



HAL
open science

Rôle clé du transporteur PptAB dans le quorum sensing chez *Streptococcus thermophilus*

Abarna Lingeswaran

► **To cite this version:**

Abarna Lingeswaran. Rôle clé du transporteur PptAB dans le quorum sensing chez *Streptococcus thermophilus*. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris-Saclay, 2020. Français. NNT : 2020UPASB013 . tel-03136164

HAL Id: tel-03136164

<https://theses.hal.science/tel-03136164v1>

Submitted on 9 Feb 2021

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

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

Rôle clé du transporteur PptAB
dans le quorum sensing chez
Streptococcus thermophilus

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 581, Agriculture, Alimentation, Biologie,
Environnement et Santé (ABIES)

Spécialité de doctorat: Microbiologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute,
78350, Jouy-en-Josas, France.

Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

**Thèse présentée et soutenue en visioconférence totale,
le 26 octobre 2020, par**

Abarna LINGESWARAN

Composition du Jury

Annie DARY

Professeure, Université de Lorraine

Rapporteuse & Examinatrice

Valérie GAGNAIRE

Chargée de recherche (HDR), INRAE, STLO, Rennes

Rapporteuse & Examinatrice

Nicolas BAYAN

Professeur, Université Paris-Saclay

Président de jury

Rozenn GARDAN

Chargée de recherche (HDR), INRAE, MICALIS,
Jouy-en-Josas

Directrice de thèse

“The sides of the mountain sustain life, not the peak. This is where things grow, experience is gained, and technologies are mastered. The importance of the peak lies only in the fact that it defines the sides.”

-Dr. Kalam in “Wings of Fire”

Remerciements

Je voudrais remercier tout d'abord les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon manuscrit de thèse ainsi que mon travail effectué pendant ces trois années.

Rozenn .G, merci pour m'avoir transmis tes valeurs de rigueur et du raisonnement scientifiques. La thèse n'était pas toujours Roz, mais merci de m'avoir toujours encouragé à aller au-delà de mes limites ! Mme Isabelle MV m'avait dit que tu m'encadrerais avec soin et tu consacrerai du temps pour me former. Je dois l'avouer aujourd'hui qu'elle avait totalement raison. Heureusement tu étais là pour résoudre nos problèmes de bio mol ! Merci pour m'avoir donné ce qu'on a tous de plus précieux : ton temps pendant ces trois ans et demi ! J'essaierai d'appliquer au mieux ton précieux conseil dans la vie : « Aller au plus simple » !

Vincent. J, je ne suis pas la première et ne serai pas la dernière à te dire à quel point tu es inspirant comme scientifique et personne. Je n'aurais jamais cherché ces petits peptides avec autant d'enthousiasme sans ta pédagogie. J'ai eu de la chance de pouvoir te solliciter avec mes questions scientifiques mais aussi philosophiques. Ton sens de l'écoute était ma grande force pour surmonter des collines qui me semblaient insurmontables ou pour traverser des tunnels sans issue de sortie. Merci pour ton temps, ta patience, ta tolérance et surtout pour ton pouvoir de rassurance ! Sinon « J'ai une question » 😊 !

Céline. H, tu m'étonnes chaque fois que tu trouves toujours un petit créneau pour moi dès que j'ai besoin alors que parfois tu as à peine le temps pour un déjeuner. Merci d'avoir été aussi présente et répondu à toutes mes questions

avec autant de patience avec mes petits peptides. Nos discussions lumos mais aussi sur la vie vont beaucoup me manquer !

Lydie. C, comment oublier les émotions qu'on a vécu avec notre cher Orbi !

Véronique. M, ton énergie est tellement contagieuse et inspirante ! Tu m'as toujours donné des conditions optimales pour travailler ! Je ne sais pas si merci est suffisant pour te dire à quel point je suis reconnaissante pour le moment où tu es venue frapper à ma porte quand je n'étais pas dans mon assiette ! Merci pour tes conseils et tes retours sur mon manuscrit de thèse et d'avoir été présente quand j'en avais besoin.

Merci à mes membres de comité, Eugénie. H, Martin. P et Pascale. S, pour les conseils précieux aux moments cruciaux de ma thèse !

Christine. D, comment oublier ta présence pendant toute ma phase de préparation au concours ABIES mais aussi après ! Tu m'as fait réaliser pendant le co-voiturage (merci RATP/SNCF) le contentement qu'on peut ressentir en rendant service à la communauté dans laquelle on vit !

Françoise. R, si mes diapos sont lisibles à distance aujourd'hui c'est grâce à tes commentaires sur la police. Quelle chance de pouvoir discuter science, bio, thé, fashion, mots-fléchés et de la vie avec une même personne.

Christine. M, la préparation MCD aurait été moins drôle sans toi ! Je sais à quel point tu voulais que je continue en thèse après mon M2. Même si les trois ans sont passés à une vitesse éclair, nos papotages me manquent déjà !

Sophie B, tu sais que non seulement toi mais toute ta petite famille va me manquer ! Nos moments de concerts de musique classique avec ta maman, retrouver tes deux petits loulous Hugo et Elise sont un grand bonheur ! Sans

oublier nos tentatives de running à Vauboyen pour perdre les calories qu'on avait gagné avec notre boîte de gâteaux/chocolat cachée dans les tiroirs !

Edith H, tu as aussi subi comme beaucoup mes râleries quand mes manips ne fonctionnaient pas ! A chaque fois tu es plus optimiste pour mes mutants que les tiens ! Merci de m'avoir permis de bénéficier aussi de ton vécu !

Cécile G ou ma petite Cécile ! Même si je ne serai pas présente à tes côtés au 526 pendant ta période de fin de thèse, tu sais que tant qu'il y a du spritz et un restau jap dans le coin on peut passer des heures à discuter !

Lucas P, merci pour les conseils plus qu'utiles et des critiques pointues !

Coralie M, merci pour les belles constructions de souches qui ont permises d'avoir mes premiers résultats ! Ta gentillesse est trop réconfortante !

Marine ou ma grande Marine, que des bons souvenirs entre les soirées d'anniversaires et les moments intenses pour trouver des cadeaux au dernier moment ! Bon au moins on sait que même en partant du 526, on ne changera pas nos vieilles habitudes !

Gwendoline pour les dépannages de matos quand il faut, les livraisons de courses, Léa, Sophia, Esteban, Aaron, beaucoup de bons moments rigolos passés ensemble pour être listés ici ! Mots-fléchés, horoscope, pause glace...

Anne-Marie et Marie, merci pour votre bienveillance envers moi !

Merci à tous les membres de la grande équipe 526 pour avoir contribué à créer une bonne ambiance mais aussi pour les moments café, notre grand « pouet » témoignant de la présence de la nourriture !

La thèse était aussi pleine d'aventures de groupe et des rencontres incroyables plus ou moins marquantes d'abord à Micalis avec Repas de jeunes et DocMicalis puis sur le centre avec Doc'J ! Merci à Arnaud qui m'a transmis

son enthousiasme à embarquer dans un projet aussi incroyable comme CARaDOC, du coup à la rencontre des doctorants de Paris-Saclay !

Young and Xu-Fei, you girls were a great company during my thesis ! Thanks Xu-Fei for the carpooling and delicious food for Chinese New-year!

Maca, le chemin de Vauboyen était agréable le soir grâce à toi ! Merci pour ta présence et ta bonne humeur !!

Vincent. S, les procédures sur ADUM auraient été moins drôles sans toi !

Jonathan/Jo, merci pour tes appels de soutien pendant la rédaction !

Le groupe Déborah & co ou RDB ou « C'est Mayrone qui paie », merci pour les soirées inépuisables ! Merci pour les moments magiques de rire (comment oublier Emy !!) et votre soutien !

Céline. B, Merci de nous avoir sauvé d'un frelon à Avignon !

Comment oublier le soutien irremplaçable de FcFC ! En plus de Flocon et Chocothé, Pauline et Bertrand, vous étiez formidables depuis qu'on s'est connu ! Tellement de bons souvenirs, je ne sais pas si j'ai suffisamment d'espace pour les stocker ! Malgré la distance ou les circonstances, je n'ai jamais ressenti qu'on ne partageait plus les mêmes aventures !!

Sophie. L, on a commencé par partager le même bureau mais me voilà aujourd'hui devenue ta grande amie ! Surtout la tata de ta petite Eléa !!

Toutes ces belles rencontres ont été possibles grâce au concours d'ABIES qui m'a donné l'opportunité de passer trois ans dans ce projet génial ! Merci à Alexandre Pery pour votre présence à mon 2^{ème} comité de thèse qui a été très formateur ! Pierre Lauraffie pour avoir pris du temps pour discuter de l'après-thèse ! Merci à l'équipe d'ABIES qui exerce un travail formidable !

Mme. Isabelle. MV, merci pour vos conseils depuis M2 !

One of my wonders during this thesis is my meeting with you Irina. V! I never thought the 2nd time we met at ABIES, we will end up having priceless conversations at Jardin du Luxembourg thanks to our "butterfly vision"!

Felipe, merci pour ta présence et ta zénitude qui ont été une bouffée d'oxygène pendant ma dernière phase de thèse !

Mon petit groupe de « Multi-ethnic friends », malgré nos emplois du temps de ministre, nous arrivons heureusement à trouver des créneaux par miracle! Merci à Sujung et Kelly, mes copines de thèse pour nos moments de râleries! Stéphanie pour ta touche de « normalité » à ce groupe! Estelle et Megan, comment oublier les vacances à Divonne-les-Bains et Pilatus!

Annabelle et Mélanie ou je dois dire « trio infernal », entre les bons restos, les soirées de raviolis népalais, les nuits blanches Monopoly, les réveillons, bien trop de choses à évoquer ! Merci pour votre soutien !

Bénédictte, cette petite rando à Clermont-Ferrand pendant la période de rédaction a été top ! On changera notre rdv annuel à Paris vers CF bientôt !

Chooyoung, merci pour m'avoir fait bénéficier de ton expertise de thèse !

Mimi, Nounours, Sabrinou et Willy/William, quel soutien infailible dans toutes mes aventures depuis le lycée ! Nos moments en direct ou par visio pendant le confinement ne sont pas remplaçables !

Roseline, thanks for being my definition of wisdom! How lucky am I to have you in my life! Your support have always been my great strength!

Accsana, thanks for being my definition of craziness! Why? Because you believe in me more than I believe in myself since we met!

Madhu, it's been 14 years since we have met but still you cheer me up from Chennai! Hopefully one day we will go to beach and have "sundal" together!!

Vari and Pivi, my dear sisters or my definition of unconditional love! You have been showering me with so much love, care and affection, I can't wish to have any more gifts in my life! You both are my lifelines who have become two women I'm so proud of! Thanks for completing my life!

அம்மா, அப்பா, நாங்கள் வாழ நீங்கள் செய்த விலைமதிப்பற்ற தியாகத்திற்கு நன்றி!

Dear Mama, thank you is a small word to express my gratitude for your presence in our life when we needed the most! Today has been possible thanks to you!

அம்மம்மா, இது நான் உங்களுக்கு மிக தாமதமாக தரும் பிறந்தநாள் பரிசு!

Mes derniers mots de remerciements sont dédiés à mes professeurs que j'ai eu la chance de rencontrer pendant ma scolarité ! Mme. Meyer, Mme. El Mourtada, Mme. Duggan, Mme. Luiggi, Mme. Aubert, Mme. Delcroix, M. Rachenbach et M. Castagnetto ! Vous n'avez pas fait seulement votre travail d'enseigner mais vous avez aussi transmis les valeurs qui m'ont permis de me construire depuis que je suis en France !

Table des matières

Table des matières

Liste des figures	xiv
Liste des tableaux	xvi
Abréviations.....	xvii
Introduction générale	1
Introduction bibliographique.....	4
Chapitre1. Le Quorum sensing chez les bactéries.....	4
1.1. Généralités sur la communication bactérienne contrôlée par quorum sensing	5
1.2. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram-négatif	6
1.3. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram-positif	8
Chapitre2. Le cycle de vie des phéromones chez les bactéries à Gram-positif.....	13
2.1. Biosynthèse ribosomale des phéromones.....	13
2.2. Sécrétion et maturation des phéromones.....	14
2.2.1. Sécrétion et maturation des phéromones avec un peptide signal	15
2.2.1.1. Phéromones avec un peptide signal spécifique : Acteur dédié seul ou en association avec des acteurs généraux	15
2.2.1.2. Phéromones avec un peptide signal classique : Acteurs généraux	18
2.2.2. Sécrétion et maturation des phéromones sans peptide signal classique.....	21
2.2.2.1. Phéromones issues de lipoprotéines : Un transporteur de la famille ABC et des protéases	22
2.2.2.2. Phéromones issues de petits gènes sans peptide signal classique : Un transporteur de la famille ABC et une protéase membranaire.....	25
2.3. Détection des phéromones en extracellulaire : Couple senseur membranaire HK et régulateur cytoplasmique RR	28
2.4. La détection des phéromones en intracellulaires : un transporteur d'oligopeptides et des senseurs cytoplasmiques spécifiques de la famille RRNPP indispensables	31
2.4.1. Le transporteur d'oligopeptides Opp : un acteur principal de la nutrition avec un rôle spécifique dans le mécanisme de QS.....	31
2.4.1.1. Les caractéristiques du transporteur Opp et son rôle général dans la nutrition ...	31
2.4.1.2. Le rôle essentiel du transporteur général Opp dans l'internalisation des phéromones	33
2.4.2. Les senseurs cytoplasmiques de la famille RRNPP.....	35
2.4.2.1. Les caractéristiques générales et spécifiques des senseurs cytoplasmiques RRNPP	35
2.4.2.2. Mécanismes et fonctions biologiques contrôlés par les senseurs de la famille RRNPP	38
2.4.2.2.1. Les senseurs cytoplasmiques Rap inhibés par les phéromones Phr	38

Table des matières

2.4.2.2.2. Le binôme des senseurs cytoplasmiques PlcR et NprR contrôlent la virulence, le nécrotrophisme et la sporulation dans le groupe <i>cereus</i>	41
2.4.2.2.3. Le régulateur PrgX contrôlant la conjugaison chez les entérocoques	43
Chapitre 3. Le cycle de vie des phéromones chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	47
3.1. Les bactéries lactiques contenant le genre <i>Streptococcus</i>	47
3.2. Exploitation des bactéries lactiques dans la fermentation des aliments	48
3.3. Généralités sur les streptocoques	49
3.4. Classification des différentes espèces de streptocoques	50
3.5. <i>S. thermophilus</i> ou le seul ferment lactique des streptocoques	51
3.6. Evolution des génomes de <i>S. thermophilus</i>	53
3.7. Mécanismes de quorum sensing chez <i>S. thermophilus</i>	55
3.7.1. La production du streptide contrôlée par le mécanisme Rgg ₁₃₅₈ /SHP ₁₃₅₈	55
3.7.2. Cross-activation ou communication inter-espèces par les SHP	58
3.7.3. Le système ComR/ComS dans l'activation de la compétence naturelle	59
Résultats	65
Chapitre 4. Le transporteur PptAB est essentiel pour l'activation de trois systèmes de quorum-sensing chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	65
4.1. Introduction	65
4.2. Résultats	67
4.2.1. Caractérisation de l'expression de gènes <i>pptAB</i> en milieu dépourvu de peptides (MCD) et riche en peptides (M17)	67
4.2.2. Les gènes <i>pptAB</i> sont essentiels pour l'activation de trois systèmes de quorum sensing chez <i>S. thermophilus</i>	68
4.2.2.1. Les gènes <i>pptAB</i> sont indispensables pour l'activation du système ComR/ComS donc pour la compétence	69
4.2.2.2. Les gènes <i>pptAB</i> sont essentiels pour l'activation de deux systèmes de QS Rgg/SHP	71
4.3. Discussion et conclusion	73
Chapitre 5. Le transporteur PptAB est l'acteur principal de la sécrétion des phéromones matures SHP chez <i>Streptococcus thermophilus</i>	74
5.1. Introduction	74
5.2. Résultats	75
5.2.1. La délétion des gènes <i>pptAB</i> abolit la détection des phéromones matures sécrétées détectables par spectrométrie de masse dans le surnageant de la souche sauvage	75
5.2.1.1. Détection d'une nouvelle phéromone SHP dans le surnageant de la souche sauvage par spectrométrie de masse	77
5.2.1.2. Absence de détection des phéromones matures SHP dans le surnageant en cas de délétion des gènes <i>pptAB</i> par spectrométrie de masse	78

Table des matières

5.2.1.3. Absence de détection des phéromones matures SHP dans le surnageant en cas de délétion des gènes <i>eep</i> ou <i>amiCDE</i> par spectrométrie de masse.....	79
5.2.1.4. Les essais non concluants d'identification des conditions de détection de la forme mature de la phéromone ComS dans le surnageant de la souche sauvage par spectrométrie de masse	81
5.2.2. Le transporteur PptAB secrète principalement la forme mature de la phéromone SHP ₁₃₅₈	82
5.3. Discussion et conclusion	89
Chapitre6. Les transporteurs d'oligopeptides PptAB, Ami et la protéase Eep contrôlent l'expression de tous les gènes situés en aval des gènes codant les régulateurs Rgg de la souche LMD-9 de <i>Streptococcus thermophilus</i>	91
6.1. Introduction	91
6.2. Résultats	92
6.2.1. L'expression des gènes sous le contrôle de mécanismes de quorum sensing dépendant des transporteurs PptAB et Ami et de la protéase Eep	93
6.2.1.1. Expression très forte dans un contexte sauvage et répression très forte dans les trois souches mutantes de deux opérons : Rgg ₁₂₉₉ /SHP ₁₂₉₉ et Rgg ₁₃₅₈ /SHP ₁₃₅₈	93
6.2.1.2. Expression forte dans un contexte sauvage et répression forte dans les trois souches mutantes de gènes proximaux des loci <i>rgg4/shp4</i> et <i>rgg5/shp5</i>	96
6.2.1.3. Expression faible dans un contexte sauvage et répression faible dans les trois souches mutantes de gènes proximaux du locus <i>rgg1/shp1</i>	96
6.2.1.4. Identification d'une cible distale : opéron de biosynthèse de la cystéine soumise à un mécanisme de quorum sensing	98
6.2.2. Gènes dont l'expression est uniquement dépendante de la protéase Eep	101
6.2.2.1. Le gène <i>amiA3</i> codant une lipoprotéine : AmiA3.....	101
6.2.2.2. Perte d'un plasmide curable lors d'une étape de délétion des gènes	101
6.2.3. Petits gènes dont l'expression est contrôlée par les transporteurs PptAB et Ami et la protéase Eep	104
6.3. Discussion et conclusion	105
Chapitre7. Discussion et Perspectives.....	108
7.1. Le transporteur PptAB est-il dédié à la communication dépendante des régulateurs Rgg-like ou joue-t-il un rôle plus pléiotrope chez <i>S. thermophilus</i> ?.....	108
7.1.1. Le transporteur PptAB exporte des phéromones chez certaines bactéries à Gram-positif	109
7.1.2. Le transporteur PptAB joue-t-il un rôle pléiotrope en exportant des oligopeptides localisés au niveau de la membrane ?.....	114
7.2. La maturation et la sécrétion sont-elles très fortement liées ?	115
7.2.1. Ordre chronologique entre la maturation et la sécrétion des phéromones	115
7.2.2. Le transporteur PptAB fonctionne-t-il obligatoirement avec la protéase Eep, acteur de la maturation ?	117

Table des matières

7.3. L'expression des gènes cibles des mécanismes de quorum-sensing est dépendante du transporteur PptAB, de la protéase Eep et du transporteur Ami	118
7.3.1. L'expression des gènes situés en aval des gènes de tous les régulateurs Rgg exprimés est dépendante des trois acteurs du quorum-sensing	118
7.3.2. Opéron distal des Rgg	120
7.4. La complexité de la notion couple régulateur/phéromone apparié.....	121
7.4.1. Une même phéromone SHP peut-elle interagir avec différents régulateurs Rgg et donc participer à une interférence au sein d'une même souche ?	121
7.4.2. Un même couple Rgg/SHP très actif contrôle plusieurs cibles ?	123
Conclusion générale.....	126
Références	127
ANNEXE A	141
Matériel et méthodes	141
1. Souches bactériennes et conditions de croissance.....	141
2. Manipulation d'ADN et séquençage.....	141
3. Construction de souches mutantes :.....	142
4. Analyse par spectrométrie de masse.....	144
5. Essais luciférase.....	145
6. Extraction des ARN totaux	146
7. Séquençage des ARN et analyse transcriptomique	146
Références	149
ANNEXE B	151
TABLEAU DES SOUCHES	151
ANNEXE C	152
TABLEAU DES MASSES <small>théoriques</small> DES DIFFERENTES FORMES DE PHEROMONE SHP ₁₃₅₈	152
ANNEXE D	153
TABLEAUX ISSU DE BANQUE DE PETITS TRANSCRITS.....	153
ANNEXE E	154
Contributions et communications.....	154
Article scientifique	154
Conférences.....	154
ANNEXE F	155
Composition M17 et MCD	155
ANNEXE G.....	156

Table des matières

Export of Rgg Quorum Sensing Peptides is Mediated by the PptAB ABC Transporter in <i>Streptococcus Thermophilus</i> Strain LMD-9. <i>Genes</i> 2020, 11, 1096. https://doi.org/10.3390/genes11091096	156
--	-----

Liste des figures

Figure 1. Le mécanisme général de QS.....	5
Figure 2. La bioluminescence contrôlée par le mécanisme de QS chez une bactérie à Gram-négatif.....	7
Figure 3. Schéma des étapes clés du cycle de vie des phéromones chez les bactéries à Gram-positif.....	11
Figure 4. Les caractéristiques générales du peptide signal chez les bactéries à Gram-positif..	14
Figure 5. Modèle de transport et de maturation de la phéromone AgrD chez <i>S. aureus</i>	18
Figure 6. Le processus de la maturation du précurseur PhrC vers la phéromone mature CSF chez <i>B. subtilis</i>	21
Figure 7. Les étapes de maturation de la phéromone cCF10 issue de lipoprotéine chez <i>E. faecalis</i>	23
Figure 8. Maturation et sécrétion de certaines phéromones de conjugaison chez <i>E. faecalis</i> ..	24
Figure 9. Organisation génétique des gènes pptAB et leurs gènes adjacents chez <i>S. pyogenes</i>	26
Figure 10. La compétence chez <i>S. pneumoniae</i> contrôlée par un mécanisme de QS.	30
Figure 11. Le schéma illustre l'organisation structurale et fonctionnelle du transporteur Opp chez les bactéries à Gram-positif.	33
Figure 12. Schéma décrivant les caractéristiques générales de domaines structuraux de la famille RRNPP.....	37
Figure 13. Hypothèse d'évolution des senseurs cytoplasmiques de la famille RRNPP chez les Bacilli.....	38
Figure 14. La sporulation et la compétence contrôlées par les différents senseurs cytoplasmiques Rap associés à leurs phéromones.	40
Figure 15. Le changement allostérique du senseur cytoplasmique Rap en présence de la phéromone associée Phr.....	41
Figure 16. Les senseurs cytoplasmiques PlcR et NprR dans le cycle de vie de <i>B. thuringensis</i> dans l'infection l'hôte.....	43
Figure 17. Le mécanisme de conjugaison dans la cellule donneuse du plasmide pCF10 chez <i>E. faecalis</i>	45
Figure 18. Classification des bactéries lactiques sur la base de leur ARN 16S.....	48
Figure 19. Regroupement des espèces du genre streptococcus selon la phylogénie et les caractéristiques phénotypiques.....	51
Figure 20. L'image de microscope électronique à balayage de la souche LMD-9 de <i>S. thermophilus</i>	52
Figure 21. Le mécanisme de QS contrôlé par Rgg ₁₃₅₈ /SHP ₁₃₅₈	57
Figure 22. L'arbre phylogénétique de protéines Rgg parmi les firmicutes.	58
Figure 23. Etude de cross-talk entre les systèmes Rgg/SHP de streptocoques.....	59

Liste des figures

Figure 24. Mécanisme de l'activation de la compétence chez <i>S. thermophilus</i>	62
Figure 25. Les différentes conformations du régulateur ComR.....	62
Figure 26. L'expérience illustrant le mécanisme ComR/ComS variant du QS classique.	63
Figure 27. Schéma représentatif des systèmes Rgg/SHP identifiés chez <i>S. thermophilus</i> LMD-9.	66
Figure 28. Organisation génétique des gènes pptAB et de leurs gènes adjacents identiques entre <i>E. faecalis</i> et <i>S. thermophilus</i>	67
Figure 29. Le niveau d'expression des gènes pptAB dans deux milieux différents.	68
Figure 30. Cinétique d'expression du gène <i>comX</i> en MCD reflétant le mécanisme de la compétence dans les souches TIL1379 ($P_{comX-luxAB}$) et TIL1488 ($P_{comX-luxAB} \Delta pptAB :: erm$).	70
Figure 31. Cinétique d'expression du gène <i>shp1299</i> en MCD témoignant l'inactivation du mécanisme de QS de Rgg ₁₂₉₉ /SHP ₁₂₉₉ chez le mutant $\Delta pptAB :: erm$	72
Figure 32. Cinétique d'expression du gène <i>shp1358</i> en MCD montrant l'inactivation du mécanisme de QS de Rgg ₁₃₅₈ /SHP ₁₃₅₈ chez le mutant $\Delta pptAB :: erm$	72
Figure 33. Spectres de fragmentation des formes matures des phéromones SHP ₁₂₉₉ et SHP ₁₃₅₈ dans le SN de la souche LMD-9.....	78
Figure 34. Spectre en MS1 et de fragmentation en MS2 de la phéromone mature SHP ₅ dans le SN de la souche LMD-9 par SM.	80
Figure 35. La croissance et l'activité luciférase en co-culture entre le biosenseur de phéromone SHP ₁₃₅₈ et différentes souches.	84
Figure 36. Les différentes formes de phéromones qui pourraient être exportées par le transporteur PptAB en présence ou en absence de la protéase Eep.	85
Figure 37. Schéma montrant la séquence des différentes formes intermédiaires et complémentaires recherchées.....	86
Figure 38. Les gènes cibles associés aux loci <i>rgg1299/shp1299</i> et <i>rgg1358/shp1358</i> sous exprimés en cas de délétion des gènes <i>pptAB</i> , <i>amiCDE</i> ou <i>eep</i>	95
Figure 39. Les gènes cibles associés aux loci <i>rgg1/shp1</i> , <i>rgg4/shp4</i> et <i>rgg5/shp5</i> exprimés de manière différentielle dans les trois conditions d'analyse.	97
Figure 40. Une cible distale aux loci <i>rgg/shp</i> probablement impliqué dans la biosynthèse de cystéine.	98
Figure 41. Gel d'électrophorèse de PCR amplifiant un fragment du plasmide 1.	102
Figure 42. Organisation génétique des gènes <i>pptAB</i> et <i>ecsAB</i> chez certaines bactéries à Gram-positif.	109
Figure 43. Les différents scénarios de maturation et de sécrétion des phéromones chez <i>S. thermophilus</i>	116
Figure 44. Les deux hypothèses sur la complexité de notion couple régulateur/phéromone apparié.	124
Figure 45. Le mécanisme de QS chez <i>S. thermophilus</i>	125

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 1. La famille des régulateurs RRNPP.....	10
Tableau 2. Les phéromones maturées par la protéase Eep et/ou sécrétées par le transporteur PptAB ou son homologue EcsAB.	27
Tableau 3. Caractères pathogènes de certains streptocoques opportunistes de l'Homme.....	50
Tableau 4. Les annotations de gènes codant les régulateurs Rgg associés aux phéromones SHP dans la souche LMD-9.....	76
Tableau 5. La détection en MS1 des formes matures de trois phéromones SHP dans le SN de la souche LMD-9.	77
Tableau 6. Les séquences et les masses correspondantes aux formes complémentaires à la forme mature.	88
Tableau 7. Les loci des gènes différentiellement exprimés entre la souche TIL1560 (<i>comR::aphA3</i>) et la souche TIL 1562 (Δ pptAB <i>comR::aphA3</i>).	99
Tableau 8. Les loci des gènes différentiellement exprimés entre la souche TIL1560 (<i>comR::aphA3</i>) et la souche TIL 1564 (Δ amiCDE <i>comR::aphA3</i>).	100
Tableau 9. Les gènes du plasmide 1 non-exprimés dans la souche TIL1561 (Δ eep <i>comR::aphA3</i>) comparé à la souche TIL 1560 (<i>comR::aphA3</i>).	102
Tableau 10. Les loci des gènes différentiellement exprimés entre la souche TIL1560 (<i>comR::aphA3</i>) et la souche TIL 1561 (Δ eep <i>comR::aphA3</i>).....	103
Tableau 11. L'expression des petits transcrits dans la souche TIL1560 (<i>comR::aphA3</i>) et la souche TIL1562 (Δ pptAB <i>comR::aphA3</i>).....	105
Tableau 12. L'homologie entre le transporteur PptAB d' <i>E. faecalis</i> et d'autres bactéries à Gram-positif.	109
Tableau 13. Les phéromones exportées par le transporteur PptAB chez <i>E. faecalis</i> et les streptocoques et par le transporteur EcsAB chez <i>S. aureus</i>	111
Tableau 14. Les fonctions biologiques des différents systèmes Rgg/SHP chez les streptocoques.	120
Tableau 15. L'expression des petits transcrits dans la souche TIL1560 (<i>comR::aphA3</i>) et la souche TIL1561 (Δ eep <i>comR::aphA3</i>).	153
Tableau 16. L'expression des petits transcrits dans la souche TIL1560 (<i>comR::aphA3</i>) et la souche TIL1564 (Δ amiCDE <i>comR::aphA3</i>).....	153

Abréviations**Abréviations**

ABC ATP -binding cassette

ADN Acide désoxyribonucléique

AHL Acyl-Homoserine Lactones

AI-2 Auto-inducteur 2

ARN Acide ribonucléique

ATP Adénosine trophosphate

ComS/XIP competence inducing peptide

CSF Competence and sporulation stimulating factor

CSP Competence stimulating peptide

GRAS Generally Recognized as Safe

HK Histidine kinase

MCD Milieu chimiquement défini

Opp Oligopeptide permease

PCAT Peptidase containing ABC transporter

QS Quorum sensing

QQ Quorum quenching

RR Response regulator

Abréviations

RIP Regulated Intramembrane Proteolysis

RiPPs Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides

SAM S-adenosyl-L-methionine

SBP Substrate Binding Protein

sCDS short Coding DNA Sequence

SHP Short Hydrophobic Peptide

SM Spectrométrie de masse

SN Surnageant

sORF short Open Reading Frame

SPase Signal peptidase

TCS Two Component System

TPR Tetratricopeptide Repeat

Introduction générale

Les bactéries sont des procaryotes unicellulaires colonisant l'environnement et tous les écosystèmes complexes de la Terre. Elles vivent dans le sol, les sources aquatiques, l'air, les nuages, la neige, les profondeurs océaniques, la croûte terrestre, les plantes, les animaux jusqu'à l'Homme. Les conditions extrêmes telles que la température, le pH, la pression osmotique ou la composition chimique hostile aux être-vivants telle que la radioactivité n'empêchent pas les bactéries d'y vivre (Roszak and Colwell, 1987 ; Rampelotto, 2013). Afin de survivre dans un environnement souvent hostile et imprévisible, les bactéries ont évolué avec des structures de membranes complexes. Cette structure protège le cytoplasme renfermant le matériel génétique et d'autres éléments intracellulaires nécessaires aux fonctions biologiques des bactéries avec une possibilité d'échange de nutriments et de déchets avec leurs environnements. Cette structure fondamentale sert à classer toutes les bactéries décrites jusqu'à aujourd'hui selon la composition de la paroi cellulaire lorsque celle-ci est présente. En effet une expérience de coloration développée par Christian Gram (1884) permet de distinguer les bactéries avec les parois plus ou moins riches en peptidoglycane, un composant de la paroi cellulaire composé d'une partie glucidique et peptidique. Ainsi, les bactéries avec une paroi contenant une couche épaisse de peptidoglycane retenant la coloration de Gram sont des bactéries à Gram-positif. Quant aux bactéries avec une paroi pauvre en peptidoglycane, la coloration Gram n'étant pas retenue, elles sont appelées bactéries à Gram-négatif (Silhavy et al., 2010).

Jusqu'aux années 1960-1970, toutes les bactéries étaient connues pour vivre en tant qu'individus, en compétition entre-elles en se reproduisant rapidement si les conditions le permettaient (Parsek and Greenberg, 2000). La découverte de fonctions biologiques plus complexes, activées à forte densité cellulaire, telles que la compétence naturelle chez *Streptococcus pneumoniae*, une bactérie à Gram-positif, ou la bioluminescence chez *Vibrio fischeri*, une bactérie à Gram-négatif a permis d'établir qu'elles peuvent imiter un comportement de groupe observé jusque-là chez des organismes multi-

Introduction générale

cellulaires (Tomasz, 1965 ; Neelson et al., 1970). En effet, les bactéries ne sont pas qu'une somme d'individus mais peuvent communiquer entre elles avec des systèmes complexes permettant d'envoyer et de percevoir différents signaux chimiques. Ce comportement ne se révèle efficace qu'à partir d'un seuil de densité de population. Ainsi, le terme « *quorum* » a été donné pour décrire le seuil minimum nécessaire pour activer le comportement de groupe. Selon la définition de départ, le quorum sensing (QS) permet aux bactéries de se compter au sein d'une population afin d'activer les fonctions biologiques utiles selon le mode de « l'union fait la force » (Fuqua et al., 1994). Le QS, un des mécanismes de communication, considéré au départ comme anecdotique chez certaines bactéries s'est révélé de plus en plus répandu (Bassler and Losick, 2006; Perez-Pascual et al., 2016; Turkina and Vikström, 2019).

Chez les bactéries à Gram-négatif et chez les bactéries à Gram-positif, le mécanisme de QS est divisé en quatre étapes : i) biosynthèse de molécules de signalisation ii) sécrétion de ces molécules vers le milieu extracellulaire iii) détection de ces molécules sécrétées à partir d'un seuil iv) activation ou répression de l'expression des gènes cibles. La nature des molécules de signalisation ainsi que le mode de sécrétion varient entre ces deux groupes de bactéries. Chez les bactéries à Gram-positif, ces molécules de signalisation appelées phéromones sont souvent des oligopeptides qui sont maturés et secrétés vers le milieu extracellulaire. La détection se fait soit en extracellulaire soit en intracellulaire par les régulateurs cytoplasmiques appartenant à une grande famille appelée RRNPP. Tous les acteurs impliqués et le processus de maturation et de sécrétion des phéromones associées à ces régulateurs RRNPP ne sont pas encore bien élucidés dans la littérature (Partie 1.3 et chapitre 2) (Monnet et al., 2014; Neiditch et al., 2017). Chez les bactéries à Gram-négatif, les molécules de signalisation sont majoritairement des acyl-homoserine lactones (AHL) diffusibles à travers la membrane et détectées en intracellulaire par la famille des régulateurs appelé LuxR (Partie 1.2) (Whitehead et al., 2001).

Dans la première partie de mon manuscrit, je présenterai un ensemble d'éléments déjà connus dans la littérature à travers une introduction bibliographique divisée en trois chapitres. Le premier chapitre évoquera les généralités sur les mécanismes du QS ainsi qu'une description brève de ces mécanismes

Introduction générale

chez les bactéries à Gram-négatif et chez les bactéries à Gram-positif. Dans un deuxième chapitre, je décrirai le cycle de vie des phéromones de QS chez les bactéries à Gram-positif en exposant chaque étape : la biosynthèse, la maturation et la sécrétion et la détection. Ce chapitre soulignera le consensus non-établi pour les étapes de maturation et de sécrétion des molécules de signalisation et donc l'intérêt de ce projet à décortiquer l'étape de sécrétion dans notre modèle d'étude, *Streptococcus thermophilus*. Dans le dernier chapitre, je présenterai *S. thermophilus*, une bactérie à Gram-positif, en le situant parmi les bactéries lactiques puis au sein de son genre *streptococcus* avant de le décrire plus spécifiquement. Je terminerai ce chapitre par la description des mécanismes du QS contrôlés par les phéromones associées aux régulateurs cytoplasmiques chez *S. thermophilus*. Ces trois chapitres contribueront à la compréhension du mécanisme de QS ainsi que les lacunes qui restent à combler sur ce mécanisme chez les bactéries à Gram-positif et plus particulièrement chez *S. thermophilus*. La connaissance manquante sur l'identité du transporteur sécrétant les molécules de signalisation chez cette bactérie a été le point initial de ce projet. Son objectif était de valider le rôle de deux gènes codant un transporteur dans la sécrétion des molécules de signalisation chez *S. thermophilus*. Dans une deuxième partie, je présenterai mes résultats en trois chapitres indépendants. Enfin, je discuterai de mes résultats pour terminer avec une conclusion générale ainsi que les perspectives à explorer.

Introduction bibliographique

Chapitre1. Le Quorum sensing chez les bactéries

Les conditions laboratoires utilisées pour étudier les bactéries sont très différentes des milieux complexes dans lesquels les bactéries évoluent. Ainsi, elles ont développé différents mécanismes pour vivre en communauté et une capacité d'adaptation selon les stimuli ou la perception de dangers de l'environnement. D'une manière générale, le comportement social est influencé par les déterminants génétiques ainsi que par les conditions environnementales. Ces deux facteurs étant intrinsèquement liés certains parlent de « sociomicrobiologie » lorsque les comportements de groupe tels que le mécanisme de QS ou la formation de biofilms sont étudiés chez les microbes (Parsek and Greenberg, 2005).

Le QS, un des mécanismes de communication cellulaire, permet aux bactéries de contrôler les fonctions biologiques utiles lorsqu'elles sont exercées uniquement en groupe – c'est-à-dire à partir d'un certain seuil de densité cellulaire – telles que la virulence ou encore la formation de biofilms. Ce mécanisme est utilisé par les bactéries pour communiquer au sein de leur propre population mais également avec les espèces proches (Federle and Bassler, 2003). Le QS a été initialement défini comme dépendant d'un seuil de densité cellulaire. En fait on peut le définir comme dépendant d'un seuil de concentration de molécules de communication. Ce seuil n'est plus alors seulement lié à la concentration mais peut être influencé par d'autres facteurs abiotiques tels que la composition du milieu, le pH, la température, le stress-oxydant, les métabolites secondaires ainsi que des facteurs biotiques intrinsèques tels que la stabilité et le transport de molécules de signalisation. Ainsi, la communication par le mécanisme de QS ne serait pas qu'une question de quorum mais plus complexe (Boyer and Wisniewski-Dyé, 2009 ; Lee et al., 2013).

Dans ce chapitre, je présenterai les généralités du mécanisme de QS ainsi que les spécificités de QS entre les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif.

Introduction bibliographique-Chapitre1.

1.1. Généralités sur la communication bactérienne contrôlée par quorum sensing

Les bactéries sécrètent des molécules de signalisation appelées auto-inducteurs dans leurs milieux. A faible densité cellulaire, les auto-inducteurs produits sont à faible concentration et ne sont pas détectés. Au cours de la croissance, la concentration extracellulaire des auto-inducteurs augmente et ils sont détectés par les bactéries à partir d'un seuil donné. Par conséquent, un contrôle coordonné et synchronisé de l'expression des gènes spécifiques se met en place et se traduit par l'activation ou l'inhibition d'une fonction biologique utile pour la bactérie. La Figure 1 illustre le mécanisme de QS ainsi que certaines fonctions biologiques contrôlées.

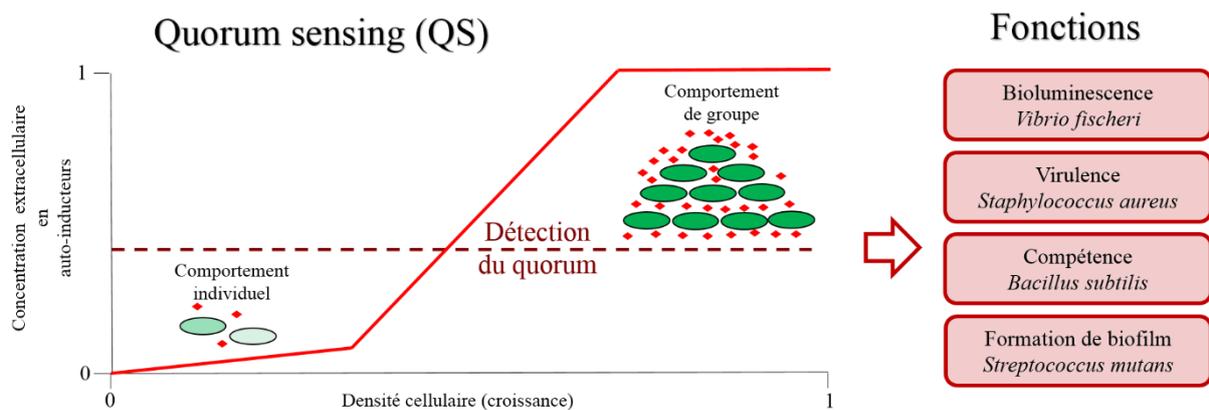


Figure 1. Le mécanisme général de QS. A faible densité cellulaire, les bactéries ont un comportement individuel et la concentration des auto-inducteurs (♦) dans le milieu est faible. Au cours de la croissance, la concentration des auto-inducteurs augmente et ils sont détectés à partir d'un seuil appelé quorum. Cela active un contrôle synchronisé des gènes spécifiques dans l'ensemble des bactéries contribuant à un comportement de groupe. Le QS permet de contrôler différentes fonctions biologiques chez les bactéries à Gram-négatif et chez les bactéries à Gram-positif.

La compréhension du mécanisme de QS est aussi la première étape vers la maîtrise de ces fonctions biologiques. Dans le cas de fonctions néfastes telles que la virulence ou la formation d'un biofilm par les bactéries pathogènes, une inactivation du mécanisme QS appelé quorum quenching (QQ) serait bénéfique et pourrait être une alternative pour contrer les bactéries résistantes ou persistantes face aux antibiotiques. Le QQ a été surtout étudié chez les bactéries à Gram-négatif ou chez *Staphylococcus aureus* parmi les bactéries à Gram-positif (Dong and Zhang, 2005 ; Lyon et al., 2000). Dans le cas des

Introduction bibliographique-Chapitre1.

fonctions bénéfiques telles que la production d'un produit d'intérêt, booster le mécanisme de QS permettrait d'en tirer parti à des fins biotechnologiques. Le principe de booster le mécanisme de QS n'est pas encore très exploré dans la littérature (Whiteley et al., 2017).

1.2. Le quorum sensing chez les bactéries à Gram-négatif

Les bactéries à Gram-négatif utilisent principalement les auto-inducteurs dérivés d'acides gras. Ils appartiennent essentiellement à la famille des acyl-homoserine-lactones (AHLs). Les enzymes de la famille LuxI synthase synthétisent les AHL à partir de métabolites secondaires. La plupart des AHLs contiennent un cycle de N-acyl-homoserine-lactone principal avec une chaîne latérale de 4 à 18 carbones acylée modifiée. En effet, la partie lactone est issue de la S-adénosylméthionine (SAM) et la partie acyle provient d'un dérivé d'acides gras. Compte tenu de la nature hydrophobe de l'auto-inducteur et de la composition de la bicouche lipidique de la membrane des bactéries à Gram-négatif, les AHLs traversent la membrane par diffusion simple et selon le gradient de concentration. L'effet biologique peut être observé à partir de 10 nM d'AHL dans le milieu.

Le mécanisme de QS est activé dans différents contextes. A titre d'exemple, la bactérie marine *Vibrio fischeri* active la bioluminescence par QS lors de son mode de vie symbiotique avec le calamar *Euprymna scolopes*. Ces bactéries, stockées dans un organe dédié de l'abdomen du calamar, produisent de la lumière par le mécanisme de QS en échange de nutriments. Ainsi, le calamar peut chasser tout en se camouflant contre ces prédateurs la nuit (Nealson et al., 1970 ; Nealson and Hastings, 1979). Le cycle de vie des AHLs est illustré dans la Figure 2 à travers la description du mécanisme de QS activant la bioluminescence chez *V. fischeri* (Miller and Bassler, 2001; Papenfort and Bassler, 2016). Lorsque le signal est détecté en intracellulaire par le régulateur associé appelé LuxR, ce complexe active l'expression des gènes cibles. Les structures cristallographiques obtenues de certains LuxR indiquent que LuxR est un homodimère dont la région N-terminale lie l'AHL tandis que la région C-terminale contient un motif hélice-boucle-hélice permettant la liaison à l'ADN (Li and Nair, 2012). La stabilité

Introduction bibliographique-Chapitre1.

des AHLs peut être dépendante de la longueur de la chaîne latérale du groupement acyle ainsi que de la présence des enzymes capables de dégrader le signal. Cela contribue au contrôle dynamique du mécanisme de QS (Boyer and Wisniewski-Dyé, 2009).

En plus des AHLs, une autre molécule de signalisation, qui est un furanosyl borate diester appelé autoinducteur 2 (AI-2) impliqué dans le mécanisme de QS activant la luminescence, a été mise en évidence chez *Vibrio harveyi*, une bactérie à Gram-négatif. Une enzyme appelée LuxS contribue à la synthèse d'AI-2 à partir de SAM (Bassler et al., 1997). L'analyse des génomes a montré que le gène *luxS* codant l'enzyme LuxS est présent chez les bactéries à Gram-négatif et chez les bactéries à Gram-

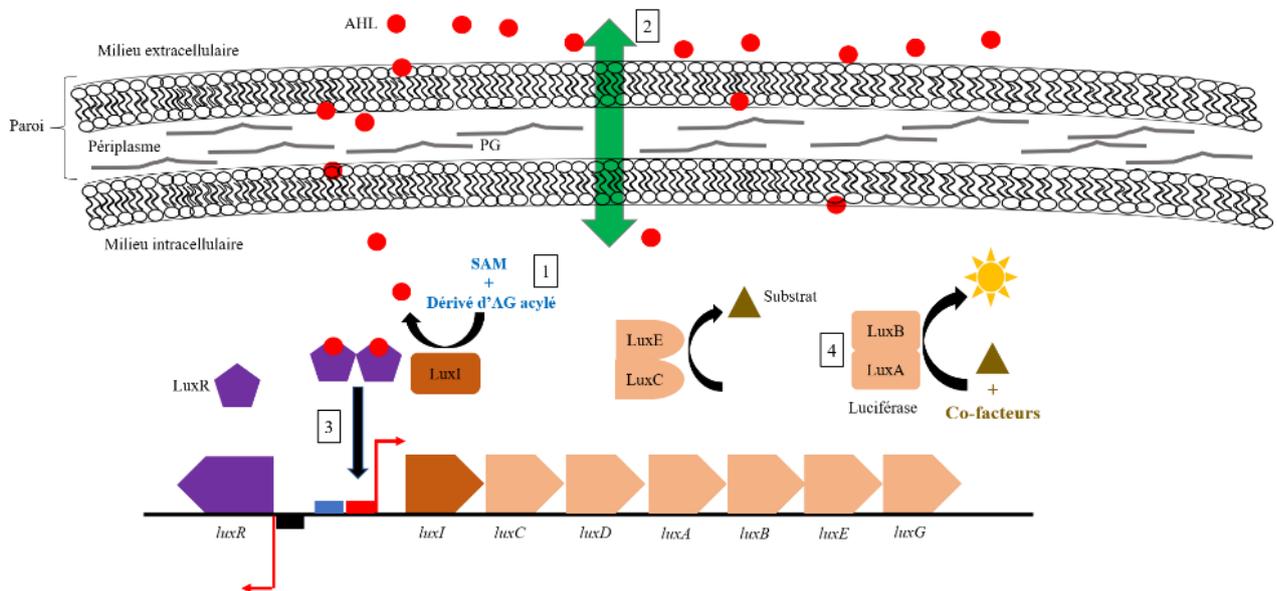


Figure 2. La bioluminescence contrôlée par le mécanisme de QS chez une bactérie à Gram-négatif. Chez *V. fischeri*, les AHL synthétisées par l'enzyme LuxI synthase à partir de SAM et de dérivé d'AG acylé (1) sont cumulées dans le milieu extracellulaire. A partir d'un seuil de concentration, elles traversent la membrane formée de membrane externe et la couche fine de peptidoglycane (paroi) et la membrane interne par une diffusion simple selon le gradient de concentration (2). Le régulateur cytoplasmique LuxR forme un homodimère à la suite de liaison avec son AHL associée et active ou réprime l'expression des gènes cibles en se liant à la région promotrice lux (rectangle rouge) (3). Les gènes cibles sont *luxI* et l'opéron *luxCDABEG* codant pour l'enzyme LuxI et les protéines nécessaires à la production de luminescence respectivement. Le complexe peut également lier la région promotrice de *luxR* (rectangle noir) mais dans ce cas pour réprimer son expression. L'expression du gène *luxI* et de l'opéron *luxCDABEG* peut également être contrôlée par d'autres facteurs métaboliques (rectangle bleu). Les produits des gènes *luxC* et *luxE* génèrent le substrat qui sera utilisé par l'enzyme luciférase formée par les sous-unités LuxA et LuxB. La luciférase réduit le substrat en association avec des co-facteurs issus de milieu et l'énergie en excès de cette réaction est libérée sous forme de lumière. D'après Miller and Bassler, 2001.

Introduction bibliographique-Chapitre1.

positif. Cette présence universelle a permis de formuler l'hypothèse selon laquelle l'AI-2 serait la molécule de communication inter-espèces (Federle and Bassler, 2003). En effet, la production d'AI-2 par *Streptococcus gordonii*, une bactérie à Gram-positif, a été observée sans démontrer son rôle dans un mécanisme de QS (McNab et al., 2003). L'enzyme LuxS joue également un rôle central dans le recyclage des composés méthylés. L'hypothèse de la communication inter-espèces par l'AI-2 est donc complexe et reste à vérifier (Pereira et al., 2013).

1.3.Le quorum sensing chez les bactéries à Gram-positif

Les bactéries à Gram-positif utilisent essentiellement les oligopeptides comme molécules de signalisation dans les mécanismes du QS (Miller and Bassler, 2001). Comme précédemment indiqué, ces oligopeptides linéaires et parfois modifiés sont appelés phéromones (Kleerebezem et al., 1997). Le terme phéromone, inventé en 1959, dérive des mots grecs « *pherein* » pour transférer et « *hormon* » pour exciter (Karlson and Lüscher, 1959). La phéromone est définie comme un composé sécrété par un organisme dans l'objectif d'obtenir une réponse spécifique chez un autre individu de même espèce (Stephens, 1986). Parfois certaines de ces phéromones jouent un double rôle et sont à la fois une molécule de signalisation de QS et un peptide anti-microbien (Sturme et al., 2002). Ces phéromones spécifiques connues sous le nom des bactériocines ne seront pas évoquées par la suite. Les phéromones contrôlent des fonctions diverses telles que la compétence chez *B. subtilis* (Pottathil and Lazazzera, 2003), la virulence chez *S. aureus* (Mayville et al., 1999), la conjugaison chez *Enterococcus faecalis* (Clewell and Weaver, 1989) ou la formation d'un biofilm chez *Streptococcus pyogenes* (Chang et al., 2011).

Le cycle de vie des phéromones est divisé en quatre étapes. D'abord la biosynthèse ribosomale sous forme de précurseurs puis la sécrétion vers le milieu extracellulaire et la maturation de précurseurs en phéromone mature. L'étape de la détection de la phéromone mature aboutissant au contrôle de l'expression des gènes cibles se fait soit en extracellulaire soit en intracellulaire (Monnet et al., 2014).

Introduction bibliographique-Chapitre1.

Le gène produisant la phéromone est souvent une des cibles. Dans ce cas, une boucle d'auto-contrôle positive est mise en place. Même si l'étape de biosynthèse des phéromones et le mécanisme de détection ont été bien décrits dans la littérature, les acteurs intervenant dans l'étape de sécrétion et maturation ne sont pas toujours mis en évidence pour tous les mécanismes de QS. La connaissance des facteurs contribuant à la stabilité des phéromones ainsi que des acteurs impliqués dans l'arrêt de la vie des phéromones reste également très limitée dans la littérature (Neiditch et al., 2017).

Lorsque la détection de la phéromone est extracellulaire, les systèmes à deux composants ou Two Component System (TCS) contribuent à la transduction du signal. Le premier composant du TCS est un « senseur » qui est un récepteur membranaire de la famille Histidine Kinase (HK). Ce senseur HK s'autophosphoryle puis transfère son groupement phosphate au deuxième composant qui est cytoplasmique et appelé « Response Regulator » (RR). Ces RR sont souvent des régulateurs transcriptionnels contrôlant l'expression des gènes cibles de manière directe en se liant à leurs régions promotrices au niveau de l'ADN (Liu et al., 2019). Quant à la détection en intracellulaire, les phéromones matures sont réimportées par le transporteur d'oligopeptides Opp et s'associent aux régulateurs cytoplasmiques appartenant à la grande famille RRNPP. Ce nom dérive des initiales des membres prototypes de cette grande famille : Rgg, Rap, NprR, PlcR et PrgX. A l'exception des Rap qui sont des phosphatases, les autres sont des régulateurs transcriptionnels. Ces senseurs cytoplasmiques des phéromones étudiés jusque-là se trouvent chez les bacilles, les entérocoques et les streptocoques. Ils sont regroupés au sein de la même famille sur la base d'une similarité au niveau structural même si les fonctions contrôlées sont différentes (Declerck et al., 2007 ; Neiditch et al., 2017). Le Tableau 1 ci-dessous résume les membres de ces régulateurs étudiés et leurs phéromones associées. La Figure 3 illustre un schéma général des différentes étapes de cycle de vie des phéromones qui seront décrites dans le chapitre 2.

Introduction bibliographique-Chapitre1.

Tableau 1. La famille des régulateurs RRNPP. Les membres prototypiques de la famille des senseurs cytoplasmiques des phéromones avec le nom de leurs phéromones associées, leurs répartitions parmi les Firmicutes et les fonctions physiologiques associées connues. D'après Gardan et al., 2013.

Senseur cytoplasmique	Signification	Phéromone associée	Espèce	Fonction
Rgg	Regulator of glucosyltransferase gene G (gtfG)	SHP	Streptocoques	Production de peptide cyclique, Formation de biofilm, Virulence
ComR	Comptence regulator	ComS (XIP)		Compétence naturelle
Rap	Response regulator aspartyl phosphatase	Phr	Bacilli	Sporulation, Compétence naturelle
NprR	Neutral protease regulator	NprX	Bacilli	Necrotrophisme
PlcR	Phospholipase C regulator	PapR	Bacilli	Virulence
PrgX, TraA	Pheromone responsive gene regulator	cCF10 et iCF10, cAD1 et iAD1	Entérocoques	Conjugaison

Les mécanismes de QS sont très répandus chez les bactéries. Même si la nature des auto-inducteurs utilisés par les bactéries à Gram-négatif et les bactéries à Gram-positif diffère ainsi que leurs modes de transport à travers la membrane, la détection à partir d'un certain seuil et un contrôle coordonné de l'expression des gènes spécifiques restent le noyau de la communication bactérienne soumis aux mécanismes de QS. Les facteurs externes pouvant influencer l'expression des gènes contrôlés par les mécanismes de QS, la dissection de ces mécanismes dans les milieux complexes et lorsque les bactéries vivent en communauté avec d'autres espèces reste un grand défi.

Introduction bibliographique-Chapitre1.

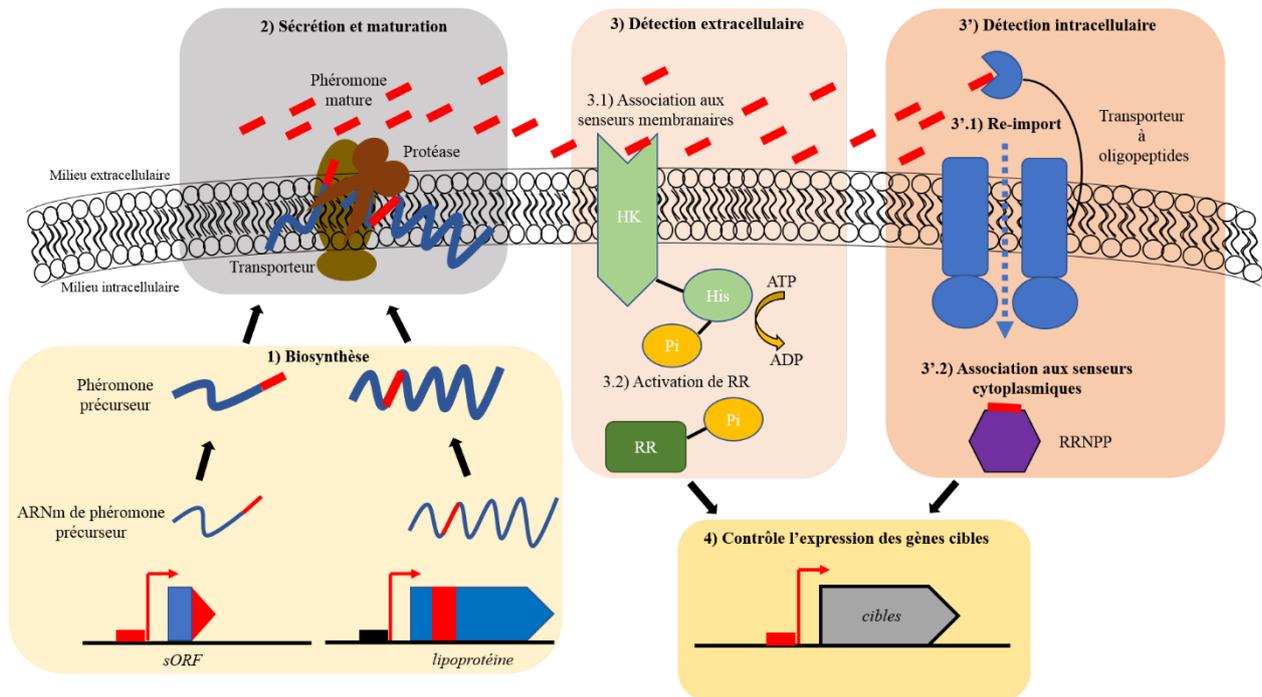


Figure 3. Schéma des étapes clés du cycle de vie des phéromones chez les bactéries à Gram-positif. Les phéromones synthétisées par les ribosomes (1), maturées et sécrétées par différents acteurs (2) peuvent être détectées soit en milieu extracellulaire par le senseur membranaire HK soit en milieu intracellulaire par les senseurs cytoplasmiques de la famille RRNPP. Dans la détection extracellulaire (3) le senseur HK s'autophosphoryle lors de la détection des phéromones (3.1), puis transfère le signal en phosphorylant le « response regulator » RR cytoplasmique (3.2). Dans la détection en intracellulaire (3'.1), les phéromones mures sont re-intériorisées par un transporteur d'oligopeptides (3'.1) et s'associent avec leurs senseurs cytoplasmiques correspondants de la famille RRNPP (3'.2). Les deux voies de détection mènent au contrôle de l'expression des gènes cibles (4). La région promotrice des gènes cibles est dessinée avec une boîte rouge. Dans le cas de biosynthèse des phéromones à partir de *sORF*, la détection des phéromones active la production de phéromone détectée créant ainsi une boucle d'auto-contrôle positive. D'après Monnet and Gardan, 2015.

Points Clés

- ✓ Le QS est un des mécanismes de communication dépendant de la densité cellulaire permettant aux bactéries de se comporter comme un groupe.
- ✓ Le QS contrôle des fonctions biologiques diverses et variées par l'expression coordonnée de gènes spécifiques et à la suite de la détection des molécules de signalisation ou auto-inducteurs.
- ✓ Les AHL, issus de métabolites secondaires, sont les auto-inducteurs des bactéries à Gram-négatif et sont perméables à la membrane.
- ✓ Les oligopeptides parfois modifiés sont les auto-inducteurs des bactéries à Gram-positif et sont imperméables à la membrane. Ce projet s'intéressera à la sécrétion de ces peptides chez une des bactéries à Gram-positif.
- ✓ La maîtrise de la communication bactérienne pour contrôler les fonctions biologiques et la compréhension de la communication inter-espèces restent des champs du domaine de la microbiologie sociale à explorer.

Chapitre2. Le cycle de vie des phéromones chez les bactéries à Gram-positif

Nous avons vu dans le chapitre 1 [1.3] les généralités sur le mécanisme de QS chez les bactéries à Gram-positif. Dans ce chapitre, je développerai distinctement chaque étape du cycle de la vie des phéromones en précisant les similarités mais aussi les spécificités de certaines étapes selon les mécanismes du QS étudiés. Dans un premier temps, je décrirai la biosynthèse des phéromones. Ensuite, je détaillerai les étapes de la sécrétion et de la maturation selon leurs spécificités dépendant des caractéristiques des phéromones étudiées en soulignant les lacunes concernant ces étapes. Par la suite, je présenterai brièvement le mécanisme de la détection des phéromones en extracellulaire à travers l'illustration de la compétence chez *S. pneumoniae*. Enfin, j'exposerai les mécanismes de la détection des phéromones en intracellulaire par la famille des régulateurs RRNPP à l'exception du mécanisme associé aux régulateurs Rgg qui sera décrit dans le Chapitre 3. « Le cycle de vie des phéromones chez *Streptococcus thermophilus* » consacré au modèle d'étude de ce projet.

2.1. Biosynthèse ribosomale des phéromones

Les phéromones sont synthétisées de manière ribosomale soit à partir de petits gènes appelés sORF pour « short Open Reading Frame » soit à partir de peptides signaux, séquences dirigeant la protéine vers la membrane pour l'export, de certaines lipoprotéines (Monnet et al., 2014). A ce jour, les phéromones issues de lipoprotéines n'ont été observées que chez *Enterococcus faecalis* (Chen et al., 2017). Les petits gènes à l'origine des phéromones sont généralement soumis à une boucle d'autocontrôle positive. En d'autres termes, la transcription de leurs gènes est activée par le régulateur dont l'activité est contrôlée par la phéromone. La taille des précurseurs longs issus de petits gènes peuvent varier entre 15 à 50 AA et celle de la forme mature de 5 à 10 AA (Neiditch et al., 2017). Même si toutes les phéromones sont synthétisées par la voie ribosomale, les processus de sécrétion, de maturation et leurs mécanismes

Introduction bibliographique-Chapitre2.

d'activation sont distincts (Cook and Federle, 2014). Parmi ces précurseurs de phéromones, on peut distinguer ceux qui ont un peptide signal en région N-terminale (Figure 4), caractéristique des protéines à destination extracellulaire par la voie de sécrétion générale, de ceux qui n'en ont pas (Neiditch et al., 2017).

Les précurseurs des phéromones nécessitent d'être sécrétés vers le milieu extracellulaire et maturés sous forme de phéromones matures pour induire un effet physiologique. Ces deux étapes, sécrétion et maturation, sont plus ou moins fortement liées entre elles. Elles peuvent être soit séquentielles soit concomitantes selon les phéromones décrites dans la littérature.

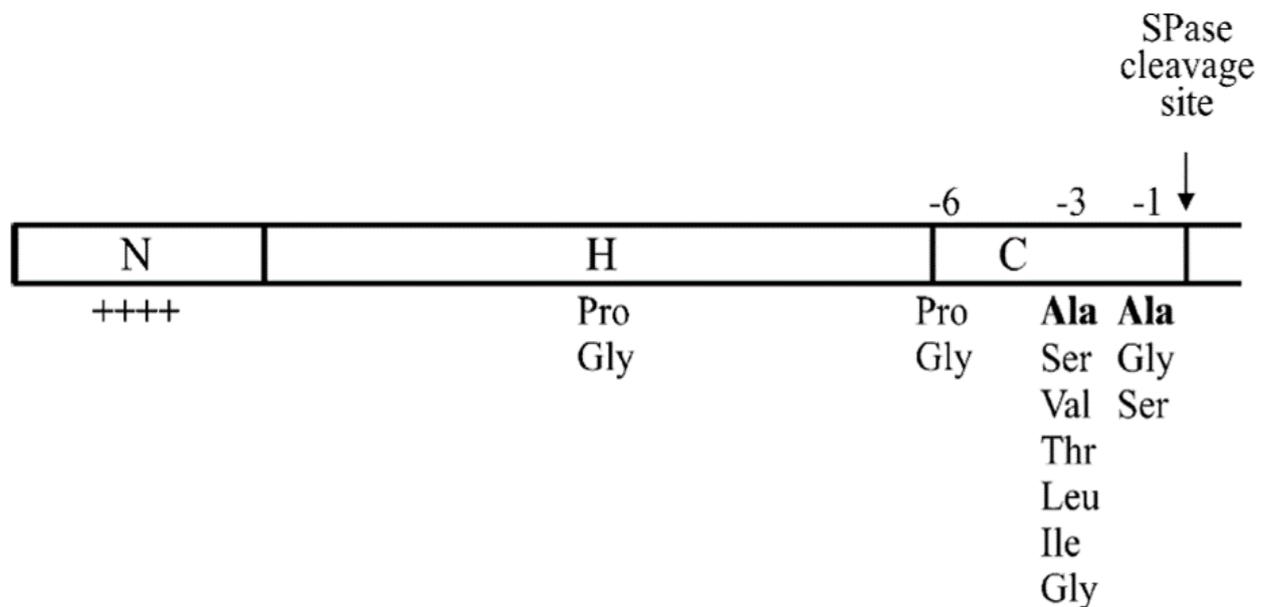


Figure 4. Les caractéristiques générales du peptide signal chez les bactéries à Gram-positif. Le peptide signal permet l'adressage des protéines extracellulaires à la voie de sécrétion générale. Il est clivé par une protéase appelée Signal peptidase (SPase) pendant ou après la translocation. En région N-terminale du peptide signal se situe la région « N » chargée positivement, avec la région centrale « H » hydrophobique et la région terminale « C » polaire. Les résidus d'AA anti-hélices (Pro et Gly) sont trouvés souvent au milieu de la région « H » et dans la région « C » en position -6 relative au site de coupure. Le site de reconnaissance par SPase est composé de petits AA polaires en position -3 et -1 au site de coupure. Le motif le plus commun est Ala-X-Ala. Extrait de Van Roosmalen et al., 2003.

2.2. Sécrétion et maturation des phéromones

Les phéromones seraient imperméables à la membrane contrairement aux auto-inducteurs des bactéries à Gram-négatif capables de diffuser à travers la membrane. Ainsi, le mécanisme d'export par des acteurs

Introduction bibliographique-Chapitre2.

plus ou moins dédiés est essentiel pour le transport des phéromones. La phéromone mature, située en région C-terminale du précurseur peut être linéaire ou parfois modifiée de manière post-traductionnelle (Thoendel and Horswill, 2010). Le processus de maturation regroupe l'ensemble des étapes de clivages et de modifications nécessaires pour générer la phéromone mature à partir du précurseur. Tout comme la sécrétion, différents acteurs plus ou moins généraux avec une activité peptidase contribuent à la maturation des phéromones (Sturme et al., 2002 ; Neiditch et al., 2017). La maturation des phéromones peut se faire avant, pendant ou après la sécrétion. En fonction de cela, la sécrétion contribue à l'export des phéromones matures actives, des formes intermédiaires ou des précurseurs (Peterson et al., 2004 ; Stephenson et al., 2003).

Pour la suite, j'exposerai les différents acteurs impliqués dans la sécrétion et la maturation des phéromones avec et sans peptide signal.

2.2.1. Sécrétion et maturation des phéromones avec un peptide signal

Les phéromones avec un peptide signal sont séparées en deux groupes selon les caractéristiques du peptide signal. D'une manière générale, la similarité entre les séquences de peptides signaux est très faible et il n'y a pas de séquences consensus permettant de reconnaître un peptide signal (Pottathil and Lazazzera, 2003). Mais tous les peptides signaux ont une structure commune (Figure 4). Les phéromones avec un peptide signal ayant une structure différente de celle qui est décrite dans la Figure 4 sont catégorisées en phéromones avec un peptide signal spécifique en opposition à celles qui ont un peptide signal classique.

2.2.1.1. Phéromones avec un peptide signal spécifique : Acteur dédié seul ou en association avec des acteurs généraux

Les phéromones détectées en extracellulaire par les senseurs membranaires HK sont souvent dépourvues de la région « H » du peptide signal classique (Figure 4). La sécrétion et la maturation de ces phéromones

Introduction bibliographique-Chapitre2.

impliquent, soit uniquement les acteurs dédiés, soit une association entre acteurs dédiés et généraux. Je vais m'appuyer sur deux phéromones ayant un peptide signal de caractéristiques distinctes et détectées par les TCS pour illustrer la complexité à élucider les étapes de ces mécanismes.

Chez *S. pneumoniae*, le mécanisme de la compétence permettant la transformation naturelle est contrôlé par la détection de la phéromone CSP pour « Competence Stimulating Peptide ». Le peptide signal en région N-terminale du précurseur de la phéromone CSP, ComC, contient un motif double glycine (Gly-Gly). Il guide le précurseur vers un transporteur bifonctionnel dédié à la maturation et à la sécrétion de la phéromone mature. Les gènes codant ce transporteur appelé ComAB sont parmi les cibles activées à la suite de la détection de la phéromone mature CSP (Shanker and Federle, 2017). Ce transporteur ComAB appartient à la famille des transporteurs ABC contenant un domaine peptidase ou PCAT pour « Peptidase containing ABC transporter » (Claverys and Havarstein, 2002). Le domaine protéolytique situé en région N-terminale de la protéine ComA clive le peptide signal après le motif Gly-Gly de manière concomitante à l'étape de sécrétion de la phéromone (Havarstein et al., 1995a).

Chez *S. aureus*, la détection de la phéromone mature cyclique AgrD active la virulence. Le peptide signal en région N-terminale du précurseur de la phéromone AgrD contient des AA amphipathiques. Ce peptide signal très conservé est essentiel pour guider le précurseur AgrD vers la membrane. A la suite de l'ancrage du peptide signal au niveau de la membrane, le précurseur AgrD est pris en charge par une protéine transmembranaire à activité peptidase, AgrB (Saenz et al., 2000 ; Zhang et al., 2002). L'expression du gène *agrB* codant cette peptidase membranaire est activée par la détection de la phéromone mature AgrD. La phéromone mature est située entre le peptide signal et le site de reconnaissance par la protéine AgrB en région C-terminale. A la suite de reconnaissance d'AgrD, la peptidase membranaire AgrB clive le site de reconnaissance de manière concomitante à la formation d'un cycle thiolactone générant une forme intermédiaire de la phéromone AgrD (Zhang et al., 2002). Cette forme intermédiaire contenant le peptide signal et un cycle de thiolactone doit être maturée à nouveau pour générer la phéromone mature dépourvue du peptide signal. Le rôle d' AgrB dans cette

Introduction bibliographique-Chapitre2.

deuxième étape de protéolyse a été écarté par des études biochimiques (Qiu et al., 2005 ; Wang et al., 2015). Ce peptide signal spécifique est dépourvu de site de coupure pour une signal peptidase générale. Cependant, une étude utilisant un peptide mimant la forme intermédiaire de la phéromone AgrD a montré qu'une signal peptidase, SpsB, peut libérer la forme mature cyclisée en clivant le peptide signal *in vitro* (Kavanaugh et al., 2007). La validation de cette hypothèse sur les formes intermédiaires exprimées *in vivo* reste compliquée compte tenu du rôle indispensable des signal peptidases pour la survie des bactéries. Concernant le transport de la phéromone mature d'AgrD, le rôle d'AgrB dans la translocation est proposée (Zhang et al., 2002). La peptidase membranaire AgrB n'ayant pas de domaine ATP, pour « ATP-Binding Cassette » fournissant l'énergie, le mécanisme de cette translocation reste à être élucidé. Si la peptidase membranaire AgrB est le seul acteur de la sécrétion de la phéromone mature de AgrD, l'ordre entre la première étape de la maturation et la sécrétion reste confus. Une étude montrant l'accumulation du peptide signal dans le milieu extracellulaire de *S. aureus* suggère que la translocation de précurseur par AgrB précède la maturation par la peptidase membranaire AgrB et la signal peptidase maturerait la forme intermédiaire dans le milieu extracellulaire générant la phéromone mature et le peptide signal (Schwartz et al., 2014 ; Wang and Muir, 2016). Plus récemment, le rôle d'une peptidase membranaire, MroQ, a été proposé comme un partenaire facultatif de la protéase AgrB (Cosgriff et al., 2019). A l'exception de l'étape de maturation de la phéromone AgrD par la peptidase membranaire AgrB, des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier tous les partenaires impliqués dans la sécrétion et la maturation de la phéromone AgrD. La Figure 5 propose un modèle de transport et de maturation de la phéromone AgrD.

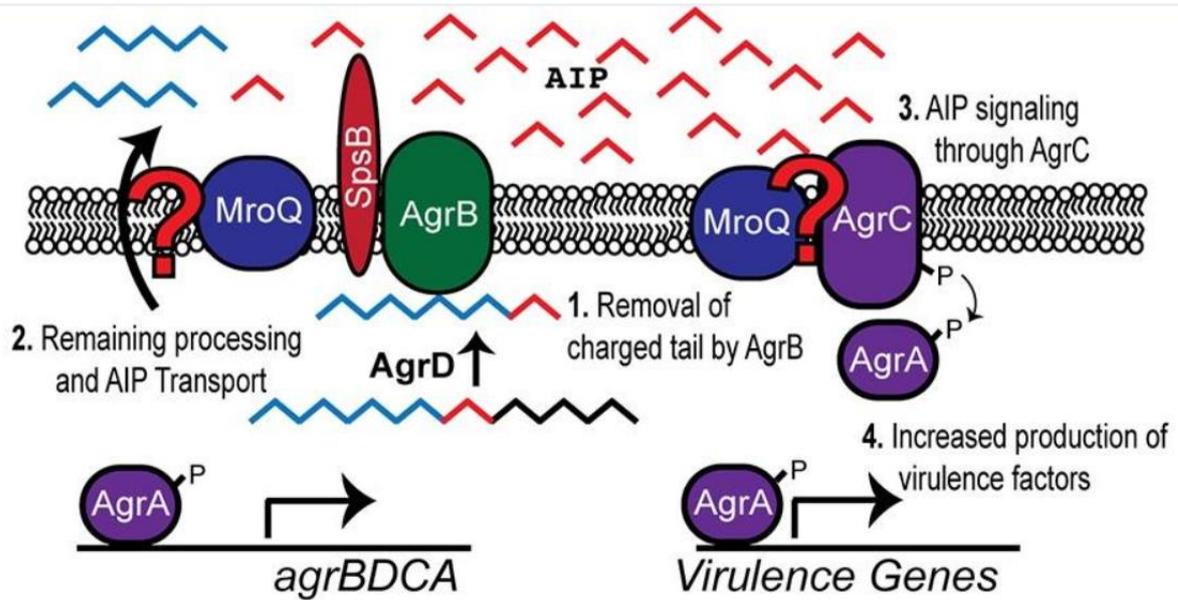


Figure 5. Modèle de transport et de maturation de la phéromone AgrD chez *S. aureus*. Le précurseur AgrD est clivé et cyclisé en région C-terminale par la peptidase membranaire AgrB lors du transport (1). La signal peptidase SpsB cliverait la forme intermédiaire pour générer la phéromone mature (AIP) et le peptide signal (en bleu) en extracellulaire. La peptidase liée à la membrane MroQ participerait soit au niveau de l'étape de maturation par la protéine AgrB soit au niveau de reconnaissance de la phéromone mature par son récepteur membranaire AgrC. D'autres acteurs impliqués dans la maturation complète et la sécrétion de la phéromone mature restent à élucider (2). La phéromone mature est détectée par le TCS AgrC (récepteur membranaire HK) et AgrA (RR). Le RR AgrA phosphorylé active l'expression des gènes de virulence ainsi que celle de l'opéron agrBDCA. D'après Cosgriff et al., 2019.

Les peptides signaux atypiques des phéromones détectées par les TCS sont essentiels pour guider les précurseurs vers les acteurs dédiés à leurs sécrétion et maturation mais tous les acteurs impliqués dans ces étapes ne sont pas toujours élucidés. Les gènes codant certains acteurs dédiés à la sécrétion et à la maturation sont parmi les cibles activées par la détection de la phéromone contribuant à augmenter la biosynthèse de la phéromone soumise à la boucle d'autocontrôle positive.

2.2.1.2. Phéromones avec un peptide signal classique : Acteurs généraux

Certains précurseurs de phéromones qui sont détectées en intracellulaire ont un peptide signal respectant la structure classique décrite dans la Figure 4. D'une manière générale, ce peptide signal guide les

Introduction bibliographique-Chapitre2.

précurseurs vers la voie de sécrétion générale Sec qui est un complexe multi-protéique permettant la translocation des précurseurs. Au cours de la translocation, ce peptide signal est clivé par des peptidases appelés signal peptidases de type I sécrétant ainsi les formes intermédiaires des phéromones. D'autres protéases extracellulaires contribuent à la génération des phéromones matures. L'analyse de séquence d'AA des précurseurs des phéromones Phr, PapR et NprX détectées en intracellulaire par les senseurs cytoplasmiques Rap, PlcR et NprR respectivement indique la présence d'un peptide signal classique. De ce fait, il est admis que la voie de sécrétion générale Sec avec la contribution des signal peptidases participent à la sécrétion des formes intermédiaires. Compte tenu du rôle essentiel de la voie de sécrétion générale Sec et des signal peptidases pour la survie des bactéries, la démonstration expérimentale reste très complexe (Stephenson et al., 2003; Pomerantsev et al., 2009 ; Dubois et al., 2019). Pour la suite, je décrirai les différents acteurs contribuant à la maturation de ces phéromones lorsqu'ils sont identifiés.

Chez les Bacilli, les précurseurs des phéromones Phr et PapR sont sécrétés par la voie de sécrétion générale Sec et le peptide signal serait clivé par une des cinq signal peptidases de type I présentes (Stephenson et al., 2003; Pomerantsev et al., 2009). A la suite de ces deux étapes, les formes intermédiaires se trouvent dans le milieu extracellulaire où d'autres protéases rentrent en jeu pour générer la forme mature de phéromone.

Trois protéases à serine extracellulaire, la Subtilisin, la Vpr et la Epr participent à la maturation finale des formes intermédiaires de certaines phéromones Phr, PhrC et PhrA de manière redondante. En d'autres termes l'absence des deux protéases peut être compensée par la troisième (Lanigan-Gerdes et al., 2007). La méthode de « Alanine scan » substituant chaque résidu de la forme intermédiaire de la phéromone par une alanine dans l'objectif d'identifier le site de coupure par ces protéases n'a pas donné de résultats soulignant la complexité à identifier les éléments contribuant à la spécificité des protéases à maturer les phéromones (Lanigan-Gerdes et al., 2008). De plus, la délétion de ces trois protéases diminue mais n'abolit pas la maturation de la forme intermédiaire de la phéromone PhrC suggérant l'existence d'autres protéases non-identifiées qui peuvent également contribuer à la maturation finale. La Figure 6

Introduction bibliographique-Chapitre2.

illustre la sécrétion et la maturation du précurseur PhrC chez *B. subtilis*. Les acteurs de la maturation des formes intermédiaires d'autres phéromones Phr telles que PhrE ne sont pas encore identifiés soulignant la difficulté à établir un consensus général sur la maturation, même pour les phéromones de même famille (Lanigan-Gerdes et al., 2007).

Une métalloprotéase à zinc sécrétée vers le milieu extracellulaire nommée NprB peut générer les formes intermédiaires et matures des phéromones PapR. Le gène codant cette protéase est situé dans le locus du gène codant le régulateur PlcR avec une séquence palindromique reconnue par PlcR suggérant que l'expression du gène *nprB* est probablement activé à la suite de la détection de la phéromone PapR. La protéase NprB contribue à la maturation de PapR mais n'est pas indispensable suggérant l'implication d'autres protéases non encore identifiées (Pomerantsev et al., 2009).

Quant à la phéromone NprX, l'analyse de séquence en AA de précurseur suggère une sécrétion par la voie générale de sécrétion Sec des formes intermédiaires mais des acteurs contribuant à la maturation finale restent à déterminer (Dubois et al., 2019).

En conclusion, la sécrétion des phéromones Phr, PapR et NprX se fait par la voie de sécrétion générale Sec pendant laquelle un premier clivage est opéré par une signal peptidase. Ensuite l'étape de maturation de ces formes intermédiaires sécrétées se poursuit jusqu'à l'obtention des formes matures par des protéases extracellulaires qui ne sont pas spécifiquement dédiées à la maturation des phéromones. Suivant les systèmes étudiés, les protéases participant à la maturation ne sont pas toujours identifiées.

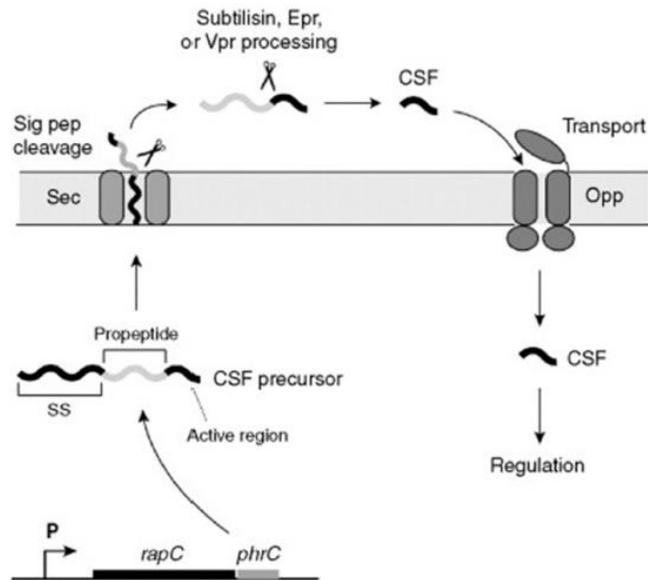


Figure 6. Le processus de la maturation du précurseur *PhrC* vers la phéromone mature *CSF* chez *B. subtilis*. Le précurseur de *PhrC* avec le peptide signal (SS pour « Signal Sequence ») est sécrété par la voie de sécrétion générale SEC sous forme intermédiaire après clivage du peptide signal par la SPase type I (« Sig pep cleavage »). La forme intermédiaire en extracellulaire est clivée par les trois protéases extracellulaires, la Subtilisin, la Vpr et la Epr indifféremment générant la phéromone mature CSF qui est re-internalisée par le transporteur Opp vers le milieu intracellulaire. Ainsi, la forme mature CSF induit une réponse biologique. Extrait de Thoendel and Horswill, 2010.

2.2.2. Sécrétion et maturation des phéromones sans peptide signal classique

Chez *E. faecalis*, l'expression des gènes nécessaires au mécanisme de conjugaison est activée par les phéromones issues du peptide signal de certaines lipoprotéines tandis qu'elle est inhibée par des phéromones issues de la biosynthèse ribosomale de petits gènes (An and Clewell, 2002). Ces phéromones inhibitrices ainsi que les phéromones SHP et ComS sont dépourvus de peptide signal classique en amont de leur forme mature (Cook and Federle, 2014 ; Gardan et al., 2013). Pour mieux saisir la complexité de l'étape de sécrétion et de maturation de ces phéromones, je vais décrire dans un premier temps le cas particulier des phéromones de conjugaison situés au sein du peptide signal classique

Introduction bibliographique-Chapitre2.

de lipoprotéines suivi des phéromones inactivant la conjugaison, SHP et ComS détectées par les régulateurs cytoplasmiques PrgX, Rgg et ComR.

2.2.2.1. Phéromones issues de lipoprotéines : Un transporteur de la famille ABC et des protéases

Concernant les phéromones de conjugaison s'associant au régulateur PrgX issues de lipoprotéines chez *E. faecalis*, le peptide signal en région N-terminale les dirige vers la voie de sécrétion générale Sec pour la translocation de lipoprotéine vers le milieu extracellulaire. Le peptide signal en N-terminale des lipoprotéines est clivé par la famille des signal peptidases type II au niveau d'une cystéine (Chandler and Dunny, 2008). La phéromone mature se trouvant en région C-terminale de ce peptide signal clivé, des étapes de maturation supplémentaires sont nécessaires. Les acteurs participant à la maturation complète de toutes les phéromones de conjugaison ne sont pas toujours identifiés. Dans le cas de certaines phéromones tels que cAD1, cCF10, cPD1 le rôle dans la maturation une métalloprotéase à zinc membranaire appelé Eep pour « Enhanced expression of pheromones » est démontré (An et al., 1999 ; An and Clewell, 2002). Même si la protéase Eep semble suffisante pour la génération de ces phéromones matures, une généralité ne peut être établie. A titre d'exemple, la maturation finale de la phéromone cCF10 impliquerait d'autres exopeptidases comme une carboxypeptidase pour cliver les trois AA en région C-terminale (Chen et al., 2017). La Figure 7 illustre les différentes étapes de maturation de la phéromone cCF10 chez *E. faecalis*. La protéase Eep n'est pas essentielle pour la maturation de la phéromone de conjugaison cAM373 soulignant la complexité à généraliser sur les acteurs de maturation pour les phéromones de la même famille (An et al., 1999 ; An and Clewell, 2002). La protéase Eep appartient à la famille S2P pour « Site 2 proteases » impliquée dans le mécanisme de clivage de nombreuses protéines transmembranaires au sein de bicouche lipidique de la membrane. Cette protéolyse est appelée RIP pour « Regulated Intramembrane Proteolysis » (Brown et al., 2000). La métalloprotéase Eep a plusieurs domaines transmembranaires avec un site actif pour zinc avec le motif HEXXH conservé dans un de ces domaines (Schneider and Glickman, 2013). Il n'est pas encore établi

Introduction bibliographique-Chapitre2.

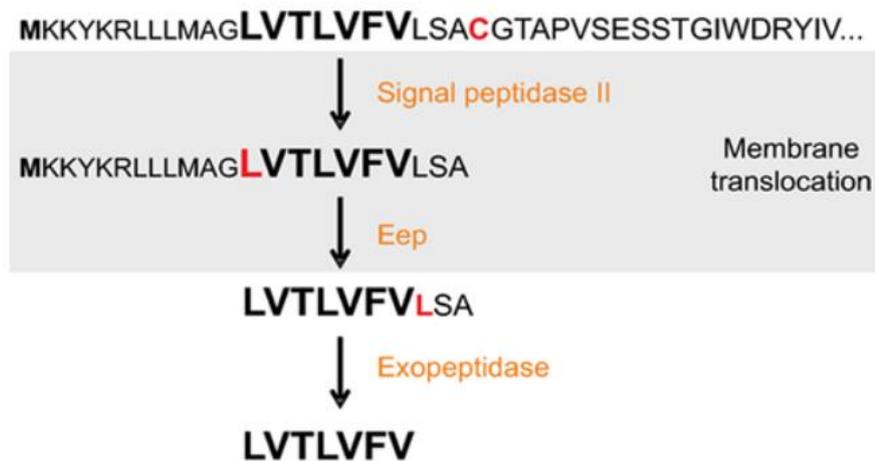


Figure 7. Les étapes de maturation de la phéromone cCF10 issue de lipoprotéine chez E. faecalis. La signal peptidase type II clive le peptide signal en région N-terminale de la lipoprotéine en amont d'un résidu cystéine pour donner le pro-précurseur. La métalloprotéase Eep clive en région C-terminale du pro-précurseur suivi d'un clivage par une autre exopeptidase non identifiée pour produire la phéromone mature. Extrait de Cook and Federle, 2014.

si les phéromones de conjugaison sont exportées avant, au cours ou à la suite de l'étape de maturation par la protéase Eep.

Chez *E. faecalis*, la sécrétion de certaines phéromones de conjugaison nécessite un transporteur de la famille ABC. En effet, une étude de mutagénèse par transposition avec l'objectif d'identifier des gènes impliqués dans la production d'une phéromone de conjugaison donnée a mis en évidence deux gènes nommés *pptA* et *pptB* (Varahan et al., 2014). L'analyse des séquences en AA issu de ces gènes indique que les gènes *pptAB* codent pour un transporteur de la famille ABC qui a été baptisé PptAB pour « Peptide pheromone transporter ». Les transporteurs ABC forment la très grande famille des transporteurs actifs primaires. Ils utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) pour transporter des substances diverses tels que les ions jusqu'aux macromolécules à travers les membranes biologiques contre leur gradient de concentration (Beek et al., 2014). La sous-unité PptA présentant le domaine de liaison à l'ATP hydrolyse l'ATP et la sous-unité PptB forme le canal pour la traversée des phéromones (Varahan et al., 2014).

Introduction bibliographique-Chapitre2.

Les études phénotypiques de conjugaison ont permis de montrer que la sécrétion de certaines phéromones de conjugaison telles que cCF10, cAD1, cAM373 nécessite la présence du transporteur PptAB (Varahan et al., 2014). L'homologue du transporteur PptAB codé avec le gène *pptA* codant l'ABC et le gène *pptB* codant la perméase existe également chez d'autres bactéries à Gram-positif (Pérez-Pascual et al., 2015; Chang and Federle, 2016). La Figure 8 résume les étapes de maturation et sécrétion de certaines phéromones de conjugaison issues du peptide signal de lipoprotéines.

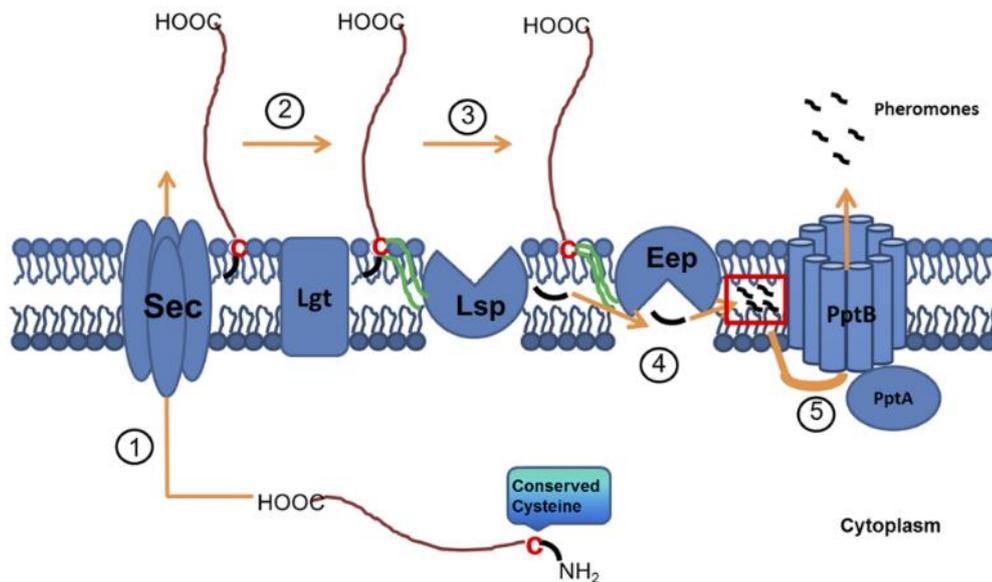


Figure 8. Maturation et sécrétion de certaines phéromones de conjugaison chez *E. faecalis*. Le précurseur issu d'un peptide signal de lipoprotéines est dirigé vers la voie de sécrétion générale Sec (1) et une protéine membranaire, Lgt, participe à son ancrage au niveau de la membrane (2). La signal peptidase type II (LSP) clive en amont d'une cystéine au niveau du peptide signal (3). La protéase membranaire Eep contribue à la maturation de la région C-terminale du peptide signal libéré de lipoprotéines (4). Le transporteur PptAB exporte les phéromones issues de cette maturation vers le milieu extracellulaire (5). Extrait de Varahan et al., 2014.

La protéase Eep n'est pas suffisante pour générer la phéromone mature cCF10. Le transporteur PptAB sécrète la phéromone cAM373 mais la protéase Eep ne contribue pas à sa maturation. Ainsi, le rôle de ces deux acteurs dans la sécrétion et la maturation des phéromones de conjugaison chez *E. faecalis* ne peut être généralisé.

Introduction bibliographique-Chapitre2.

2.2.2.2. Phéromones issues de petits gènes sans peptide signal classique : Un transporteur de la famille ABC et une protéase membranaire

Les précurseurs des phéromones inactivant la conjugaison s'associant au régulateur cytoplasmique PrgX et ceux des phéromones SHP et ComS détectées par les régulateurs Rgg et ComR sont dépourvus de peptide signal classique. Chez *E. faecalis*, seule la protéase membranaire Eep semble maturer certaines phéromones telles que iAD1, iCF10 et iPD1 inactivant la conjugaison (An and Clewell, 2002 ; Chandler and Dunny, 2008). La protéase Eep est impliquée dans la maturation des phéromones SHP₁₃₅₈ et ComS chez *S. thermophilus*, la phéromone SHP s'associant au régulateur RovS de la famille Rgg chez *Streptococcus agalactiae* (Fleuchot et al., 2011 ; Gardan et al., 2013 ; Pérez-Pascual et al., 2015). Quant à la maturation de ComS chez *Streptococcus mutans*, la protéase Eep n'est pas nécessaire soulignant que cette protéase n'est pas le seul acteur de la maturation de ces précurseurs sans peptide signal (Khan et al., 2012).

Chez *S. agalactiae*, l'abolition de la production de la phéromone SHP s'associant au Rgg, RovS, induite par la délétion des gènes codant le transporteur PptAB est rétablie par l'ajout de SHP synthétique mature suggérant son rôle dans l'export de cette phéromone (Pérez-Pascual et al., 2015). Chez *S. pyogenes*, les gènes *pptA* et *pptB* ont également été identifiés par une étude de mutagénèse réalisée pour identifier les acteurs impliqués dans la production des phéromones SHP. Les gènes *pptA* et *pptB* sont transcrits indépendamment de leurs gènes adjacents (Chang and Federle, 2016). La Figure 9 montre le contexte génétique des gènes *pptAB* chez *S. pyogenes*. Des études de fusions transcriptionnelles permettant d'exprimer des gènes rapporteurs sous le contrôle de la région promotrice des gènes cibles activé par la détection des phéromones étudiées montrent que le rôle du transporteur PptAB est essentiel pour la production des phéromones SHP matures chez *S. pyogenes*. Chez *S. mutans*, le transporteur PptAB n'est pas essentiel pour l'export de sa phéromone ComS/XIP soulignant la complexité à établir un consensus sur l'acteur de la sécrétion des phéromones sans peptide signal (Chang and Federle, 2016).

Introduction bibliographique-Chapitre2.

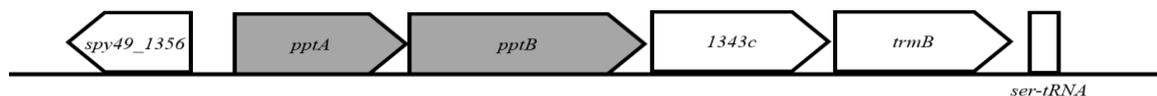


Figure 9. Organisation génétique des gènes pptAB et leurs gènes adjacents chez *S. pyogenes*. Les gènes *pptA* et *pptB* codant pour le transporteur ABC PptAB avec la sous-unité ATPasique PptA et la permease PptB sont exprimés en opéron indépendamment de leurs gènes adjacents. D'après Chang and Federle, 2016.

La maturation des phéromones de conjugaison issues de lipoprotéines nécessite plusieurs étapes de clivage par différentes protéases avant de générer la forme mature. Quant aux phéromones associées aux régulateurs Rgg et ComR, certaines nécessitent juste l'intervention de la protéase Eep mais une généralisation est à éviter même au sein de phéromones de même famille. Il est à noter que cette protéase Eep n'est pas spécifique à la maturation des phéromones mais joue aussi d'autres rôles, non-développés dans ce contexte, plus globaux tels que la maturation des lipoprotéines chez *Streptococcus uberis* (Denham et al., 2008) ou l'infection par *E. faecalis* chez les souris (Frank et al., 2013). La sécrétion des phéromones de conjugaison issues de lipoprotéines implique le transporteur de la famille ABC, PptAB mais son rôle dans la sécrétion des phéromones de conjugaison issues de petits gènes reste à démontrer. D'autres rôles du transporteur PptAB n'ont pas été identifiés dans la littérature à ce jour à l'exception de sa contribution à la formation d'un biofilm chez *E. faecalis* probablement lié à un mécanisme de communication dépendant de ce transporteur (Varahan et al., 2014). L'homologue du transporteur PptAB chez *B. subtilis* est appelé EcsAB mais son rôle dans la sécrétion des phéromones n'est pas connu (Leskelä et al., 1996). Le Tableau 2 résume l'ensemble des phéromones soit maturées par la protéase Eep, soit sécrétées par le transporteur PptAB ou son homologue EcsAB soit maturées par Eep et sécrétées par PptAB. Ce tableau montre la diversité des fonctions contrôlées par ces phéromones mais aussi les lacunes à combler sur leurs étapes de maturation et sécrétion et plus particulièrement chez *S. thermophilus*. La description des fonctions contrôlées par les phéromones de *S. thermophilus* sera faite dans le chapitre 3.

Introduction bibliographique-Chapitre2.

Tableau 2. Les phéromones maturées par la protéase Eep et/ou sécrétées par le transporteur PptAB ou son homologue EcsAB. Le rôle de la protéase Eep et du transporteur PptAB est seulement partiel dans la maturation et sécrétion de la phéromone ComS chez *S. mutans*.

Espèces	Phéromones	Séquence en AA de la phéromone mature	Maturation/ Sécrétion	Fonctions	Références
<i>Enterococcus faecalis</i>	cOB1	VAVAVLVGAC	Eep/?	Conjugaison	An et al., 1999
	cAM373	AIFILAS	?/PptAB		Varahan et al., 2014
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SHP _{gbs1555}	DLIIVGG	Eep/PptAB	Pathogénèse	Pérez-Pascual et al., 2015
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SHP2	DLIIVGG	Eep/PptAB	Formation de biofilm	Chang et Federle, 2016
	SHP3	DIIIVGG			
<i>Streptococcus mutans</i>	ComS	GLDWWSL	Partiel Eep/PpAB	Compétence	Chang et Federle, 2016
<i>Streptococcus gordonii</i>	cAM373	SVFILAA	?/EcsAB	Conjugaison	Vickerman et Mansfield 2019
<i>Staphylococcus aureus</i>	cAM373	AIFILAA	?/EcsAB	Conjugaison	Schilcher et al, 2020
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SHP ₁₂₉₉ /SHP ₂	DIIIFPPFG	??	?	Fleuchot et al., 2013
	SHP ₁₃₅₈ /SHP ₃	EGHIVVVG	Eep/?	Production de streptide	Fleuchot et al., 2011
	ComS	IAILPYFAGCL	Eep/?	Compétence	Fontaine et al., 2010

Pour les précurseurs ayant un peptide signal spécifique, les phéromones matures sont sécrétées de manière concomitante à l'étape de la maturation par des acteurs plus ou moins dédiés et spécifiques. Pour les précurseurs ayant un peptide signal classique, les acteurs généraux, la voie de sécrétion générale Sec et les signal peptidases, contribuent à l'export des formes intermédiaires suivi par des maturations supplémentaires en extracellulaire. Pour les précurseurs n'ayant pas du peptide signal classique, un transporteur de la famille ABC et une protéase membranaire contribuent à la sécrétion et à la maturation de certaines phéromones et l'ordre entre ces étapes n'est pas clairement décrit. Les acteurs de tous les systèmes décrits n'ont pas été étudiés. L'étude des caractéristiques des phéromones (la taille, la forme) reconnues par le transporteur ou par des acteurs de maturation reste très limitée. Etablir un consensus général, même entre les phéromones ayant des caractéristiques très similaires, semble un pari osé. Ainsi, chaque système nécessite d'être examiné avec précision pour identifier les acteurs de maturation et de sécrétion ainsi que le lien entre ces deux étapes.

Les phéromones sécrétées et matures peuvent être détectées à très faible concentration ($\leq 1\text{nM}$) pour induire une réponse biologique (Dunny and Leonard, 1997). Une fois dans le milieu extracellulaire et le

Introduction bibliographique-Chapitre2.

seuil de détection atteint, les phéromones matures sont détectées soit en extracellulaire soit en intracellulaire. Nous allons décrire maintenant les acteurs impliqués dans l'étape de détection.

2.3. Détection des phéromones en extracellulaire : Couple senseur membranaire HK et régulateur cytoplasmique RR

Les bactéries détectent les différents stimuli et les signaux de l'environnement principalement par les systèmes à deux composants (TCS). Comme déjà évoqué dans la partie 1.3, ces TCS sont composés d'un récepteur membranaire histidine kinase (HK) et d'un « Response Regulator » (RR) intracellulaire associé. A la suite de la détection du signal, le récepteur HK s'autophosphoryle au niveau d'un résidu d'histidine conservé puis transfère son signal de phosphorylation à son RR associé au niveau d'un résidu aspartate conservé. Cela induit un changement de conformation du RR conduisant souvent à une modification au niveau de l'expression des gènes cibles (Capra and Laub, 2012). Chez les bactéries à Gram positif, deux mécanismes de détection des phéromones en extracellulaire par les TCS ont été particulièrement étudiés. Le premier contrôle la compétence chez *S. pneumoniae* et le deuxième la virulence chez *S. aureus* (Kleerebezem et al., 1997 ; Ji et al., 1997). J'ai choisi d'illustrer la détection des phéromones en extracellulaire en présentant la compétence chez *S. pneumoniae*.

La notion de la transformation génétique a été décrite pour la première fois chez le pathogène humain *S. pneumoniae*. C'est un des mécanismes de transfert de gène horizontal lors duquel les bactéries prennent en charge de l'ADN étranger nu de leur environnement et l'intègrent dans leurs génomes par recombinaison homologue (Havarstein et al., 1995b ; Fontaine et al., 2015). L'état physiologique pendant lequel cette prise en charge est permise s'appelle la compétence. Chez les streptocoques l'activation de la compétence est divisée en deux phases temporelles distinctes appelées phase précoce et phase tardive. La phase précoce est activée par le système ComCDE (Fontaine et al., 2015). La phéromone CSP issue du précurseur ComC est maturée et sécrétée par le transporteur bifonctionnel ComAB. A son seuil de concentration de détection, le senseur membranaire HK, ComD, s'associe à la

Introduction bibliographique-Chapitre2.

phéromone CSP et s'active en s'autophosphorylant. Ensuite, le senseur ComD phosphorylé active son RR associé cytoplasmique ComE en lui transférant son groupement phosphate. Le RR ComE phosphorylé (ComE-P) active l'expression des gènes cibles en se liant à leurs régions promotrices au niveau d'un motif consensus conservé appelé Ceb pour ComE binding site (Shanker and Federle, 2017). Parmi ses cibles se trouvent les gènes de la phase précoce dont *comCDE*, *comAB* et particulièrement le gène *comX* codant pour le facteur sigma alternatif ComX qui active les gènes de la phase tardive. Le facteur sigma alternatif ComX, aussi appelé le régulateur principal de la compétence ou « master regulator », s'associe à l'ARN polymérase (ARNpol) et se fixe dans les régions promotrices des gènes cibles au niveau d'un motif consensus conservé appelé « com-box » ou Cin-box (Fontaine et al., 2015). Il contrôle l'expression de 80 gènes tardifs parmi lesquels seuls 14 sont essentiels à la transformation et comprennent ceux nécessaires à la formation d'un complexe multiprotéique appelé « transformasome » impliqué dans la prise en charge de l'ADN extracellulaire et ceux nécessaires à la recombinaison homologue, (Peterson et al., 2004;Shanker and Federle, 2017) . Chez *S. pneumoniae*, la compétence est un état transitoire activé pendant la phase exponentielle de la croissance suivant un mécanisme de QS classique (Miller and Bassler, 2001). L'état précoce, défini par le pic maximal de niveau d'expression des gènes précoces, est observé 5 min après le traitement avec la phéromone CSP et l'état tardif suit 15 min après l'induction par le CSP, soulignant l'existence de mécanismes permettant la fermeture de l'état de compétence (Alloing et al., 1998). Deux mécanismes identifiés peuvent en partie contribuer à la fermeture de la compétence. Le premier mécanisme est l'équilibre entre les deux formes de RR, ComE et ComE-P, dont la première est une inhibitrice et la seconde activatrice des gènes précoces de la compétence. Elles sont en compétition pour lier le même site Ceb (Weyder et al., 2018). Le deuxième est dépendante du facteur sigma ComX conduisant à une inhibition de l'activateur ComE-P par une protéine de la phase tardive DprA pour « DNA processing protein A » probablement par une séquestration ou une déphosphorylation (Mirouze et al., 2013). Le facteur ComX inhiberait également des gènes tardifs par une protéine encore non-identifié (Weng et al., 2013). La Figure 10 illustre les

Introduction bibliographique-Chapitre2.

grandes étapes et les acteurs de l'ouverture et de la fermeture de la compétence chez *S. pneumoniae* (Fontaine et al., 2015). L'activation de la compétence est une fonction très coûteuse en énergie pour la bactérie. Chez *S. pneumoniae*, elle est également accompagnée d'un phénomène dit fratricide activé par le facteur sigma ComX. Ce mécanisme aussi appelé allolyse consiste à la lyse ciblée de cellules non-compétentes de *S. pneumoniae* par les cellules de la fratrie qui sont compétentes. Ce mécanisme permet le relargage de l'ADN dans l'environnement assurant ainsi l'accès à l'ADN (Wang and Dawid, 2018). Compte tenu des conséquences importantes provoquées par la compétence, un contrôle très strict de la production du régulateur principal ComX est nécessaire. Ainsi, sa production est soumise à un contrôle transcriptionnel par le mécanisme de QS avec la détection en extracellulaire de la phéromone CSP et à un contrôle post-traductionnel par des mécanismes de dégradation et de stabilisation (Fontaine et al., 2015).

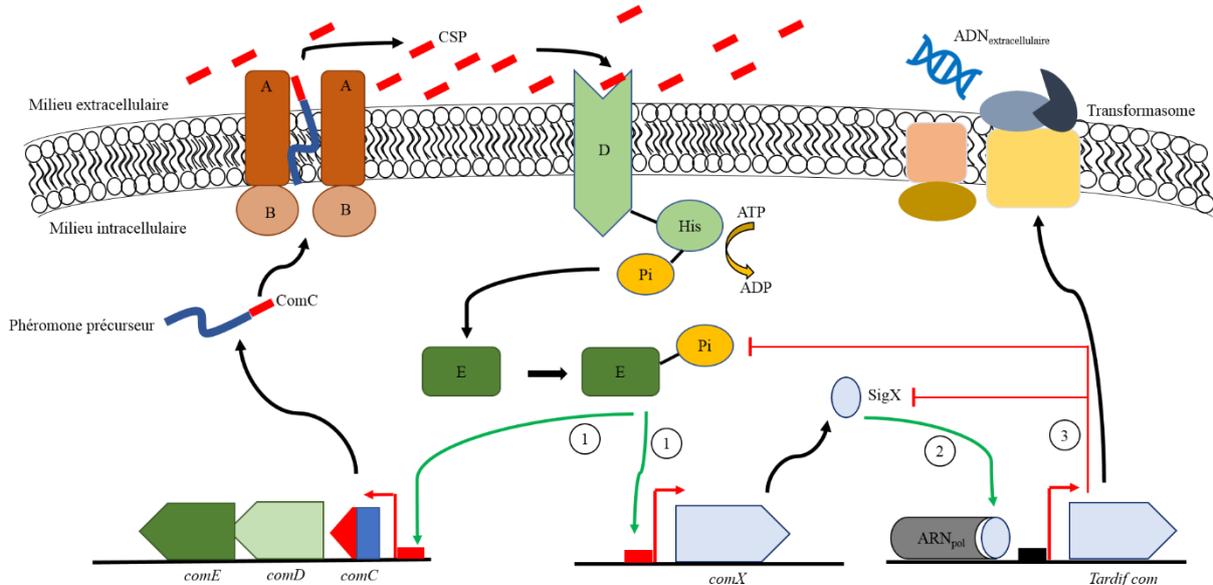


Figure 10. La compétence chez *S. pneumoniae* contrôlée par un mécanisme de QS. Le précurseur ComC de la phéromone de la compétence CSP est sécrété et mûri par le transporteur ABC avec un domaine peptidase ComAB. La phéromone CSP est détectée en extracellulaire par le récepteur membranaire HK ComD. L'HK ComD s'autophosphoryle et transfère son groupement phosphate au RR cytoplasmique ComE qui active l'expression des gènes précoces de la compétence dont les gènes *comCDE* (1) et le gène *comX* (1) codant le facteur sigma SigX. Ce facteur active l'expression des gènes tardifs de la compétence (2) en s'associant à l'ARN pol. Les produits des gènes tardifs contribuent à la formation de transformasome prenant en charge l'ADN extracellulaire. Un produit de la phase tardive, *DprA*, inhibe le RR ComE-P par un mécanisme non-décrit (3) et un autre produit non-identifié encore de cette même phase inhiberait le facteur sigma SigX (3). D'après Fontaine et al., 2015.

Introduction bibliographique-Chapitre2.

A la suite de cette détection en extracellulaire, je vais décrire en détails les différents mécanismes et acteurs intervenant dans la détection des phéromones en intracellulaire. Comme déjà dit, la détection en intracellulaire implique un acteur général impliqué dans le transport des oligopeptides puis des acteurs spécifiques appartenant à la grande famille des senseurs cytoplasmiques RRNPP.

2.4. La détection des phéromones en intracellulaires : un transporteur d'oligopeptides et des senseurs cytoplasmiques spécifiques de la famille RRNPP indispensables

2.4.1. Le transporteur d'oligopeptides Opp : un acteur principal de la nutrition avec un rôle spécifique dans le mécanisme de QS

2.4.1.1. Les caractéristiques du transporteur Opp et son rôle général dans la nutrition

Le transporteur d' oligopeptides appelé Opp pour « Oligopeptide permease » présent chez les bactéries à Gram-négatif comme chez les bactéries à Gram-positif, a été caractérisé en premier chez *Salmonella typhimurium* pour son rôle dans l'internalisation des oligopeptides (Hiles et al., 1987). L'assimilation des oligopeptides présents dans un milieu riche en peptides est primordiale pour la croissance des bactéries car les sources principales d'AA, de carbone et d'azote sont sous forme d'oligopeptides. Ainsi, le transporteur Opp de la famille ABC est essentiel pour la nutrition dans un milieu riche en peptides (Garai et al., 2016). Chez les bactéries à Gram-positif, le transporteur Opp intervient également dans les mécanismes de QS en important les phéromones matures du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire pour la détection en intracellulaire (Monnet and Gardan, 2015).

Le transporteur Opp est composé de cinq sous-unités nommés OppA, OppB, OppC, OppD et OppF. La sous-unité OppA extracellulaire de nature lipoprotéique appartient à la famille des « substrate-binding protein » (SBP) pour protéine liant le substrat. Cette famille regroupe un ensemble de protéines avec une structure tertiaire et une organisation en domaines similaires (Norcross et al., 2019). La SBP OppA est libre dans le périplasme chez les bactéries à Gram-négatif tandis qu'elle est ancrée à la membrane par

Introduction bibliographique-Chapitre2.

une liaison lipidique au niveau de sa région N-terminale chez les bactéries à Gram-positif (Monnet et al., 2003 ; Scheepers et al., 2016). Les deux sous-unités OppB et OppC transmembranaires forment la perméase permettant le passage des oligopeptides à travers la membrane. L'énergie nécessaire pour cette translocation des oligopeptides est fournie par l'activité ATPasique des deux sous-unités intracellulaires OppD et OppF. Au niveau de l'organisation génétique, les gènes *oppBCDF* sont toujours dans un opéron et le gène codant la SBP, *oppA*, est soit inclus dans cet opéron soit transcrit indépendamment selon les espèces et les souches. Selon les génomes, le gène codant la SBP est présent en multiples copies soit au sein d'un opéron codant un système de transport à oligopeptides supplémentaire soit indépendamment au niveau de chromosome ou du plasmide (Gominet et al., 2001 ; Garault et al., 2002 ; Monnet et al., 2003). La taille et la nature des oligopeptides internalisés par le transporteur Opp sont déterminés par les SBPs et varient selon les espèces. Par exemple, la SBP OppA de *Lactococcus lactis* peut fixer des oligopeptides de 4 à 35 AA de préférence avec les résidus hydrophobes et basiques tandis que celle d'*E. coli* peut transporter des dipeptides à pentapeptides avec une grande affinité pour les tri- et tetrapeptides chargés positivement (Charbonnel et al., 2004 ; Klepsch et al., 2011). L'étape limitante de ce transport est probablement le transfert de substrat lié par SBP à la perméase OppBC (Charbonnel et al., 2004). Le mécanisme de transport décrit en cinq étapes chez *L. lactis* indique que la SBP OppA fixe l'oligopeptide de manière réversible au niveau des six premiers AA dans sa conformation ouverte induisant son changement conformationnel vers une forme fermée permettant la capture d'oligopeptide (Etape I). Le substrat est transféré à la perméase OppBC par la SBP OppA (Etape II) induisant un changement de conformation de OppBC (Etape III) et l'hydrolyse d'ATP par les sous-unités OppDF permet la translocation du substrat à travers la membrane (Etape IV) (Lanfermeijer et al., 2000 ; Charbonnel et al., 2004). La Figure 11 montre l'organisation structurale et les différents étapes de l'internalisation des oligopeptides par le transporteur Opp (Charbonnel et al., 2004).

Introduction bibliographique-Chapitre2.

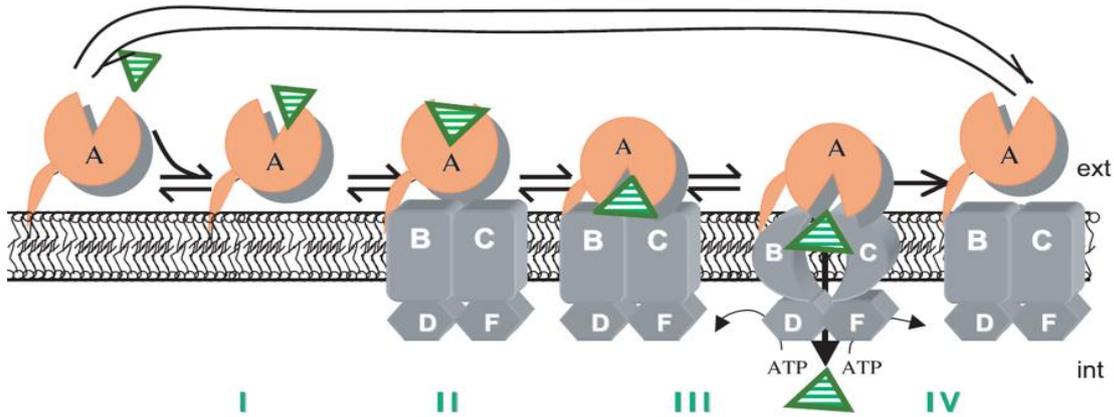


Figure 11. Le schéma illustre l'organisation structurale et fonctionnelle du transporteur Opp chez les bactéries à Gram-positif. La protéine OppA ancrée à la membrane de la famille SBP se lie à son substrat, les oligopeptides, (triangles verts). Cette fixation induit une conformation fermée de la SBP OppA (Etape I). Le substrat est transmis à la perméase formée par les sous-unités OppB et OppC par la SBP OppA (Etape II) provoquant un changement de conformation de la perméase (Etape III). La translocation du substrat à travers la membrane est permise par l'hydrolyse de deux molécules d'ATP par le sous-unités intracellulaires OppD et OppF (Etape IV). Extrait de Charbonnel et al., 2004.

2.4.1.2. Le rôle essentiel du transporteur général Opp dans l'internalisation des phéromones

Un rôle supplémentaire du transporteur Opp, en plus de celui dans la nutrition, a été documenté chez les bactéries à Gram-positif avec les études sur les phéromones détectées en intracellulaire. Avec l'agrandissement de la famille des senseurs cytoplasmiques avec leurs phéromones associés, le transporteur Opp est devenu essentiel et central pour la détection de ces phéromones en intracellulaire donc dans le mécanisme de QS (Slamti et al., 2019).

Chez *B. subtilis*, le rôle du transporteur Opp dans les fonctions contrôlées par les phéromones Phr telles que la sporulation ou la compétence a été évoqué en premier (Perego, 1997 ; Lazazzera et al., 1997). Les phéromones PhrC impliquées dans la compétence et la sporulation, les phéromones PhrA et PhrE impliquées dans la sporulation et la phéromone PhrI entraînant l'excision et le transfert d'un élément génétique mobile sont importées par le transporteur Opp avant d'être détectées par les senseurs cytoplasmiques Rap associés (Lazazzera et al., 1997 ; Pottathil and Lazazzera, 2003 ; Auchtung et al., 2005). Un deuxième transporteur d' oligopeptides fonctionnel et nommé App est présent dans certaines

Introduction bibliographique-Chapitre2.

souches de *B. subtilis* (Slamti et al., 2019). Ce transporteur, organisé en opéron *appDFABC*, est nommé par analogie avec les composants de son homologue dans le génome, le transporteur Opp. Certains génomes de *B. subtilis* codent pour une version non-fonctionnelle du transporteur App avec un décalage de cadre de lecture provoqué par une mutation dans le gène *appA*. La correction de cette mutation produit un transporteur App capable de se substituer au transporteur Opp en internalisant les phéromones de la sporulation et de la compétence. Malgré la capacité de complémentarité du transporteur App au transporteur Opp, les deux SBPs, AppA et OppA, ont un faible niveau d'homologie avec une différence également pour la spécificité du substrat (Koide and Hoch, 1994). Le transporteur Opp peut transporter les tripeptides contrairement au transporteur App (Koide et al., 1999). Les phéromones Phr s'associent aux senseurs cytoplasmiques Rap sont réinternalisées principalement par le transporteur Opp chez *B. subtilis* (Perego, 2013).

Les phéromones PapR et NprX, associées aux senseurs cytoplasmiques PlcR et NprR et essentiels pour la virulence et le nécrotrophisme respectivement, chez le groupe *cereus* incluant l'entomopathogène *Bacillus thuringiensis*, sont principalement re-importées par le transporteur Opp (Gominet et al., 2001 ; Perchat et al., 2011a). Dans ce groupe, plusieurs copies de systèmes de transports d'oligopeptides ont été identifiés et annotés App, Opp ou Dpp pour transporteur à dipeptides. L'annotation par l'analyse *in silico*, distinguant les transporteurs à di-ou tripeptides et/ou oligopeptides nécessite des preuves expérimentales pour la validation de leurs fonctions (Slamti et al., 2019). L'existence de multiples copies de systèmes de transport d' oligopeptides dans certains génomes est observé de manière répandue mais la raison de cette redondance n'est pas toujours connue (Monnet et al., 2003 ; Gardan et al., 2009). Pour certaines phéromones comme NprX, l'implication de plusieurs SBPs et d'au moins deux systèmes de transport d'oligopeptides dans l'étape de re-import a été décrite. La phéromone NprX peut être réinternalisée par au moins deux SBPs s'associant au complexe OppBCDF et par un autre transporteur spécifique appelé Npp pour « NprX peptide permease ». Le transporteur Npp présent en opéron *nppDFBCA* n'est pas essentiel mais contribue au transport de la phéromone NprX avec la SBP NppA

Introduction bibliographique-Chapitre2.

capable de s'associer à la perméase NppBC (Dubois et al., 2019). Selon ce même mécanisme d'association de différentes SBPs avec le complexe OppBCDF, la SBP OppA, non-spécifique aux phéromones, et d'autres SBPs dont les gènes sont présents sur certains plasmides conjugatifs tels que pCF10 ou pPD1 participent à la translocation des phéromones de conjugaison à travers ce complexe chez *E. faecalis*. La SBP OppA lie la phéromone cCF10 à une très forte concentration tandis que la SBP PrgZ dont le gène est codé par le plasmide conjugatif pCF10 fixe cette phéromone à sa concentration physiologique qui est très faible avec plus d'affinité (Leonard et al., 1996). La protéine PrgZ lie également la phéromone d'inhibition de conjugaison iCF10 mais avec moins d'affinité comparé à la phéromone d'activation (Berntsson et al., 2012). La SBP TraC portée par le plasmide pPD1 réinternalise la phéromone cPD1 en s'associant au complexe OppBCDF (Nakayama et al., 1995). Il est probable qu'avoir leurs propres SBP pour détecter les phéromones de conjugaison permettrait aux bactéries de détecter les phéromones à faible concentration physiologique sans rentrer en compétition avec les substrats divers et variés d'OppA (Slamti et al., 2019).

Le transporteur d'oligopeptides Opp est non-seulement essentiel à la croissance et à la survie des bactéries dans un milieu riche en peptides mais également essentiel pour le mécanisme de QS dans le cas de détection des phéromones en intracellulaire. L'existence d'autres systèmes de transport alternatif au transporteur Opp comme Npp pour l'import des phéromones est très anecdotique. Compte tenu de la diversité des substrats de la SBP OppA, certaines bactéries produisent des SBP homologues à OppA ayant plus d'affinité pour certaines phéromones pour éviter la compétition et faciliter leurs détections de manière spécifique et efficace à leurs concentrations physiologiques.

2.4.2. Les senseurs cytoplasmiques de la famille RRNPP

2.4.2.1. Les caractéristiques générales et spécifiques des senseurs cytoplasmiques RRNPP

Comme déjà annoncé dans la partie 1.3, les phéromones matures réinternalisées sont détectées par la famille des senseurs cytoplasmiques RRNPP. Malgré une similarité faible au niveau des séquences en

Introduction bibliographique-Chapitre2.

AA, ces senseurs sont regroupés au sein de la même famille grâce à une similarité au niveau de leurs structures. Tous les membres de la famille RRNPP possèdent un domaine liant la phéromone en région C-terminale, appelé domaine TPR pour « tetratricopeptide repeat » et constitué d'une répétition d'hélice-boucle-hélice (Sikorski et al., 1990 ; Declerck et al., 2007 ; Perchat et al., 2016 ; Neiditch et al., 2017). Ce domaine TPR, répandu chez les procaryotes comme chez les eucaryotes, est impliqué dans l'interaction protéine-protéine ou protéine-peptide (Blatch and Lässle, 1999 ; D'Andrea and Regan, 2003). Le domaine TPR des régulateurs RRNPP interagit avec les phéromones par sa surface intérieure concave (Declerck et al., 2007). Contrairement à la région C-terminale bien conservée, la structure de la partie N-terminale des membres de la famille RRNPP varie. En effet, la région N-terminale des membres Rgg, PlcR et PrgX possède un motif d'hélice-boucle-hélice de domaine de liaison à l'ADN ou DBD pour « DNA-binding domain » tandis que celle des membres Rap est dépourvue de DBD et a des motifs TPR supplémentaires. La région N-terminale du senseur cytoplasmique NprR possède à la fois un domaine DBD et des motifs TPR additionnels (Neiditch et al., 2017). La Figure 12 illustre en détails les différents motifs décrits chez les senseurs cytoplasmiques de la famille RRNPP (Neiditch et al., 2017) et la Figure 13 propose un modèle d'évolution pour les senseurs du groupe bacilli. La différence structurale au niveau des régions N-terminales de ces senseurs cytoplasmiques contribue à la diversité des mécanismes d'activations (Neiditch et al., 2017).

Introduction bibliographique-Chapitre2.

La structure cristallographique d'au moins un senseur cytoplasmique de chaque famille étant obtenue, je vais décrire pour chacun son mode d'activation ainsi que les fonctions biologiques contrôlées. Les régulateurs Rgg seront décrits dans le chapitre 3.

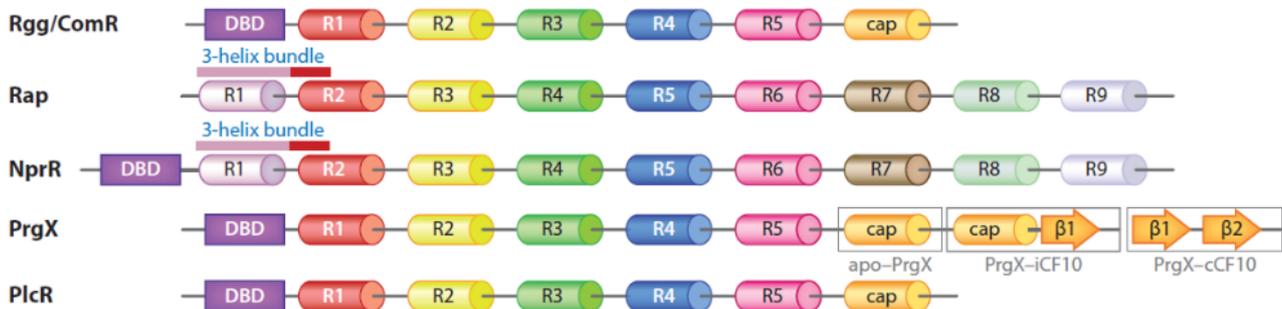


Figure 12. Schéma décrivant les caractéristiques générales de domaines structuraux de la famille RRNPP. En région N-terminale, le domaine liant l'ADN ou DBD pour « DNA-binding domain » est présent chez tous les membres à l'exception de ceux de la famille Rap. La région N-terminale des membres Rap et NprR ont trois hélices en faisceaux décrits comme « 3-helix bundle ». Les motifs TPR formant le domaine TPR liant les phéromones en C-terminale sont annotés « R » pour répétition. Les membres Rgg/ComR, PrgX et PlcR ont également à la suite de TPR un motif « helix-capping » annoté « cap » qui contribue à la stabilisation des hélices. Extrait de Neiditch et al., 2017.

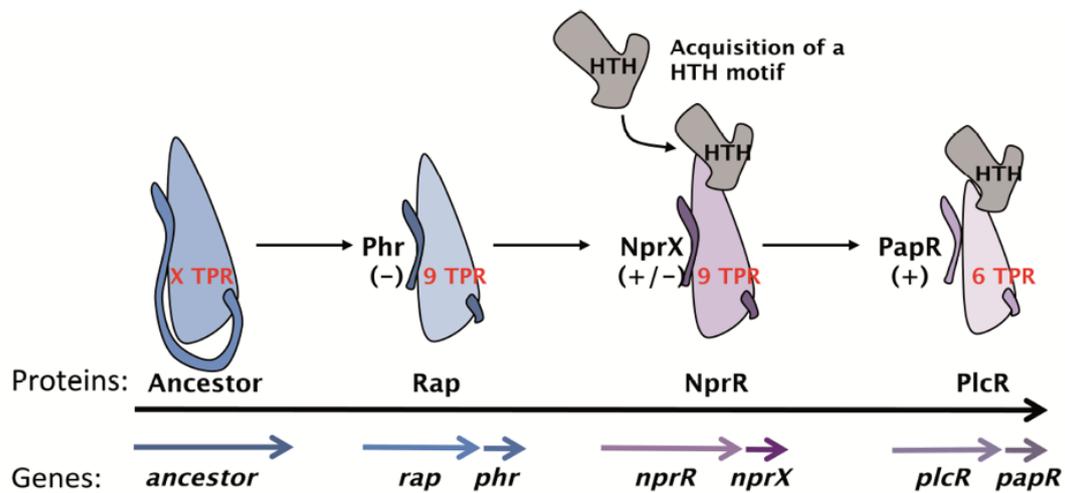


Figure 13. Hypothèse d'évolution des senseurs cytoplasmiques de la famille RRNPP chez les Bacilli. L'ancêtre commun possédait un domaine TPR permettant l'interaction protéine-protéine et une structure flexible inhibitrice de l'interaction en région C-terminale. Les phosphatases Rap qui sont inhibées par la liaison avec leurs phéromones Phr au niveau de leur domaine TPR formé de 9 motifs TPR. NprR est une phosphatase en absence de phéromone NprX et en sa présence devient un activateur transcriptionnel grâce à l'acquisition du motif HTH en région N-terminale. Avec ces deux caractéristiques, le régulateur NprR est considéré comme l'intermédiaire entre les phosphatases Rap et les autres activateurs transcriptionnels de la famille RRNPP au cours de l'évolution. Avec la perte de 3 motifs de TPR, le régulateur PlcR est un activateur transcriptionnel en présence de sa phéromone PapR. Extrait de Perchat et al., 2016.

2.4.2.2. Mécanismes et fonctions biologiques contrôlés par les senseurs de la famille

RRNPP

2.4.2.2.1. Les senseurs cytoplasmiques Rap inhibés par les phéromones Phr

Chez les Bacilli, les fonctions biologiques telles que la compétence naturelle, la formation de biofilms, la sporulation, la production d'enzymes secrétées impliquées dans la virulence ou le transfert des éléments mobiles conjugatifs sont contrôlées en partie par les senseurs cytoplasmiques Rap (Perego, 2013), (Do and Kumaraswami, 2016).

Onze gènes chromosomiques et cinq gènes plasmidiques codant des protéines Rap ont été identifiés chez *B. subtilis*. Parmi les onze gènes chromosomiques, huit sont localisés à côté de gènes codant leurs

Introduction bibliographique-Chapitre2.

phéromones Phr. Certaines protéines Rap déphosphorylent les RR des systèmes à deux composants et leurs intermédiaires impliqués dans la sporulation mais d'autres peuvent également contrôler les TCS en séquestrant des RR et donc en inhibant leur activité indépendamment de leur fonction phosphatase (Do and Kumaraswami, 2016). Malgré une très forte homologie de séquences entre elles (42 %), les protéines Rap contrôlent des processus divers en interagissant avec des cibles distinctes (Perego, 2013). L'étude détaillée du contrôle de la compétence et de la sporulation a permis de mieux comprendre les mécanismes de fonctionnement distinct des protéines Rap. Il est illustré par la Figure 14.

Chez les bactéries sporulantes, la condition défavorable à la croissance active la formation de spores dormantes qui, en condition favorable, peuvent germer pour former une bactérie viable. Chez les Bacilli, la sporulation, activée par le RR Spo0A phosphorylé, est contrôlée par certains senseurs cytoplasmiques Rap et leurs phéromones Phr. D'une manière succincte, différents stimuli de l'environnement extracellulaire et intracellulaire activent cinq kinases de la famille HK (KinA-KinE). Cette activation induit une cascade de phosphorylation complexe avec des protéines intermédiaires Spo0F et Spo0B permettant la phosphorylation du RR Spo0A. Cela active l'expression des gènes impliqués dans la sporulation mais également impliqués dans la formation de biofilms ou la compétence. Certaines protéines Rap, en absence de phéromones respectives, inactivent cette cascade de phosphorylation en déphosphorylant l'intermédiaire Spo0F et ainsi contribue à l'inactivation des fonctions contrôlées par Spo0A-phosphorylé. La liaison aux phéromones respectives de ces protéines Rap inactive cette fonction phosphatase et ainsi active la sporulation.

Les résolutions de la structure de certaines protéines Rap par cristallographie montre qu'elles fonctionnent sous forme monomérique contrairement aux autres membres de la famille RRNPP. Chaque monomère sous forme apo est structuré en deux domaines liés par une hélice de liaison ou « linker helix ». A la suite de leur liaison aux phéromones, un changement conformationnel allostérique induit un rapprochement des deux domaines. En d'autres termes, les protéines Rap complexées avec leur phéromone se trouvent sous la forme d'une protéine à un seul domaine empêchant soit l'interaction avec

Introduction bibliographique-Chapitre2.

le RR Spo0F soit la séquestration du RR ComA (Perego, 2013, Do and Kumaraswami, 2016; Neiditch et al., 2017; Slamti et al., 2019). Ces changements de conformation sont illustrés dans la Figure 15.

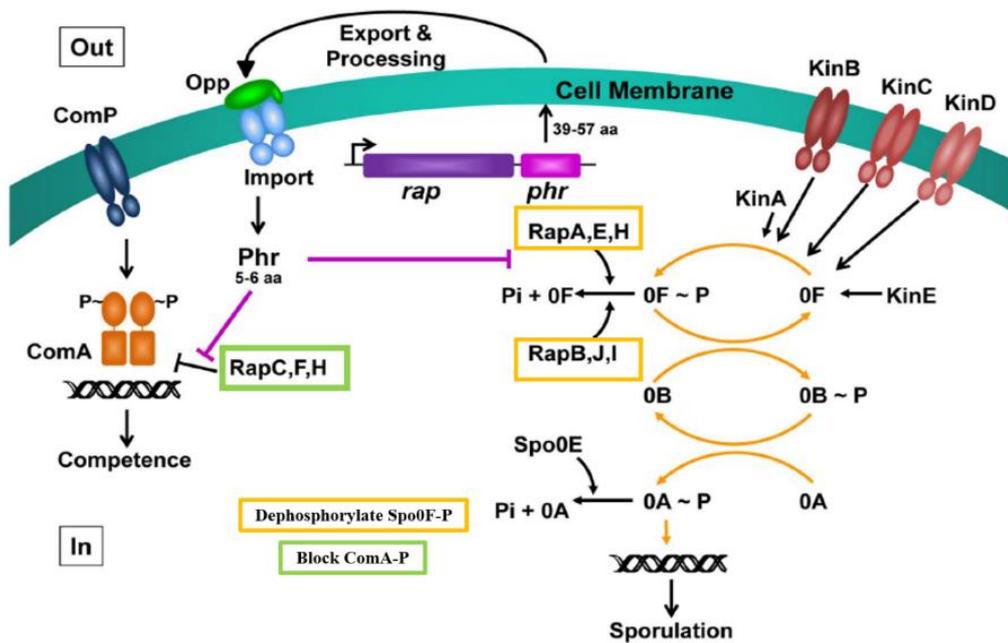


Figure 14. La sporulation et la compétence contrôlées par les différents senseurs cytoplasmiques Rap associés à leurs phéromones. La sporulation est activée par le RR Spo0A phosphorylée. Les trois kinases membranaires (KinB, KinC, KinD) et les deux kinases cytoplasmiques (KinA et KinE) sont activées par des stimuli variés. Cela active une cascade de phosphorylation impliquant Spo0F, Spo0B et le RR Spo0A qui sous forme phosphorylée (Spo0A-P) active les gènes impliqués dans la sporulation. Rap A, B, E, H, I et J déphosphorylent la protéine Spo0F en absence de leurs phéromones associées ainsi perturbe la cascade de phosphorylation. Leurs phéromones Phr inactivent leurs fonctions phosphatases. Une autre phosphatase Spo0E déphosphoryle également le RR Spo0A-P. Quant à la compétence activée par le TCS avec le récepteur HK ComP et son RR ComA, les protéines RapC, F et H séquestrent le RR inhibant l'activation des gènes cibles. Cette inhibition est inactivée par leurs phéromones associées. Modifié à partir de (Perego, 2013).

Introduction bibliographique-Chapitre2.

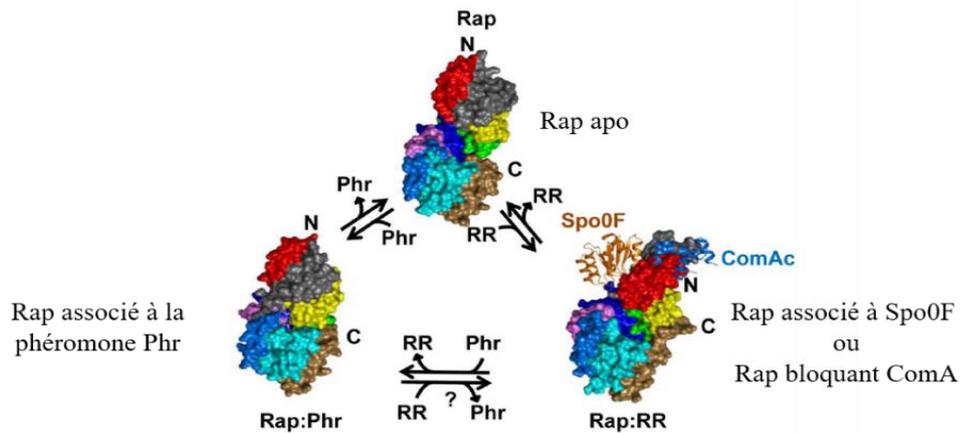


Figure 15. Le changement allostérique du senseur cytoplasmique Rap en présence de la phéromone associée Phr. La protéine Rap en forme apo possède deux domaines en N-terminal et en C-terminal liés par une hélice de liaison flexible. Cette figure synthétise les régions de liaisons aux RR Spo0F ou ComAc sur une même protéine Rap. En forme complexe avec leurs phéromones respectives, le changement induit par la liaison rapproche les deux domaines formant une protéine à un seul domaine. Les résidus nécessaires pour l'interaction avec les RR ne sont plus accessibles dans la forme en complexe avec les phéromones. Modifié à partir de Perego, 2013.

2.4.2.2.2. Le binôme des senseurs cytoplasmiques PlcR et NprR contrôlent la virulence, le nécrotrophisme et la sporulation dans le groupe *cereus*

Chez *B. cereus*, une bactérie ubiquitaire du sol, pouvant provoquer des intoxications alimentaires et devenir pathogène pour l'Homme, la virulence est contrôlée par le régulateur PlcR et la phéromone PapR. Le couple PlcR/PapR active l'expression des gènes de virulence tels que les gènes codants des enzymes de dégradation, des protéines de surface et des toxines (Gominet et al., 2001). La résolution de la structure du régulateur PlcR par cristallographie indique que la forme apo est un dimère stable. La liaison de la phéromone mature PapR induit un changement conformationnel transformant le dimère d'une forme fermée vers une forme flexible. Cela permet l'interaction de PlcR avec les régions promotrices de ses cibles caractérisées par un site palindromique imparfait (Declerck et al., 2007). Le régulateur NprR essentiel pour le nécrotrophisme, qui est le mode de vie permettant l'utilisation des ressources de l'hôte mort pour la croissance, appartient également au régulon de PlcR (Slamti et al., 2014). Il est également impliqué dans l'inhibition de la sporulation permettant à la bactérie d'assimiler

Introduction bibliographique-Chapitre2.

le maximum de nutriments disponibles dans le cadavre de l'hôte. Ce double rôle de NprR semble nécessaire pour activer le processus irréversible de sporulation seulement dans les bactéries qui ont activé le nécrotrophisme (Perchat et al., 2016).

Dans le cycle de vie de l'entomopathogène *B. thuringensis* du groupe *cereus*, le régulateur PlcR active la virulence pendant la phase de l'infection de l'hôte. Ensuite le régulateur NprR permet de commuter entre le nécrotrophisme et la sporulation permettant la dissémination des spores pour infecter des nouveaux hôtes (Dubois, 2012). Le régulon de NprR-NprX active l'expression de 41 gènes dont ceux codant pour des enzymes nécessaires à la dégradation de tissus de l'hôte mort ou des métalloprotéases sécrétées (Perchat et al., 2016 ; Dubois et al., 2019). L'étude structurale de ce régulateur montre qu'en absence de sa phéromone associée NprX, le senseur NprR en forme apo est un dimère qui fonctionne comme une protéine Rap en déphosphorylant le RR Spo0F-P. Ainsi, ce contrôle contribue à la diminution du seuil de concentration de RR Spo0A-P nécessaire pour l'activation de la sporulation. Le rôle antagoniste de la sporulation de NprR est contrôlé par son association à sa phéromone NprX qui induit la tétramérisation de NprR et le couple NprR-NprX devient un régulateur transcriptionnel (Perchat et al., 2016). La Figure 16 résume l'intervention des différents mécanismes de QS contrôlés par des régulateurs RRNPP dans le cycle d'infection de larves par *B. thuringensis*.

L'analyse phylogénétique des différentes séquences de PlcR et de NprR parmi les bacilli a montré qu'il existe un polymorphisme au sein de ces membres. Dans les deux cas, le polymorphisme des régulateurs a co-évolué avec celui des phéromones qui leurs sont associées. Cela a mené au partitionnement des régulateurs PlcR associés à leurs phéromones PapR en quatre groupes et du couple NprR/NprX en sept groupes. Chacun de ces groupes est appelé un phérotypé (Slamti and Lereclus, 2005 ; Perchat et al., 2011a). Les phéromones d'un phérotypé donné sont spécifiques aux régulateurs de ce même phérotypé. Dans certains cas, les interférences ou « cross-talk » sont possibles entre certains phérotypes. Par exemple les PlcR de groupe II et III peuvent être activés par les phéromones du groupe I et IV (Slamti and Lereclus, 2005 ; Perchat et al., 2011b).

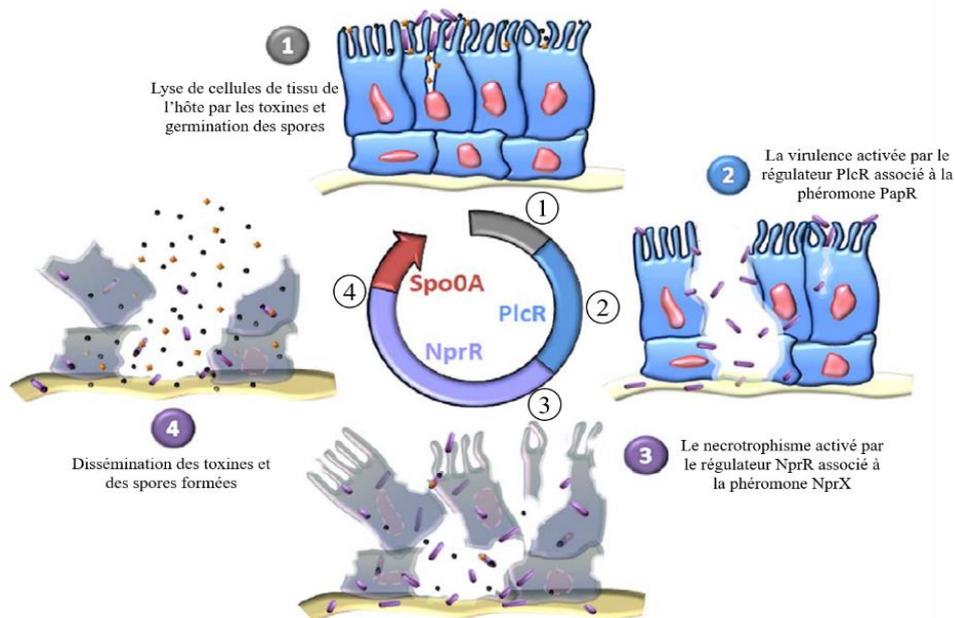


Figure 16. Les senseurs cytoplasmiques PlcR et NprR dans le cycle de vie de *B. thuringiensis* dans l'infection l'hôte. A la suite de l'infection des tissus par les bactéries (1), le régulateur PlcR active l'expression des gènes de virulence en conséquence à la liaison de la phéromone associée PapR (2). Pour croître dans les tissus du cadavre de l'hôte, le régulateur NprR associé à la phéromone NprX active les gènes de nécrotrophisme (3). Enfin le processus de sporulation est activé par le régulateur Spo0A-P qui voit sa concentration augmenter par l'effet agoniste des phéromones associant à Rap et à NprR. Modifié à partir de Dubois, 2012.

2.4.2.2.3. Le régulateur PrgX contrôlant la conjugaison chez les entérocoques

Chez *E. faecalis*, une bactérie commensale du tube digestif de l'Homme, la conjugaison permettant le transfert horizontal de gènes au sein de l'espèce par des plasmides conjuguatifs est contrôlée par des régulateurs transcriptionnels de la famille PrgX (Cook and Federle, 2014). Contrairement aux autres mécanismes de QS décrits dans lesquels le signal est détecté par la cellule qui l'a produit, la conjugaison se fait entre deux populations distinctes. En effet, les cellules portant les plasmides conjuguatifs appelées donneuses sont aptes à détecter le signal tandis que celles privées du plasmide qui sont les receveuses peuvent seulement produire le signal. Pour la suite, le mécanisme de transfert par la conjugaison sera illustré avec le plasmide conjuguatif pCF10 portant le gène de résistance à l'antibiotique tétracycline

Introduction bibliographique-Chapitre2.

même si celui d'autres plasmides tels que ceux de pAD1 et pAM373 sont aussi décrits dans la littérature, (Dunny, 2007; Chen et al., 2017).

Lorsque les cellules donneuses et receveuses sont présentes à proximité, les phéromones matures de conjugaison cCF10 sont internalisées par le transporteur Opp associé des cellules donneuses. En bref, le régulateur PrgX sous forme apo et tétramérique réprime l'expression de ses gènes cibles nécessaire à la conjugaison. A la suite de son association avec la phéromone cCF10, le changement de conformation déstabilise le tétramère vers deux dimères de PrgX levant la répression exercée par PrgX sur l'expression des gènes de conjugaison (Cook and Federle, 2014). Un mécanisme allostérique alternatif proposé suggère que la liaison de la phéromone cCF10 induit un changement conformationnel subtil au niveau du tétramère de PrgX permettant l'activation de l'expression de ses gènes cibles (Chen et al., 2017). Pour empêcher l'activation de conjugaison par une autodétection de la phéromone produite par les cellules donneuses, différents mécanismes de contrôle sont mis en place par la bactérie. Un des mécanismes met en jeu des phéromones inhibitrices. En effet, les cellules donneuses produisent des anti-phéromones de conjugaison, iCF10, codé par un petit gène du plasmide, qui sont également détectées par le régulateur PrgX. L'association de cette phéromone inhibitrice stabilise la forme tétramérique du régulateur et ainsi donc la répression des gènes cibles. En d'autres termes le ratio entre iCF10 et cCF10 détermine l'activation de la conjugaison. La Figure 17 détaille le mécanisme de conjugaison du plasmide pCF10 activé par le régulateur transcriptionnel PrgX dans une cellule donneuse.

Ce chapitre résume les différentes étapes du QS chez les bactéries à Gram-positif qui sont globalement conservées. Comme nous l'avons vu, chaque étape possède cependant ses spécificités en fonction des senseurs et des phéromones considérées. Ainsi, la généralisation des mécanismes même au sein de la même famille des régulateurs est complexe. Le chapitre suivant sera consacré à une bactérie à Gram-positif, *S. thermophilus* qui a servi de modèle pour le projet.

Introduction bibliographique-Chapitre2.

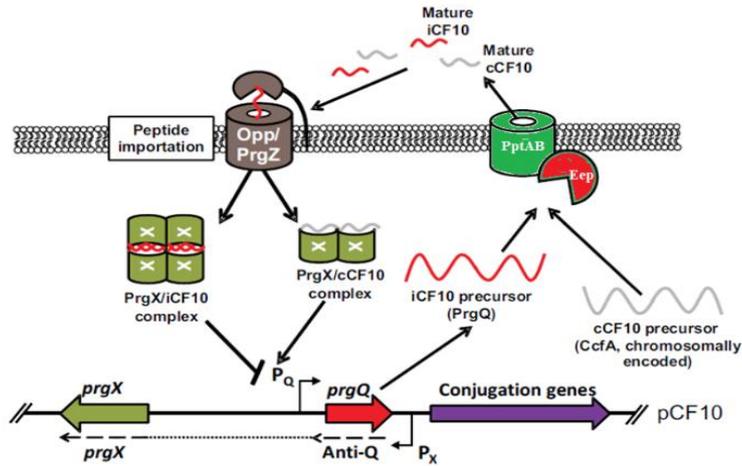


Figure 17. Le mécanisme de conjugaison dans la cellule donneuse du plasmide pCF10 chez *E. faecalis*. Le régulateur PrgX lie les phéromones cCF10 et iCF10, la première étant codée par le chromosome et la deuxième par le plasmide. Ces phéromones avec des effets opposés sur la conjugaison sont maturées en partie par la protéase Eep. La phéromone cCF10 est sécrétée par le transporteur PptAB. Dans la cellule donneuse, l'association avec l'inhibiteur de la conjugaison iCF10 stabilise la forme tétramérique de PrgX ainsi inhibe la transcription des gènes de conjugaison. La transcription du gène prgX codant le régulateur à partir de promoteur P_x produit également un ARN anti-sens, Anti-Q, inhibant la production de l'anti-phéromone iCF10. Lorsque la ratio cCF10 / iCF10 est élevé, la phéromone cCF10 se lie au régulateur PrgX et déstabilise le tétramère ainsi permettant la transcription des gènes de conjugaison de l'opéron prgQ par l'ARN pol. .D'après Cook and Federle, 2014.

Points Clés

- ✓ Les phéromones sont issues de biosynthèse ribosomale à partir du peptide signal de lipoprotéines parfois ou des petits gènes souvent.
- ✓ Une généralité sur les acteurs de sécrétion et de maturation est difficile à établir et ces étapes restent à élucider selon les systèmes étudiés. Les acteurs dédiés ou généraux peuvent contribuer à la sécrétion et à la maturation des phéromones selon la détection d'un peptide signal spécifique ou classique. En revanche, un transporteur de la famille ABC et une protéase membranaire participent à la sécrétion et à la maturation de certaines phéromones sans peptide signal. Nous contribuerons à mieux comprendre la sécrétion des phéromones détectées en intracellulaire dans le modèle bactérien de ce projet.
- ✓ Les phéromones matures sont détectées soit en extracellulaire par les TCS ou en intracellulaire par les senseurs cytoplasmiques de la famille RRNPP précédée par la re-internalisation des phéromones par le transporteur d'oligopeptides Opp.
- ✓ La famille des senseurs cytoplasmiques RRNPP partagent une structure commune avec liaison de la phéromone mature à leurs domaine TPR en région C-terminale. Le mécanisme d'activation ainsi que les fonctions biologiques contrôlées sont dépendants du couple étudié.
- ✓ Les facteurs et les acteurs contribuant à l'arrêt des mécanismes activés par la détection des phéromones nécessitent encore des études pour combler les lacunes dans ce domaine.

Chapitre 3. Le cycle de vie des phéromones chez *Streptococcus*

thermophilus

A la suite de la description générale du mécanisme de QS chez les bactéries à Gram-positif, je terminerai l'introduction bibliographique en présentant le modèle de bactérie utilisé dans ce projet, *Streptococcus thermophilus*. Ensuite, je détaillerai deux mécanismes de QS. Le premier est contrôlé par une phéromone SHP associée au régulateur Rgg impliqué dans la production du streptide qui est un peptide cyclique modifié dont la fonction biologique reste à identifier. Le second est le mécanisme de la compétence fonctionnant de manière similaire avec la phéromone ComS associé à son régulateur cytoplasmique ComR. Ces descriptions permettront de présenter la problématique de ce projet : comment les phéromones sont-elles sécrétées dans cette espèce ?

3.1. Les bactéries lactiques contenant le genre *Streptococcus*

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de bactéries à Gram-positif, non-sporulantes, immobiles, à faible taux de GC dans la composition de leur ADN (<50% de GC), tolérantes à l'acide donc à de faibles pH. Elles peuvent être sous forme de bâtonnets ou de coques et sont impliquées dans différents processus de fermentation permettant la conversion des sucres en gaz et/ou en acide et/ou en alcool. La production d'acide lactique à partir de carbohydrate est la fonction principale de ces bactéries permettant de les regrouper au sein d'un même groupe. Les bactéries lactiques appartiennent aux différents ordres et genres tels que *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* de l'ordre Lactobacillales (Salminen and Wright, 2004). La Figure 18 représente le groupe hétérogène des bactéries lactiques. Elles sont omniprésentes dans différents habitats naturels tels que le sol, les plantes en décomposition et les animaux. Chez ces derniers, elles sont présentes dans les cavités orales, vaginales, le tractus digestif et dans le lait. Parmi ces

Introduction bibliographique-Chapitre3.

bactéries, certaines sont des bactéries pathogènes strictes et d'autres des bactéries commensales et/ou saprophytes pouvant devenir des pathogènes opportunistes selon les conditions de leurs environnements. Les espèces reconnues pour leur innocuité sont exploitées par l'Homme pour la fabrication des produits fermentés (Schleifer et al., 1995 ; Salminen and Wright, 2004 ; Bintsis, 2018).

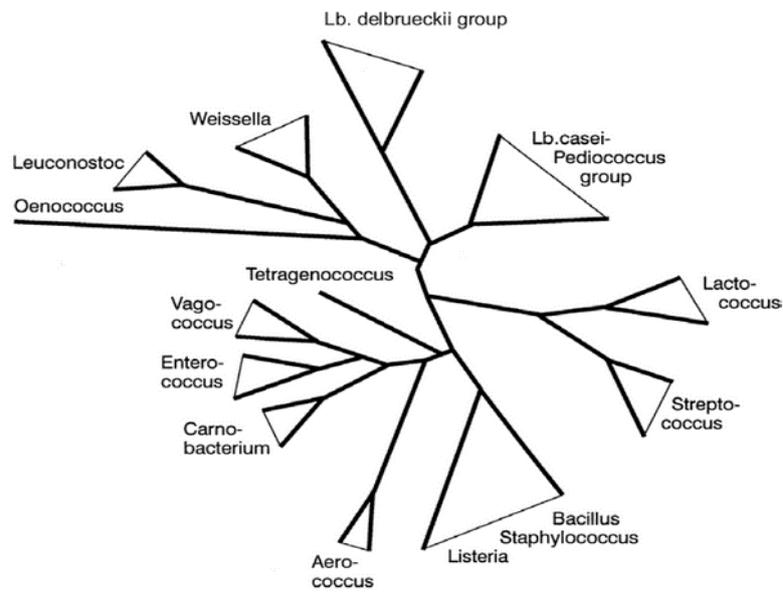


Figure 18. Classification des bactéries lactiques sur la base de leur ARN 16S. Extrait de Salminen and Wright, 2004.

3.2. Exploitation des bactéries lactiques dans la fermentation des aliments

Comme déjà dit, le métabolisme commun des bactéries lactiques est la fermentation des sucres. Cette fermentation est homolactique si l'acide lactique est le produit principal de la réaction. Dans le cas de la fermentation hétérolactique, les produits principaux sont l'éthanol et/ou l'acide acétique, l'acide formique et le dioxyde de carbone (Bintsis, 2018). L'acide lactique, à l'issue de ces réactions, sert à acidifier la matrice alimentaire et la protège ainsi de la contamination par d'autres microorganismes. Ces bactéries contribuent également à l'amélioration de la texture et au développement des propriétés organoleptiques des aliments fermentés par les métabolites produits. L'utilisation des bactéries lactiques dans la fermentation des aliments tels que les produits laitiers, les viandes et les légumes et également pour la production du vin ou du cidre est incontournable. Plusieurs espèces de bactéries lactiques

Introduction bibliographique-Chapitre3.

utilisées dans la fermentation des produits alimentaires bénéficient du statut de « Generally Recognized As Safe » (GRAS) par la « Food and Drug Administration » (FDA) américaine ou remplissent les critères de « Qualified Presumption of Safety » (QPS) par la « European Food Safety Authority » (EFSA) à l'échelle européenne témoignant leur innocuité pour la consommation par l'Homme. Dans le genre *Streptococcus* appartenant aux bactéries lactiques, *Streptococcus thermophilus*, un ferment lactique étudié dans ce projet, est la seule espèce reconnue pour son innocuité et donc GRAS ou QPS (Delorme, 2008). Après avoir décrit quelques généralités sur le genre *Streptococcus*, je développerai les généralités et les spécificités de *S. thermophilus* avant d'exposer deux mécanismes distincts de QS étudiés chez ce modèle.

3.3. Généralités sur les streptocoques

Le genre *Streptococcus* regroupe plusieurs espèces de bactéries à Gram-positif comprenant des commensaux, des saprophytes et un ferment lactique. Les streptocoques commensaux appartenant à la flore de l'oropharynx ou intestinale peuvent devenir des pathogènes dans certaines conditions donc sont des pathogènes opportunistes. En 1874, un chirurgien autrichien Theodor Billroth donne le nom « streptococcus » d'origine grecque avec « *streptos* » pour « chaîne » et « *coccus* » pour « baie » (Majno and Joris, 1979). Les streptocoques sont des coques qui s'observent en paire appelé « diplocoques » ou en chaînes de taille variable. Ils sont également immobiles et non-sporulants. Quant à la tolérance à l'oxygène donc au type respiratoire de ce genre, la majorité est tolérante donc anaérobie facultative mais certains pathogènes sont intolérants on parle alors d'anaérobies stricts. Une autre caractéristique biochimique est d'être négatif au test catalase qui est l'enzyme permettant la réduction du composé toxique produit par la bactérie, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), en eau et oxygène. La croissance optimale de ces bactéries nécessite un milieu riche en nutriments donc avec des sources de carbone et d'azote (Hardie and Whiley, 1997).

Introduction bibliographique-Chapitre3.

3.4. Classification des différentes espèces de streptocoques

Les méthodologies pour distinguer les différentes espèces du genre *Streptococcus* ont continué d'évoluer avec les différentes approches utilisées par les cliniciens, les biochimistes et les biologistes moléculaires. En effet, la morphologie des colonies, l'hémolyse, les réactions biochimiques et la sérologie ont été utilisées pour la classification. D'abord le test hémolyse (1903) permettait de classer les streptocoques selon leur capacité à lyser ou pas l'hémoglobine, suivi par des tests phénotypiques les classant par rapport à leur tolérance à certains produits biochimiques donnés et enfin les tests sérologiques (1933) permettaient de subdiviser les streptocoques selon la présence ou l'absence d'un antigène lié à un polysaccharide de la paroi. Une classification en quatre sous-divisions combinant toutes ces méthodes (1937) n'a pas été totalement conservée par les approches moléculaires qui ont suivi. L'approche moléculaire par l'analyse des séquences de ARNr 16S, de séquences des gènes de ménage donnés combiné aux caractéristiques phénotypiques, a permis de reclasser les streptocoques au sein de sept groupes avec le groupe pyogenic, qui a été conservé, et le groupe viridans réparti en cinq nouveaux groupes : anginosus, bovis, mitis, mutans et salivarius et certaines espèces non-groupées (Kawamura et al., 1995 ; Facklam, 2002 ; Póntigo et al., 2015). Les caractéristiques de certaines espèces de ces groupes impliquées dans les infections bénignes ou sévères chez l'Homme sont résumées dans le Tableau 3 (Richards et al., 2014 ; Póntigo et al., 2015). La Figure 19 illustre les sept sous-groupes du genre *streptococcus*.

Tableau 3. Caractères pathogènes de certains streptocoques opportunistes de l'Homme.

Commensaux	Pathogénicités	Colonisation
<i>S. pyogenes</i>	Pharyngite, impétigo, angine, bactériémie, infections cutanée nécrosante, méningite, puerpéral sepsis, choc toxique, scarlatine, glomérulonéphrite, fasciite nécrosante, fièvre rhumatismale	Peau, Flore de nasopharynx
<i>S. agalactiae</i>	Pneumonie, méningite et septicémie chez les adultes et nouveau-nés	Voies digestives, Voies génito-urinaires
<i>S. mutans</i>	Carie dentaire	Flore de la cavité buccale
<i>S. pneumoniae</i>	Otite moyenne, sepsis, méningite, pneumonie	Flore de nasopharynx
<i>S. salivarius</i>	Bactériémie, endocardite, méningite	Flore buccale

Introduction bibliographique-Chapitre3.

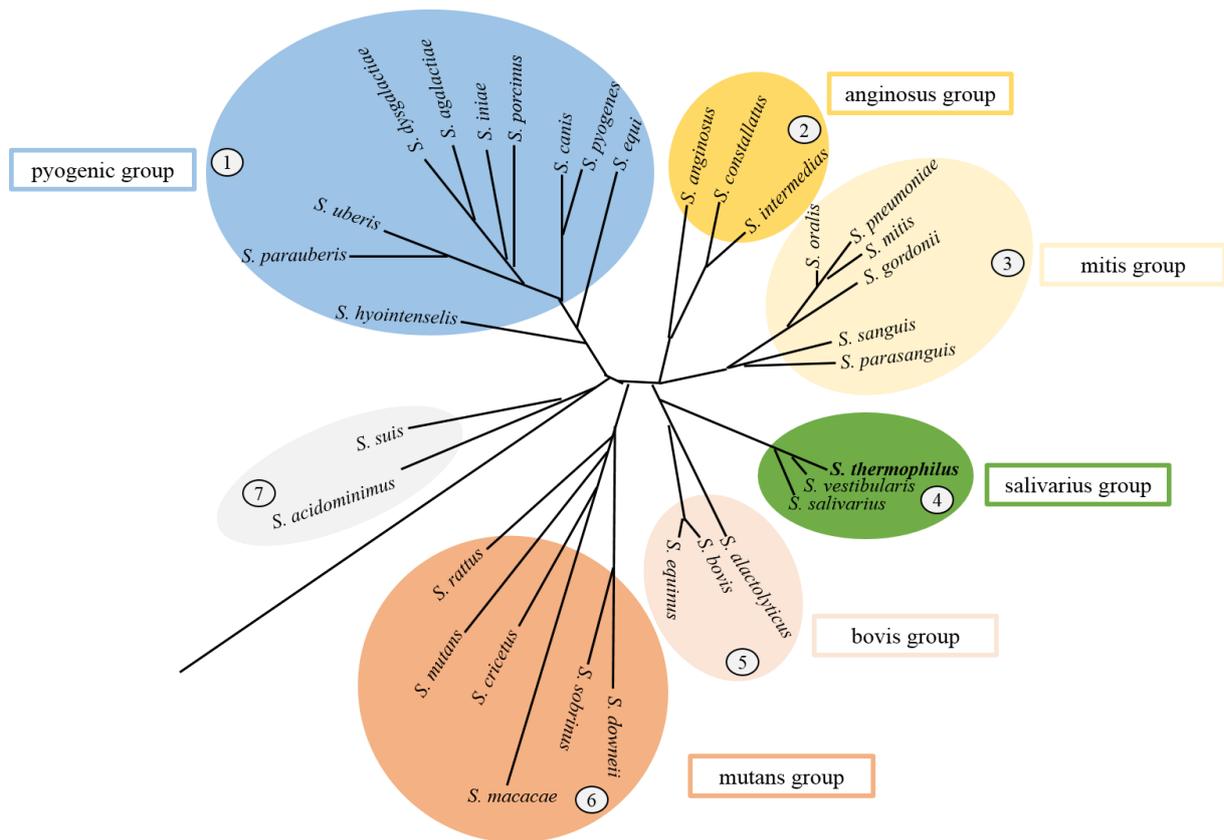


Figure 19. Regroupement des espèces du genre streptococcus selon la phylogénie et les caractéristiques phénotypiques. Le groupe pyogenic contient les streptocoques β -hémolytiques telles que *S. pyogenes* et *S. agalactiae*. Les cinq autres groupes sont issus de la division du groupe *Streptococcus viridans*. *S. thermophilus* (en gras) du groupe salivarius est la seule espèce avec le statut GRAS. Le septième groupe contient les streptocoques non-classées. D'après Kawamura et al., 1995.

3.5. *S. thermophilus* ou le seul ferment lactique des streptocoques

S. thermophilus avec « *thermophilus* » d'origine grecque pour « aime la chaleur » a été décrit par Orla-Jensen en 1919 en tant que sous-espèce de *S. salivarius*. Son nom reflète sa capacité à croître à des températures élevées, jusqu'à 50° C, avec une capacité de survie à 60° C pendant 30 min à la différence des autres streptocoques mésophiles qui ne poussent qu'à des températures modérées (20° à 40° C). Il a été promu au statut d'espèce à part entière suite aux travaux d'hybridation d'ADN-ADN. Il croît sous forme d'ovoïde de diamètre de 0,7 à 1 μm en chaînettes en anaérobie mais il est tolérant au dioxygène donc, anaérobie facultatif (Schleifer et al., 1991 ; Schleifer et al., 1995). La Figure 20 illustre les chaînettes de *S. thermophilus*.

Introduction bibliographique-Chapitre3.

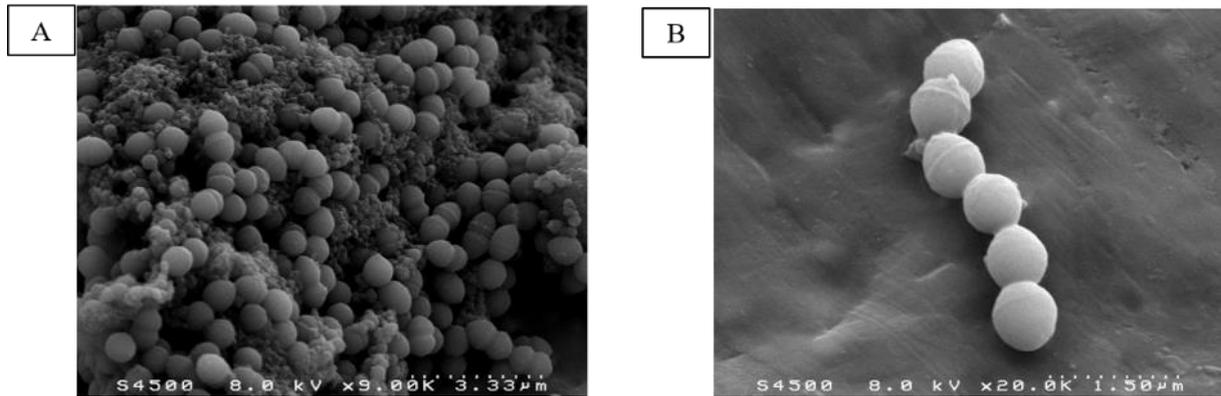


Figure 20. L'image de microscope électronique à balayage de la souche LMD-9 de *S. thermophilus*. Croissance dans le lait avec une résolution X9000 (image A) et X20000 (image B). Source T. Meylheuc. MIMA2.

Après *Lactococcus lactis*, *S. thermophilus* est la deuxième espèce la plus utilisée dans l'industrie laitière (Bintsis, 2018). En France, un lait fermenté peut bénéficier de l'appellation yaourt si et seulement si les bactéries de *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* et de *S. thermophilus* ont été utilisées en association comme ferment pour déclencher la fermentation. Ces deux espèces sont connues pour co-exister dans le lait et interagir de manière bénéfique en échangeant des métabolites ou peptides d'intérêt. Ce fonctionnement appelé « protocoopération » a un intérêt industriel (Tamime and Robinson, 1999) en améliorant la qualité du yaourt produit. En 2015, le marché global du yaourt atteignait 65 milliards \$ (USD) (Rul, 2017). Ainsi, la compréhension du fonctionnement de *S. thermophilus* a un grand intérêt économique pour l'industrie laitière. La niche écologique naturelle de *S. thermophilus* est le lait (Delorme, 2008). *S. thermophilus* est connu pour la conversion rapide du lactose, sucre principal du lait, en acide lactique contribuant à la diminution rapide de pH. *S. thermophilus* est aussi capable de produire des métabolites aromatiques contribuant à l'amélioration organoleptique (goût, flaveur, odeur) (Rhim et al., 2010 ; Rul, 2017). Le lait étant pauvre en acides aminés (AA) libres, l'hydrolyse des protéines du lait appelées caséines par les exopeptidases et l'internalisation des peptides sont essentielles pour la croissance de la bactérie (Charbonnel et al., 2004). Certaines souches de *S. thermophilus* dépourvues de la protéase de paroi, PrtS, nécessaire à cette hydrolyse, peuvent croître dans le lait en co-culture avec d'autres espèces telles que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus* ou

Introduction bibliographique-Chapitre3.

Lactococcus lactis possédant les exopeptidases (Dandoy et al., 2011). A l'issue de cette hydrolyse, l'internalisation des peptides est essentielle pour l'assimilation de cette source azotée. Donc, le système de transport à oligopeptides Opp appelé Ami chez *S. thermophilus* est indispensable pour sa croissance optimale dans le lait. Les gènes codant pour ce transporteur sont organisés en opéron *amiA1BCDF*. Ce transporteur est composé de cinq sous-unités avec la protéine liant le substrat (SBP) AmiA1, la perméase formée par AmiBC et les sous-unités ATPasiques AmiDF. Certaines souches peuvent avoir une ou deux copies supplémentaires de gènes codant des SBP annotés *amiA2* et *amiA3* par homologie au gène *amiA1* (Garault et al., 2002). Plusieurs souches produisent les exopolysaccharides (EPS) qui contribuent à la texture et aux propriétés rhéologiques du yaourt (Wu and Shah, 2018). *S. thermophilus* est également utilisé seul ou en association avec d'autres lactobacilles dans la production du lait fermenté ou de certains fromages tels que la mozzarella, la feta et le cheddar et de fromages à pâte pressée cuite (ex. l'emmental, le gruyère, types de parmigiano ou grana etc) (Delorme, 2008 ; Bintsis, 2018).

En plus de l'intérêt pour l'industrie laitière, *S. thermophilus* est aussi connu pour ses propriétés probiotiques en culture avec d'autres espèces dans le yaourt (Kolars et al., 1984 ; Liu et al., 2010 ; Rul, 2017). Par définition un probiotique est un micro-organisme vivant avec un effet bénéfique pour la santé. De nos jours, l'aspect « outil biotechnologique » de *S. thermophilus* pour produire des protéines hétérologues d'intérêt médical ou bénéfiques pour la santé commence à être exploré. Même si la réglementation européenne d'aujourd'hui ne permet pas la consommation des organismes génétiquement modifiés (OGM) par l'Homme, la capacité de *S. thermophilus* à survivre dans le tractus intestinal lui donne un statut de vecteur potentiel émergent pour livrer des produits bénéfiques pour la santé par l'alimentation (Lecomte et al., 2016).

3.6. Evolution des génomes de *S. thermophilus*

D'après le NCBI, le génome de 30 souches de *S. thermophilus* a été séquencé dont deux souches portant un ou deux plasmides (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Le taux de GC est faible, entre 36,8 et

Introduction bibliographique-Chapitre3.

39%, en accord avec celui des bactéries lactiques. La taille de son génome de 1,8 Mb est la plus petite parmi les bactéries lactiques (Bintsis, 2018). Les études de comparaison de génomes montrent que l'espèce *S. thermophilus* a suivi une évolution régressive par rapport à ses espèces proches. La perte des déterminants de pathogénicité présents chez les autres espèces de streptocoques serait parvenue pendant la domestication de l'espèce. Le génome riche en pseudogènes (10%) témoigne également d'une perte de fonctions non-essentiels corrélée avec la simplification du métabolisme en s'adaptant à sa niche écologique (Bolotin et al., 2004; Hols et al., 2005). Tous les génomes séquencés contiennent un génome de base appelés core-génome. Il existe aussi des gènes accessoires spécifiques à certaines souches et des gènes uniques à une souche donnée. La somme de l'ensemble de tous ces gènes appelés pangénome semble fermé chez *S. thermophilus*. En d'autres termes, le séquençage du génome de nouvelles souches n'augmente pas la taille du pangénome. En effet, l'analyse du génome de 29 souches témoigne d'une grande conservation des gènes parmi les souches séquencées (Alexandraki et al., 2019). La biodiversité au sein de différentes souches a été évaluée avec des méthodes moléculaires tels que RAPD-PCR (Random amplification of polymorphic DNA-PCR), PFGE (pulse-fields electrophoresis) ou MLST (multi locus sequence typing) qui comparent la séquence nucléotidique d'un nombre donné de gènes de ménage. Ces méthodes n'ont pas permis de montrer une grande distinction entre les souches. Plus récemment une méthode de MLST plus optimisée et une comparaison génomique ont permis de mieux séparer les souches en différents clusters (Delorme et al., 2017 ; Alexandraki et al., 2019). Parmi les éléments contribuant à distinguer les différentes souches se trouvent les systèmes d'immunité permettant d'être compétitif vis-à-vis de l'intrusion d'éléments étrangers tels que les phages ou l'ADN (système de CRISPR-CAS9 ou systèmes de restriction-modification). Les traits technologiques acquis souvent par le transfert horizontal lors de rencontres avec des espèces proches dans sa niche écologique telles que la protéase PrtS ou la capacité à synthétiser des EPS varient selon les souches. L'auxotrophie en AA qui est la capacité de biosynthèse d'AA essentiels est également souche dépendante (Hols et al., 2005 ; Alexandraki et al., 2019).

Introduction bibliographique-Chapitre3.

3.7. Mécanismes de quorum sensing chez *S. thermophilus*

3.7.1. La production du streptide contrôlée par le mécanisme Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈

L'identification des petits gènes (sORFs) codant pour des peptides par l'expérimentation ou *in silico* est très complexe. Pourtant l'intérêt des petits peptides souvent codés par des petits gènes dans la communication bactérienne est bien connu (Partie 2.1). En 2007, l'utilisation d'un outil bio-informatique appelé « SHOW » (Nicolas et al., 2002) adapté à l'annotation des petits gènes a permis d'identifier une nouvelle famille de séquences codant des peptides de 20 à 30AA de nature hydrophobe donc appelé « Short hydrophobic peptide » (SHP) dans les génomes de streptocoques. Ces petits gènes sont adjacents à des gènes *rgg* codant des régulateurs transcriptionnels de la famille Rgg (Ibrahim et al., 2007a). Ce régulateur initialement identifié chez *Streptococcus gordonii* pour contrôler la transcription d'un gène codant une glycosyltransférase était considéré comme fonctionnant de manière autonome (Sulavik et al., 1992).

La validation fonctionnelle de cette nouvelle famille de peptide-régulateur a été fournie par la même équipe. En effet, il a été montré qu'une phéromone appelée SHP₁₃₅₈ codée par un petit gène, *shp1358*, est synthétisée sous forme de précurseur. La protéase Eep mature la phéromone et le transporteur Ami re-internalise la phéromone mature. A forte densité cellulaire, la phéromone mature SHP₁₃₅₈ est détectée par son régulateur cytoplasmique Rgg₁₃₅₈ dont le gène est adjacent au sORF *shp1358*. Cette association mène à l'activation de la production d'un peptide cyclique appelé Pep1357c dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus*. Dans le cycle de vie de cette phéromone, le transporteur impliqué dans la sécrétion ainsi que l'ordre entre les étapes de la maturation et de la sécrétion restent à identifier. Concernant la fonction de ce mécanisme de QS, la détection de ce peptide cyclique de 9 AA aussi appelé streptide de séquence AKGDGWKVM dans le surnageant de la souche LMD-9, a permis de mettre en évidence une modification post-traductionnelle originale impliquant une lysine et un tryptophane et est décrite pour la première fois (Ibrahim et al., 2007b ; Fleuchot, 2011). Même si la fonction biologique de ce streptide

Introduction bibliographique-Chapitre3.

reste à identifier, sa structure cyclique unique catalysée par une enzyme de la famille S-adenosyl Méthionine (SAM) connue pour un large éventail de réactions a donné naissance à une nouvelle famille de peptides avec le motif de cyclisation KXXXW réparti dans plusieurs espèces bactériennes telles que *L. lactis*, *S. agalactiae*, *Streptococcus suis* (Ibrahim et al., 2007b ; Schramma et al., 2015). Depuis, plusieurs petits peptides synthétisés par les ribosomes et modifiés par des enzymes à radical SAM ont été décrits. L'intérêt pour l'identification des structures et des fonctions de ces peptides « naturels » regroupés au sein d'une famille appelé RiPPS pour « ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides » ne cesse de grandir. La recherche de molécules naturelles à effet bactéricide ou à effet bénéfique pour la santé est un des moteurs qui ne cesse d'agrandir cette famille (Arnison et al., 2013 ; Holliday et al., 2018; Merwin et al., 2020). La Figure 21 illustre le mécanisme de QS de Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈.

L'analyse phylogénétique des régulateurs Rgg a montré qu'ils sont retrouvés chez les firmicutes mais les régulateurs Rgg associés aux SHP se trouvent principalement dans le genre streptococcus (Fleuchot, 2011). La Figure 22 illustre cet arbre phylogénétique. L'analyse phylogénétique des protéines Rgg a identifié trois groupes distincts parmi les régulateurs Rgg/SHP. Les SHP associés aux Rgg de groupe I et de groupe II ont généralement un glutamate et une aspartate conservés respectivement avec une position divergente entre les gènes de *shp* et de *rgg*. Tandis que les SHP associés aux Rgg de groupe III ont soit un glutamate soit un aspartate conservés et le gène *shp* est situé en aval du gène *rgg* (Ibrahim et al., 2007a ; Fleuchot, 2011). Parmi les génomes de streptocoques séquencés, la majorité code au moins un système SHP/Rgg et la plupart en code plusieurs exemplaires. Dans le génome de la souche LMD-9 de *S. thermophilus* six systèmes de Rgg/SHP ont été identifiés et deux ont été étudiés et validés selon le modèle décrit sur la Figure 21. Ce sont les systèmes Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ du groupe II décrit plus haut et le système Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ du groupe III (Ibrahim et al., 2007b ; Fleuchot, 2011 ; Fleuchot et al., 2013).

Introduction bibliographique-Chapitre3.

D'autres systèmes ont ensuite été étudiés chez des streptocoques pathogènes comme les systèmes SHP₂/Rgg₂ et SHP₃/Rgg₃ avec des effets antagonistes sur la formation de biofilms chez *S. pyogenes* et SHP/RovS impliqué dans la pathogénicité chez *S. agalactiae*. Les mécanismes sont tout à fait similaires à ceux décrits chez *S. thermophilus* (Chang et al., 2011 ; LaSarre et al., 2012 ; Pérez-Pascual et al., 2015).

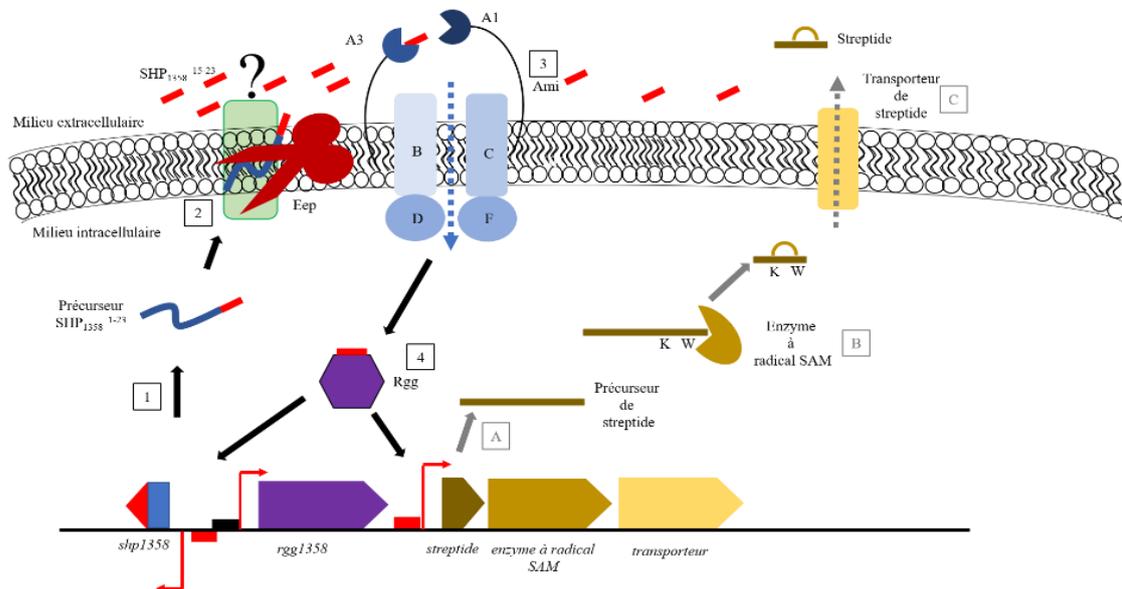


Figure 21. Le mécanisme de QS contrôlé par Rgg1358/SHP1358. La phéromone SHP1358 synthétisée sous forme de précurseur (1) est maturée par la protéase Eep et sécrétée vers le milieu par un mécanisme inconnu (2). A la suite de sa re-internalisation par le transporteur Ami (3), la phéromone mature est détectée par son régulateur Rgg1358 (4). Le couple Rgg/SHP active l'expression du gène shp et des trois gènes cibles avec la région promotrice en rouge. Ce mécanisme de QS active la production de streptide sous forme de précurseur linéaire (A) qui sera cyclisé entre une lysine et un tryptophane par l'enzyme à radical SAM (B) pour être sécrété (C) par le transporteur dédié. D'après Fleuchot, 2011.

Introduction bibliographique-Chapitre3.

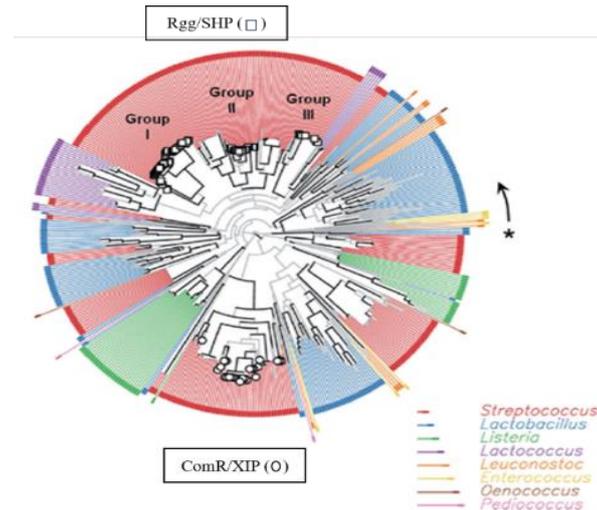


Figure 22. L'arbre phylogénétique de protéines Rgg parmi les firmicutes. La famille des Rgg associés aux phéromones SHP est divisée en trois groupes. La famille des régulateurs ComR associés aux phéromones XIP fonctionnant de manière similaire aux régulateurs Rgg appartient à une branche indépendante de l'arbre phylogénétique. D'après Fleuchot, 2011.

La résolution de la structure de forme apo d'un régulateur Rgg a montré une organisation similaire à celle des autres régulateurs transcriptionnels de la famille RNPP avec un domaine de liaison à l'ADN en région N-terminale et un domaine TPR en région C-terminale confirmant l'appartenance des Rgg à la famille structurale des RRNPP. L'absence de structure de complexe binaire (Rgg/phéromone) ou ternaire (Rgg/phéromone/ADN) ne permet pas la compréhension du mécanisme d'activation de ce type de régulateur (Parashar et al., 2015).

3.7.2. Cross-activation ou communication inter-espèces par les SHP

Le nombre important de systèmes de Rgg/SHP similaires parmi des espèces différentes de streptocoques légitime la question d'une éventuelle activation croisée de ces systèmes ou « cross-activation » contribuant à la communication inter-espèces. En effet, certaines séquences prédites de SHP matures se révèlent identiques entre différentes espèces. Une étude de cross-talk entre quatre systèmes étudiés dont deux issus de la souche LMD-9 de *S. thermophilus*, un de *S. agalactiae* et un de *S. mutans* a montré que l'interaction est très spécifique entre la phéromone SHP associé à son régulateur Rgg dans une même

Introduction bibliographique-Chapitre3.

souche. Dans certaines conditions, une cross-activation d'un système par un SHP d'une espèce voisine est possible même s'il est à noter que les quatre systèmes ont été étudiés dans *S. thermophilus* avec des peptides synthétiques. (Fleuchot et al., 2013). La Figure 23 décrit le résultat clé donnant cette conclusion. Les études de co-culture montrant une éventuelle communication inter-espèces et les études sur la cross-activation intra-espèces par les phéromones SHP similaires manquent dans la littérature pour analyser la communication inter-espèces au sein d'une matrice complexe.

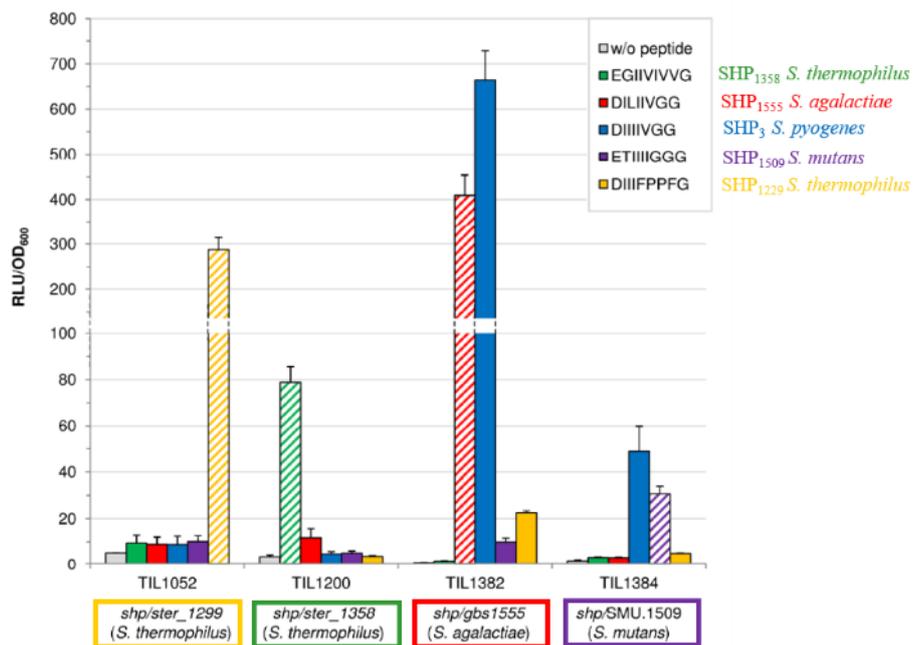


Figure 23. Etude de cross-talk entre les systèmes Rgg/SHP de streptocoques. Ce graphe montre le niveau maximal de luminescence mesurée pour chaque système Rgg/SHP grâce aux fusions transcriptionnelles exprimant les gènes *luxAB* codant une luciférase sous le contrôle de la région promotrice d'un gène *shp*. La luminescence relative (RLU/OD600) a été mesurée pour quatre systèmes en absence (gris) ou en présence de différents peptides synthétique SHP dans le milieu. Les histogrammes sont hachurés lorsque la phéromone synthétique correspond au SHP associé au système étudié. D'après Fleuchot et al., 2013.

3.7.3. Le système ComR/ComS dans l'activation de la compétence naturelle

Une étude protéomique comparant la souche sauvage à une souche délétée des gènes codant le transporteur Ami, a permis d'identifier le rôle indispensable de ce transporteur et ainsi que les conditions permissives pour l'activation de la compétence naturelle (Gardan et al., 2009). Ensuite, le mécanisme impliquant une famille de régulateur ComR associé aux phéromones ComS aussi appelé XIP (ComX/

Introduction bibliographique-Chapitre3.

Sig-X inducing peptide) a été démontré (Fontaine et al., 2010 ; Fontaine et al., 2013 ; Gardan et al., 2013). Cette famille de régulateurs avec des caractéristiques de Rgg-like fonctionne avec un mécanisme similaire à la famille Rgg/SHP (Figure 22) (Fontaine et al., 2010 ; Fleuchot, 2011).

La compétence est activée par la phéromone XIP issue de la maturation de précurseur ComS par la protéase Eep, réinternalisée par le transporteur Ami et détectée en intracellulaire par le régulateur ComR. Le couple ComR/ComS contrôle la compétence en activant l'expression des gènes précoces tels que le gène *comX* codant pour le facteur sigma de la compétence ComX qui active à son tour 135 gènes appelés gènes tardifs. Parmi ces cibles se situent les gènes codant les protéines formant le complexe multi-protéique appelé la transformasome nécessaire pour la compétence (Gardan et al., 2009 ; Fontaine et al., 2010 ; Boutry et al., 2012 ; Gardan et al., 2013). La fermeture de ce mécanisme transitoire n'est pas totalement élucidée mais le rôle de certains acteurs contrôlés par le facteur ComX est évoqué, (Boutry et al., 2012 ; Haustenne et al., 2015). La Figure 25 montre le mécanisme ComR/ComS. Récemment, une étude transcriptomique a montré que le régulon ComR/ComS de la souche LMD-9 de *S. thermophilus* contrôle l'expression de plus de 200 gènes qui ne sont pas tous directement impliqués dans la compétence. Cette étude suggère également un contrôle négatif indirect du locus de QS Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ par ComR/ComS mais une démonstration expérimentale manque pour confirmer une éventuelle interaction entre ces deux systèmes de QS (Mignolet et al., 2018). La structure cristallographique de ComR de *S. thermophilus* sous la forme complexée avec phéromone et l'ADN montre que l'association de la phéromone XIP induit une dimérisation du régulateur ComR permettant l'exposition du domaine liant l'ADN (Talagas et al., 2016). Les différentes conformations du régulateur ComR sont illustrées dans la Figure 24.

L'organisation génétique des gènes *comR* et *comS* est toujours conservée parmi les streptocoques avec le gène *comS* toujours en aval du gène *comR* tandis que pour les gènes *rgg* et *shp*, l'organisation peut différer selon les systèmes (Fleuchot et al., 2013 ; Fontaine et al., 2015). L'efficacité de la compétence est hétérogène selon les souches de *S. thermophilus*. Le niveau d'expression de ComR expliquerait en

Introduction bibliographique-Chapitre3.

partie mais pas totalement cette différence (Haustenne et al., 2015). Chez *S. thermophilus*, à la différence des systèmes Rgg/SHP qui suivent un mécanisme classique de QS, la compétence est activée au début de la phase exponentielle et dure environ une heure, indépendamment de la densité cellulaire. Elle fonctionne plus comme un « dispositif temporel » que comme un mécanisme de QS dépendant de la densité cellulaire (Gardan et al., 2013 ; Monnet et al., 2014). La Figure 26 montre l'expérience validant cette proposition. La compétence chez *S. pneumoniae* (Partie 2.3) contrôlée par un mécanisme de QS classique impliquant un TCS souligne la complexité à généraliser le mécanisme d'une même fonction biologique.

Nous avons vu que le ferment lactique *S. thermophilus* est une espèce incontournable de l'industrie laitière. Dans sa niche écologique naturelle, le lait, il est souvent en interaction avec d'autres espèces. Examiner les différents mécanismes de communication permettrait de l'exploiter à des fins technologiques telles qu'activer la production des peptides d'intérêts ou qu'inhiber certaines fonctions telles que la compétence naturelle en co-culture avec d'autres espèces. La famille des phéromones SHP associées aux régulateurs cytoplasmiques Rgg ainsi que la phéromone ComS associée au régulateur ComR ont été étudiées expérimentalement dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus*. Cependant, l'acteur impliqué dans l'export de ces phéromones reste à déterminer pour compléter le cycle de vie de ces phéromones. D'où, notre objectif de thèse qui est d'identifier les gènes impliqués dans le transport de ces phéromones et aussi d'étudier l'ensemble des mécanismes contrôlés par ce transporteur.

Introduction bibliographique-Chapitre3.

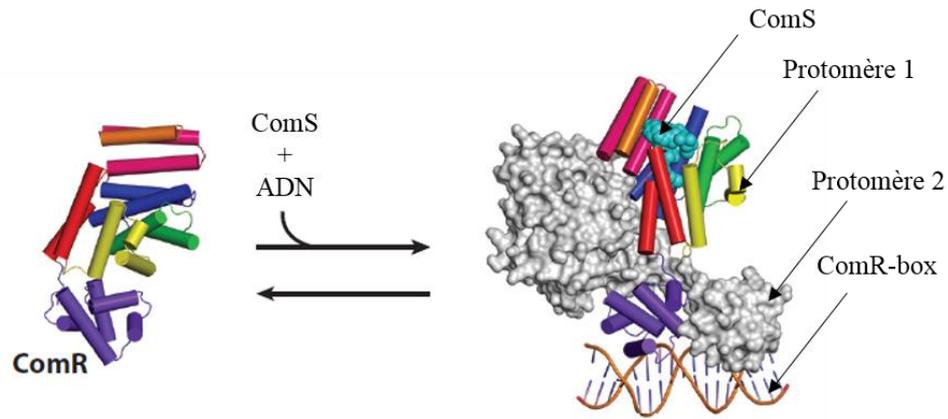


Figure 24. Les différentes conformations du régulateur *ComR*. L'association de la phéromone *ComS* induit la dimérisation de *ComR* et la liaison à l'ADN au niveau du motif *ComR*-box. D'après Neiditch et al., 2017.

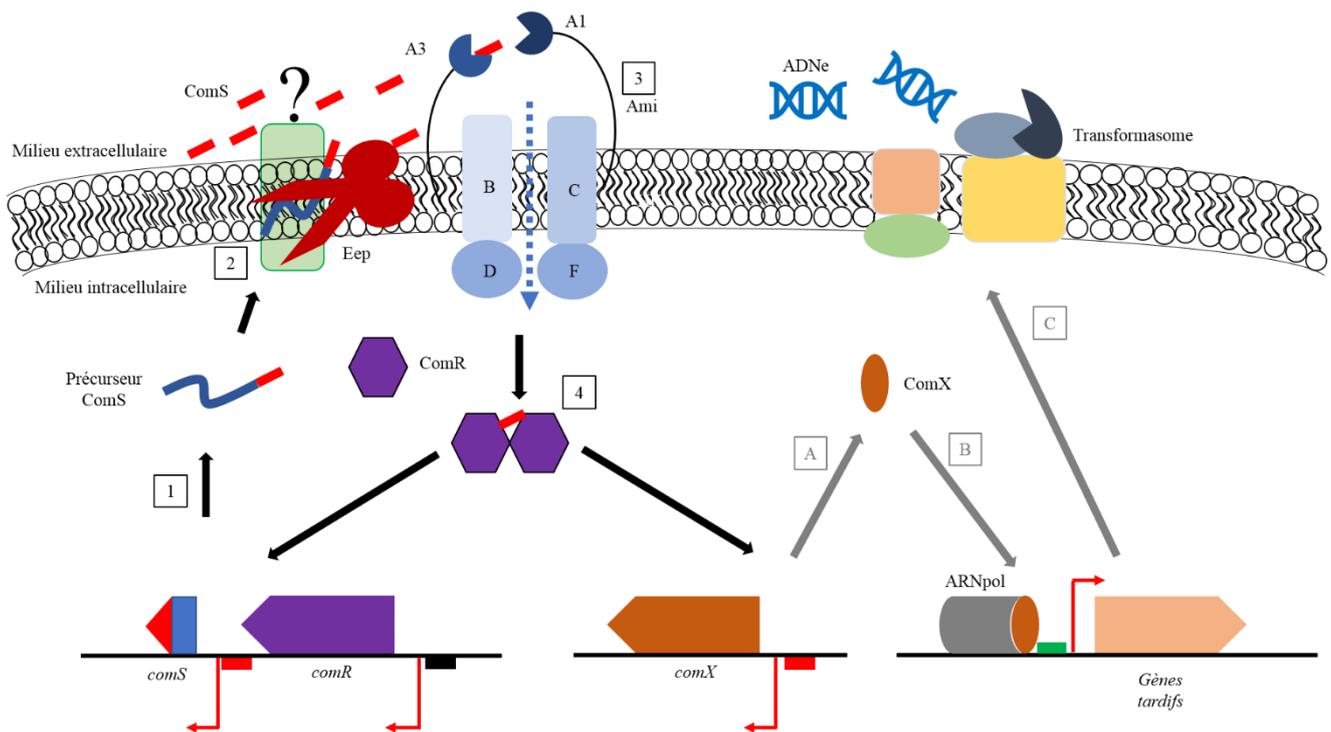


Figure 25. Mécanisme de l'activation de la compétence chez *S. thermophilus*. La phéromone *ComS* produite sous forme de précurseur (1) est maturée par la protéase *Eep* et sécrétée par un acteur non-déterminé (2). La forme mature est re-intériorisée par le transporteur *Ami* (3). L'association de la phéromone mature au régulateur *ComR* (4) induit une dimérisation de régulateur et le couple contrôle l'expression de leurs gènes cibles. Le facteur sigma codé par le gène *comX* (A), cible de *ComR/ComS*, active l'expression des gènes tardifs de la compétence en s'associant à l'ARN polymérase (B) dont les gènes de transformasome (C). Ce complexe multiprotéique permet l'internalisation de l'ADN extracellulaire. D'après Fontaine et al., 2015.

Introduction bibliographique-Chapitre3.

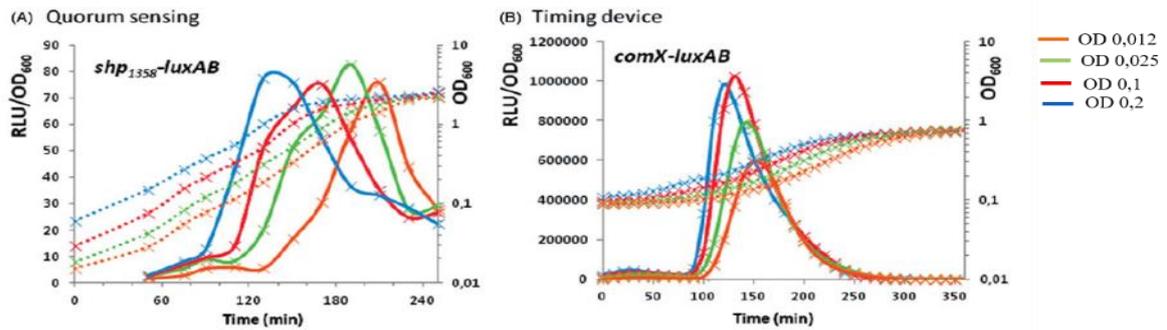


Figure 26. L'expérience illustrant le mécanisme ComR/ComS variant du QS classique. Le niveau d'expression des gènes cibles *shp*₁₃₅₈ et *comX* activés par Rgg1358/SHP1358 (A) et ComR/ComS (B) respectivement à différent densité cellulaire variant de 0,012 à 0,2. Le niveau de luminescence relatif (RLU/OD₆₀₀) est représenté en lignes solides et la croissance (OD₆₀₀) en lignes discontinues en fonction du temps. Cette expérience illustre que dans le cas d'un gène contrôlé par un mécanisme de QS classique, le démarrage de son expression se déclenche lorsqu'une certaine DO est atteinte. Dans le cas du mécanisme ComR/ComS, le déclenchement de l'expression de la cible est indépendant de la DO. D'après Monnet et al., 2014.

Points Clés

- ✓ *S. thermophilus*, dont la niche écologique est le lait, est la seule espèce reconnue parmi les streptocoques pour son innocuité avec le statut GRAS.
- ✓ *S. thermophilus*, anaérobie facultatif avec une capacité à croître à des températures élevées (50° C) est un ferment lactique utilisé dans l'industrie laitière.
- ✓ Le fonctionnement des phéromones SHP s'associant aux régulateurs Rgg selon un mécanisme de QS a été mis en évidence pour le couple Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ produisant un streptide dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus*.
- ✓ Dans la souche LMD-9, la phéromone ComS contrôle la compétence naturelle en s'associant au régulateur ComR selon un mécanisme différent du QS classique.
- ✓ L'identité de l'acteur sécrétant les phéromones SHP₁₃₅₈ et ComS est une lacune pour compléter le cycle de vie des phéromones détectées en intracellulaire. Nous allons identifier ce transporteur dans ce projet.

Résultats

Chapitre 4. Le transporteur PptAB est essentiel pour l'activation de trois systèmes de quorum-sensing chez *Streptococcus thermophilus*

4.1. Introduction

L'analyse *in silico* des petits gènes codés par les génomes de streptocoques a mis en évidence des petits gènes associés à des gènes codant des régulateurs Rgg. Ces loci ont été nommé *rgg/shp* car les petits gènes *shp* pour « short hydrophobic peptides » codent des petits peptides de nature hydrophobe (Ibrahim et al., 2007b ; Fleuchot et al., 2011). L'analyse phylogénétique des Rgg a permis de mettre en évidence trois groupes de régulateurs Rgg associés à des phéromones SHPs (Partie 3.6.1). Chez *S. thermophilus*, la souche LMD-9 contient six loci *rgg/shp* codant des régulateurs Rgg associés à des phéromones SHP du groupe II et III (Figure 27) (Fleuchot et al., 2013). Dans cette souche, le fonctionnement des couples Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ (groupe II de Rgg) et Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ (groupe III de Rgg) selon un mécanisme de QS mettant en jeu l'importeur d'oligopeptides Ami a été décrit (Ibrahim et al., 2007b ; Fleuchot et al., 2011 ; Fleuchot et al., 2013). En plus de ces deux phéromones SHP, la phéromone ComS activant la compétence suite à sa détection intracellulaire par le régulateur ComR, qui est un régulateur Rgg-like, a été également mise en évidence (Fontaine et al., 2010). La protéase Eep identifiée comme une des protéases du processus de la maturation de certaines phéromones de conjugaison telles que cAD1, iAD1, cPD1, cCF10 et iCF10 chez *E. faecalis* est impliquée dans la production des phéromones matures SHP₁₃₅₈ et ComS chez *S. thermophilus* (An et al., 1999 ; Chandler and Dunny, 2008 ; Fleuchot et al., 2011 ; Gardan et al., 2013).

Résultats-Chapitre4.

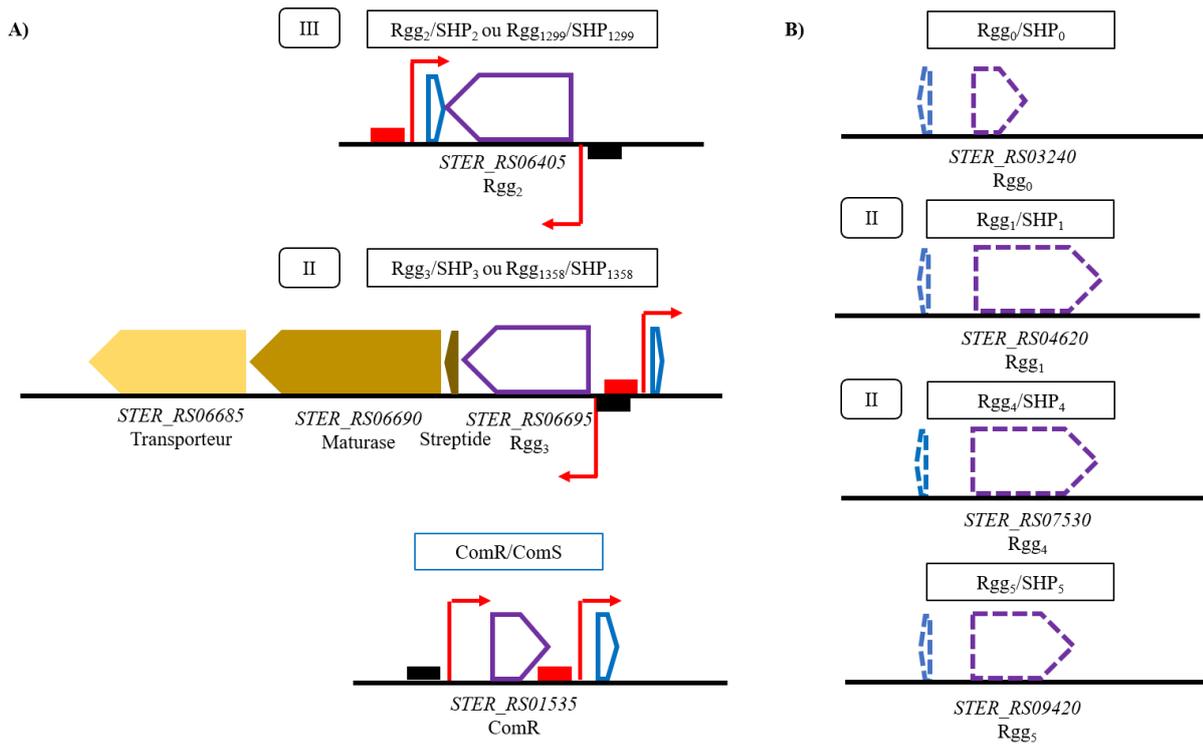


Figure 27. Schéma représentatif des systèmes Rgg/SHP identifiés chez *S. thermophilus* LMD-9. Les gènes codant les régulateurs cytoplasmiques sont représentés en violet et les petits gènes codant les phéromones sont en bleu. A) Les systèmes étudiés expérimentalement. Les cibles directes proximales du loci Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ sont représentés. B) Les systèmes identifiés uniquement in silico. Les loci rgg/shp sont avec des traits discontinus. Rgg₀ est un pseudogène contrairement aux autres Rgg.

Son rôle dans la maturation de SHP₁₂₉₉ n'a pas été exploré. Dans le cycle de vie de ces trois phéromones, ComS, SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈, l'acteur impliqué dans la sécrétion n'est pas connu.

Pour identifier l'acteur de sécrétion de ces phéromones, notre équipe s'est appuyée sur la littérature qui a mis en évidence le rôle du transporteur PptAB dans la sécrétion de certaines phéromones de conjugaison telles que cOB1, cAM373 et cCF10 chez *E. faecalis* et de phéromones SHP chez *S. agalactiae* et *S. pyogenes* (Varahan et al., 2014 ; Chang and Federle, 2016). Une recherche de séquence par alignement avec les gènes *pptAB* d'*E. faecalis* par BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a permis d'identifier deux gènes annotés *STER_RS07730* et *STER_RS07725* dans la souche LMD-9. Les gènes *STER_RS07730* et *STER_RS07725* ont 63% et 30% d'identité respectivement avec les gènes *pptA* et *pptB* d'*E. faecalis* et l'organisation génétique du locus est conservée entre les deux espèces

Résultats-Chapitre4.

(Figure 28). Ainsi, les gènes *STER_RS07730* et *STER_RS07725* ont été rebaptisés *pptA* et *pptB* pour la suite du projet. Dans ce chapitre, l'étude de l'expression des gènes *pptAB* va précéder les résultats permettant de caractériser leur rôle dans l'activation de la compétence et de deux systèmes de QS impliquant les phéromones SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈ décrits dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus*.

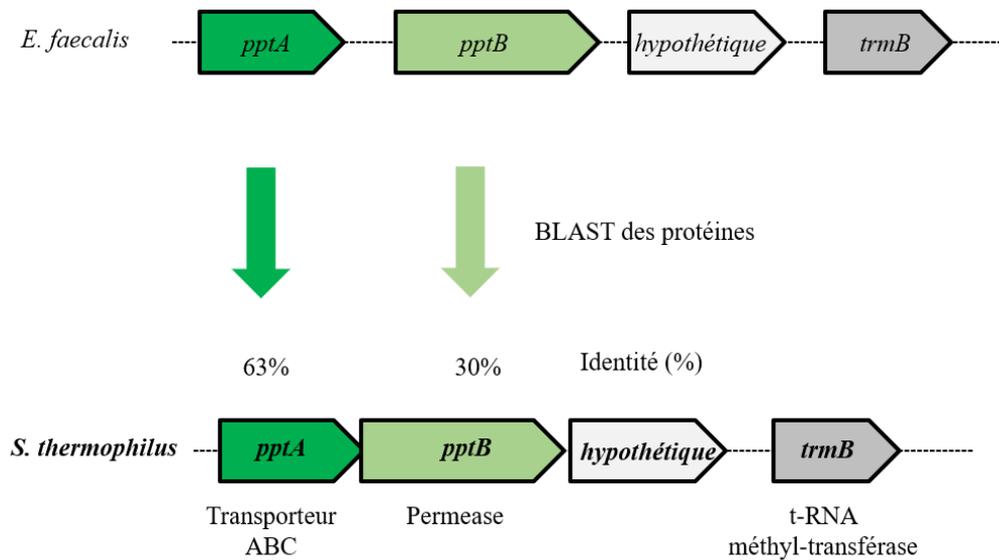


Figure 28. Organisation génétique des gènes *pptAB* et de leurs gènes adjacents identiques entre *E. faecalis* et *S. thermophilus*.

4.2. Résultats

4.2.1. Caractérisation de l'expression de gènes *pptAB* en milieu dépourvu de peptides (MCD) et riche en peptides (M17)

Pour savoir si les gènes *pptAB* identifiés par BLAST sont exprimés dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus*, nous avons étudié leurs niveaux d'expression dans deux milieux de laboratoires différents dont le milieu M17 (riche en peptides) en présence de lactose (M17lac) et un milieu chimiquement défini (MCD) dépourvu de peptides. J'ai construit une fusion transcriptionnelle avec les gènes rapporteurs *luxAB* codant l'enzyme luciférase exprimés sous le contrôle de la région promotrice des gènes *pptAB* pour cette étude (Figure 29). Le maximum de niveau de luminescence relative est constant pendant la

Résultats-Chapitre4.

phase exponentielle de croissance dans les deux milieux. Donc, le niveau d'expression des gènes *pptAB* est constitutif mais est exprimé à un niveau faible en M17lac comparé à MCD. Le MCD étant moins tamponné que le M17, il est probable que la chute de l'expression de *pptAB* observée en MCD soit liée à une chute de pH car l'enzyme luciférase est sensible au pH. Il est difficile de conclure sur la régulation des gènes *pptAB* par la composition du milieu.

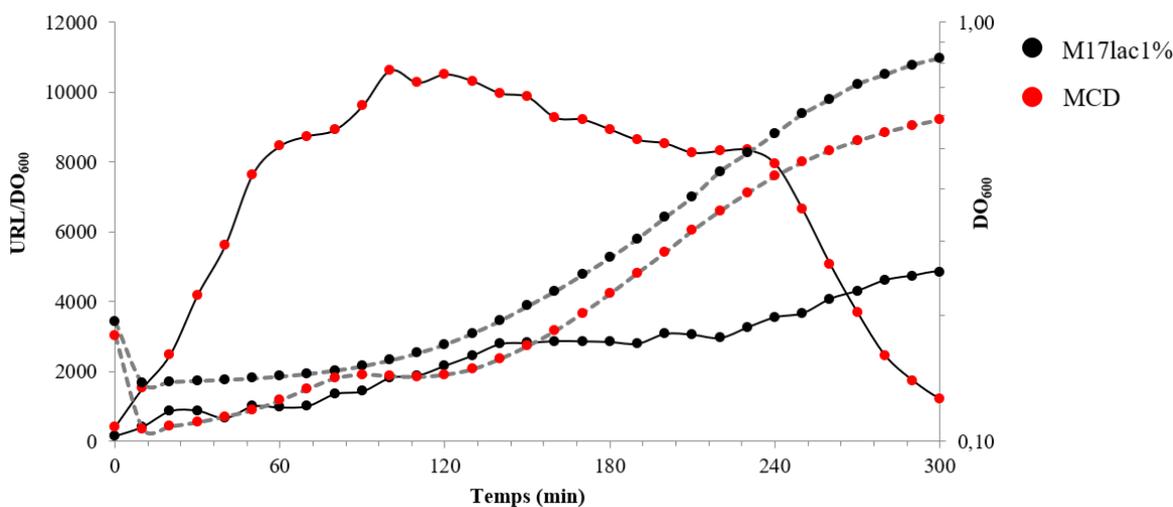


Figure 29. Le niveau d'expression des gènes *pptAB* dans deux milieux différents. La croissance et l'activité luciférase de la souche TIL1557 contenant la fusion P_{pptAB} -*luxAB* sont représentées. La croissance (DO_{600}) est représentée par des courbes discontinues en grises et l'activité luciférase (URL/DO_{600}) par des courbes continues noires. Ce graphe est représentatif de trois répliquats biologiques.

4.2.2. Les gènes *pptAB* sont essentiels pour l'activation de trois systèmes de quorum sensing chez *S. thermophilus*.

Pour étudier le rôle des gènes *pptAB* dans l'activation des mécanismes dépendant des phéromones détectées en intracellulaire, nous avons étudié l'expression des gènes cibles des trois systèmes, ComR/ComS, Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ et Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈, dans une souche sauvage ou mutée pour le gène codant le transporteur PptAB. Nous avons donc étudié l'expression du gène *comX*, une des cibles du couple ComR/ComS dans le cas de la compétence et celles des gènes *shp1299* et *shp1358* codant les phéromones SHP pour les systèmes Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ et Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ respectivement. Pour cela j'ai

Résultats-Chapitre4.

utilisé des fusions transcriptionnelles construites avant le démarrage de mon projet de thèse. En effet, nous avons exprimé les gènes rapporteurs *luxAB* sous le contrôle de la région promotrice d'un gène cible spécifique à chaque mécanisme étudié. Brièvement, le niveau d'expression du gène cible peut être quantifié à partir de luminescence émise par l'enzyme de luciférase en présence de son substrat et les co-facteurs issus du milieu (Gardan et al., 2013). On peut ainsi déduire l'activation de chaque mécanisme étudié en MCD.

4.2.2.1. Les gènes *pptAB* sont indispensables pour l'activation du système ComR/ComS donc pour la compétence

La luminescence relative de la souche TIL1379 ($P_{comX-luxAB}$) atteint le pic de 500,000 en phase mi-exponentielle tandis qu'elle n'est pas mesurable dans la souche TIL1488 ($P_{comX-luxAB} \Delta pptAB::erm$) (Figure 30). Cela traduit une absence de transcription du gène *comX* dans la souche délétée pour les gènes *pptAB*. Les gènes *pptAB* sont donc nécessaires au fonctionnement du couple ComR/ComS. En cas de supplémentation du milieu avec le peptide synthétique ComS₁₇₋₂₄ (LPYFAGCL) à 1 μ M, le niveau de luminescence relative est restauré dans la souche TIL1488 ($P_{comX-luxAB} \Delta pptAB::erm$) au même niveau que la souche TIL1379 ($P_{comX-luxAB}$) (Figure 30). Cette restauration de l'expression du gène *comX* dans la souche TIL1488 ($P_{comX-luxAB} \Delta pptAB::erm$) souligne le rôle des gènes *pptAB* dans la production des phéromones matures en amont de leur détection en intracellulaire. Dans le cas de la supplémentation du milieu avec le peptide synthétique, la production de luminescence démarre immédiatement dans la souche TIL1488 ($P_{comX-luxAB} \Delta pptAB::erm$) contrairement à ce qui a été observé dans la souche TIL1379 ($P_{comX-luxAB}$) sans supplémentation soulignant la cinétique d'expression artificielle du gène *comX* en cas de délétion des gènes *pptAB*.

On peut aussi observer que la cinétique de croissance de la TIL1379 ($P_{comX} luxAB$) subit un ralentissement net au moment où l'expression du gène *comX* démarre contrairement à la souche TIL1488 ($P_{comX-luxAB} \Delta pptAB::erm$). Comme déjà dit, cela est la conséquence de l'activation de la compétence

Résultats-Chapitre4.

dans la souche TIL1379 ($P_{comX} luxAB$) contenant les gènes $pptAB$ fonctionnels contrairement à la souche TIL1488 ($P_{comX}-luxAB \Delta pptAB::erm$).

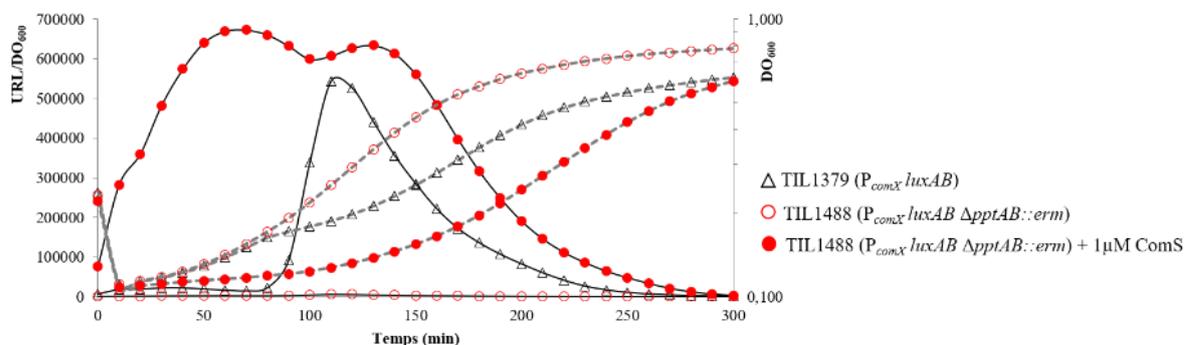


Figure 30. Cinétique d'expression du gène $comX$ en MCD reflétant le mécanisme de la compétence dans les souches TIL1379 ($P_{comX} luxAB$) et TIL1488 ($P_{comX} luxAB \Delta pptAB::erm$). La croissance (DO_{600}) est représentée par des courbes discontinues et l'activité luciférase (URL/DO_{600}) par les courbes continues noires. Ce graphique est représentatif de trois réplicats biologiques.

La cinétique de croissance de la souche TIL1488 ($P_{comX} luxAB \Delta pptAB::erm$) subit également un ralentissement marquant lorsque le milieu est supplémenté avec la phéromone ComS synthétique à $1\mu M$ confirmant à nouveau notre hypothèse.

Nous savons que la souche LMD-9 est compétente naturellement en MCD (Gardan et al., 2013). Pour vérifier que la délétion des gènes $pptAB$ inactive la compétence naturelle, nous avons étudié le phénotype de transformation naturelle de la souche mutante TIL1558 ($\Delta pptAB$). J'ai construit cette souche délétée pour les gènes $pptAB$ pendant la thèse. Une expérience de transformation naturelle avec le plasmide pG+host9 réalisée en trois répétitions biologiques n'a donné aucun transformant avec la souche TIL1558 ($\Delta pptAB$) contrairement à ce qui est observé avec la souche sauvage (résultats non-montrés). La souche $\Delta pptAB$ n'est donc pas compétente naturellement. Les gènes $pptAB$ sont donc essentiels pour l'activation de la compétence.

Résultats-Chapitre4.

4.2.2.2. Les gènes *pptAB* sont essentiels pour l'activation de deux systèmes de QS

Rgg/SHP

Le niveau de luminescence de la souche TIL1038 ($P_{shp1299} luxAB$) atteint son maximum (140000 URL/DO₆₀₀) en fin phase exponentielle témoignant de l'expression maximale du gène *shp1299* activée par le couple Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉. Par contre, le niveau de luminescence n'est pas détectable dans la souche TIL1491 ($P_{shp1299} luxAB \Delta pptAB::erm$) indiquant que l'expression du gène *shp1299* est abolie en cas de délétion des gènes *pptAB* (Figure 31). Pour le système Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈, le niveau de luminescence relative est à son maximum (10000 URL/DO₆₀₀) en fin phase exponentielle dans la souche TIL1165 ($P_{shp1358} luxAB$) tandis que la luminescence n'est pas détectable dans la souche TIL1489 ($P_{shp1358} luxAB \Delta pptAB::erm$). Ainsi, le gène *shp1358* n'est pas transcrit en cas de délétion des gènes *pptAB* (Figure 32).

Lorsque le milieu est supplémenté avec le peptide synthétique SHP₁₂₉₉ (DIIIFPPFG) à 1µM, le niveau de luminescence devient détectable et atteint le maximum (120000 URL/DO₆₀₀) en amont de fin phase exponentielle dans la souche TIL1491 ($P_{shp1299} luxAB \Delta pptAB::erm$) témoignant la restauration de l'expression du gène *shp1299* dans ce mutant (Figure 31). De la même manière la supplémentation du milieu avec le peptide synthétique SHP₁₃₅₈ (EGIIVIVVG) à 1µM élève le maximum de luminescence relative à 70000 URL/DO₆₀₀ en mi-phase exponentielle dans la souche TIL1489 ($P_{shp1358} luxAB \Delta pptAB::erm$) restaurant ainsi l'expression du gène *shp1358* dans le mutant $\Delta pptAB::erm$ (Figure 32).

Comme dans le cas de la phéromone ComS, les gènes *pptAB* sont essentiels pour la production des phéromones matures SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈ et ne sont pas impliqués dans l'étape de détection des phéromones.

Résultats-Chapitre4.

Les fusions transcriptionnelles ont montré que les gènes *pptAB* sont indispensables à l'activation de la compétence ainsi qu'à l'activation de deux systèmes de QS impliquant Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ et Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈. Les gènes *pptAB* sont donc impliqués dans la production des formes actives des phéromones ComS, SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈.

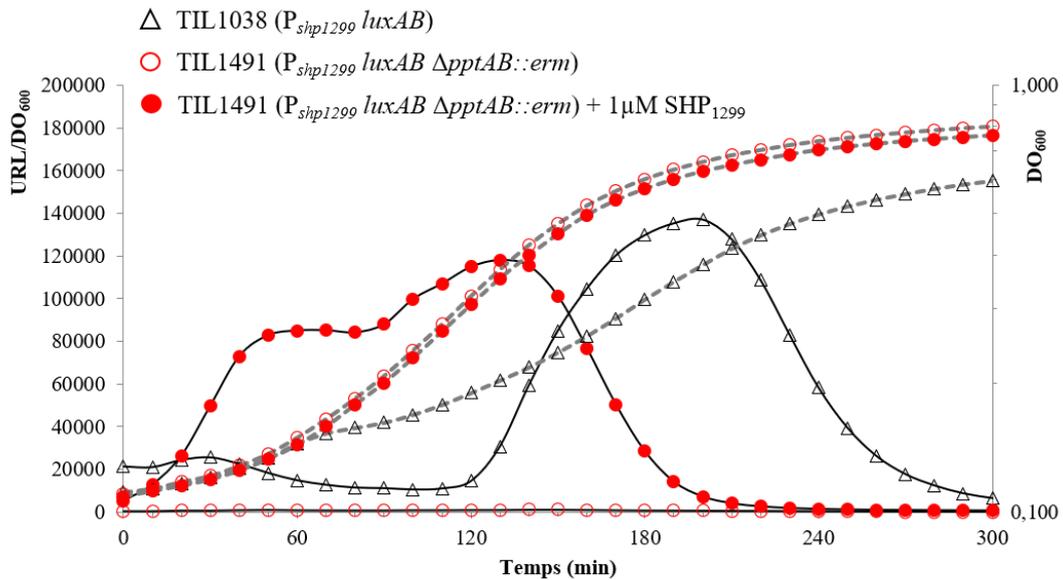


Figure 31. Cinétique d'expression du gène *shp1299* en MCD témoignant l'inactivation du mécanisme de QS de Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ chez le mutant *ΔpptAB::erm*. La croissance (DO_{600}) est représentée par des courbes discontinues en grises et l'activité luciférase (URL/DO_{600}) par les courbes continues noires. Ce graphe est représentatif de trois réplicats biologiques.

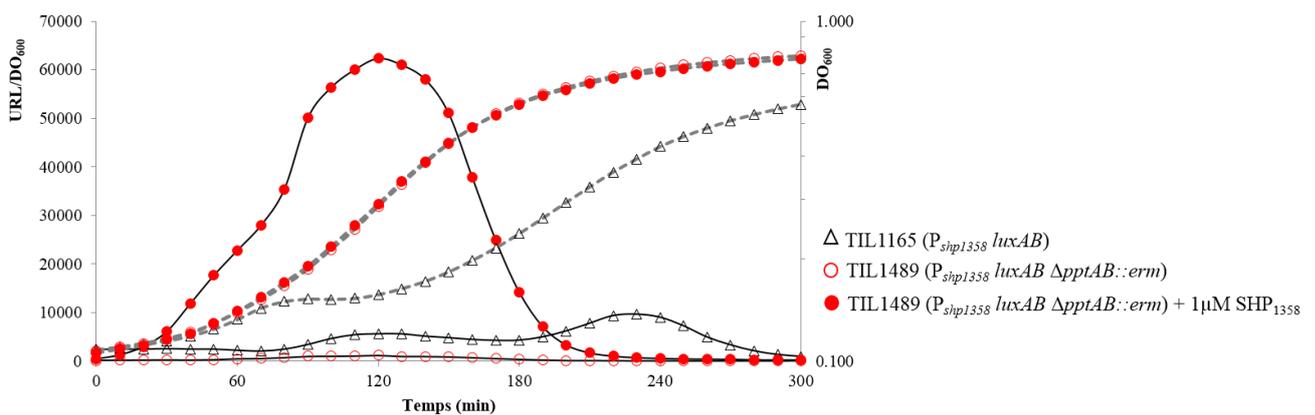


Figure 32. Cinétique d'expression du gène *shp1358* en MCD montrant l'inactivation du mécanisme de QS de Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ chez le mutant *ΔpptAB::erm*. La croissance (DO_{600}) est représentée par des courbes discontinues en grises et l'activité luciférase (URL/DO_{600}) par les courbes continues noires. Ce graphe est représentatif de trois réplicats biologiques.

Résultats-Chapitre4.

4.3. Discussion et conclusion

Nous avons observé que les gènes *pptAB* sont exprimés dans la souche LMD-9 dans nos conditions testées. Nous avons par la suite démontré, à l'aide de fusion transcriptionnelle, que l'activation de trois mécanismes du QS dont la compétence et ceux contrôlés par Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ et Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ exige la présence des gènes *pptAB*. Nos résultats suggèrent que les gènes *pptAB* sont plus spécifiquement impliqués dans la production des phéromones matures ComS, SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈. Nous avons vérifié que l'expression des gènes cibles des trois systèmes ComR/ComS, Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉, Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈, n'est pas restaurée par l'ajout des peptides synthétiques respectifs dans les milieux en cas de délétion des gènes *amiCDE* et *pptAB* (résultats non-montrés).

La cinétique d'expression des gènes cibles dans une souche avec les gènes *pptAB* fonctionnels varie selon les systèmes étudiés témoignant que, même si ces systèmes sont activés selon un mécanisme similaire de QS, d'autres facteurs non-identifiés peuvent également jouer un rôle dans leurs contrôles. La chute de l'expression des gènes cibles peuvent être liée soit aux facteurs biologiques comme pour la compétence où le rôle des certaines protéines de la phase-tardive dans la fermeture de l'expression du gène *comX* est ainsi évoqué dans la littérature (Haustenne et al., 2015) soit aux conditions expérimentales comme un épuisement de co-facteur FMNH₂ (nécessaire à l'activité luciférase) lié à la croissance des bactéries (Gardan et al., 2013). Cette observation n'ayant pas de lien direct avec le transporteur PptAB, elle ne sera pas approfondie dans ce projet.

Chapitre 5. Le transporteur PptAB est l'acteur principal de la sécrétion des phéromones matures SHP chez *Streptococcus thermophilus*

5.1. Introduction

Nous avons montré que le transporteur PptAB est nécessaire à l'expression de trois gènes cibles de trois systèmes, ComR/ComS, Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ et Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈, et que son rôle se joue plus spécifiquement à l'étape de la production des phéromones matures de ces systèmes. Ainsi, le transporteur PptAB serait impliqué dans la sécrétion des phéromones matures chez *S. thermophilus*. Nous avons donc voulu identifier toutes les phéromones matures détectées par les régulateurs de la famille Rgg ou Rgg-like (ComR) sécrétées dans le milieu extracellulaire dans une souche sauvage. Ensuite, nous avons recherché la présence des phéromones en cas de délétion des gènes *pptAB* ou *eep* ou *amiCDE* qui sont tous impliqués dans le cycle de vie des phéromones déjà étudiées.

Nous savons que l'expression des gènes codant les phéromones des trois systèmes étudiés est contrôlée par un régulateur Rgg-like dont l'activité est elle-même contrôlée par son interaction avec la phéromone (Fleuchot et al., 2011 ; Fleuchot et al., 2013 ; Fontaine et al., 2010). Ainsi, les étapes de biosynthèse et de sécrétion de ces trois phéromones sont intrinsèquement liées. Afin d'étudier le rôle du transporteur PptAB dans la sécrétion des phéromones matures indépendamment de leurs productions, nous avons choisi de dissocier l'étape de biosynthèse de l'étape de sécrétion. La stratégie que nous avons mise en place est de produire une phéromone de manière constitutive en rajoutant une copie du gène codant la phéromone étudiée sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort. Ce promoteur ne nécessitant pas la présence et la détection de la phéromone mature contrairement au promoteur natif codant ces phéromones, l'étape de biosynthèse devient indépendante de la sécrétion.

Dans le cadre de l'étude de la spécificité du transporteur PptAB, ne sachant ni l'ordre précis entre la maturation et la sécrétion ni toutes les étapes de maturation, nous avons aussi recherché d'autres formes

Résultats-Chapitre5.

que la forme mature telles que le précurseur, les formes intermédiaires ou complémentaires à la phéromone mature dans le surnageant (SN) de différentes souches en condition de surproduction de la phéromone étudiée.

5.2. Résultats

5.2.1. La délétion des gènes *pptAB* abolit la détection des phéromones matures secrétées détectables par spectrométrie de masse dans le surnageant de la souche sauvage

Le génome de la souche LMD-9 contient six loci *shp/rgg* associés aux régulateurs Rgg du groupe II et III. Seules les formes matures de deux phéromones SHP, SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈, avaient été jusque là recherchées et détectées dans le SN brut par une analyse de spectrométrie de masse (SM) (Tableau 4) (Fleuchot et al., 2013). Il a été observé que les phéromones SHP des groupes II et III de Rgg ont soit un acide aspartique soit un acide glutamique conservé (Ibrahim et al., 2007a). Toutes les phéromones matures SHP appartenant à ces deux groupes étudiés commencent par l'acide aspartique ou l'acide glutamique (Chang et al., 2011 ; Fleuchot et al., 2013). Ainsi, nous avons supposé que les quatres autres SHP identifiés seulement *in silico* (SHP₀, SHP₁, SHP₄ et SHP₅) auront aussi leurs phéromones matures commençant par un acide aspartique ou un acide glutamique conservé (Tableau 4).

En nous appuyant sur les conditions optimales de détection des phéromones matures SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈, nous avons recherché la présence de toutes les phéromones matures SHP dans le SN de culture brut (sans traitement préalable) en milieu chimiquement défini (MCD) récolté à DO₆₀₀ 0,8 dans différents contextes génétiques : sauvage, TIL1558 (Δ *pptAB*), TIL773 (Δ *deep*) et TIL883 (Δ *amiCDE*). Avec la méthode de SM que nous avons utilisée, l'échantillon est ionisé puis l'analyse en MS1 permet de séparer les différents peptides ionisés en fonction de la masse des peptides par rapports à leur nombre de charge avec une précision de 10 ppm. Ensuite, l'analyse en MS2 permet de fragmenter ces peptides ionisés en MS1 validant ainsi leurs structures exactes, c'est-à-dire leurs séquences en AA, avec une précision de 0,5 Da.

Tableau 4. Les annotations de gènes codant les régulateurs Rgg associés aux phéromones SHP dans la souche LMD-9. Les phéromones matures dont la séquence a été identifiée sont indiquées par « *in vitro* » et celles avec les prédictions par « *in silico* ». ^a. La nouvelle et l'ancienne annotation des gènes rgg. ^b. La position sur le génome et le brin complémentaire est indiqué par le signe -. ^c. Annotation issu du logiciel SHOW. ^d. Le rapport masse sur charge de l'ion monochargé correspondant à phéromone mature dont la séquence en AA est indiquée en rouge. *Le gène rgg₀ est un pseudogène. La séquence de la forme mature de SHP associé au régulateur Rgg₀ est plus courte comparée aux autres.

Rgg annotation Nouvelle	Rgg annotation Ancienne	Longueur	Position	SHP	Séquence AA SHP	Forme mature [M+H] ⁺ théorique
STER_RS03240*	STER_0657	288	597,565-597,852	SHP ₀ <i>In silico</i>	MKKISKICPIFWLVL DIHGG	587.33995
STER_RS04620	STER_0934	858	865,021-865,878	SHP ₁	MNKESFLAILLLIF ESIIIVAVG	900.54010
STER_RS06405	STER_1299	876	-1,207,191-1,208,066	SHP ₁₂₉₉ /SHP ₂ <i>In vitro</i>	MKKVIAIFLIQIVVVI DIHFFPPFG	1018.56084
STER_RS06695	STER_1358	861	-1,261,738-1,262,598	SHP ₁₃₅₈ /SHP ₃ <i>In vitro</i>	MKKQILLTLLLVVF EGHIVVVG	898.56084
STER_RS07530	STER_1530	864	1,434,695-1,435,558	SHP ₄ <i>In silico</i>	MKKQKLLLLLVVLC EGHIVLVG	912.57649
STER_RS09420	STER_1922	699	1,786,014-1,786,712	SHP ₅ <i>In silico</i>	MNKKALFSLFVIL EGHIVGVG	856.51389

Résultats-Chapitre5.

5.2.1.1. Détection d'une nouvelle phéromone SHP dans le surnageant de la souche sauvage par spectrométrie de masse

L'analyse du SN brut de la souche sauvage a permis d'extraire trois peptides ionisés mono chargés dont les valeurs de rapport masse sur charge correspondent aux trois phéromones matures SHP : SHP₁₂₉₉, SHP₁₃₅₈ et SHP₅ (Tableau 5). La présence de ces trois phéromones matures a été validée par la détection d'au moins trois peptides ionisés issus de fragmentations en MS2 (Figure 33 et Figure 34). La détection des phéromones matures SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈ dans le SN de la souche sauvage confirme des résultats antérieurs déjà publiés et valide la démarche expérimentale (Fleuchot et al., 2013). En revanche, la détection de la phéromone mature SHP₅ est un nouveau résultat. Les trois autres phéromones SHP (SHP₀, SHP₁ et SHP₄), n'ont pas été détectées par l'analyse de SM dans nos conditions d'analyse.

Tableau 5. La détection en MS1 des formes matures de trois phéromones SHP dans le SN de la souche LMD-9. Les résultats sont représentatifs de trois réplicats biologiques.

Phéromone mature	[M+H] ⁺ théorique	[M+H] ⁺ expérimentale	Temps de rétention (minutes)	Aire sous la courbe
SHP ₁₂₉₉ DIIIFPPFG	1018.56084	1018.56165 (+/-) 0.00144	45.12	137,704
SHP ₁₃₅₈ EGIIIVVVG	898.56084	898.56189 (+/-) 0.00058	36.82	534,608
SHP ₅ EGIIVIGVG	856.51389	856.51599 (+/-) 0.00053	32.82	489,747

Sachant l'implication des gènes *pptAB*, *eep* et *amiCDE*, dans la production de la phéromone mature SHP₁₃₅₈, nous avons voulu déterminer leurs rôles dans la production des autres phéromones matures SHP (Chapitre 4), (Fleuchot et al., 2011).

Résultats-Chapitre5.

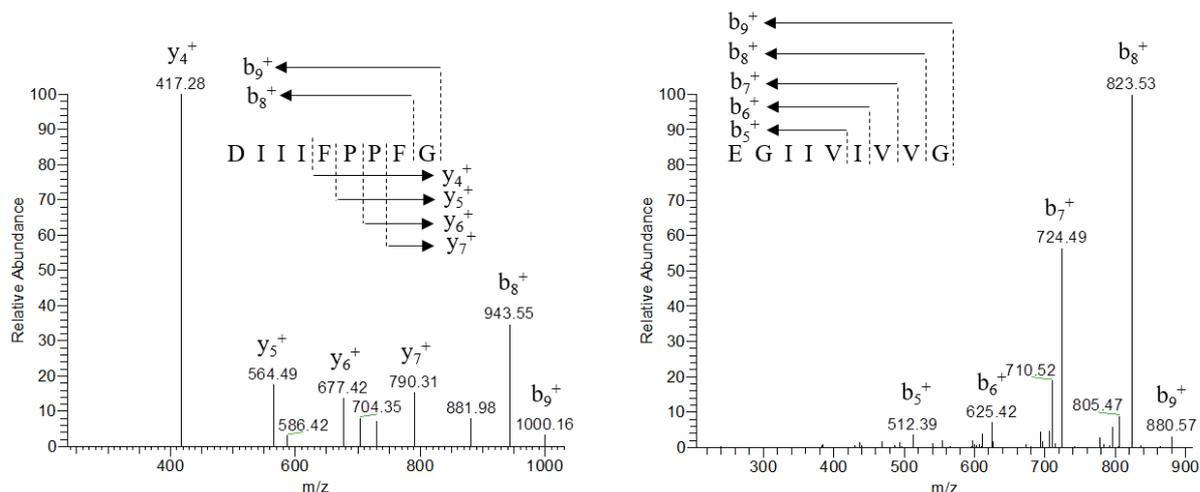


Figure 33. Spectres de fragmentation des formes matures des phéromones SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈ dans le SN de la souche LMD-9. Les spectres sont représentatifs de trois réplicats biologiques.

5.2.1.2. Absence de détection des phéromones matures SHP dans le surnageant en cas de délétion des gènes *pptAB* par spectrométrie de masse

Les formes matures des six SHP ont été recherchées également dans le SN de la souche TIL1558 ($\Delta pptAB$) par SM. Aucune des phéromones matures de SHP n'a été détectée dans ce SN. Les trois phéromones matures SHP détectées dans le SN de la souche sauvage, SHP₁₂₉₉, SHP₁₃₅₈ et SHP₅, sont donc absentes en cas de délétion des gènes *pptAB*. L'absence de production des phéromones matures SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈ est cohérente avec l'abolition de transcription des gènes codant ces phéromones lorsque les gènes *pptAB* sont délétés (Partie 4.2.2). Quant à la phéromone mature SHP₅, sa production est aussi dépendante de l'expression des gènes *pptAB*. L'absence de détection des phéromones matures SHP₀, SHP₁ et SHP₄ n'est pas surprenante car elles n'étaient pas détectées dans le SN de la souche sauvage.

Nous savons que la production de la phéromone mature SHP₁₃₅₈ est dépendante des gènes *eep* et *amiCDE* (Fleuchot et al., 2011). Afin de savoir si le cycle de vie de toutes les phéromones SHP est dépendant de

Résultats-Chapitre5.

ces deux acteurs de QS chez *S. thermophilus*, nous avons voulu déterminer leurs présence ou absence dans les SN en situation de délétion de ces gènes.

5.2.1.3. Absence de détection des phéromones matures SHP dans le surnageant en cas de délétion des gènes *eep* ou *amiCDE* par spectrométrie de masse

Les trois phéromones matures SHP, SHP₁₂₉₉, SHP₁₃₅₈ et SHP₅, détectées dans le SN de la souche sauvage ne sont pas détectées dans le SN de la souche TIL773 (Δeep) confirmant que leur production dans le SN est dépendante de la protéase Eep. En cas d'absence du transporteur d'oligopeptides ré-internalisant les phéromones matures SHP, les phéromones matures SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈ n'ont pas été détectées dans le SN de la souche TIL883 ($\Delta amiCDE$). De manière inattendue, la phéromone mature SHP₅ a été détectée lors de l'analyse de MS1 avec une aire sous la courbe comparable à celle de la souche sauvage (Tableau 5). Par ailleurs, sa structure a été validée avec l'analyse de MS2 du SN de la souche TIL883 ($\Delta amiCDE$) (Figure 34). Les trois phéromones matures SHP non détectées dans le SN de la souche sauvage n'ont pas été détectées dans le SN des souches TIL773 (Δeep) et TIL883 ($\Delta amiCDE$).

Résultats-Chapitre5.

5.2.1.4. Les essais non concluants d'identification des conditions de détection de la forme mature de la phéromone ComS dans le surnageant de la souche sauvage par spectrométrie de masse

La phéromone mature ComS (IAILPYFAGCL) de 11 AA se différencie biochimiquement des phéromones SHP qui commencent par un AA acide (D ou E) et aussi par la présence de deux AAs particulièrement réactifs, une proline et une cystéine. Chez *S. mutans*, il a été montré que le transporteur PptAB joue seulement un rôle partiel dans l'export de la phéromone ComS (Chang and Federle, 2016). Nous avons cherché à détecter la forme mature naturellement produite dans le SN de la souche sauvage avant de vérifier son absence en cas de délétion des gènes *pptAB*. Les résultats déjà publiés par notre équipe ont montré l'absence de détection de ComS dans le SN brut de la souche sauvage. Ceci peut sans doute s'expliquer par sa localisation à proximité de la membrane et de sa production optimale au début de la croissance donc à une valeur de DO₆₀₀ faible (0,1) (Gardan et al., 2013). Nous avons donc décidé de mettre en place des nouveaux essais pour détecter la phéromone mature ComS dans le SN de la souche sauvage.

Dans un premier temps, nous avons concentré l'échantillon en éliminant l'ensemble des peptides de taille supérieure à 3 KDa afin de mieux détecter la phéromone ComS avec une étape d'ultrafiltration (UF) du SN à 3 KDa. Nous avons constaté à l'aide de peptides synthétiques rajoutés avant (étalonnage interne) et après (étalonnage externe) l'étape d'UF que la phéromone ComS est perdue lors de cette étape. La nature hydrophobe de la phéromone nous fait penser qu'elle ne se décroche pas de la membrane utilisée pour l'UF. Cet essai d'UF n'a pas donné de résultats satisfaisants permettant la détection de la phéromone ComS dans le SN de la souche sauvage.

Dans un deuxième temps, la quantité de la phéromone ComS dans le SN de la souche LMD-9 étant probablement très faible, nous avons décidé de concentrer les SN sur une colonne d'extraction en phase solide (SPE). En effet, cette colonne permet la rétention des composés hydrophobes qui peuvent être élués par des solvants hydrophobes. La concentration de la phéromone étant tellement élevée dans le cas

Résultats-Chapitre5.

d'ajout de phéromones synthétiques avant le traitement par SPE (étalonnage interne) et la nature très hydrophobe de la phéromone ont contribué à une grande difficulté à éluer la phéromone de la colonne de SM dans nos conditions d'analyses. L'analyse de plusieurs blancs passés après montrent que la phéromone synthétique ComS est très difficile à éliminer de la colonne de SM conduisant à sa détection ultérieure dans l'ensemble des échantillons.

En prenant en compte la perte de phéromone ComS avec le premier essai de concentration et l'impossibilité à doser correctement la phéromone ComS avec le deuxième essai de concentration, nous avons décidé de ne pas poursuivre la mise au point de détection de la phéromone ComS produite naturellement par SM.

L'ensemble de ces résultats confirme le rôle primordial du transporteur PptAB dans la production de deux phéromones matures déjà étudiées, SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈, mais également de la phéromone SHP₅ détectée pour la première fois dans le SN de la souche sauvage. Pour la phéromone ComS, l'approche de fusion transcriptionnelle montre que le transporteur PptAB est nécessaire à sa production (Figure 30).

5.2.2. Le transporteur PptAB secrète principalement la forme mature de la phéromone SHP₁₃₅₈

Pour démontrer le rôle du transporteur PptAB dans la sécrétion des phéromones matures indépendamment de son rôle dans l'expression des gènes codant les phéromones, nous avons recherché par SM la forme mature dans le SN d'une souche $\Delta pptAB$ surproduisant une phéromone SHP à partir d'un promoteur fort constitutif. Le plasmide surproduisant la phéromone SHP₁₃₅₈ ayant déjà été construit pour étudier le rôle de la protéase Eep dans la maturation de SHP₁₃₅₈ dans une étude précédente (Fleuchot et al., 2011), nous avons décidé d'utiliser ce plasmide pour notre étude.

L'analyse de SN de la souche TIL1563 ($\Delta pptAB$ pBV5030::P_{32shp1358}) que j'ai construite pendant la thèse a donné un pic avec l'analyse de MS1 correspondant à la masse théorique de la forme mature de la phéromone SHP₁₃₅₈. En revanche, l'intensité du signal correspondant à ce peptide ionisé étant trop

Résultats-Chapitre5.

faible, ce peptide ionisé n'a pas pu être fragmenté en MS2. Ainsi, nous n'avons pas pu valider sa séquence donc sa présence.

Pour confirmer que le pic de très faible intensité du signal détecté en MS1 correspondait à la forme mature de SHP₁₃₅₈, nous avons réalisé une analyse ciblée du SN de la souche TIL1563 ($\Delta pptAB$ pBV5030::P_{32shp1358}). Cette méthode permet de fragmenter en MS2 uniquement les ions de MS1 présélectionnés pour avoir la masse théorique de la forme mature de SHP₁₃₅₈. Cette méthode très sensible a permis de fragmenter le pic de très faible intensité du signal observé en MS1 et de valider qu'il correspondait à la forme mature de SHP₁₃₅₈. Pour vérifier si la quantité de la forme mature détectée dans le SN de la souche TIL1563 ($\Delta pptAB$ pBV5030::P_{32shp1358}) pouvait induire une réponse biologique, nous avons utilisé une souche capable de produire de la luminescence en présence de la phéromone active de SHP₁₃₅₈ dans le milieu appelée biosenseur pour la phéromone SHP₁₃₅₈ TIL1200 (P_{shp1358-luxAB} $\Delta shp1358$). En effet, nous avons réalisé une co-culture entre ce biosenseur et différentes souches dont certaines surproduisant la phéromone (Figure 35). Le niveau maximum de luminescence relative (URL/OD₆₀₀) émis par la souche TIL1563 ($\Delta pptAB$ pBV5030::P_{32shp1358}) est comparable à celui du contrôle négatif, la souche TIL1214 ($\Delta shp1358$ pBV5030::P₃₂). Donc, la quantité infime de phéromones matures détectées dans le SN de la souche $\Delta pptAB$ surproduisant la phéromone SHP₁₃₅₈ par la méthode ciblée en SM ne peut pas induire une réponse biologique significative.

Résultats-Chapitre5.

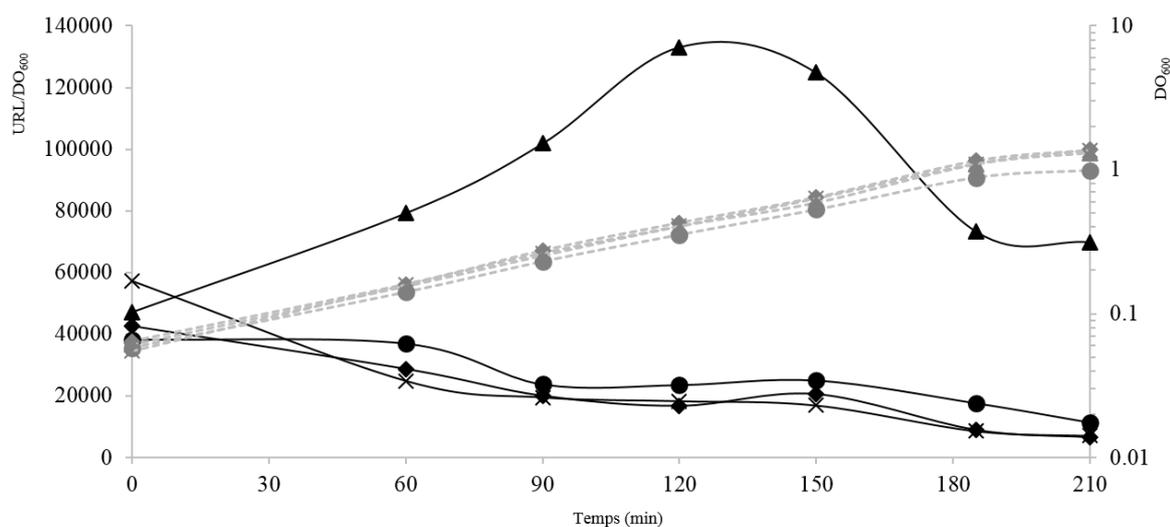


Figure 35. La croissance et l'activité luciférase en co-culture entre le biosenseur de phéromone SHP₁₃₅₈ et différentes souches. La croissance et l'activité luciférase des co-cultures entre le biosenseur $P_{shp1358}$ -luxAB Δshp_{1358} et les souches de contrôle négatif TIL1214 (Δshp_{1358} pBV5030::P₃₂) (●), sauvage surproduisant la phéromone TIL1559 (pBV5030::P₃₂shp₁₃₅₈) (▲), TIL1206 (Δeep pBV5030::P₃₂shp₁₃₅₈) (◆), TIL1563 ($\Delta pptAB$ pBV5030::P₃₂shp₁₃₅₈) (×). Les souches ont été cultivées dans MCD à 37°. La cinétique de croissance (DO₆₀₀) est en ligne grise discontinue et l'activité relative luciférase (RLU/DO₆₀₀) est en ligne noire continue. Ces données sont représentatives de deux expériences indépendantes.

Maintenant que nous savons que le transporteur PptAB prend en charge la phéromone mature de SHP₁₃₅₈, nous nous interrogeons sur sa spécificité d'export. En d'autres termes, peut-il exporter le précurseur ou les formes intermédiaires/complémentaires de la phéromone mature de SHP₁₃₅₈. Nous savons que les étapes de maturation et de sécrétion sont intrinsèquement liées mais nous ne connaissons pas précisément le processus de l'étape de maturation. En effet, même si le rôle de la protéase Eep, appartenant à la famille de S2P, dans la maturation de la phéromone SHP₁₃₅₈ est connu, les étapes du processus de maturation de cette phéromone n'ont pas été élucidées. On peut imaginer deux scénarios impliquant la protéase Eep. Dans le premier scénario, seule la protéase Eep intervient pour libérer la forme mature de SHP. Dans le second, d'autres protéases participent avec Eep au processus de maturation (Figure 36).

Résultats-Chapitre5.

Dans une maturation à plusieurs étapes, d'autres protéases peuvent intervenir en amont de la protéase Eep et générer des formes intermédiaires (Figure 36) et les phéromones matures. Dans le cas d'une maturation en une seule étape, la protéase Eep génère la forme complémentaire en région N-terminale à la phéromone mature (Figure 36) et la phéromone mature. Dans les deux cas, nous nous sommes demandés si les formes générées pouvaient être prises en charge par le transporteur PptAB.

Différents scénarios de la maturation		Substrats potentiels du transporteur PptAB	
		Si Eep présente	Si Eep absente
Si plusieurs étapes	Clivage avant Eep	Forme mature	Forme intermédiaire
Si une seule étape	Clivage par Eep	Forme complémentaire et mature Ou Forme mature	Précurseur ou Aucune forme

Figure 36. Les différentes formes de phéromones qui pourraient être exportées par le transporteur PptAB en présence ou en absence de la protéase Eep.

Nous avons supposé que la souche TIL1206 (Δeep pBV5030::P₃₂-shp₁₃₅₈) déléetée pour le gène *eep* codant la protéase et surproduisant la phéromone SHP₁₃₅₈ accumulerait le précurseur et/ou les formes intermédiaires en quantités plus importantes (Figure 36) en comparaison avec les souches avec le gène *eep* fonctionnel et surproduisant la phéromone telles que la souche TIL1559 (pBV5030::P₃₂-shp₁₃₅₈) que j'ai construite ou la souche TIL1213 ($\Delta amiCDE$ pBV5030::P₃₂-shp₁₃₅₈).

Dans l'hypothèse de maturation en plusieurs étapes, nous avons cherché toutes les formes intermédiaires probablement générées par les protéases impliquées en amont de la protéase Eep (Figure 36 et Figure 37). Comme la forme mature (SHP₁₃₅₈¹⁶⁻²⁴) correspond à la région C-terminale de la phéromone, nous avons supposé un clivage à partir de la région N-terminale du précurseur. Nous avons tout d'abord généré un tableau avec les masses théoriques d'ions de mono à trois fois chargés correspondants aux séquences de SHP₁₃₅₈²⁻²⁴ à SHP₁₃₅₈²⁻¹⁵. La Figure 37 illustre le principe et le tableau en ANNEXE C donne les séquences et les masses théoriques de toutes les formes recherchées. Nous n'avons pas identifié des masses théoriques correspondant au précurseur sous sa forme naturelle ou oxydée dans le SN de la souche déléetée pour le gène *eep* surproduisant la phéromone, TIL1206 (Δeep

Résultats-Chapitre5.

pBV5030::P_{32shp1358}). En conditions artificielles de surproduction, on peut supposer que les SN de la souche TIL1559 (pBV5030::P_{32shp1358}) ou de la souche TIL1213 (Δ amiCDE pBV5030::P_{32shp1358}) délétée pour le transporteur Ami peuvent contenir ces formes intermédiaires si ces formes sont prises en charge par le transporteur PptAB. La recherche dans les différents SN n'a pas permis de détecter les ions correspondants à ces formes non plus. Ainsi, les formes intermédiaires de la forme mature, si elles sont produites, resteraient à l'intérieur de la bactérie et ne seraient pas exportées via PptAB.

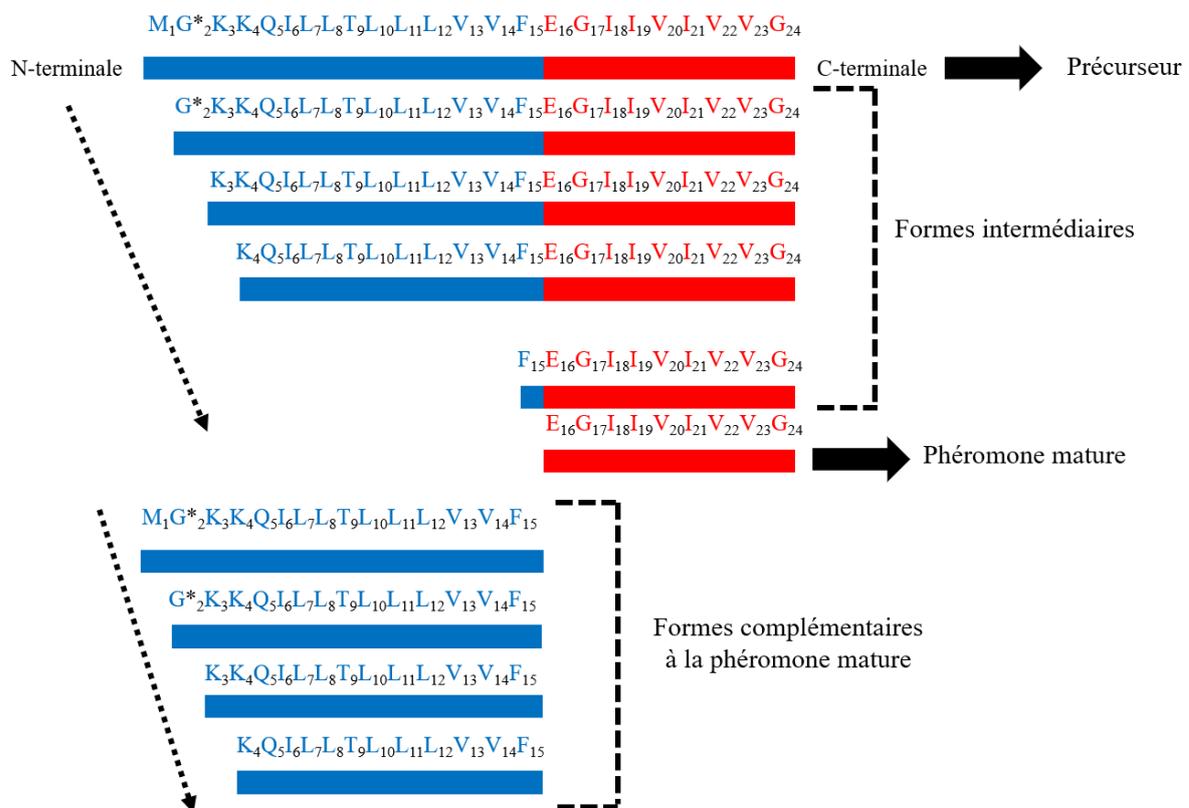


Figure 37. Schéma montrant la séquence des différentes formes intermédiaires et complémentaires recherchées. Les masses des différents ions de précurseurs (SHP₁₃₅₈¹⁻²⁴) à SHP₁₃₅₈¹⁵⁻²⁴ ainsi que celles des formes complémentaires SHP₁₃₅₈¹⁻¹⁵ à SHP₁₃₅₈⁷⁻¹⁵ ont été recherchées. *Une glycine a été rajoutée en plus lors de construction de plasmide par rapport à la séquence du SHP₁₃₅₈ produit naturellement.

Sur les trois réplicats biologiques réalisés, la forme mature a uniquement été détectée dans un SN de la souche TIL1206 (Δ eep pBV5030::P_{32shp1358}) (résultat non-montré). Nous avons ainsi pu déduire le rôle essentiel de la protéase Eep dans la production de la phéromone mature. Cette détection seulement sur l'une des trois réplicats biologiques peut être attribué à un clivage de la phéromone par d'autres

Résultats-Chapitre5.

endopeptidases, c'est-à-dire des peptidases intracellulaires. Cette hypothèse est plausible car on est en conditions de surproduction donc très artificielle. L'expérience de co-culture réalisée avec la souche délétée pour le gène *eep* surproduisant la phéromone SHP₁₃₅₈ montre que le maximum de luminescence relative est comparable à celui obtenu lors de la co-culture avec la souche TIL1214 (Δshp_{1358} pBV5030::P₃₂). Donc, en conditions de surproduction, la forme active produite en absence de la protéase Eep n'est pas suffisante pour induire une réponse biologique significative (Figure 35).

Dans le cas d'une seule étape de maturation, la génération des formes complémentaires de la phéromone mature, correspondant à la région N-terminale du précurseur est inévitable et on peut imaginer que ces formes puissent aussi être soumises à des étapes de protéolyses supplémentaires (Figure 37). Ces formes peuvent soit être exportées par le transporteur PptAB compte tenu qu'elles se trouvent aussi au niveau de la membrane soit rester à l'intérieur de la bactérie sans être prises en charge par PptAB.

Nous avons recherché ces formes dans les SN des souches TIL1159 (pBV5030::P_{32shp1358}), TIL1213 ($\Delta amiCDE$ pBV5030::P_{32shp1358}) mutée pour le transporteur Ami et TIL1206 (Δeep pBV5030::P_{32shp1358}) mutée pour la protéase Eep surproduisant la phéromone SHP₁₃₅₈. Aucun ion avec les masses théoriques correspondants aux formes complémentaires à la forme mature n'a été détecté. On peut supposer que les formes complémentaires de la forme mature sont générées en intracellulaire mais ne sont pas exportées par le transporteur PptAB ou sont rapidement dégradées par des protéases extracellulaires à la suite de la sécrétion. Le Tableau 6 récapitule les informations sur les séquences recherchées.

Dans le cas de maturation uniquement par la protéase Eep, le précurseur de la phéromone noté SHP₁₃₅₈^{1-24*} serait la seule forme produite en cas de délétion du gène *eep* (Figure 36). La séquence du précurseur en conditions de surproduction (SHP₁₃₅₈^{1-24*}) varie de la séquence de précurseur naturel à un AA près où une glycine a été rajouté entre la première méthionine et la troisième lysine en raison de contraintes de clonage. Plusieurs essais de clonage avec la séquence de précurseur naturel n'ont pas donné de résultats. La recherche dans le SN de TIL1206 (Δeep pBV5030::P_{32-shp1358}) pour les peptides ionisés

Résultats-Chapitre5.

avec l'analyse MS1 correspondant à la masse théorique de la séquence complète de la phéromone surproduite n'a pas non plus permis de détecter la présence du précurseur (ANNEXE C). Nous n'avons pas exclu la possibilité que la méthionine (1^{er} AA du précurseur) soit sous forme oxydée dans le SN. Les peptides ionisés correspondants à la masse théorique du précurseur sous forme oxydée (SHP₁₃₅₈^{1oxydé-24*}) n'ont cependant pas non plus été détectée en MS1. En conditions de surproduction, la souche TIL1559 (pBV5030::P_{32-shp1358}) ou mutée pour le transporteur Ami TIL1213 (Δ amiCDE pBV5030::P_{32-shp1358}) pourrait générer le précurseur. La recherche de la présence du précurseur natif ou de sa forme oxydée dans ces SN n'a rien donné.

Tableau 6. Les séquences et les masses correspondantes aux formes complémentaires à la forme mature.

Annotation	Séquence	[M+H] ⁺	[M+2H] ²⁺	[M+3H] ³⁺
SHP ₁₃₅₈ ¹⁻¹⁵	MGKKQILLTLLLVF	1716.08564	858.54648	572.70009
SHP ₁₃₅₈ ^{1oxydé-15}	M _{oxydé} GKKQILLTLLLVF	1732.08054	866.54393	578.03173
SHP ₁₃₅₈ ²⁻¹⁵	GKKQILLTLLLVF	1585.04515	793.02624	529.01993
SHP ₁₃₅₈ ³⁻¹⁵	KKQILLTLLLVF	1528.02369	764.51551	510.01278
SHP ₁₃₅₈ ⁴⁻¹⁵	KQILLTLLLVF	1399.92873	700.46802	467.31446
SHP ₁₃₅₈ ⁵⁻¹⁵	QILLTLLLVF	1271.83376	636.42054	424.61614
SHP ₁₃₅₈ ⁶⁻¹⁵	ILLTLLLVF	1143.77519	572.39125	381.92994
SHP ₁₃₅₈ ⁷⁻¹⁵	LLTLLLVF	1030.69112	515.84922	

Pour valider le fait que cette « non-détection » dans le SN correspond à une absence de la forme de précurseur dans les SN et n'est pas lié à un biais de la méthode de détection utilisée, nous avons injecté le peptide synthétique du précurseur dilué dans le SN de la souche TIL1214 (Δ shp1358 pBV5030::P₃₂). Dans nos conditions d'analyse, le peptide synthétique du précurseur n'est pas détectable par SM. En effet, le peptide synthétisé, par sa nature très hydrophobe est difficile à dissoudre en solution et à éluer de la colonne avec le gradient du solvant utilisé. Dans nos conditions, il est élué à une concentration d'acétonitrile supérieure à 99% donc au-delà du gradient d'élution. Il s'oxyde aussi spontanément par la présence d'une méthionine dans la séquence. Par conséquent, il se trouve sous forme non-modifiée et aussi oxydée. Nous avons aussi constaté que le mélange du peptide synthétisé donne un pic

Résultats-Chapitre5.

correspondant à la forme mature mais aussi d'autres pics dont on n'a pas identifié les formes. Face à la complexité de mise au point de la détection du précurseur synthétique, nous n'avons pas pu valider la conclusion de nos analyses sur la forme du précurseur recherché.

5.3. Discussion et conclusion

L'approche de SM a confirmé l'absence de production des phéromones matures SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈ en absence du transporteur PptAB. Cette approche a aussi mis en évidence que la production de la forme mature SHP₅ dans le SN est dépendante de la présence du transporteur PptAB. En revanche, nos résultats suggèrent que la production de la phéromone mature SHP₅ est indépendante du transporteur Ami. D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

Les facteurs biotiques tels qu'une faible production (pouvant être liée à un stade physiologique non-optimal pour la récolte de SN) peut limiter la détection des phéromones en SM. Cette hypothèse peut expliquer la non-détection des formes matures SHP₀, SHP₁ et SHP₄ dans le SN de la souche sauvage. Les difficultés à mettre au point les conditions de détection de la phéromone ComS produite dans le SN de la souche LMD-9 ont conduit à la détecter dans une condition artificielle. En effet dans une étude antérieure, la phéromone ComS a été surproduite dans une souche $\Delta amiCDE$ permettant son accumulation dans le SN. Ce dernier a été traité au préalable afin de limiter l'oxydation de la cystéine présente dans la séquence de ComS et concentré par SPE (Gardan et al., 2013). Pour répondre à la question d'export de la phéromone ComS, j'aurais pu surproduire la phéromone ComS dans une souche double mutante pour les gènes *amiCDE* et *pptAB* et utiliser la même méthode de détection mise en place dans cette étude. Face à la complexité de construction du mutant et la condition artificielle de l'expérience je n'ai pas entrepris cette démonstration.

Notre étude montre que le transporteur PptAB est l'acteur principal de la sécrétion de la forme mature de la phéromone SHP₁₃₅₈. La recherche de détection du précurseur, des formes intermédiaires ou complémentaires à la forme mature dans différents SN par SM n'a pas donné de résultats définitifs. Nos

Résultats-Chapitre5.

résultats suggèrent toutefois que seule la forme mature est prise en charge par le transporteur PptAB pour l'export. Ainsi, les formes intermédiaires ou complémentaires à la forme mature seraient générées en intracellulaire et non prises en charge par le transporteur PptAB. Si cette hypothèse est juste, une approche peptidomique intracellulaire permettant de détecter les peptides présents dans le cytoplasme serait un moyen d'avancer sur ce projet. Toutefois on ne peut exclure l'implication d'endopeptidases qui dégraderaient ces formes. Pour valider le résultat de non-détection de toutes les formes recherchées par SM, il faudrait démontrer que ces formes sont détectables par notre méthode d'analyse. Nous n'avons pas pu valider la détection du précurseur dans les conditions d'analyse avec le peptide synthétique du précurseur. Compte tenu du coût et des difficultés à synthétiser et injecter les peptides de nature très hydrophobe, nous n'avons pas réalisé cette validation pour toutes les formes recherchées et non-détectées. Nous avons également essayé de cloner le gène *shp₁₂₉₉* sous le contrôle d'un promoteur constitutif pour valider nos hypothèses également avec la phéromone SHP₁₂₉₉ du groupe III. Les quelques essais de clonage réalisés n'ont cependant pas donné de résultats concluants.

Chapitre6. Les transporteurs d'oligopeptides PptAB, Ami et la protéase

Eep contrôlent l'expression de tous les gènes situés en aval des gènes

codant les régulateurs Rgg de la souche LMD-9 de

Streptococcus thermophilus

6.1. Introduction

Nous avons montré que le transporteur PptAB sécrète au moins quatre phéromones matures, ComS, SHP₁₂₉₉, SHP₁₃₅₈ et SHP₅, dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus* (Chapitre 4 et Chapitre 5). Donc, il contrôle l'expression des gènes cibles des régulateurs dont l'activité est contrôlée par ces phéromones. Nous avons donc voulu identifier l'ensemble des gènes cibles contrôlé par ces systèmes et éventuellement par d'autres systèmes similaires. Pour répondre à cette question, nous avons mis en place une approche globale par une étude transcriptomique qui permet de séquencer l'ensemble de transcrits (RNA-Seq) à un moment donné de la croissance. La stratégie est de comparer le niveau de transcrits entre une souche délétée pour le gène étudié et une souche sauvage afin d'identifier les gènes exprimés de manière différentielle entre les deux conditions. Nous avons voulu valider si l'expression des gènes dépendante du transporteur PptAB était contrôlée par un mécanisme de QS mettant en jeu la protéase Eep et le transporteur Ami. Pour cela nous avons aussi identifié les gènes dont l'expression est dépendante de ces deux acteurs impliqués dans la maturation et la re-internalisation respectivement des phéromones de QS par la même approche.

Nous savons que le fonctionnement des systèmes du QS déjà étudiés chez LMD-9 est optimal en MCD et en fin de phase exponentielle (Ibrahim et al., 2007b; Fleuchot et al., 2011). Nous savons également que la cinétique de croissance de la souche sauvage diffère de celle de la souche délétée pour les gènes *pptAB* lié à l'inactivation de la compétence dans la souche Δ *pptAB* (Partie 4.2.2.1). Etant donné que le régulon ComR/ComS a été également étudié récemment par une approche transcriptomique dans la

Résultats-Chapitre6.

souche LMD-9 (Mignolet et al., 2018), nous avons décidé de travailler avec les souches délétées pour le gène *comR* afin de comparer le niveau de transcrits à un moment où l'état métabolique est identique entre les différentes souches. Après avoir réalisé les cinétiques de croissance de toutes les souches que j'ai construites pour cette expérience en trois répétitions biologiques (résultats non-montrés), j'ai confirmé qu'elles ont une cinétique de croissance identique. En sachant que les systèmes Rgg/SHP déjà étudiés fonctionnent de manière optimale en mi-phase exponentielle dans nos conditions, nous avons choisi ce point pour notre comparaison. Par conséquent, les transcrits totaux extraits de cellule récoltés à DO_{600} 1 pour les souches TIL1562 ($\Delta pptAB$ *comR::aphA3*), TIL1561 (Δeep *comR::aphA3*), TIL1564 ($\Delta amiCDE$ *comR::aphA3*) ont été comparés avec ceux récoltés à la même DO pour la souche TIL1560 (*comR::aphA3*) qui sera considérée comme un contexte sauvage dans la suite par soucis de simplification.

Pour l'identification des transcrits issus de RNA-Seq, nous avons rajouté une liste de 858 petits gènes à l'annotation du génome de la souche LMD-9 de NCBI. Cette liste de petits gènes a été obtenue à l'aide du logiciel d'annotation BactgeneSHOW (Nicolas et al., 2002 ;Ibrahim et al., 2007a).

6.2. Résultats

Le traitement des données issues de l'analyse de l'expression différentielle des transcrits des souches mutantes TIL1562 ($\Delta pptAB$ *comR::aphA3*), TIL1561 (Δeep *comR::aphA3*), TIL1564 ($\Delta amiCDE$ *comR::aphA3*) avec le contexte sauvage TIL1560 (*comR::aphA3*) donne trois profils similaires. Dans les trois souches mutantes, tous les gènes identifiés sont sous-exprimés comparés au contexte sauvage. Parmi ces gènes sous-exprimés dans les trois souches mutantes, tous à l'exception d'un opéron sont localisés en aval des gènes *rgg*. Cet ensemble de gènes sera appelé cibles proximales pour la suite. Nous avons aussi identifié un opéron qui est sous-exprimé dans les trois souches mutantes et qui n'est pas localisé à proximité d'un gène codant un régulateur Rgg. Je vais considérer cet opéron comme une cible

Résultats-Chapitre6.

distale. Je passerai ensuite en revue ces différents types de cibles. Enfin j'aborderai les gènes sous-exprimés seulement en cas de délétion du gène *eep* comparé au contexte sauvage.

6.2.1. L'expression des gènes sous le contrôle de mécanismes de quorum sensing dépendant des transporteurs PptAB et Ami et de la protéase Eep

6.2.1.1. Expression très forte dans un contexte sauvage et répression très forte dans les trois souches mutantes de deux opérons : Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ et Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈

Les gènes proximaux des loci *rgg₁₂₉₉/shp₁₂₉₉* et *rgg₁₃₅₈/shp₁₃₅₈* sont très fortement sous-exprimés dans les trois souches mutantes, TIL1562 (Δ *pptAB comR::aphA3*), TIL1564 (Δ *amiCDE comR::aphA3*) et TIL1561 (Δ *eep comR::aphA3*) comparée à celle de la souche TIL1560 (*comR::aphA3*). Les deux gènes *shp* ont aussi le même comportement que ces cibles proximales et sont donc exprimés à très fort niveau dans un contexte sauvage comparé au contexte mutant. L'ensemble des résultats est présenté dans les tableaux 7 à 10 (Tableau 7, Tableau 8 et Tableau 10).

Pour le système Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉, le gène *shp₁₂₉₉* était la seule cible validée expérimentalement au début de la thèse (Fleuchot et al., 2013). Nos analyses montrent que le régulon Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ contrôle également l'expression de huit autres gènes comprenant deux petits gènes. Parmi ces gènes cibles, souvent de fonctions inconnues, certains ont une annotation automatique correspondant à des transporteurs (perméases ou ABC) ou à des protéines avec un domaine d'endopeptidase Pep-F like (Figure 38). On peut supposer que cet ensemble de gènes est impliqué dans la production d'un peptide de la famille RiPPs (Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides, (Arnison et al., 2013)). Quant au régulon de Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ déjà décrit (Partie 3.6.1), il comprend les gènes codant le streptide ainsi que la maturase et le transporteur impliqué dans la maturation et l'export du streptide. Ces gènes sont sous-exprimés d'un facteur au moins 80 dans la souche TIL1562 (Δ *pptAB comR::aphA3*) (Tableau 7). Cela est cohérent avec la sous-expression de gène *shp₁₃₅₈*. De plus, deux gènes annotés codant une protéine contenant un domaine SPASM (Iron-sulfur cluster binding domain) et un

Résultats-Chapitre6.

transporteur à sodium sont également sous-exprimés d'un facteur au moins 115 dans la souche TIL1562 (Δ *pptAB comR::aphA3*) (Figure 38). Ainsi, ces deux gènes sont également contrôlés par le système Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ en plus des quatre gènes cibles déjà connus.

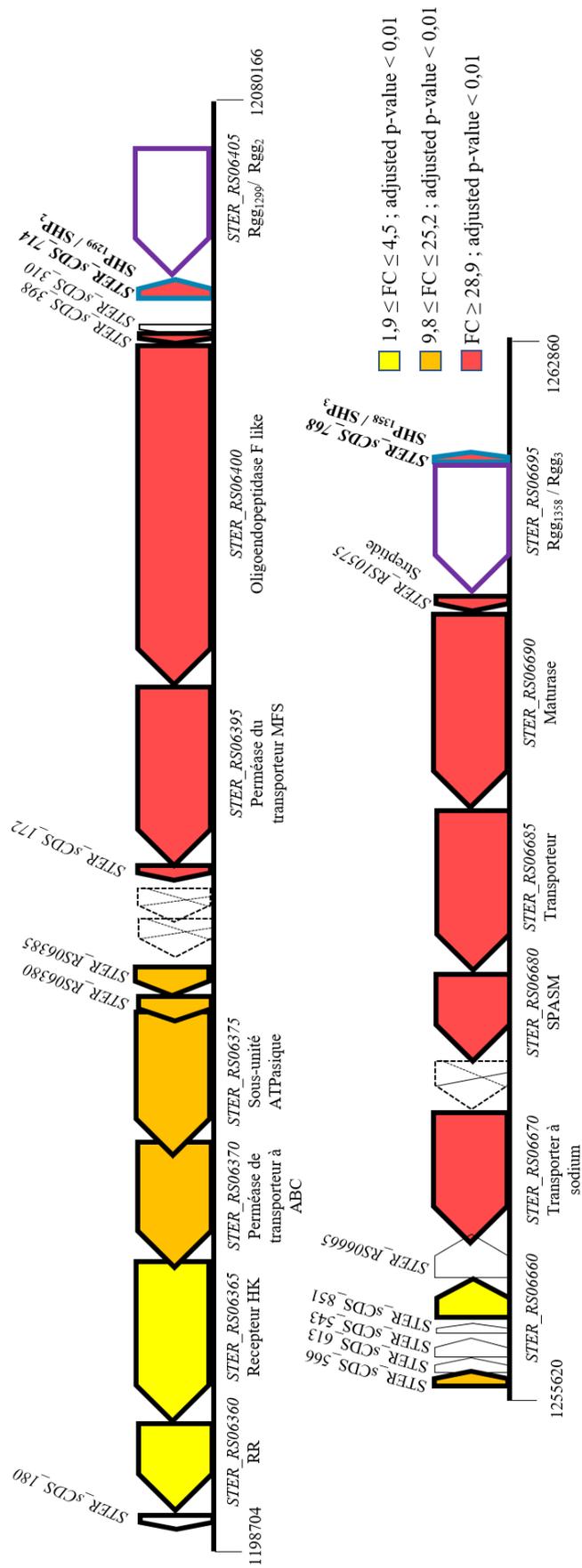


Figure 38 Les gènes cibles associés aux loci *rgg1299/shp1299* et *rgg1358/shp1358* sous exprimés en cas de délétion des gènes *pptAB*, *amiCDE* ou *eep*.

Résultats-Chapitre6.

6.2.1.2. Expression forte dans un contexte sauvage et répression forte dans les trois souches mutantes de gènes proximaux des loci *rgg4/shp4* et *rgg5/shp5*

Nous avons aussi identifié, un ensemble de gènes cibles de deux loci, *rgg4/shp4* et *rgg5/shp5* fortement exprimé dans un contexte sauvage tandis que leur expression est fortement réprimée dans les trois souches mutantes.

A proximité du système Rgg₄/SHP₄, l'expression d'un seul gène, *STER_RS07535*, codant à un transporteur perméase varie avec un facteur de 28 à 30 dans les trois souches mutantes suggérant que l'expression de ce gène est soumise à un mécanisme de QS. Dans les trois souches mutantes, un petit gène, *STER_sCDS_560*, situé à quelques gènes près de ce système est sous-exprimé d'un facteur 4 mais son niveau d'expression dans la souche TIL1560 (*comR::aphA3*) reste faible (<50 reads) (Figure 39) (Tableau 7, Tableau 8 et Tableau 10). Nous devons vérifier si ce petit gène est vraiment une cible distale du système Rgg₄/SHP₄ et quelle est la signification biologique de cette expression différentielle.

L'organisation génétique des gènes cibles situés en aval du locus *rgg5/shp5* est similaire à celle du locus *rgg1358/shp1358*. Cependant le facteur de variation entre le contexte sauvage et le contexte mutant n'est pas comparable pour les gènes cibles similaires des deux systèmes.

L'expression des gènes codant les gènes *shp* ne varie pas de manière différentielle ou très peu (*shp5* avec p-value ajustée >0,01) pour ces deux loci suggérant que ces gènes ne sont pas cibles de leurs systèmes associés (Tableau 7, Tableau 8 et Tableau 10).

6.2.1.3. Expression faible dans un contexte sauvage et répression faible dans les trois souches mutantes de gènes proximaux du locus *rgg1/shp1*

Les gènes cibles associés au locus *rgg1/shp1* sont faiblement exprimés dans un contexte sauvage et réprimés dans un contexte mutant. Les gènes cibles associés à ce locus sont sous-exprimés avec un facteur variant de 2 à 4. Ils sont les moins exprimés parmi tous les gènes exprimés de manière

Résultats-Chapitre6.

différentielle et situés à proximité des loci *rgg/shp*. Parmi les gènes cibles du locus *rgg1/shp1* se trouve le gène annoté pour une enzyme à radical SAM comme c'est le cas des loci *rgg1358/shp1358* et *rgg5/shp5*. Il y a également deux petits gènes, un gène annoté pour une enzyme arginase-like et un transporteur (Figure 39).

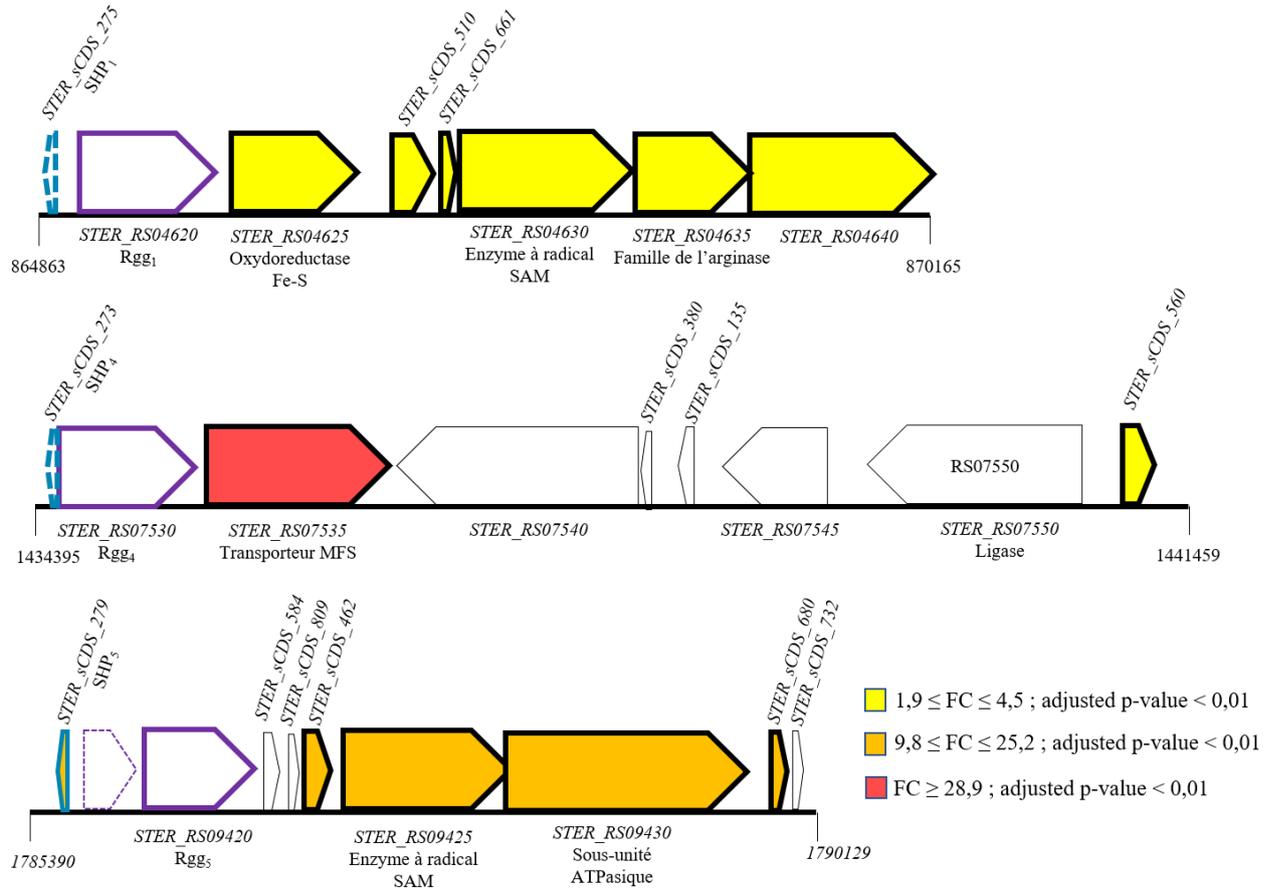


Figure 39. Les gènes cibles associés aux loci *rgg1/shp1*, *rgg4/shp4* et *rgg5/shp5* exprimés de manière différentielle dans les trois conditions d'analyse.

Comme le cas du gène *shp4*, le gène *shp1* n'est pas exprimé dans le contexte sauvage suggérant qu'il n'est pas une cible proximale du système associé.

Résultats-Chapitre6.

6.2.1.4. Identification d'une cible distale : opéron de biosynthèse de la cystéine soumise à un mécanisme de quorum sensing

La comparaison des transcrits entre les souches mutantes et la souche sauvage indique la sous-expression d'un cluster de trois gènes distaux à tous les loci *rgg/shp*. Ce cluster (*STER_RS04380*, *STER_RS04385* et *STER_RS04390*) est sous-exprimé au moins avec un facteur quatre dans les trois souches. L'expression de ces gènes n'est pas complètement abolie dans les trois souches mutantes. Ainsi, ce cluster est exprimé à un niveau basal et a un niveau de contrôle supplémentaire au QS dans nos conditions. L'annotation et les études *in silico* indiquent que cet opéron est impliqué dans la biosynthèse de la cystéine notamment dans la conversion de la serine vers la cystéine (Kovaleva and Gelfand, 2007), (Liu et al., 2009). La validation expérimentale sur le rôle de ces gènes est manquante dans la littérature (Figure 40).

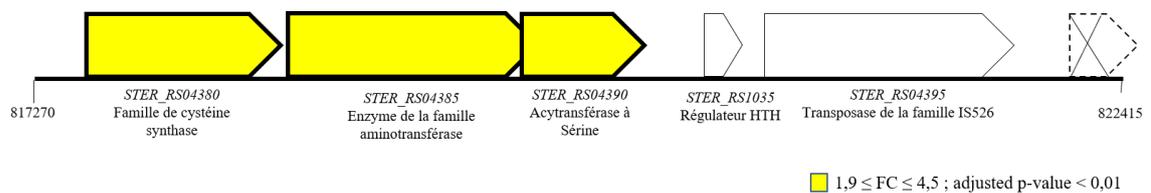


Figure 40. Une cible distale aux loci *rgg/shp* probablement impliqué dans la biosynthèse de la cystéine.

Résultats-Chapitre6.

Tableau 7. Les loci des gènes différentiellement exprimés entre la souche TIL1560 (*comR::aphA3*) et la souche TIL 1562 (*ApptAB comR::aphA3*).

ID	Fold Change	TIL 1560 ³	TIL1562 ³	Start	End	Strand	Gene ID	Length (AA)	Description
Cluster cystéine									
STER_RS04380	3,6	703	2552	817570	818481	+		304	cysteine synthase family protein
STER_RS04385	3,8	1138	3818	818503	819687	+		395	aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme
STER_RS04390	3,9	484	1704	819629	820210	+		194	serine acetyltransferase
locus <i>rgg 1/shp 1</i>									
STER_sCDS_265	NR	20	7	864863	864934	-	<i>shp 1</i>	24	SHP₁
STER_RS04620	NR	1214	1296	865021	865878	+	<i>rgg 1</i>	286	Rgg1
STER_RS04625	3,0	3966	1322	865938	866738	+		267	Fe-S oxidoreductase
STER_sCDS_510	3,8	990	259	866798	866947	+		50	
STER_sCDS_661	2,5	351	141	867030	867119	+		30	
STER_RS04630	2,7	3087	1132	867149	868246	+		366	radical SAM protein
STER_RS04635	2,8	1748	629	868243	868986	+		248	arginase family protein
STER_RS04640	2,2	3534	1641	868993	870165	+		391	MFS transporter
locus <i>rgg 2/shp 2</i>									
STER_sCDS_180	NR	92	51	1198704	1198796	-		31	
STER_RS06360	2,0	601	296	1198824	1199426	-	<i>rrO6</i>	201	response regulator transcription factor
STER_RS06365	1,9	1125	593	1199423	1200517	-	<i>hkO6</i>	365	sensor histidine kinase
STER_RS06370	11,2	504	45	1200510	1201247	-		246	ABC transporter permease
STER_RS06375	12,8	545	43	1201244	1202125	-		294	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein
STER_RS06380	13,3	111	8	1202118	1202297	-		60	hypothetical protein
STER_RS06385	18,7	183	10	1202308	1202517	-		70	hypothetical protein
STER_RS06390	ND	ND	ND	1202668	1202934	-		87	hypothetical protein (incomplete)
STER_RS10535	ND	ND	ND	1202925	1203152	-		74	hypothetical protein (incomplete)
STER_sCDS_172	56,6	8877	157	1203195	1203290	-		32	
STER_RS06395	59,7	93273	1563	1203277	1204506	-		410	MFS transporter permease
STER_RS06400	49,7	195871	3942	1204484	1206817	-		778	oligopeptidase F
STER_sCDS_398	46,3	97	2	1206867	1206920	-		18	
STER_sCDS_310	NR	1	1	1206895	1206960	-		22	
STER_sCDS_714	67,4	1015	15	1207133	1207213	+	<i>shp 2</i>	27	SHP₂/SHP₁₂₉₉
STER_RS06405	NR	924	1060	1207191	1208066	-	<i>rgg 2</i>	292	Rgg2/Rgg1299
locus <i>rgg 3/shp 3</i>									
STER_sCDS_566	9,8	76	8	1255722	1255835	+		38	
STER_sCDS_613	NR	25	31	1256064	1256165	+		34	
STER_sCDS_543	NR	26	14	1256228	1256353	+		42	
STER_sCDS_851	ND	0	0	1256331	1256390	+		20	
STER_RS06660	3,1	137	44	1256335	1256604	+		90	hypothetical protein
STER_RS06665	NR	55	70	1256764	1257063	+		100	
STER_RS06670	114,6	32175	281	1257163	1258074	-		304	sodium transporter
STER_RS06680	132,9	21819	164	1258390	1258992	-		201	SPASM domain-containing protein
STER_RS06685	113,3	31202	275	1259086	1260177	-		364	MULTISPECIES: transporter
STER_RS06690	109,6	53740	490	1260174	1261493	-		440	KxxxW cyclic peptide radical SAM maturase
STER_RS10575	78,0	6544	84	1261563	1261655	-		31	KxxxW-cyclized peptide pheromone
STER_RS06695	NR	450	565	1261738	1262598	-	<i>rgg 3</i>	287	Rgg3/Rgg1358
STER_sCDS_768	114,8	723	6	1262689	1262760	+	<i>shp 3</i>	24	SHP₃/SHP₁₃₅₈
locus <i>rgg 4/shp 4</i>									
STER_sCDS_273	NR	3	8	1434537	1434608	-	<i>shp 4</i>	24	SHP₄
STER_RS07530	NR	648	628	1434695	1435558	+	<i>rgg 4</i>	288	Rgg4
STER_RS07535	28,9	19052	660	1435675	1436853	+		393	MFS transporter
STER_RS07540	1,3	11160	14465	1437099	1438643	-		515	
STER_sCDS_380	NR	85	112	1438687	1438743	-		19	
STER_sCDS_135	NR	120	169	1438746	1438853	-		36	
STER_RS07545	NR	729	946	1438993	1439658	-		222	
STER_RS07550	NR	5858	6954	1439747	1441120	-		458	
STER_sCDS_560	3,2	39	12	1441243	1441359	+		39	
<i>pptAB</i>									
STER_RS07710	NR	90	129	1471347	1471433	-	<i>t-RNA ser</i>	29	t-RNA Ser
STER_RS07715	NR	6615	5770	1471493	1472134	-	t-RNA	214	methyltransferase TrmB
STER_RS07720	NR	7180	5810	1472144	1472935	-		264	Phosphotransferase family
STER_RS07725*	37,9	5837	154	1472993	1474030	-	<i>pptB</i>	346	Permease
STER_RS07730*	2491,3	3491	1	1474027	1474758	-	<i>pptA</i>	244	ABC transporter ATP-binding protein
locus <i>rgg 5/shp 5</i>									
STER_sCDS_279	1,9	139	74	1785690	1785761	-	<i>shp 5</i>	24	SHP₅
STER_RS09420	NR	1102	1194	1786014	1786712	+	<i>rgg 5</i>	233	Rgg5
STER_sCDS_584	NR	71	92	1786790	1786897	+		36	
STER_sCDS_809	ND	0	0	1786854	1786919	+		22	
STER_sCDS_462	13,1	1242	95	1786909	1787088	+		60	
STER_RS09425	14,9	15002	1007	1787097	1788152	+		352	radical SAM protein
STER_RS09430	15,4	18315	1192	1788145	1789686	+		514	ABC transporter ATP-binding protein
STER_sCDS_680	19,6	150	8	1789819	1789905	+		29	
STER_sCDS_732	NR	10	0	1789952	1790029	+		26	

NR, not significantly regulated (adjusted p-value>0.01)

ND, not determined

³Average of normalized read counts from three biological repetitions

*genes deleted in the mutant strain

1,9 ≤ FC ≤ 4,5 ; adjusted p-value < 0,01

9,8 ≤ FC ≤ 25,2 ; adjusted p-value < 0,01

FC ≥ 28,9 ; adjusted p-value < 0,01

Résultats-Chapitre6.

Tableau 8. Les loci des gènes différentiellement exprimés entre la souche TIL1560 (comR::aphA3) et la souche TIL 1564 (Δ amiCDE comR::aphA3).

ID	Fold Change	TIL1560 ^a	TIL1564 ^a	Start	End	Strand	Gene ID	Length (AA)	Description
Cluster cystéine									
STER_RS04380	3,9	2625	669	817570	818481	+		304	cysteine synthase family protein
STER_RS04385	3,8	3926	1040	818503	819687	+		395	aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme
STER_RS04390	3,9	1753	452	819629	820210	+		194	serine acetyltransferase
locus rgg₁/shp₁									
STER_sCDS_265	ND	20	5	864863	864934	-	shp ₁	24	SHP₁
STER_RS04620	NR	1249	1225	865021	865878	+	rgg ₁	286	Rgg₁
STER_RS04625	3,2	4080	1275	865938	866738	+		267	Fe-S oxidoreductase
STER_sCDS_510	4,0	1018	256	866798	866947	+		50	
STER_sCDS_661	2,4	361	149	867030	867119	+		30	
STER_RS04630	3,0	3176	1054	867149	868246	+		366	radical SAM protein
STER_RS04635	3,1	1799	583	868243	868986	+		248	arginase family protein
STER_RS04640	2,6	3636	1412	868993	870165	+		391	MFS transporter
locus rgg₂/shp₂									
STER_sCDS_180	2,1	95	44	1198704	1198796	-		31	
STER_RS06360	2,0	618	304	1198824	1199426	-		201	response regulator transcription factor
STER_RS06365	1,9	1157	605	1199423	1200517	-		365	sensor histidine kinase
STER_RS06370	15,0	519	35	1200510	1201247	-		246	ABC transporter permease
STER_RS06375	19,5	561	28	1201244	1202125	-		294	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein
STER_RS06380	28,0	115	4	1202118	1202297	-		60	hypothetical protein
STER_RS06385	23,1	188	8	1202308	1202517	-		70	hypothetical protein
STER_RS06390	ND	ND	ND	1202668	1202934	-		87	hypothetical protein (incomplete)
STER_RS10535	ND	ND	ND	1202925	1203152	-		74	hypothetical protein (incomplete)
STER_sCDS_172	184,2	9132	49	1203195	1203290	-		32	
STER_RS06395	186,3	95951	515	1203277	1204506	-		410	MFS transporter permease
STER_RS06400	150,1	201502	1343	1204484	1206817	-		778	oligoendopeptidase F
STER_sCDS_398	531,4	100	0	1206867	1206920	-		18	
STER_sCDS_310	ND	1	2	1206895	1206960	-		22	
STER_sCDS_714	153,7	1043	7	1207133	1207213	+	shp ₂	27	SHP₂/SHP₁₂₉₉
STER_RS06405	NR	951	962	1207191	1208066	-	rgg ₂	292	Rgg₂/Rgg₁₂₉₉
locus rgg₃/shp₃									
STER_sCDS_566	22,7	78	3	1255722	1255835	+		38	
STER_sCDS_613	NR	26	37	1256064	1256165	+		34	
STER_sCDS_543	ND	27	12	1256228	1256353	+		42	
STER_sCDS_851	ND	0	0	1256331	1256390	+		20	
STER_RS06660	3,5	141	40	1256335	1256604	+		90	hypothetical protein
STER_RS06665	NR	56	72	1256764	1257063	+		100	
STER_RS06670	121,4	33091	273	1257163	1258074	-		304	sodium transporter
STER_RS06680	119,6	22440	188	1258390	1258992	-		201	SPASM domain-containing protein
STER_RS06685	99,6	32094	323	1259086	1260177	-		364	MULTISPECIES: transporter
STER_RS06690	112,0	55276	494	1260174	1261493	-		440	KxxxW cyclic peptide radical SAM maturase
STER_RS10575	82,5	6732	82	1261563	1261655	-		31	KxxxW-cyclized peptide pheromone
STER_RS06695	NR	463	594	1261738	1262598	-	rgg ₃	287	Rgg₃/Rgg₁₃₅₈
STER_sCDS_768	104,2	744	7	1262689	1262760	+	shp ₃	24	SHP₃/SHP₁₃₅₈
amiA1CDEF									
STER_RS06920*	1033,8	11926	12	1315155	1316081		amiD		
locus rgg₄/shp₄									
STER_sCDS_273	ND	3	5	1434537	1434608	-	shp ₄	24	SHP₄
STER_RS07530	NR	667	606	1434695	1435558	+	rgg ₄	288	Rgg₄
STER_RS07535	34,2	19596	572	1435675	1436853	+		393	MFS transporter
STER_RS07540	1,4	11479	16325	1437099	1438643	-		515	
STER_sCDS_380	NR	88	126	1438687	1438743	-		19	
STER_sCDS_135	NR	123	183	1438746	1438853	-		36	
STER_RS07545	1,4	750	1048	1438993	1439658	-		222	
STER_RS07550	1,2	6026	7183	1439747	1441120	-		458	
STER_sCDS_560	ND	40	10	1441243	1441359	+		39	
locus rgg₅/shp₅									
STER_sCDS_279	1,9	143	76	1785690	1785761	-	shp ₅	24	SHP₅
STER_RS09420	NR	1134	1177	1786014	1786712	+	rgg ₅	233	Rgg₅
STER_sCDS_584	NR	73	90	1786790	1786897	+		36	
STER_sCDS_809	ND	0	0	1786854	1786919	+		22	
STER_sCDS_462	16,2	1278	79	1786909	1787088	+		60	
STER_RS09425	15,6	15431	988	1787097	1788152	+		352	radical SAM protein
STER_RS09430	15,9	18836	1185	1788145	1789686	+		514	ABC transporter ATP-binding protein
STER_sCDS_680	25,2	155	6	1789819	1789905	+		29	
STER_sCDS_732	ND	10	1	1789952	1790029	+		26	

NR, not significantly regulated (adjusted p-value>0.01)

ND, not determined

^aAverage of normalized read counts from three biological repetitions

*gene deleted in the mutant strain

1,9 ≤ FC ≤ 4,5 ; adjusted p-value < 0,01

9,8 ≤ FC ≤ 25,2 ; adjusted p-value < 0,01

FC ≥ 28,9 ; adjusted p-value < 0,01

Résultats-Chapitre6.

6.2.2. Gènes dont l'expression est uniquement dépendante de la protéase Eep

6.2.2.1. Le gène *amiA3* codant une lipoprotéine : AmiA3

L'analyse d'expression différentielle des transcrits entre la souche TIL1561 (Δeep *comR::aphA3*) et la souche TIL1560 (*comR::aphA3*) indique une sous-expression du gène *amiA3* avec un facteur 4 (Tableau 10). Ce gène code pour une « substrat binding protein » (SBP) de nature lipoprotéique qui est localisé à proximité de l'opéron *amiAICDE* mais n'est pas co-transcrit. L'ensemble de ces gènes codent pour le transporteur Ami. L'expression du gène *amiA3* n'est pas totalement abolie dans la souche TIL1561 (Δeep *comR::aphA3*) et l'expression de l'opéron *amiAICDE* reste invariable entre les deux souches suggérant que l'expression du gène *amiA3* est soumise à un contrôle transcriptionnel supplémentaire dépendant de la protéase Eep en plus de son expression basale.

6.2.2.2. Perte d'un plasmide curable lors d'une étape de délétion des gènes

Tous les gènes du plasmide 1 de référence NCBI [NC_008500.1](#) ne sont pas exprimés dans la souche TIL1561 (Δeep *comR::aphA3*) comparé à la souche TIL1560 (*comR::aphA3*). Le plasmide 1 serait donc absent de la souche TIL1561 (Δeep *comR::aphA3*). Nous avons vérifié cette hypothèse à l'aide d'une PCR amplifiant une région du plasmide 1 dans différents contextes. La Figure 41 montre le gel avec dépôt de l'amplification d'un fragment de plasmide 1. Ce résultat a permis de constater que le plasmide 1 a été perdu lors de l'étape de délétion du gène *comR* dans la souche Δeep et non lors de délétion du gène *eep*. En effet, l'équipe avait constaté lors d'une expérience de curage de plasmides que le plasmide 1 était curable contrairement au plasmide 2 de référence NCBI [NC_008501.1](#) (Résultats non montrés). Les résultats d'analyse d'expression différentielle sont dans le Tableau 9 et le Tableau 10.

Résultats-Chapitre6.

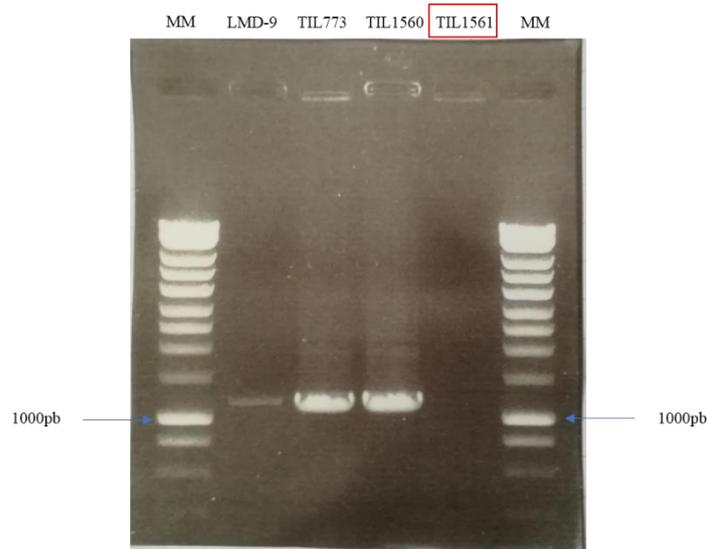


Figure 41. Gel d'électrophorèse de PCR amplifiant un fragment du plasmide 1. La présence du plasmide 1 dans les souches LMD-9, TIL773 (Δ cep), TIL1560 ($comR::aphA3$) est validé par la bande de 1203 pb alors que cette bande est absente de la souche TIL1561 (Δ cep $comR::aphA3$).

Tableau 9. Les gènes du plasmide 1 non-exprimés dans la souche TIL1561 (Δ cep $comR::aphA3$) comparé à la souche TIL 1560 ($comR::aphA3$).

ID	Fold Change	TIL 1560 ^a	TIL1561 ^a	Start	End	Strand	Length (AA)
Plasmide NC_008500.1							
STER_sCDS_986	87,4	16	0	3	59	+	19
STER_RS09805	4930,9	11236	2	65	385	-	107
STER_sCDS_983	629,2	113	0	474	593	-	40
STER_RS09810	1860,3	653	0	596	1036	+	147
STER_sCDS_982	966,0	174	0	715	846	-	44
STER_sCDS_984	341,0	61	0	924	1025	-	34
STER_RS09815	3081,8	1082	0	1030	2376	-	449
STER_RS09820	2983,2	538	0	2378	3484	-	369
STER_RS09825	1607,8	290	0	3609	4016	-	136
STER_sCDS_985	773,4	272	0	4384	4449	-	22

^aAverage of normalized read counts from three biological repetitions

Résultats-Chapitre6.

Tableau 10. Les loci des gènes différentiellement exprimés entre la souche TIL1560 (*comR::aphA3*) et la souche TIL 1561 (*Δeep comR::aphA3*).

ID	Fold Change	TIL 1560 ^a	TIL1561 ^a	Start	End	Strand	Gene ID	Length (AA)	Description
<i>eep</i>									
STER_RS01205*	3132,1	27476	9				<i>eep</i>		
Cluster cystéine									
STER_RS04380	4,2	2745	656	817570	818481	+		304	cysteine synthase family protein
STER_RS04385	4,4	4106	928	818503	819687	+		395	aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme
STER_RS04390	4,5	1833	409	819629	820210	+		194	serine acetyltransferase
locus <i>rgg 1/shp 1</i>									
STER_sCDS_265	NR	21	5	864863	864934	-	<i>shp 1</i>	24	SHP₁
STER_RS04620	NR	1306	1279	865021	865878	+	<i>rgg 1</i>	286	Rgg₁
STER_RS04625	3,1	4267	1360	865938	866738	+		267	Fe-S oxidoreductase
STER_sCDS_510	3,8	1065	281	866798	866947	+		50	
STER_sCDS_661	2,8	378	135	867030	867119	+		30	
STER_RS04630	2,7	3321	1217	867149	868246	+		366	radical SAM protein
STER_RS04635	2,7	1881	689	868243	868986	+		248	arginase family protein
STER_RS04640	2,3	3802	1651	868993	870165	+		391	MFS transporter
locus <i>rgg 2/shp 2</i>									
STER_sCDS_180	2,3	99	43	1198704	1198796	-		31	
STER_RS06360	2,0	646	327	1198824	1199426	-		201	response regulator transcription factor
STER_RS06365	1,9	1210	640	1199423	1200517	-		365	sensor histidine kinase
STER_RS06370	10,8	542	50	1200510	1201247	-		246	ABC transporter permease
STER_RS06375	16,5	586	35	1201244	1202125	-		294	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein
STER_RS06380	9,4	120	13	1202118	1202297	-		60	hypothetical protein
STER_RS06385	17,3	196	11	1202308	1202517	-		70	hypothetical protein
STER_RS06390	ND	ND	ND	1202668	1202934	-		87	hypothetical protein (incomplete)
STER_RS10535	ND	ND	ND	1202925	1203152	-		74	hypothetical protein (incomplete)
STER_sCDS_172	71,4	9549	133	1203195	1203290	-		32	
STER_RS06395	82	100338	1231	1203277	1204506	-		410	MFS transporter permease
STER_RS06400	68	210708	3105	1204484	1206817	-		778	oligoendopeptidase F
STER_sCDS_398	80	105	1	1206867	1206920	-		18	
STER_sCDS_310	ND	1	0	1206895	1206960	-		22	
STER_sCDS_714	88,3	1091	12	1207133	1207213	+	<i>shp 2</i>	27	SHP₂/SHP₁₂₉₉
STER_RS06405	NR	994	938	1207191	1208066	-	<i>rgg 2</i>	292	Rgg₂/Rgg₁₂₉₉
locus <i>rgg 3/shp 3</i>									
STER_sCDS_566	10,3	81	8	1255722	1255835	+		38	
STER_sCDS_613	NR	27	34	1256064	1256165	+		34	
STER_sCDS_543	NR	28	20	1256228	1256353	+		42	
STER_sCDS_851	ND	0	0	1256331	1256390	+		20	
STER_RS06660	3,3	148	45	1256335	1256604	+		90	hypothetical protein
STER_RS06665	NR	59	77	1256764	1257063	+		100	
STER_RS06670	104,1	34602	332	1257163	1258074	-		304	sodium transporter
STER_RS06680	108,1	23464	217	1258390	1258992	-		201	SPASM domain-containing protein
STER_RS06685	99,8	33558	335	1259086	1260177	-		364	MULTISPECIES: transporter
STER_RS06690	101,8	57798	567	1260174	1261493	-		440	KxxxW cyclic peptide radical SAM maturase
STER_RS10575	76,8	7040	91	1261563	1261655	-		31	KxxxW-cyclized peptide pheromone
STER_RS06695	NR	484	645	1261738	1262598	-	<i>rgg 3</i>	287	Rgg₃/Rgg₁₃₅₈
STER_sCDS_768	72	778	11	1262689	1262760	+	<i>shp 3</i>	24	SHP₃/SHP₁₃₅₈
locus <i>rgg 4/shp 4</i>									
STER_sCDS_273	NR	3	4	1434537	1434608	-	<i>shp 4</i>	24	SHP₄
STER_RS07530	NR	697	689	1434695	1435558	+	<i>rgg 4</i>	288	Rgg₄
STER_RS07535	30	20489	684	1435675	1436853	+		393	MFS transporter
STER_RS07540	1,3	12004	15152	1437099	1438643	-		515	
STER_sCDS_380	NR	92	120	1438687	1438743	-		19	
STER_sCDS_135	1,6	129	200	1438746	1438853	-		36	
STER_RS07545	1,4	784	1084	1438993	1439658	-		222	
STER_RS07550	NR	6301	7286	1439747	1441120	-		458	
STER_sCDS_560	2,9	42	14	1441243	1441359	+		39	
locus <i>rgg 5/shp 5</i>									
STER_sCDS_279	NR	150	92	1785690	1785761	-	<i>shp 5</i>	24	SHP₅
STER_RS09420	NR	1185	1232	1786014	1786712	+	<i>rgg 5</i>	233	Rgg₅
STER_sCDS_584	NR	76	89	1786790	1786897	+		36	
STER_sCDS_809	ND	0	0	1786854	1786919	+		22	
STER_sCDS_462	14,6	1336	91	1786909	1787088	+		60	
STER_RS09425	15,7	16137	1026	1787097	1788152	+		352	radical SAM protein
STER_RS09430	16,3	19698	1207	1788145	1789686	+		514	ABC transporter ATP-binding protein
STER_sCDS_680	18,4	162	9	1789819	1789905	+		29	
STER_sCDS_732	NR	11	1	1789952	1790029	+		26	
NR, not significantly regulated (adjusted p-value>0.01)									
ND, not determined									
^a Average of normalized read counts from three biological repetitions									
*gene deleted in the mutant strain									

1,9 ≤ FC ≤ 4,5 ; adjusted p-value < 0,01

9,8 ≤ FC ≤ 25,2 ; adjusted p-value < 0,01

FC ≥ 28,9 ; adjusted p-value < 0,01

Résultats-Chapitre6.

6.2.3. Petits gènes dont l'expression est contrôlée par les transporteurs PptAB et Ami et la protéase Eep

Dans l'objectif d'identifier tous les petits gènes dont l'expression est contrôlée par l'exporteur des phéromones PptAB, le transporteur d'oligopeptides Ami et la protéase de maturation des phéromones Eep, nous avons réalisé une banque enrichie en transcrits de petite taille (<200 nucléotides). L'analyse de cette banque entre la souche TIL1560 (*comR::aphA3*) et la souche TIL1562 (Δ *pptAB comR::aphA3*) (Tableau 11) nous a donné seulement 8 cibles dont quatre déjà identifiées par la banque de grand transcrits présentée au-dessus. Parmi ces cibles connues nous retrouvons deux petits gènes des opérons Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ (*STER_sCDS_172*) et Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ (*STER_RS10575*). Les gènes *STER_sCDS_714* et *STER_sCDS_768* codant les phéromones SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈ sont également très fortement exprimés dans un contexte sauvage et réprimés dans un contexte muté pour PptAB. Cette banque a permis d'identifier l'expression d'un nouveau petit gène de l'opéron Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ (*STER_sCDS_310*) dans un contexte sauvage et sa répression dans un contexte muté pour PptAB. Il y a également une forte expression de deux petits gènes non-identifiés par la banque de grand transcrits, *STER_sCDS_584* et *STER_sCDS_809*, localisés en aval du gène codant le régulateur Rgg₅ dans la souche TIL1560 (*comR::aphA3*) comparé à la souche TIL1562 (Δ *pptAB comR::aphA3*). En termes de cible distale, seul le gène *STER_sCDS_076* a été identifié pour être exprimé avec un facteur de variation 3 entre le contexte sauvage et le contexte mutant. Les résultats de cette comparaison sont résumés dans le Tableau 11.

Cet ensemble de cibles a été également identifié par l'analyse différentielle entre la souche TIL1564 (Δ *amiCDE comR::aphA3*) et TIL1560 (*comR::aphA3*). Par contre la comparaison des petits transcrits de la souche TIL1561 (Δ *eep comR::aphA3*) et TIL1560 (*comR::aphA3*) a donné 12 petits gènes cibles dont l'expression est réprimée en absence de la protéase Eep. Parmi ces 12 gènes, les huit sont des cibles communes des transporteurs PptAB et Ami décrits au-dessus et les quatre appartiennent au plasmide 1 perdu dans cette souche mutante. Le niveau d'expression des petits gènes communs varie entre les trois comparaisons rendant l'interprétation plus compliquée. Ces résultats se trouvent dans l'ANNEXE D.

Résultats-Chapitre6.

Tableau 11. L'expression des petits transcrits dans la souche TIL1560 (*comR::aphA3*) et la souche TIL1562 (*ΔpptAB comR::aphA3*). *Rgg2/SHP₂* indique *Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉* et *Rgg3/SHP₃* correspond à *Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈*.

ID	Fold Change TIL 1560 ^a	TIL1561 ^a	Start	End	Strand	Length (AA)
locus <i>rgg₂/shp₂</i>						
STER_sCDS_172	52	38	1	1203195	1203290	- 32
STER_sCDS_310	32	105	3	1206895	1206960	- 22
STER_sCDS_714	43	31	1	1207133	1207213	+ 27
locus <i>rgg₃/shp₃</i>						
STER_RS10575	296	2189	8	1261563	1261655	- 31
STER_sCDS_768	304	119	0	1262689	1262760	+ 24
locus <i>STER_RS07755-STER_RS07760</i>						
STER_sCDS_076	3	127	36	1477364	1477495	- 44
locus <i>rgg₅/shp₅</i>						
STER_sCDS_584	14	437	31	1786790	1786897	+ 36
STER_sCDS_809	7	61.05	9	1786854	1786919	+ 22

^aAverage of normalized read counts from three biological

3 ≤ FC ≤ 14 ; adjusted p-value < 0,01

32 ≤ FC ≤ 57 ; adjusted p-value < 0,01

FC ≥ 92 ; adjusted p-value < 0,01

6.3. Discussion et conclusion

Nous avons identifié l'expression d'un ensemble de gènes localisés en aval de cinq gènes codant les régulateurs Rgg dans la souche LMD-9 à différents niveaux dans un contexte sauvage. La comparaison de leurs niveaux de transcription avec les souches mutées pour le transporteur PptAB ou pour le transporteur d'oligopeptides Ami ou la protéase Eep a montré que l'expression de cet ensemble de gènes est réprimée dans les mutants. Donc, ces trois acteurs contrôlent l'expression de ces gènes suivant un mécanisme similaire de QS. Ces trois acteurs semblent également contrôler un opéron de biosynthèse de la cystéine localisé indépendamment des loci *rgg/shp* qui peut donc être considéré comme une cible distale des Rgg.

Cette étude transcriptomique a mis en évidence que les opérons cibles des systèmes déjà connus, *Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉* et *Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈*, sont plus longs que ce qui avait été préalablement étudié ou prédit (Fleuchot et al., 2011 ; Fleuchot et al., 2013). Maintenant il reste à valider si l'expression des gènes situés en aval des régulateurs Rgg₁, Rgg₄ et Rgg₅ sont contrôlés par ces régulateurs respectifs. Il reste

Résultats-Chapitre6.

également à étudier pour ces régulateurs dont l'expression du gène *shp* n'a pas été détecté (*shp1* et *shp4*) ou a été détecté à un faible niveau (*shp5*), s'il peut avoir une interférence entre les systèmes Rgg/SHP au sein d'une même souche.

Les gènes codant les phéromones des trois autres loci *rgg/shp*, *shp1*, *shp4* et *shp5*, ne semblent pas être contrôlés par les mécanismes du QS. Leurs niveaux d'expression à peine détectables voire pas détectables suggèrent que soit nos conditions expérimentales ne correspondent pas à leurs conditions d'expression optimale soit ces gènes identifiés ne sont pas des cibles de leurs systèmes. La phéromone mature de SHP₅ que nous avons pu détecter par SM dans certaines conditions est identique à la phéromone SHP₁₃₅₈ à un AA près et est associée à un régulateur Rgg tronqué. Compte-tenu de cette similarité, nous ne pouvons exclure une cross-activation du régulateur Rgg₅ par la phéromone SHP₁₃₅₈ pour activer l'expression des gènes cibles associés au loci *rgg5/shp5*. L'absence de détection des gènes cibles pour le système Rgg₀/SHP₀ était prévisible car il n'y a pas de gènes cibles à proximité *in silico*. Le gène codant Rgg₀ associé à SHP₀ dont la forme mature est plus courte que d'autres phéromones SHP étant un pseudogène, l'absence de détection de l'expression du gène *shp0* dans nos conditions expérimentales n'est pas surprenante. La détection d'un opéron probablement impliqué dans la biosynthèse de la cystéine dans les trois conditions d'analyse suggère que cet opéron est aussi soumis à un contrôle par un mécanisme de QS lié à un des cinq loci *rgg/shp*. Dans cette hypothèse le rôle des systèmes Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ ou Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ les plus exprimés doit sans doute être privilégié. Une autre hypothèse alternative est que cet opéron soit contrôlé par une des cibles contrôlées par un des cinq loci *rgg/shp*.

La réalisation d'une banque de petits transcrits avait pour objectif d'obtenir une information plus riche sur les petits transcrits exprimés de manière différentielle entre nos souches. Tous les petits transcrits identifiés par la banque de grand transcrits ne sont pas identifiés par la banque de petits transcrits. Nous pensons que cette banque a cumulé plusieurs biais lors de sa préparation. Lors de l'extraction d'ARN par une colonne commerciale nous avons pu perdre certains petits transcrits. Lors des étapes de

Résultats-Chapitre6.

traitement d'échantillon, une partie des petits transcrits a pu être dégradée. L'étape d'enrichissement de petits transcrits par une colonne avec les billes a également pu contribuer à la perte en petits transcrits. Pour les transcrits retenus uniquement par la banque de petits transcrits, des expériences complémentaires sont nécessaires pour valider leurs niveaux d'expression et interpréter leurs significations biologiques.

Chapitre7. Discussion et Perspectives

A travers mon projet de thèse, nous avons montré le rôle du transporteur PptAB dans l'export de quatre phéromones, ComS, SHP₁₂₉₉, SHP₁₃₅₈ et SHP₅, dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus*. Nous avons également constaté que le transporteur n'exporte très probablement que la forme mature des phéromones. Nous avons aussi découvert que l'expression d'un ensemble des gènes situés en aval de cinq gènes codant les régulateurs Rgg et un opéron distal des loci *rgg/shp* impliqué dans la biosynthèse de cystéine est dépendante du transporteur PptAB mais aussi du transporteur d'oligopeptides Ami et de la protéase Eep. Nous allons discuter par la suite l'ensemble des résultats obtenus et proposer de nouvelles questions à explorer en perspectives.

7.1. Le transporteur PptAB est-il dédié à la communication dépendante des régulateurs Rgg-like ou joue-t-il un rôle plus pléiotrope chez *S. thermophilus* ?

Nos résultats indiquent que le rôle du transporteur PptAB semble être spécifique et dédié à la communication impliquant les phéromones associant les régulateurs Rgg-like dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus*. En revanche, l'homologue du transporteur PptAB appelé EcsAB joue un rôle dans la sécrétion d'exoenzymes mais impacte aussi la protéolyse intramembranaire (RIP) par un mécanisme inconnu. Ce rôle multiple suggère qu'il serait d'avantage pléiotrope chez *B. subtilis* (Leskelä et al., 1996 ; Heinrich et al., 2018). La Figure 42 indique l'organisation génétique différente des gènes codant les transporteurs PptAB et EcsAB et le Tableau 12 résume le pourcentage d'identité soulignant la forte homologie parmi les différentes espèces. Il nous faut donc nous poser la question d'un possible rôle plus large de PptAB chez *S. thermophilus*. Nous allons donc nous intéresser aux différents arguments permettant de discuter du rôle de transporteur PptAB.

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

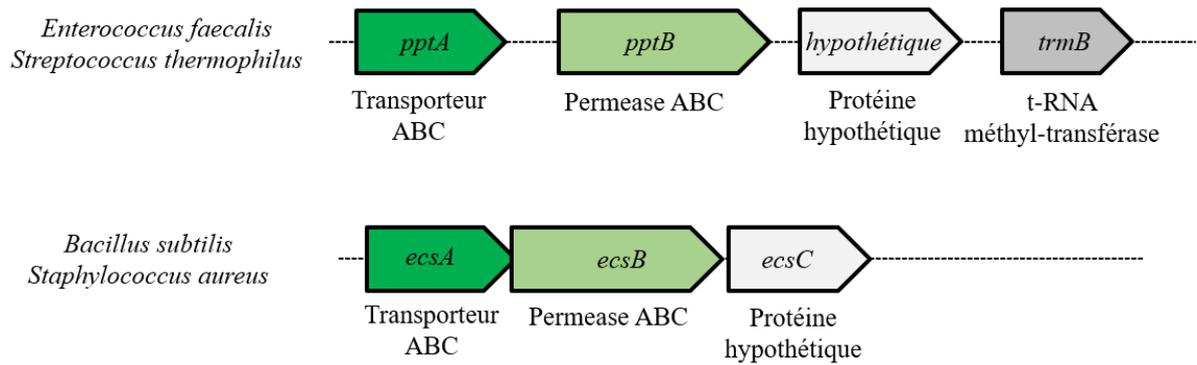


Figure 42. Organisation génétique des gènes *pptAB* et *ecsAB* chez certaines bactéries à Gram-positif. Les gènes adjacents aux gènes codant le transporteur *PptAB* et *EcsAB* sont différents et leurs fonctions ne sont pas connues.

Tableau 12. L'homologie entre le transporteur *PptAB* d'*E. faecalis* et d'autres bactéries à Gram-positif. Les pourcentages d'identité entre la protéine liant l'ATP (*PptA/EcsA*) et la perméase (*PptB/EcsB*) sont comparables entre différentes espèces.

Identité (%) avec <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
PptA/EcsA	63%	62%	60%
PptB/EcsB	30%	30%	30%
Sources	Cette étude	Varahan et al., 2014	Schilcher et al., 2020

7.1.1. Le transporteur *PptAB* exporte des phéromones chez certaines bactéries à Gram-positif

Le transporteur *PptAB* est décrit dans la littérature pour son implication dans l'export de certaines phéromones interagissant avec les régulateurs transcriptionnels *PrgX* ou *Rgg*-like (famille *RRNPP*) chez *E. faecalis* (Varahan et al., 2014), *S. agalactiae* (Pérez-Pascual et al., 2015), *S. pyogenes* (Chang and Federle, 2016) et *S. gordonii* (Vickerman and Mansfield, 2019). Le Tableau 13 résume les différents substrats exportés par les transporteurs *PptAB* et *EcsAB*.

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

La plupart des études ont étudié le rôle du transporteur PptAB dans l'export de la forme mature des phéromones (Chang and Federle, 2016) (Tableau 13). Dans notre projet, nous avons recherché si la forme mature mais aussi le précurseur, les formes intermédiaires et/ou les formes complémentaires de la phéromone SHP₁₃₅₈ pouvaient être pris en charge par le transporteur PptAB. Nous n'avons pas obtenu des résultats concluants. Soit ces formes ne sont effectivement pas prises en charge par le transporteur PptAB soit nos conditions de détection par SM n'étaient pas adaptées pour valider leur présence. En effet, la colonne de chromatographie que nous avons utilisée (colonne C-18) retenait peut-être trop fortement le précurseur synthétique et le gradient de solvant utilisé (acétonitrile > 99%) n'a pas permis son élution. Pour surmonter ces problèmes, il faudrait tester une colonne moins rétentive (C-4 ou C-8) et/ou tester d'autres conditions de solvants telles qu'un mélange d'acétonitrile et/ou de méthanol (Yates, 2004), (Karpievitch et al., 2010 ; Budamgunta et al., 2019). Une autre hypothèse est que les ions issus du précurseur synthétique soient trop retenus par la pré-colonne. Donc, pour tester cette hypothèse, il faudra injecter le précurseur synthétique directement au niveau de la colonne de chromatographie sans la pré-colonne. Dans nos conditions d'analyse, la source utilisée est ESI (electrospray ionization) permettant l'ionisation par électronébulisation. Cette méthode favorise la formation des ions multichargés. En méthode alternative, une autre source d'ionisation, MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) qui favorise les ions mono-chargés pourrait être utilisée pour la détection du précurseur synthétique (Domon and Aebersold, 2006).

Une autre stratégie pour valider si d'autres formes de phéromones sont exportées par le transporteur PptAB serait d'exprimer celui-ci dans un liposome contenant ces formes de phéromones sous forme de peptides synthétiques marqués. Ces peptides synthétiques pourraient être marqués avec des fluorochromes ou du sélénium (Hyrup Møller et al., 2015). Une autre alternative serait d'utiliser des isotopes stables non-radioactifs (Ong et al., 2002). Ces différentes méthodes permettraient ainsi de suivre le transport des différentes formes de peptides (Seigneurin-Berny et al., 2016). Cette stratégie *in vitro*, en n'imitant pas la condition biologique permettrait d'éliminer les contraintes liées à une protéolyse de

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

ces formes par les protéases extracellulaires ou les aminopeptidases/protéases intracellulaires (Rodríguez-Serrano et al., 2018).

La recherche de toutes les formes probablement produites s'est faite en extrayant manuellement les signaux correspondant à toutes ces formes compte tenu du fait que les outils existants tels que X!TandemPipeline-tandem (Langella et al., 2017) ou Peaks (Bioinformatics Solutions Inc, Zhang et al., 2012) ne permettent pas d'identifier automatiquement les formes que nous recherchons ni la forme mature. En effet, la taille des peptides recherchés étant petite, le nombre de fragments pour valider la détection est fortement réduit. Même si cette contrainte n'empêche pas la détection des peptides si présents, le développement d'outils adaptés aux peptides de petite taille permettrait d'automatiser la recherche et ainsi réduire le temps d'analyse.

Tableau 13. Les phéromones exportées par le transporteur PptAB chez *E. faecalis* et les streptocoques et par le transporteur EcsAB chez *S. aureus*.

Espèces	Phéromones	Séquence en AA de précurseur et/ou mature	Indice GRAVY	Références
<i>Enterococcus faecalis</i>	cOB1*	VAVAVLVLGAC	2.9	Varahan et al., 2014
	cAM373*	AIFILAS	2.6	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	SHP _{gbs1555}	MKKINKALLFTLIMDILIVGG	2.15	Pérez-Pascual et al., 2015
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SHP2	MKKVNKALLFLIMDILIVGG	2.15	Chang et Federle, 2016
	SHP3	MKKISKFLPILILAMDIIIVGG	1.9	
<i>Streptococcus mutans</i>	ComS	MFSILTSILMGLDWWSL	0.16	
<i>Streptococcus gordonii</i>	cAM373*	SVFILAA	2.59	Vickerman et Mansfield 2019
<i>Staphylococcus aureus</i>	cAM373*	AIFILAA	3	Schilcher et al, 2020
<i>Streptococcus thermophilus</i>	SHP ₁₂₉₉ /SHP ₂	MKKVIAIFLIQTVVVIDIIHPPFG	1.3	Ce projet
	SHP ₁₃₅₈ /SHP ₃	MKKQILLTLLVVFEGHIVVVG	2.4	
	SHP ₅	MNKKALFSLFVILEGIIVIGVG	1.9	
	ComS	MKTLKIFVLFSLLAIPYFAGCL	2.0	

Séquence des phéromones matures: en rouge et calcul d'Indice GRAY (<http://www.gravy-calculator.de/>)
 *Phéromones issues de lipoprotéines: Séquence de précurseur non-indiquée

Il est très difficile de prédire les substrats qui peuvent être pris en charge par un transporteur ABC de manière générale (Davidson et al., 2008). Nous savons que la spécificité de substrats des transporteurs d'oligopeptides impliqués dans l'import est en partie déterminée par les SBPs et la taille des oligopeptides (Maqbool et al., 2015). Les études structurales des transporteurs ont permis d'identifier les changements de conformation lors du transport des substrats mais les mécanismes de reconnaissance

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

de substrat ainsi que leurs spécificités restent évasives (Beis et al., 2015), (Yu et al., 2015). Pour le moment, le transporteur PptAB semble exporter les phéromones linéaires neutres ou chargées négativement (présence de D/E) de taille variant de 7 à 11 AA (Tableau 13). Le calcul d'indice GRAVY (grand average hydrophathy) permettant d'apprécier le niveau d'hydrophobicité des peptides signifie que plus la valeur est élevée, plus le peptide est hydrophobe. De ce fait, toutes les phéromones étudiées jusque-là pour être exportées par le transporteur PptAB/EcsAB sont hydrophobes (Tableau 13). L'étude de Chang et Federle et al., 2016, a démontré le rôle seulement partiel du transporteur PptAB dans l'export de la phéromone ComS de *S. mutans*. Cette phéromone ComS est la moins hydrophobe parmi les autres substrats étudiés avec une valeur d'indice Gravy de 0.16 (Tableau 13). Les auteurs ont suggéré que le transporteur PptAB ne semblait pas nécessaire dans le mécanisme ComR/ComS chez les streptocoques. Or nous avons montré que le transporteur PptAB est essentiel dans l'activation du mécanisme ComR/ComS chez *S. thermophilus* en exportant la phéromone ComS qui est hydrophobe. En combinant toutes ces observations, on peut spéculer que le transporteur PptAB exporterait les phéromones matures de nature hydrophobe préférentiellement. Pour valider cette hypothèse, il faudra vérifier si les peptides de nature hydrophile pourraient être exportés par le transporteur PptAB à l'aide des peptides marqués et exprimant le transporteur dans un liposome (Hyrup Møller et al., 2015 ; Seigneurin-Berny et al., 2016). En revanche, on ne sait pas si les phéromones matures contenant une cystéine qui est un AA très réactif (cOB1 chez *E. faecalis* et ComS chez *S. thermophilus*) peuvent être exportées sous leurs formes oxydées. Le transporteur PptAB est conservé parmi les firmicutes (Chang and Federle, 2016). Les études expérimentales montrent que les gènes *pptAB* chez *S. pyogenes* sont transcrits en opéron et que les gènes adjacents de fonction inconnue ne sont pas essentiels au fonctionnement du transporteur PptAB dans la communication (Chang and Federle, 2016). De manière plus générale, les gènes codant des transporteurs dédiés à l'export de phéromones particulières comme le transporteur ComAB impliqué dans la compétence ou RtgAB sécrétant un phéromone d'un système Rgg/SHP like appelé RtgR/S chez *S. pneumoniae* sont situés au sein de l'opéron contrôlé par ces phéromones (Alloing et al., 1998 ; Wang

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

et al., 2020). Comment le transporteur PptAB dont les gènes ne sont apparemment pas contrôlés par les systèmes de communication, a évolué vers seulement de l'export des phéromones de communication reste un mystère à élucider.

Dans l'hypothèse où le transporteur PptAB est dédié à l'export des phéromones, notre approche globale transcriptomique a permis d'identifier seulement l'expression de trois phéromones, SHP₁₂₉₉, SHP₁₃₅₈ et SHP₅ impactée dans le mutant PptAB alors que notre base de données issue de BactgeneSHOW comportait plus de 800 petits gènes (Ibrahim et al., 2007a). Nous ne pouvons cependant pas exclure que certains substrats soient pris en charge par le transporteur PptAB sans forcément que l'expression de leurs gènes soit dépendante de ce dernier. Par exemple, le transporteur EcsAB exporte au moins cinq peptides signaux issus de la maturation des lipoprotéines dont on ne connaît pas le rôle dans la communication chez *S. aureus* (Schilcher et al., 2020). Chez *E. faecalis*, l'expression des gènes codant des lipoprotéines, dont certains peptides signaux fonctionnent comme des phéromones, n'est pas contrôlée par ces phéromones associées au régulateur PrgX (An and Clewell, 2002). Le génome de *S. thermophilus* code pour des lipoprotéines (Bolotin et al., 2004) mais le rôle de ces peptides signaux à agir comme des phéromones n'a jamais été recherché. De la même manière que chez *S. aureus* (Schilcher et al., 2020), il serait intéressant d'identifier tous les peptides signaux des lipoprotéines prédits *in silico* et rechercher leur présences dans un contexte sauvage puis muté au transporteur PptAB afin de savoir si ce transporteur exporte également les peptides signaux des lipoprotéines en plus des phéromones. Pour cela nous pouvons développer une méthode plus sensible et ciblée appliquant le mode MRM (Multi Reaction Monitoring) en SM. Cette méthode permet d'identifier différents fragments des ions précurseurs dont on connaît déjà les séquences recherchées donc les masses (Russo et al., 2017). Elle a été utilisée pour détecter et quantifier toutes les phéromones s'associant aux régulateurs RRNPP chez *E. faecalis* (Verbeke et al., 2018). Si ces peptides signaux sont exportés par le transporteur PptAB nous pouvons aussi se demander si sa fonction biologique dépasse celle d'exporter les phéromones s'associant aux régulateur Rgg-like.

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

7.1.2. Le transporteur PptAB joue-t-il un rôle pléiotrope en exportant des oligopeptides localisés au niveau de la membrane ?

Les arguments en faveur d'un possible rôle plus pléiotropique de PptAB sont essentiellement basés sur les connaissances concernant son homologue EcsAB. En effet, celui-ci contribuerait en partie à la sécrétion d'alpha-amylase en cas de surproduction, à la compétence chez *B. subtilis* et à la virulence chez *S. aureus* par des mécanismes inconnus jusqu'à aujourd'hui (Leskelä et al., 1996 ; Jonsson et al., 2010). Les substrats transportés par le transporteur EcsAB ne sont pas connus chez *B. subtilis* (Heinrich et al., 2008). Chez *S. aureus*, il a été très récemment montré que EcsAB exportait des peptides signaux de lipoprotéines sans savoir si ceux-ci jouent un rôle dans la communication (Schilcher et al., 2020). La virulence chez cette espèce, en cas de délétion des gènes *ecsAB* pourrait être expliquée par un mécanisme de communication dépendant du transporteur EcsAB. Mais ce mécanisme n'impliquerait pas un régulateur Rgg-like car ce dernier n'est pas présent chez *S. aureus*.

Dans le cadre de mon projet de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle du transporteur PptAB dans la communication de QS chez *S. thermophilus*. Son rôle dans la formation de biofilm chez *E. faecalis* (Varahan et al., 2014) et dans la résistance au lysozyme chez *S. pyogenes* (Chang and Federle, 2016) a été étudié même si les mécanismes expliquant ces effets ne sont pas connus. Dans le cas de *S. thermophilus*, il serait intéressant d'étudier le rôle du transporteur PptAB dans le lait, sa niche écologique.

Une étude réalisée chez *B. subtilis* a montré que le transporteur EcsAB joue un rôle dans la protéolyse intramembranaire connue sous le nom de RIP (« Regulated intramembrane proteolyse ») en association avec la protéase membranaire RasP qui est un homologue de la protéase Eep (Heinrich et al., 2008). L'exporteur évacuerait les peptides libérés au niveau de la membrane par RasP. Un mécanisme similaire, connu sous le nom de « hydrophobic vacuum cleaner » (Sharom, 2014), pour éviter le stress membranaire (Alix and Blanc-Potard, 2009) pourrait aussi être envisagé dans le cas de PptAB. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions étudier le transporteur PptAB *in vitro* au sein de liposomes avec

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

des substrats de taille variable et de séquences aléatoires ou imitant des peptides issus de RIP (Seigneurin-Berny et al., 2016).

Cette question de la protéolyse intramembranaire, nous amène à nous intéresser, dans une deuxième partie, aux liens entre l'étape de maturation et de sécrétion des phéromones.

7.2. La maturation et la sécrétion sont-elles très fortement liées ?

7.2.1. Ordre chronologique entre la maturation et la sécrétion des phéromones

Comme nous l'avons déjà mentionné, d'après la littérature, le processus de maturation/sécrétion des phéromones n'est pas conservé parmi les bactéries. C'est particulièrement vrai pour l'ordre chronologique dans lequel se déroulent ces deux étapes. Les phéromones Phr chez les Bacilli sont sécrétées par la voie Sec puis maturées par plusieurs protéases extracellulaires (Lanigan-Gerdes et al., 2007) tandis que les modèles proposés pour les phéromones de conjugaison chez *Enterococcus faecalis* suggèrent une maturation en plusieurs étapes par des signal peptidases puis la protéase Eep et ensuite la sécrétion par le transporteur de PptAB. Dans certains cas la maturation peut se poursuivre à la suite de la sécrétion par une maturation par des protéases extracellulaires (Varahan et al., 2014 ; Schilcher et al., 2020).

Dans notre projet, nous avons recherché les différentes formes de phéromone SHP₁₃₅₈ en nous basant sur deux hypothèses de maturation : soit l'intervention de plusieurs protéases dont la protéase Eep soit une maturation impliquant uniquement la protéase Eep. Comme nous n'avons pas détecté d'autres formes que les formes matures dans différents surnageant avec nos conditions d'analyse, nous n'avons pas pu identifier de maturation extracellulaire. Ces formes sont peut-être générées dans le cytoplasme et l'étape de sécrétion par le transporteur PptAB serait réservée aux phéromones matures. Pour vérifier cette hypothèse il faudrait rechercher ces formes dans le cytoplasme par SM en réalisant un peptidome intracellulaire. La difficulté à surmonter est de mettre au point la méthode pour détecter ces formes présentes en très faible quantité dans le cytoplasme. En effet, le cytoplasme est très riche en protéines

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

comparé au SN de *S. thermophilus* connu pour avoir un sécrétome infime (Hols et al., 2005). De plus, ce genre d'étude n'a jamais été réalisé compte tenu de la difficulté à distinguer des peptides issus de la protéolyse de peptides endogènes. La séparation des peptides intracellulaires sans contamination par des peptides extracellulaires est également compliqué. La Figure 43 résume nos hypothèses qui n'ont pas pu être validées.

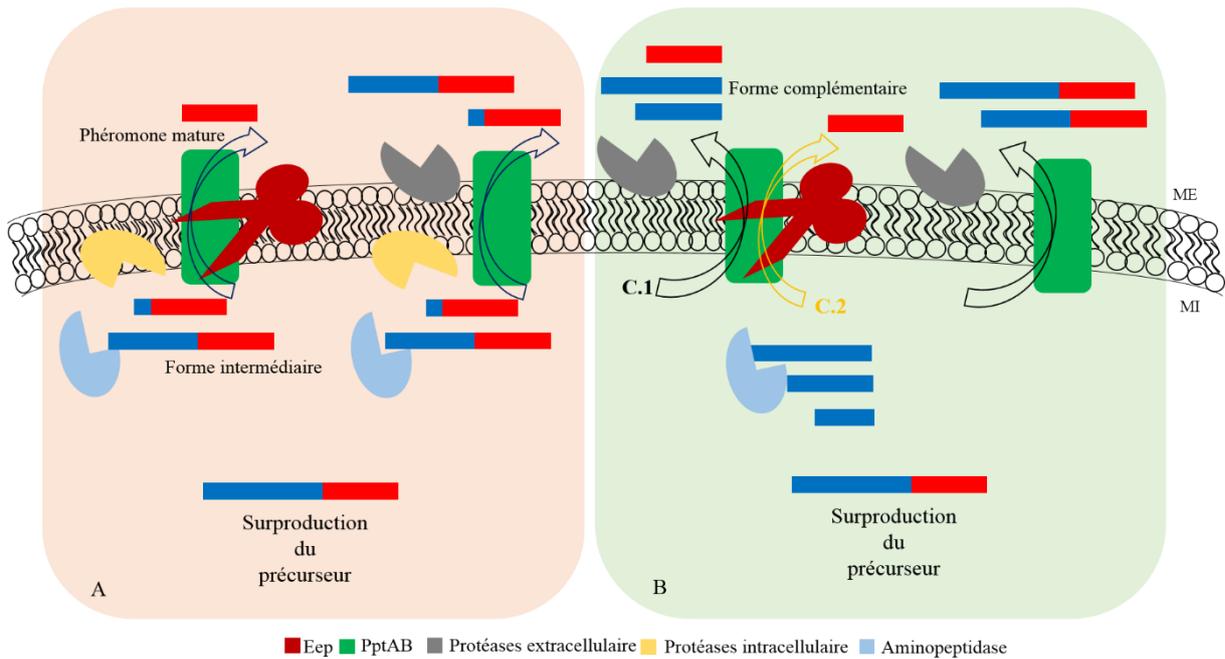


Figure 43. Les différents scénarios de maturation et de sécrétion des phéromones chez *S. thermophilus*. Dans le cas où le processus de maturation se fait en plusieurs étapes (A), en absence de la protéase *Eep*, le transporteur *PptAB* pourrait transporter des formes intermédiaires. On ne peut exclure une protéolyse de ces formes par des protéases extracellulaires. Dans le cas où seule la protéase *Eep* est l'acteur de la maturation, le transporteur *PptAB* pourrait exporter les formes complémentaires en plus des phéromones matures (C.1) ou uniquement les phéromones matures et les formes complémentaires restent en intracellulaire (C.2). Ces formes complémentaires pourraient être dégradées par les protéases extracellulaires. En absence de la protéase *Eep*, le transporteur *PptAB* pourrait exporter le précurseur et ce dernier pourrait être dégradé. MI : Milieu intracellulaire. ME : Milieu extracellulaire.

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

7.2.2. Le transporteur PptAB fonctionne-t-il obligatoirement avec la protéase Eep, acteur de la maturation ?

Tous les substrats exportés par le transporteur PptAB sont aussi en partie maturés par la protéase Eep (Pérez-Pascual et al., 2015 ;Schilcher et al., 2020) à une exception près. C'est le cas de la phéromone de conjugaison cAM373 qui n'est pas maturée par la protéase Eep (An et al., 1999) mais exportée par le transporteur PptAB (Varahan et al., 2014). En revanche les phéromones homologues à cAM373 chez *S. gordonii* (Vickerman and Mansfield, 2019) et *S. aureus* (Cheng et al., 2020) sont maturées et sécrétées par leurs homologues Eep et PptAB. Nous pouvons donc nous demander si globalement le transporteur PptAB fait équipe avec la protéase Eep plus régulièrement. Ceci pourrait s'expliquer par une co-localisation de ces protéines au niveau de la membrane (Varahan et al., 2014 ; (Schilcher et al., 2020). L'utilisation de la technique de FRET permettrait de vérifier ou pas cette co-localisation par microscopie confocale. La difficulté est d'identifier les conditions permettant l'expression optimale de ces deux protéines membranaires avec les fusions codant les protéines fluorophores (Dunn et al., 2011). En effet, dans cette expérience, réussir à produire des protéines avec le bon repliement et l'adressage vers les membranes sans problème n'est pas évident.

La protéase Eep est connue pour la maturation des lipoprotéines et aussi pour son rôle dans la communication bactérienne en association avec les acteurs de transport PptAB et Ami (Chandler and Dunny, 2008 ; Gardan et al., 2013 ; Varahan et al., 2014). En revanche, le contrôle de l'expression du gène *amiA3* dépendant de la protéase Eep de manière indépendante des mécanismes de communication est un des résultats inattendus de notre analyse transcriptomique. Ainsi, nous mettons en évidence un contrôle transcriptionnel indépendant des mécanismes de QS par la protéase Eep. Nous pouvons spéculer qu'un des peptides signaux issus de la maturation des lipoprotéines par la protéase Eep servirait de manière directe ou indirecte à contrôler l'expression du gène *amiA3* par un mécanisme inconnu.

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

7.3. L'expression des gènes cibles des mécanismes de quorum-sensing est dépendante du transporteur PptAB, de la protéase Eep et du transporteur Ami

7.3.1. L'expression des gènes situés en aval des gènes de tous les régulateurs Rgg exprimés est dépendante des trois acteurs du quorum-sensing

Notre approche globale de transcriptomique a révélé des profils d'expression quasi identiques pour les trois mutants PptAB, Eep et Ami. Ces trois acteurs contrôlent l'expression de l'ensemble des gènes situés en aval des cinq gènes codant les régulateurs Rgg dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus*. Ceci met en lumière que ces trois acteurs sont dédiés à la communication dans nos conditions expérimentales. Nous avons également mis en évidence l'expression de tous les gènes codant les régulateurs Rgg à l'exception de Rgg₀ codé par un pseudogène. Les cinq gènes codant les régulateurs Rgg sont tous exprimés au même niveau en fin phase exponentielle. Une étude de notre équipe a montré que le régulateur Rgg₁₃₅₈ agit en tant qu'auto-répresseur en réprimant l'expression de son propre gène (Fleuchot et al., 2011). Donc, il serait intéressant de savoir si les gènes des quatre autres régulateurs Rgg sont soumis à une auto-répression au cours de la croissance et en absence de leurs phéromones afin de savoir si tous ces régulateurs suivent le même fonctionnement.

L'ensemble des gènes exprimés à proximité des gènes *rgg*, est plus important que ce que nous savions jusqu'ici, suggérant l'identification de nouvelles cibles proximales. Le contrôle de l'expression de ces cibles proximales par les régulateurs Rgg situés à proximité devra être confirmé par exemple en vérifiant si ces cibles sont toujours exprimées dans les souches mutées pour ces régulateurs.

Les nouvelles cibles identifiées des systèmes déjà étudiés Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ et Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ pourraient contribuer à identifier le produit inconnu du système Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ et à mieux comprendre le système Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ décrit pour la production du streptide (Ibrahim et al., 2007b), (Fleuchot et al., 2011). Par exemple, on peut étudier si les deux nouvelles cibles identifiées du système Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ jouent

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

un rôle dans la production de streptide en les mutant et recherchant le streptide dans le SN par SM (Ibrahim et al., 2007b).

Un point commun aux loci *rgg/shp* chez *S. thermophilus* est une organisation génétique similaire avec des gènes des enzymes à radical SAM, des petits gènes et des transporteurs. Connaissant le système Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ décrit pour la production de peptide modifié (Ibrahim et al., 2007b), nous suggérons que ces systèmes sont impliqués dans la production des peptides modifiés et peuvent donc contribuer à la production de nouveaux RiPPs (Merwin et al., 2020). L'intérêt pour ces RiPPs, dont la fonction biologique et les modifications post-traductionnelles ne sont pas faciles à identifier, est en plein essor dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules à effets bactéricides ou probiotiques (Dobson et al., 2012 ; Hudson and Mitchell, 2018 ; Zhong et al., 2020). Nous connaissons la séquence en AA des petits peptides à partir des petits gènes que nous avons identifiés. Comme nous connaissons les conditions d'expression de ces petits gènes, la comparaison par SM de SN dans un contexte sauvage et un contexte mutant permettrait de mettre en évidence les modifications post-traductionnelles potentielles sur ces peptides nouvellement identifiés. On peut aussi spéculer que ces peptides agissent comme des bactériocines ou tout simplement agissent comme des phéromones à leur tour, soit dans la communication inter-espèces soit intra-espèces (Fontaine et al., 2007 ; Chikindas et al., 2018).

Parmi les systèmes Rgg/SHP connus de la littérature, les fonctions biologiques de très peu de systèmes sont connus. Le Tableau 14 résume ces informations chez les différentes espèces de streptocoques. Pour les fonctions telles que la formation de biofilms ou la résistance aux lysozymes, les mécanismes exacts ne sont pas connus mais sont issus d'observation phénotypiques. Le système Rgg₅/SHP₅ de la souche LMD-9 existe également dans la souche CNRZ368 et l'homologue du régulateur Rgg₅ a été identifié dans cette souche pour jouer un rôle dans la résistance au stress oxydant sans décrire le mécanisme précis (Thibessard et al., 2004 ; Fernandez et al., 2004). Basé sur les résultats obtenus dans la souche CNRZ368, nous pouvons proposer l'hypothèse que les gènes cibles contrôlés par le système Rgg₅/SHP₅ pourraient contribuer à la résistance au stress oxydant dans la souche LMD-9. Nous pouvons tester la

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

résistance aux produits provoquant le stress oxydant tels que le paraquat ou l'H₂O₂, d'une souche mutée pour l'une des cibles du système Rgg₅/SHP₅ et la comparer à la souche sauvage afin de confirmer son rôle dans le stress oxydant.

Tableau 14. Les fonctions biologiques des différents systèmes Rgg/SHP chez les streptocoques.

Origine	Rgg/SHP	Fonction biologique	Références
<i>S. thermophilus</i>	Rgg ₁₂₉₉ /SHP ₁₂₉₉	Inconnue	Fleuchot et al., 2013
	Rgg ₁₃₅₈ /SHP ₁₃₅₈	Production de streptide	Fleuchot et al., 2011
	Rgg ₅ /SHP ₅	Résistance au stress oxydant?*	Cette étude
	Rgg ₀₁₈₂ /SHP ₀₁₈₂ **	Résistance au stress thermique	Henry et al., 2011
<i>S. pyogenes</i> ***	Rgg ₂ /SHP ₂	Formation de biofilm	Chang et al., 2011
	Rgg ₃ /SHP ₃	Résistance au lysozyme	
<i>S. agalactiae</i>	RovS/SHP _{gs1555}	Pathogénèse	Pérez-Pascual et al., 2015
<i>S. pneumoniae</i>	Rgg ₀₉₃₉ /SHP	Formation de biofilm Production de polysaccharide de surface	Junges et al., 2017
<i>S. zooepidemicus</i>	Rgg/SHP	Formation de biofilm Production de polysaccharide	Xie et al., 2019

*gène homologue de rgg₅ dans la souche CNRZ368: résistance au stress oxydant (Fernandez et al., 2004)

**Souche LMG18311

***Rgg₃/SHP₃: répresseur transcriptionnel

7.3.2. Opéron distal des Rgg

Dans la littérature, il n'y a que très peu de cibles distales de système Rgg/SHP décrites à ce jour (Xie et al., 2019). L'opéron codant les gènes impliqués dans la biosynthèse de cystéine que nous avons identifié semble être la première cible distale d'un des systèmes Rgg/SHP exprimés dans nos conditions chez *S. thermophilus*. Cet opéron est issu d'un transfert horizontal de *Lactobacillus bulgaricus* (Liu et al., 2009). Une autre étude réalisée chez *Lactobacillus paracasei* montre que les gènes *cysK* et *cysE* sont co-transcrits en un opéron (Wüthrich et al., 2018). Un motif palindromique [AAAGGGCGCGAA-N₍₁₁₋₁₈₎-TTCGCGCCTTTT] situé en amont de cet opéron est conservé entre *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *Lactococcus plantarum*, *Oenococcus* et *Leuconostoc* mais le mécanisme de régulation contrôlant l'expression de ces gènes n'est pas encore connu (Liu et al., 2009 ; Wüthrich et al., 2018). Les

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

homologues des gènes *cysK* et *cysE* impliqué dans la biosynthèse de cystéine étant déjà présents dans la souche LMD-9, les facteurs de pression de sélection qui ont permis la conservation de cet opéron acquis au cours de l'évolution sont à élucider (Hols et al., 2005).

L'expression de cet opéron pourrait être contrôlée par un des cinq systèmes de Rgg/SHP. Même si nous ne pouvons exclure qu'il soit la cible de l'un des gènes cibles contrôlé par l'un des cinq systèmes de Rgg/SHP donc une cible indirecte. La cystéine et l'oxydation étant très fortement liées, on ne peut exclure que le contrôle de l'expression de cet opéron soit lié intrinsèquement au rôle du stress oxydant probablement en partie contrôlé par l'un des systèmes Rgg/SHP (Fernandez et al., 2006 ; Bortoni et al., 2009).

Comme nous l'avons déjà dit, le pan génome de *S. thermophilus* est fermé et l'espèce a évolué par perte de gènes à la suite de son adaptation dans sa niche écologique, le lait (Hols et al., 2005). L'opéron de cystéine décrit ci-dessus et tous les systèmes Rgg/SHP à l'exception du système Rgg₄/SHP₄ sont issus de transferts horizontaux (Alexandraki et al., 2019). Les facteurs de pression de sélection qui ont contribué à la conservation de cet opéron et ces systèmes acquis dans le génome au cours de l'évolution sont une énigme intrigante à résoudre.

7.4. La complexité de la notion couple régulateur/phéromone apparié

7.4.1. Une même phéromone SHP peut-elle interagir avec différents régulateurs Rgg et

donc participer à une interférence au sein d'une même souche ?

L'approche globale transcriptomique a permis de conclure que tous les gènes *shp* adjacents au loci *rgg* ne sont pas exprimés. Nous avons la confirmation de l'absence de la détection en SM de deux SHP (SHP₁ et SHP₄) sur les cinq. Cependant l'expression des gènes situés en aval de ces régulateurs dépendant des trois acteurs de QS, les transporteur PptAB et Ami et la protéase Eep, confirme que leur expression requiert la production d'une phéromone.

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

Les deux SHP déjà identifiées, SHP₁₂₉₉ et SHP₁₃₅₈, ont les gènes les plus exprimés dans nos conditions d'analyse. Tous les gènes codant les régulateurs Rgg étant exprimés à un niveau similaire, nous pouvons nous demander s'il y a une interférence entre les phéromones les plus produites avec les régulateurs Rgg des systèmes dont les phéromones sont produites à faible niveau ou quasi nulle. Une étude par notre équipe a montré qu'il n'y a pas d'interférence entre ces deux systèmes (Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉ et Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈) dont les phéromones sont les plus exprimées dans la souche LMD-9 (Fleuchot et al., 2013). Les formes matures des phéromones non-exprimées, SHP₁ (ESIIIVAVG) et SHP₄ (EGIIVILVG), sont assez proches de la forme mature de SHP₁₃₅₈ (EGIIVIVVG). Nous pouvons donc faire l'hypothèse d'une interférence entre la phéromone SHP₁₃₅₈ avec les autres régulateurs à l'exception de Rgg₁₂₉₉ (Fleuchot et al., 2013). La non-expression de certaines phéromones peut être expliquée soit par nos conditions expérimentales, qui ne seraient pas optimales pour leurs expressions, soit par la présence de promoteurs dégénérés. L'analyse *in silico* de la région promotrice du gène *shp*₁₃₅₈ avec celles des gènes de *shp* non-exprimés permettraient d'indiquer si tous les éléments nécessaires à leurs expressions sont conservés (Browning and Busby, 2016). Nous pouvons également tester si les phéromones synthétiques des phéromones non-exprimées dans nos conditions peuvent activer l'expression des gènes cibles de leurs systèmes Rgg/SHP afin de valider si elles sont fonctionnelles même si nos conditions actuelles ne sont pas idéales pour leur production.

Pour vérifier l'hypothèse d'interférence, nous devons d'abord valider si les régulateurs Rgg₁, Rgg₄ et Rgg₅ contrôlent l'expression des gènes situés à proximité. Pour cela, nous pouvons étudier le niveau d'expression de ces gènes cibles dans un contexte sauvage et un contexte muté pour ces régulateurs. Puis nous pourrions étudier le niveau d'expression des gènes cibles des systèmes dont la phéromone n'est pas produite dans une souche mutée pour la phéromone SHP₁₃₅₈. Comparer le niveau d'expression de ces gènes cibles entre un contexte sauvage et mutant permettrait de savoir si le système Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ interfère dans l'activation de ces gènes cibles. Ensuite, une supplémentation avec le peptide synthétique SHP₁₃₅₈ indiquerait si cette phéromone interagit avec d'autres régulateurs Rgg pour activer l'expression

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

de ces gènes cibles. Cette étude peut également être réalisée avec la fusion transcriptionnelle. Si notre hypothèse d'interférence est validée, ça sera la première démonstration de cross-talk au sein d'une même souche. Dans ce cas la notion d'un couple régulateur/phéromone apparié sera remise en question. Une seule exception est décrite chez *S. pyogenes* où une même phéromone peut interagir avec deux régulateurs des systèmes Rgg₂/SHP₂ et Rgg₃/SHP₃ mais dans ce cas Rgg₂ est un activateur tandis que Rgg₃ agit comme un répresseur transcriptionnel (Aggarwal et al., 2014). Une étude très récente a montré pour la première fois l'interférence de la phéromone PapR avec deux régulateurs PlcR distincts au sein d'une même souche de *B. cereus* (Huillet et al., 2020).

Dans le cas de mise en évidence d'une interférence d'une phéromone avec différents régulateurs Rgg au sein d'une même souche, le mécanisme proposé serait que le niveau d'expression des gènes cibles est dépendant de l'affinité entre la phéromone SHP exprimée et le régulateur Rgg. La Figure 44 A illustre cette hypothèse.

7.4.2. Un même couple Rgg/SHP très actif contrôle plusieurs cibles ?

Une hypothèse alternative serait que l'expression des gènes situés en aval des loci *rgg/shp* dont les phéromones SHP ne sont pas produites soit contrôlée par un autre locus *rgg/shp*, celui de Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ par exemple. Pour vérifier cette hypothèse, nous pouvons étudier si le régulateur Rgg₁₃₅₈ peut se fixer au niveau des régions promotrices des gènes concernés (Fleuchot et al., 2011). Le site de reconnaissance de Rgg₁₃₅₈ étant déjà connu (Fleuchot et al., 2011), une analyse *in silico* des régions promotrices des autres loci *rgg/shp* contribuerait à renforcer cette hypothèse.

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

Dans le cas d'activation par un même couple Rgg/SHP, le système Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ deviendra plus global que celui impliqué dans la production d'un streptide. Le mécanisme proposé serait que, selon l'affinité entre le domaine de fixation à l'ADN du régulateur Rgg₁₃₅₈ et le site de reconnaissance au niveau de la région promotrice des différentes cibles, l'expression des gènes peut être plus ou moins activée. Cette hypothèse est illustrée dans la Figure 44 B.

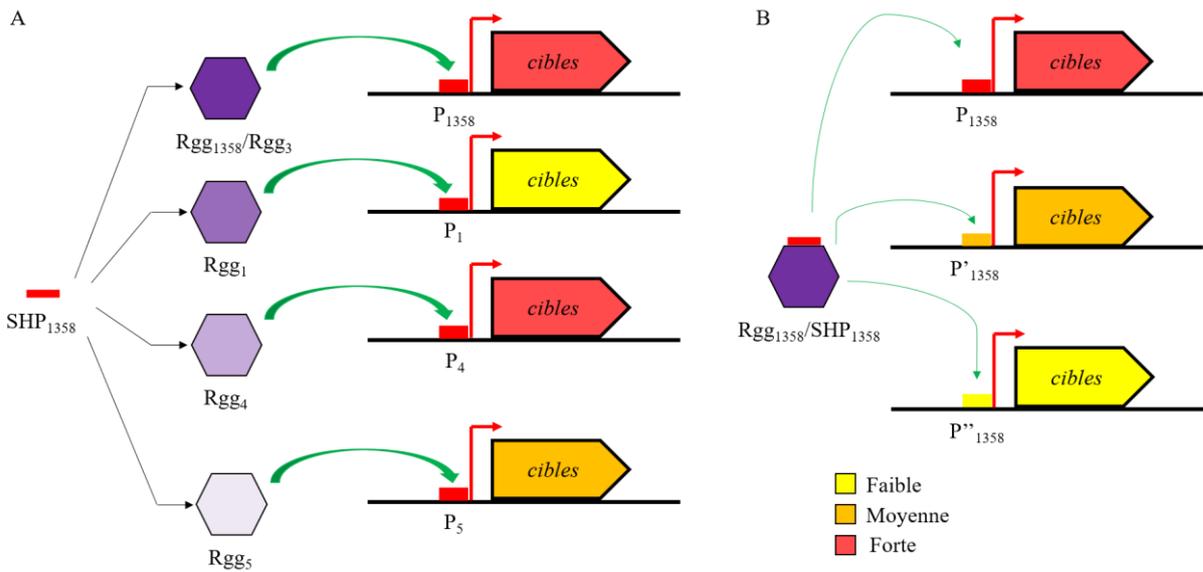


Figure 44. Les deux hypothèses sur la complexité de notion couple régulateur/phéromone apparié. Dans l'hypothèse A, la même phéromone mature SHP₁₃₅₈ pourrait interagir avec quatre régulateurs Rgg différents. Dans l'hypothèse B, le même couple Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈ pourrait activer l'expression des gènes dont la région promotrice serait plus ou moins similaire.

Discussion et Perspectives-Chapitre7.

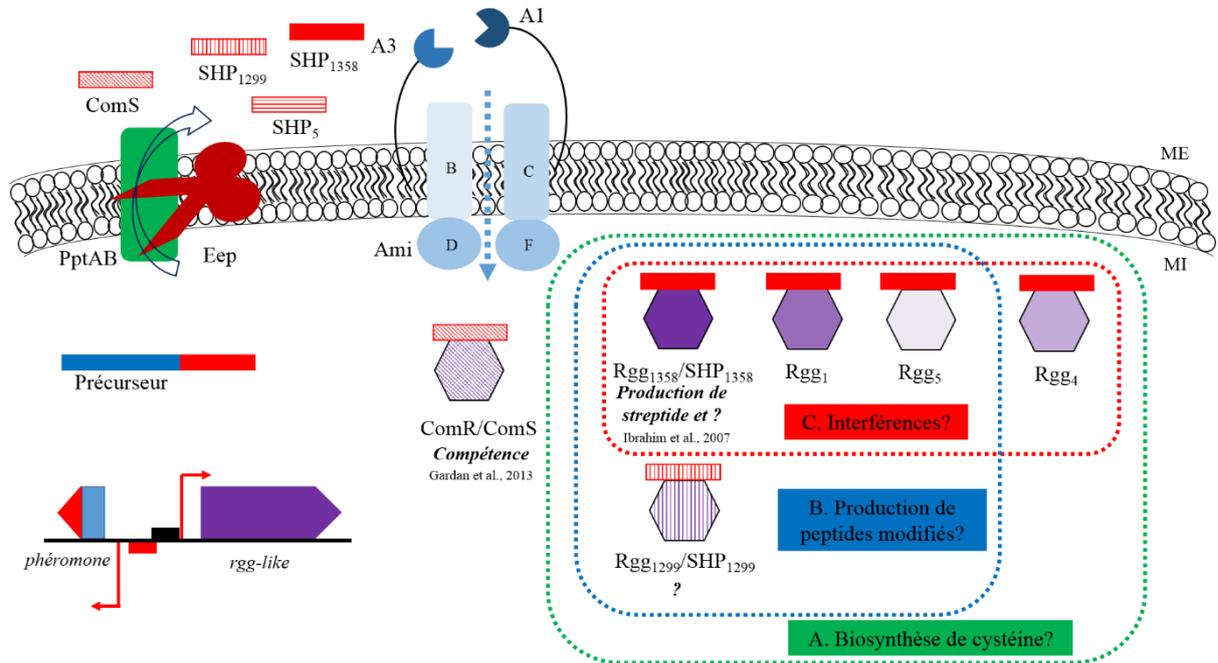


Figure 45. Le mécanisme de QS chez *S. thermophilus*. La production de phéromone matures à partir du précurseur est dépendante de la protéase de la maturation Eep, du transporteur exportant les phéromones matures PptAB et du transporteur d'oligopeptides Ami. Ces phéromones re-intériorisées contrôlent la compétence (ComR/ComS), la production de streptide (Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈) et d'autres fonctions inconnues. L'un de ces cinq systèmes Rgg/SHP contrôlerait la biosynthèse de cystéine (A). L'organisation des gènes contrôlés par certains loci rgg/shp suggèrent que ces systèmes pourraient produire des peptides modifiés de fonctions inconnues (B). La phéromone SHP₁₃₅₈ pourrait interagir avec d'autres régulateurs Rgg pour qui le gène de la phéromone associé est très peu exprimé (shp₅) voire pas exprimé (shp₁ et shp₄). MI : Milieu intracellulaire et ME : Milieu extracellulaire.

Conclusion générale

Conclusion générale

Le transporteur PptAB exporte au moins quatre phéromones matures activant les régulateurs Rgg-like dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus*. Le mécanisme de quorum sensing impliquant les systèmes Rgg/SHP est dépendant de trois acteurs situés au niveau de la membrane, la protéase Eep maturant les phéromones, le transporteur exportant les phéromones et le transporteur d'oligopeptides Ami important les phéromones matures. Ces trois acteurs travaillent de concert pour contrôler le mécanisme de QS. Ils sont donc dédiés à la communication dans nos conditions. La protéase Eep et le transporteur Ami ayant un rôle plus global dans la physiologie de la bactérie dans d'autres conditions, il ne serait pas étonnant que le transporteur PptAB soit pléiotrope dans d'autres contextes. Dans nos conditions où il n'est dédié qu'à l'export des phéromones et donc à la communication, il serait une cible intéressante pour contrôler tous les mécanismes de communication sans impacter la physiologie de la bactérie. Les études plus détaillées de tous les systèmes de Rgg/SHP dans le lait, la niche écologique de *S. thermophilus*, puis en interaction avec d'autres espèces telles que *L. bulgaricus* permettraient de comprendre la communication de *S. thermophilus* avec lui-même mais aussi avec les espèces avec lesquelles il cohabite. La maîtrise de la communication de *S. thermophilus* est un bon outil pour exploiter au mieux cette espèce indispensable dans l'industrie laitière mais qui a aussi sa place parmi les probiotiques et qui progresse pour devenir un outil incontournable en biotechnologie.

Références

- Aggarwal, C., Jimenez, J.C., Nanavati, D., and Federle, M.J. (2014). Multiple Length Peptide-Pheromone Variants Produced by *Streptococcus pyogenes* Directly Bind Rgg Proteins to Confer Transcriptional Regulation. *J. Biol. Chem.* jbc.M114.583989.
- Alexandraki, V., Kazou, M., Blom, J., Pot, B., Papadimitriou, K., and Tsakalidou, E. (2019). Comparative Genomics of *Streptococcus thermophilus* Support Important Traits Concerning the Evolution, Biology and Technological Properties of the Species. *Front. Microbiol.* 10.
- Alix, E., and Blanc-Potard, A.-B. (2009). Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membrane. *Molecular Microbiology* 72, 5–11.
- Alloing et al., G. (1998). Development of competence in *Streptococcus pneumoniae*: pheromone autoinduction and control of quorum sensing by the oligopeptide permease - Alloing - 1998 - *Molecular Microbiology* - Wiley Online Library.
- An, F.Y., and Clewell, D.B. (2002). Identification of the cAD1 sex pheromone precursor in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 184, 1880–1887.
- An, F.Y., Sulavik, M.C., and Clewell, D.B. (1999). Identification and Characterization of a Determinant (*ep*) on the *Enterococcus faecalis* Chromosome That Is Involved in Production of the Peptide Sex Pheromone cAD1. *J Bacteriol* 181, 5915–5921.
- Arnison, P.G., Bibb, M.J., Bierbaum, G., Bowers, A.A., Bugni, T.S., Bulaj, G., Camarero, J.A., Campopiano, D.J., Challis, G.L., Clardy, J., et al. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat Prod Rep* 30, 108–160.
- Auchtung, J.M., Lee, C.A., Monson, R.E., Lehman, A.P., and Grossman, A.D. (2005). Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *PNAS* 102, 12554–12559.
- Bassler, B.L., and Losick, R. (2006). Bacterially Speaking. *Cell* 125, 237–246.
- Bassler, B.L., Greenberg, E.P., and Stevens, A.M. (1997). Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J Bacteriol* 179, 4043–4045.
- Beek, J., Guskov, A., and Slotboom, D.J. (2014). Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol* 143, 419–435.
- Beis et al., K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochemical Society Transactions* 43, 889–893.
- Berntsson, R.P.-A., Schuurman-Wolters, G.K., Dunny, G., Slotboom, D.-J., and Poolman, B. (2012). Structure and Mode of Peptide Binding of Pheromone Receptor PrgZ. *J. Biol. Chem.* 287, 37165–37170.
- Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol* 4, 665–684.

Références

- Blatch, G.L., and Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21, 932–939.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., et al. (2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22, 1554–1558.
- Bortoni, M.E., Terra, V.S., Hinds, J., Andrew, P.W., and Yesilkaya, H. (2009). The pneumococcal response to oxidative stress includes a role for Rgg. *Microbiology* 155, 4123–4134.
- Boutry, C., Wahl, A., Delplace, B., Clippe, A., Fontaine, L., and Hols, P. (2012). Adaptor Protein MecA Is a Negative Regulator of the Expression of Late Competence Genes in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* 194, 1777–1788.
- Boyer, M., and Wisniewski-Dyé, F. (2009). Cell–cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol Ecol* 70, 1–19.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., and Goldstein, J.L. (2000). Regulated Intramembrane Proteolysis: A Control Mechanism Conserved from Bacteria to Humans. *Cell* 100, 391–398.
- Browning, D.F., and Busby, S.J.W. (2016). Local and global regulation of transcription initiation in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 638–650.
- Budamgunta, H., Maes, E., Willems, H., Menschaert, G., Schildermans, K., Kumar, A.A., Boonen, K., and Baggerman, G. (2019). Multiple solvent elution, a method to counter the effects of coelution and ion suppression in LC-MS analysis in bottom up proteomics. *Journal of Chromatography B* 1124, 256–264.
- Capra, E.J., and Laub, M.T. (2012). Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 66, 325–347.
- Chandler, J.R., and Dunny, G.M. (2008). Characterization of the Sequence Specificity Determinants Required for Processing and Control of Sex Pheromone by the Intramembrane Protease Eep and the Plasmid-Encoded Protein PrgY. *J Bacteriol* 190, 1172–1183.
- Chang, J.C., and Federle, M.J. (2016). PptAB Exports Rgg Quorum-Sensing Peptides in *Streptococcus*. *PLoS One* 11.
- Chang, J.C., LaSarre, B., Jimenez, J.C., Aggarwal, C., and Federle, M.J. (2011). Two group A streptococcal peptide pheromones act through opposing Rgg regulators to control biofilm development. *PLoS Pathog.* 7, e1002190.
- Charbonnel, P., Lamarque, M., Aubel, D., Piard, J.-C., Juillard, V., and Atlan, D. (2004). Who determines the diversity of oligopeptide transport specificity in *Lactococcus lactis*? *Le Lait* 84, 95–102.
- Chen, Y., Bandyopadhyay, A., Kozłowicz, B.K., Haemig, H.A.H., Tai, A., Hu, W., and Dunny, G.M. (2017). Mechanisms of peptide sex pheromone regulation of conjugation in *Enterococcus faecalis*. *Microbiologyopen* 6.
- Cheng, D., Lv, H., Yao, Y., Cheng, S., Huang, Q., Wang, H., Liu, X., Bae, T., Li, M., and Liu, Q. (2020). Roles of the Site 2 Protease Eep in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* 202.

Références

- Chikindas, M.L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V.A., and Dicks, L.M. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology* 49, 23–28.
- Claverys, J.-P., and Havarstein, L.S. (2002). EXTRACELLULAR-PEPTIDE CONTROL OF COMPETENCE FOR GENETIC TRANSFORMATION IN. 17.
- Clewell, D.B., and Weaver, K.E. (1989). Sex pheromones and plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* 21, 175–184.
- Cook, L.C., and Federle, M.J. (2014). Peptide pheromone signaling in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *FEMS Microbiol Rev* 38, 473–492.
- Cosgriff, C.J., White, C.R., Teoh, W.P., Grayczyk, J.P., and Alonzo, F. (2019). Control of *Staphylococcus aureus* Quorum Sensing by a Membrane-Embedded Peptidase. *Infection and Immunity* 87, e00019-19.
- Dandoy, D., Fremaux, C., Henry de Frahan, M., Horvath, P., Boyaval, P., Hols, P., and Fontaine, L. (2011). The fast milk acidifying phenotype of *Streptococcus thermophilus* can be acquired by natural transformation of the genomic island encoding the cell-envelope proteinase PrtS. *Microb Cell Fact* 10, S21.
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., and Chen, J. (2008). Structure, Function, and Evolution of Bacterial ATP-Binding Cassette Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 317–364.
- Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F., Lereclus, D., and Arold, S.T. (2007). Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18490–18495.
- Delorme, C. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology* 126, 274–277.
- Delorme, C., Legravet, N., Jamet, E., Hoarau, C., Alexandre, B., El-Sharoud, W.M., Darwish, M.S., and Renault, P. (2017). Study of *Streptococcus thermophilus* population on a world-wide and historical collection by a new MLST scheme. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 70–81.
- Denham, E.L., Ward, P.N., and Leigh, J.A. (2008). Lipoprotein Signal Peptides Are Processed by Lsp and Eep of *Streptococcus uberis*. *J Bacteriol* 190, 4641–4647.
- Do, H., and Kumaraswami, M. (2016). Structural Mechanisms of Peptide Recognition and Allosteric Modulation of Gene Regulation by the RRNPP Family of Quorum-Sensing Regulators. *Journal of Molecular Biology* 428, 2793–2804.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2012). Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? *Appl Environ Microbiol* 78, 1–6.
- Domon, B., and Aebersold, R. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* 312, 212–217.
- Dong, Y.-H., and Zhang, L.-H. (2005). Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. *J. Microbiol.* 10.
- Dubois, T. (2012). Etude du système de communication cellulaire NprR-NprX au sein du groupe *Bacillus cereus*. phdthesis. AgroParisTech.

Références

- Dubois, T., Lemy, C., Perchat, S., and Lereclus, D. (2019). The signaling peptide NprX controlling sporulation and necrotrophism is imported into *Bacillus thuringiensis* by two oligopeptide permease systems. *Molecular Microbiology* 112, 219–232.
- Dunn, K.W., Kamocka, M.M., and McDonald, J.H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol* 300, C723–C742.
- Dunny, G.M. (2007). The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell–cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362, 1185–1193.
- Dunny, G.M., and Leonard, B.A.B. (1997). Cell-Cell Communication in Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Microbiology* 51, 527–564.
- Facklam, R. (2002). What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clinical Microbiology Reviews* 15, 613–630.
- Federle, M.J., and Bassler, B.L. (2003). Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* 112, 1291–1299.
- Fernandez, A., Thibessard, A., Borges, F., Gintz, B., Decaris, B., and Leblond–Bourget, N. (2004). Characterisation of oxidative stress-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Arch Microbiol* 182, 364–372.
- Fernandez, A., Borges, F., Gintz, B., Decaris, B., and Leblond-Bourget, N. (2006). The *rggC* locus, with a frameshift mutation, is involved in oxidative stress response by *Streptococcus thermophilus*. *Arch Microbiol* 186, 161–169.
- Fleuchot, B. (2011). Les régulateurs transcriptionnels Rgg. Confirmation de leur implication dans des phénomènes de quorum-sensing et identification de leurs cibles. thesis. Paris, AgroParisTech.
- Fleuchot, B., Gitton, C., Guillot, A., Vidic, J., Nicolas, P., Besset, C., Fontaine, L., Hols, P., Leblond-Bourget, N., Monnet, V., et al. (2011). Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci. *Molecular Microbiology* 80, 1102–1119.
- Fleuchot, B., Guillot, A., Mézange, C., Besset, C., Chambellon, E., Monnet, V., and Gardan, R. (2013). Rgg-Associated SHP Signaling Peptides Mediate Cross-Talk in Streptococci. *PLoS One* 8.
- Fontaine, L., Boutry, C., Guedon, E., Guillot, A., Ibrahim, M., Grossiord, B., and Hols, P. (2007). Quorum-Sensing Regulation of the Production of Blp Bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* 189, 7195–7205.
- Fontaine, L., Boutry, C., de Frahan, M.H., Delplace, B., Fremaux, C., Horvath, P., Boyaval, P., and Hols, P. (2010). A Novel Pheromone Quorum-Sensing System Controls the Development of Natural Competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol* 192, 1444–1454.
- Fontaine, L., Goffin, P., Dubout, H., Delplace, B., Baulard, A., Lecat-Guillet, N., Chambellon, E., Gardan, R., and Hols, P. (2013). Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci. *Molecular Microbiology* 87, 1113–1132.
- Fontaine, L., Wahl, A., Fléchar, M., Mignolet, J., and Hols, P. (2015). Regulation of competence for natural transformation in streptococci. *Infection, Genetics and Evolution* 33, 343–360.

Références

- Frank, K.L., Guiton, P.S., Barnes, A.M.T., Manias, D.A., Chuang-Smith, O.N., Kohler, P.L., Spaulding, A.R., Hultgren, S.J., Schlievert, P.M., and Dunny, G.M. (2013). AhrC and Eep Are Biofilm Infection-Associated Virulence Factors in *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 81, 1696–1708.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994). Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *Microbiol. Rev.* 58, 62–91.
- Garai, P., Chandra, K., and Chakravorty, D. (2016). Bacterial peptide transporters: Messengers of nutrition to virulence. *Virulence* 8, 297–309.
- Garault, P., Bars, D.L., Besset, C., and Monnet, V. (2002). Three Oligopeptide-binding Proteins Are Involved in the Oligopeptide Transport of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 277, 32–39.
- Gardan, R., Besset, C., Guillot, A., Gitton, C., and Monnet, V. (2009). The Oligopeptide Transport System Is Essential for the Development of Natural Competence in *Streptococcus thermophilus* Strain LMD-9. *J Bacteriol* 191, 4647–4655.
- Gardan, R., Besset, C., Gitton, C., Guillot, A., Fontaine, L., Hols, P., and Monnet, V. (2013). Extracellular Life Cycle of ComS, the Competence-Stimulating Peptide of *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 195, 1845–1855.
- Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M., and Lereclus, D. (2001). Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence. *Molecular Microbiology* 40, 963–975.
- Hardie, J.M., and Whiley, R.A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology* 83, 1S-11S.
- Haustenne, L., Bastin, G., Hols, P., and Fontaine, L. (2015). Modeling of the ComRS Signaling Pathway Reveals the Limiting Factors Controlling Competence in *Streptococcus thermophilus*. *Front. Microbiol.* 6.
- Havarstein, L.S., Coomaraswamy, G., and Morrison, D.A. (1995a). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 11140–11144.
- Havarstein, L.S., Coomaraswamy, G., and Morrison, D.A. (1995b). An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92, 11140–11144.
- Heinrich, J., Lundén, T., Kontinen, V.P., and Wiegert, T. (2008). The *Bacillus subtilis* ABC transporter EcsAB influences intramembrane proteolysis through RasP. *Microbiology* 154, 1989–1997.
- Hiles, I.D., Gallagher, M.P., Jamieson, D.J., and Higgins, C.F. (1987). Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Molecular Biology* 195, 125–142.
- Holliday, G.L., Akiva, E., Meng, E.C., Brown, S.D., Calhoun, S., Pieper, U., Sali, A., Booker, S.J., and Babbitt, P.C. (2018). Atlas of the Radical SAM Superfamily: Divergent Evolution of Function Using a “Plug & Play” Domain. *Methods Enzymol* 606, 1–71.

Références

- Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., et al. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 29, 435–463.
- Hudson, G.A., and Mitchell, D.A. (2018). RiPP antibiotics: biosynthesis and engineering potential. *Curr. Opin. Microbiol.* 45, 61–69.
- Huillet, E., Bridoux, L., Barboza, I., Lemy, C., André-Leroux, G., and Lereclus, D. (2020). The signaling peptide PapR is required for the activity of the quorum-sensor PlcRa in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology*, 166, 398–410.
- Hyrup Møller, L., Bahnsen, J.S., Nielsen, H.M., Østergaard, J., Stürup, S., and Gammelgaard, B. (2015). Selenium as an alternative peptide label - comparison to fluorophore-labelled penetratin. *Eur J Pharm Sci* 67, 76–84.
- Ibrahim, M., Nicolas, P., Bessières, P., Bolotin, A., Monnet, V., and Gardan, R. (2007a). A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci. *Microbiology* 153, 3631–3644.
- Ibrahim, M., Guillot, A., Wessner, F., Algaron, F., Besset, C., Courtin, P., Gardan, R., and Monnet, V. (2007b). Control of the Transcription of a Short Gene Encoding a Cyclic Peptide in *Streptococcus thermophilus*: a New Quorum-Sensing System? *J Bacteriol* 189, 8844–8854.
- Ji, G., Beavis, R., and Novick, R.P. (1997). Bacterial Interference Caused by Autoinducing Peptide Variants. *Science* 276, 2027–2030.
- Jonsson, I.-M., Juuti, J.T., François, P., AlMajidi, R., Pietiäinen, M., Girard, M., Lindholm, C., Saller, M.J., Driessen, A.J.M., Kuusela, P., et al. (2010). Inactivation of the Ecs ABC Transporter of *Staphylococcus aureus* Attenuates Virulence by Altering Composition and Function of Bacterial Wall. *PLOS ONE* 5, e14209.
- Karpievitch, Y.V., Polpitiya, A.D., Anderson, G.A., Smith, R.D., and Dabney, A.R. (2010). Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *Ann Appl Stat* 4, 1797–1823.
- Kavanaugh, J.S., Thoendel, M., and Horswill, A.R. (2007). A role for type I signal peptidase in *Staphylococcus aureus* quorum sensing. *Molecular Microbiology* 65, 780–798.
- Kawamura, Y., Hou, X.G., Sultana, F., Miura, H., and Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 406–408.
- Khan, R., Rukke, H.V., Ricomini Filho, A.P., Fimland, G., Arntzen, M.Ø., Thiede, B., and Petersen, F.C. (2012). Extracellular Identification of a Processed Type II ComR/ComS Pheromone of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 194, 3781–3788.
- Kleerebezem, M., Quadri, L.E.N., Kuipers, O.P., and De Vos, W.M. (1997). Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* 24, 895–904.
- Klepsch, M.M., Kovermann, M., Löw, C., Balbach, J., Permentier, H.P., Fusetti, F., de Gier, J.W., Slotboom, D.J., and Berntsson, R.P.-A. (2011). *Escherichia coli* Peptide Binding Protein OppA Has a Preference for Positively Charged Peptides. *Journal of Molecular Biology* 414, 75–85.

Références

- Koide, A., and Hoch, J.A. (1994). Identification of a second oligopeptide transport system in *Bacillus subtilis* and determination of its role in sporulation. *Molecular Microbiology* 13, 417–426.
- Koide, A., Perego, M., and Hoch, J.A. (1999). ScoC Regulates Peptide Transport and Sporulation Initiation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181, 4114–4117.
- Kolars, J.C., Levitt, M.D., Aouji, M., and Savaiano, D.A. (1984). Yogurt — An Autodigesting Source of Lactose. *New England Journal of Medicine* 310, 1–3.
- Kovaleva, G.Y., and Gelfand, M.S. (2007). Transcriptional regulation of the methionine and cysteine transport and metabolism in streptococci. *FEMS Microbiol. Lett.* 276, 207–215.
- Lanfermeijer, F.C., Detmers, F.J.M., Konings, W.N., and Poolman, B. (2000). On the binding mechanism of the peptide receptor of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *The EMBO Journal* 19, 3649–3656.
- Langella, O., Valot, B., Balliau, T., Blein-Nicolas, M., Bonhomme, L., and Zivy, M. (2017). X!TandemPipeline: A Tool to Manage Sequence Redundancy for Protein Inference and Phosphosite Identification. *J. Proteome Res.* 16, 494–503.
- Lanigan-Gerdes, S., Dooley, A.N., Faull, K.F., and Lazazzera, B.A. (2007). Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 65, 1321–1333.
- Lanigan-Gerdes, S., Briceno, G., Dooley, A.N., Faull, K.F., and Lazazzera, B.A. (2008). Identification of Residues Important for Cleavage of the Extracellular Signaling Peptide CSF of *Bacillus subtilis* from Its Precursor Protein. *J Bacteriol* 190, 6668–6675.
- LaSarre, B., Aggarwal, C., and Federle, M.J. (2012). Antagonistic Rgg Regulators Mediate Quorum Sensing via Competitive DNA Binding in *Streptococcus pyogenes*. *MBio* 3.
- Lazazzera, B.A., Solomon, J.M., and Grossman, A.D. (1997). An Exported Peptide Functions Intracellularly to Contribute to Cell Density Signaling in *B. subtilis*. *Cell* 89, 917–925.
- Lecomte, X., Gagnaire, V., Lortal, S., Dary, A., and Genay, M. (2016). *Streptococcus thermophilus*, an emerging and promising tool for heterologous expression: Advantages and future trends. *Food Microbiology* 53, 2–9.
- Lee, J., Wu, J., Deng, Y., Wang, J., Wang, C., Wang, J., Chang, C., Dong, Y., Williams, P., and Zhang, L.-H. (2013). A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. *Nat Chem Biol* 9, 339–343.
- Leonard, B.A., Podbielski, A., Hedberg, P.J., and Dunny, G.M. (1996). *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 260–264.
- Leskelä, S., Kontinen, V.P., and Sarvas, M. (1996). Molecular analysis of an operon in *Bacillus subtilis* encoding a novel ABC transporter with a role in exoprotein production, sporulation and competence. *Microbiology (Reading, Engl.)* 142 (Pt 1), 71–77.
- Li, Z., and Nair, S.K. (2012). Quorum sensing: How bacteria can coordinate activity and synchronize their response to external signals? *Protein Sci* 21, 1403–1417.

Références

- Liu, C., Sun, D., Zhu, J., and Liu, W. (2019). Two-Component Signal Transduction Systems: A Major Strategy for Connecting Input Stimuli to Biofilm Formation. *Front Microbiol* 9.
- Liu, J.-E., Zhang, Y., Zhang, J., Dong, P.-L., Chen, M., and Duan, Z.-P. (2010). Probiotic Yogurt Effects on Intestinal Flora of Patients with Chronic Liver Disease. *Nurs. Res.* 59, 426–432.
- Liu, M., Siezen, R.J., and Nauta, A. (2009). In Silico Prediction of Horizontal Gene Transfer Events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* Reveals Protocooperation in Yogurt Manufacturing. *Appl Environ Microbiol* 75, 4120–4129.
- Lyon, G.J., Mayville, P., Muir, T.W., and Novick, R.P. (2000). Rational design of a global inhibitor of the virulence response in *Staphylococcus aureus*, based in part on localization of the site of inhibition to the receptor-histidine kinase, AgrC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 13330–13335.
- Majno, G., and Joris, I. (1979). Billroth and Penicillium. *Rev. Infect. Dis.* 1, 880–884.
- Maqbool, A., Horler, R.S.P., Muller, A., Wilkinson, A.J., Wilson, K.S., and Thomas, G.H. (2015). The substrate-binding protein in bacterial ABC transporters: dissecting roles in the evolution of substrate specificity. *Biochemical Society Transactions* 43, 1011–1017.
- Mayville, P., Ji, G., Beavis, R., Yang, H., Goger, M., Novick, R.P., and Muir, T.W. (1999). Structure-activity analysis of synthetic autoinducing thiolactone peptides from *Staphylococcus aureus* responsible for virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1218–1223.
- McNab, R., Ford, S.K., El-Sabaeny, A., Barbieri, B., Cook, G.S., and Lamont, R.J. (2003). LuxS-Based Signaling in *Streptococcus gordonii*: Autoinducer 2 Controls Carbohydrate Metabolism and Biofilm Formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 185, 274–284.
- Merwin, N.J., Mousa, W.K., Dejong, C.A., Skinnider, M.A., Cannon, M.J., Li, H., Dial, K., Gunabalasingam, M., Johnston, C., and Magarvey, N.A. (2020). DeepRiPP integrates multiomics data to automate discovery of novel ribosomally synthesized natural products. *PNAS* 117, 371–380.
- Mignolet, J., Fontaine, L., Sass, A., Nannan, C., Mahillon, J., Coenye, T., and Hols, P. (2018). Circuitry Rewiring Directly Couples Competence to Predation in the Gut Dweller *Streptococcus salivarius*. *Cell Reports* 22, 1627–1638.
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001). Quorum Sensing in Bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 165–199.
- Mirouze, N., Bergé, M.A., Soulet, A.-L., Mortier-Barrière, I., Quentin, Y., Fichant, G., Granadel, C., Noirot-Gros, M.-F., Noirot, P., Polard, P., et al. (2013). Direct involvement of DprA, the transformation-dedicated RecA loader, in the shut-off of pneumococcal competence. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, E1035–E1044.
- Monnet, V., and Gardan, R. (2015). Quorum-sensing regulators in Gram-positive bacteria: “cherchez le peptide.” *Mol. Microbiol.* 97, 181–184.
- Monnet, V., Juillard, V., and Gardan, R. (2014). Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 339–351.
- Monnet et al., V. (2003). Bacterial oligopeptide-binding proteins. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 60, 2100–2114.

Références

- Nakayama, J., Yoshida, K., Kobayashi, H., Isogai, A., Clewell, D.B., and Suzuki, A. (1995). Cloning and characterization of a region of *Enterococcus faecalis* plasmid pPD1 encoding pheromone inhibitor (ipd), pheromone sensitivity (traC), and pheromone shutdown (traB) genes. *Journal of Bacteriology* 177, 5567–5573.
- Nealson, K.H., and Hastings, J.W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* 43, 496–518.
- Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W. (1970). Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System1. *J Bacteriol* 104, 313–322.
- Neiditch, M.B., Capodagli, G.C., Prehna, G., and Federle, M.J. (2017). Genetic and Structural Analyses of RRNPP Intercellular Peptide Signaling of Gram-Positive Bacteria. *Annual Review of Genetics* 51, 311–333.
- Nicolas, P., Bize, L., Muri, F., Hoebeke, M., Rodolphe, F., Ehrlich, S.D., Prum, B., and Bessières, P. (2002). Mining *Bacillus subtilis* chromosome heterogeneities using hidden Markov models. *Nucleic Acids Res* 30, 1418–1426.
- Norcross, S., Sunderraj, A., and Tantama, M. (2019). pH- and Temperature-Dependent Peptide Binding to the *Lactococcus lactis* Oligopeptide-Binding Protein A Measured with a Fluorescence Anisotropy Assay. *ACS Omega* 4, 2812–2822.
- Ong, S.-E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., and Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics* 1, 376–386.
- Papenfort, K., and Bassler, B.L. (2016). Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 14, 576–588.
- Parashar, V., Aggarwal, C., Federle, M.J., and Neiditch, M.B. (2015). Rgg protein structure–function and inhibition by cyclic peptide compounds. *PNAS* 112, 5177–5182.
- Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2000). Acyl-homoserine lactone quorum sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8789–8793.
- Parsek, M.R., and Greenberg, E.P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology* 13, 27–33.
- Perchat, S., Dubois, T., Zouhir, S., Gominet, M., Poncet, S., Lemy, C., Aumont-Nicaise, M., Deutscher, J., Gohar, M., Nessler, S., et al. (2011a). A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Mol. Microbiol.* 82, 619–633.
- Perchat, S., Dubois, T., Zouhir, S., Gominet, M., Poncet, S., Lemy, C., Aumont-Nicaise, M., Deutscher, J., Gohar, M., Nessler, S., et al. (2011b). A cell–cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Molecular Microbiology* 82, 619–633.
- Perchat, S., Talagas, A., Zouhir, S., Poncet, S., Bouillaut, L., Nessler, S., and Lereclus, D. (2016). NprR, a moonlighting quorum sensor shifting from a phosphatase activity to a transcriptional activator. *Microb Cell* 3, 573–575.

Références

- Perego, M. (1997). A peptide export–import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *PNAS* 94, 8612–8617.
- Perego, M. (2013). Forty Years in the Making: Understanding the Molecular Mechanism of Peptide Regulation in Bacterial Development. *PLOS Biology* 11, e1001516.
- Pereira, C.S., Thompson, J.A., and Xavier, K.B. (2013). AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 37, 156–181.
- Pérez-Pascual, D., Gaudu, P., Fleuchot, B., Besset, C., Rosinski-Chupin, I., Guillot, A., Monnet, V., and Gardan, R. (2015). RovS and Its Associated Signaling Peptide Form a Cell-To-Cell Communication System Required for *Streptococcus agalactiae* Pathogenesis. *MBio* 6.
- Perez-Pascual, D., Monnet, V., and Gardan, R. (2016). Bacterial Cell-Cell Communication in the Host via RRNPP Peptide-Binding Regulators. *Front Microbiol* 7, 706.
- Peterson et al. (2004). Identification of competence pheromone responsive genes in *Streptococcus pneumoniae* by use of DNA microarrays.
- Pomerantsev, A.P., Pomerantseva, O.M., Camp, A.S., Mukkamala, R., Goldman, S., and Leppla, S.H. (2009). PapR peptide maturation: role of the NprB protease in *Bacillus cereus* 569 PlcR/PapR global gene regulation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 55, 361–377.
- Póntigo, F., Moraga, M., and Flores, S.V. (2015). Molecular phylogeny and a taxonomic proposal for the genus *Streptococcus*. *Genet. Mol. Res.* 14, 10905–10918.
- Pottathil, M., and Lazazzera, B.A. (2003). The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front. Biosci.* 8, d32-45.
- Qiu, R., Pei, W., Zhang, L., Lin, J., and Ji, G. (2005). Identification of the putative staphylococcal AgrB catalytic residues involving the proteolytic cleavage of AgrD to generate autoinducing peptide. *J. Biol. Chem.* 280, 16695–16704.
- Rampelotto, P.H. (2013). Extremophiles and Extreme Environments. *Life (Basel)* 3, 482–485.
- Rhimi, M., Boisson, A., Dejob, M., Boudebouze, S., Maguin, E., Haser, R., and Aghajari, N. (2010). Efficient bioconversion of lactose in milk and whey: immobilization and biochemical characterization of a beta-galactosidase from the dairy *Streptococcus thermophilus* LMD9 strain. *Res. Microbiol.* 161, 515–525.
- Richards, V.P., Palmer, S.R., Pavinski Bitar, P.D., Qin, X., Weinstock, G.M., Highlander, S.K., Town, C.D., Burne, R.A., and Stanhope, M.J. (2014). Phylogenomics and the Dynamic Genome Evolution of the Genus *Streptococcus*. *Genome Biol Evol* 6, 741–753.
- Rodríguez-Serrano, G.M., Garcia-Garibay, J.M., Cruz-Guerrero, A.E., Gomez-Ruiz, L.D.C., Ayala-Nino, A., Castaneda-Ovando, A., and Gonzalez-Olivares, L.G. (2018). Proteolytic system of *Streptococcus thermophilus*: A review. *J. Microbiol. Biotechnol.*
- Roszak, D.B., and Colwell, R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews* 51, 365–379.

Références

- Rul, F. (2017). *Yogurt Microbiology, Organoleptic Properties and Probiotic Potential* (Boca Raton: Crc Press-Taylor & Francis Group).
- Russo, P., Hood, B.L., Bateman, N.W., and Conrads, T.P. (2017). Quantitative Mass Spectrometry by Isotope Dilution and Multiple Reaction Monitoring (MRM). *Methods Mol. Biol.* 1606, 313–332.
- Saenz, H.L., Augsburger, V., Vuong, C., Jack, R.W., Götz, F., and Otto, M. (2000). Inducible expression and cellular location of AgrB, a protein involved in the maturation of the staphylococcal quorum-sensing pheromone. *Arch Microbiol* 174, 452–455.
- Salminen, S., and Wright, A. von (2004). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Third Edition (CRC Press).
- Scheepers et al. (2016). An updated structural classification of substrate-binding proteins - Scheepers - 2016 - FEBS Letters - Wiley Online Library.
- Schilcher, K., Caesar, L.K., Cech, N.B., and Horswill, A.R. (2020). Processing, Export, and Identification of Novel Linear Peptides from *Staphylococcus aureus*. *MBio* 11, e00112-20, /mbio/11/2/mBio.00112-20.atom.
- Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Krusch, U., and Neve, H. (1991). Revival of the Species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev. *Systematic and Applied Microbiology* 14, 386–388.
- Schleifer, K.-H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W., and Amann, R. (1995). Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* 5, 1081–1094.
- Schneider, J.S., and Glickman, M.S. (2013). Function of site-2 proteases in bacteria and bacterial pathogens. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 2808–2814.
- Schramma, K.R., Bushin, L.B., and Seyedsayamdost, M.R. (2015). Structure and biosynthesis of a macrocyclic peptide containing an unprecedented lysine-to-tryptophan crosslink. *Nat Chem* 7, 431–437.
- Schwartz, K., Sekedat, M.D., Syed, A.K., O'Hara, B., Payne, D.E., Lamb, A., and Boles, B.R. (2014). The AgrD N-Terminal Leader Peptide of *Staphylococcus aureus* Has Cytolytic and Amyloidogenic Properties. *Infection and Immunity* 82, 3837–3844.
- Seigneurin-Berny, D., King, M.S., Sautron, E., Moyet, L., Catty, P., André, F., Rolland, N., Kunji, E.R.S., and Frelet-Barrand, A. (2016). Membrane Protein Production in *Lactococcus lactis* for Functional Studies. In *Heterologous Expression of Membrane Proteins*, I. Mus-Veteau, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 79–101.
- Shanker, E., and Federle, M.J. (2017). Quorum Sensing Regulation of Competence and Bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and mutans. *Genes (Basel)* 8.
- Sharom, F.J. (2014). Complex Interplay between the P-Glycoprotein Multidrug Efflux Pump and the Membrane: Its Role in Modulating Protein Function. *Front Oncol* 4, 41.
- Sikorski, R.S., Boguski, M.S., Goebel, M., and Hieter, P. (1990). A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell* 60, 307–317.

Références

- Silhavy, T.J., Kahne, D., and Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.
- Slamti, L., and Lereclus, D. (2005). Specificity and Polymorphism of the PlcR-PapR Quorum-Sensing System in the *Bacillus cereus* Group. *Journal of Bacteriology* 187, 1182–1187.
- Slamti et al., L. (2019). The oligopeptide ABC-importers are essential communication channels in Gram-positive bacteria. *Research in Microbiology*.
- Stephens, K. (1986). Pheromones Among the Prokaryotes. *CRC Critical Reviews in Microbiology* 13, 309–334.
- Stephenson, S., Mueller, C., Jiang, M., and Perego, M. (2003). Molecular Analysis of Phr Peptide Processing in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 185, 4861–4871.
- Sturme, M.H.J., Kleerebezem, M., Nakayama, J., Akkermans, A.D.L., Vaughan, E.E., and Vos, W.M. de (2002). Cell to cell communication by autoinducing peptides in gram-positive bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 233–243.
- Sulavik, M.C., Tardif, G., and Clewell, D.B. (1992). Identification of a gene, *rgg*, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of *Streptococcus gordonii* Challis. *J Bacteriol* 174, 3577–3586.
- Talagas, A., Fontaine, L., Ledesma-Garca, L., Mignolet, J., Sierra-Gallay, I.L. de la, Lazar, N., Aumont-Nicaise, M., Federle, M.J., Prehna, G., Hols, P., et al. (2016). Structural Insights into Streptococcal Competence Regulation by the Cell-to-Cell Communication System ComRS. *PLOS Pathogens* 12, e1005980.
- Tamime, A.Y., and Robinson, R.K. (1999). *Yoghurt: Science and Technology* (Woodhead Publishing).
- Thibessard, A., Borges, F., Fernandez, A., Gintz, B., Decaris, B., and Leblond-Bourget, N. (2004). Identification of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 Genes Involved in Defense against Superoxide Stress. *Appl Environ Microbiol* 70, 2220–2229.
- Thoendel, M., and Horswill, A.R. (2010). Biosynthesis of Peptide Signals in Gram-Positive Bacteria. *Adv Appl Microbiol* 71, 91–112.
- Tomasz, A. (1965). Control of the Competent State in Pneumococcus by a Hormone-Like Cell Product: An Example for a New Type of Regulatory Mechanism in Bacteria. *Nature* 208, 155–159.
- Turkina, M.V., and Vikström, E. (2019). Bacteria-Host Crosstalk: Sensing of the Quorum in the Context of *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *JIN* 11, 263–279.
- Varahan, S., Harms, N., Gilmore, M.S., Tomich, J.M., and Hancock, L.E. (2014). An ABC Transporter Is Required for Secretion of Peptide Sex Pheromones in *Enterococcus faecalis*. *MBio* 5.
- Verbeke, F., Debunne, N., Janssens, Y., Tack, L., Wynendaele, E., Rigole, P., Coenye, T., and De Spiegeleer, B. (2018). Detection and quantification of *Enterococcus faecalis* RNPP-type quorum sensing peptides in bacterial culture media by UHPLC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 160, 55–63.

Références

- Vickerman, M.M., and Mansfield, J.M. (2019). Streptococcal peptides that signal *Enterococcus faecalis* cells carrying the pheromone-responsive conjugative plasmid pAM373. *Mol Oral Microbiol* 34, 254–262.
- Wang, B., and Muir, T.W. (2016). Regulation of Virulence in *Staphylococcus aureus*: Molecular Mechanisms and Remaining Puzzles. *Cell Chemical Biology* 23, 214–224.
- Wang, C.Y., and Dawid, S. (2018). Mobilization of Bacteriocins during Competence in Streptococci. *Trends in Microbiology* 26, 389–391.
- Wang, B., Zhao, A., Novick, R.P., and Muir, T.W. (2015). Key driving forces in the biosynthesis of autoinducing peptides required for staphylococcal virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 10679–10684.
- Wang, C.Y., Medlin, J.S., Nguyen, D.R., Disbennett, W.M., and Dawid, S. (2020). Molecular Determinants of Substrate Selectivity of a Pneumococcal Rgg-Regulated Peptidase-Containing ABC Transporter. *MBio* 11.
- Weng, L., Piotrowski, A., and Morrison, D.A. (2013). Exit from Competence for Genetic Transformation in *Streptococcus pneumoniae* Is Regulated at Multiple Levels. *PLoS ONE* 8, e64197.
- Weyder et al., M. (2018). *Frontiers | Dynamic Modeling of Streptococcus pneumoniae Competence Provides Regulatory Mechanistic Insights Into Its Tight Temporal Regulation | Microbiology.*
- Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L., and Salmond, G.P.C. (2001). Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 25, 365–404.
- Whiteley, M., Diggle, S.P., and Greenberg, E.P. (2017). Progress in and promise of bacterial quorum sensing research. *Nature* 551, 313–320.
- Wu, Q., and Shah, N.P. (2018). Comparative mRNA-Seq Analysis Reveals the Improved EPS Production Machinery in *Streptococcus thermophilus* ASCC 1275 During Optimized Milk Fermentation. *Front Microbiol* 9.
- Wüthrich, D., Wenzel, C., Bavan, T., Bruggmann, R., Berthoud, H., and Irmeler, S. (2018). Transcriptional Regulation of Cysteine and Methionine Metabolism in *Lactobacillus paracasei* FAM18149. *Front. Microbiol.* 9, 1261.
- Xie, Z., Meng, K., Yang, X., Liu, J., Yu, J., Zheng, C., Cao, W., and Liu, H. (2019). Identification of a Quorum Sensing System Regulating Capsule Polysaccharide Production and Biofilm Formation in *Streptococcus zooepidemicus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9.
- Yates, J.R. (2004). Mass Spectral Analysis in Proteomics. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33, 297–316.
- Yu, J., Ge, J., Heuveling, J., Schneider, E., and Yang, M. (2015). Structural basis for substrate specificity of an amino acid ABC transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 5243–5248.
- Zhang, J., Xin, L., Shan, B., Chen, W., Xie, M., Yuen, D., Zhang, W., Zhang, Z., Lajoie, G.A., and Ma, B. (2012). PEAKS DB: De Novo Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification. *Mol Cell Proteomics* 11.

Références

Zhang, L., Gray, L., Novick, R.P., and Ji, G. (2002). Transmembrane Topology of AgrB, the Protein Involved in the Post-translational Modification of AgrD in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* 277, 34736–34742.

Zhong, Z., He, B., Li, J., and Li, Y.-X. (2020). Challenges and advances in genome mining of ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs). *Synthetic and Systems Biotechnology* 5, 155–172.

ANNEXE A

Matériel et méthodes

1. Souches bactériennes et conditions de croissance.

La souche LMD-9 de *Streptococcus thermophilus* a été utilisée dans cette étude. Elle porte deux plasmides appelés plasmide1 [NC_008500.1](#) et plasmide2 [NC_008501.1](#) (Makarova et al., 2006). Les dérivés de cette souche utilisés ou construits dans ce projet sont listés dans l'ANNEXE B. *S. thermophilus* a été cultivé à 37°C ou 42°C en M17 (Difco) enrichi en lactose à 10 g l⁻¹ ou en milieu chimiquement défini (MCD) (Letort and Juillard, 2001). *Escherichia coli* a été cultivée à 37°C dans le bouillon de Luria-Bertani sous agitation. De l'agarose à 1,5% a été rajouté au milieu dans le cas échéant. Les antibiotiques ont été également ajoutés dans le milieu de culture si nécessaire aux concentrations finales suivantes : érythromycine à 150 µg ml⁻¹ pour *E. coli* et à 5 µg ml⁻¹ pour *S. thermophilus* et kanamycine à 1 mg ml⁻¹ pour *S. thermophilus*.

2. Manipulation d'ADN et séquençage.

Les enzymes de restrictions, T4 DNA ligase (New England Biolabs), et Phusion DNA polymerase (Finnzymes) ont été utilisées selon les instructions des fabricants. Les méthodes standards ont été utilisées pour la purification d'ADN, la digestion avec les enzymes de restrictions, la PCR, la ligation et le séquençage. Les amorces, synthétisées par Eurofins, sont listées dans l'ANNEXE E. La souche TG1 *repA*⁺ d'*E. coli* a été utilisée comme hôte pour les expériences de clonage (Gardan et al., 2009). *S. thermophilus* a été transformé en utilisant des cellules compétentes naturelles (Gardan et al., 2009) avec l'addition du peptide de compétence synthétique (ComS) à 1µM si nécessaire ou en utilisant des cellules électro-compétentes (Ibrahim et al., 2007) si les souches n'étaient pas compétentes naturellement. Les plasmides utilisés sont listés dans l'ANNEXE E.

3. Construction de souches mutantes :

La méthode de PCR par chevauchement (« overlapping PCR ») a été utilisée pour la délétion des gènes *pptAB* et pour les remplacer par une cassette de résistance à l'érythromycine (*erm*) selon la méthode suivante. La cassette *erm* a été amplifiée par PCR avec les amorces Erm-F et Erm-R à partir du plasmide pG⁺host9 comme matrice (Biswas et al., 1993) et fusionnée par PCR aux fragments situés en amont et en aval des gènes *pptAB*. Les fragments en aval et en amont ont été amplifiés avec les amorces *pptABe_up-F/pptABe_up-R* et *pptABe_down-F/pptABe_down-R*, respectivement en utilisant l'ADN chromosomique de la souche LMD-9 comme matrice. Le fragment PCR résultant a été utilisé pour transformer les cellules compétentes naturellement de la souche LMD-9 conduisant à la construction de la souche TIL1486 ($\Delta pptAB :: erm$). Les souches TIL1488 (*blp* :: P_{comX}-*luxAB* $\Delta pptAB :: erm$), TIL1489 (*blp* :: P_{shp1358}-*luxAB* $\Delta pptAB :: erm$) et TIL1491 (*blp* :: P_{shp1299}-*luxAB* $\Delta pptAB :: erm$) ont été obtenues en transformant les cellules compétentes de CB001, TIL1165 et TIL1038, respectivement, avec l'ADN chromosomique de la souche TIL1486 ($\Delta pptAB :: erm$).

On a aussi construit le mutant des gènes *pptAB*, TIL1558 ($\Delta pptAB$), en supprimant un fragment interne des gènes par une double recombinaison à l'aide du plasmide pG⁺host9. Ainsi, ce mutant ne porte pas de cassette de résistance à aucun antibiotique. Brièvement, les fragments en amont et en aval des gènes *pptAB* ont été amplifiés à l'aide des amorces *pptAB_up-F* avec *pptAB_up-R* et *pptAB_down-F* avec *pptAB_down-R*. La méthode de PCR par chevauchement a été utilisée pour fusionner les deux fragments. Le fragment résultant a subi une double digestion avec les enzymes de restriction EcoRI et KpnI et une ligation entre les mêmes sites de restriction du plasmide pG⁺host9. Le plasmide résultant, pG⁺host9 :: amont-aval *pptAB*, a été utilisé pour transformer les cellules compétentes naturellement de la souche LMD-9. L'intégration et l'excision de ce plasmide ont donné la souche TIL1558 ($\Delta pptAB$).

ANNEXE A

Le plasmide pBV5030 ::P₃₂-*shp1358* (Fleuchot et al., 2011) permettant l'expression du gène *shp1358* à partir d'un promoteur fort P₃₂ a été utilisé pour transformer les cellules compétentes de la souche LMD-9 et les cellules électro-compétentes de la souche TIL1558 (Δ *pptAB*) donnant les souches TIL1559 (pBV5030 ::P₃₂-*shp1358*) et TIL1563 (Δ *pptAB* pBV5030 ::P₃₂-*shp1358*), respectivement.

Le gène *comR* a été remplacé avec une cassette de résistance à la kanamycine dans différentes souches selon la méthode suivante. Les régions en amont et en aval du gène *comR* ont été amplifiées en utilisant les amorces comR_up-F avec comR_up-R et comR_down-F avec comR_down-R respectivement. La cassette de kanamycine (*aphA3*) a été amplifiée avec les amorces AphA3-F et AphA3-R à partir du plasmide pKa comme matrice (Debarbouille et al., 1990). Cette cassette a été fusionnée entre les fragments en aval et en amont du gène *comR*, avec la méthode de PCR par chevauchement. Le fragment résultant a été soumis à une double digestion avec les enzymes de restrictions EcoRI et XhoI et une ligation de ce fragment entre ces sites de restriction du plasmide pG⁺host9 créant le plasmide pG⁺host9 ::amont-aval. *comR-aphA3*. Le plasmide linéarisé obtenu suite à une digestion par l'enzyme de restriction NdeI a été utilisé pour transformer naturellement les souches LMD-9, TIL773 (Δ *deep*) et TIL1562 (Δ *pptAB*) pour générer les souches TIL1560 (*comR::aphA3*), TIL1561 (Δ *deep comR::aphA3*) et TIL1562 (Δ *pptAB comR::aphA3*) respectivement. L'électro-transformation de la souche TIL883 (Δ *amiCDE*) avec le plasmide pG⁺host9 :: amont-aval.*comRaphA3* suivi de son intégration et excision ont donné la souche TIL1564 (Δ *amiCDE comR::aphA3*).

Pour étudier l'expression des gènes *pptAB*, un dérivé du plasmide pGICB004a, pGICB004a ::P_{*pptAB*}, a été construit selon la méthode suivante. La région promotrice des gènes *pptAB* a été amplifiée avec les amorces P*pptAB*-SpeI et P*pptAB*-EcoRI suivi d'une double digestion avec les enzymes SpeI et EcoRI et une ligation entre ces mêmes sites de restrictions du plasmide pGICB004a.

Toutes les constructions ont été vérifiées par PCR et séquençage, si nécessaire.

ANNEXE A

4. Analyse par spectrométrie de masse.

L'analyse par spectrométrie de masse a été réalisée par le couplage entre un LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) avec un UltiMate™ 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific) à la plateforme d'analyse PAPPISO (MICALIS, INRAE, Jouy-en-Josas, France). Les souches ont été cultivées en MCD jusqu'à atteindre le DO_{600} de 0,8. Trois cultures indépendantes ont été réalisées pour chaque souche étudiée. Les surnageants ont été récoltés par centrifugation à 20817 g pendant 10 min à 4°C et des fractions de 4 μ l ont été soumises aux analyses par la spectrométrie de masse sans traitement préliminaire ou supplémentaire. La séparation de peptide a été réalisée sur une colonne de phase inverse Pepmap®C18 (75 μ m X 150 mm, 100 Å, Thermo Fisher) à 300 nl min⁻¹ avec un gradient linéaire d'acétonitrile dans 0,1% d'acide formique (0,8% par min) allant de 2 à 60%. Les peptides élués ont été ionisés avec un spray de voltage à 1,3 kV. Les ions sont séparés en fonction de leurs rapports masses/charges dans l'Orbitrap. Trois états de charges (+1, +2 et +3) ont été analysés. Parmi ces ions de MS1, les huit ions les plus abondants ont été fragmentés dans la trappe par la méthode de CID (« collision induced dissociation »), avec une exclusion dynamique de 30 sec et un seuil d'intensité de 5×10^2 . On a extrait manuellement les signaux d'intensité de courant (XIC pour X ion current signal) avec l'outil de qual browser (Xcalibur version 3.063). Les masses des formes matures de SHP₁₃₅₈ (EGIIVIVVG), 898.561 Da, SHP₁₂₉₉ (DIIIFPPFG), 1018.561 Da, SHP₅ (EGIIVIGVG), 856, 514 Da ont été analysées avec une précision de haute résolution (10ppm). La présence des formes matures a été validée avec la détection d'au moins trois masses correspondants aux fragments issus de la fragmentation MS2 avec une précision de 0,5 Da.

Pour la mise au point de la détection de la phéromone ComS dans le surnageant, la récolte du surnageant a été réalisée à 90min de culture en MCD. Dans le cas d'ultrafiltration, le surnageant a été pré-traité avec une membrane d'ultrafiltration Millipore <3kDa. Pour l'étalonnage interne le peptide synthétique ComS (IAILPYFAGCL) a été ajouté à 10 μ M final dans le surnageant UF_{3kDa} et pour l'étalonnage externe, le peptide synthétique a été ajouté à 10 μ M finale dans le surnageant avant l'étape d'ultrafiltration. Dans le

ANNEXE A

cas de traitement d'extraction en phase solide avec la colonne SPE [Strat-X 33U Polymerci reversed phase, 500mg/ml], le surnageant a été concentré 10^6 fois. Les étapes de traitement de colonne ont été réalisées selon les instructions de fabricant. Après l'élution avec 2 ml d'acétonitrile 70%, le surnageant a été séché au speedvac et repris dans 50 μ l d'acétonitrile 2%. Pour l'étalonnage interne, le peptide ComS a été ajouté à 1 μ M de concentration finale avant le traitement par SPE pour être concentré à 1 mM après traitement et par conséquent pour l'étalonnage externe, ce peptide a été rajouté à 1 mM finale dans le surnageant pré-traité. Pour chaque condition, 4 μ l de surnageant pré-traité brut ou avec étalonnage interne ou avec étalonnage externe a été injecté.

Pour l'injection de précurseur synthétique SHP₁₃₅₈ (MGKKQILLTLLLVVFEGIIIVVVG), le peptide a été préparé dans l'eau et face à la difficulté de solubilisation, on a ajouté acétonitrile à 2%. On a injecté 4 μ l de peptide précurseur à 100 μ M.

5. Essais luciférase

Les cellules ont été cultivées pendant la nuit à 37°C en MCD. Les essais luciférase automatiques ont été réalisés selon la méthode suivante. Les cultures ont été diluées à une DO₆₀₀ finale de 0,05 dans 1 ml de MCD. Selon les conditions, les peptides synthétiques, SHP₁₃₅₈ (EGIIIVVVG), SHP₁₂₉₉ (DIIIFPPFG) ou ComS (LPYFAGCL), stockés sous forme lyophilisée et fraîchement préparés dans DMSO pour les deux peptides SHP ou l'eau pour le peptide ComS ont été ajoutés à une concentration finale de 1 μ M. On a transféré 250 μ l de ces cultures diluées dans les puits d'une microplaque blanche stérile couverte avec d'un couvercle transparent (Greiner). La DO₆₀₀ et la luminescence, exprimées en unité relative de luciférase (URL), des cultures ont été mesurées à 37°C dans un Infinite M200 spectroluminomètre (Tecan), comme décrit précédemment (Fontaine et al., 2010). Les co-cultures impliquant le biosenseur *P_{shp1358}-luxAB* Δ *shp1358* et les souches TIL1214 (Δ *shp1358* pBV5030::*P₃₂*), TIL1559 (pBV5030::*P_{32shp1358}*), TIL1206 (Δ *ep* pBV5030::*P_{32shp1358}*) et TIL1563 (Δ *pptAB* pBV5030::*P_{32shp1358}*) avec essais luciférase manuelles ont été réalisés selon les étapes suivantes. Les

ANNEXE A

cultures de 50 ml en MCD ont été inoculées à une DO_{600} finale de 0,025 pour chaque culture et incubées à 37°C. Des aliquots de 1 ml ont été prélevés à intervalles de temps réguliers jusqu'à ce que la culture atteigne la phase stationnaire et analysées comme déjà décrit (Fleuchot et al., 2011) à l'exception de la mesure de la luminescence réalisée avec un appareil Junior LB 9509 (Bertold technology).

6. Extraction des ARN totaux

Les différentes souches ont été cultivées en MCD à 42°C et les ARN ont été extraits à partir des cultures à DO_{600} 1. Les cellules ont été récoltées par une centrifugation rapide (13, 400g, 15 sec), les surnageants ont été éliminés et les culots bactériens ont été congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C. Les cellules ont été lysées dans un mélange phénol-chloroforme 5 :1 (v/v) avec un appareil FastPrep FT120 (Thermo Savant, USA) à l'aide de deux cycles de cassages cellulaires réalisées avec une intensité de 6,5 m sec⁻¹ pendant 45 sec. Les débris cellulaires ont été culottés par centrifugation (16,000 g, 10 min, 4°C) et les surnageants aqueux contenant les ARN ont été collectés. Ensuite, les ARN totaux ont été extraits avec un kit Direct-Zol RNA MiniPrep (Zymoresearch, USA) selon les instructions de fabricant. L'ADN génomique contaminant a été éliminé avec le kit DNA-free DNA Removal (Invitrogen, USA). Enfin, l'estimation de la quantité et de la qualité des ARN a été réalisée avec un kit de Qubit RNA HS Assay (Thermo Fisher, USA) et un système de Bioanalyzer (Agilent, USA), respectivement.

7. Séquençage des ARN et analyse transcriptomique

Le séquençage des ARN a été réalisé à la plateforme de séquençage I2BC (www.i2bc.paris-saclay.fr). Deux types de banques directionnelles ont été construites à partir des échantillons purifiés, en premier à partir des transcrits courts et en deuxième à partir de transcrits d'ARNm totaux. Pour la préparation des banques à partir de transcrits courts, un enrichissement en petits ARN ($\approx 20-200$ nt) et la déplétion des ARNr a été effectuée en utilisant les billes AMPure (Beckman Coulter) suivant le protocole de fabricant pour enrichissement en ARNmi utilisant SPRIselect. Pour la préparation des banques à partir des transcrits totaux, la déplétion des ARNr a été réalisée avec le kit Ribo-Zero (Illumina) selon les consignes

ANNEXE A

de fabricant. Les banques des petits transcrits ont été faites avec NEBNext Multiplex Small RN Library Prep Kit pour Illumina (New England Biolabs). Les banques de transcrits totaux ont été créées en utilisant le ScriptSeq RNA-seq Library Prep kit (Illumina). Le contrôle de la qualité des deux types de banques a été évalué en utilisant le kit de Bioanalyzer HS DNA (Agilent) et le dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fischer). Les banques ont été séquencées ensuite en « single-end » (les lectures de 75 pb) par une plateforme d'Illumina NextSeq 500. Les lectures brutes ont été d'abord démultiplexées et extraites sous forme de fichiers de fastq avec bcl2fastq2 v. 2.18.12 (Illumina). Les séquences des adaptateurs ont été coupées avec « Cutadapt v. 1.15 (Martin, 2011) et leurs qualités ont été vérifiées avec FastQC v. 0.11.5. Les lectures nettoyées issues des banques de transcrits totaux ont été alignées contre le génome de *S. thermophilus* LMD-9 utilisant BWA-aln v. 0.6.2-r126 (LI et Durbin, 2009). Le génome de LMD-9 a été traité auparavant utilisant le programme BactGeneSHOW pour prédire les petites séquences codantes (sCDS) (Nicolas et al., 2002), (Ibrahim et al., 2007). Les paramètres d'options sont les suivantes : -m 4C_si-rbs m1 -duprev -cdst 0.01. Les sCDS prédits (45-180nt) qui n'étaient pas présents dans l'annotation de NCBI (chromosome : [NC_008532.1](#); plasmide 1 : [NC_008500.1](#); plasmide 2 : [NC_008501.1](#)) (Makarova et al., 2006) ont été inclus dans ces jeu de données. Les lectures nettoyées à l'issue de coupure des séquences des adaptateurs suivi de vérification de leurs qualités ont été alignées contre la banque de petits gènes (<200 nt) de *S. thermophilus* LMD-9 utilisant bowtie2 2.3.0. Suivant ce travail, l'expression relative de petits gènes et de gènes réguliers a été calculée avec l'outil featureCounts (option-Q10) à partir de SubRead package v. 1.5.2 (Liao et al., 2014), en utilisant les données de banques dérivées de courts et transcrits réguliers, respectivement. Après cette étape, ces données ont été importés dans R sur SARTools environnement v. 1.6.3 (Varet et al., 2016) dans l'objectif de procéder à leur normalisation et l'analyse d'expression différentielle. Ces dernières ont été réalisées avec DE-Seq2 v. 1.18.1 (Love et al., 2014). Les comptes de lectures totaux ont été normalisés en premier par le médian de méthode ratios (Anders and Huber, 2010). Le niveau d'expression des gènes a été comparé entre notre souche de références TIL1560 (*comR::aphA3*) et les souches TIL1561 (*Δ_{deep} comR::aphA3*),

ANNEXE A

TIL1562 (Δ *pptAB comR::aphA3*) et TIL1563 (Δ *amiCDE comR::aphA3*) dans l'objectif d'étudier le rôle des gènes *eep*, *pptAB* et *amiCDE*. Les valeurs de *p*-value générées à la suite ont été ajustées par une procédure de taux de fausse découverte appelé FDR pour « False Discovery Rate » (Benjamini and Hochberg, 1995). Seuls les gènes affichant une valeur de *p*-value ajustée ≤ 0.01 et un facteur de variation d'au moins deux entre les deux fonds génétiques ont été conservés pour les analyses suivantes.

Références

- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biology* *11*, R106.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. *J. Royal Statist. Soc., Series B* *57*, 289–300.
- Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S.D., and Maguin, E. (1993). High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* *175*, 3628–3635.
- Debarbouille, M., Arnaud, M., Fouet, A., Klier, A., and Rapoport, G. (1990). The *sacT* gene regulating the *sacPA* operon in *Bacillus subtilis* shares strong homology with transcriptional antiterminators. *J. Bacteriol.* *172*, 3966–3973.
- Fleuchot, B., Gitton, C., Guillot, A., Vidic, J., Nicolas, P., Besset, C., Fontaine, L., Hols, P., Leblond-Bourget, N., Monnet, V., et al. (2011). Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci. *Molecular Microbiology* *80*, 1102–1119.
- Fontaine, L., Boutry, C., de Frahan, M.H., Delplace, B., Fremaux, C., Horvath, P., Boyaval, P., and Hols, P. (2010). A Novel Pheromone Quorum-Sensing System Controls the Development of Natural Competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol* *192*, 1444–1454.
- 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.
- Ibrahim, M., Nicolas, P., Bessières, P., Bolotin, A., Monnet, V., and Gardan, R. (2007). A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci. *Microbiology* *153*, 3631–3644.
- Letort, C., and Juillard, V. (2001). Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology* *91*, 1023–1029.
- Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* *30*, 923–930.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* *15*, 550.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., et al. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 15611–15616.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal* *17*, 10–12.
- Nicolas, P., Bize, L., Muri, F., Hoebeke, M., Rodolphe, F., Ehrlich, S.D., Prum, B., and Bessières, P. (2002). Mining *Bacillus subtilis* chromosome heterogeneities using hidden Markov models. *Nucleic Acids Res* *30*, 1418–1426.

ANNEXE A

Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J.-Y., and Dillies, M.-A. (2016). SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLOS ONE* *11*, e0157022.

ANNEXE B

TABLEAU DES SOUCHES

Souche	Genotype	Résistance ^a	Description ^b	Phénotype	Source ou référence
LMD-9	Sauvage				(Makarova et al., 2006)
CB001	<i>bip::P_{comX}-luxAB</i>				(Fontaine et al., 2010)
TIL773	Δ <i>leep</i>				(Fleuchot et al., 2011)
TIL778	Δ <i>shp₁₃₅₈</i>				(Ibrahim et al., 2007b)
TIL883	Δ <i>amiCDE</i>				(Ibrahim et al., 2007b)
TIL1038	<i>bip::P_{shp1299}-luxAB aphA43</i>	Km			(Fleuchot et al., 2013)
TIL1165	<i>bip::P_{shp1358}-luxAB</i>				(Fleuchot et al., 2011)
TIL1200	Δ <i>shp₁₃₅₈ bip::P_{shp1358}-luxAB</i>				(Fleuchot et al., 2011)
TIL1206	Δ <i>leep pBV5030::P₃₂-shp1358</i>	Er			(Fleuchot et al., 2011)
TIL1213	Δ <i>amiCDE pBV5030::P₃₂-shp1358</i>	Er			(Fleuchot et al., 2011)
TIL1214	Δ <i>shp₁₃₅₈ pBV5030::P₃₂</i>	Er	<i>pBV5030::P₃₂ → TIL778</i>		(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1486	<i>pptAB::erm</i>	Er	Fragment PCR <i>pptAB::erm → LMD-9</i>	PptAB [*]	(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1488	<i>bip::P_{comX}-luxAB pptAB::erm</i>	Er	TIL1486 DNA → CB001		(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1489	<i>bip::P_{shp1358}-luxAB pptAB::erm</i>	Er	TIL1486 DNA → TIL1165	PptAB [*]	(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1491	<i>bip::P_{shp1299}-luxAB aphA43 pptAB::erm</i>	Er Km	TIL1486 DNA → TIL1038	PptAB [*]	(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1557	<i>bip::P_{pptAB}-luxAB aphA43</i>	Km	<i>pGICB004a::PpptAB → LMD-9</i>		(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1558	Δ <i>pptAB</i>		<i>pG+host9::updown.pptAB → LMD-9</i>	PptAB [*]	(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1559	<i>pBV5030::P₃₂-shp1358</i>	Er	<i>pBV5030::P32-shp1358 → LMD-9</i>		(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1560	<i>comR::aphA43</i>	Km	<i>pG+host9::updown.comRaphA3 → LMD-9</i>	ComR [*]	(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1561	Δ <i>leep comR::aphA43</i>	Km	<i>pG+host9::updown.comRaphA3 → TIL773</i>	Eep [*] et ComR [*]	(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1562	Δ <i>pptAB comR::aphA43</i>	Km	<i>pG+host9::updown.comRaphA3 → TIL1558</i>	PptAB [*] et ComR [*]	(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1563	Δ <i>pptAB pBV5030::P₃₂-shp1358</i>	Er	<i>pBV5030::P32-shp1358 → TIL1558</i>		(Lingeswaran et al., 2020)
TIL1564	Δ <i>amiCDE comR::aphA43</i>	Km	<i>pG+host9::up.comRaphA3down → TIL883</i>	Ami [*] et ComR [*]	(Lingeswaran et al., 2020)

^aKm et Er résistance au kanamycine et erythromycine respective

^b La flèche indique une construction par transformation avec l'ADN chromosomique ou un plasmide

ANNEXE C

TABLEAU DES MASSES théoriques DES DIFFERENTES FORMES DE PHEROMONE SHP₁₃₅₈

Annotation	Séquence*	[M+H ⁺] ⁺	[M+2H ⁺] ²⁺	[M+3H ⁺] ³⁺
SHP ₁₃₅₈ ¹⁻²⁴	MGKKQILLTLLL VVFEGIIIVVVG	1298.31796	865.88108	
SHP ₁₃₅₈ ^{1oxy-24}	M _{oxy} GKKQILLTLLL VVFEGIIIVVVG	1306.31541	871.21271	
SHP ₁₃₅₈ ²⁻²⁴	GKKQILLTLLL VVFEGIIIVVVG	1232.79771	822.20092	
SHP ₁₃₅₈ ³⁻²⁴	KKQILLTLLL VVFEGIIIVVVG	1204.28698	803.19376	
SHP ₁₃₅₈ ⁴⁻²⁴	KQILLTLLL VVFEGIIIVVVG	1140.2395	760.49544	
SHP ₁₃₅₈ ⁵⁻²⁴	QILLTLLL VVFEGIIIVVVG	1076.19202	717.79712	
SHP ₁₃₅₈ ⁶⁻²⁴	ILLTLLL VVFEGIIIVVVG	1012.16273	675.11093	
SHP ₁₃₅₈ ⁷⁻²⁴	LLTLLL VVFEGIIIVVVG	1910.23407	955.6207	637.41624
SHP ₁₃₅₈ ⁸⁻²⁴	L TLLL VVFEGIIIVVVG	1797.15001	899.07867	599.72155
SHP ₁₃₅₈ ⁹⁻²⁴	TLLL VVFEGIIIVVVG	1684.06595	842.53663	562.02686
SHP ₁₃₅₈ ¹⁰⁻²⁴	LLLVVFEGIIIVVVG	1583.01827	792.0128	528.3443
SHP ₁₃₅₈ ¹¹⁻²⁴	LLVVFEGIIIVVVG	1469.93421	735.47076	490.64962
SHP ₁₃₅₈ ¹²⁻²⁴	L VVFEGIIIVVVG	1356.85014	678.92873	452.95493
SHP ₁₃₅₈ ¹³⁻²⁴	VVFEGIIIVVVG	1243.76608	622.3867	415.26024
SHP ₁₃₅₈ ¹⁴⁻²⁴	VFEGIIIVVVG	1144.69766	572.85249	
SHP ₁₃₅₈ ¹⁵⁻²⁴	FEGIIIVVVG	1045.62925	523.31829	
SHP ₁₃₅₈ ¹⁶⁻²⁴	EIIIVVVG	898.56084	509.78408	

Le tableau contient le rapport masses théoriques des ions monochargés et deux fois ou trois fois chargés.

ANNEXE D

TABLEAUX ISSU DE BANQUE DE PETITS TRANSCRITS

Tableau 16. L'expression des petits transcrits dans la souche TIL1560 (*comR::aphA3*) et la souche TIL1564 (Δ *amiCDE comR::aphA3*). *Rgg2/SHP₂* indique *Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉* et *Rgg3/SHP₃* correspond à *Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈*.

ID	Fold Change	TIL 1560 ^a	TIL1564 ^a	Start	End	Strand	Length (AA)
locus <i>rgg₂/shp₂</i>							
STER_sCDS_172	110	40	0	1203195	1203290	-	32
STER_sCDS_310	112	111	1	1206895	1206960	-	22
STER_sCDS_714	92	33	0	1207133	1207213	+	27
locus <i>rgg₃/shp₃</i>							
STER_RS10575	903	2311	2	1261563	1261655	-	31
STER_sCDS_768	350	127	0	1262689	1262760	+	24
locus <i>STER_RS07755-STER_RS07760</i>							
STER_sCDS_076	4	134	34	1477364	1477495	-	44
locus <i>rgg₅/shp₅</i>							
STER_sCDS_584	14	463	33	1786790	1786897	+	36
STER_sCDS_809	9	65	7	1786854	1786919	+	22

^aAverage of normalized read counts from three biological

3 ≤ FC ≤ 14 ; adjusted p-value < 0,01

32 ≤ FC ≤ 57 ; adjusted p-value < 0,01

FC ≥ 92 ; adjusted p-value < 0,01

Tableau 15. L'expression des petits transcrits dans la souche TIL1560 (*comR::aphA3*) et la souche TIL1561 (Δ *ep comR::aphA3*). *Rgg2/SHP₂* indique *Rgg₁₂₉₉/SHP₁₂₉₉* et *Rgg3/SHP₃* correspond à *Rgg₁₃₅₈/SHP₁₃₅₈*.

ID	Fold Change	TIL 1560 ^a	TIL1561 ^a	Start	End	Strand	Length (AA)
locus <i>rgg₂/shp₂</i>							
STER_sCDS_172	183	38	0	1203195	1203290	-	32
STER_sCDS_310	57	105	2	1206895	1206960	-	22
STER_sCDS_714	152	31	0	1207133	1207213	+	27
locus <i>rgg₃/shp₃</i>							
STER_RS10575	14	437	32	1261563	1261655	-	31
STER_sCDS_768	582	119	0	1262689	1262760	+	24
locus <i>STER_RS07755-STER_RS07760</i>							
STER_sCDS_076	3	127	38	1477364	1477495	-	44
locus <i>rgg₅/shp₅</i>							
STER_sCDS_584	741	2185	3	1786790	1786897	+	36
STER_sCDS_809	7	61	8	1786854	1786919	+	22
Plasmide NC_008500.1							
STER_sCDS_986	571	228	0	3	59	+	19
STER_sCDS_982	138	28	0	715	846	-	44
STER_sCDS_984	165	34	0	924	1025	-	34
STER_sCDS_985	714	1052	1	4384	4449	-	22

^aAverage of normalized read counts from three biological repetitions

3 ≤ FC ≤ 14 ; adjusted p-value < 0,01

32 ≤ FC ≤ 57 ; adjusted p-value < 0,01

FC ≥ 92 ; adjusted p-value < 0,01

ANNEXE E

Contributions et communications

Article scientifique

Lingeswaran, A.; Metton, C.; Henry, C.; Monnet, V.; Juillard, V.; Gardan, R. Export of Rgg Quorum Sensing Peptides is Mediated by the PptAB ABC Transporter in *Streptococcus Thermophilus* Strain LMD-9. *Genes* **2020**, *11*, 1096. <https://doi.org/10.3390/genes11091096>

Conférences

- Séminaire Doc’J : Séminaire interne de l’association de jeunes chercheurs de l’INRAE à Jouy-en-Josas. Mars 2018. Présentation orale en anglais sous le format de « My thesis in 3min ». 2^{ème} prix.
- DocMicalis Day. Journée de présentations pour les doctorants de l’institut Micalis. Mai 2019. Jouy-en-Josas. Séminaire interne. Présentation orale en anglais. “Role of the exporter PptAB and the protease Eep in secretion and maturation of pheromones in *Streptococcus thermophilus*” Abarna Lingeswaran, Vincent Juillard, Rozenn Gardan.
- « Microbes », 15^{ème} congrès organisé par La Société Française de Microbiologie (SFM), 30 septembre-02 octobre en 2019. Paris 19^{ème}. Présentation orale en français. « Rôle du transporteur PptAB dans la sécrétion des phéromones chez *Streptococcus thermophilus* ». Abarna Lingeswaran, Vincent Juillard, Rozenn Gardan.

Travail associatif

- Organisation de séminaire interne DocMicalis Day. Juin 2018. Jouy-en-Josas
- Doc’J. Association des jeunes chercheurs de l’INRAE du centre Jouy-en-Josas. Secrétaire septembre 2018-octobre 2019.
- CARaDOC. Contribution du septembre 2019 à avril 2020 pour la création d’une rencontre entre les doctorants et les entreprises avec les doctorants de l’université Paris-Saclay.

ANNEXE F

Composition M17 et MCD

Composition M17

Digestion pancréatique de caséine 5 g/l, peptone de soja 5 g/l, extrait de bœuf 5 g/l, extrait de levure 2,5 g/l, acide ascorbique 0,5 g/l, sulfate de magnésium 0,25 g/l, bêta-glycérophosphate disodique 19 g/l

Composition MCD streptocoques

	g/mol	[final /L		g/mol	[final /L
Tampon			Vitamines		
acetate de sodium	82.03	1 g	1	ac ascorbique	176.13 0.5 g
citrate d'ammonium	243.2	0.6 g			
KH ₂ PO ₄	136.09	3 g	2	pyridoxamine	241.1 5 mg
K ₂ HPO ₄	174.18	2.5 g	3	ac nicotinique	123.1 1 mg
urée	60.06	0.24 g	4	riboflavine	376.4 1 mg
Metaux			5	panthotenate ca	238.3 1 mg
MgCL ₂ -6H ₂ O	203.3	200 mg	6	thiamine	337.3 1 mg
CaCL ₂ -2H ₂ O	147.02	50 mg	7	pyridoxine	205.6 2 mg
sulfate de manganèse	169	28 mg	8	na-p-aminobenzoate	137.1 10 mg
			9	biotine	244.3 10 mg
sulfate de zinc	287.54	5 mg	10	ac folique	441.4 1 mg
sulfate de cuivre	249.7	0.1 mg	11	B12	1355.4 1 mg
chlorure de cobalt	237.9	2.5 mg	12	ac orotique	156.1 5 mg
Acides Aminés			13	thymidine	242.2 5 mg
L alanine	89.1	0.24 g	14	inosine	268.23 5 mg
L arginine	174.2	0.35 g	15	DL 6,8 ac thioctique	206.3 2.5 mg
L asparagine	132.1	0.35 g	Sucre		
L aspartic acid	133.1	0.455 g		lactose	360.32 10 g
L glutamic acid	147.13	0.398 g	Metaux		
L glutamine	146.1	0.39 g		chlorure de Fer	198.81 5 mg
L glycine	75.07	0.175 g	ajuster à pH 6,6 avec HCl ajuster le volume final Filtrer sur GV 0,22µm désoxygéner avant stockage et utilisation		
L histidine	155.16	0.15 g			
L isoleucine	131.18	0.21 g			
L leucine	131.18	0.475 g			
L lysine	146.2	0.44 g			
L méthionine	149.2	0.125 g			
L proline	115.13	0.675 g			
L serine	105.1	0.225 g			
L threonine	119.1	0.175 g			
L tryptophane	204.2	0.05 g			
L valine	117.1	0.325 g			
L phénylalanine	165.19	0.275 g			
L tyrosine	181.2	0.29 g			
L cystéine	121.16	0.25 g			
Bases					
adenine	135.1	10 mg			
uracile	112.09	10 mg			
xanthine	174.1	10 mg			
guanine	187.6	10 mg			

ANNEXE G

Export of Rgg Quorum Sensing Peptides is Mediated by the PptAB ABC Transporter in

Streptococcus Thermophilus Strain LMD-9. *Genes* 2020, 11, 1096.

<https://doi.org/10.3390/genes11091096>

Article

Export of Rgg Quorum Sensing Peptides is Mediated by the PptAB ABC Transporter in *Streptococcus Thermophilus* Strain LMD-9

Abarna Lingeswaran, Coralie Metton, Céline Henry, Véronique Monnet, Vincent Juillard  and Rozenn Gardan *

Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas, France; abarna.lingeswaran@inrae.fr (A.L.); coraliemetton@yahoo.fr (C.M.); celine.henry@inrae.fr (C.H.); veronique.monnet@inrae.fr (V.M.); vincent.juillard@inrae.fr (V.J.)

* Correspondence: rozenn.gardan@inrae.fr

Received: 23 July 2020; Accepted: 17 September 2020; Published: 19 September 2020



Abstract: In streptococci, intracellular quorum sensing pathways are based on quorum-sensing systems that are responsible for peptide secretion, maturation, and reimport. These peptides then interact with Rgg or ComR transcriptional regulators in the Rap, Rgg, NprR, PlcR, and PrgX (RRNPP) family, whose members are found in Gram-positive bacteria. Short hydrophobic peptides (SHP) interact with Rgg whereas ComS peptides interact with ComR regulators. To date, in *Streptococcus thermophilus*, peptide secretion, maturation, and extracellular fate have received little attention, even though this species has several (at least five) genes encoding Rgg regulators and one encoding a ComR regulator. We studied pheromone export in this species, focusing our attention on PptAB, which is an exporter of signaling peptides previously identified in *Enterococcus faecalis*, pathogenic streptococci and *Staphylococcus aureus*. In the *S. thermophilus* strain LMD-9, we showed that PptAB controlled three regulation systems, two SHP/Rgg systems (SHP/Rgg₁₃₅₈ and SHP/Rgg₁₂₉₉), and the ComS/ComR system, while using transcriptional fusions and that PptAB helped to produce and export at least three different mature SHPs (SHP₁₃₅₈, SHP₁₂₉₉, and SHP₂₇₉) peptides while using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Using a deep sequencing approach (RNAseq), we showed that the exporter PptAB, the membrane protease Eep, and the oligopeptide importer Ami controlled the transcription of the genes that were located downstream from the five non-truncated *rgg* genes as well as few distal genes. This led us to propose that the five non-truncated *shp/rgg* loci were functional. Only three *shp* genes were expressed in our experimental condition. Thus, this transcriptome analysis also highlighted the complex interconnected network that exists between SHP/Rgg systems, where a few homologous signaling peptides likely interact with different regulators.

Keywords: signaling peptide; streptococci; RRNPP; transcriptional regulation

Highlights

- PptAB exports signaling peptides from intracellular quorum sensing systems in *Streptococcus thermophilus*;
- PptAB only exports mature signaling peptides;
- in the *S. thermophilus* strain LMD-9, PptAB, Eep (a protease), and Ami (a peptide importer) are involved in a QS mechanism that controls the expression of genes located downstream all *rgg* genes but also of a few distal targets; and,

- at the strain level, crosstalk between the SHP/Rgg systems likely occurs and involves a few SHP signaling peptides that interact with multiple Rgg regulators.

1. Introduction

Quorum sensing (QS) is a cell-cell communication mechanism that is used by bacteria to trigger the expression of an entire set of genes when population levels exceed a certain threshold of cell density [1]. Functions that are controlled by QS are very diverse, ranging from luminescence in *Vibrio fischeri* [2], natural transformation in streptococci [3], bacteriocin production in lactococci and bacilli [4], and virulence in *Staphylococcus aureus* [5]. The QS circuit is similar across all bacteria. First, a signaling molecule, also called an autoinducer, is released into the extracellular environment, where it accumulates. Once it reaches a threshold concentration, its presence is detected by a sensor protein, which leads cells to modulate the expression of target genes. In Gram-positive bacteria, the signaling molecules are mainly autoinducing peptides (AIPs), also called pheromones. Most are ribosomally synthesized from short coding sequences (short CDSs), transformed into their mature forms, exported, and sometimes experience cyclization or the modification of amino acid residues. Some AIPs are produced via the proteolytic degradation of lipoproteins and, more specifically, their secretory signal peptides [6]. There are two general activation pathways. The first pathway is a two-component system that comprises a histidine kinase and a response regulator. The histidine kinase senses the presence of AIPs in the extracellular environment. A phosphorylation cascade involving the histidine kinase and the response regulator leads to the activation or repression of target gene transcription [5,7,8]. In the second pathway also called intracellular pathway, the presence of AIPs is sensed within the cell after they have been internalized by an oligopeptide permease transport system composed of ABC-family transporters. Once in the cell, AIPs interact with transcriptional regulators or Rap proteins, both members of the RRNPP family (which stands for Rap, Rgg, NprR, PlcR, and PrgX), thereby modifying the latter's activity and, consequently, the expression of target genes [9,10]. Rap proteins mediate sporulation, competence, and the production of degradative enzymes in bacilli [11]. PlcR and NprR help to control virulence and necrotrophism in bacteria of the *cereus* group [12]. PrgX-like proteins are involved in plasmid transfer in enterococci [13]. The function of the Rgg-like regulators found in streptococci will be described below. To date, research focusing on this process has largely examined the interactions between RRNPP proteins and their cognate AIPs [10]. It has revealed that all of the members of the RRNPP family share a similar core structure and they have a tetratricopeptide domain in their C-terminus [14,15]. This domain is involved in the interaction with their cognate AIPs. In addition, the transcriptional regulators have a helix-turn-helix DNA-binding domain at their N-terminus. Interestingly, members of the RRNPP family each undergo distinct structural changes following binding with their specific AIPs [10].

Far less is known about the secretion, maturation, and extracellular fate of the AIPs, but these processes appear to be somewhat specific for each member of the RRNPP family. AIPs that are associated with Rap, PlcR, and NprR proteins have a particular secretion signal peptide in their N-terminus that is likely targeted for the Sec-dependent export pathway, resulting in the AIPs' secretion and maturation via a signal peptidase. Additional extracellular proteases mediate further maturation: they have been identified for some AIPs of Rap proteins [11,16] and the AIP of the PlcR regulator [17]. Most, however, remain unknown. Peptides associated with PrgX-like regulators fall into one of two categories: (1) they are inhibitory peptides encoded by short genes or (2) they are activating peptides that are embedded in lipoprotein secretion signal peptides that are released outside the cell during lipoprotein export. Activating peptides are matured by serial peptidases, which include a lipoprotein signal peptidase, a transmembrane protease, named Eep, and additional undescribed exoproteases. Eep appears to be capable of maturing inhibitory peptides [18]. By screening a transposon mutant library, the researchers identified PptAB, a peptide exporter of ABC transporters, and determined that it was the exporter of three different activating peptides in *E. faecalis* [19]. The final members of the RRNPP family—Rgg and ComR—are Rgg-like regulators. Rgg regulators help to produce modified

secreted peptides [20], biofilms and lysozyme resistance [21–23], and mediate pathogenicity [24,25]. ComR regulators help to mediate competence and bacteriocin production [3,26]. Rgg regulators are associated with AIPs, called short hydrophobic peptides (SHPs); ComR regulators are associated with ComS peptides, called *sigX*-inducing peptides (XIPs) in their mature form. Eep causes the maturation of SHPs, as observed for one SHP in *Streptococcus thermophilus* [27]; for SHP2 and SHP3 in *Streptococcus pyogenes* [21]; and, for the RovS-associated SHP in *Streptococcus agalactiae* [24]. Eep also controls the maturation of ComS in *S. thermophilus* [28], but only plays a contributing role in *S. mutans* [29]. Finally, PptAB is involved in the export of SHP2 and SHP3 in *S. pyogenes* [30] and of the RovS-associated SHP in *S. agalactiae* [24]; however, it only contributes to the export of mature ComS in *Streptococcus mutans* [30].

S. thermophilus plays a major role in the food industry, because it is a starter employed in massive quantities to manufacture yoghurt, Swiss-type cheeses, and Italian-type cheeses. It is also a useful representative of the genus *Streptococcus* with which to study QS: *S. thermophilus* encodes many QS systems in its genome, including at least five different SHP/Rgg systems [27] and one ComS/ComR system [31]. We have deciphered two different SHP/Rgg systems in the *S. thermophilus* wild-type strain LMD-9. The first system, SHP/Rgg₁₃₅₈, controls the transcription of the *shp*₁₃₅₈ gene and at least three genes that are involved in the production of a cyclic secreted peptide, called streptide, which are located downstream from the *rgg*₁₃₅₈ gene [20,27,32]. The second system, SHP/Rgg₁₂₉₉, controls the transcription of the *shp*₁₂₉₉ gene and a putative operon located downstream from the *rgg*₁₂₉₉ gene whose function remains undetermined [33]. Because little is known about the process by which the AIPs of the two SHP/Rgg systems and the ComS/ComR system are exported, we characterized the role of the PptAB exporter in these three QS systems with transcriptional fusions and a LC-MS/MS approach for three SHP₁₃₅₈, SHP₁₂₉₉ and SHP₂₇₉. We used a transcriptomic approach to explore genome-level expression of the target genes in all functional RRNPP QS systems.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains and Growth Conditions

Our study strain was the *S. thermophilus* wild-type strain LMD-9 (hereafter, the wild-type strain). It has two plasmids—plasmid 1 and plasmid 2 [34]. Table 1 lists the mutant strains that we constructed using this wild-type strain. *S. thermophilus* was grown at 37 °C or 42 °C in either M17 medium (Difco) supplemented with 10 g L⁻¹ lactose (M17lac) or in a chemically defined medium (CDM) [35]. *Escherichia coli* was grown at 37 °C in Luria–Bertani broth with shaking. Agar (1.5%) was added to the media, as needed. When required, antibiotics were added to the media at the following final concentrations: erythromycin at 150 µg mL⁻¹ for *E. coli* and at 5 µg mL⁻¹ for *S. thermophilus* and kanamycin at 1 mg mL⁻¹ for *S. thermophilus*.

Table 1. *S. thermophilus* strains used in this study.

Strain	Genotype	Resistance ^a	Description ^b	Source or Reference
LMD-9	<i>wild-type</i>			[34]
CB001	<i>blp::P_{comX}-luxAB</i>			[31]
TIL773	Δ <i>ep</i>			[27]
TIL883	Δ <i>amiCDE</i>			[20]
TIL1038	<i>blp::P_{shp1299}-luxAB aphA3</i>	Km		[33]
TIL1165	<i>blp::P_{shp1358}-luxAB</i>			[27]
TIL1179	<i>pBV5030::P₃₂</i>	Er		[28]
TIL1213	Δ <i>amiCDE pBV5030::P₃₂-shp1358</i>	Er		[27]
TIL1486	<i>pptAB::erm</i>	Er	PCR fragment <i>pptAB::erm</i> → LMD-9	This study
TIL1488	<i>blp::P_{comX}-luxAB pptAB::erm</i>	Er	TIL1486 DNA → CB001	This study
TIL1489	<i>blp::P_{shp1358}-luxAB pptAB::erm</i>	Er	TIL1486 DNA → TIL1165	This study
TIL1491	<i>blp::P_{shp1299}-luxAB aphA3 pptAB::erm</i>	Er Km	TIL1486 DNA → TIL1038	This study
TIL1557	<i>blp::P_{pptAB}-luxAB aphA3</i>	Km	<i>pGICB004a::P_{pptAB}</i> → LMD-9	This study
TIL1558	Δ <i>pptAB</i>		<i>pG⁺host9::updown.pptAB</i> → LMD-9	This study
TIL1559	<i>pBV5030::P₃₂-shp1358</i>	Er	<i>pBV5030::P₃₂-shp1358</i> → LMD-9	This study
TIL1560	<i>comR::aphA3</i>	Km	<i>pG⁺host9::updown.comRaphA3</i> → LMD-9	This study
TIL1561	Δ <i>ep comR::aphA3</i>	Km	<i>pG⁺host9::updown.comRaphA3</i> → TIL773	This study
TIL1562	Δ <i>pptAB comR::aphA3</i>	Km	<i>pG⁺host9::updown.comRaphA3</i> → TIL1558	This study
TIL1563	Δ <i>pptAB pBV5030::P₃₂-shp1358</i>	Er	<i>pBV5030::P₃₂-shp1358</i> → TIL1558	This study
TIL1564	Δ <i>amiCDE comR::aphA3</i>	Km	<i>pG⁺host9::updown.comRaphA3</i> . → TIL883	This study
TIL1565	Δ <i>pptAB pBV5030::P₃₂</i>	Er	<i>pBV5030::P₃₂</i> → TIL1558	This study

^a Km and Er = resistance to kanamycin and erythromycin, respectively. ^b The arrows indicate construction via transformation with chromosomal DNA or a plasmid.

2.2. DNA Manipulation and Sequencing

Restriction enzymes, T4 DNA ligase (New England Biolabs), and Phusion DNA polymerase (Finnzymes) were used in accordance with the manufacturers' instructions. Standard methods were used to carry out DNA purification, restriction digestion, PCR, ligation, and sequencing. Table S1 lists the oligonucleotides we used (Eurofins). The *E. coli* strain TG1 *repA*⁺ was used as the host for the cloning experiments [36]. *S. thermophilus* was transformed while using natural competent cells [36] with the addition of synthetic competence peptide (ComS, LPYFAGCL) at a concentration of 1 μM when required or using electrocompetent cells [20] when the strains were not naturally competent. The plasmids used are listed in Table S2.

2.3. Construction of the Mutant Strains

The overlapping PCR method was used to delete the *pptAB* genes and replace them with an erythromycin cassette (*erm*) as follows. The *erm* cassette was amplified via PCR with the oligonucleotides Erm-F and Erm-R and using pG⁺host9 as a template [37]; it was fused to fragments located upstream and downstream from the *pptAB* genes, also using PCR. The upstream and downstream fragments were amplified with the oligonucleotides *pptABe_up-F/pptABe_up-R* and *pptABe_down-F/pptABe_down-R*, respectively, while using chromosomal DNA from the wild-type strain as a template. The resulting PCR fragment was used to transform the wild-type strain, leading to the construction of TIL1486 strain (*pptAB::erm*). The TIL1488 (*blp::P_{comX}-luxAB pptAB::erm*), TIL1489 (*blp::P_{shp1358}-luxAB pptAB::erm*), and TIL1491 (*blp::P_{shp1299}-luxAB aphA3 pptAB::erm*) strains were constructed by transforming the CB001, TIL1165, and TIL1038 strains, respectively, with chromosomal DNA from the TIL1486 strain.

We also constructed a mutant, the TIL1558 strain (Δ *pptAB*), in which we deleted an internal fragment of the *pptAB* genes via a double crossover event that involves the plasmid pG⁺host9. Thus, this mutant did not have an antibiotic resistance cassette. Briefly, the upstream and the downstream fragments of the *pptAB* genes were obtained via amplification using the primer pairs *pptAB_up-F/pptAB_up-R* and *pptAB_down-F/pptAB_down-R*. The overlapping PCR method was used to fuse both fragments. The resulting fragment was double digested using the restriction enzymes EcoRI and KpnI and then ligated into pG⁺host9 between the EcoRI and KpnI restriction sites. The resulting plasmid, pG⁺host9::updown.*pptAB*, was used to transform competent cells of the wild-type strain. The integration and excision of this plasmid [37] then generated the TIL1558 strain. In this mutant, the promoter of the *pptA* gene (including its ATG) and the last 74 bp of the *pptB* gene were conserved.

The presence of the plasmid pBV5030::P₃₂-*shp1358* allowed for the expression of the *shp1358* gene under the strong P₃₂ promoter. This plasmid was used to transform the wild-type strain and the TIL1558 strain, resulting in the TIL1559 and TIL1563 strains, respectively.

A variety of strains were created in which the *comR* gene was replaced with a kanamycin resistance cassette. First, the upstream and downstream regions of the *comR* gene were amplified using the primers *comR_up-F/comR_up-R* and *comR_down-F/comR_down-R*, respectively. The kanamycin cassette (*aphA3*) was amplified via PCR using the primers *AphA3-F/AphA3-R* and plasmid pKa as the template [38]. This cassette was inserted between the upstream and downstream fragments of the *comR* gene via overlapping PCR. The resulting fragment was double digested with the restriction enzymes EcoRI and XhoI and then ligated into pG⁺host9 between the related restriction sites, creating the plasmid pG⁺host9::updown.*comRaphA3*. The linearized plasmid that was obtained via digestion with the restriction enzyme NdeI was used to naturally transform the wild-type, TIL773 (Δ *deep*), and TIL1558 (Δ *pptAB*) strains in order to generate the TIL1560 (*comR::aphA3*), TIL1561 (Δ *deep comR::aphA3*), and TIL1562 (Δ *pptAB comR::aphA3*) strains, respectively. The electrotransformation of the TIL883 strain (Δ *amiCDE*) with the plasmid pG⁺host9::updown.*comRaphA3* and the subsequent processes of integration and excision generated the TIL1564 strain (Δ *amiCDE comR::aphA3*).

In order to study the expression of the *pptAB* genes, a derivative of pGICB004a, pGICB004a::P_{*pptAB*}, was constructed, as follows. The promoter of the *pptAB* genes was amplified using the

oligonucleotides PpptAB-SpeI and PpptAB-EcoRI; double digested with the restriction enzymes SpeI and EcoRI; and finally, ligated into pGICB004a between the related restriction sites. ScaI-linearized pGICB004a::P_{pptAB} was used to transform the wild-type strain, leading to the TIL1557 strain (*blp*::P_{pptAB}-*luxAB aphA3*).

Finally, the plasmid pBV5030::P₃₂ was used to transform the TIL1558 strain, resulting in the TIL1565 strain.

All of the constructions were verified by PCR and sequenced when necessary.

2.4. Mass Spectrometry Analysis

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was performed by coupling an LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with an UltiMate™ 3000 RSLCnano System (Thermo Fisher Scientific); analyses were carried out at the PAPPSO platform (MICALIS, INRAE, Jouy-en-Josas, France). The strains were grown in CDM until they reached an OD₆₀₀ of 0.8, which corresponded to the end of the exponential growth phase. Three independent cultures (i.e., biological replicates) were grown for each strain studied. Supernatants were recovered via centrifugation (at 10,000 rpm and 4 °C for 10 min). Samples (4 µL) were loaded at 20 µL min⁻¹ on a precolumn (µ-Precolumn, 300 µm × 5 mm, C18 PepMap100, 5 µm, 100 Å, Thermo Fisher) and then washed with loading buffer. After 3 min, the precolumn cartridge was connected to the separating column (Acclaim PepMap®, 75 µm × 500 mm, C18, 3 µm, 100 Å, Thermo Fisher). The flow rate was 300 nL min⁻¹, and elution employed a linear gradient of acetonitrile (0.8% per min) in 0.1% formic acid. The eluted peptides were ionized with a spray voltage of 1.3 kV. A full MS scan (range: 400–2000 m/z) was performed while using the LTQ-Orbitrap. The full MS scans were automatically calibrated using the lock mass option and two dimethylcyclodioxanes (391.284 and 536.165). The MS/MS analysis was carried out employing the collision-induced dissociation (CID) technique (40% collision energy), which was applied to three charge states (+1, +2, and +3) and the eight most abundant ions (dynamic exclusion of 30 s; minimal intensity threshold of 5 × 10²). We manually extracted the ion current signals (XIC) with Xcalibur Qual Browser (v. 3.0.63). We analyzed the masses of mature SHP₁₃₅₈ (EGIIIVVVG), 898.561 Da, SHP₁₂₉₉ (DIIIFPPFG), 1018.561 Da, SHP₂₇₉ (EGIIIVGVG), 856.514 Da, and the streptide (AKGDGWKVM with a cyclization between the first K and the W), and 495.247 Da at a high level of resolution (10 ppm). The presence of these mature forms was confirmed when we detected at least three masses that corresponded to fragments that were produced by MS2 fragmentation (accuracy of 0.5 Da).

2.5. Luciferase Assays

For the *pptAB* genes expression study, TIL1557 was the strain used (Figure 1, Table 1). For the results that are described in Figure 2, strains used were CB001, TIL1488, TIL1165, TIL1489, TIL1038, and TIL1491 (Table 1). The luciferase assays were carried out, as follows. The cells were grown overnight at 37 °C in CDM or M17lac. The cultures were diluted to a final OD₆₀₀ of 0.05 in 1 mL of CDM or M17lac. As necessary, synthetic peptides, SHP₁₃₅₈ (EGIIIVVVG), SHP₁₂₉₉ (DIIIFPPFG), or ComS (LPYFAGCL), prepared in DMSO for the two SHPs or water for ComS were added at a final concentration of 1 µM. We transferred 250 µL of these diluted cultures to the wells of a covered sterile white microplate with a transparent bottom (Greiner). The cultures' OD₆₀₀ and luminescence (as expressed in relative light units [RLU]) values were assessed at 37 °C in an Infinite M200 spectroluminometer (Tecan), as previously described [31].

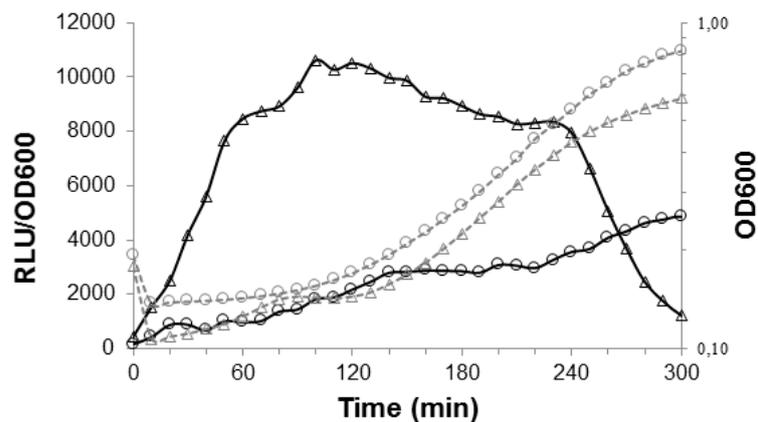


Figure 1. Growth and luciferase activity levels for the *S. thermophilus* TIL1557 strain (P_{pptAB} -*luxAB*) grown in chemically defined medium (CDM) (Δ) versus M17lac (\circ). The growth curves (OD_{600}) are depicted using gray dotted lines, and the relative levels of luciferase activity (RLU/OD_{600}) are depicted using black solid lines. Data shown are representative of three independent experiments.

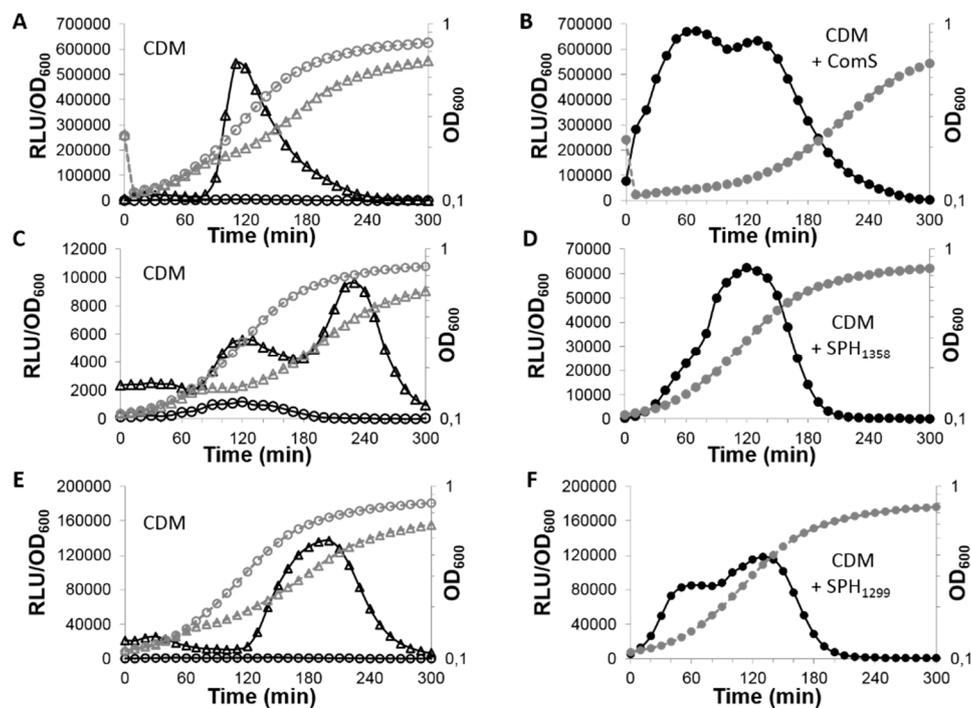


Figure 2. Growth and luciferase activity levels for strains that contained P_{comX} -*luxAB*, $P_{shp1358}$ -*luxAB*, or $P_{shp1299}$ -*luxAB* fusions in a wild-type or a $pptAB::erm$ background and grown in CDM with or without a synthetic autoinducing peptide (AIP). The growth curves (OD_{600}) are presented in gray dotted lines, and the relative levels of luciferase activity (RLU/OD_{600}) in black solid lines. Results are shown for strains grown in CDM containing P_{comX} -*luxAB* (A), $P_{shp1358}$ -*luxAB* (C), or $P_{shp1299}$ -*luxAB* (E) fusions with a wild-type background (Δ) or $pptAB::erm$ background (\circ) and for strains grown in CDM with the cognate AIP stated on the figure and containing P_{comX} -*luxAB* (B), $P_{shp1358}$ -*luxAB* (D), or $P_{shp1299}$ -*luxAB* (F) fusions with a $pptAB::erm$ background (\bullet). Data shown are representative of three independent experiments.

2.6. Total RNA Extraction

The strains were grown in CDM at 42 °C, and samples were taken from the cultures at the end of the exponential growth phase ($OD_{600} = 1$). TIL1560, TIL1561, TIL1562, and TIL1564 were the strains used (Table 1). The cells were harvested via fast centrifugation (at 13,400 g for 15 s); the

supernatants were removed; and, the bacterial pellets were frozen in liquid nitrogen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. The cells were then lysed in phenol-chloroform 5:1 (*v/v*) with a FastPrep FT120 tissue grinder (Thermo Savant, Holbrook, NY, USA). Two cycles of cell disruption were performed (both at 6.5 m s^{-1} for 45 s). Cellular debris was pelleted by centrifugation (at 16,000 g and $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min.) and the supernatants were collected. The total RNA extraction was then performed using the Direct-Zol RNA MiniPrep Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Genomic DNA was eliminated with a DNA-free DNA Removal Kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Finally, RNA quantity and quality were assessed using a Qubit RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA) and a Bioanalyzer system (Agilent, Santa Clara, CA, USA), respectively. For each strain, RNA was extracted from the three biological replicates.

2.7. RNA Sequencing and Transcriptome Analysis

RNA sequencing was performed at I2BC (www.i2bc.paris-saclay.fr), a sequencing facility. The total transcript libraries were created using a Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina). We followed the manufacturer's instructions, except in the initial steps (i.e., up until RNA fragmentation), where polyA purification was replaced by rRNA depletion using a Ribo-Zero Kit (Illumina). Quality control was carried out on the libraries using a Bioanalyzer HS DNA Kit (Agilent) and a dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). The libraries were then sequenced (single-end reading, read length of 75 bp) using an Illumina NextSeq 500 System. The raw reads were demultiplexed, and fastq files were created from the output with bcl2fastq2 (v. 2.18.12; Illumina). The adapters were subsequently trimmed out of the reads using Cutadapt (v. 1.15; [39]), and read quality was then verified via FastQC (v. 0.11.5; <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The clean reads in the total transcript libraries were then mapped against the *S. thermophilus* LMD-9 genome while using BWA-aln (v. 0.6.2-r126; [40]). The LMD-9 genome was processed beforehand using BactgeneSHOW to predict short CDSs [41,42]. We used the following option parameters: -m 4C_si -rbs m1 -duprev -cdst 0.01. The dataset included predicted CDSs (45–180 nt) that were not present in the GenBank annotation for LMD-9 (chromosome: CP000419.1; plasmid 1: CP000420.1; plasmid 2: CP000421.1) [34] (Supplementary Table S3). The raw read counts were calculated using the featureCounts tool (option -s 1) in the SubRead package (v. 1.5.2; [43]). We employed DESeq2 (v. 1.18.1; [44]) to carry out normalization and differential analysis. First, the total read counts were normalized using the median of ratios method [45]. Subsequently, gene expression was compared between our reference strain, TIL1560 (*comR::aphA3*), and the TIL1561 ($\Delta eep\ comR::aphA3$), TIL1562 ($\Delta pptAB\ comR::aphA3$), and TIL1564 ($\Delta amiCDE\ comR::aphA3$) strains to examine the roles of the *eep*, *pptAB*, and *amiCDE* genes. The resulting *p*-values were adjusted using the false discovery rate method [46]. In our further analyses, we only focused on genes with adjusted *p*-values ≤ 0.01 and for which there was at least a 1.9-fold difference between the reference strain and the other strains. The RNA-seq raw data from this study have been deposited in the ArrayExpress database at EMBL-EBI under accession number E-MTAB-9568 (www.ebi.ac.uk/arrayexpress).

2.8. Bioinformatic Tools

We employed BlastP (v. 2.9.0) with standard parameters and the PptAB proteins of *S. mutans* UA159 as baits to identify the PptAB homologous proteins of *S. thermophilus* LMD-9. PptA of *S. thermophilus* was found to be encoded by the Ster_RS07730 gene (previous nomenclature: Ster_1572). PptB of *S. thermophilus* was found to be encoded by the Ster_RS07725 gene (previous nomenclature: Ster_1571). We used the 65 complete genome sequences available in the NCBI database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) to compare the amino acid sequences of PptA and PptB inside the *S. thermophilus* species.

3. Results

3.1. The PptAB Genes Are Expressed in *S. thermophilus* and Required for the Positive Control of Three Signaling Systems

PptAB is an ABC transporter that is made of a membrane-bound cytoplasmic ATP-binding protein, PptA, which provides the energy for substrate translocation, and a transmembrane protein, PptB, which forms the pore. It was first identified in *E. faecalis* [19]. However, shortly thereafter, orthologous genes encoding exporters with similar functions were found in *S. pyogenes*, *S. mutans* [30] and *S. agalactiae* [24]. We used the PptAB proteins in the *S. mutans* UA159 strain to identify any corresponding proteins in the *S. thermophilus* LMD-9 strain [47]. PptA of *S. thermophilus* shared 77% identity with PptA of *S. mutans* (88% sequence similarity) and PptB shared 51% identity with PptB of *S. mutans* (70% sequence similarity). The PptA and PptB proteins are highly conserved in the species *S. thermophilus*, estimates of shared identity range between 98 and 100 for PptA and between 97 and 100 for PptB.

First, we characterized the expression patterns of the *pptAB* genes in two media, CDM and M17lac, while using a P_{pptAB} -*luxAB* transcriptional fusion in the TIL1557 strain. We found that gene expression was constitutive throughout the exponential growth phase and it was higher in CDM than in M17lac (Figure 1). Second, we deleted the *pptAB* genes and characterized the phenotype of the resulting strains. To date, three RRNPP signaling systems have been studied in the LMD-9 strain of *S. thermophilus*. They involve three different AIPs that are potentially exported by PptAB, but only two systems have been associated with a phenotype.

The first is a SHP/Rgg system that is based on a nine-amino-acid-long hydrophobic AIP, SHP₁₃₅₈ (EGIIVIVVG). This system helps to produce the streptide encoded by the *Ster_RS010575* gene [27]. Therefore, we measured streptide production by the TIL1179 strain, which had a wild-type background and the TIL1565 strain, which bore the $\Delta pptAB$ mutation using LC-MS/MS; streptide levels were quantified by measuring the integrated area under the curve in extracted-ion chromatograms for the three biological replicates per strain. The TIL1179 strain had a mean (\pm SD) streptide level of 2.7×10^8 ($\pm 4 \times 10^7$). In contrast, the streptide level was $< 7 \times 10^4$ in the TIL1565 strain. This result indicates that streptide was only produced at trace levels when the *pptAB* genes were inactivated.

The second system is based on the mature form of ComS (IAILPYFAGCL), which is also hydrophobic, but composed of eleven amino acids [28]. It controls the activity of ComR, a transcriptional regulator that is involved in mediating competence. Indeed, the ComS/ComR system positively controls the transcription of the *comX* gene. ComX is an alternative sigma factor that controls the transcription of genes encoding the transformasome, a protein complex essential for competence [31,48]. Therefore, we assessed the competence of the TIL1558 strain, a $\Delta pptAB$ mutant, when it was grown in CDM with pG⁺host9. No transformants were detected, which indicated that the mutant had completely lost the ability to transform naturally. However, the transformability of strain TIL1558 was restored with the addition of synthetic ComS in the CDM medium, as demonstrated with the construction of strains TIL1562, TIL1563, and TIL1565 (Table 1).

The third RRNPP system is the SHP/Rgg₁₂₉₉ system. It is known to be functional, but its target function is unknown.

Thus, we wanted to demonstrate that streptide production and competence were specifically influenced by the elimination of expression of the RRNPP QS target genes in the $\Delta pptAB$ mutant. Therefore, we quantified the expression of the *comX* gene, a target of the ComS/ComR system, the *shp*₁₃₅₈ gene, a target of the SHP/Rgg₁₃₅₈ system, and also the *shp*₁₂₉₉ gene, a target of the SHP/Rgg₁₂₉₉ system. The mature form of its AIP, SHP₁₂₉₉ (DIIIFPPFG), is similar to SHP₁₃₅₈ because it is also nine amino acids long and mostly hydrophobic. To this end, we used transcriptional fusions between the promoter of these three genes and the *luxAB* genes encoding a luciferase and then explored gene expression in the wild-type versus the *pptAB::erm* background. In the three systems, the genes encoding the AIPs, *shp* genes, or *comS* gene, are system targets, creating a positive feedback loop and resulting in the marked

expression of all the target genes [27,31,33]. Interestingly, although the three systems function similarly because they involve the export and reimport of AIPs, the three target genes were not expressed at the same moment during strain growth (Figure 2). The *comX* gene and the *shp*₁₂₉₉ gene were expressed at the beginning and the middle of the exponential growth phase, respectively (Figure 2A,E). In contrast, the *shp*₁₃₅₈ gene displayed a bimodal pattern during growth: there was a lower peak of expression early on and then a higher peak at the end (Figure 2C). These differences in the timing of expression indicate that, although the mechanisms that underlie each system are similar, they are not identical. In the *pptAB::erm* background, the expression of the *comX* and the *shp*₁₂₉₉ genes was completely absent (Figure 2A,E) and it dropped to trace levels for the *shp*₁₃₅₈ gene. In conclusion, these results show that PptAB is necessary for the expression of the three target genes and, therefore, for the functionality of the three QS systems.

We added the cognate mature AIPs ComS, SHP₁₃₅₈, and SHP₁₂₉₉ to cultures of the strains that contained the three transcriptional fusions in the *pptAB::erm* background in order to verify PptAB's predicted role in AIP export. The addition of the cognate AIPs immediately triggered the expression of the *comX*, or *shp*₁₂₉₉ genes at levels that are similar than those obtained when the *pptAB* genes were functional (Figure 2B,F) and at a level six times higher for the *shp*₁₃₅₈ gene (Figure 2D). Consequently, the functionality of the three QS systems was fully restored, confirming that PptAB plays a role in signal production, not signal detection, for these three systems. We deleted the *amiCDE* genes in strains TIL1488 (*blp::comX-luxAB pptAB::erm*), TIL1489 (*blp::Pshp₁₃₅₈-luxAB pptAB::erm*), and TIL1491 (*blp::shp₁₂₉₉-luxAB pptAB::erm*). Using luciferase assays, we checked that the expression of the *comX*, *shp*₁₃₅₈ and *shp*₁₂₉₉ genes remained absent in the presence of the cognate AIP (data not shown), which confirmed that Ami is the importer of the AIPs in strain TIL1488, TIL1489, and TIL1491.

3.2. PptAB is Involved in the Export of SHP₁₃₅₈ and SHP₁₂₉₉

To determine whether PptAB helps export the AIPs in *S. thermophilus*, we used LC-MS/MS to ascertain whether mature forms of SHP₁₃₅₈ and SHP₁₂₉₉ were present in the wild-type strain and absent in the Δ *pptAB* mutant (TIL1558). We did not look for ComS, which is not detectable via LC-MS/MS in the supernatant of the wild-type strain [28].

As expected based on prior research, we found mature forms of SHP₁₃₅₈ and SHP₁₂₉₉ in the wild-type strain [27,33] (Figure S1) but not in the Δ *pptAB* mutant. This result fits with our prior research showing that the *shp*₁₃₅₈ and *shp*₁₂₉₉ genes were not expressed in the *pptAB* mutant due to the disruption of the positive feedback loop.

To further characterize the key role played by PptAB as a peptide exporter, we delved deeper into how the mature form of SHP₁₃₅₈ is produced. We uncoupled the expression of the *shp*₁₃₅₈ gene from the presence of PptAB by introducing the plasmid pBV5030::P32-*shp*₁₃₅₈ into the Δ *pptAB* mutant, creating the TIL1563 strain. Because of the plasmid, *shp*₁₃₅₈ expression was under the control of a strong promoter and it was not reliant on the autoregulation loop generated by the SHP/Rgg₁₃₅₈ system. As a result, there was constant independent synthesis of a SHP₁₃₅₈-like precursor, which, due to technical constraints, contained a glycine residue between the methionine at position 1 and the lysine at position 2 of the wild-type sequence [27]. This 24-amino-acid-long precursor (hereafter, SHP*₁₃₅₈) can serve as the basis for the 9-amino-acid-long mature wild-type peptide, as seen below in the results for the TIL1213 strain. We did not detect the presence of mature SHP₁₃₅₈ in the TIL1563 strain, which demonstrated that the PptAB transporter is required for the peptide's production.

3.3. PptAB Only Exports the Mature Form of SHP₁₃₅₈

Past research has shown that PptAB is necessary for the production of active AIPs, but which form(s) of AIPs are recognized by PptAB? We cannot exclude the possibility that PptAB can export forms that are longer than mature AIPs, which may undergo further maturation via the action of extracellular proteases. PptAB might also be able to export the complementary sequence of the mature form of SHP*₁₃₅₈ (i.e., the N-terminal peptide that results from the maturation of SHP*₁₃₅₈ [SHP*₁₃₅₈(1-15)]) and the

related products of degradation. Therefore, using the TIL1213 strain ($\Delta amiCDE$ pBV5030::P_{32-shp1358}), we looked for traces of SHP*_{1358 (1-15)} as well as for fragments that result from shortening at the N-terminus (from SHP*_{1358 (1-15)} to SHP*_{1358 (7-15)}) and at the C-terminus (from SHP*_{1358 (1-14)} to SHP*_{1358 (1-10)}) (Table S4). The TIL1213 strain might have accumulated these peptides, since it was able to synthesize the AIP precursor thanks to the presence of the plasmid pBV5030::P_{32-shp1358}; however, the strain was unable to reimport any peptides because the Ami importer was inactivated. While we confirmed the presence of mature SHP₁₃₅₈ in the supernatant, we found no evidence of the fragments (data not shown). These results indicate that the precursor is likely matured in either the cytoplasm or in the cell membrane prior to secretion and that PptAB only interacts with the peptide's mature form.

3.4. PptAB Controls Transcription of the Genes Located Downstream from the Rgg Genes in *S. thermophilus*

Because PptAB helps export the AIPs that control the activity of transcriptional regulators, we used a deep sequencing approach (RNAseq) to identify all of the genes whose expression is controlled by PptAB. The genome of LMD-9 contains three complete *shp/rgg* loci in addition to the *shp/rgg*₁₃₅₈ and *shp/rgg*₁₂₉₉ loci, as well as a locus with truncated *shp* and *rgg* genes (sCDS_305/Ster_RS03240) (Figure S2A). Thus, we hypothesized that other genes in the near or far vicinity of the *rgg* genes could also be controlled by this transporter. The ComR regulon, partially controlled by PptAB through the export of the mature form of its cognate AIP ComS, was previously identified in *S. thermophilus* [26,48]. Because the regulon encompasses more than 100 genes, we chose to work in a $\Delta comR$ background, so that we could identify PptAB regulon in the absence of the genes that are regulated by the ComS/ComR system. Therefore, we compared gene expression between the TIL1560 (*comR::aphA3*) and TIL1562 (*comR::aphA3* $\Delta pptAB$) strains. The *shp*₁₂₉₉ and *shp*₁₃₅₈ genes, the two distinct targets of the SHP/Rgg systems, were highly expressed at the end of the exponential growth phase (Figure 1), so samples for mRNA extraction were obtained at this stage (OD₆₀₀ = 1). Genes were upregulated in the TIL1520 strain compared to in the TIL1562 strain (Table 2; Figure 3). Except sCDS_305/Ster_RS03240 locus (Figure S2A), the expression of all genes located downstream of the other five *rgg* genes and some, but not all of their cognate *shp* genes were controlled by PptAB. Hereafter, these genes will be referred as the proximal target genes of the Rgg regulators. We discovered two distal target genes (i.e., not located near a *shp/rgg* locus) that were regulated by PptAB: one short CDS (CDS_560) that was poorly expressed and one operon (Ster_RS04380-90). The short CDS has an unknown function, and the operon contains genes that are annotated as encoding enzymes that are involved in cysteine metabolism.

Table 2. Genes significantly upregulated in the TIL1560 strain (comR::aphA3) versus in the TIL1562 strain (comR::aphA3 ΔpptAB) (positively controlled by PptAB).

Locus Tag	Old Locus Tag	Fold Change	TIL1560 *	TIL1562 *	Start	Stop	Strand	Gene Name	Protein Length	Description
Cluster STER_RS04380-STER_RS04390										
STER_RS04380	STER_0885	3.6	2552	704	817570	818481	+		303	cysteine synthase family protein
STER_RS04385	STER_0886	3.8	3818	1006	818503	819687	+		394	aminotransferase class V-fold PLP-dependent enzyme
STER_RS04390	STER_0887	3.9	1704	433	819629	820210	+		193	serine acetyltransferase
Locus sCDS_265/Ster_RS04620										
STER_sCDS_265	STER_0933	NR	20	7	864863	864934	−	<i>shp265</i>	23	
STER_RS04620	STER_0934	NR	1214	1296	865021	865878	+	<i>rgg4620</i>	285	MutR family transcriptional regulator
STER_RS04625	STER_0935	3.0	3966	1322	865938	866738	+		266	Fe-S oxidoreductase
STER_sCDS_510		3.8	990	259	866798	866947	+		49	
STER_sCDS_661		2.5	351	141	867030	867119	+		29	
STER_RS04630	STER_0937	2.7	3087	1132	867149	868246	+		365	radical SAM protein
STER_RS04635	STER_0938	2.8	1748	629	868243	868986	+		247	arginase family protein
STER_RS04640	STER_0939	2.2	3534	1641	868993	870165	+		390	MFS transporter
Locus shp/rgg1299										
STER_RS06360	STER_1290	2.0	601	296	1198824	1199426	−	<i>rr06</i>	200	response regulator transcription factor
STER_RS06365	STER_1291	1.9	1125	593	1199423	1200517	−	<i>hk06</i>	364	sensor histidine kinase
STER_RS06370	STER_1292	11.2	504	45	1200510	1201247	−		245	ABC transporter permease
STER_RS06375	STER_1293	12.8	545	43	1201244	1202125	−		293	MULTISPECIES: ABC transporter ATP-binding protein
STER_RS06380	STER_1294	13.3	111	8	1202118	1202297	−		59	hypothetical protein
STER_RS06385	STER_1295	18.7	183	10	1202308	1202517	−		69	hypothetical protein
STER_RS06390		ND	ND	ND	1202668	1202934	−		87	hypothetical protein (incomplete)
STER_RS10535		ND	ND	ND	1202925	1203152	−		74	hypothetical protein (incomplete)
STER_sCDS_172		56.6	8877	157	1203195	1203290	−		31	
STER_RS06395	STER_1296	59.7	93273	1563	1203277	1204506	−		409	MFS transporter permease
STER_RS06400	STER_1297	49.7	195871	3942	1204484	1206817	−		777	oligoendopeptidase F
STER_sCDS_398		46.3	97	2	1206867	1206920	−		17	
STER_sCDS_310		NR	1	1	1206895	1206960	−		21	

Table 2. Cont.

Locus Tag	Old Locus Tag	Fold Change	TIL1560 *	TIL1562 *	Start	Stop	Strand	Gene Name	Protein Length	Description
STER_sCDS_714	STER_1298	67.4	1015	15	1207133	1207213	+	<i>shp1299</i>	26	
STER_RS06405	STER_1299	NR	924	1060	1207191	1208066	−	<i>rgg1299</i>	291	XRE family transcriptional regulator
Locus <i>shp/rgg1358</i>										
STER_sCDS_566		9.8	76	8	1255722	1255835	+		37	
STER_sCDS_613		NR	25	31	1256064	1256165	+		33	
STER_sCDS_543		NR	26	14	1256228	1256353	+		41	
STER_sCDS_851		NR	0	0	1256331	1256390	+		19	
STER_RS06660	STER_1350	3.1	137	44	1256335	1256604	+		89	hypothetical protein
STER_RS06665	STER_1351	NR	55	70	1256764	1257063	+		99	hypothetical protein
STER_RS06670	STER_1352	114.6	32175	281	1257163	1258074	−		303	sodium transporter
STER_RS06675		ND	ND	ND	1258071	1258393	−		107	hypothetical protein (incomplete)
STER_RS06680		132.9	21819	164	1258390	1258992	−		200	SPASM domain-containing protein
STER_RS06685	STER_1355	113.3	31202	275	1259086	1260177	−	<i>strC</i>	363	MULTISPECIES: transporter
STER_RS06690	STER_1356	109.6	53740	490	1260174	1261493	−	<i>strB</i>	439	KxxxW cyclic peptide radical SAM maturase
STER_RS10575	STER_1357	78.0	6544	84	1261563	1261655	−	<i>strA</i>	30	KxxxW-cyclized peptide pheromone
STER_RS06695	STER_1358	NR	450	565	1261738	1262598	−	<i>rgg1358</i>	286	MutR family transcriptional regulator
STER_sCDS_768		114.8	723	6	1262689	1262760	+	<i>shp1358</i>	23	
Locus <i>sCDS_273/Ster_RS07530</i>										
STER_sCDS_273		NR	3	8	1434537	1434608	−	<i>shp273</i>	23	
STER_RS07530	STER_1530	NR	648	628	1434695	1435558	+	<i>rgg7530</i>	287	MutR family transcriptional regulator
STER_RS07535	STER_1531	28.9	19052	660	1435675	1436853	+		392	MFS transporter
Gene <i>STER_sCDS_560</i>										
STER_sCDS_560		3.2	39	12	1441243	1441359	+		38	
<i>pptAB</i>										
STER_RS07725	STER_1571	37.9	5837	154	1472993	1474030	−	<i>pptB</i>	345	ABC transporter permease
STER_RS07730	STER_1572	2491	3491	1	1474027	1474758	−	<i>pptA</i>	243	ABC transporter ATP-binding protein

Table 2. Cont.

Locus Tag	Old Locus Tag	Fold Change	TIL1560 *	TIL1562 *	Start	Stop	Strand	Gene Name	Protein Length	Description
Locus sCDS_279/Ster_RS09420										
STER_sCDS_279		1.9	139	74	1785690	1785761	–	<i>shp279</i>	23	
STER_RS09420		NR	1102	1194	1786014	1786712	+	<i>r889420</i>	232	MutR family transcriptional regulator
STER_sCDS_584		NR	71	92	1786790	1786897	+		35	
STER_sCDS_809		NR	0	0	1786854	1786919	+		21	
STER_sCDS_462		13.1	1242	95	1786909	1787088	+		59	
STER_RS09425	STER_1924	14.9	15002	1007	1787097	1788152	+		351	radical SAM protein
STER_RS09430	STER_1925	15.4	18315	1192	1788145	1789686	+		513	ABC transporter ATP-binding protein
STER_sCDS_680		19.6	150	8	1789819	1789905	+		28	

Only genes with an adjusted p -value ≤ 0.01 and an at least 1.9-fold change were examined; NR, not significantly regulated (adjusted p -value > 0.01); ND, not determined; * Average of normalized read counts from the three biological replicates.

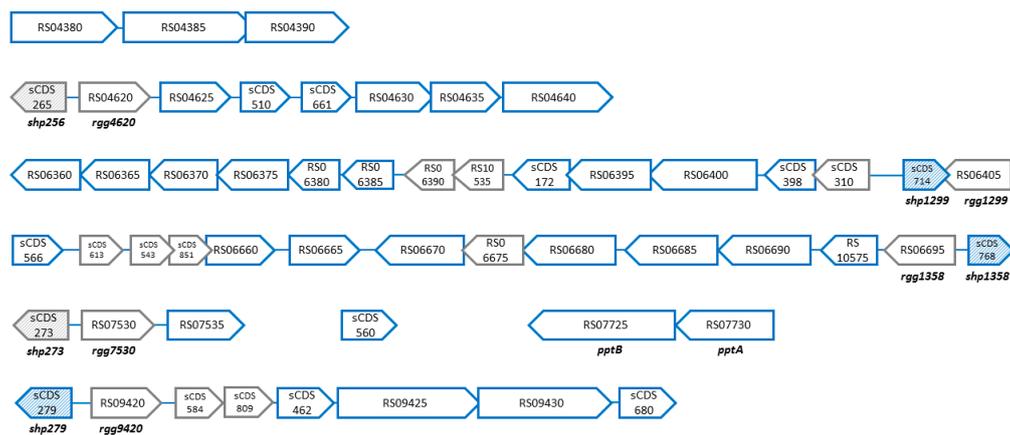


Figure 3. Organizational schematic of the genes controlled by PptAB. The genes whose expression was upregulated in the TIL1560 strain (*comR::aphA3*) compared to the TIL1562 strain (*comR::aphA3 ΔpptAB*) are shown in blue. This set of genes was controlled by PptAB but did not include genes regulated by ComR, which controls competence. ORF orientation within each cluster is indicated by the direction of the arrowhead (not to scale). Genes encoding SHPs have hatched shading. Genes that were not regulated by PptAB are in gray. Genes were named and described in accordance with their GenBank annotations, to which we added in-lab annotations for the short genes (see the Materials and methods section and Table S3).

We could distinguish three classes of genes located downstream from the *rgg* genes. First, there were two sets of highly expressed genes (based on the average of the normalized read counts) located downstream from the two *rgg* genes already studied, *rgg1299* and *rgg1358*; they were strongly controlled by PptAB and displayed greater than 45-fold changes in expression (Table 2). The genes downstream from the *rgg1299* gene were all transcribed in the same direction, but, the greater their proximity, the higher their level of transcription and fold change. The operon's initial genes encode an enzyme (annotated oligopeptidase F), a transporter, and a peptide. The function of these genes is unknown. The operon's later genes encode two peptides, an ABC transporter, and a two-component system whose function seems to be linked to rhamnose-glucose polysaccharide synthesis induced by bacitracin stress [49]. The genes downstream from *rgg1358* form two transcriptional units. The first unit was transcribed in the same direction as *rgg1358* and it was strongly controlled by PptAB; it encodes proteins that are involved in the production of the streptide [20,32] and two additional proteins with unknown functions. The second unit was transcribed in the opposite direction and it was weakly controlled by PptAB; it encodes peptides or small proteins with unknown functions. The transcription of the two *shp* genes at these loci was also strongly controlled by PptAB, as had already been demonstrated via the transcriptional fusions with the luciferase reporter (Figure 2).

The second class of genes involved two *shp/rgg* loci, sCDS_273/Ster_RS07530 and sCDS_279/Ster_RS09420. For this gene class, gene expression was relatively high in the TIL1560 strain, with fold changes ranging between 13 and 29. The *shp* gene at the sCDS_273/Ster_RS07530 locus was not expressed. The *shp* gene at the sCDS_279/Ster_RS09420 locus was weakly expressed and weakly controlled by PptAB (1.9-fold change). The sole proximal target gene in the sCDS_273/Ster_RS07530 system encodes a transporter with an unknown function. The proximal target genes in the sCDS_279/Ster_RS09420 system are similar to those at the streptide locus, with a gene encoding a SAM radical enzyme, a gene encoding a transporter, and two genes encoding peptides with unknown functions. The third class of genes was associated with the locus sCDS_265/Ster_RS04620. The genes were weakly expressed and controlled by PptAB (three-fold change). The *shp* gene at this locus was not expressed. Again, the proximal target genes were similar to those at the streptide locus, with a gene encoding a SAM radical enzyme, a gene encoding a transporter, two genes encoding peptides, a gene encoding an Fe-S oxido-reductase, and a gene encoding an arginase.

We found very similar expression levels and fold changes when we compared gene expression across the TIL1560 (*comR::aphA3*), TIL1561 (Δ *eep comR::aphA3*), and TIL1564 (Δ *amiCDE comR::aphA3*) strains (Tables S5 and S6). The differences mainly involved short CDSs encoding genes that were poorly expressed and for which regulation resulted in a three-fold change at most (sCDS_180, sCDS_560, sCDS_279, and sCDS_854). Only one gene (Ster_RS06940) was found to be downregulated in the *eep* mutant (Table S5); it encodes a peptide-binding protein of the Ami transporter and it was expressed at high levels in the TIL1560 strain. The expression of this gene was unaffected by the *amiCDE* and *pptAB* mutations. We also found that one gene (Ster_RS09420) was upregulated 1.9 fold in the *amiCDE* mutant, but it was poorly expressed in general (data not shown). Furthermore, it is important to note that none of the genes in plasmid 1 were expressed in the TIL1561 strain. Upon PCR verification, we discovered that this strain had lost this plasmid during the construction process (data not shown).

Finally, we observed that the *shp*₂₇₉ gene was expressed at very low levels. As a result, we questioned whether the expression levels were sufficient to allow for the production of mature SHP₂₇₉ in the wild-type strain. We found that the mature form of SHP₂₇₉ was indeed present in the wild-type strain (Figure S3) as well as in the TIL883 strain (Δ *amiCDE*) (data not shown). Interestingly, it was absent in the TIL773 (Δ *eep*) and TIL1558 (Δ *pptAB*) strains.

4. Discussion

PptAB has been identified as the exporter of the pheromones of PrgX in *E. faecalis* [19] and of Rgg and ComR in pathogenic streptococci *S. pyogenes*, *S. mutans* [30] and *S. agalactiae*, [24]. PptAB also exports peptides in *S. aureus* via a mechanism that is similar to the one that produces the pheromones in *E. faecalis*. However, the biological function of these peptides remains unclear [50,51]. The role of PptAB in the starter species *S. thermophilus* had previously remained unexplored, even though this bacterium has a *comS/comR* locus and it is one of the streptococcus species with *S. pneumoniae* with the greatest number of paralogous *shp/rgg* loci. In this study, we used genetic approaches and mass spectrometry to show that PptAB can export the mature AIPs of four different systems: ComS/ComR, SHP/Rgg₁₂₉₉, SHP/Rgg₁₃₅₈, and SHP/Rgg₉₄₂₀. Focusing on the SHP/Rgg₁₃₅₈ system, we found direct evidence, namely the presence of mature SHP₁₃₅₈, that PptAB acts as a peptide exporter of this specific peptide.

Here, we studied the mature forms of AIPs in *S. thermophilus*. These peptides are hydrophobic and short in length, ranging in size from nine amino acids (the SHPs) to 11 amino acids (the mature ComS). These characteristics are shared by PptAB-transported AIPs in other streptococci. In the wild-type strain, we found no traces of the complementary part of mature SHP₁₃₅₈, a short hydrophobic peptide (14 amino acids long) that should be released after the cleavage of the precursor; we also did not observe any fragments of this complementary part. This result raised questions regarding the specificity of the transporter. One hypothesis is that PptAB only exports mature SHP₁₃₅₈ because its activity focuses on mature AIPs. Another hypothesis is that there is interplay between PptAB and the protease Eep, which is known to be involved in the maturation of these peptides [21,24,27]. Eep is a transmembrane zinc-metalloprotease whose active cleavage site is thought to occur in a transmembrane domain [52]. It is possible that only mature SHPs are directly delivered to PptAB. If such is the case, the fate of the complementary part remains unknown.

Most commonly, AIPs of Gram-positive bacteria are exported either by the general Sec-dependent pathway or by dedicated peptidase-containing ABC transporters that can export and mature double glycine signaling peptides, which play a role in competence or provide competitive fitness advantages in complex environments [26,53,54]. The PptAB export mechanism represents an intermediate solution that is neither highly generalized nor highly specific. Further research should explore the potential evolutionary benefits of this solution and, more importantly, assess whether it is a point of control in QS systems. While the expression of the *pptAB* genes seems constitutive, more work is needed to determine whether PptAB activity is somehow regulated.

The RNAseq approach was used to identify the genes whose expression was controlled by PptAB, Eep, and AmiCDEF. All of the genes located downstream from the five non truncated *rgg* gene are part

of the targets genes. Our findings suggest that non-truncated *shp/rgg* loci are functional and involved in the actions taken by PptAB, Eep, and AmiCDEF to regulate these target genes. Nevertheless, further work is needed in order to confirm that the expression of these target genes is indeed controlled by their cognate *rgg* gene. These target genes were generally expressed and regulated at similar levels by the three proteins PptAB, Eep, and AmiCDEF, indicating that these target genes might belong to a single transcriptional unit. There were a few exceptions: for example, when the proximal targets of SHP/Rgg₁₂₉₉ were examined, the genes farthest from the *rgg* gene (Ster_RS06385- Ster_RS06360) were poorly expressed and regulated. However, this effect may have resulted from readthrough transcription dynamics, rather than from issues with QS regulation. Surprisingly, these genes are also part of the ComR regulon [26]. Although some of these loci had been previously studied, using the RNAseq approach, we were able to identify additional proximal targets, such as Ster_RS06680 and Ster_RS06670 for the *shp/rgg*₁₃₅₈ locus, and Ster_sCDS172 for the *shp/rgg*₁₂₉₉ locus. Ster_RS06680 and Ster_RS06670 have been annotated as SPASM-domain-containing protein and sodium transporters, respectively. Here, we discovered that they belong to the *str* operon, but further work is needed in order to clarify their role in streptide production. The function of Ster_sCDS172 is also unknown. We additionally found significantly expressed distal target genes with a three-gene operon linked to cysteine synthesis. Research is currently underway to identify the SHP/Rgg system that is associated with this operon and to confirm the operon's function. To our knowledge, it is one of the few distal target gene of a SHP/Rgg system identified to date, although we must still verify that transcriptional control is direct. Indeed, few RNAseq approaches have been developed to exhaustively identify SHP/Rgg system targets in streptococci. These experiments highlighted genes located near the *rgg* genes in *Streptococcus mitis* [55], *Streptococcus pneumoniae* [23], or *S. pyogenes* [21].

The identity and expression patterns of those genes regulated by PptAB, Eep, and Ami were strikingly similar. This finding indicates that an equivalent role is being played in export, maturation, and reimport. It is highly likely that the deletion of these genes would completely inactivate the mechanism in action, leading to similar results for target gene transcription. However, a closer look at the expression of the *shp* genes in the wild-type strain versus the Δ *pptAB*, Δ *eep*, and Δ *amiCDE* background revealed the existence of three different regulation scenarios.

First, the *shp*₁₂₉₉ and *shp*₁₃₅₈ genes were expressed at high levels, and their expression was clearly controlled by the three proteins. The result was a positive feedback loop and marked expression of the proximal target genes at the end of the exponential growth phase in the wild-type strain background. These results correspond to a scenario, in which SHP is exported by PptAB, matured by Eep, and reimported by Ami. Consequently, the activity of the associated Rgg regulator is controlled, and there is the transcription of the genes located downstream from the *rgg* gene.

Second, the *shp*₂₇₃ and *shp*₂₆₅ genes were not expressed. This result suggests that a SHP encoded by another locus controls the activity of Rgg₇₅₃₀ and Rgg₄₆₂₀. We feel that there is more support for this hypothesis than for a hypothesis that involves the involvement of a non-cognate SHP/Rgg complex, because all of the *rgg* genes in the wild-type strain were expressed at similar levels indicating that the genes are likely functional also this deserves further validation. The proximal target gene in the SHP₂₇₃/Rgg₇₅₃₀ system was expressed at high levels and regulated by PptAB, Eep, and Ami, whereas the proximal target genes of SHP₂₆₅/Rgg₄₆₂₀ were expressed at lower levels and subject to less regulation by the three proteins. Interestingly, SHP₂₇₃ is nearly identical to SHP₁₃₅₈: there is a single amino acid difference, a spot occupied by a valine in SHP₁₃₅₈ is occupied by a leucine in SHP₂₇₃. SHP₂₆₅ and SHP₁₃₅₈ differ by two amino acids: spots occupied by a glycine and a leucine in SHP₁₃₅₈ are occupied by a serine and an alanine, respectively, in SHP₂₆₅ (Figure S2B). This finding suggests that SHP₁₃₅₈ is a good candidate for interacting with Rgg₇₅₃₀ and Rgg₄₆₂₀, and it could more effectively cross-activate Rgg₇₅₃₀, but less effectively cross-activate Rgg₄₆₂₀, if we assume that the cognate SHP of a Rgg is likely to be the most efficient SHP. Further experimental work is needed in order to confirm that SHP₁₃₅₈ can interact with different Rggs.

Third, the gene encoding SHP₂₇₉ was poorly expressed and controlled by PptAB, Eep, and Ami, but the mature form of SHP₂₇₉ was present in the wild-type strain background. In contrast, the system's proximal target genes were expressed at higher levels and more strongly regulated by these three proteins than the *shp*₂₇₉ gene. The Rgg regulator that was encoded by Ster_RS09420 plays a role in oxidative stress defense in the *S. thermophilus* CNRZ368 strain [56]. This system did not display a positive feedback loop related to *shp*₂₇₉ expression, providing an additional element of support for the hypothesis that another SHP might interact with the Rgg₉₄₂₀ regulator. SHP₂₇₉ is nearly identical to SHP₁₃₅₈: a spot that is occupied by a valine in SHP₁₃₅₈ is occupied by a glycine in SHP₂₇₉. Consequently, SHP₁₃₅₈ is again a good candidate for Rgg₉₄₂₀ activation.

In a previous study, we demonstrated the absence of cross-activation between the SHP₁₂₉₉/Rgg₁₂₉₉ and SHP₁₃₅₈/Rgg₁₃₅₈ systems [33]. This result was expected, since the amino acid sequences of the two SHPs are not similar. Our findings here suggest that some SHP/Rgg systems can cross-activate each other, likely via highly similar SHPs, although this hypothesis must be experimentally tested. However, the fact that some SHP/Rgg loci encoded *shp* genes that were not expressed and that appeared to be activated by SHPs from other systems was surprising. Therefore, we wonder if, in *S. thermophilus*, these accumulated SHP/Rgg systems have degenerated or if they may prove to be useful under certain natural conditions. We also cannot exclude the possibility that other growth conditions exist, in which these *shp* genes are efficiently expressed. Previous work has shown that intracellular cross-activation involving 2 SHP/Rgg systems exists in *S. pneumoniae* [25] and in *S. pyogenes* [21]. However, circumstances are slightly different in the latter case because the two SHPs can interact with two Rggs with relatively similar affinities [57], although one Rgg activates transcription whereas the other inhibits it [21]. Another level of complexity is present if we consider interspecies crosstalk. This cross-talk can occur between streptococci species via SHP/Rgg systems, as demonstrated between *S. pneumoniae* and *S. mitis* [55], but also between distinct species via another RRNPP mechanism between *S. aureus* and *E. faecalis*. *S. aureus* can produce at least four linear peptides during the maturation process of secretion signal peptides of lipoproteins; one of these peptides can mimic a pheromone of *E. faecalis* and cause aggregation, the first step in horizontal gene transfer in this species [50]. Interestingly, in *S. aureus*, the transporter EcsAB, encoded by paralogs of the genes that encode PptAB and Eep, are necessary for the production of these peptides [50,51].

5. Conclusions

In conclusion, in *S. thermophilus*, PptAB plays a central role in the export of the AIPs that are involved in intracellular QS mechanisms. A RNAseq approach designed to identify the genes regulated by the exporter PptAB, the protease Eep and the importer Ami highlighted cross-talk between SHP/Rgg systems. More work is needed now in order to dissect this crosstalk at the strain level, but also at intra- and inter-species levels and to understand their various roles in natural and complex environments.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4425/11/9/1096/s1>, Table S1: Oligonucleotides used in this study, Table S2: Plasmids used in this study, Table S3: List of CDSs annotated in GenBank and short putative CDSs predicted by BactgeneSHOW in the chromosome and the two plasmids of the *S. thermophilus* wild-type strain (LMD-9), Table S4: List of the SHP*1358 (MGKKQILLTLLLIVFEGIIVIVVG) fragments whose masses was looked for in the TIL1213 strain (Δ amiCDE pBV5030::P₃₂-*shp*₁₃₅₈) via LC-MS/MS., Table S5: Genes significantly upregulated in the TIL1560 strain (*comR::aphA3*) versus in the TIL1561 strain (*comR::aphA3 Deep*) (positively controlled by Eep), Table S6: Genes significantly upregulated in the TIL1560 strain (*comR::aphA3*) versus in the TIL1564 strain (*comR::aphA3 Δ amiCDE*) (positively controlled by Ami), Figure S1: Detection of the mature forms of SHP₁₂₉₉ and SHP₁₃₅₈ in cultures of the *S. thermophilus* wild-type strain (LMD-9) via LC-MS/MS. Fragmentation spectra for SHP₁₂₉₉ (A) and SHP₁₃₅₈ (B); mass, retention time, and the integrated area under the curve obtained from the extracted-ion chromatograms for both peptides (C). The data shown are representative of three independent experiments, Figure S2: Information on the *shp/rgg* loci in the *S. thermophilus* wild-type strain (LMD-9). (A) Schematic representation of the six *shp/rgg* loci based on genome annotation for the LMD-9 strain, as described in Table S4. Annotations for the *rgg* genes come from GenBank (CP000419.1), and annotations for the *shp* genes were developed in our lab using BactgeneSHOW, as described in the Materials and methods section. The *rgg* genes and *shp* genes are represented by black and gray arrows, respectively. The size of the protein encoded by each gene is indicated underneath. (B) Alignment of the sequences for the SHP precursors. The predicted or experimentally validated sequences for the mature forms are in bold,

Figure S3: Detection of the mature form of SHP₂₇₉ in cultures of the *S. thermophilus* wild-type strain (LMD-9) via LC-MS/MS. Fragmentation spectra for SHP₂₇₉ (A); mass, retention time, and the integrated area under the curve obtained from the extracted-ion chromatograms for the peptide (B). The data shown are representative of three independent experiments.

Author Contributions: Conceptualization, A.L., V.M., V.J. and R.J.; Formal analysis, A.L. and R.G.; Funding acquisition, V.M. and V.J.; Investigation, A.L. and C.M.; Methodology, C.M., C.H. and R.G.; Project administration, R.G.; Resources, Céline Henry; Supervision, R.G.; Validation, A.L.; Visualization, R.G.; Writing—original draft, A.L., V.M., V.J. and R.G.; Writing—review & editing, V.M., V.J. and R.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was funded by the French National Institute for Agriculture, Food, and Environment (INRAE) and the French Ministry of Higher Education, Research, and Innovation (MESRI). Proteomics analyses were performed by the PAPPSO platform (<http://pappso.inra.fr>), which is supported by INRAE, the Regional Council of Ile-de-France, IBI SA, and CNRS.

Acknowledgments: We thank Lydie Oliveira-Correia for her help with the LC-MS/MS analysis. We are grateful to Françoise Rul for critical reading of the manuscript and to Jessica Pearce-Duvet for the English-language editing.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper. Abbreviations: ABC, ATP binding cassette; AIP, auto-inducing peptide; bp, base pair; CDM, chemically defined medium; CDS, coding sequence; CID, collision-induced dissociation; Erm, erythromycin; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Da, Dalton; ds, double strand(ed); Km, kanamycin; OD, optical density; QS, quorum sensing; RLU, relative light units; rRNA, ribosomal RNA; RRNPP, Rap Rgg NprR PlcR PrgX; SHP, short hydrophobic peptides; XIC, ion current signal; XIP, *sigX*-inducing peptide.

References

1. Nealson, K.H. On the 50th Anniversary of the discovery of autoinduction and the ensuing birth of quorum sensing. *Environ. Microbiol.* **2020**, *22*, 801–807. [[CrossRef](#)]
2. Verma, S.C.; Miyashiro, T. Quorum sensing in the squid-Vibrio symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 16386–16401. [[CrossRef](#)]
3. Fontaine, L.; Wahl, A.; Fléchar, M.; Mignolet, J.; Hols, P. Regulation of competence for natural transformation in streptococci. *Infect. Genet. Evol.* **2015**, *33*, 343–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kleerebezem, M. Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* **2004**, *25*, 1405–1414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Le, K.Y.; Otto, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Monnet, V.; Juillard, V.; Gardan, R. Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **2014**, *42*, 339–351. [[CrossRef](#)]
7. Kalamara, M.; Spacapan, M.; Mandic-Mulec, I.; Stanley-Wall, N.R. Social behaviours by *Bacillus subtilis*: Quorum sensing, kin discrimination and beyond. *Mol. Microbiol.* **2018**, *110*, 863–878. [[CrossRef](#)]
8. Shanker, E.; Federle, M.J. Quorum Sensing Regulation of Competence and Bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and mutants. *Genes* **2017**, *8*, 15. [[CrossRef](#)]
9. Rocha-Estrada, J.; Aceves-Diez, A.E.; Guarneros, G.; de la Torre, M. The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *87*, 913–923. [[CrossRef](#)]
10. Neiditch, M.B.; Capodagli, G.C.; Prehna, G.; Federle, M.J. Genetic and structural analyses of RRNPP intercellular peptide signaling of Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **2017**, *51*, 311–333. [[CrossRef](#)]
11. Pottathil, M.; Lazazzera, B.A. The extracellular Phr Peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front. Biosci.* **2003**, *8*, 32–45. [[CrossRef](#)]
12. Slamti, L.; Perchat, S.; Huillet, E.; Lereclus, D. Quorum sensing in *Bacillus thuringiensis* is required for completion of a full infectious cycle in the insect. *Toxins* **2014**, *6*, 2239–2255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Dunny, G.M.; Berntsson, R.P. Enterococcal sex pheromones: Evolutionary pathways to complex, two-signal systems. *J. Bacteriol.* **2016**, *198*, 1556–1562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Declerck, N.; Bouillaud, L.; Chaix, D.; Rugani, N.; Slamti, L.; Hoh, F.; Lereclus, D.; Arold, S.T. Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 18490–18495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Parashar, V.; Aggarwal, C.; Federle, M.J.; Neiditch, M.B. Rgg protein structure-function and inhibition by cyclic peptide compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 5177–5182. [[CrossRef](#)]

16. Lanigan-Gerdes, S.; Dooley, A.N.; Faull, K.F.; Lazazzera, B.A. Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *65*, 1321–1333. [[CrossRef](#)]
17. Pomerantsev, A.P.; Pomerantseva, O.M.; Camp, A.S.; Mukkamala, R.; Goldman, S.; Leppla, S.H. PapR peptide maturation: Role of the NprB protease in *Bacillus cereus* 569 PlcR/PapR global gene regulation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2009**, *55*, 361–377. [[CrossRef](#)]
18. Clewell, D.B.; Weaver, K.E.; Dunny, G.M.; Coque, T.M.; Francia, M.V.; Hayes, F. Extrachromosomal and Mobile Elements in Enterococci: Transmission, Maintenance, and Epidemiology. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*; Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., Shankar, N., Eds.; Massachusetts Eye and Ear Infirmary: Boston, MA, USA, 2014.
19. Varahan, S.; Harms, N.; Gilmore, M.S.; Tomich, J.M.; Hancock, L.E. An ABC transporter is required for secretion of peptide sex pheromones in *Enterococcus faecalis*. *MBio* **2014**, *5*, e01726-14. [[CrossRef](#)]
20. Ibrahim, M.; Guillot, A.; Wessner, F.; Algaron, F.; Besset, C.; Courtin, P.; Gardan, R.; Monnet, V. Control of the transcription of a short gene encoding a cyclic peptide in *Streptococcus thermophilus*: A new quorum-sensing system? *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 8844–8854. [[CrossRef](#)]
21. Chang, J.C.; LaSarre, B.; Jimenez, J.C.; Aggarwal, C.; Federle, M.J. Two Group A streptococcal peptide pheromones act through opposing Rgg regulators to control biofilm development. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002190. [[CrossRef](#)]
22. Chang, J.C.; Jimenez, J.C.; Federle, M.J. Induction of a quorum sensing pathway by environmental signals enhances group A streptococcal resistance to lysozyme. *Mol. Microbiol.* **2015**, *97*, 1097–1113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Junges, R.; Salvadori, G.; Shekhar, S.; Amdal, H.A.; Periselnieris, J.N.; Chen, T.; Brown, J.S.; Petersen, F.C. A Quorum-Sensing System That Regulates *Streptococcus pneumoniae* Biofilm Formation and Surface Polysaccharide Production. *mSphere* **2017**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Pérez-Pascual, D.; Gaudu, P.; Fleuchot, B.; Besset, C.; Rosinski-Chupin, I.; Guillot, A.; Monnet, V.; Gardan, R. RovS and its associated signaling peptide form a cell-to-cell communication system required for *Streptococcus agalactiae* pathogenesis. *MBio* **2015**, *6*, e02306–e02314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhi, X.; Abdullah, I.T.; Gazioglu, O.; Manzoor, I.; Shafeeq, S.; Kuipers, O.P.; Hiller, N.L.; Andrew, P.W.; Yesilkaya, H. Rgg-Shp regulators are important for pneumococcal colonization and invasion through their effect on mannose utilization and capsule synthesis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Mignolet, J.; Fontaine, L.; Sass, A.; Nannan, C.; Mahillon, J.; Coenye, T.; Hols, P. Circuitry rewiring directly couples competence to predation in the gut dweller *Streptococcus salivarius*. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 1627–1638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Fleuchot, B.; Gitton, C.; Guillot, A.; Vidic, J.; Nicolas, P.; Besset, C.; Fontaine, L.; Hols, P.; Leblond-Bourget, N.; Monnet, V.; et al. Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: A new quorum-sensing mechanism in streptococci. *Mol. Microbiol.* **2011**, *80*, 1102–1119. [[CrossRef](#)]
28. Gardan, R.; Besset, C.; Gitton, C.; Guillot, A.; Fontaine, L.; Hols, P.; Monnet, V. The extracellular life cycle of ComS, the competence stimulating peptide of *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 1845–1855. [[CrossRef](#)]
29. Khan, R.; Rukke, H.V.; Ricomini Filho, A.P.; Fimland, G.; Arntzen, M.O.; Thiede, B.; Petersen, F.C. Extracellular identification of a processed type II ComR/ComS pheromone of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 3781–3788. [[CrossRef](#)]
30. Chang, J.C.; Federle, M.J. PptAB exports Rgg quorum-sensing peptides in *Streptococcus*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0168461. [[CrossRef](#)]
31. Fontaine, L.; Boutry, C.; de Frahan, M.H.; Delplace, B.; Fremaux, C.; Horvath, P.; Boyaval, P.; Hols, P. A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Bacteriol.* **2010**, *192*, 1444–1454. [[CrossRef](#)]
32. Schramma, K.R.; Bushin, L.B.; Seyedsayamdost, M.R. Structure and biosynthesis of a macrocyclic peptide containing an unprecedented lysine-to-tryptophan crosslink. *Nat. Chem.* **2015**, *7*, 431–437. [[CrossRef](#)]
33. Fleuchot, B.; Guillot, A.; Mézange, C.; Besset, C.; Chambellon, E.; Monnet, V.; Gardan, R. Rgg-associated SHP signaling peptides mediate cross-talk in streptococci. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Makarova, K.; Slesarev, A.; Wolf, Y.; Sorokin, A.; Mirkin, B.; Koonin, E.; Pavlov, A.; Pavlova, N.; Karamychev, V.; Polouchine, N.; et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 15611–15616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Letort, C.; Juillard, V. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* **2001**, *91*, 1023–1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Gardan, R.; Besset, C.; Guillot, A.; Gitton, C.; Monnet, V. The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 4647–4655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Biswas, I.; Gruss, A.; Ehrlich, S.D.; Maguin, E. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **1993**, *175*, 3628–3635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Débarbouillé, M.; Arnaud, M.; Fouet, A.; Klier, A.; Rapoport, G. The *sacT* gene regulating the *sacPA* operon in *Bacillus subtilis* shares strong homology with transcriptional antiterminators. *J. Bacteriol.* **1990**, *172*, 3966–3973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* **2011**, *17*, 3. [[CrossRef](#)]
40. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760. [[CrossRef](#)]
41. Nicolas, P.; Bize, L.; Muri, F.; Hoebeke, M.; Rodolphe, F.; Ehrlich, S.D.; Prum, B.; Bessières, P. Mining *Bacillus subtilis* chromosome heterogeneities using hidden Markov models. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1418–1426. [[CrossRef](#)]
42. Ibrahim, M.; Nicolas, P.; Bessières, P.; Bolotin, A.; Monnet, V.; Gardan, R. A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci. *Microbiology* **2007**, *153*, 3631–3644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liao, Y.; Smyth, G.K.; Shi, W. featureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 923–930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Anders, S.; Huber, W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* **2010**, *11*, R106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **1995**, *57*, 289–300. [[CrossRef](#)]
47. Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389–3402. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Boutry, C.; Wahl, A.; Delplace, B.; Clippe, A.; Fontaine, L.; Hols, P. Adaptor protein MecA is a negative regulator of the expression of late competence genes in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **2012**, *194*, 1777–1788. [[CrossRef](#)]
49. Thévenard, B.; Besset, C.; Choinard, S.; Fourcassié, P.; Boyaval, P.; Monnet, V.; Rul, F. Response of *S. thermophilus* LMD-9 to bacitracin: Involvement of a BceRS/AB-like module and of the rhamnose-glucose polysaccharide synthesis pathway. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *177*, 89–97. [[CrossRef](#)]
50. Schilcher, K.; Caesar, L.K.; Cech, N.B.; Horswill, A.R. Processing, export, and identification of novel linear peptides from *Staphylococcus aureus*. *mBio* **2020**, *11*, e00112–e00120. [[CrossRef](#)]
51. Cheng, D.; Lv, H.; Yao, Y.; Cheng, S.; Huang, Q.; Wang, H.; Liu, X.; Bae, T.; Li, M.; Liu, Q. Roles of the Site 2 Protease Eep in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2020**, *202*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Brown, M.S.; Ye, J.; Rawson, R.B.; Goldstein, J.L. Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **2000**, *100*, 391–398. [[CrossRef](#)]
53. Martin, B.; Quentin, Y.; Fichant, G.; Claverys, J.P. Independent evolution of competence regulatory cascades in streptococci? *Trends Microbiol.* **2006**, *14*, 339–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wang, C.Y.; Medlin, J.S.; Nguyen, D.R.; Disbennett, W.M.; Dawid, S. Molecular determinants of substrate selectivity of a pneumococcal Rgg-regulated peptidase-containing ABC transporter. *mBio* **2020**, *11*, e02502–e02519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Junges, R.; Sturod, K.; Salvadori, G.; Amdal, H.A.; Chen, T.; Petersen, F.C. Characterization of a signaling system in *Streptococcus mitis* that mediates interspecies communication with *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e02297-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

56. Fernandez, A.; Borges, F.; Thibessard, A.; Gintz, B.; Decaris, B.; Leblond-Bourget, N. Characterisation of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 oxidative stress-resistant mutants: Involvement of a potential Rgg-like transcriptional regulator. *Le Lait* **2004**, *84*, 77–85. [[CrossRef](#)]
57. Aggarwal, C.; Jimenez, J.C.; Nanavati, D.; Federle, M.J. Multiple length peptide-pheromone variants produced by *Streptococcus pyogenes* directly bind Rgg proteins to confer transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 22427–22436. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Titre : Rôle clé du transporteur PptAB dans le quorum sensing chez *Streptococcus thermophilus*

Mots clés : quorum sensing, phéromones, sécrétion, transporteur, régulateurs transcriptionnels, *Streptococcus thermophilus*

Résumé : Chez *Streptococcus thermophilus*, le cycle de vie des signaux peptidiques appelés phéromones contribuant aux mécanismes de communication dit quorum sensing (QS) est divisé en quatre étapes. La synthèse des phéromones est suivie par leur maturation par la protéase Eep et leur sécrétion. Enfin, leur re-intériorisation par le transporteur d'oligopeptides Ami est indispensable pour leur détection intracellulaire par les régulateurs transcriptionnels dit Rgg-like contrôlant l'expression des gènes cibles. L'objectif de ma thèse était de valider le rôle du transporteur PptAB dans la sécrétion des phéromones avant d'identifier les gènes dont l'expression est dépendante de ce transporteur chez *S. thermophilus*.

En premier, nous avons confirmé le rôle du transporteur PptAB dans l'activation de trois

systèmes de QS impliquant les régulateurs Rgg-like. Pour cela nous avons utilisé des fusions transcriptionnelles entre un gène rapporteur codant la luciférase et le promoteur de trois gènes cibles de ces systèmes. Nous avons ensuite montré que le transporteur PptAB n'exporte probablement que la forme mature des phéromones par LC-MS/MS. Enfin, nous avons découvert que l'expression d'un ensemble des gènes situé en aval des gènes codant les régulateurs Rgg-like est dépendante du transporteur PptAB mais aussi du transporteur Ami et de la protéase Eep par une approche globale transcriptomique. Ainsi, les transporteurs PptAB et Ami et la protéase Eep contrôlent ces cibles par un même mécanisme.

Notre travail a mis en évidence des interférences entre ces systèmes qui devront être élucidées.

Title : Key role of the transporter PptAB in the quorum sensing in *Streptococcus thermophilus*

Keywords : quorum sensing, pheromones, secretion, transporter, transcriptional regulators, *Streptococcus thermophilus*

Abstract : In *Streptococcus thermophilus*, the life cycle of signaling peptides called pheromones contributing to communication mechanisms named quorum sensing (QS) is divided into four steps. The synthesis of pheromones is followed by their maturation by the protease Eep and their secretion. At last, their re-intériorisation by the oligopeptide transporter Ami is essential for their intracellular detection by transcriptional regulators called Rgg-like controlling the expression of target genes. The aim of my thesis was to valid the role of the transporter PptAB in the secretion of pheromones before identifying genes whose expression is dependent of this transporter in *S. thermophilus*.

First, we confirmed the role of the transporter PptAB in the activation of three QS systems involving

Rgg-like regulators. For that we used transcriptional fusions between a reporter gene coding the luciferase and the promoter of three target genes of these systems. We then showed that the transporter PptAB exports more likely only the mature form of pheromones by LC-MS/MS. Finally, we discovered that the expression of a set of genes located downstream of genes coding Rgg-like regulators is dependant of the transporter PptAB and also of the transporter Ami and the protease Eep by a global transcriptomic approach. Thereby, the transporters PptAB and Ami and the protease Eep regulate these targets by a same mechanism.

Our work brought light on cross-talks between these systems which need to be deciphered.