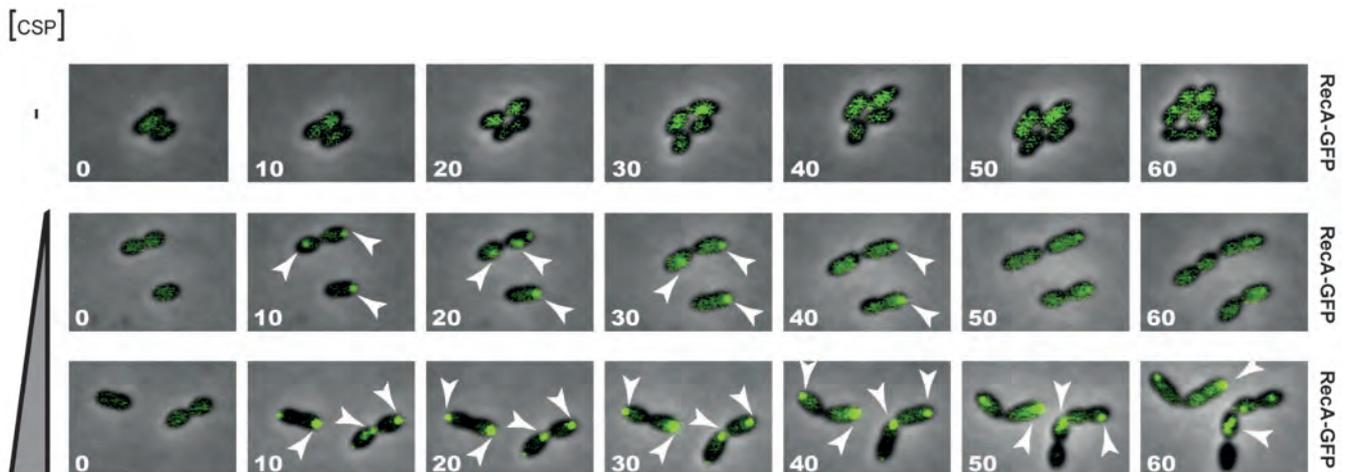


Figure 30 : Suivi du développement de la compétence par time lapse. La souche exprimant la fusion RecA-GFP (R2198) est incubée avec différentes concentrations de CSP, 0ng.mL⁻¹ (panneaux du haut, cellules non compétentes), 25ng.mL⁻¹ (panneaux du milieu) et 100ng.mL⁻¹ (panneaux du bas). Les images ont été capturées toutes les minutes mais seules les images acquises toutes les 10 minutes sont montrées. La superposition du contraste de phase (gris) et de la fluorescence (vert) est présentée. Les foci de RecA dépendants de la compétence sont marqués (flèche blanche).

chaque catégorie dans la population a été comptabilisée et montre une majorité de cellules de la catégorie I (76%) et 24% de cellules de la catégorie II dans une culture de cellules sauvages en phase exponentielle de croissance dans un milieu riche à 37°C (**figure 28**).

Une souche exprimant la fusion FtsZ-GFP a ensuite été étudiée par des expériences de time lapse pour suivre l'évolution du cycle cellulaire à l'échelle d'une cellule. Le protocole utilisé pour cultiver les cellules sur lame d'agarose est principalement basé sur celui décrit dans la littérature (De Jong et al., 2011). Brièvement, les cultures sont cultivées en milieu liquide jusqu'à une DO_{550nm} de 0,1 puis déposées sur une lame d'agarose comme décrit dans le matériel et méthode. La lame est placée sur la platine « porte objet » du microscope dans une enceinte thermostatée à 37°C. L'acquisition des images de fluorescence a été réalisée toutes les cinq minutes. Le suivi au cours du temps d'une cellule représentative du champ est présenté (**figure 29**). Au temps choisi comme T_0 , les cellules de la catégorie A présentent une localisation septale de FtsZ montrant comme attendu que FtsZ arrive très précocement au niveau du site de division. Les cellules « s'allongent », en passant par les catégories B et C, et présentent une invagination (initiation de la septation) après 20 minutes dans les cellules non compétentes. L'anneau FtsZ commence alors à se relocaliser au niveau du futur site de division des cellules filles. La constriction progresse pendant 10 minutes pour donner 4 cellules de la catégorie A avec FtsZ localisée uniquement au septum de division. Ceci suggère que le temps de génération sur lame est d'environ 30 minutes. On peut d'ailleurs noter que la population double encore pendant les 30 minutes suivantes. Ce temps de génération des cellules sur lame d'agarose est équivalent au temps mesuré en culture liquide.

II. A.2 Choix du rapporteur de la compétence

Nous avons voulu par la suite observer le développement de la compétence des cellules au microscope. Pour suivre ce mécanisme, une souche exprimant la fusion RecA-GFP est regardée en time lapse. La recombinaison universelle, RecA, qui permet d'intégrer par recombinaison homologue le fragment d'ADN transformant dans le chromosome de la bactérie appartient au régulon compétence. Elle est surexprimée 4 fois environ pendant cette période (Martin et al., 1995). RecA présente une localisation diffuse dans le cytoplasme dans des cellules non compétentes comme il a été observé chez d'autres bactéries (Kidane et Graumann, 2005; Renzette et al., 2005; Orillard et al., 2011). Puis lorsque les cellules basculent en compétence, RecA se concentre sous forme de foci dans les cellules (résultats non publiés) comme il a été montré chez *B. subtilis* (Kidane et Graumann, 2005). Pour suivre l'induction de la compétence, nous avons donc observé la formation de foci RecA-GFP dans les cellules traitées avec le CSP. RecA-GFP nous a semblé un meilleur

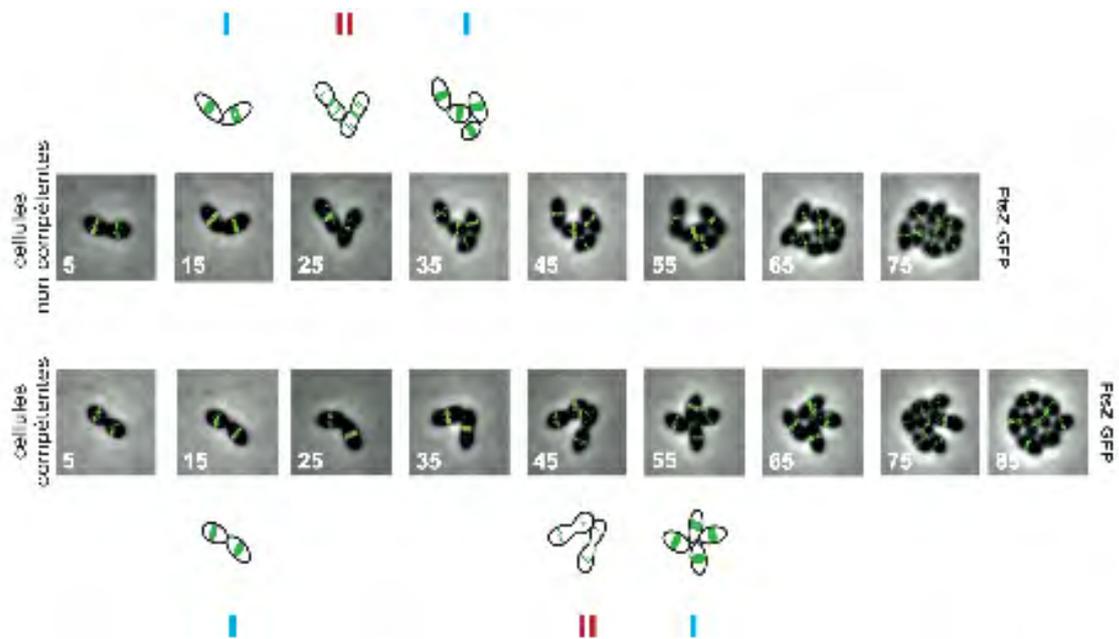


Figure 31 : La constriction est ralentie lors de l'induction de la compétence chez *S. pneumoniae*. La souche exprimant la fusion FtsZ-GFP (R3136) est localisée dans des cellules non compétentes (panneaux du haut) et dans des cellules compétentes (panneau du bas). Les images sont capturées toutes les cinq minutes. Le temps (en minutes) est indiqué sur chaque image. La superposition du contraste de phase (gris) et de la fluorescence (vert) est présentée. Le passage de la classe I à la classe II est représenté par les schémas.

rapporteur de l'induction en compétence que la protéine fluorescente GFP synthétisées sous le contrôle d'un promoteur inductible en compétence parce que cette protéine libre dans le cytoplasme a tendance à photo blanchir plus rapidement.

II. A.3 Induction de la compétence

Parmi les tests effectués pour induire la compétence, les cellules sont mises en contact avec du CSP synthétique pendant 30 secondes puis les cellules sont déposées au plus vite sur la lame d'agarose. Les cellules sont incubées à 37°C sur la platine du microscope et des acquisitions d'images sont réalisées toutes les minutes. Pour induire la compétence, plusieurs concentrations de CSP ont été testées allant de 25 à 100ng.ml⁻¹ final (**figure 30**). Dans les cellules non compétentes, RecA reste localisée de manière uniforme dans le cytoplasme des cellules. Cependant, on peut aussi voir dans ces cellules l'apparition brève de foci. Une explication possible serait que les multiples excitations aux ultraviolets qui permettent d'activer la GFP (395nm) entraîneraient dans quelques cellules des cassures d'ADN double brin. Les foci de RecA refléteraient l'action de RecA pour réparer ces cassures d'ADN génomique.

Des résultats similaires ont été observés chez *E. coli* et il semble que ces foci sont plus fréquents en milieu riche (Renzette et al., 2005). Les auteurs proposent que RecA se concentrerait en foci pour jouer son rôle au niveau du réplisome. Dans des cellules induites par le CSP, RecA est localisée en foci 10 minutes après l'induction de la compétence avec 25 ou 100ng.mL⁻¹ de CSP. Plus précisément, RecA est concentrée sous forme de foci après 7 minutes de contact avec le CSP dans la majorité des cellules. On peut noter une différence pour les deux concentrations de CSP utilisées au moment de la fermeture de la compétence. Les foci de RecA disparaissent après 40 minutes d'induction avec 25ng.mL⁻¹ de CSP tandis qu'ils sont encore présents après 60 minutes avec 100ng.mL⁻¹ de CSP. A ce temps, les cellules ne devraient plus être compétentes. Cependant, il est possible que l'utilisation de concentration élevée de CSP entraîne une réinduction de la compétence qui serait due à l'excédant de CSP dans le milieu extérieur. Dans ce cas, on regarde une population hétérogène où des cellules induisent à nouveau la compétence et des cellules qui sont en train de fermer la compétence. Par la suite, nous avons choisi d'induire les cellules avec une concentration finale de CSP de 25ng.mL⁻¹.

II. A.4 Validation

Une étude au laboratoire a montré un ralentissement du processus de constriction lors de l'induction de la compétence qui se traduit par une accumulation de cellules de la catégorie II (résultats non publiés). Pour visualiser ce phénomène, nous avons comparé la croissance de cellules compétentes ou non compétentes par time lapse. Pour cela, nous

avons utilisé la souche contenant la fusion FtsZ-GFP et nous avons déposé en parallèle sur la même lame des cellules non compétentes et des cellules induites au CSP à 25ng.mL⁻¹. L'anneau septal FtsZ est bien localisé dans des cellules induites en compétence (**figure 31**). Le suivi de la progression du cycle cellulaire dans les cellules non compétentes montre qu'il faut 10 minutes pour passer de la catégorie I à la catégorie II où FtsZ est aussi localisée au futur site de division des cellules filles. Dans des cellules compétentes, il faut environ entre 20 et 30 minutes pour arriver au même stade. Ceci traduit donc un ralentissement du cycle cellulaire dans des cellules compétentes. Après ce premier événement de division, et alors que les cellules sont sorties de l'état de compétence, il faut 30 minutes pour doubler le nombre de cellules, temps équivalent à la souche non induite. Ces expériences traduisent donc un ralentissement du premier cycle de division qui suit l'induction de la compétence et une reprise normale du cycle lors de la fermeture de la compétence.

Ces résultats s'intègrent dans un article du laboratoire qui a pour but de montrer un ralentissement du cycle cellulaire lors de l'induction de la compétence chez *S. pneumoniae* (Campo, Bergé *et al.*, en préparation).

II. B Adaptation de microbe Tracker pour l'analyse d'images de *S. pneumoniae*

Microbe Tracker est un logiciel d'analyse d'images de microscopie accessible librement fonctionnant sur la plateforme de Matlab (Matworks®) (Sliusarenko *et al.*, 2011). Ce logiciel est conçu comme une boîte à outils qui permettent de mesurer des paramètres morphologiques des cellules, de détecter des signaux de fluorescence dans les cellules et de quantifier ces signaux ou suivre leur trajectoire à l'intérieur des cellules au cours du temps par des expériences de time lapse. Ce logiciel peut donc établir les propriétés spatio-temporelles d'une protéine au sein de la cellule. La particularité de MicrobeTracker est sa capacité à détecter de façon très précise les contours des cellules sur une image en contraste de phase et de suivre l'évolution de chaque cellule dans les expériences de time lapse. Cet outil a été conçu pour les bacilles comme *E. coli* ou *B. subtilis* ou encore *C. crescentus*. Il a donc fallu adapter certains paramètres de reconnaissance des cellules pour détecter les cellules de forme ovoïde de *S. pneumoniae*. De plus, une difficulté de ce travail est liée au fait que *S. pneumoniae* est un diplocoque. Il était important de moduler les paramètres qui permettent de repérer et séparer automatiquement les cellules filles. Aussi, nous avons optimisé les paramètres de reconnaissance des cellules pour pouvoir distinguer une seule cellule en fin de division (cellule de catégorie F, voir **figure 28**) et deux "nouvelles" cellules filles (cellules de la catégorie A, **figure 28**). Cette partie de ce chapitre s'intéresse à

l'adaptation de MicrobeTracker pour *S. pneumoniae* et montre diverses applications que permet ce logiciel.

II. B.1 Analyse d'image fixe

Dans un premier temps, il a fallu adapter les algorithmes pour reconnaître la forme de *S. pneumoniae*. Il existe plusieurs algorithmes disponibles pour la détection des cellules, les auteurs préconisant d'utiliser les algorithmes *alg2* ou *alg4* (Sliusarenko et al., 2011). Ils ont été testés pour seuiller une image de *S. pneumoniae* (**figure 32**) et s'avèrent plus ou moins correct pour le pneumocoque. L'algorithme *alg4* n'est pas du tout adapté car beaucoup de cellules ne sont pas détectées. Au contraire, l'algorithme *alg4e.coli2* permet de détecter toutes les cellules présentes sur le champ. Cet algorithme a donc servi de base pour la détection des cellules. Cependant, on peut noter sur la figure 32 que certains diplocoques ne sont pas correctement séparés. Il est donc important de trouver le "juste milieu" entre les paramètres gérant la division et la séparation des cellules. Donc ce paramètre a été travaillé selon les tutoriels fournis par le site MicrobeTracker disponible sur internet (<http://www.microbetracker.org/>) en faisant varier plusieurs facteurs i) *splitThreshold* ii) *joindist* et iii) *joinangle*. Par rapport à l'algorithme *alg4 ecoli2*, on peut remarquer que le nouvel algorithme créé (nommé *alg4s.pneumoniae2*) est capable de mieux séparer les cellules. Ces paramètres ont par la suite été utilisés pour le seuillage des cellules. Si besoin, le seuillage a été amélioré par des retouches manuelles. A l'issue de cette analyse, un fichier matlab est généré contenant toutes les informations sur la morphologie de chaque cellule.

Ce fichier est ensuite utilisé pour détecter les spots fluorescents dans les cellules en utilisant l'algorithme *SpotFinder*. Un nouveau fichier de type Matlab est alors généré contenant toutes les informations de ces foci pour chaque cellule (position dans la cellule, intensité du spot...).

Les données de ce fichier peuvent être retranscrites sous forme de graphe en utilisant certains outils du programme Matlab (<http://www.mathworks.fr/products/matlab/>). Nous nous sommes servis de la base de ces outils pour les adapter à nos besoins. Les algorithmes générés permettent de classer les cellules en fonction du nombre de foci qu'elles contiennent et d'obtenir la position de ces foci à l'intérieur des cellules en une seule opération (**figure 33**).

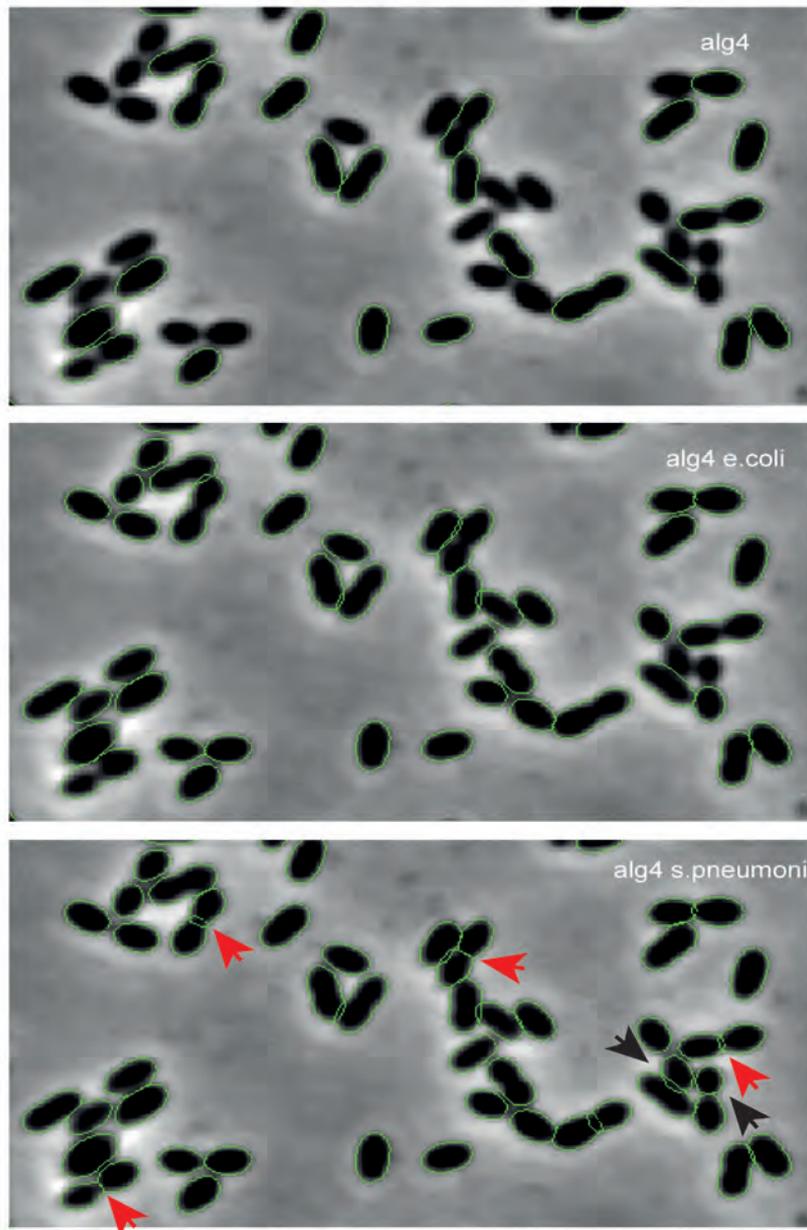


Figure 32 : Présentation des algorithmes pour le seuillage des cellules du pneumocoque par *microbeTracker*. Test des algorithmes *alg4*, *alg4 e.coli* ou *alg4s.pneumoniae2* sur des cellules en phase exponentielle de croissance de *S. pneumoniae*. Les flèches rouges marquent deux cellules adjacentes correctement seuillées avec l'*alg4s.pneumoniae2* alors qu'elles étaient repérées comme une seule cellule avec les autres algorithmes.

II. B.2 Analyse de time lapse

Un time lapse permet de suivre une cellule au cours du temps. Un des avantages de MicrobeTracker est sa capacité à pouvoir suivre l'évolution de la morphologie cellulaire. La procédure utilisée est similaire à l'analyse d'une image fixe, mise à part que le fichier matlab contient toutes les informations relatives à une cellule et sa descendance. Il est par exemple possible de distinguer le "nouveau pôle" du "pôle ancien" d'une cellule. Les outils qui complètent microbeTracker s'adaptent également à l'analyse de time lapse.

Par exemple, la fonction *kymograph* nous a permis de représenter l'évolution dans l'espace et dans le temps du signal de fluorescence de la fusion FtsZ-GFP dans des cellules compétentes et non compétentes (**figure 34**). Dans des cellules non compétentes, la fusion FtsZ-GFP est localisée durant 20 minutes au septum puis se relocalise au niveau de la zone équatoriale des cellules filles. Au cours de la première génération après l'induction au CSP, la fusion FtsZ-GFP reste localisée au septum de division pendant 35 minutes, soit un délai de 15 minutes par rapport aux cellules non compétentes, suggérant un ralentissement de la relocalisation de FtsZ vers les futurs sites de division.

III. Discussion

La visualisation directe de l'induction de la compétence en time lapse est réalisable et s'avère complémentaire des techniques de biologie cellulaire utilisées au laboratoire. Une analyse d'images statiques a mis en évidence une augmentation de la proportion de cellules en cours de septation (cellules de la catégorie II, **figure 28**) suggérant que la constriction du septum de division est ralentie dans des cellules compétentes. Ce phénomène a pu être directement observé à l'échelle de cellules uniques en suivant leur cycle cellulaire par time lapse. L'observation de FtsZ au cours du développement de la compétence montre qu'elle est correctement localisée au site de division. Cependant, on a pu constater que la relocalisation de FtsZ au niveau du futur site de division est ralentie (**figure 31**), d'environ 15 minutes (**figure 34**), dans des cellules compétentes. Nous ne savons pas si ce délai est dû au ralentissement du processus de septation ou si un mécanisme est mis en place dans les cellules compétentes pour retenir FtsZ au centre de la cellule et ralentir son repositionnement aux futurs sites de division.

Chez *E. coli* et *B. subtilis*, la localisation correcte de FtsZ au site de division dépend d'au moins deux mécanismes indépendants le système d'occlusion du nucléoïde et le système MinCD (Rothfield et al., 2005). Bien que très conservé, ces mécanismes

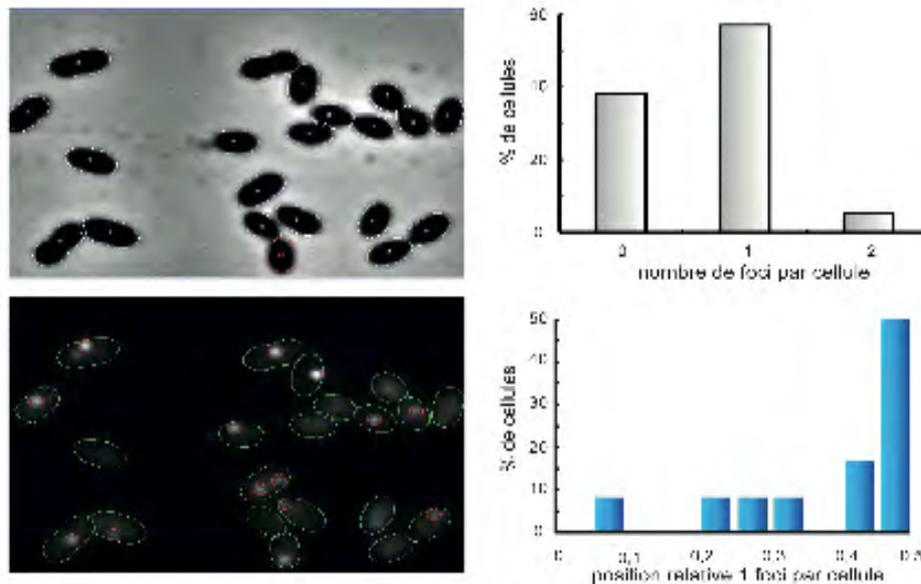


Figure 33- Exemple d'analyse effectuée sur microbeTracker. A partir de l'image en contraste de phase, les cellules sont seuillées en utilisant l'algorithme *alg4s.pneumoniae2*. Les cellules repérées sont entourées en blanc et chaque cellule est notée par un numéro. Ce fichier est utilisé par l'algorithme *spotFinder* qui repère les foci à l'intérieur des cellules (ronds rouges). L'extraction des données est exécutée par l'algorithme *compteur spotalain213* qui utilise les fonctions *spotnumhist* (nombre de spot dans la cellule) et *spotposhist* (position du foci dans la cellule). Les données obtenues pour l'image présentée sont représentées sur les graphes.

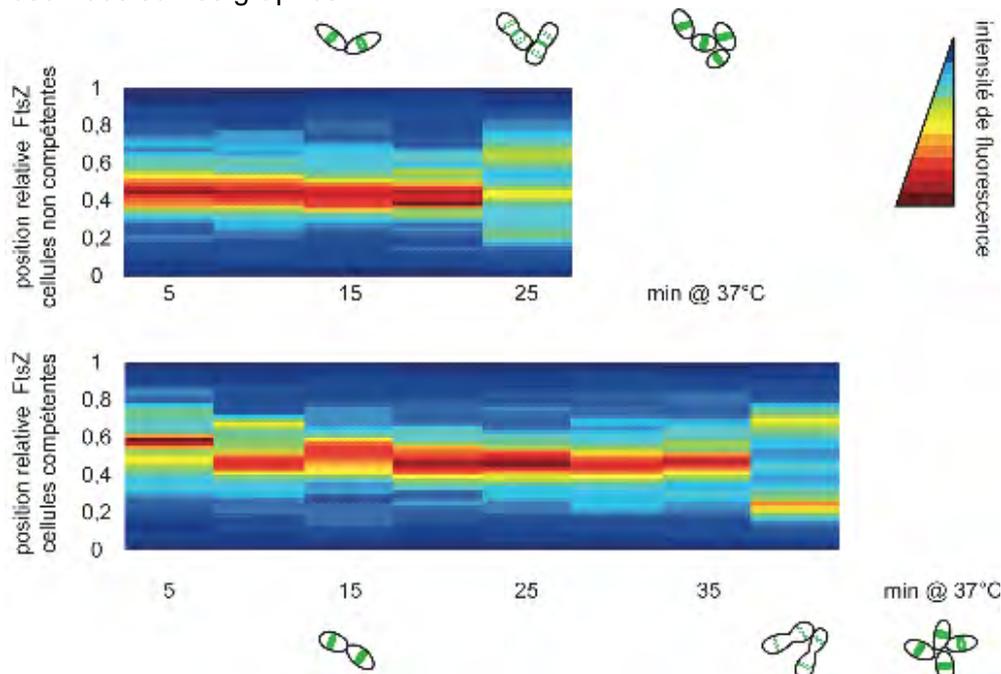


Figure 34- Représentation en kymographe de la localisation de FtsZ-GFP dans une cellule non compétente et compétente. Les cellules de la figure 31 ont été seuillées avec l'algorithme *alg4 e.coli2*. Ce seuillage sert de matrice pour utiliser la fonction *kymographe* de microbeTracker. La représentation montre le profil de fluorescence de FtsZ-GFP dans les cellules pendant le premier cycle de division qui suit l'addition de CSP, soit 25 minutes pour des cellules non compétentes et 45 minutes pour les cellules compétentes. Des schémas représentant les cellules au cours du time lapse sont présentés.

présentent des différences, notamment au niveau du moyen de localiser les protéines (la protéine DivIVA chez *B. subtilis* et MinE chez *E. coli* servent à localiser le complexe MinCD).

Chez *S. pneumoniae*, si le système d'occlusion du nucléoïde existe, il doit différer des bactéries en forme de bacille (Patel et Weaver, 2006). En revanche, il a été montré que la protéine DivIVA est présente. Elle est localisée au niveau des pôles et des septums de division et elle interagit avec un grand nombre de protéines impliquées dans la division cellulaire (Fadda et al., 2007), suggérant qu'elle joue un rôle similaire à son homologue chez *B. subtilis*. Il serait donc intéressant d'étudier la localisation de ce système lors du développement de la compétence pour voir s'il y a une différence avec la souche non induite. Ce résultat pourrait permettre de mieux comprendre le lien existant entre le cycle cellulaire et l'état de compétence.

IV. Matériel et méthodes

Les souches utilisées dans cette étude, dérivée de la souche séquencée R6 (Hoskins et al., 2001), sont listées dans la table III. Elles contiennent toutes une délétion du gène *comC*, notée *comC₀*, pour empêcher le déclenchement naturel de la compétence et pouvoir ainsi le contrôler artificiellement. La souche R1501 a été transformée par les plasmides présentés ci-dessous.

IV. A Construction des plasmides

pMB28 (CEP_M^{ftsZ-gfp}) a été généré par une ligation à trois fragments. Le fragment PCR *ftsZ* a été amplifié avec les oligonucléotides OCN51 et OCN52 à partir de l'ADN chromosomique R304 et le produit PCR *gfp(sp)* a été amplifié avec les oligonucléotides OMB4 et KanI sur une matrice du plasmide pCN35 (CEP_M^{gfp(sp)}) puis digérés respectivement par les enzymes de restriction *NcoI/XhoI* et *XhoI/BamHI*. Ces fragments ont été insérés dans le plasmide pCEP_M (Guiral et al., 2006) ouvert entre les sites *NcoI/BamHI*. Le mélange de ligation a été directement utilisé pour transformer *S. pneumoniae*. Les transformants sélectionnés en présence de kanamycine ont été analysés par PCR et le produit PCR a été séquencé pour vérifier l'absence de mutation.

IV. B Time lapse

Le protocole a été réalisé selon la procédure décrite précédemment (De Jong et al., 2011) avec quelques modifications. Brièvement, les cellules sont inoculées au 100^{ème} dans du milieu C+Y et cultivées jusqu'à une DO_{550nm} de 0,1. Pendant ce temps, des lames de microscopie recouvertes d'un coussin d'agarose ont été préparées. Une lame de verre est nettoyée avec de l'éthanol à 70% puis incubée 15 minutes à 55°C pour éliminer l'excédant

souches	génotypes	références
R304	Dérivée de R800 ; <i>nov1, rif23, str41</i> (NovR, rifR, StrR)	Mortier-Barrière et al., 1998
R800	Dérivée de R6	Lefevre et al., 1979
R1501	Dérivée de R800 ; <i>comC₀</i>	Dagkessamanskaia et al., 2004
R3136	Dérivée de R800 ; <i>comC₀, CEP_M^{ftsZ-gfp}</i> (KanR)	Cette étude

Table III – tableau des souches

plasmides	description	références
pCEP	Dérivé du pSC101 (bas nombre de copies) s'intégrant à la plateforme CEP (kanR)	Guiral et al., 2006
PCN35	Dérivé du pCEPX portant la gène <i>gfp(sp)</i> (KanR)	Martin et al., 2010
pMB28	Dérivé de pCEP _M portant la fusion <i>ftsZ-gfp(sp)</i> (KanR)	Cette étude

Table IV – tableau des plasmides

amorces	description	Séquences*
OCN51	amorce sens amplification <i>ftsZ</i> sur ATG avec site <i>BspHI</i>	^{5'} cggtcatgacattttcatttgatacagctgct ^{3'}
OCN52	amorce antisens amplification <i>ftsZ</i> sans codon stop et site <i>XhoI</i>	^{5'} ctgctcgagacgatttttgaaaaatggagggtgatcca ^{3'}
OMB4	amorce sens amplification <i>gfp(sp)</i> avec un linker et site <i>XhoI</i>	^{5'} agactcggagggtccggaatggttctaaagggtgaag ^{3'}
KanI	Amorce antisens amplification <i>gfp(sp)</i> sur PCN35	^{5'} atcatgtcctttcccgtccac ^{3'}

Table V – tableau des oligonucléotides. * les sites de restriction sur les amorces sont marqués en gras

d'éthanol. Un cadre "gene frame" (ABgene ; 17*28mm) a été appliqué sur la lame propre en suivant les instructions du fabricant. Le cadre a ensuite été rempli avec 500µL de milieu C+Y agarose 1,2% (120mg d'agarose pour 10mL de C+Y). L'agarose High resolution low-melting n'est pas adapté car les cellules dérivent dans le temps donc de l'agarose "classique" est utilisé (SIGMA, A9539). Les lames ont été refroidies à 4°C pendant 60 minutes puis réchauffées 5 minutes à 37°C juste avant le dépôt des échantillons.

A partir de ce moment, les étapes doivent être réalisées rapidement pour éviter que l'agarose ne sèche trop. La partie supérieure du "gene frame" est retirée et des bandes de 1mm de large sont coupées dans l'agarose pour séparer les différents échantillons. Si besoin, les cellules sont incubées 30 secondes avec du CSP-1 synthétique et déposées rapidement sur le coussin d'agarose. Les cellules sont alors incubées à 37°C dans la chambre thermostatée du microscope. La fonction perfect focus (PFS) du microscope est activée pour éviter de perdre le focus. Les images sont capturées toutes les minutes en contraste de phase et à différents temps comme indiqué dans les légendes des figures pour la fluorescence. Les images en contraste de phase et les images à fluorescence sont capturées avec un microscope à épifluorescence inversé, le microscope motorisé Nikon Ti-E/B équipé du système perfect focus (PFS), d'un objectif à contraste de phase (CFI Plan Fluor DLL 100X oil NA1.3), d'un filtre Semrock GFP (Ex : 482BP35; DM : 506; Em : 536BP40), et une caméra OrcaR2 (Hamamatsu) couplé au logiciel d'acquisition Nis-Element (Nikon).

IV. C Analyse d'image par microbeTracker

Les images ont été converties dans le format tiff à partir du logiciel d'acquisition Nis-Element. Les images de contraste de phase et de fluorescence ont été placées dans deux fichiers différents. Ces images peuvent être ainsi chargées dans microbeTracker. Le seuillage des cellules est réalisé en utilisant l'algorithme *alg4s.pneumoniae2* pour les images fixes ou l'*alg4e.coli2* pour les time lapse en cochant la case « compute signal1 ». Le fichier meshes obtenu est enregistré et est utilisé pour l'analyse effectuée par l'algorithme *spotFinderZ*. Les données sont ensuite traitées en utilisant les outils disponibles (<http://microbetracker.org/help/helpTools.htm>) ou les algorithmes écrits au laboratoire.

Chapitre III

Localisation du complexe de transport de l'ADN transformant

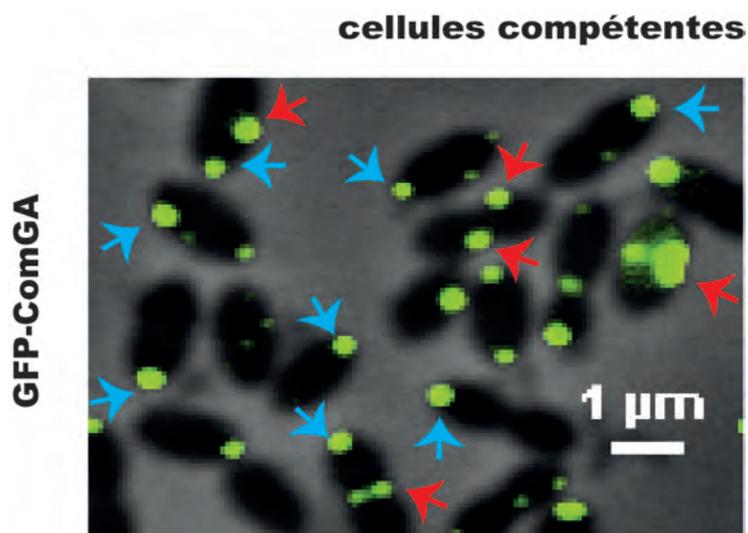


Figure 35- Localisation polaire et septale de la fusion GFP-ComGA dans des cellules compétentes. Une construction *gfp-comGA* est placée sous les signaux d'expression de l'opéron *comG* au locus naturel de *comGA*. Les cellules, après avoir été induites au CSP (25ng.mL^{-1}), sont observées par microscopie à fluorescence au pic de transformation. Les flèches bleues et rouges représentent respectivement les localisations polaires et septales. Barre d'échelle $1\mu\text{m}$.

I. Introduction

Ce chapitre regroupe un ensemble de résultats portant sur la localisation subcellulaire de plusieurs éléments du Transformasome (**figure 9**). Pour cela, plusieurs composants clés du Transformasome ont été fusionnés à la protéine fluorescente GFP (ou ses dérivées, YFP et CFP) comme la fusion GFP-ComGA.

ComGA est l'ATPase cytoplasmique impliquée dans la mise en place du pseudo-pilus. L'analyse par microscopie à fluorescence de la fusion GFP-ComGA montre que la protéine est présente dans toutes les cellules d'une culture compétente (**figure 35**). Elle se présente majoritairement sous forme de foci concentrés à la fois au septum et aux deux pôles de chaque cellule. Cette localisation multiple dans les cellules est différente de celle observée pour les autres composants membranaires du Transformasome étudiés (voir ci-après). Chez *B. subtilis*, ComGA jouerait deux rôles dans le processus de transformation. Elle est nécessaire pour l'assemblage du pseudo-pilus et elle serait impliquée dans la reprise du processus de division au moment de la sortie de l'état de compétence. Il est donc possible que ComGA exerce aussi plusieurs fonctions chez *S. pneumoniae* et que ces localisations septales et polaires reflètent ces différentes fonctions. Pour comprendre le schéma de la localisation spécifique de ComGA chez le pneumocoque, les perspectives de ce travail seraient d'étudier d'une part la localisation d'autres composants du pseudo-pilus, et d'autre part de rechercher des liens entre les protéines impliquées dans le processus de division et la protéine ComGA.

Le manuscrit ci-après détaille l'analyse des localisations de la nucléase EndA et le récepteur membranaire de l'ADN ComEA au cours du développement de la compétence.

Midcell relocation of transforming-DNA-uptake nuclease EndA during pneumococcal competence

Mathieu J. Bergé^{1,2}, Bernard Martin^{1,2}, Alain Kamgoué^{2,3}, Patrice Polard^{1,2}, Nathalie Campo^{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; ³Centre National de la Recherche Scientifique, LMGM-UMR5100, F-31000 Toulouse, France

For correspondence: Jean-Pierre Claverys; Université Paul Sabatier-CNRS, LMGM, Bât. IBCG, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France; Tel. (+33) 561 33 59 11; Fax (+33) 561 33 58 86; E-mail claverys@biotoul.fr; Nathalie Campo; Université Paul Sabatier-CNRS, LMGM, Bât. IBCG, 118 route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France; Tel. (+33) 561 33 59 11; Fax (+33) 561 33 58 86; E-mail campo@biotoul.fr

Transformation is a widely distributed feature of bacterial life, permitting the uptake and chromosomal integration of environmental DNA by bacterial cells in the competent state. It requires a specialized membrane-associated machinery for binding of exogenous double-stranded DNA (dsDNA), internalization of single-strand DNA (ssDNA) fragments, and homologous integration of ssDNA into the recipient genome. In the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*, degradation of dsDNA into ssDNA is mediated by a membrane-located endonuclease, EndA. This enzyme, which also plays an important function as a bacterial virulence factor, is constitutively expressed and is likely to be recruited by the DNA uptake complex. Here, we report that the EndA nuclease is uniformly distributed in the membrane of non-competent cells and redistributed into foci upon competence induction. This specific relocation depends on the competence-specific DNA-receptor, ComEA. We further show that EndA and ComEA appear preferentially located at midcell cellular positions in cultures exhibiting optimal transformation efficiency. As competence proceeds and long after its completion, the fraction of cells containing ComEA foci away from midcell and near the pole increased. We propose that the ComEA protein emerges at midcell and subsequently diffuses into the membrane towards the pole, where it is degraded. Finally, using fluorescently-labeled donor DNA, we present evidences that DNA binding and uptake occur at midcell. Together, our results are consistent with a model in which active entry pore for DNA transformation are located at the septum in pneumococcal cells.

DNA uptake / EndA nuclease / Natural transformation / *Streptococcus pneumoniae* / virulence nuclease

Bacterial transformation, a programmed mechanism for genetic exchange, is based on the uptake and integration of extracellular DNA into the recipient genome. Gram-positive and Gram-negative microorganisms use related proteins assembled into a highly integrated machine to internalize, protect, and process transforming DNA, with the only known partial exception, *Helicobacter pylori* (Chen et al., 2005; Claverys et al., 2009; Hofreuter et al., 2000; Kruger and Stingl, 2011).

Transporting DNA from the extracellular medium into the cytoplasm is a complex process. The incoming DNA must cross the outer membrane (in Gram-negative bacteria), the cell wall and the cytoplasmic membrane. Access of exogenous DNA to the cytoplasmic membrane

is dependent on the formation of a structure evolutionary related to type IV pili and type-2 secretion systems, the competence pseudopilus, ((Chen et al., 2005; Chen et al., 2006; Dubnau, 1999). The architecture and the functioning of the pseudopilus are still poorly understood, but its proposed function is to secure the binding of exogenous double stranded DNA to the cell surface by conveying it to the membrane bound receptor, ComEA. DNA is then delivered to a nuclease that degrades one strand while its complement is driven into the cytosol by the DNA translocase ComFA through a transmembrane channel formed by ComEC (Briley et al., 2011; Dubnau and Cirigliano, 1972; Lacks and Greenberg, 1973; Lacks et al., 1974; Mejean and Claverys, 1993; Morrison and Guild, 1973). A 3'-5' polarity of DNA transport was observed in *Streptococcus pneumoniae* (Mejean and Claverys, 1988) and *H. influenzae* (Barany et al., 1983). A transport rate of 80 nt.s⁻¹ at 37°C and 100 nt.s⁻¹ at 31°C was determined in *Bacillus subtilis* and *S. pneumoniae* respectively (Maier et al., 2004; Mejean and Claverys, 1993). In the later species, it was shown that uptake and degradation of DNA occur at similar rates and proceed with opposite polarities suggesting that transport of one strand is coupled with degradation of its complement (Mejean and Claverys, 1993).

Only in the streptococcal system has the nuclease responsible for degradation of the nontransported strand been identified (Lacks et al., 1974, 1975). EndA is a sequence non-specific endonuclease bound to the membrane (Lacks and Neuberger, 1975; Rosenthal and Lacks, 1977) for which the structure has recently been solved (Moon et al., 2011) and the nuclease active site uncovered (Midon et al., 2011). Besides its role in DNA uptake, the enzyme plays an important function as a bacterial virulence factor during the establishment of invasive infections by degrading the DNA scaffold of neutrophil extracellular traps, enabling streptococci to escape the innate immune response in mammals (Beiter et al., 2006). How EndA associates with the bacterial membrane and whether the nuclease is exposed to the cell surface or not are still unclear (Moon et al., 2011). However, the inability of EndA to degrade DNA during the transformation process in the absence of components of the pseudopilus or ComEA, suggests that, despite its membrane location, EndA cannot access transforming DNA unless the transformation pseudopilus is present to facilitate peptidoglycan crossing and that ComEA is required to deliver dsDNA to EndA (Berge et al., 2002). Conversely, degradation was still effective in the absence of ComEC, indicating that neither the pseudotransformation pilus nor the dsDNA receptor ComEA rely on the presence of the transmembrane

channel for proper activity. Remarkably, EndA is the only known component of the DNA entry pore that is constitutively expressed in noncompetent cells and is not induced at competence (Peterson et al., 2004). Hence, the proposal that EndA may be recruited by the DNA uptake complex assembled in competent cells (Rosenthal and Lacks, 1980), thereby triggering a switch in its activity as a DNA entry nuclease (Midon et al., 2011; Puyet et al., 1990).

Several lines of evidence indicate that the active subcellular site for DNA transport during the transformation process resides at the cell pole in *B. subtilis*. Both membrane and cytosolic components of the transformation apparatus associate with the poles in competent cells (Hahn et al., 2005; Kaufenstein et al., 2011; Kidane and Graumann, 2005; Kramer et al., 2007; Tadesse and Graumann, 2007) providing support for the existence of a unique machine to internalize and process transforming DNA into recombinant products. Notably, this localization pattern is dynamic as the accumulation and delocalization of proteins at the cell pole correlate with the development and the decline of transformability in the culture (Hahn et al., 2009; Hahn et al., 2005). Moreover, visualization of fluorescently labeled DNA and single-molecule experiments with laser tweezers indicated that DNA binding and internalization also occurred in the polar region. Similarly, the first step of DNA uptake in the Gram-negative bacterium *H. pylori*, i.e. translocation across the outer membrane into the periplasm, was found at the cell poles (Stingl et al., 2010) suggesting that transformation machineries may occupy polar positions, at least in rod-shaped bacteria.

Here we are concerned with the Gram-positive ovoid-shaped bacterium *S. pneumoniae* that is usually found as a diplococcus or as short chains of cells. A striking feature of this species is its ability to abruptly and simultaneously develop competence (i.e., the ability to internalize ssDNA) in nearly all cells of an exponentially growing culture in response to a peptide pheromone, CSP (competence-stimulating peptide) (Havarstein et al., 1995) for a period of time as short as 20 minutes. CSP induction ultimately activates the synthesis of a competence-specific alternative σ factor (σ^X) (Lee and Morrison, 1999) required for expression of *com* genes that encode components of the transformation machinery (Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004). We describe the localization of components of the DNA entry pore from the onset of competence development to their disappearance in the cell. We show that the constitutively expressed EndA nuclease concentrates into foci upon competence induction. This specific localization depends on the presence of the DNA-receptor, ComEA. Moreover, EndA and ComEA appear preferentially located at midcell cellular positions in cultures exhibiting optimal transformation efficiency. Similarly, DNA binding was found about the cell centre. Together, our results are consistent with a model in which active entry pore for DNA transformation are located at the septum in pneumococcal cells.

Results

Excess EndA does not impair transformation. As a first step to analyze the distribution of the DNA entry pore in pneumococcal cells we sought to compare the localization of the EndA nuclease in competent and non-competent cells. EndA is the product of the last gene of

the *murA-epuA-endA* operon that is constitutively expressed in pneumococcal cells (Lacks et al., 1974; Puyet et al., 1990). To determine the localization of EndA, we constructed strains expressing N-terminal GFP or YFP fusions to EndA. Genes encoding for GFP-EndA and YFP-EndA were respectively introduced into the *endA* chromosomal locus replacing the native *endA* gene (to give strain R2762, *gfp-endA*), or at an ectopic chromosomal site, the CEP platform (Guiral et al., 2006), under the control of the maltose inducible promoter (Fig. S1A). The *endA* natural copy was subsequently disrupted in the later background resulting in strain R3243 (CEP_M-*yfp-endA*) (Table S1).

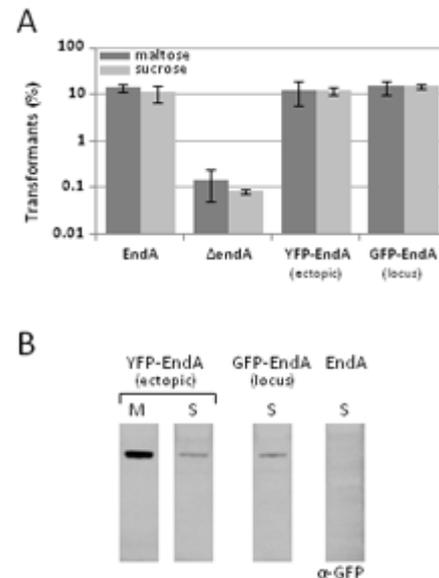


Fig. 1. Overproduction of YFP-EndA does not impair transforming activity. (A) Transforming activity of wild type strain (EndA, R1501), *endA* mutant (Δ EndA, R951) and strains harboring the maltose-inducible YFP-EndA fusion (R3243) and the GFP-EndA fusion expressed from the *endA* chromosomal locus (R2762) (see also Fig. S1). To induce or repress production of YFP-EndA in competent cells, precultures were prepared in medium supplemented with 1% maltose (dark grey) or 0.3% sucrose (light grey) respectively as described in the *Materials and Method*. (B) Immunoblot analyses of YFP-EndA and GFP-EndA levels. Cells were grown in C+Y medium supplemented with 1% maltose (M) or 0.3% sucrose (S) to early exponential phase and induced to develop competence by CSP addition for 10 minutes. Whole cell extracts were prepared and analyzed by immunoblot using anti-GFP antibodies. The level of the fusion protein is indicated relative to that of GFP-EndA expressed from the endogenous locus. Signals were quantified using a Fujifilm LAS-4000 luminescence image analyzer. Immunoblots were from the same gel (and the same nitrocellulose membrane) but control lanes were removed for clarity. Strains used: R3243 (YFP-EndA), R2762 (GFP-EndA) and R1501 (EndA) (see also Fig. S1).

All the GFP-EndA or YFP-EndA fusions used in this study were functional. Functionality was assessed by measurement of transformation frequency (Fig. 1A). While an *endA* mutant strain exhibited a residual transforming activity close to 1% of wild type (0.14% for the mutant strain compared to 14.4% for wild-type) as previously described (Berge et al., 2002), the GFP-EndA fusion expressed from the endogenous *endA* chromosomal locus exhibited transformation efficiency to

wild-type levels. Similar results were obtained with the YFP-EndA fusion expressed from the CEP ectopic locus under the control of a maltose inducible promoter in an *ΔendA* background. Interestingly, modulation of the level of *yfp-endA* expression did not affect transformation efficiency. Western blot analysis confirmed that full induction with maltose resulted in approximately 7-fold overproduction of the fusion protein whereas maximal repression in the presence of saccharose led to an expression level close to the amount of GFP-EndA expressed from the endogenous locus (Fig. 1B and Fig. S1B). Altogether, we conclude that N-terminal fusions of fluorescent proteins to EndA are functional at least to achieve transformation and that larger amount of the protein does not impair transforming activity.

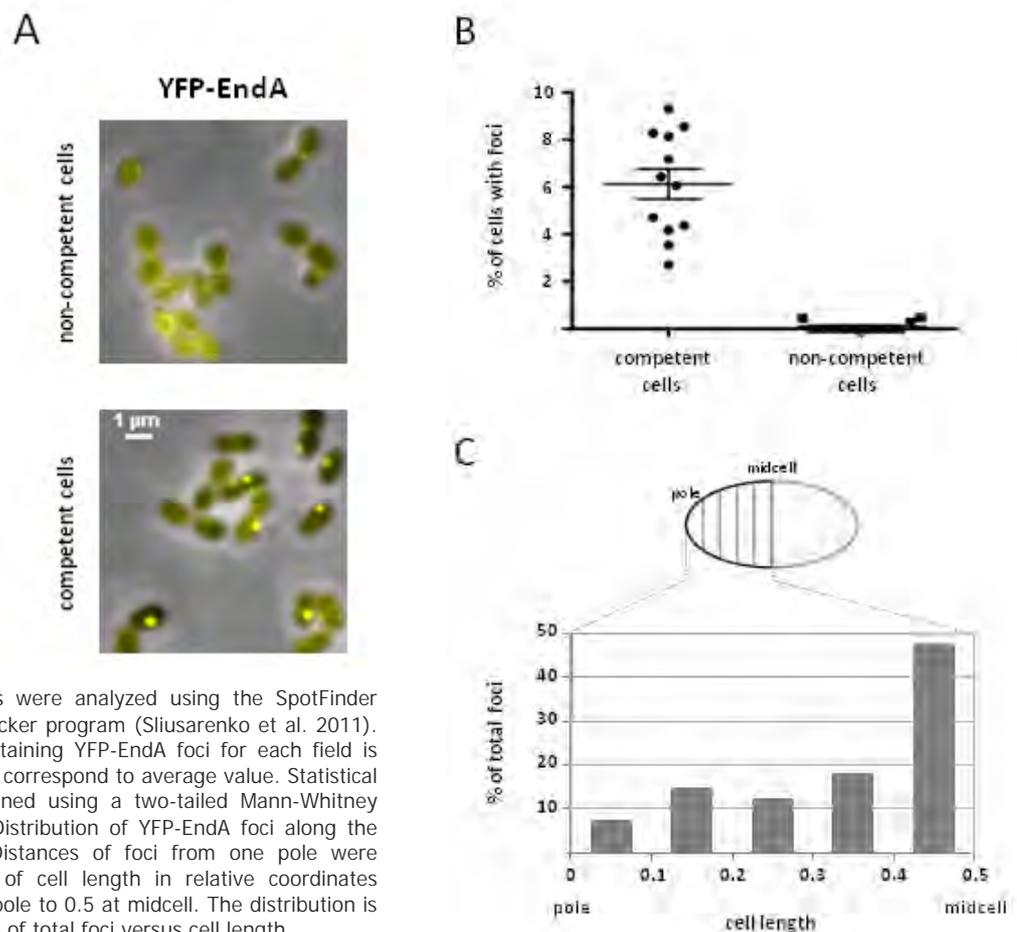
EndA redistributes into foci in competent cells. Cells were grown in C+Y medium with maltose to early exponential phase as described in the *Materials and Methods* and induced or not to develop competence by CSP addition. Fluorescence microscopy analysis indicated that the YFP-EndA signal was distributed all around the membrane in non-competent cells (Fig. 2A). The fluorescent pattern appeared different in cultures examined approximately 10 minutes after CSP addition, a time corresponding to the maximum of transformation efficiency in the population ((Alloing et al., 1998) and Fig. 3A). While the signal in the membrane seemed attenuated in all cells, a number of these cells exhibited one or two discrete fluorescent foci. We analyzed over

2,500 cells using the SpotFinder tool from the image analysis program MicrobeTracker (Sliusarenko et al., 2011), to automatically detect the cells containing foci (Fig. 2B). The proportion of cells having fluorescent YFP-EndA foci represented about 8% (201 cells over a total of 2563 cells) of the population in competent cultures (Fig. 2B) with almost all of these cells (185 of 201) containing only one focus. Occasionally, SpotFinder could also detect cells with foci in non-competent cultures (3 cells over a total of 2823, Fig. 2B). A closer examination of these cells revealed that the shape of the foci were irregular and generally less bright than the ones found in competent cells suggesting that these signals were false positive due to a higher concentration of fluorescence at the septum which is composed of a double membrane. The sub-cellular positions of EndA fluorescent foci were systematically recorded in relative coordinates extending from 0 at the pole to 0.5 at the center of the cell and plotted as shown in Figure 2C. Strikingly, about half of the foci (47%) appeared clustered about the cell centre with only 7% of the cells containing a focus near the cell poles.

Similar fluorescent foci were also seen in competent cells containing the GFP-EndA construct expressed from the endogenous locus (Fig. S2A). However, the signal intensity in these cells was weaker, often barely detectable above the background signal, rendering image analysis difficult. Nevertheless, these images established that the results described above are not an artifact arising from ectopic expression of EndA. Moreover the detection of foci could not be the consequence of aggregates formation induced by overexpression of the fusion protein

Fig. 2. EndA concentrates into foci in pneumococcal competent cells. Cells

harboring the YFP-EndA fusion (strain R3243) were grown in C+Y medium with maltose at 37°C to early exponential phase and induced or not to develop competence by CSP addition for 10 minutes in presence or absence of transforming DNA. (A) Fluorescent images of cells containing the YFP-EndA fusion. The YFP fluorescence images were false colored yellow and overlaid on phase contrast images. *Upper panel:* non-competent cells, *lower panel:* competent cells. Bars, 1 μm. (B) EndA forms foci in a subset of the competent cells population. Four fields of several hundred cells each from three independent experiments were analyzed using the SpotFinder tool from the MicrobeTracker program (Sliusarenko et al. 2011). The percent of cells containing YFP-EndA foci for each field is reported. Horizontal lines correspond to average value. Statistical significance was determined using a two-tailed Mann-Whitney test ($p = 0.0003$). (C) Distribution of YFP-EndA foci along the long axis of the cell. Distances of foci from one pole were recorded as a function of cell length in relative coordinates extending from 0 at the pole to 0.5 at midcell. The distribution is plotted as the percentage of total foci versus cell length.



during competence development since the level of the protein remained broadly stable before and after CSP addition as shown by immunoblot analysis (Fig. S2B). We conclude that the EndA nuclease behaves as a dynamic protein localized all around the membrane in non-competent exponentially growing cells and redistributing into foci upon competence induction.

EndA has a dynamic localization pattern in competent cells. Our data indicate that competence development in pneumococcal cultures causes the relocation of the EndA nuclease from a uniform distribution in the cytoplasmic membrane into foci in a fraction of the cells. The fact that foci were detected in a subset of the cells only was puzzling (appeared paradoxical) since all pneumococcal cells are able to develop competence. However, Figure 2 shows the subcellular localization of YFP-EndA at a specific time

point, 10 minutes after competence induction, whilst the competence state lasts for about 20 minutes (Alloing et al., 1998). We therefore wondered whether the proportion of cells containing a focus could vary over time during this differentiation process. To investigate this, we measured the frequency of YFP-EndA foci in pneumococcal cell cultures at different time after competence induction (*Material and Methods*). The proportion of cells containing at least one focus increased rapidly and reached a maximum of about 20% 8 minutes after CSP addition (Fig. 3A). A drastic decrease of this proportion was then observed for the next 10 minutes. About 60 minutes after CSP addition, the frequency of cells containing foci was close to the one measured in non-competent cells. Remarkably, the kinetics of appearance of the transformants paralleled the evolution of the number of cells with foci over time suggesting a link between the capacity of YFP-EndA to concentrate into foci and DNA-uptake activity.

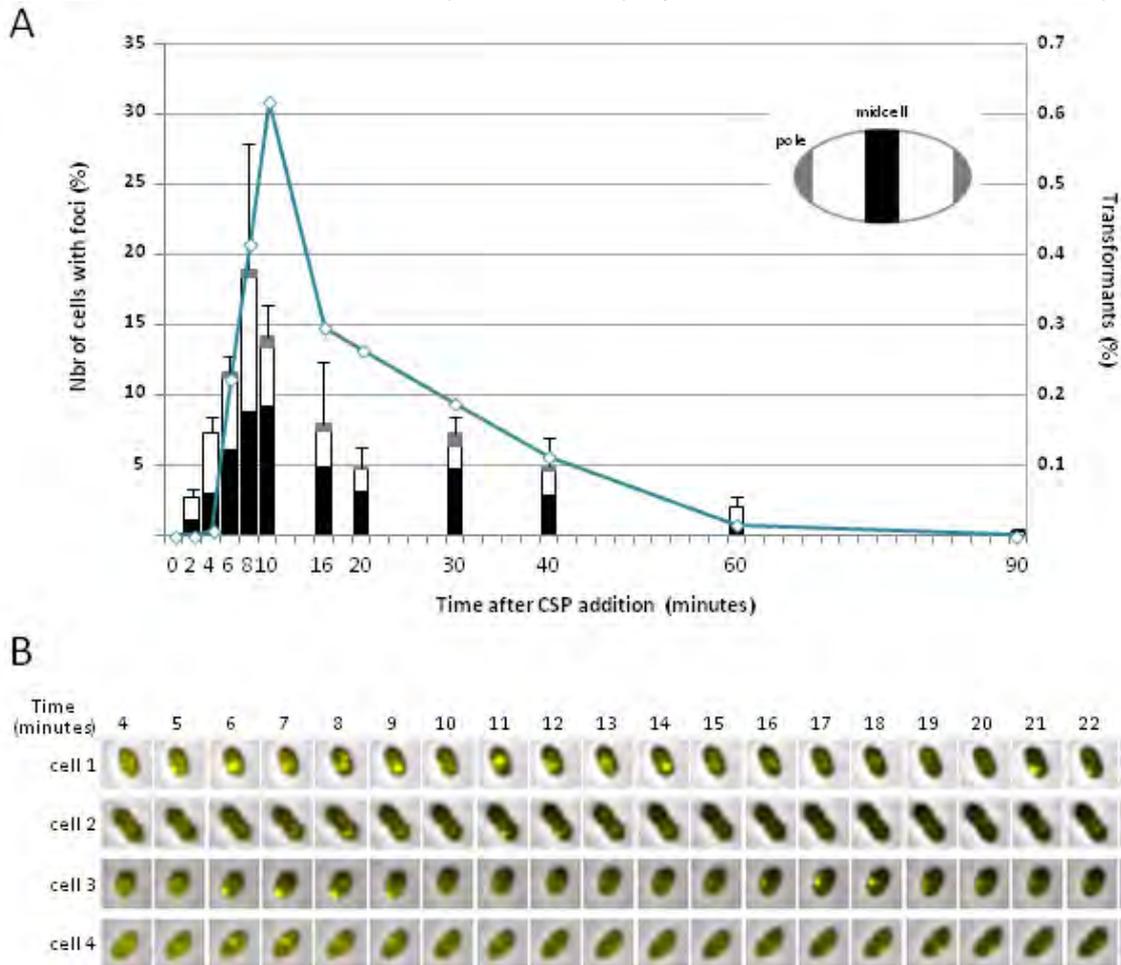


Fig. 3. Dynamic behavior of EndA in competent cells. (A) Schematic presentation of a time course fluorescence microscopy experiment showing the correlation of transforming activity with the fraction of cells containing YFP-EndA foci and the position of these foci in cultures developing competence. Cells containing the YFP-EndA fusion (strain R3243) were grown to mid-exponential phase in C+Y medium with maltose at 37°C and induced to develop competence by CSP addition. At indicated times (minutes) cells were collected for microscopy analysis and measurement of transformation efficiency. The subcellular position of YFP-EndA foci was determined as described in the legend of Fig. 2. Black shading shows the frequency of cells (% of total cells measured) containing foci localized closed to midcell; grey shading represents the cells containing polar foci and white shading represents cells containing foci in between the center and the polar regions. A schematic diagram depicting a pneumococcal cell with the polar and the midcell regions is shown. For each time point, four fields of several hundred cells each from two independent experiments were analyzed. Error bars indicate standard deviation for the percent of total cells containing foci. Blue diamonds indicate transforming efficiency. For each time point, aliquots were exposed to DNA for 3 min and then incubated for a further 15 minutes before plating to measure the frequency of transformation (*Materials and Methods*). (B) Fluorescence time lapse microscopy of strain R3243 (YFP-EndA) induced to develop competence by CSP addition. The YFP fluorescence images were false colored yellow and overlaid on phase contrast images. Four representative cells are shown. Time after CSP addition is indicated in minutes. See also [Movie S1](#). Bars, 1 μm.

Several explanations could account for the variation of the number of cells containing a focus in the population. The foci could arise gradually in a subset of the population, be maintained for about 10 minutes and then EndA could relocate evenly in the cytoplasmic membrane. If the capacity of YFP-EndA to concentrate into foci is linked with transformability, this possibility seems unlikely because it implies that foci would form in a minority fraction of the cells even though all cells in the culture undergo competence. Another possibility is that the stability of the focus lasts for a few minutes only. Because the population is asynchronous, foci would be detected in a small fraction of the cells at a specific time point, but by the end of the competence process, foci would have formed in all cells. Alternatively, foci keep appearing and disappearing in every cell during the whole competence process.

To discriminate between these possibilities, we performed a time lapse microscopy analysis. Cells containing the YFP-EndA fusion grown to early exponential phase were spotted onto agarose after CSP addition and images were acquired every minute for 1.5 hours. EndA foci were eventually able to form in all cells over time. As shown in Fig 3B and Movie S1, the stability of single focus appeared transient, lasting only a few minutes, but several foci could form successively in the same cell. This experiment confirms the dynamic behavior of EndA and supports a model in which the nuclease is recruited at a specific location during the development of competence.

The dsDNA receptor ComEA is required for competence-specific relocation of EndA. All components of the transformation machinery, with the exception of EndA, are the products of so-called “late *com* genes” under the control of the competence-specific alternative σ factor (σ^X), itself encoded by the *comX* gene. To explore the possibility that the CSP-dependent dynamic localization of EndA results from its recruitment by the DNA entry pore, we examined the distribution of YFP-EndA in a *comX* mutant strain induced to develop competence. In this strain, only early *com* genes are expressed in response to CSP (Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004). Consistent with the idea that late *com* gene expression is required for EndA to concentrate into foci, the localization of YFP-EndA in competent cells was indistinguishable from non-competent cells (Fig. 4A). The fluorescent signal was evenly distributed in the cytoplasmic membrane and false positive foci were detected in less than 1% of the cells. We conclude that the localization of EndA into foci during competence development likely involves a late competence protein.

To determine the requirement for the assembly of the EndA nuclease as a focus during competence, we investigated the localization of the fluorescent EndA protein fusion in strains lacking components of the transformation machinery encoded by late competence genes. We engineered pneumococcal strains carrying the YFP-EndA fusion and transposon insertions in the *comGA*, *comEC*, *comFA* and *comEA* genes (Table S1). We found that YFP-EndA was still able to concentrate into foci upon competence induction in a subset of the cell population lacking ComGA, ComEC or ComFA proteins (Fig. 4A). In these mutants, YFP-EndA foci remained preferentially localized in the midcell region 10 minutes after CSP induction (Fig. 4B) as was found in wildtype

cells (Fig. 1C). These data indicate that the ability of EndA to form foci and to localize at the center of the cell is independent of ComGs proteins, ComEC or ComFA.

In contrast, EndA failed to form foci and remained uniformly localized all around the cytoplasmic membrane even after CSP addition in the absence of ComEA (Fig. 1C). To rule out the possibility that the failure to form foci was due to a degradation of the protein, we monitored EndA levels in all mutants background. Immunoblot analysis demonstrated that the amount of YFP-EndA was similar to wildtype levels in the absence of ComX, ComGA, ComEC, ComFA or ComEA (Fig. 4C).

Altogether, these results indicate that the proper localization of EndA during competence relies on the dsDNA receptor late competence protein ComEA, independently of other components of the DNA uptake machinery including the transformation pseudopilus (ComGA and other ComGs proteins), the transmembrane channel (ComEC) and the DNA translocase ComFA.

Localization of the ComEA dsDNA receptor. We reasoned that if the ComEA protein anchors EndA during competence development, the two proteins should show the same (or at least overlapping) subcellular localization pattern. To test whether the two proteins co-localize in pneumococcal competent cells, we attempted to perform a double-labeling experiment. Specifically, we analyzed a strain R3244 that contained the maltose inducible *yfp-endA* fusion and a CFP fusion to ComEA (CFP-ComEA) expressed from its native chromosomal locus and under the control of its native promoter. The CFP-ComEA fusion restored transformation activity to near wildtype levels in cells lacking ComEA (data not shown). Yet, although immunoblot analysis confirmed that the fusion proteins were correctly synthesized during competence development, a significant amount of proteolysis of the CFP-ComEA protein was found (Fig. S3). The weakness of the CFP fluorescent signal precluded the observation of both CFP-ComEA and YFP-EndA proteins in the same cell. Interestingly, however, the YFP-EndA fluorescence, which is easily visible in single labeled-cells, appeared barely detectable in the double-label background. We tentatively explain this observation as due to an encumbrance of the fluorescent fusion protein brought together through a putative interaction between ComEA and EndA.

Next, to rigorously analyze the subcellular localization of ComEA, we used a strain harboring a fusion of ComEA to the GFP fluorescent protein which is significantly brighter than the CFP derivative. In addition and unlike the CFP-ComEA fusion, for reasons that we do not understand, the GFP-ComEA fusion protein remained intact throughout the competence process (Fig. S3). Cells were induced to develop competence and visualized by fluorescence microscopy over time. Similarly to the EndA protein, ComEA appeared concentrated into foci in a subset of the competent cells and the number of cells containing GFP-ComEA foci increased progressively until transformability reached a maximum in the culture (Fig. 5). Yet, while the fraction of cells containing EndA foci rapidly decreased 10 to 20 minutes after competence induction and virtually disappeared from the culture by 60 minutes, the proportion of cells containing GFP-ComEA foci remained stable in competent cells (up to 30 to 40 minutes after CSP addition) and persisted long after competence completion. For example, as many as 19% of the cells still contained a comEA focus 60 minutes after

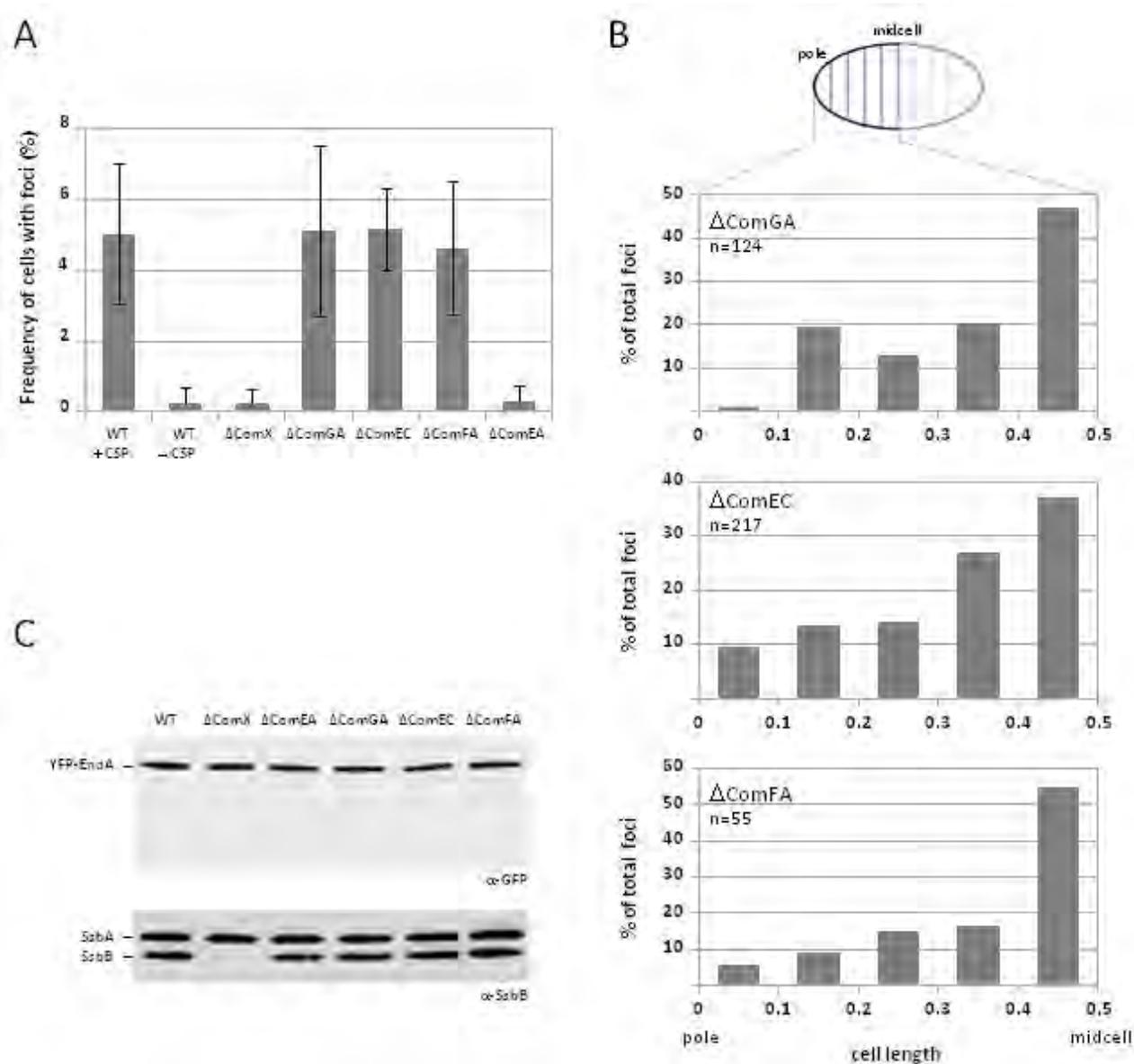


Fig. 4. Competence specific localization of EndA depends on ComEA but not ComGA, ComEC or ComFA. (A) The percent of cells containing YFP-EndA foci is reported for wildtype competent (WT + CSP) or non-competent (WT - CSP) cultures (strain R1501), and Δ ComX (R3245), Δ ComGA (R3247), Δ ComEC (R3484), Δ ComFA (R3485) and Δ ComEA (R3246) mutants induced to develop competence. Cells were grown in C+Y medium with maltose at 37°C to early exponential phase and induced or not to develop competence by CSP addition for 10 minutes. For each strain, at least three fields of several hundred cells from a minimum of two independent experiments were examined. Error bars indicate standard deviation. (B) Distribution of YFP-EndA foci along the long axis of the cell in Δ ComGA, Δ ComEC and Δ ComFA mutants. n: number of cells containing foci analyzed. See legend of Fig. 2C for details. (C) Immunoblot analyses of YFP-EndA levels in wildtype, Δ ComX, Δ ComEA, Δ ComGA, Δ ComEC and Δ ComFA mutants induced to develop competence by CSP addition for 10 minutes. Whole cell extracts were prepared and analyzed by immunoblot using anti-GFP antibodies (*top panel*). As a control for competence induction, the level of the late competence protein SsbB (absent in Δ ComX mutant) and the constitutively expressed SsbA (Claverys et al., 2009) were monitored using anti-SsbB antibodies (*bottom panel*).

competence induction. A closer examination of the positioning of EndA and ComEA foci, suggests that these two proteins occupy similar locations at early time points following CSP addition (compare Fig 3A and Fig. 5). Specifically, the first foci were detected as early as 4 minutes post-induction in 7% and 10% of the cells for EndA and ComEA respectively. These foci were clustered at or around the cell center suggesting that foci emerged at mid-cell. The fraction of cells containing a focus subsequently increased markedly within the first 8

minutes with the vast majority of the foci remaining over the center half of the cell. As mentioned above, at later time points, EndA foci gradually disappeared mirroring the decay of transformability in the cell population. By contrast, ComEA foci persisted in cells that were not competent for transformation anymore. In these cells (30 to 40 minutes after CSP addition and beyond), foci appeared to preferentially localize away from midcell with a fraction of the cells containing foci at the poles. An interpretation of this localization pattern is that ComEA

diffuses in the membrane from midcell toward the poles. The fact that ComEA foci did not accumulate at the pole further suggests that these foci were progressively degraded in this region. Eventually, the fraction of cells containing ComEA foci diminished to 6% at 90 minutes (with no foci at midcell) and completely vanished by 120 minutes. Collectively, these data suggest that while ComEA foci and EndA foci emerged both at midcell, EndA proteins actively relocated all around the cytoplasmic membrane shortly after DNA uptake and ComEA foci were degraded at the pole.

DNA binding occurs at septal positions and colocalize with EndA and ComEA. The correlation between transformation efficiency and the medial localization of EndA and ComEA prompted us to hypothesize that DNA uptake might occur at midcell in *S. pneumoniae*. To explore this possibility, we monitored the location of DNA binding at the surface of competent cells by visualizing Cy3-fluorescently labeled donor DNA. Taking into account that internally modified DNA with multiple fluorophore may affect the structure of the macromolecule and interfere with DNA transport (Hahn et al. 2005; Stingl et al.; 2010) and that DNA enters the cell with a 3'-5' polarity (Méjean and Claverys, 1988), we used a DNA fragment harboring a single Cy3' dye molecule at the 5'-end. To maximize specific binding, the DNA fragment length was limited to 285 bp. To evaluate the capability of terminally-labeled DNA to enter the cell, we chose a homologous DNA fragment containing a single point mutation conferring resistance to streptomycin (*str41*, *Materials and Methods*). Transformation assay scoring recombinants resistant to streptomycin confirmed that this substrate was efficiently taken up and integrated into the recipient genome (data not shown).

As a first attempt to visualize DNA binding, wild type competent cells induced to develop competence for 10 minutes were incubated with the fluorescent DNA substrate for 3 minutes before microscopic observation. In these conditions, very few DNA dots were observed, some of which appeared associated to cells. Interestingly however, time lapse microscopy revealed that this association was very transient, below 1 minute (Fig. S4A). We tentatively attribute this finding to the uptake of DNA into the cell. In *S. pneumoniae*, a transport rate of 100 nt.s⁻¹ at 31°C has been measured (Mejean and Claverys, 1993), meaning that the transport of a 285 bp fragment should last about 3 seconds only. To increase the detection time window of DNA uptake, we used a 12 kb fluorescently labeled DNA fragment. In this case, a maximal transport time of 2 minutes is estimated. Again, visualization of fluorescent dots in competent cultures turned out to be challenging. Nevertheless, Figure S4B shows two DNA dots in contact with two different cells. The DNA signals lay close to the center of the cell. The fluorescence of these spots disappeared after a few minutes as can be expected if DNA gradually enters the cell. Interestingly, in support of the idea that DNA entry pore can process several DNA fragments, one of the cells exhibited a second fluorescent dot localized at the same spot as the first one a few minutes after its disappearance.

The speed of DNA internalization may impede the visualization of extracellular DNA at the surface of competent cells. Notably, it was found previously that DNA tends to accumulate at the surface of competent *endA* mutant cells, due to the failure of these cells to degrade and internalize bound DNA (Berge et al., 2002). We therefore used an $\Delta endA$ mutant background to

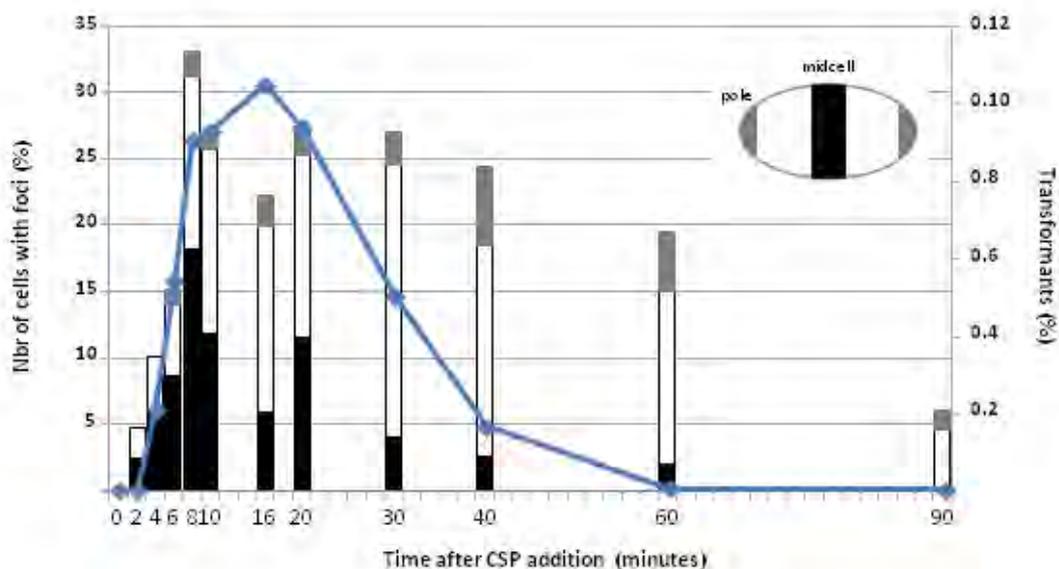


Fig. 5. ComEA dynamic localization. Schematic presentation of a time course fluorescence microscopy experiment showing the correlation of transforming activity with the fraction of cells containing GFP-ComEA foci and the position of these foci in cultures developing competence. Cells containing the GFP-ComEA fusion (strain R2940) were grown to mid-exponential phase in C+Y medium at 37°C and induced to develop competence by CSP addition. At indicated times (minutes) cells were collected for microscopy analysis and measurement of transformation efficiency as described in legend of Fig. 3A. A schematic diagram depicting a pneumococcal cell with the polar and the midcell regions is shown.

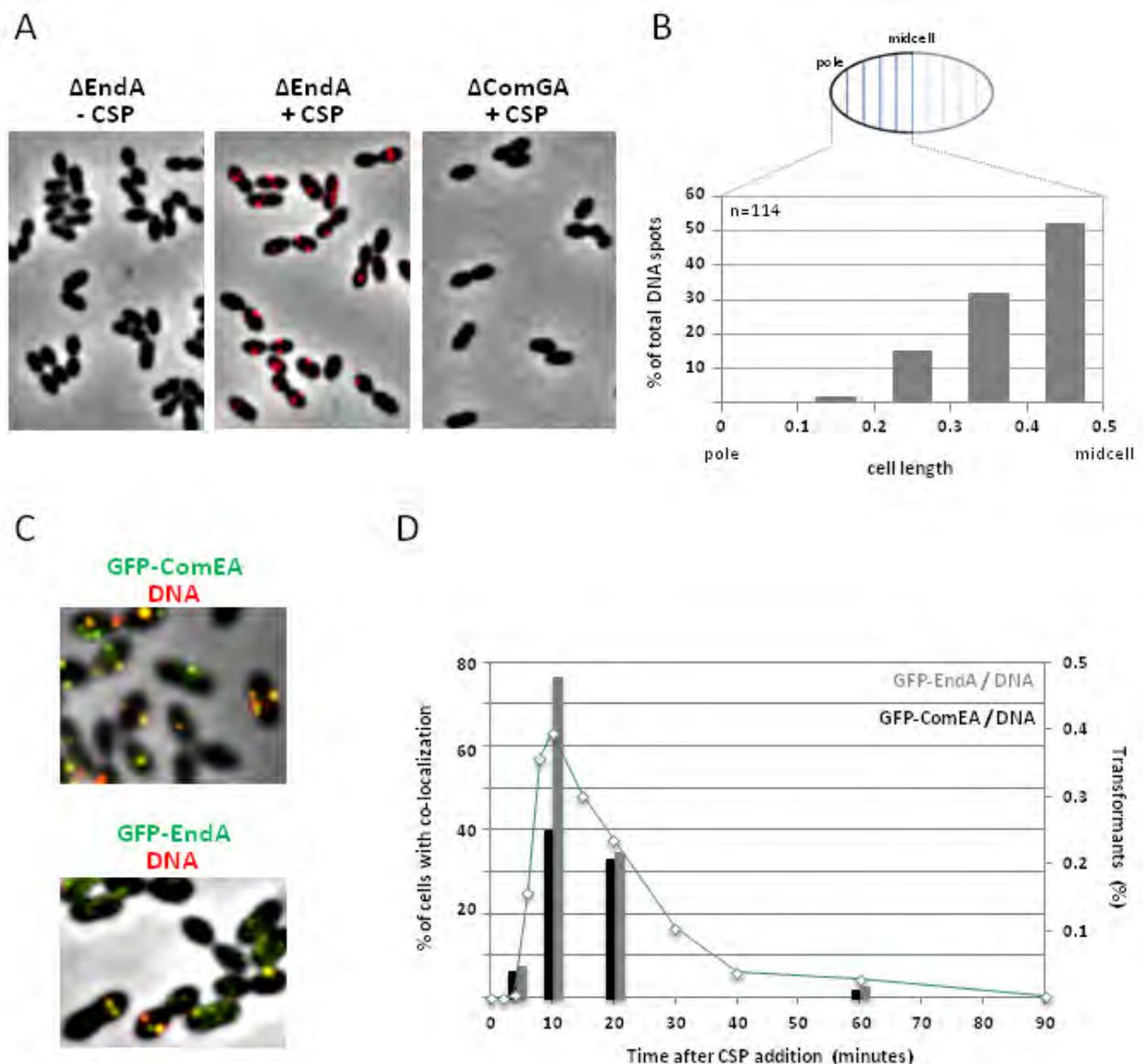


Fig. 6. Donor DNA binding occurs at midcell. (A) Fluorescent images of cells incubated with 285 bp fluorescent DNA. *left*: Δ endA mutant (R2811) non competent culture (-CSP); *middle*: Δ endA mutant competent culture (+CSP); *right*: Δ comGA mutant competent culture (+CSP). (B) Distribution of DNA fluorescent dots along the long axis of the cell in Δ endA competent cultures. n: number of DNA dots analyzed. See legend of Fig. 2C for details. (C) Co-localization of exogenous DNA with ComEA and EndA. (D) Correlation of the frequency of DNA dots co-localizing with GFP-ComEA (black) or GFP-EndA (grey) with transformation efficiency. Cells containing the GFP-ComEA fusion (strain R3606) or the GFP-EndA fusion (strain R3696) were grown to mid-exponential phase in C+Y medium at 37°C and induced to develop competence by CSP addition. At 0, 5 and 15 minutes, cells were collected and incubated with Cy3-fluorescent DNA for 5 minutes. Samples were then prepared for microscopy analysis. The blue curve represents transformation efficiency as measured in wild type culture.

analyze the binding of donor DNA. Strikingly, fluorescent DNA signals were found at the cell surface (43% of the cells, 105 out of 247 cells) in competent cultures (Fig 6A) and the intensity of the fluorescent signal appeared proportional to the amount of DNA added to the culture (data not shown). In contrast, we could not detect any fluorescence in non competent cultures. Moreover, no fluorescence was found at the surface of competent *comGA* mutant cells, consistent with the previous observation that binding was abolished in absence of ComGA (Berge et al., 2002). Altogether these results demonstrate that the fluorescent DNA signals localized at

the surface of Δ endA competent cells represent competence-specific DNA binding.

We note that most of the DNA-labeled cells exhibited several dots, some of them arranged in two peripheral dots close to the center of the cell, a pattern reminiscent to that of components of the septal ring. In any case, the position of fluorescent DNA was clearly preferentially found in the midcell region (Fig. 6B) with no polar foci suggesting that DNA binding coincides with the medial location of ComEA and EndA.

To further investigate whether the fluorescent DNA signals colocalize with components of the DNA entry

pore, we performed a double labeling experiment by combining Cy3-labelled DNA and GFP fusions to ComEA or EndA (Fig. 6C). As mentioned above, to circumvent the difficulty of detecting DNA binding in cells containing the EndA nuclease, we took advantage of a strain in which the catalytic site of EndA is mutated (EndA^{H160A}, Midon et al. 2011). Therefore, to analyze the EndA protein, we monitored a GFP-EndA^{H160A} fusion expressed from the *endA* chromosomal locus. At different time after competence induction, cells containing the GFP-ComEA or GFP-EndA^{H160A} proteins were collected and incubated for 3 minutes with fluorescent DNA before imaging. Our data indicate a strong correlation between the percentage of cells containing colocalized GFP fusions and DNA dots and transforming activity as measured in wildtype cultures (Fig. 6C and 6D). Ten minutes into the competence development, when transforming activity reaches a maximum, GFP-EndA foci and DNA dots colocalized in as many as 75% of total cells exhibiting both signal. Yet, ten minutes later, when cells have lost half of their transforming activity, the percentage of colocalization roughly dropped by a factor 2. Similar results were obtained from co-localization measurements of GFP-ComEA and DNA.

We note that compared to wildtype, the *endA* mutant yielded a larger fraction of cells containing more than one ComEA-GFP focus. These foci appeared also brighter than in a wildtype background. We suggest from these observations that the detection of ComEA-GFP fluorescence is partially impaired in wildtype cells, possibly through the putative interaction of the protein with EndA. This hypothesis would be consistent with the failure to visualize both CFP-ComEA and YFP-EndA in the same cells. Alternatively, ComEA proteins may accumulate at the entry pore under conditions of uptake inhibition.

Discussion

Dynamic localization of components of the DNA entry pore. Naturally transformable bacteria assemble a specialized membrane-associated machinery for uptake of exogenous double-stranded DNA (Claverys et al., 2009). Here we show that several components of this machinery exhibit a dynamic behavior during the development of competence in *S. pneumoniae*. All components of the DNA uptake machine are encoded by genes belonging to the competence regulon (Claverys et al., 2006) with one remarkable exception, EndA, which is constitutively expressed. We found that this endonuclease is uniformly distributed in the membrane of non-competent cells and redistributed into foci upon competence induction (Fig. 2A). Remarkably, its peripheral relocation coincides with completion of the competence process (Fig. 3). The putative DNA receptor, ComEA is detected a few minutes after initiation of competence. At that time, ComEA appears as a focus preferentially localized close to the center of the cell (Fig. 5). As competence proceeds and long after its completion, the fraction of cells containing ComEA foci away from midcell and near the pole increased. These findings are most consistent with a model in which the ComEA protein emerges at midcell and subsequently diffuses into the membrane towards the pole, where it is degraded. However, we cannot exclude an alternative explanation that ComEA foci remain static and that their

midcell location becomes polar after formation of a newborn pole following cytokinesis.

The fact that EndA concentrates into foci on a ComEA-dependent manner but independently of ComGA, ComEC or ComFA (Fig. 4), suggests that ComEA transiently anchors the EndA protein. EndA foci would therefore mark the sites of sub-complexes assembly and perhaps of the complete DNA entry pore. The stability of EndA foci measured over timelapse experiments appeared short (Fig. 3), even for the time window of competence development which is estimated around 20 minutes (Alloing et al., 1998). Because evidences indicate coupling of DNA degradation and transport inside the cytoplasm (Mejean and Claverys, 1993), a putative ComEA-EndA subcomplex must assemble with components of the transport machinery to form an active DNA entry pore. It seems unlikely that during the time EndA foci are maintained, a putative EndA-ComEA subcomplex recruits all the remaining subunits required to generate an active DNA entry pore, execute the DNA binding and degradation steps linked to the subsequent internalization and finally disassemble. We envision instead that competence-specific proteins of the transformation apparatus assemble together as they emerge at the center of the cell and that EndA is recruited to this site via ComEA. Consistent with this hypothesis, the first fluorescent foci for ComEA and ComEC were detected at midcell and the majority of EndA foci were preferentially found close to the center of the cell throughout the competence process.

Position of active DNA entry pores? Previous work measuring DNA binding and degradation established that exogenous DNA binding accumulated in the absence of EndA (Berge et al., 2002). Our microscopy data visualizing fluorescent DNA confirm this result (Fig. 6 and Fig. S4). In a background in which EndA-dependent DNA degradation was abolished, DNA binding appeared as fluorescent dots preferentially located at midcell positions (Fig. 6) as was found for ComEA and EndA. Moreover, ComEA and the EndA catalytic mutant colocalized with DNA signals at the time transforming activity reaches a maximum in wild type cultures. We hypothesize that the sites of DNA binding correspond to the location of active DNA entry pores and consequently that donor DNA enters pneumococcal cells at sites located close to midcell. It is formally possible that in the *endA* mutant that we used, absence of DNA degradation and thus absence of internalization either prevents the assembly of the entry pore complex or causes its disassembly. In this scenario, DNA processing would ensure the stabilization of the transformation apparatus. However, our analysis indicates that the DNA receptor and the nuclease exhibit the same localization pattern when competent cells are exposed to DNA or not. These proteins are commonly positioned close to the center of the cell when the transformation efficiency is maximal. On the contrary, when cells exit competence and transformation activity drops to low levels, ComEA foci appear to accumulate at the poles. Altogether, these findings strongly suggest that, even in the eventuality that proper assembly of the entry pore relies on actual DNA processing, DNA gets into the cytoplasm through medial complexes.

Species specific DNA uptake location? In *B. subtilis*, it appears that the entire process of DNA transformation localizes at the cell poles. Several components of the

DNA entry pore, but also the pseudopilus and cytoplasmic proteins involved in the integration of donor DNA into the chromosome were preferentially associated with one cell pole (Hahn et al., 2005; Kaufenstein et al., 2011; Kidane and Graumann, 2005; Kramer et al., 2007; Tadesse and Graumann, 2007). Moreover, both binding of fluorescent DNA and DNA import characterized at the single molecule level using laser tweezers appeared to take place in the polar region (Hahn et al., 2005). Here, our data are most consistent with a model in which transformation occurs at midcell in *S. pneumoniae*. What are the specifics that could account for different DNA uptake locations in *B. subtilis* and *S. pneumoniae*? The first noticeable difference between these two bacteria is their shape. *B. subtilis* is a straight-rod shaped bacterium whereas *S. pneumoniae* is a rugby-ball shaped ovococcus. The morphology of bacterial cells is ultimately determined by the peptidoglycan cell wall. Although very speculative, an attractive idea is that the sites of DNA uptake are linked to peptidoglycan biosynthesis. Large trans-envelope complexes such as the transformation apparatus must require the formation of gaps in the peptidoglycan to allow their assembly. Thus, specialized hydrolases have been identified for the assembly of a type IV secretion system in *Agrobacterium tumefaciens* (Zahl et al., 2005), the type IV pilus synthesis or for flagellum synthesis in *Escherichia coli* (Koraimann, 2003; Nambu et al., 1999). In *S. pneumoniae*, several hydrolases are induced during competence development but because their absence do not appear to have an effect on transformation efficiency, it is unlikely that they execute such an important function so as to facilitate penetration of the peptidoglycan network. Yet, the process of peptidoglycan biosynthesis involves not only synthesis but also remodeling by hydrolase enzymes for the insertion of new material (Vollmer et al., 2008). Thus, it is tempting to speculate that remodeling at the site of nascent peptidoglycan synthesis may enable the assembly of the transformation machinery. In support of this hypothesis, peptidoglycan synthesis occurs at the midcell regions of dividing cells in pneumococcal cells (Ng et al., 2004). In *B. subtilis*, peptidoglycan synthesis occurs along the sidewall in a punctated pattern possibly following a helicoidal path. Interestingly, the ComEA protein is also found distributed in a punctated spiral-like pattern (Hahn et al., 2005; Kaufenstein et al., 2011). Nevertheless, it appears that the transformation complex assembles as a whole entity at *B. subtilis* cell poles and is not composed of dynamically interacting subcomplexes or set up from preexisting subcomplexes (Kaufenstein et al., 2011). It should be noted however that competence develops during stationary phase in *B. subtilis* cells, a time when the rate of peptidoglycan synthesis slows down (Typas et al., 2012). It is therefore tempting to propose that the transformation machinery also assembles at the septum in *B. subtilis* during the last division cycle at the onset of stationary phase. In this case, the actual localization of the transformation machinery at one cell pole would result from daughter cell separation

Another major difference between these two naturally transformable bacteria species concerns the regulation of the competence differentiation process. The two species have evolved specific regulatory cascades, best adapted to their lifestyles, for tightly controlling assembly of orthologous DNA-uptake machines (Claverys et al., 2006). In *S. pneumoniae* competence develops abruptly

and simultaneously in nearly all cells of an exponentially growing culture; it is maintained for about 15 min and then decays almost as quickly as it arose. In *B. subtilis* cultures, competence rises slowly in only 10% of the cells and the competence period is much more extended than that of *S. pneumoniae*. Therefore, it is possible that the choice for the implantation of the transformation machinery is ruled by different constraints in these two bacteria. In pneumococcal cells, competence development and DNA uptake occur in cells that are actively dividing. Thus, in support of the idea that the transformation process may be coordinated with cell cycle progression, the midcell localization of the transformation machinery in pneumococcal cells is reminiscent to that of components of the septal ring.

Materials and Methods

General Methods. All *S. pneumoniae* strains used are R800 strain derivatives (Lefèvre Claverys Sicard 1979) and are listed in Table S1. The R800 strain is a derivative of R6 (Hoskins et al., 2001). Stock cultures were routinely grown at 37° in Todd–Hewitt (BD Diagnostic System) plus yeast extract (THY) medium to OD₅₅₀ = 0.3; after addition of 15% (vol/vol) glycerol, stocks were kept frozen at -70°C. These precultures were used to initiate cultures in C+Y at 6 x 10⁶ cells ml⁻¹. *E. coli* strains used were LE392 and BL21 DE3 pLysS.

Plasmid and Strain Constructions. Plasmids used are listed in Table S2 oligonucleotide primers used for PCR and site-directed mutagenesis are listed in Table S3.

Strain R2762 harboring the *gfp-endA* fusion at the *endA* endogenous locus was obtained by transformation of strain R1501 with a ligation mixture containing the pMB12 construct. To generate the pMB12 construct (i.e. pGBDU-*gfp-endA*), primers were designed to amplify the upstream region of the *endA* gene (oligonucleotide primers OMB13 and OMB17, and genomic DNA from strain R304 as template), a downstream region containing the *endA* open reading frame (oligonucleotide primers OMB20 and OMB16, and genomic DNA from strain R304 as template) and the *gfp* gene (oligonucleotide primers OMB18 and OMB19, and template DNA pUC57-*gfp*(*Sp*) (Martin et al., 2010)). The PCR products were gel-purified and used as templates in a SOEing PCR using the outer primers OMB13 and OMB16, yielding a PCR product containing the *gfp-endA* fusion. The PCR product was subsequently cut with *Bam*HI and *Hind*III and ligated with the pGBDU plasmid also cut with *Bam*HI and *Hind*III.

Strains R2940 and R3138 containing the *gfp-comEA* and *cfp-comEA* fusions at the *comEA* endogenous locus were obtained by transformation of strain R1501 with constructs pMB14 and pMB30. To generate the pMB14 construct (i.e. pGBDU-*gfp-comEA*), primers were designed to amplify an upstream region containing the promoter sequence of the *comEA* gene (oligonucleotide primers OMB26 and OMB27, and genomic DNA from strain R304 as template), a downstream region containing the *comEA* open reading frame (oligonucleotide primers OMB30 and OMB31, and genomic DNA from strain R304 as template) and the *gfp* gene (oligonucleotide primers OMB28 and OMB29, and template DNA pUC57-*gfp*(*Sp*) (Martin et al., 2010)). The PCR products were gel-purified and used as templates in a SOEing PCR using the outer primers OMB26 and OMB31, yielding a PCR product containing the *gfp-comEA* fusion under the control of the

comEA promoter. The PCR product was subsequently cut with *Pst*I and *Bam*HI and ligated with the pGBDU plasmid also cut with *Pst*I and *Bam*HI. The ligation mixture was directly used for transformation of pneumococcal cells. The pMB30 construct (i.e. pGBDU-*cfp-comEA*) was obtained as pMB14 except that a PCR product containing the *cfp* gene (instead of *gfp*) was generated using oligonucleotides OMB28 and OMB29, and template DNA pUC57-*cfp(Sp)*. Plasmid pUC57-*cfp(Sp)* contains the gene encoding eCFP (Clonotech) resynthesized with codons optimized for *S. pneumoniae* strain R6 (<http://gib.genes.nig.ac.jp/>) using the OptimumGene™ algorithm and cloned into pUC57 by Genscript USA. Notably, in addition to codon optimization, two modifications were included in the synthesis; a nucleotide transition at position 171 (A->T) that results in the inactivation of an internal *Nco*I restriction site; and an amino acid substitution (A206K) that prevents CFP dimerization (Zacharias et al., 2002).

To achieve ectopic expression of the *yfp-endA* fusion in *S. pneumoniae*, we constructed a derivative of pCEP_M, an integrative plasmid that allows chromosomal integration of a gene at CEP and its expression under the control of the maltose inducible promoter P_M (Guiral et al., 2006). Plasmid pMB29 (i.e. pCEP_M-*yfp-endA*) was created in a three-way ligation with an *Eag*I-*Bam*HI PCR product containing the *endA* open reading frame (oligonucleotide OCN5 and OCN6, and genomic DNA from strain R304 as template), a *Nco*I-*Eag*I PCR product containing the *yfp* gene with codon optimized for *S. pneumoniae* (oligonucleotide OMB2 and OMB79, and template DNA pUC57-*yfp(Sp)*), and pCEP_M cut with *Nco*I and *Bam*HI. The pUC57-*yfp(Sp)* plasmid contains a *yfp* variant derived from pUC57-*gfp(Sp)* (Martin et al., 2010) with a single point mutation (T203Y) generated by Genscript USA.

Pneumococcal Transformation. CSP-induced transformation was performed in C+Y medium as described previously (Martin et al., 2000), using precompetent cells treated at 37°C for 10 min with synthetic CSP1 (25 ng ml⁻¹). After addition of transforming DNA and unless otherwise indicated, cells were incubated for 20 minutes at 30°C. Transformants were selected by plating on CAT-agar supplemented with 4% (vol/vol) horse blood, followed by selection using a 10 ml overlay containing chloramphenicol (Cm; 4.5 µg ml⁻¹), erythromycin (Ery; 0.05 µg ml⁻¹), kanamycin (Kan; 250 µg ml⁻¹), spectinomycin (Spc; 100 µg ml⁻¹), streptomycin (Sm; 200 µg ml⁻¹) or tetracyclin (Tc; 1 µg ml⁻¹), after phenotypic expression for 120 min at 37°C.

To compare transforming activity of a DNA fragment harboring a single Cy3' dye molecule at the 5'-end to a non labeled fragment, an 285-bp fragment carrying the *rpsL41* allele, which confers resistance to Sm, used as transforming DNA was amplified from R304 chromosomal DNA using the OCN81-OCN82 primer pair to generate a non-labeled fragment or the OCN75-OCN76 primer pair to generate the Cy3 labeled fragment.

To get an insight in uptake activity, transforming efficiency in Figure 3 and 5 was measured as follows. At indicated times after the initiation of competence (by CSP1 addition), competent cells (1 ml) were incubated for 3 minutes at 37°C with 100 ng of genomic DNA from strain R304. Uptake was terminated with DNase I (50 mg ml⁻¹; SIGMA) and incubation was continued for 17 minutes at 30°C. Transformants were selected by plating

on CAT-agar supplemented with 4% (vol/vol) horse blood, followed by selection using a 10 ml overlay containing streptomycin (Sm; 200 µg ml⁻¹).

Whole-Cell Extract Preparation. At indicated times after the initiation of competence (by CSP1 addition), the OD₅₅₀ was measured (for equivalent loading) and samples (3.0 ml) were collected by centrifugation. Cell pellets from the CSP-induced and control cultures were stored at -80°C. Whole-cell extracts were prepared by resuspension of cell pellets in 50 µl lysis buffer [10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.01 % (wt/vol) DOC, 0.02% (wt/vol) SDS] and incubation at 37°C for 10 min followed by addition of 50 µl loading buffer [0.25 M Tris pH 6.8, 6% (wt/vol) SDS, 10 mM EDTA, 20% (vol/vol) Glycerol] containing 10% (vol/vol) β-mercaptoethanol. Sample were heated for 5 min at 80°C prior to loading.

Immunoblot Analysis. Proteins were separated on pre-cast 4–12% NuPage Bis-Tris gels (Invitrogen) with MOPS-SDS running buffer, transferred to a nitrocellulose membrane using an iBLOT apparatus (Invitrogen) and blocked in 8% (wt/vol) skimmed milk in Tris-buffered saline (TBS) (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH8) containing 0.1% (vol/vol) Tween-20. The blocked membrane was probed with anti-GFP, or anti-SsbB antibodies (Attaiech et al., 2011). Primary antibodies were diluted 1:10,000 into 5% (wt/vol) skimmed milk in TBS supplemented with 0.01% (vol/vol) Tween-20. Primary antibodies were detected using peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Sigma) with ECL Western Blotting Detection System (GE Healthcare®) and a luminescent image analyzer (LAS-4000, Fujii). Signals were quantified with a MultiGauge V3.0 Software (Fugifilm).

Fluorescence Microscopy and Analysis. After gentle thawing of stock cultures, aliquots were inoculated at OD₅₅₀ = 0.006 in C+Y medium and grown at 37°C to an OD₅₅₀ of 0.3. These precultures were inoculated (1/100) in C+Y medium and incubated at 37°C to an OD₅₅₀ of 0.06. Then, competence was induced with synthetic CSP1 (25 ng ml⁻¹). At indicated times after the initiation of competence 1 ml of samples was collected and cooled down by addition of 500 µl cold T+Y medium, pelleted (3 min, 3000 g) and resuspended in 50 µl C+Y medium. Two microlitres of this cell suspension were spotted on a microscope slide containing a slab of 1.2% C+Y agarose as described previously (de Jong et al., 2011).

Phase contrast and fluorescence microscopy were performed with an automated and inverted epifluorescence microscope Nikon Ti-E/B equipped with the perfect focus system™ (PFS, Nikon), a phase contrast objective (CFI Plan Fluor DLL 100X oil NA1.3), Semrock filters sets for GFP (Ex : 482BP35; DM : 506; Em : 536BP40), YFP (Ex : 500BP24; DM : 520; Em : 542BP27), Cy3 (Ex : 531BP40; DM : 562; Em : 593BP40), a Nikon Intensilight 130W High-Pressure Mercury Lamp, and a monochrome OrcaR2 digital CCD camera (Hamamatsu). The microscope is equipped with a thermostated chamber at 30°C. For time lapse experiments, temperature was set at 37°C. Fluorescence images were captured and processed using Nis-Elements AR software (Nikon). All fluorescence images were acquired with a minimal exposure time to minimize bleaching and phototoxicity effects.

Images were analyzed MATLAB-based, open-source software MicrobeTracker (Sliurenko *et al*, 2011). Cell contours were obtained using the *alg4 ecolli2* algorithm implemented in MicrobeTracker and parameters splitTreshhold, joindist and joinangle were refined to fit the

shape of *S. pneumoniae*. Fluorescent foci inside the cells were automatically identified using the SpotFinder tool from MicrobeTracker. All statistics were calculated using Graphpad Prism 4.

References

- Alloing, G., Martin, B., Granadel, C., and Claverys, J.P. (1998). Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease. *Molecular microbiology* 29, 75-83.
- Barany, F., Kahn, M.E., and Smith, H.O. (1983). Directional transport and integration of donor DNA in *Haemophilus influenzae* transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 7274-7278.
- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., and Henriques-Normark, B. (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Current biology : CB* 16, 401-407.
- Berge, 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*. *Molecular microbiology* 45, 411-421.
- Briley, K., Jr., Dorsey-Oresto, A., Prepiak, P., Dias, M.J., Mann, J.M., and Dubnau, D. (2011). The secretion ATPase ComGA is required for the binding and transport of transforming DNA. *Molecular microbiology* 81, 818-830.
- Chen, I., Christie, P.J., and Dubnau, D. (2005). The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* 310, 1456-1460.
- Chen, I., Provvedi, R., and Dubnau, D. (2006). A macromolecular complex formed by a pilin-like protein in competent *Bacillus subtilis*. *The Journal of biological chemistry* 281, 21720-21727.
- Claverys, J.P., Martin, B., and Polard, P. (2009). The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS microbiology reviews* 33, 643-656.
- Claverys, J.P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology* 60, 451-475.
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Henard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J., and 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.
- Dubnau, D. (1999). DNA uptake in bacteria. *Annual review of microbiology* 53, 217-244.
- Dubnau, D., and Cirigliano, C. (1972). Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. Formation and properties of products isolated from transformed cells which are derived entirely from donor DNA. *Journal of molecular biology* 64, 9-29.
- Guiral, S., Henard, 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, 343-349.
- Hahn, J., Kramer, N., Briley, K., Jr., and Dubnau, D. (2009). McsA and B mediate the delocalization of competence proteins from the cell poles of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 72, 202-215.
- Hahn, J., Maier, B., Haijema, B.J., Sheetz, M., and Dubnau, D. (2005). Transformation proteins and DNA uptake localize to the cell poles in *Bacillus subtilis*. *Cell* 122, 59-71.
- Havarstein, L.S., Coomaraswamy, G., and 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, 11140-11144.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Puls, J., Schwan, D., and Haas, R. (2000). Genetic competence in *Helicobacter pylori*: mechanisms and biological implications. *Research in microbiology* 151, 487-491.
- Kaufenstein, M., van der Laan, M., and Graumann, P.L. (2011). The three-layered DNA uptake machinery at the cell pole in competent *Bacillus subtilis* cells is a stable complex. *Journal of bacteriology* 193, 1633-1642.
- Kidane, D., and Graumann, P.L. (2005). Intracellular protein and DNA dynamics in competent *Bacillus subtilis* cells. *Cell* 122, 73-84.
- Koraimann, G. (2003). Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60, 2371-2388.
- Kramer, N., Hahn, J., and Dubnau, D. (2007). Multiple interactions among the competence proteins of *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 65, 454-464.
- Kruger, N.J., and Stögl, K. (2011). Two steps away from novelty-principles of bacterial DNA uptake. *Molecular microbiology* 80, 860-867.
- Lacks, S., and Greenberg, B. (1973). Competence for deoxyribonucleic acid uptake and deoxyribonuclease action external to cells in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 114, 152-163.
- Lacks, S., Greenberg, B., and Neuberger, M. (1974). Role of a deoxyribonuclease in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 2305-2309.
- Lacks, S., Greenberg, B., and Neuberger, M. (1975). Identification of a deoxyribonuclease implicated in genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 123, 222-232.
- Lacks, S., and Neuberger, M. (1975). Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *Journal of bacteriology* 124, 1321-1329.
- Lee, M.S., and Morrison, D.A. (1999). Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *Journal of bacteriology* 181, 5004-5016.
- Maier, B., Chen, I., Dubnau, D., and Sheetz, M.P. (2004). DNA transport into *Bacillus subtilis* requires proton motive force to generate large molecular forces. *Nature structural & molecular biology* 11, 643-649.
- Martin, B., Granadel, C., Campo, N., Henard, V., Prudhomme, M., and 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.
- Mejean, V., and Claverys, J.P. (1988). Polarity of DNA entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular & general genetics : MGG* 213, 444-448.

- Mejean, V., and Claverys, J.P. (1993). DNA processing during entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of biological chemistry* *268*, 5594-5599.
- Midon, M., Schafer, P., Pingoud, A., Ghosh, M., Moon, A.F., Cuneo, M.J., London, R.E., and Meiss, G. (2011). Mutational and biochemical analysis of the DNA-entry nuclease EndA from *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic acids research* *39*, 623-634.
- Moon, A.F., Midon, M., Meiss, G., Pingoud, A., London, R.E., and Pedersen, L.C. (2011). Structural insights into catalytic and substrate binding mechanisms of the strategic EndA nuclease from *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic acids research* *39*, 2943-2953.
- Morrison, D.A., and Guild, W.R. (1973). Breakage prior to entry of donor DNA in *Pneumococcus* transformation. *Biochimica et biophysica acta* *299*, 545-556.
- Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R.M., and Kutsukake, K. (1999). Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* *181*, 1555-1561.
- Ng, W.L., Kazmierczak, K.M., and Winkler, M.E. (2004). Defective cell wall synthesis in *Streptococcus pneumoniae* R6 depleted for the essential PcsB putative murein hydrolase or the VicR (YycF) response regulator. *Molecular microbiology* *53*, 1161-1175.
- 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. *Molecular microbiology* *51*, 1051-1070.
- Puyet, A., Greenberg, B., and Lacks, S.A. (1990). Genetic and structural characterization of endA. A membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of molecular biology* *213*, 727-738.
- Rosenthal, A.L., and Lacks, S.A. (1977). Nuclease detection in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry* *80*, 76-90.
- Rosenthal, A.L., and Lacks, S.A. (1980). Complex structure of the membrane nuclease of *Streptococcus pneumoniae* revealed by two-dimensional electrophoresis. *Journal of molecular biology* *141*, 133-146.
- Sliusarenko, O., Heinritz, J., Emonet, T., and Jacobs-Wagner, C. (2011). High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Molecular microbiology* *80*, 612-627.
- Stingl, K., Muller, S., Scheidgen-Kleyboldt, G., Clausen, M., and Maier, B. (2010). Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *107*, 1184-1189.
- Tadesse, S., and Graumann, P.L. (2007). DprA/Smf protein localizes at the DNA uptake machinery in competent *Bacillus subtilis* cells. *BMC microbiology* *7*, 105.
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C.A., and Vollmer, W. (2012). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nature reviews. Microbiology* *10*, 123-136.
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS microbiology reviews* *32*, 259-286.
- Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C., and Tsien, R.Y. (2002). Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* *296*, 913-916.
- Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavec, B., Beranek, A., Ruckstuhl, C., Zarfel, G.E., and Koraimann, G. (2005). Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* *151*, 3455-3467.

Supporting Information

Table S1

Strains ^a	Genotype ^b /Description	Source/reference
R304	<i>nov1, rif23, str41</i> ; Nov ^R , Rif ^R , Sm ^R	Mortier-barrière <i>et al.</i> 1998
R1501	$\Delta comC$	Dagkessamanskaia <i>et al.</i> 2004
R951	<i>endA::cat^{βC}</i> , Cm ^R	Claverys strain collection
R2002	$\Delta comC$, <i>comC::luc</i> , <i>comX2::tet</i> , <i>comX1::ermAM</i> ; Cm ^R , Tet ^R , ery ^R	Claverys strain collection
R1062	<i>comA::ermAM</i> , <i>ssbB::luc (ssbB+)</i> , <i>comGA::spc3^C</i> mariner insertion; Ery ^R ; Cm ^R ; Spc ^R	Bergé <i>et al</i> 2002
R1063	<i>comA::ermAM</i> , <i>ssbB::luc (ssbB+)</i> , <i>comFA::spc9^C</i> mariner insertion; Ery ^R ; Cm ^R ; Spc ^R	Bergé <i>et al</i> 2002
R1147	<i>comA::ermAM</i> , <i>ssbB::luc (ssbB+)</i> ; <i>comEA::spc6^A</i> mariner insertion; Ery ^R ; Cm ^R ; Spc ^R	Bergé <i>et al</i> 2002
R2586	$\Delta comC$, <i>comEC::ermAM</i> ; Ery ^R	This study
R2811	$\Delta comC$, <i>endA::cat^{βC}</i> , Cm ^R	Claverys strain collection
R2762	$\Delta comC$, <i>gfp-endA</i> (from plasmid pMB12)	This study
R2940	$\Delta comC$, <i>gfp-comEA</i> (from plasmid pMB14)	This study
R3138	$\Delta comC$, <i>cfp-comEA</i> (from plasmid pMB30)	This study
R3184	$\Delta comC$, <i>CEP_M-yfp-endA</i> (from plasmid pMB29); Kan ^R	This study
R3242	$\Delta comC$, <i>cfp-comEA</i> , <i>CEP_M-yfp-endA</i> ; Kan ^R	This study
R3243	$\Delta comC$, <i>CEP_M-yfp-endA</i> , <i>endA::cat</i> ; Kan ^R , Cm ^R	This study
R3244	$\Delta comC$, <i>cfp-comEA</i> , <i>CEP_M-yfp-endA</i> , <i>endA::cat</i> ; Kan ^R , Cm ^R	This study
R3245	$\Delta comC$, <i>CEP_M-yfp-endA</i> , <i>endA::cat</i> ; <i>comX2::tet</i> , <i>comX1::ermAM</i> ; ; Kan ^R , Cm ^R , Tet ^R , Ery ^R	This study
R3246	$\Delta comC$, <i>CEP_M-yfp-endA</i> , <i>endA::cat</i> , <i>comEA::spc6</i> ; Kan ^R , Cm ^R , Spc ^R	This study
R3247	$\Delta comC$, <i>CEP_M-yfp-endA</i> , <i>endA::cat</i> , <i>comGA::spc3^C</i> ; Kan ^R , Cm ^R , Spc ^R	This study
R3484	$\Delta comC$, <i>CEP_M-yfp-endA</i> , <i>endA::cat</i> , <i>comEC::ermAM</i> ; Kan ^R , Cm ^R , Ery ^R	This study
R3485	$\Delta comC$, <i>CEP_M-yfp-endA</i> , <i>endA::cat</i> , <i>comFA::spc9^C</i> ; Kan ^R , Cm ^R , Spc ^R	This study
R3606	$\Delta comC$, <i>gfp-comEA</i> , <i>endA::cat^{βC}</i> , Cm ^R	This study
R3696	$\Delta comC$, <i>gfp-endA^{H160A}</i>	This study

^a All strains are R800 strain derivatives (Lefèvre Claverys Sicard 1979). The R800 strain is a derivative of R6 (Hoskins *et al.*, 2001)

^b ^R, resistance; Ap, ampicillin; Ery, erythromycin; Kan, kanamycin; Nov, novobiocin; Rif, rifampicin; Sm, streptomycin; Cm, chloramphenicol; Tet, tetracycline

Table S2

Plasmids	Description	Source/reference
pCEP _M	pSC101 derivative carrying the chromosomal platform CEP and the maltose inducible promoter P _M , Kan ^R	Guiral <i>et al.</i> , 2006
pUC57- <i>gfp</i> (<i>Sp</i>)	pUC57 derivative carrying a 728 bp <i>NcoI-BamHI</i> synthetic fragment containing the <i>gfp</i> (<i>Sp</i>) gene encoding GFP with codon optimized for <i>S. pneumoniae</i> R6; Ap ^R	Martin <i>et al.</i> , 2010
pUC57- <i>yfp</i> (<i>Sp</i>)	pUC57 derivative carrying a 728 bp <i>NcoI-BamHI</i> synthetic fragment containing the <i>gfp</i> (<i>Sp</i>) gene encoding GFP with codon optimized for <i>S. pneumoniae</i> R6; Ap ^R	GenScript, USA
pUC57- <i>cfp</i> (<i>Sp</i>)	pUC57 derivative carrying a 728 bp <i>NcoI-BamHI</i> synthetic fragment containing the <i>gfp</i> (<i>Sp</i>) gene encoding GFP with codon optimized for <i>S. pneumoniae</i> R6; Ap ^R	GenScript, USA
pMB12	pGBDU derivative carrying the <i>gfp-endA</i> fusion,	This study
pMB14	pGBDU derivative carrying the <i>gfp-comEA</i> fusion,	This study
pMB30	pGBDU derivative carrying the <i>cfp-comEA</i> fusion,	This study
pMB29	pCEP _M derivative carrying the <i>yfp-endA</i> fusion, Kan ^R	This study

Table S3

primers	Sequence
OCN5	TCCCGGCCGTATGAACAAAAACAAGACAGACAC
OCN6	GCGGATCCATAAGTGACATAGGAGT
OMB2	GAATCCCATGGTTTCTAAAGGTG
OMB13	CCGGGATCCGGGAGCACAAACCGTCCCTTGATTGCCAAGTTACTTGAAAT
OMB16	GGCAAGCTTCCCAGGCTGTCTGAACAGCAATGTTTTAGGATTGCTTGTT
OMB17	ACAATTCTCACCTTTAGAAACCATATTTCTCCTTATCTTTAGAAAAAGGCTGGT
OMB18	ACCAGCCTTTTTCTAAAGATAAGGAGAAATATGGTTTCTAAAGGTGAAGAATTGT
OMB19	CTGTCTTGTTTTTTGTTTCATTCCGGAACCTTTATACAATTCATCCATACCATG
OMB20	CATGGTATGGATGAATTGTATAAAGGTTCCGGAATGAACAAAAACAAGACAG
OMB26	GCGCTGCAGCTTGGGACGTTGGGGAATAGAACTAA
OMB27	CCTGTAAACAATTCTTCACCTTTAGAAACCATATTTCTCCTCTTAGATTATTCGT
OMB28	ACGAATAATCTAAGAGAGGAGAAAATATGGTTTCTAAAGGTGAAGAATTGTTTACAGG
OMB29	TGATTTTCTCGATAATTGCTTCCATTCCGGAACCTTTATACAATTCATCCATACC
OMB30	GGTATGGATGAATTGTATAAAGGTTCCGGAATGGAAGCAATTATCGAGAAAATCA
OMB31	CGCGGATCCCCCTTGACCTGCTTGAGTTCTTCCAGA
OMB79	CGACGGCCGGAACCTTTATACAATTCATCCATACCATGTG

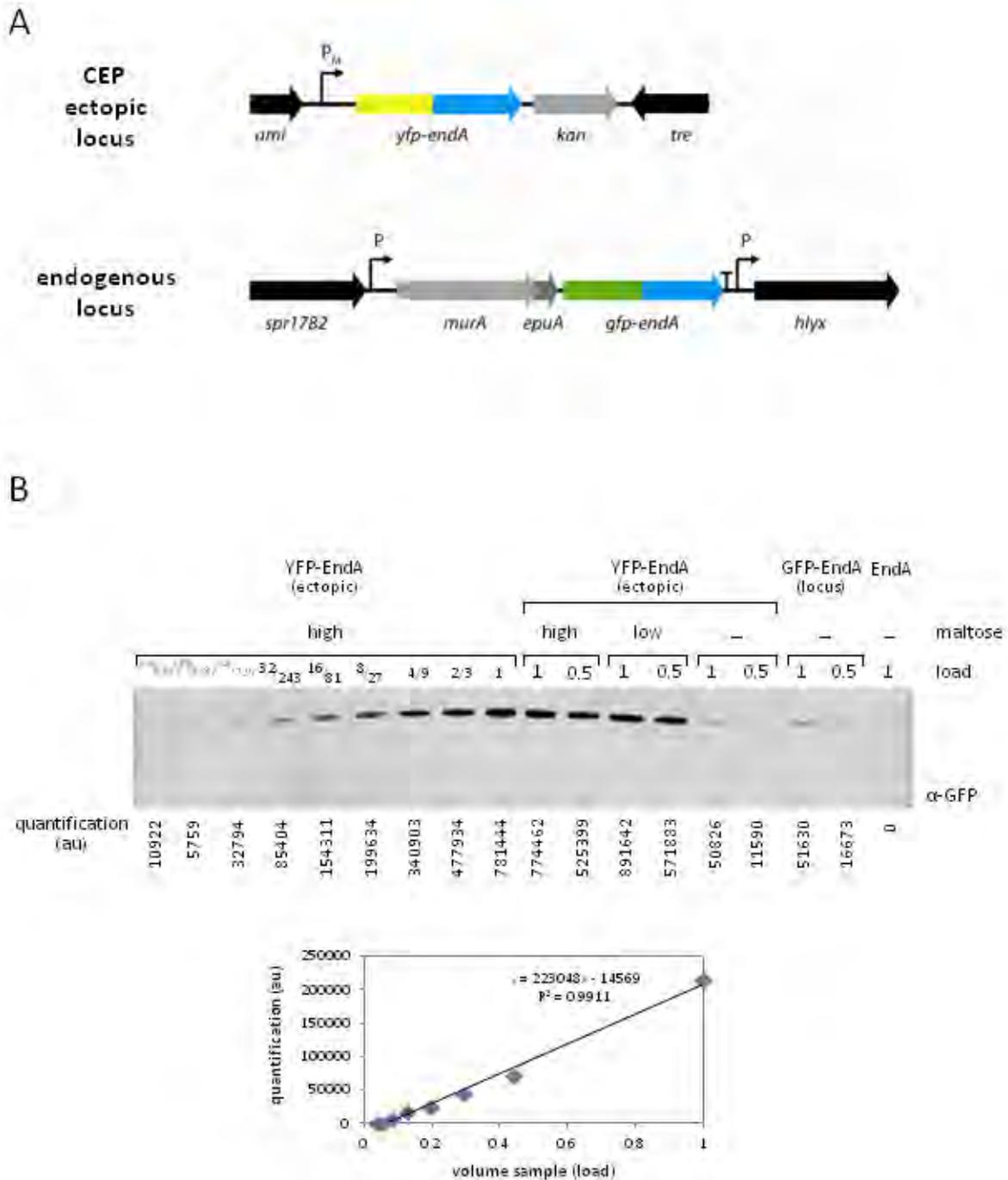


Fig. S1. Quantitation of YFP-EndA and GFP-EndA levels. (A) Schematic presentation of the genomic context of strains containing the maltose inducible (P_M) *yfp-endA* integrated at the CEP ectopic chromosomal locus and the endogenous *gfp-endA* constructs. (B) Representative immunoblot used to determine the relative cellular amounts of YFP-EndA and GFP-EndA proteins. Cells were grown in C+Y medium supplemented with maltose to a final concentration of 1% (indicated as “high”) or 0,03% (indicated as “low”), or in C+Y medium supplemented with 0.3% saccharose (indicated as “-”) to early exponential phase and induced to develop competence by CSP addition for 10 minutes. Whole cell extracts were prepared and analyzed by immunoblot using anti-GFP antibodies. Different amounts of whole cell extracts were loaded onto the gel (load). Signals were quantified using a Fujifilm LAS-4000 luminescence image analyzer and values are given in arbitrary units (au). Strains used: R3243 (YFP-EndA), R2762 (GFP-EndA) and R1501 (EndA) (top). Standard curve generated from panel A. The signal intensity of the YFP-EndA protein in cell extracts from cultures grown in high maltose concentration (1%) were plotted as a function of the volume sample loaded onto the gel (bottom).

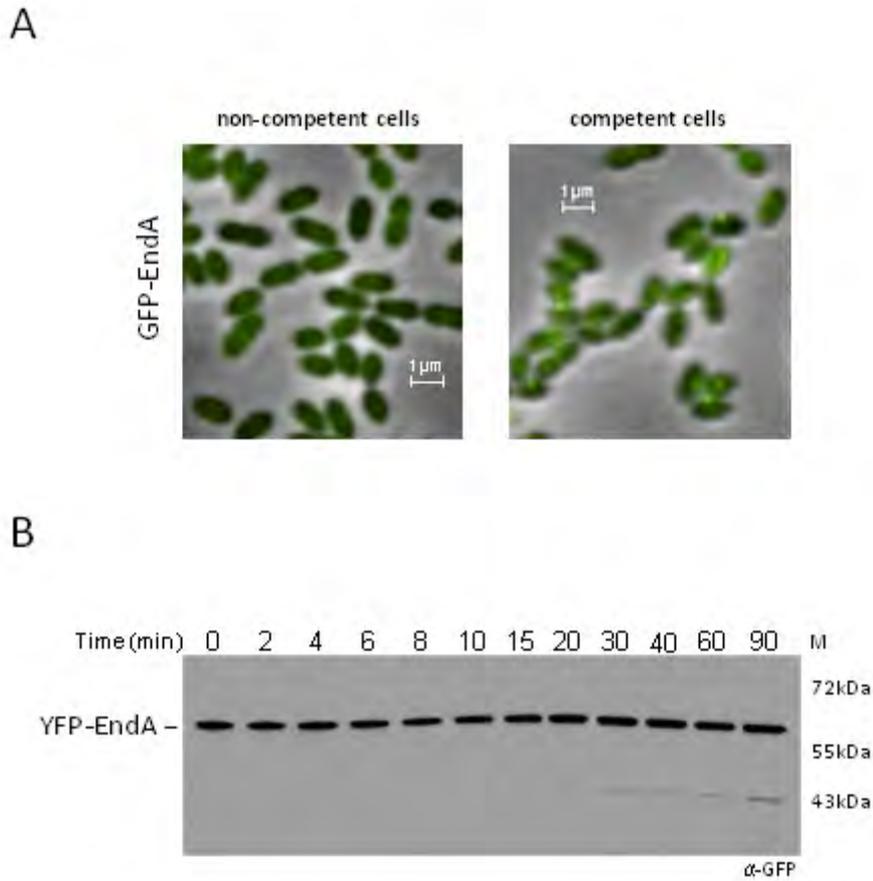


Fig. S2. (A) Localization of GFP-EndA expressed from the *endA* chromosomal locus in non-competent (*left*) and competent (*right*) cells. Cells from strain R2762 were grown to mid-exponential phase in C+Y medium at 37°C and induced or not to develop competence by CSP addition for 10 minutes. The YFP fluorescence images were false colored yellow and overlaid on phase contrast images. Bars, 1 μ m. (B) YFP-EndA levels remain stable over the competence development. Cells harboring the YFP-EndA fusion were grown in C+Y medium supplemented with 1% maltose to early exponential phase and induced to develop competence by CSP addition. At indicated times after CSP addition (in minutes), samples were collected. Whole-cell extracts were prepared and analyzed by immunoblot using anti-GFP antibodies. MW Markers (M) are shown on the right.

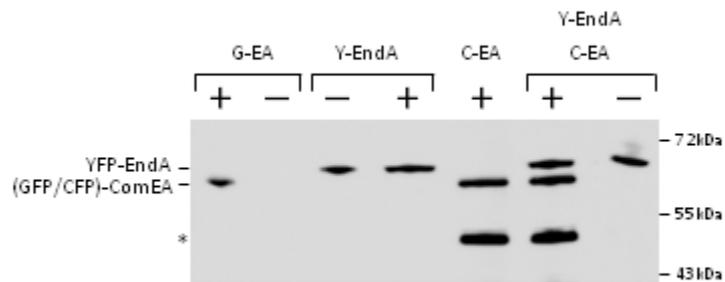


Fig. S3. Immunoblot analyses of strain containing GFP-ComEA (G-EA, strain R2940), YFP-EndA (Y-EndA, strain R3243), CFP-ComEA (C-EA, strain 3138) and both YFP-EndA and CFP-ComEA (Y-EndA C-EA, strain 3242). Cells were grown in C+Y medium supplemented with 1% maltose to early exponential phase and induced (+) or not (-) to develop competence by CSP addition for 10 minutes. Whole cell extracts were prepared and analyzed by immunoblot using anti-GFP antibodies. An asterisk indicates a degradation product band in cells containing the CFP-ComEA fusion. MW markers are shown on the right

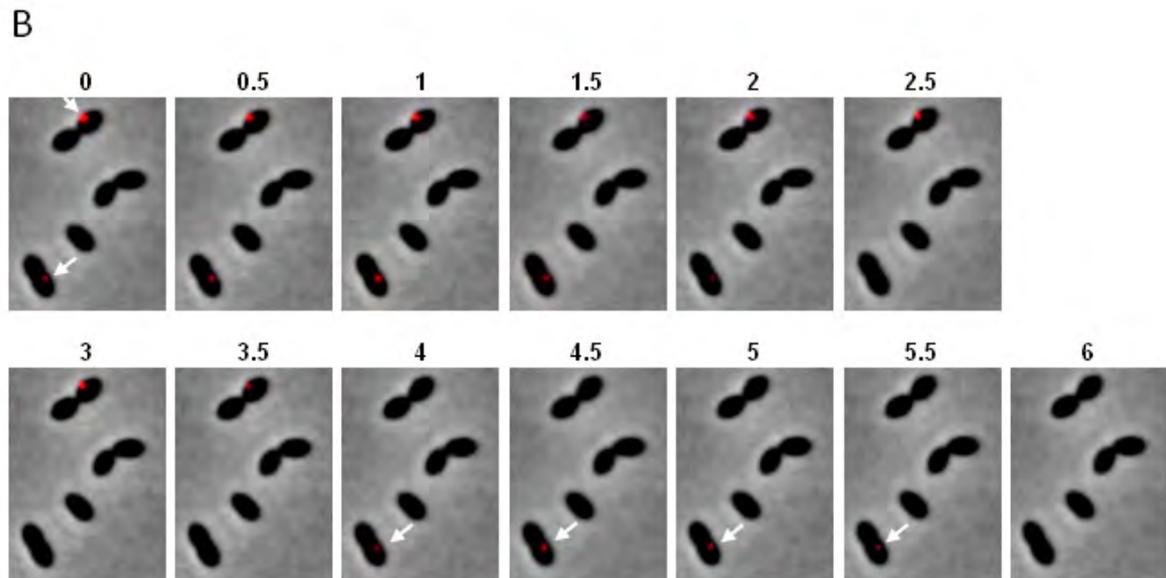
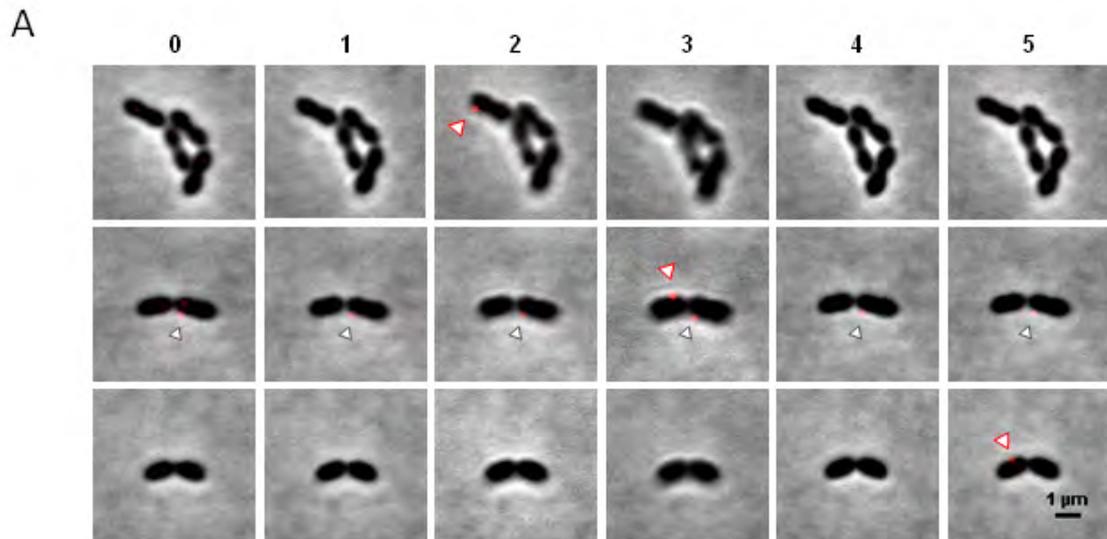


Fig. S4. Fluorescent DNA uptake in wildtype cells. (A) Fluorescence time lapse microscopy of wildtype strain R1501 induced to develop competence by CSP addition and incubated with a Cy3-labelled 285 bp DNA fragment. The Cy3 fluorescence images were false colored red and overlaid on phase contrast images. Three representative cells are shown. Time after CSP addition is indicated in minutes. Time zero is arbitrary and does not correspond to the time of CSP addition. White triangle with red outline point to putative DNA uptake events and white triangles with black outline point to stable DNA fluorescent dots that may represent non-specific DNA binding to the cell surface. (A) Fluorescence time lapse microscopy. Same as (A) with a 12 kb DNA fragment. White arrows indicate DNA dots at the surface of two different cells. Note that two successive DNA dots appear to bind to the same cell, at the same location (cell at the bottom left corner).

Discussion et perspectives

I. Le recrutement d'EndA dans les cellules compétentes

Durant cette thèse, je me suis intéressé à la localisation de plusieurs constituants du Transformasome en particulier les composants du pore d'entrée de l'ADN situés dans la membrane cytoplasmique. Les résultats obtenus montrent que la plupart des éléments sont concentrés à des sites spécifiques dans la cellule, au niveau des pôles et/ou du septum. Pour mieux comprendre ces deux profils de localisation, nous avons étudié la localisation de la nucléase EndA. EndA est une exception dans le système de transformation puisque contrairement à toutes les autres protéines du Transformasome, EndA est la seule protéine exprimée constitutivement et non induite en compétence. Dans des cellules non compétentes, EndA est localisée de manière homogène dans la membrane. Puis, lorsque les cellules développent la compétence, nous avons montré que EndA se relocalise sous forme de foci (chapitre III). Ces foci sont visibles dans toutes les cellules mais apparaissent de manière asynchrone dans la population. La stabilité des foci est transitoire dans les cellules et les foci peuvent se former successivement dans une même cellule. Cette relocalisation est dépendante d'une protéine du pore d'entrée, ComEA. De plus, nos résultats montrent que les foci d'EndA co-localisent avec la fixation d'un ADN fluorescent à la surface des cellules. Ces résultats suggèrent que les foci observés représentent le recrutement d'EndA au niveau du pore d'entrée du Transformasome.

Au laboratoire, selon le type d'ADN donneur, il est possible d'obtenir des fréquences de transformation de l'ordre de 100%. Ces résultats impliquent que, chez le pneumocoque, toutes les cellules sont capables d'internaliser et d'intégrer de l'ADN. Nous avons donc cherché à comprendre pourquoi toutes les cellules ne contenaient pas un focus d'EndA pendant le développement de la compétence. Nous avons d'abord posé l'hypothèse que le recrutement d'EndA est requis pour l'internalisation de l'ADN et que sa position marque la localisation du pore d'entrée. Le fait que les foci d'EndA se forment de manière asynchrone dans les cellules d'une culture compétente peut être interprété de deux façons i) EndA est recrutée uniquement lorsque les cellules captent de l'ADN ou ii) les pores d'entrée ne se forment pas de manière synchrone dans la population. Les résultats montrent que les foci d'EndA apparaissent dans les cellules de culture compétente même en l'absence d'ADN donneur. De plus, l'addition de grande quantité d'ADN exogène dans le milieu de culture n'entraîne pas une augmentation du nombre de cellules contenant un focus. Nous en concluons que la mise en place du pore d'entrée du Transformasome est asynchrone dans la population.

II. Localisation septale du Transformasome

EndA se concentre sous forme d'un focus majoritairement localisé au niveau du septum de division. ComEA présente un profil de localisation similaire au début du développement de la compétence. La visualisation directe d'un ADN donneur montre qu'il se fixe également essentiellement au niveau du septum de division. Des expériences préliminaires de localisation de ComEC montrent également ce profil de localisation. Il semble donc que tous les composants nécessaires à la fixation de l'ADN sont localisés de manière spécifique au septum. Pour confirmer ces résultats, il serait intéressant de regarder où sont localisés d'autres composants du Transformasome comme le pseudo-pilus. J'ai initié ce travail en étudiant la localisation de ComGA, l'ATPase nécessaire pour l'assemblage du pseudo-pilus. ComGA présente une localisation à des sites spécifiques de la cellule, à la fois polaire et septale. Chez *B. subtilis*, ComGA a été décrite comme essentielle au processus de transformation mais elle représenterait également un point de contrôle pour la reprise du processus de division au moment de la sortie de l'état de compétence. Il est donc possible que ComGA exerce aussi plusieurs fonctions chez *S. pneumoniae* et que ces localisations septales et polaires reflètent ces différentes fonctions. Pour localiser le site d'ancrage du pseudo-pilus, il serait donc plus judicieux de localiser la protéine membranaire ComGB.

De plus, pour vérifier que le Transformasome forme une machinerie unique dans la cellule, il serait intéressant d'analyser la localisation des protéines solubles impliquées dans la protection de l'ADN entrant dans le cytoplasme et servant à la recombinaison homologue chez *S. pneumoniae*. L'organisation de tous les composants du Transformasome en un complexe unique au site de division pourrait permettre aux cellules d'intégrer l'ADN plus rapidement dans le chromosome (voir ci après).

III. Quelle est l'ancre qui permet le recrutement du Transformasome ?

Mes résultats suggèrent que le Transformasome se localise à des sites précis dans la cellule. Cependant, les acteurs moléculaires qui permettent le ciblage des composants du Transformasome sont encore inconnus. L'analyse de la protéine EndA apporte des informations sur le mécanisme impliqué dans sa relocalisation. Le recrutement d'EndA lors de l'induction de la compétence est dépendant d'une protéine, ComEA. Il est possible que la relocalisation d'EndA sous forme de foci soit le résultat d'un mécanisme de diffusion et capture. EndA diffuserait dans la membrane et rencontrerait ComEA qui permettrait de la retenir à un site particulier. En revanche, le mécanisme d'ancrage de ComEA reste à découvrir.

Pour déterminer si la localisation de ComEA est dépendante du développement de la compétence, il serait intéressant d'exprimer la fusion GFP-ComEA dans une souche incapable de développer la compétence. Elle pourrait être distribuée de manière homogène dans la membrane. Ce résultat impliquerait qu'un facteur induit en compétence serait nécessaire à sa localisation. Au contraire, son profil de localisation pourrait être identique à celui observé dans des cellules compétentes suggérant que ComEA possède des propriétés intrinsèques permettant sa localisation ou bien qu'elle dépend de protéines exprimées en dehors de la compétence.

Des expériences permettant de suivre l'ADN radioactif donneur montrent que dans un mutant *comeA*, il y a une fixation résiduelle de l'ADN, suggérant que le pseudo-pilus et les acteurs putatifs impliqués dans la fixation primaire de l'ADN sont actifs et potentiellement bien localisés. ComEA ne serait donc pas nécessaire pour la localisation de ces protéines. On peut donc se demander quelles sont les ancrs moléculaires qui permettent la localisation des différentes sous unités du Transformasome. Ces ancrs peuvent être de nature protéique ou lipidique.

Récemment, il a été montré que la localisation de plusieurs protéines à des sites spécifiques peut dépendre de la courbature des membranes et des lipides qu'elles contiennent (Lenarcic et al., 2009; Ramamurthi et Losick, 2009; Ramamurthi et al., 2009; Huang et Ramamurthi, 2010; Kumaran S, 2010). On sait que l'induction de la compétence entraîne un changement de la composition lipidique dans la membrane du pneumocoque (Clavé et Trombe, 1988). De manière intéressante, j'ai pu montrer (chapitre I) que les éléments du Transformasome ne sont pas solubilisés en présence de détergents doux, contrairement à d'autres protéines membranaires du pneumocoque. Il est donc possible qu'un environnement lipidique spécifique dans la membrane des cellules compétentes soit responsable de l'ancrage du Transformasome.

IV. Dégradation du pore d'entrée du Transformasome

Lorsque les cellules ne sont plus capables de transformer, les localisations de ComEA suggèrent qu'elle est toujours présente dans la cellule et se trouve aux pôles des cellules. Nous proposons que la protéine ComEA soit dégradée au niveau des pôles. Cependant, il est possible que cette localisation polaire soit artéfactuelle du fait que ComEA est fusionnée à la GFP. En effet, la GFP est connue pour stabiliser les protéines (Margolin, 2000). Pour vérifier la présence de ComEA aux pôles des cellules lors de la fermeture de la compétence, il faudrait analyser cette localisation par immunofluorescence ou vérifier la stabilité de la fusion par rapport à la protéine sauvage en western blot, ces deux techniques nécessitant un anticorps α -ComEA .

Si cette localisation polaire est réelle, on ne peut pas conclure si ComEA se retrouve au niveau du nouveau pôle résultant de la division cellulaire ou si ComEA migre de manière active depuis le septum vers les pôles. Il a déjà été montré que les agrégats protéiques indésirables pour la cellule ont tendance à se concentrer au niveau du vieux pôle (Lindner et al., 2008), suggérant qu'il y aurait une accumulation des protéines au niveau des pôles de la cellule pour permettre leur dégradation. De plus, chez *B. subtilis*, il a été montré que la délocalisation du Transformasome se faisait au niveau des pôles des cellules compétentes (Hahn et al., 2009). Chez cette bactérie, la dégradation des protéines du Transformasome est un mécanisme actif qui nécessite un complexe protéolytique formé par les protéines McsA/McsB et ClpP qui fonctionnerait avec les protéines ClpC et/ou ClpE. Les protéines McsB, ClpC et ClpP sont localisées au niveau des pôles des cellules compétentes. Aucun homologue de McsA et McsB est retrouvé chez le *S. pneumoniae*. On peut noter que, chez le pneumocoque, la compétence entraîne l'induction de plusieurs cofacteurs de la protéase ClpP, notamment ClpL et ClpE (Dagkessamanskaia et al., 2004). Il serait donc intéressant de voir si elles sont nécessaires pour la dégradation du Transformasome. Une étape pour répondre à cette question serait par exemple de regarder leur localisation au cours du développement de la compétence.

V. Raison d'être de la localisation septale du Transformasome

Les résultats présentés ici suggèrent que le Transformasome s'assemble et serait actif au niveau du site de division et enfin serait délocalisé au niveau des pôles.

Au laboratoire, on a pu montrer que l'induction de la compétence était accompagnée d'un mécanisme actif de ralentissement du processus de septation. Une seule protéine est requise et suffisante pour provoquer ce mécanisme, ComM. *comM* est un gène précoce induit en compétence qui a d'abord été identifié comme un facteur de protection contre la lyse cellulaire due au fratricide. Récemment, au laboratoire, nous avons montré que l'expression de ComM dans des cellules non compétentes bloquait la division cellulaire. Une idée attractive consisterait à penser que ComM est exprimée précocement pour ralentir le processus de septation, permettant ainsi la mise en place du Transformasome qui se ferait lors de la synthèse du peptidoglycane.

La mise en place de complexes qui traversent les différentes enveloppes de la cellule nécessite la présence d'une brèche dans le peptidoglycane, comme il a été montré pour d'autres systèmes (Koraimann, 2003). Les études de transcriptomiques ont montré que plusieurs hydrolases étaient induites en compétence (Dagkessamanskaia et al., 2004; Peterson et al., 2004), mais leur absence n'entraîne pas de déficit de transformation dans nos conditions de laboratoire, suggérant qu'elles n'ont pas un rôle majeur dans la biogénèse

du pore d'entrée. On peut imaginer que l'insertion du pore d'entrée s'effectue durant la synthèse du peptidoglycane au niveau du septum de division.

Enfin, il est possible que le positionnement du Transformasome au centre de la cellule facilite l'intégration de l'ADN donneur dans le chromosome de la bactérie. Lorsque l'ADN entre dans les cellules compétentes, on ne sait pas si il est amené au chromosome par les protéines solubles du Transformasome ou si le chromosome est déroulé au niveau du pore d'entrée pour effectuer la recherche d'homologie. Bien que hautement spéculatif, on peut imaginer que si la réplication chez le pneumocoque a lieu au centre de la cellule, l'entrée de l'ADN transformant au niveau du septum facilite la recherche d'homologie.

Bibliographie

- Aas, F.E., Løvold, C., and Koomey, M. (2002a). An inhibitor of DNA binding and uptake events dictates the proficiency of genetic transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: mechanism of action and links to Type IV pilus expression. *Molecular Microbiology* 46, 1441–1450.
- Aas, F.E., Wolfgang, M., Frye, S., Dunham, S., Løvold, C., and Koomey, M. (2002b). Competence for natural transformation in *Neisseria gonorrhoeae*: components of DNA binding and uptake linked to type IV pilus expression. *Molecular Microbiology* 46, 749–760.
- Adams, D.W., and Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nature Reviews Microbiology* 7, 642–653.
- Assalkhou, R., Balasingham, S., Collins, R.F., Frye, S.A., Davidsen, T., Benam, A.V., Bjørås, M., Derrick, J.P., and Tønjum, T. (2007). The outer membrane secretin PilQ from *Neisseria meningitidis* binds DNA. *Microbiology* 153, 1593–1603.
- Attaiech, L. (2009). Déterminants de stabilité et de maturation de l'ADN internalisé lors de la transformation génétique naturelle chez *Streptococcus pneumoniae*. Thèse de doctorat.
- Attaiech, L., Olivier, A., Mortier-Barrière, I., Soulet, A.-L., Granadel, C., Martin, B., Polard, P., and Claverys, J.-P. (2011). Role of the single-stranded DNA-binding protein SsbB in pneumococcal transformation: maintenance of a reservoir for genetic plasticity. *PLoS Genet* 7, e1002156.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., and 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. *The Journal of Experimental Medicine* 79, 137.
- Ayers, M., Howell, P.L., and Burrows, L.L. (2010). Architecture of the type II secretion and type IV pilus machineries. *Future Microbiology* 5, 1203–1218.
- Barák, I., Muchová, K., Wilkinson, A.J., O'Toole, P.J., and Pavlendová, N. (2008). Lipid spirals in *Bacillus subtilis* and their role in cell division. *Molecular Microbiology* 68, 1315–1327.
- Barany, F., Kahn, M.E., and Smith, H.O. (1983). Directional transport and integration of donor DNA in *Haemophilus influenzae* transformation. *PNAS* 80, 7274–7278.
- Beilharz, K., Nováková, L., Fadda, D., Branny, P., Massidda, O., and Veening, J.-W. (2012). Control of cell division in *Streptococcus pneumoniae* by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP. *PNAS* 109, E905–E913.
- Beiter, K., Wartha, F., Albiger, B., Normark, S., Zychlinsky, A., and Henriques-Normark, B. (2006). An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Current Biology* 16, 401–407.
- Bejerano-Sagie, M., Oppenheimer-Shaanan, Y., Berlatzky, I., Rouvinski, A., Meyerovich, M., and Ben-Yehuda, S. (2006). A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* 125, 679–690.
- Bergé, M., Moscoso, M., Prudhomme, M., Martin, B., and Claverys, J. (2002). Uptake of transforming DNA in Gram-positive bacteria: a view from *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 45, 411–421.
- Bergé, M., Mortier-Barrière, I., Martin, B., and Claverys, J.-P. (2003). Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands. *Molecular Microbiology* 50, 527–536.

- Berka, R.M., Hahn, J., Albano, M., Draskovic, I., Persuh, M., Cui, X., Sloma, A., Widner, W., and Dubnau, D. (2002). Microarray analysis of the *Bacillus subtilis* K-state: genome-wide expression changes dependent on ComK. *Molecular Microbiology* 43, 1331–1345.
- Biswas, G.D., Burnstein, K.L., and Sparling, P.F. (1986). Linearization of donor DNA during plasmid transformation in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 168, 756–761.
- Briley Jr, K., Dorsey-Oresto, A., Prepiak, P., Dias, M.J., Mann, J.M., and Dubnau, D. (2011a). The secretion ATPase ComGA is required for the binding and transport of transforming DNA. *Molecular Microbiology* 81, 818–830.
- Briley Jr, K., Prepiak, P., Dias, M.J., Hahn, J., and Dubnau, D. (2011b). Maf acts downstream of ComGA to arrest cell division in competent cells of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 81, 23–39.
- Burghout, P., Bootsma, H.J., Kloosterman, T.G., Bijlsma, J.J.E., Jongh, C.E. de, Kuipers, O.P., and 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.
- Burrows, L.L. (2005). Weapons of mass retraction. *Molecular Microbiology* 57, 878–888.
- Burton, B., and Dubnau, D. (2010). Membrane-associated DNA transport machines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.
- Butland, G., Peregrín-Alvarez, J.M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D., Beattie, B., Krogan, N., et al. (2005). Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* 433, 531–537.
- Butler, Y.X., Abhayawardhane, Y., and Stewart, G.C. (1993). Amplification of the *Bacillus subtilis* *maf* gene results in arrested septum formation. *J. Bacteriol.* 175, 3139–3145.
- Campbell, E.A., Choi, S.Y., and Masure, H.R. (1998). A competence regulon in *Streptococcus pneumoniae* revealed by genomic analysis. *Molecular Microbiology* 27, 929–939.
- Campo, N., and Rudner, D.Z. (2006). A branched pathway governing the activation of a developmental transcription factor by regulated intramembrane proteolysis. *Molecular Cell* 23, 25–35.
- Campo, N., Marquis, K.A., and Rudner, D.Z. (2008). SpoIIQ anchors membrane proteins on both sides of the sporulation septum in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 283, 4975–4982.
- Cartwright, K. (2002). Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management. *Eur. J. Pediatr.* 161, 188–195.
- Charpentier, X., Polard, P., and Claverys, J.-P. Induction of competence for genetic transformation by antibiotics: convergent evolution of stress responses in distant bacterial species lacking SOS? *Current Opinion in Microbiology*.
- Chen, J.-D., and Morrison, D.A. (1987). Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* 133, 1959–1967.
- Chen, I., and Gotschlich, E.C. (2001). ComE, a competence protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-binding activity. *J. Bacteriol.* 183, 3160–3168.
- Chen, I., and Dubnau, D. (2004) DNA uptake during bacterial transformation. *Nature Rev. Microbiol.* 2, 241-249.

- Chen, I., Christie, P.J., and Dubnau, D. (2005). The Ins and Outs of DNA transfer in bacteria. *Science* 310, 1456–1460.
- Chen, I., Provvedi, R., and Dubnau, D. (2006). A macromolecular complex formed by a pilin-like protein in competent *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 281, 21720–21727.
- Chung, Y.S., and Dubnau, D. (1995). ComC is required for the processing and translocation of ComGC, a pilin-like competence protein of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 15, 543–551.
- Chung, Y.S., Breidt, F., and Dubnau, D. (1998). Cell surface localization and processing of the ComG proteins, required for DNA binding during transformation of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 29, 905–913.
- Clavé, C., and Trombe, M.-C. (1988). Flux ioniques et énergétique cellulaire au cours de l'induction de la compétence chez *Streptococcus pneumoniae*, leur implication dans le transport de l'ADN.
- Claverys, J.-P., Prudhomme, M., Mortier-Barrière, I., and Martin, B. (2000). Adaptation to the environment: *Streptococcus pneumoniae*, a paradigm for recombination-mediated genetic plasticity? *Molecular Microbiology* 35, 251–259.
- Claverys, J.-P., and Havarstein, L.S. (2002). Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Biosci.* 7, d1798–1814.
- Claverys, J.-P., and Martin, B. (2003). Bacterial “competence” genes: signatures of active transformation, or only remnants? *Trends in Microbiology* 11, 161–165.
- Claverys, J.-P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology* 60, 451–475.
- Claverys, J.-P., Martin, B., and Håvarstein, L.S. (2007). Competence-induced fratricide in *streptococci*. *Molecular Microbiology* 64, 1423–1433.
- Claverys, J.-P., Martin, B., and Polard, P. (2009). The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 643–656.
- Clifton, S.W., McCarthy, D., and Roe, B.A. (1994). Sequence of the *rec-2* locus of *Haemophilus influenzae*: homologies to *comE-ORF3* of *Bacillus subtilis* and *msbA* of *Escherichia coli*. *Gene* 146, 95–100.
- Collins, R.F., Frye, S.A., Kitmitto, A., Ford, R.C., Tønjum, T., and Derrick, J.P. (2004). Structure of the *Neisseria meningitidis* outer membrane PilQ secretin complex at 12 Å resolution. *J. Biol. Chem.* 279, 39750–39756.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., and Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17–37.
- Cottagnoud, P., and Tomasz, A. (1993). Triggering of pneumococcal autolysis by lysozyme. *J Infect Dis.* 167, 684–690.
- Cristea, I.M., Williams, R., Chait, B.T., and Rout, M.P. (2005). Fluorescent proteins as proteomic probes. *Mol. Cell Proteomics* 4, 1933–1941.
- Croucher, N.J., Harris, S.R., Barquist, L., Parkhill, J., and Bentley, S.D. (2012). A high-resolution view of genome-wide pneumococcal transformation. *PLoS Pathog* 8, e1002745.

- Croucher, N.J., Harris, S.R., Fraser, C., Quail, M.A., Burton, J., Linden, M. van der, McGee, L., Gottberg, A. von, Song, J.H., Ko, K.S., et al. (2011). Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* 331, 430–434.
- Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Hénard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J., and 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.
- Davidson, T. (2004). Biased distribution of DNA uptake sequences towards genome maintenance genes. *Nucleic Acids Research* 32, 1050–1058.
- De Jong, I.G., Beilharz, K., Kuipers, O.P., and Veening, J.-W. (2011). Live cell imaging of *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* using automated time-lapse microscopy. *Journal of Visualized Experiments*.
- Deich, R.A., and Smith, H.O. (1980). Mechanism of homospecific DNA uptake in *Haemophilus influenzae* transformation. *Mol. Gen. Genet.* 177, 369–374.
- Delumeau, O., Lecointe, F., Muntel, J., Guillot, A., Guédon, E., Monnet, V., Hecker, M., Becher, D., Polard, P., and Noirod, P. (2011). The dynamic protein partnership of RNA polymerase in *Bacillus subtilis*. *PROTEOMICS* 11, 2992–3001.
- Desai, B.V., and Morrison, D.A. (2007). Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: formation of eclipse complex in a *coiA* mutant implicates CoiA in genetic recombination. *Molecular Microbiology* 63, 1107–1117.
- Dorman, C.J. (2009). Regulatory integration of horizontally-transferred genes in bacteria. *Front. Biosci.* 14, 4103–4112.
- Draskovic, I., and Dubnau, D. (2005). Biogenesis of a putative channel protein, ComEC, required for DNA uptake: membrane topology, oligomerization and formation of disulphide bonds. *Molecular Microbiology* 55, 881–896.
- Dreiseikermann, B. (1994). Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol. Rev.* 58, 293–316.
- Dubnau, D., and Cirigliano, C. (1972). Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*: IV. The endwise attachment and uptake of transforming DNA. *Journal of Molecular Biology* 64, 31–46.
- Dubnau, D. (1999). Dna uptake in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 53, 217–244.
- Duffin, P.M., and Seifert, H.S. (2012). Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* shows a strand preference. *FEMS Microbiology Letters* 334, 44–48.
- Dziembowski, A., and Séraphin, B. (2004). Recent developments in the analysis of protein complexes. *FEBS Letters* 556, 1–6.
- Edwards, D.H., and Errington, J. (1997). The *Bacillus subtilis* DivIVA protein targets to the division septum and controls the site specificity of cell division. *Molecular Microbiology* 24, 905–915.
- Facijs, D., and Meyer, T.F. (1993). Novel determinant (*comA*) essential for natural transformation competence in *Neisseria gonorrhoeae* and the effect of a *comA* defect on pilin variation. *Molecular Microbiology* 10, 699–712.

- Fadda, D., Santona, A., D'Ulisse, V., Ghelardini, P., Ennas, M.G., Whalen, M.B., and Massidda, O. (2007). *Streptococcus pneumoniae* DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context. *J. Bacteriol.* *189*, 1288–1298.
- Fontaine, L., Boutry, C., Frahan, M.H. de, Delplace, B., Fremaux, C., Horvath, P., Boyaval, P., and Hols, P. (2010). A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Bacteriol.* *192*, 1444–1454.
- Forget, A.L., and Kowalczykowski, S.C. (2012). Single-molecule imaging of DNA pairing by RecA reveals a three-dimensional homology search. *Nature* *482*, 423–427.
- Fox, M.S., and Hotchkiss, R.D. (1957). Initiation of bacterial transformation. *Nature* *179*, 1322–1325.
- Fox, M.S., and Hotchkiss, R.D. (1960). Fate of Transforming deoxyribonucleate following fixation by transformable bacteria. *Nature*. *187*, 1002–1003.
- Gabor, M., and Hotchkiss, R.D. (1966). Manifestation of linear organization in molecules of pneumococcal transforming DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. *56*, 1441.
- Gardan, R., Besset, C., Guillot, A., Gitton, C., and Monnet, V. (2009). The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J. Bacteriol.* *191*, 4647–4655.
- Gasc, A.M., Sicard, N., Claverys, J.P., and Sicard, A.M. (1980). Lack of SOS repair in *Streptococcus pneumoniae*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *70*, 157–165.
- Gibbs, C.P., Reimann, B.-Y., Schultz, E., Kaufmann, A., Haas, R., and Meyer, T.F. (1989). Reassortment of pilin genes in *Neisseria gonorrhoeae* occurs by two distinct mechanisms. *Nature*. *338*, 651–652.
- Goebel, W.F., and Avery, O.T. (1929). A study of pneumococcus autolysis. *The Journal of Experimental Medicine* *49*, 267.
- Grange, W., Duckely, M., Husale, S., Jacob, S., Engel, A., and Hegner, M. (2008). VirE2: a unique ssDNA-compacting molecular machine. *PLoS Biol* *6*, e44.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *The Journal of Hygiene* *27*, 113.
- 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*, 343–349.
- Hahn, J., Maier, B., Haijema, B.J., Sheetz, M., and Dubnau, D. (2005). Transformation proteins and DNA uptake localize to the cell poles in *Bacillus subtilis*. *Cell* *122*, 59–71.
- Hahn, J., Kramer, N., Briley, K., and Dubnau, D. (2009). McsA and B mediate the delocalization of competence proteins from the cell poles of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* *72*, 202–215.
- Haijema, B.-J., Hahn, J., Haynes, J., and Dubnau, D. (2001). A ComGA-dependent checkpoint limits growth during the escape from competence. *Molecular Microbiology* *40*, 52–64.

- Hakenbeck, R., Brückner, R., Denapaite, D., and Maurer, P. (2012). Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiology* 7, 395–410.
- Hamilton, H.L., Domínguez, N.M., Schwartz, K.J., Hackett, K.T., and Dillard, J.P. (2005). *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Molecular Microbiology* 55, 1704–1721.
- Hamilton, H.L., and Dillard, J.P. (2006). Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Molecular Microbiology* 59, 376–385.
- Hamoen, L.W., Smits, W.K., Jong, A. de, Holsappel, S., and Kuipers, O.P. (2002). Improving the predictive value of the competence transcription factor (ComK) binding site in *Bacillus subtilis* using a genomic approach. *Nucl. Acids Res.* 30, 5517–5528.
- Hamoen, L.W. (2011). Cell division blockage: but this time by a surprisingly conserved protein. *Molecular Microbiology* 81, 1–3.
- Håvarstein, L.S., Coomaraswamy, G., and Morrison, D.A. (1995). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *PNAS* 92, 11140–11144.
- Hiller, N.L., Ahmed, A., Powell, E., Martin, D.P., Eutsey, R., Earl, J., Janto, B., Boissy, R.J., Hogg, J., Barbadora, K., et al. (2010). Generation of genic diversity among *Streptococcus pneumoniae* strains via horizontal gene transfer during a chronic polyclonal Pediatric Infection. *PLoS Pathog* 6, e1001108.
- Hiom, K. (2012). Homologous recombination: how RecA finds the perfect partner. *Current Biology* 22, R275–R278.
- Hofreuter, D., Odenbreit, S., Püls, J., Schwan, D., and Haas, R. (2000). Genetic competence in *Helicobacter pylori*: mechanisms and biological implications. *Research in Microbiology* 151, 487–491.
- Hoskins, J., Alborn, 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. *J. Bacteriol.* 183, 5709–5717.
- Howard, L.V., and Gooder, H. (1974). Specificity of the autolysin of *Streptococcus (Diplococcus) pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 117, 796–804.
- Huang, K.C., and Ramamurthi, K.S. (2010). Macromolecules that prefer their membranes curvy. *Mol. Microbiol.* 76, 822–832.
- Hui, F.M., Zhou, L., and Morrison, D.A. (1995). Competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: organization of a regulatory locus with homology to two lactococcal A secretion genes. *Gene* 153, 25–31.
- Inamine, G.S., and Dubnau, D. (1995). ComEA, a *Bacillus Subtilis* integral membrane protein required for genetic transformation, is needed for both DNA binding and transport. *J. Bacteriol.* 177, 3045–3051.
- Jeon, B., and Zhang, Q. (2007). Cj0011c, a periplasmic single- and double-stranded DNA-binding protein, contributes to natural transformation in *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* 189, 7399–7407.

- Johnsborg, O., Eldholm, V., and Håvarstein, L.S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in Microbiology* 158, 767–778.
- Johnsborg, O., Eldholm, V., Bjørnstad, M.L., and Håvarstein, L.S. (2008). A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Molecular Microbiology* 69, 245–253.
- Johnsborg, O., and Håvarstein, L.S. (2009). Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 627–642.
- Kadioglu, A., Weiser, J.N., Paton, J.C., and Andrew, P.W. (2008). The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nature Reviews Microbiology* 6, 288–301.
- Karimova, G., Dautin, N., and Ladant, D. (2005). Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J. Bacteriol.* 187, 2233–2243.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., and Ladant, D. (1998). A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *PNAS* 95, 5752–5756.
- Kaufenstein, M., Van Der Laan, M., and Graumann, P.L. (2011). The three-layered DNA uptake machinery at the cell pole in competent *Bacillus Subtilis* cells is a stable complex. *J. Bacteriol.* 193, 1633–1642.
- Kawai, F., Shoda, M., Harashima, R., Sadaie, Y., Hara, H., and Matsumoto, K. (2004). Cardiopilin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes. *J. Bacteriol.* 186, 1475–1483.
- Keizer, D.W., Slupsky, C.M., Kalisiak, M., Campbell, A.P., Crump, M.P., Sastry, P.A., Hazes, B., Irvin, R.T., and Sykes, B.D. (2001). Structure of a Pilin Monomer from *Pseudomonas aeruginosa* implications for the assembly of pili. *J. Biol. Chem.* 276, 24186–24193.
- Kidane, D., and Graumann, P.L. (2005). Intracellular protein and DNA dynamics in competent *Bacillus subtilis* cells. *Cell* 122, 73–84.
- Kirkpatrick, C.L., and Viollier, P.H. (2011). New(s) to the (Z)-ring. *Current Opinion in Microbiology* 14, 691–697.
- Kline, K.A., and Seifert, H.S. (2005). Mutation of the *priA* gene of *Neisseria gonorrhoeae* affects DNA transformation and DNA repair. *J. Bacteriol.* 187, 5347–5355.
- Konings, W.N., Bisschop, A., Veenhuis, M., and Vermeulen, C.A. (1973). New procedure for the isolation of membrane vesicles of *Bacillus subtilis* and an electron microscopy study of their ultrastructure. *J. Bacteriol.* 116, 1456–1465.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S., and Aravind, L. (2001). Horizontal gene transfer in prokaryotes: Quantification and Classification. *Annual Review of Microbiology* 55, 709–742.
- Koraimann, G. (2003). Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60, 2371–2388.
- Kramer, N., Hahn, J., and Dubnau, D. (2007). Multiple interactions among the competence proteins of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 65, 454–464.
- Krüger, N.-J., and Stingl, K. (2011). Two steps away from novelty – principles of bacterial DNA uptake. *Molecular Microbiology* 80, 860–867.

- Kumaran S, R. (2010). Protein localization by recognition of membrane curvature. *Current Opinion in Microbiology* 13, 753–757.
- Kuroda, K., Kato, M., Mima, J., and Ueda, M. (2006). Systems for the detection and analysis of protein–protein interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 127–136.
- Lacks, S., and Greenberg, B. (1973). Competence for deoxyribonucleic acid uptake and deoxyribonuclease action external to cells in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 114, 152–163.
- Lacks, S., Greenberg, B., and Neuberger, M. (1974). Role of a deoxyribonuclease in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 71, 2305.
- Lacks, S., and Neuberger, M. (1975). Membrane location of a deoxyribonuclease implicated in the genetic transformation of *Diplococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 124, 1321–1329.
- Lacks, S.A. (1976). Binding and entry of DNA in bacterial transformation.
- 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.
- Lawrence, M.C., Pilling, P.A., Epa, V.C., Berry, A.M., Ogunniyi, A.D., and Paton, J.C. (1998). The crystal structure of pneumococcal surface antigen PsaA reveals a metal-binding site and a novel structure for a putative ABC-type binding protein. *Structure* 6, 1553–1561.
- Lee, M.S., and Morrison, D.A. (1999). Identification of a new regulator in *Streptococcus pneumoniae* linking quorum sensing to competence for genetic transformation. *J. Bacteriol.* 181, 5004–5016.
- Lenarcic, R., Halbedel, S., Visser, L., Shaw, M., Wu, L.J., Errington, J., Marenduzzo, D., and Hamoen, L.W. (2009). Localisation of DivIVA by targeting to negatively curved membranes. *The EMBO Journal* 28, 2272–2282.
- Lepage, P., Leclerc, M.C., Joossens, M., Mondot, S., Blottière, H.M., Raes, J., Ehrlich, D., and Doré, J. (2012). A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*.
- Lindner, A.B., Madden, R., Demarez, A., Stewart, E.J., and Taddei, F. (2008). Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *PNAS* 105, 3076–3081.
- Lindner, C., Nijland, R., Hartkamp, M. van, Bron, S., Hamoen, L.W., and Kuipers, O.P. (2004). Differential expression of two paralogous genes of *Bacillus subtilis* encoding single-stranded DNA binding protein. *J. Bacteriol.* 186, 1097–1105.
- Londoño-Vallejo, J.A., and Dubnau, D. (1993). comF, a *Bacillus subtilis* late competence locus, encodes a protein similar to ATP-dependent RNA/DNA helicases. *Molecular Microbiology* 9, 119–131.
- Londoño-Vallejo, J.A., and Dubnau, D. (1994). Mutation of the putative nucleotide binding site of the *Bacillus subtilis* membrane protein ComFA abolishes the uptake of DNA during transformation. *J. Bacteriol.* 176, 4642–4645.
- Lunsford, R.D., and Roble, A.G. (1997). comYA, a gene similar to comGA of *Bacillus subtilis*, is essential for competence-factor-dependent DNA transformation in *Streptococcus gordonii*. *J. Bacteriol.* 179, 3122–3126.

- Lutkenhaus, J., Pichoff, S., and Du, S. (2012). Bacterial cytokinesis: from Z ring to divisome. *Cytoskeleton* 10, 778-780.
- Maier, B., Chen, I., Dubnau, D., and Sheetz, M.P. (2004). DNA transport into *Bacillus subtilis* requires proton motive force to generate large molecular forces. *Nature Structural & Molecular Biology* 11, 643–649.
- Margolin, W. (2000). Green fluorescent protein as a reporter for macromolecular localization in bacterial cells. *Methods* 20, 62–72.
- Martin, B., Garcia, P., Castanié, M.-P., and Claverys, J.-P. (1995). The *recA* gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. *Molecular Microbiology* 15, 367–379.
- Martin, B., Quentin, Y., Fichant, G., and Claverys, J.-P. (2006). Independent evolution of competence regulatory cascades in *streptococci*? *Trends in Microbiology* 14, 339–345.
- Martin, B., Granadel, C., Campo, N., Hénard, V., Prudhomme, M., and Claverys, J. (2010). Expression and maintenance of ComD–ComE, the two-component signal-transduction system that controls competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 75, 1513–1528.
- Mashburn-Warren, L., Morrison, D.A., and Federle, M.J. (2010). A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Molecular Microbiology* 78, 589–606.
- Mashburn-Warren, L., Morrison, D.A., and Federle, M.J. (2012). The cryptic competence pathway in *Streptococcus pyogenes* is controlled by a peptide pheromone. *J. Bacteriol.* 194, 4589–4600.
- Matsumoto, K., Kusaka, J., Nishibori, A., and Hara, H. (2006). Lipid domains in bacterial membranes. *Molecular Microbiology* 61, 1110–1117.
- Mattick, J.S. (2002). Type Iv Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology* 56, 289–314.
- Meima, R., Eschevins, C., Fillinger, S., Bolhuis, A., Hamoen, L.W., Dorenbos, R., Quax, W.J., Dijk, J.M. van, Provvedi, R., Chen, I., et al. (2002). The *bdbDC* operon of *Bacillus subtilis* encodes thiol-disulfide oxidoreductases required for competence development. *J. Biol. Chem.* 277, 6994–7001.
- Méjean, V., and Claverys, J.-P. (1988). Polarity of DNA entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular and General Genetics MGG* 213, 444–448.
- Méjean, V., and Claverys, J.P. (1993). DNA processing during entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* 268, 5594–5599.
- Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., Normark, S., and Henriques-Normark, B. (2012). *LytA*, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 287, 11018–11029.
- Merritt, J., Qi, F., and Shi, W. (2005). A unique nine-gene *comY* operon in *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 151, 157–166.
- Miao, R., and Guild, W.R. (1970). Competent *Diplococcus pneumoniae* accept both single- and double-stranded deoxyribonucleic Acid. *J. Bacteriol.* 101, 361–364.

- Midon, M., Schafer, P., Pingoud, A., Ghosh, M., Moon, A.F., Cuneo, M.J., London, R.E., and Meiss, G. (2010). Mutational and biochemical analysis of the DNA-entry nuclease EndA from *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research* 39, 623–634.
- Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2000). Visualization of phospholipid domains in *Escherichia coli* by using the cardiolipin-specific fluorescent dye 10-N-Nonyl acridine orange. *J. Bacteriol.* 182, 1172–1175.
- Modell, J.W., Hopkins, A.C., Laub, M.T. (2011). A DNA damage checkpoint in *Caulobacter crescentus* inhibits cell division through a direct interaction with FtsW. *Genes Dev.* 25, 13281343.
- Mohammadi, T., Van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A., Bouhss, A., Diepeveen-de Bruin, M., Nguyen-Distèche, M., De Kruijff, B., Breukink, E. (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *EMBO Journal* 30, 1425-1432.
- Moon, A.F., Midon, M., Meiss, G., Pingoud, A., London, R.E., and Pedersen, L.C. (2011). Structural insights into catalytic and substrate binding mechanisms of the strategic EndA nuclease from *Streptococcus pneumoniae*. *Nucl. Acids Res.* 39, 2943–2953.
- Morrison, D.A., and Guild, W.R. (1973). Breakage prior to entry of donor DNA in Pneumococcus transformation. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 299, 545–556.
- Morrison, D.A. (1977). Transformation in pneumococcus: existence and properties of a complex involving donor deoxyribonucleate single strands in eclipse. *Journal of Bacteriology* 132, 576.
- Morrison, D.A., and Baker, M.F. (1979). Competence for genetic transformation in pneumococcus depends on synthesis of a small set of proteins. *Nature* 282, 215–217.
- Morrison, D.A., and Mannarelli, B. (1979). Transformation in pneumococcus: nuclease resistance of deoxyribonucleic acid in the eclipse complex. *J. Bacteriol.* 140, 655–665.
- Morrison, D.A., Mortier-Barrière, I., Attaiech, L., and Claverys, J.-P. (2007). Identification of the major protein component of the pneumococcal eclipse complex. *J. Bacteriol.* 189, 6497–6500.
- Mortier-Barrière, I., Velten, M., Dupaigne, P., Mirouze, N., Piétrement, O., McGovern, S., Fichant, G., Martin, B., Noiro, 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.
- Mullen, L.M., Bossé, J.T., Nair, S.P., Ward, J.M., Rycroft, A.N., Robertson, G., Langford, P.R., and Henderson, B. (2008). *Pasteurellaceae* ComE1 proteins combine the properties of fibronectin adhesins and DNA binding competence proteins. *PLoS ONE* 3, e3991.
- Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., Bensasson, D., and Daffonchio, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environmental Biosafety Research* 6, 37–53.
- Orillard, E., Radicella, J.P., and Marsin, S. (2011). Biochemical and cellular characterization of *Helicobacter pylori* RecA, a protein with high-level constitutive expression. *J. Bacteriol.* 193, 6490–6497.
- Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2009). NETs: a new strategy for using old weapons. *Trends in Immunology* 30, 513–521.

- Patel, S., and Weaver, K.E. (2006). Addiction Toxin Fst has unique effects on chromosome segregation and cell division in *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* *188*, 5374–5384.
- Pesakhov, S., Benisty, R., Sikron, N., Cohen, Z., Gomelsky, P., Khozin-Goldberg, I., Dagan, R., and Porat, N. (2007). Effect of hydrogen peroxide production and the Fenton reaction on membrane composition of *Streptococcus pneumoniae*. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* *1768*, 590–597.
- Pestova, E.V., Håvarstein, L.S., and 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. *Molecular Microbiology* *21*, 853–862.
- Pestova, E.V., and Morrison, D.A. (1998). Isolation and characterization of three *Streptococcus pneumoniae* transformation-specific loci by use of a lacZ reporter insertion vector. *J. Bacteriol.* *180*, 2701–2710.
- Peterson, S., Cline, R.T., Tettelin, H., Sharov, V., and Morrison, D.A. (2000). Gene expression analysis of the *Streptococcus pneumoniae* competence regulons by use of DNA microarrays. *J. Bacteriol.* *182*, 6192–6202.
- 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. *Molecular Microbiology* *51*, 1051–1070.
- Piotrowski, A., Luo, P., and Morrison, D.A. (2009). Competence for genetic transformation in *Streptococcus Pneumoniae*: termination of activity of the alternative sigma factor ComX is independent of proteolysis of ComX and ComW. *J. Bacteriol.* *191*, 3359–3366.
- Pitsiou, G.G., and Kioumis, I.P. (2011). Pneumococcal vaccination in adults: Does it really work? *Respiratory Medicine* *105*, 1776–1783.
- Proft, T., and Baker, E. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* *66*, 613–635.
- Provvedi, R., Chen, I., and Dubnau, D. (2001). NucA is required for DNA cleavage during transformation of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* *40*, 634–644.
- Provvedi, R., and Dubnau, D. (1999). ComEA is a DNA receptor for transformation of competent *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* *31*, 271–280.
- 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.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* *24*, 218–229.
- Puyet, A., Greenberg, B., and Lacks, S.A. (1990). Genetic and structural characterization of endA: a membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Molecular Biology* *213*, 727–738.
- Quevillon-Cheruel, S., Campo, N., Mirouze, N., Mortier-Barrière, I., Brooks, M.A., Boudes, M., Durand, D., Soulet, A.-L., Lisboa, J., Noirot, P., et al. (2012). Structure–function analysis of pneumococcal DprA protein reveals that dimerization is crucial for loading RecA recombinase onto DNA during transformation. *PNAS.* *109*, e2466-75.

- Rabinovich, L., Sigal, N., Borovok, I., Nir-Paz, R., Herskovits, A.A. (2012) Prophage excision activates *Listeria* competence genes that promote phagosomal escape and virulence. *Cell* 150, 792-802.
- Ramamurthi, K.S., Clapham, K.R., and Losick, R. (2006). Peptide anchoring spore coat assembly to the outer forespore membrane in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 62, 1547–1557.
- Ramamurthi, K.S., Lecuyer, S., Stone, H.A., and Losick, R. (2009). Geometric cue for protein localization in a bacterium. *Science* 323, 1354–1357.
- Ramamurthi, K.S., and Losick, R. (2009). Negative membrane curvature as a cue for subcellular localization of a bacterial protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106, 13541–13545.
- Redfield, R.J., Cameron, A.D.S., Qian, Q., Hinds, J., Ali, T.R., Kroll, J.S., and Langford, P.R. (2005). A novel CRP-dependent regulon controls expression of competence genes in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Molecular Biology* 347, 735–747.
- Renzette, N., Gumlaw, N., Nordman, J.T., Krieger, M., Yeh, S.-P., Long, E., Centore, R., Boonsombat, R., and Sandler, S.J. (2005). Localization of RecA in *Escherichia coli* K-12 using RecA–GFP. *Molecular Microbiology* 57, 1074–1085.
- Reusch, R.N., and Sadoff, H.L. (1983). D-(-)-poly-beta-hydroxybutyrate in membranes of genetically competent bacteria. *J. Bacteriol.* 156, 778–788.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology* 17, 1030–1032.
- Rosenthal, A.L., and Lacks, S.A. (1980). Complex structure of the membrane nuclease of *Streptococcus pneumoniae* revealed by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 141, 133–146.
- Rotem, S., Radzishovsky, I.S., Bourdetsky, D., Navon-Venezia, S., Carmeli, Y., and Mor, A. (2008). Analogous oligo-acyl-lysines with distinct antibacterial mechanisms. *FASEB J* 22, 2652–2661.
- Rothfield, L., Taghbalout, A., and Shih, Y.-L. (2005). Spatial control of bacterial division-site placement. *Nature Reviews Microbiology* 3, 959–968.
- Rudner, D.Z., and Losick, R. (2010). Protein subcellular localization in bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.
- Seitz, P., and Blokesch, M. (2012). Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. [Epub ahead of print]
- Seto, H., and Tomasz, A. (1975). Protoplast formation and leakage of intramembrane cell components: induction by the competence activator substance of *pneumococci*. *J. Bacteriol.* 121, 344–353.
- Sham, L.-T., Barendt, S.M., Kopecky, K.E., and Winkler, M.E. (2011). Essential PcsB putative peptidoglycan hydrolase interacts with the essential FtsXSpn cell division protein in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, E1061–E1069.

- Shapiro, L., McAdams, H.H., and Losick, R. (2009). Why and how bacteria localize proteins. *Science* 326, 1225–1228.
- Singh, R.N. (1972). Number of deoxyribonucleic acid uptake sites in competent cells of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 110, 266.
- Sinha, S., Cameron, A.D.S., and Redfield, R.J. (2009). Sxy induces a CRP-S regulon in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 191, 5180–5195.
- Sinha, S., and Redfield, R.J. (2012). Natural DNA uptake by *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 7, e35620.
- Sliusarenko, O., Heinritz, J., Emonet, T., and Jacobs-Wagner, C. (2011). High-throughput, subpixel precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics. *Molecular Microbiology* 80, 612–627.
- Stein, D.C. (1991). Transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: physical requirements of the transforming DNA. *Can. J. Microbiol.* 37, 345–349.
- Stingl, K., Müller, S., Scheidgen-Kleyboldt, G., Clausen, M., and Maier, B. (2010). Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*. *PNAS* 107, 1184–1189.
- Sung, C.K., and 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.
- Tadesse, S., and Graumann, P.L. (2007). DprA/Smf protein localizes at the DNA uptake machinery in competent *Bacillus subtilis* cells. *BMC Microbiology* 7, 105.
- Tomasz, A., and Waks, S. (1975). Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 72, 4162.
- Tortosa, P., and Dubnau, D. (1999). Competence for transformation: a matter of taste. *Current Opinion in Microbiology* 2, 588–592.
- Vagner, V., Claverys, J.-P., Ehrlich, S.D., and Méjean, V. (1990). Direction of DNA entry in competent cells of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 4, 1785–1788.
- Varon, E., and Houssaye, S. (2006). Résistance des agents infectieux impliqués dans les infections des voies respiratoires basses en France. *Médecine et Maladies Infectieuses* 36, 555–569.
- Veening, J.-W., Kuipers, O.P., Brul, S., Hellingwerf, K.J., and Kort, R. (2006). Effects of phosphorelay perturbations on architecture, sporulation, and spore resistance in biofilms of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188, 3099–3109.
- Vijayakumar, M.N., and Morrison, D.A. (1983). Fate of DNA in eclipse complex during genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 156, 644–648.
- Walker, M.J., Hollands, A., Sanderson-Smith, M.L., Cole, J.N., Kirk, J.K., Henningham, A., McArthur, J.D., Dinkla, K., Aziz, R.K., Kansal, R.G., et al. (2007). DNase Sda1 provides selection pressure for a switch to invasive group A streptococcal infection. *Nature Medicine* 13, 981–985.
- Ween, O., Gaustad, P., and Håvarstein, L.S. (1999). Identification of DNA binding sites for ComE, a key regulator of natural competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 33, 817–827.

Wiesner, J., and Vilcinskas, A. (2010). Antimicrobial peptides: The ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1, 440–464.

Yadav, T., Carrasco, B., Myers, A.R., George, N.P., Keck, J.L., and Alonso, J.C. (2012). Genetic recombination in *Bacillus Subtilis*: A division of labor between two single-strand DNA-binding proteins. *Nucl. Acids Res.* 12, 5546-5559.

Zeghouf, M., Li, J., Butland, G., Borkowska, A., Canadien, V., Richards, D., Beattie, B., Emili, A., and Greenblatt, J.F. (2004). Sequential peptide affinity (SPA) system for the identification of mammalian and bacterial protein complexes. *J. Proteome Res.* 3, 463–468.