



**HAL**  
open science

# Biosynthèse, mécanisme d'action et régulation d'une bactériocine sécrétée par *Streptococcus gallolyticus*

Alexis Proutière

► **To cite this version:**

Alexis Proutière. Biosynthèse, mécanisme d'action et régulation d'une bactériocine sécrétée par *Streptococcus gallolyticus*. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP7178 . tel-03279086

**HAL Id: tel-03279086**

**<https://theses.hal.science/tel-03279086>**

Submitted on 6 Jul 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.

**Thèse de doctorat de Microbiologie**  
**Université de Paris**

École doctorale Bio Sorbonne Paris cité (ED 562)  
Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram-Positif  
Institut Pasteur de Paris

**Biosynthèse, mécanisme d'action et  
régulation d'une bactériocine sécrétée par**  
***Streptococcus gallolyticus***

Présentée par **Alexis Proutière**

Soutenue publiquement le 01/12/20 devant un jury composé de :

Pascale Serror, DR à l'Université de Paris Saclay	Rapporteur
Jean-Marc Berjeaud, PU à l'Université de Poitiers	Rapporteur
Sylvie Rebuffat, PU au Muséum d'Histoire Naturelle de Paris	Examineur
Alexandre Chenal, DR à l'Institut Pasteur de Paris	Examineur
Nathalie Rholion, CR INSERM au Centre de recherche Saint-Antoine	Examineur
Olivier Dussurget, PU à l'Université de Paris	Président du Jury
Shaynoor Dramsi, DR à l'Institut Pasteur de Paris	Directrice de thèse

## Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement ma directrice de thèse, Shaynoor Dramsi, pour ces quatre années passées à travailler ensemble, pour toutes les discussions scientifiques ou non que nous avons eues, et pour la confiance qu'elle m'a accordée. En plus de m'avoir encadré et guidé tout au long de cette thèse, Shaynoor m'a laissé la liberté nécessaire pour que je puisse m'épanouir en tant que jeune scientifique et a rendu ces années particulièrement enrichissantes. Son soutien, sa disponibilité et son aide dans la rédaction de cette thèse ont été tout simplement essentiels.

J'exprime aussi toute ma gratitude envers Patrick Trieu-Cuot pour m'avoir accueilli dans son Unité et pour m'avoir apporté son aide à chaque fois qu'il en a eu l'occasion.

Je remercie l'ensemble des membres du jury et tout particulièrement les rapporteurs madame Pascale Serror et monsieur Jean-Marc Berjeaud pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Un grand merci à tous les membres de l'unité de recherche BBPG pour tous leurs précieux conseils et les bons moments que nous avons partagés ensemble. Une mention spéciale à Laurence, Bruno et Myriam pour leur aide et toute la bienveillance dont ils ont fait preuve à mon égard depuis mon arrivée au laboratoire. Je remercie aussi toutes les autres personnes avec qui j'ai pu interagir et travailler et qui ont permis de développer de nombreux aspects de ce projet. Je pense notamment à nos collaborateurs américains Yftah Tal-Gan et Anthony Harrington, ainsi qu'à Hugo Varet, Alexis Voegele, Alexandre Chenal, Johann Peltier et bien d'autres au sein de l'Institut Pasteur.

Une pensée à tous les doctorants et autres personnes que j'ai pu rencontrer au cours de ces années à l'Institut Pasteur et avec qui j'ai partagé de superbes moments. A Maria pour toutes nos discussions au labo, aux "Alex" qui se reconnaîtront, à Mathieu, Nicolas, Guillaume, Émeline et Yves-Joël pour les soirées jeux passées ensemble, à Jazmin pour nos "repas bactériocine", aux "Stapiens" pour la pause détente bien méritée du vendredi soir et à tous les autres que je n'ai pas la place de citer ici !

La réalisation de ce travail n'aurait sans doute pas été possible sans ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes choix. Je remercie du fond du cœur mes parents, Denis et Monique Proutière, pour leur soutien dans tous les domaines de ma vie et quels que soient mes choix.

Pour finir je remercie spécialement celle avec qui je partage ma vie, Aurélie Corroyer, pour son soutien et son amour quotidien qui n'ont fait qu'augmenter dans les périodes difficiles et m'ont permis de surmonter toutes les épreuves que j'ai pu rencontrer.

# Sommaire

<b>Résumé.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>3</b>
<b>Liste des figures et tableaux.....</b>	<b>5</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>7</b>
<b>Synthèse bibliographique.....</b>	<b>11</b>
<b>I. Streptococcus gallolyticus .....</b>	<b>11</b>
A. Classification de Streptococcus gallolyticus.....	11
B. S. gallolyticus, une bactérie commensale de l'intestin des animaux .....	19
C. S. gallolyticus, un pathogène opportuniste .....	23
D. Association des infections à S. gallolyticus avec le cancer colorectal.....	31
<b>II. Diversité des bactériocines des bactéries à Gram-positif.....</b>	<b>39</b>
A. Définition et généralités sur les bactériocines.....	41
B. Diversité et identification des bactériocines .....	41
C. Rôle des bactériocines.....	45
D. Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif .....	45
E. Les bactériocines de l'espèce Streptococcus gallolyticus.....	51
<b>III. Biosynthèse et modes d'action des bactériocines.....</b>	<b>53</b>
A. Biosynthèse des bactériocines.....	53
B. Mode d'action des bactériocines.....	57
C. Mécanismes d'immunité .....	61
<b>IV. Régulation de la production de bactériocines.....</b>	<b>65</b>
<b>V. Les applications des bactériocines .....</b>	<b>69</b>
A. Les bactériocines en industrie agroalimentaire .....	69
B. Limites à l'utilisation de bactériocines .....	71
<b>Résultats .....</b>	<b>79</b>
<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>79</b>
<b>Préambule .....</b>	<b>79</b>
<b>Partie I : Régulation de la production de la gallocine.....</b>	<b>83</b>
Publication n°1: Characterization of a 4-component regulatory system controlling bacteriocin production in Streptococcus gallolyticus .....	83
<b>Partie II : Sécrétion, maturation et analyse structurale du GSP.....</b>	<b>91</b>
Publication N°2: Secretion, maturation and activity of a quorum-sensing peptide (GSP) inducing bacteriocins transcription in Streptococcus gallolyticus.....	91
<b>Partie III : Activité et spectre d'action de la gallocine .....</b>	<b>99</b>
<b>Partie IV : Mécanismes d'action et de résistance à la gallocine. ....</b>	<b>105</b>
<b>Discussion générale et perspectives.....</b>	<b>117</b>
<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>135</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>144</b>

## Résumé

*Streptococcus gallolyticus* sous-espèce *gallolyticus* (*Sgg*) est un pathogène opportuniste chez l'Homme responsable de septicémies et d'endocardites chez les personnes âgées souvent associées à un cancer du côlon. Il a été montré que *Sgg* produit une bactériocine spécifique appelée gallocine, capable de tuer certaines bactéries commensales du microbiote de l'hôte seulement en conditions tumorales, favorisant ainsi la colonisation de *Sgg* dans le côlon. L'objectif de cette thèse a été de déterminer le mode d'action de la gallocine et de caractériser les principaux composants impliqués dans sa biosynthèse.

Nous avons démontré que la gallocine est une bactériocine de classe IIb constituée de deux peptides appelés GIIA1 et GIIA2. Elle est active contre divers streptocoques, entérocoques, lactocoques et pédiocoques. Les peptides de la gallocine GIIA1 et GIIA2 se distinguent par le fait qu'ils contiennent chacun un pont disulfure et sont très peu chargés positivement. Des expériences de perméabilisation de liposomes suggèrent que la gallocine agit en formant des pores dans la membrane, indépendamment de la présence d'un récepteur membranaire.

Nous avons identifié un locus génomique de 13 kb qui contient les gènes codant la gallocine ainsi que d'autres gènes potentiellement impliqués dans sa biosynthèse, maturation et régulation. Nous avons tout d'abord caractérisé un système à trois composants activant sa transcription, composé d'un peptide sécrété appelé GSP (« gallocin stimulating peptide ») qui agit via un système à deux composants constitué de l'histidine kinase BlpH et du régulateur de réponse BlpR. Une analyse transcriptomique globale a permis de déterminer que ce système de régulation active spécifiquement la transcription des vingt gènes de ce locus. Puis nous avons caractérisé un deuxième régulateur atypique nommé BlpS, co-transcrit avec BlpR, qui inhibe la transcription de ces vingt gènes en se fixant sur le même site de liaison à l'ADN que BlpR.

Puis nous avons montré qu'un ABC transporteur nommé BlpAB est responsable de la sécrétion des peptides GIIA1 et GIIA2 et du peptide inducteur GSP. Nous avons également identifié le gène *gip* codant pour un peptide conférant l'immunité à la gallocine. Enfin, nous avons testé le rôle d'une protéine contenant un domaine thiorédoxine potentiellement impliquée dans la formation des ponts disulfure des peptides GIIA1 et GIIA2.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse permettent de proposer un modèle de la biosynthèse de la gallocine. Il sera important à l'avenir de déterminer l'impact de la gallocine sur le microbiote et d'évaluer son rôle dans des conditions d'infection. L'utilisation de gallocine comme agent antimicrobien pour tuer en particulier les Entérocoques résistants aux antibiotiques ou le streptocoque du groupe B constitue une voie de recherche intéressante.

Mots clés : *Streptococcus gallolyticus*, *S. bovis*, peptide antimicrobien, bactériocine, gallocine, biosynthèse, régulation, quorum sensing, système à deux composants.

# **Title: Biosynthesis, mode of action and regulation of a bacteriocin secreted by *Streptococcus gallolyticus***

## **Abstract**

*Streptococcus gallolyticus* subspecies *gallolyticus* (*Sgg*) is an opportunistic human pathogen responsible for septicemia and endocarditis in the elderly often associated with colorectal cancer. *Sgg* has been shown to produce a specific bacteriocin named gallocin, able to kill commensal bacteria of the host microbiota under tumoral conditions, thereby promoting colonization of *Sgg* in the colon.

The objective of this PhD work was to determine the mode of action of gallocin and to characterize the main components involved in its biosynthesis.

We demonstrated that gallocin is a class IIb bacteriocin consisting of two peptides called GIIA1 and GIIA2. It is active against various streptococci, enterococci, lactococci and pediocococci. The gallocin peptides GIIA1 and GIIA2 are quite unique because they contain a disulfide bond and display very few positive charges. Liposome permeabilization experiments suggest that GIIA1/GIIA2 acts by forming pores in the membrane, likely independently of the presence of a membrane receptor.

We identified a 13 kb genomic locus that contains the genes encoding gallocin peptides, the immunity peptide as well as other genes potentially involved in its biosynthesis, maturation and regulation. We first characterized a three-component system activating its transcription, composed of a secreted peptide called GSP ("gallocin stimulating peptide") that acts via a two-component system consisting of the histidine kinase BlpH and the response regulator BlpR. A global transcriptomic analysis showed that this regulatory system specifically activates the transcription of the twenty genes of this locus. We then characterized a second atypical regulator called BlpS, co-transcribed with BlpR, which inhibits the transcription of these twenty genes by binding to the same DNA binding site as BlpR.

We then showed that an ABC transporter called BlpAB is responsible for the secretion of GIIA1 and GIIA2 and the inducing peptide GSP. We also identified the *gip* gene coding for a peptide conferring immunity to gallocin. Finally, we tested the role of a protein containing a thioredoxin domain potentially involved in the formation of disulfide bonds of GIIA1 and GIIA2.

Altogether the results obtained during this Ph. D. work allow us to propose a model of gallocin biosynthesis. It will be important in the future to determine the impact of gallocin on the microbiota and to evaluate its role in infection conditions. The use of gallocin as an antimicrobial agent to kill antibiotic-resistant *Enterococcus* or Group B *Streptococcus* constitutes an interesting avenue of research.

Key words: *Streptococcus gallolyticus*, *S. bovis*, antimicrobial peptide, bacteriocin, gallocin, biosynthesis, regulation, two-components system, inhibitor.

## Liste des figures et tableaux

<b>Figure 1</b> : Arbre phylogénétique des streptocoques basé sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S.....	12
<b>Figure 2</b> : Les différents groupes de Streptocoques responsables d'infections humaines et animales.....	14
<b>Figure 3</b> : Arbre phylogénétique des bactéries du complexe SBSEC basé sur la séquence du gène <i>sodA</i> .....	14
<b>Figure 4</b> : Cliché de microscopie électronique à balayage de Sgg UCN34.....	16
<b>Figure 5</b> : Cliché de microscopie électronique à balayage de Sgg UCN34 où les pili Pil3 sont marqués spécifiquement par immunomarquage.....	22
<b>Figure 6</b> : Modèle représentant la route infectieuse des endocardites à Sgg.....	28
<b>Figure 7</b> : Structure et classification des différents types de lantibiotiques.....	46
<b>Figure 8</b> : Classification des bactériocines de classe IIa en quatre sous-groupes.....	46
<b>Figure 9</b> : Séquence primaire de 14 bactériocines de classe IIb constituée chacune de 2 peptides. La présence du motif GxxxG est indiquée en noir. Adapté de Nissen-Meyer et al. (2010).....	48
<b>Figure 10</b> : Organisation générale d'un cluster de gènes codant une bactériocine de classe IIb.....	52
<b>Figure 11</b> : Mécanisme d'action de la nisine.....	56
<b>Figure 12</b> : Modèles proposés pour expliquer la formation de pores par les bactériocines de type pédiocines.....	58
<b>Figure 13</b> : Modèle d'interaction de la lactococcine G avec la membrane.....	60
<b>Figure 14</b> : Régulation de la production de bactériocines par « quorum-sensing » chez une bactériocine de classe IIb.....	66
<b>Figure 15</b> : Locus génétique de la gallocine.....	78
<b>Figure 16</b> : Analyse comparative du locus génétique de la gallocine dans les isolats cliniques de Sgg par rapport à la souche de référence UCN34.....	80
<b>Figure 17</b> : Activation du promoteur des gènes de la gallocine ( <i>PgIIA</i> ) par le Tween20.....	88
<b>Figure 18</b> : Séquence du peptide GSP (Gallocin- Stimulating Peptide).....	90
<b>Figure 19</b> : Sécrétion et maturation des peptides <i>GIIA1</i> , <i>GIIA2</i> et GSP.....	96
<b>Figure 20</b> : La gallocine est une bactériocine à deux peptides.....	98
<b>Figure 21</b> : Test de la sensibilité à la gallocine de diverses bactéries.....	100
<b>Figure 22</b> : Résistance de la gallocine à différents stress.....	102
<b>Figure 23</b> : Production de la gallocine par le mutant $\Delta$ gallo_rs10370.....	102
<b>Figure 24</b> : Le peptide <i>Gip</i> confère l'immunité à la gallocine.....	104
<b>Figure 25</b> : Caractérisation du mutant $\Delta$ abi.....	106
<b>Figure 26</b> : Courbes de croissance de mutants de Sgm résistants à la gallocine.....	106
<b>Figure 27</b> : La gallocine entraîne une fuite du contenu intracellulaire des liposomes.....	110
<b>Figure 28</b> : Modèle de biosynthèse de la gallocine par Sgg UCN34.....	116
<b>Tableau 1</b> : Différentes taxonomies du complexe <i>S. bovis</i> - <i>S. equinus</i> (SBSEC).....	16
<b>Tableau 2</b> : Classification des bactériocines des bactéries à Gram-positif.....	44
<b>Tableau 3</b> : Bactériocines produites par les bactéries de l'espèce <i>S. gallolyticus</i> .....	50
<b>Tableau 4</b> : Liste des souches utilisées.....	134
<b>Tableau 5</b> : Liste des primers utilisés (5' vers 3').....	136

## Liste des abréviations

<i>Sgg</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i> sous-espèce <i>gallolyticus</i>
<i>Sgm</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i> sous-espèce <i>macedonicus</i>
<i>Sgp</i>	<i>Streptococcus gallolyticus</i> sous-espèce <i>pasteurianus</i>
SBSEC	<i>Streptococcus bovis</i> - <i>Streptococcus equinus</i> complex
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomal
Acides aminés	Code à une lettre (x ou X équivalant à n'importe quel acide aminé).
PCR	« Polymerase Chain Reaction »
MALDI-TOF	« Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight »
BSH	« Bile Salt Hydrolase »
CCR	Cancer colorectal
ABC transporteur	Transporteur à « ATP-binding cassette »
Man-PTS	« Mannose phosphotransferase system »
Gip	« Gallocin immunity peptide »
GSP	« Gallocin Stimulating Peptide »
<i>PgIIA</i>	Promoteur des gènes codant la gallocine
<i>gfp</i>	Gène codant la « Green fluorescent protein »
DO <sub>600</sub>	Densité optique à une longueur d'onde de 600nm
pb	paire de base
kb	kilobase
THY	Milieu Todd Hewitt contenant 0,5% d'extrait de levure
M9YEG	Milieu M9 contenant 0,2% de glucose et 0,5% d'extrait de levure
AnTc	Anhydrotétracycline
kDa	kilodalton
DTT	Dithiothréitol
WT	« Wild type » ou souche sauvage
POPC	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-(phospho-rac-(1-glycerol))
ANTS	A-350, 8-aminonaphtalene-1,3,6 trisulfonic acid
DPX	X-1525, p-xylene-bis-pyridinium bromide
LC/MS	Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
SHIME	« Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem »
SGB	Streptocoque du groupe B



*Synthèse*

*Bibliographique*

# Synthèse bibliographique

## I. *Streptococcus gallolyticus*

### A. Classification de *Streptococcus gallolyticus*

#### 1. Le genre *Streptococcus*

Les bactéries du genre *Streptococcus* sont des coques à Gram-positif, catalase négative, formant des paires ou des chaînettes et sont généralement anaérobies facultatives (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1987). Leur métabolisme énergétique principal est la fermentation amenant à la formation de lactate, conduisant à l'acidification du milieu dans lequel ils sont cultivés. Ces bactéries sont retrouvées comme commensales ou pathogènes opportunistes chez l'Homme et chez les animaux.

Les Streptocoques font parties d'un groupe très large (plus de 100 espèces de Streptocoques ont été répertoriées jusqu'à aujourd'hui), et par conséquent leur identification et classification constituent depuis toujours un défi majeur pour détecter, prévenir et soigner les infections dont ils sont responsables. Plusieurs tests phénotypiques ont été mis au point au début du XXème siècle notamment pour différencier les streptocoques d'origine humaine ou animale. Ces tests consistent entre autres à observer la présence d'hémolyse sur gélose au sang, le pH après culture de la bactérie, la résistance à la chaleur, l'hydrolyse de l'acide hippurique, la capacité à réduire le bleu de méthylène dans le lait, la croissance en présence de bile, la fermentation de différents sucres et la lyse par des bactériophages de streptocoques (Lancefield, 1933; Sherman, 1937).

En 1933, Rebecca Lancefield développa le premier test sérologique permettant de différencier les streptocoques hémolytiques en 5 groupes (A, B, C, D, E) selon un antigène de paroi, le polyside C (Lancefield, 1933). D'autres groupes sérologiques ont ensuite été découverts chez les streptocoques hémolytiques comme non-hémolytiques et 20 sérogroupe de Lancefield ont été identifiés au total (désignés par les lettres de A à H et K à V) (Spickler, 2005). En combinant ces travaux aux tests phénotypiques précédents, James M. Sherman proposa en 1937 de séparer les streptocoques en 4 groupes : les streptocoques pyogènes, viridans, lactiques et entérocoques. Longtemps basée sur ces travaux, la classification des streptocoques a connu un nouveau tournant dans les années 1980. En effet, les nouvelles

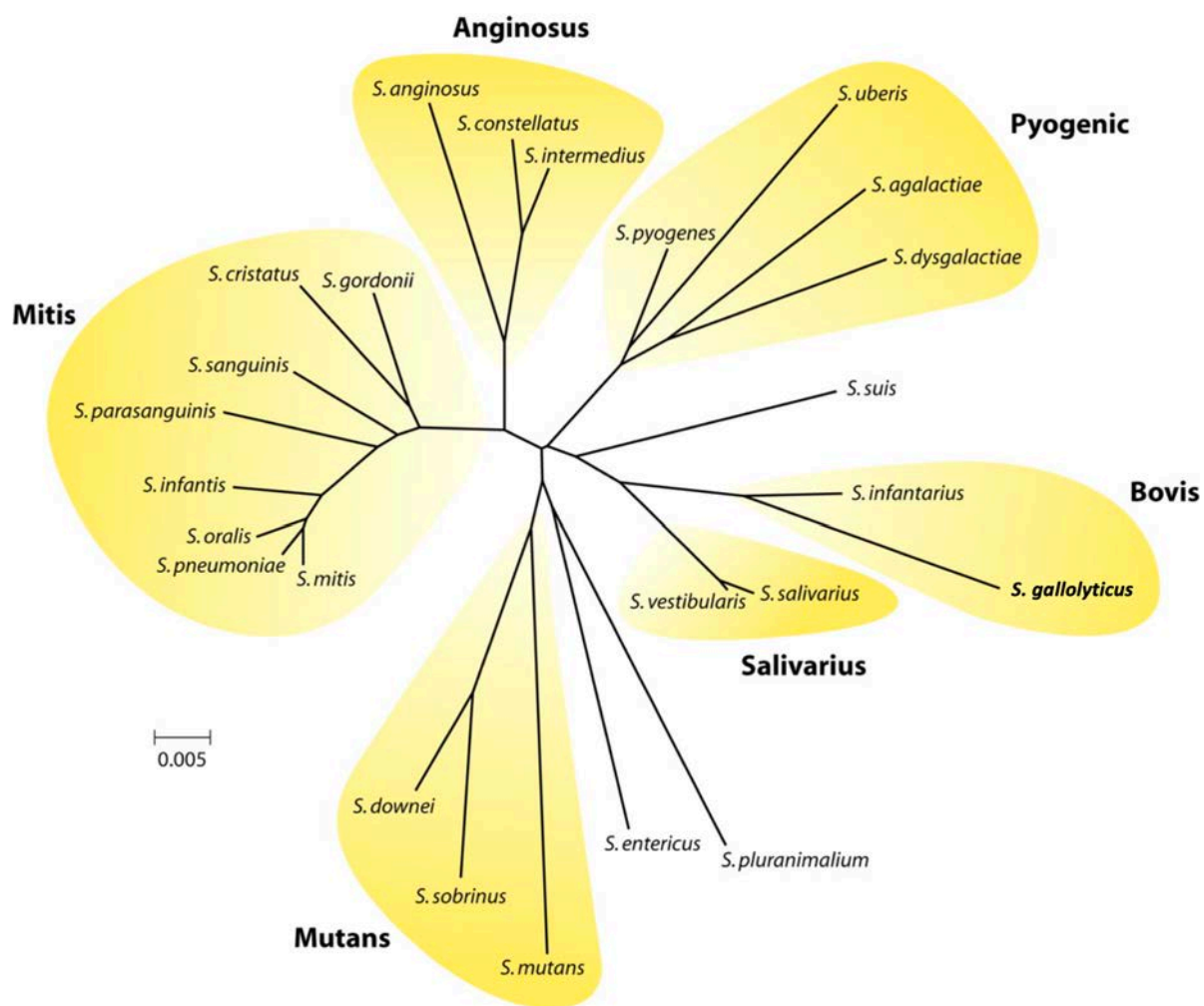


Figure 1 : Arbre phylogénétique des streptocoques basé sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S. La comparaison de la séquence du gène de l'ARNr 16S permet de classifier et différencier 5 groupes de streptocoques : Pyogenic, Bovis, Salivarius, Mutans, Mitis et Anginosus. Adapté de Nobbs et al. (2009).

méthodes d'études des acides nucléiques comme le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal (ARNr) 16S, les tests d'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARNr ont montré que les streptocoques, entérocoques et lactocoques (anciennement Streptocoques lactiques) forment 3 genres différents (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984; Schleifer et al., 1985). Les genres *Enterococcus* et *Lactococcus* ont donc été créés et les bactéries en faisant partie ont été exclues du genre *Streptococcus*.

Aujourd'hui la classification des streptocoques est basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S, les divisant en 6 groupes (Pyogenic, Bovis, Salivarius, Mutans, Mitis et Anginosus) (Figure 1) (Nobbs et al., 2009). Ce gène est particulièrement bien adapté à la différenciation d'espèces bactériennes puisqu'il est présent chez toutes les bactéries et possède des régions conservées, permettant son amplification par PCR et séquençage chez différentes espèces, et des régions variables entre les espèces permettant leur identification. Pour que deux bactéries soient considérées comme appartenant à la même espèce, il est proposé qu'elles possèdent au moins 98,7% d'identité de séquence du gène de l'ARNr 16S (Stackebrandt and Ebers, 2006).

Les différents groupes de Streptocoques sont responsables d'infections chez l'Homme et chez les animaux tels que le cheval, le chien, le cochon, la vache, le pigeon et les poissons (Figure 2).

Parmi les différentes espèces de streptocoques, quatre sont des pathogènes opportunistes majeurs pour l'Homme :

- *Streptococcus pyogenes* (streptocoque du groupe A) est responsable d'infections bénignes comme des angines, l'impétigo ou la scarlatine mais aussi de graves infections invasives comme des bactériémies, des fasciites nécrosantes, et de chocs toxiques. C'est un pathogène strictement humain qui est à l'origine de complications auto-immunes (Cutforth et al., 2016).
- *Streptococcus agalactiae* (streptocoque du groupe B, SGB) est responsable d'infections graves (méningites et bactériémies) chez les nouveau-nés. SGB est une bactérie commensale du tractus vaginal chez la mère et peut être transmis à l'enfant lors de l'accouchement.
- *Streptococcus pneumoniae*, une bactérie commensale du rhinopharynx de l'Homme, est aussi un pathogène opportuniste responsable d'infections graves telles que des sinusites, otites, méningites, bactériémies et pneumonies touchant majoritairement les enfants très jeunes et des personnes âgées.

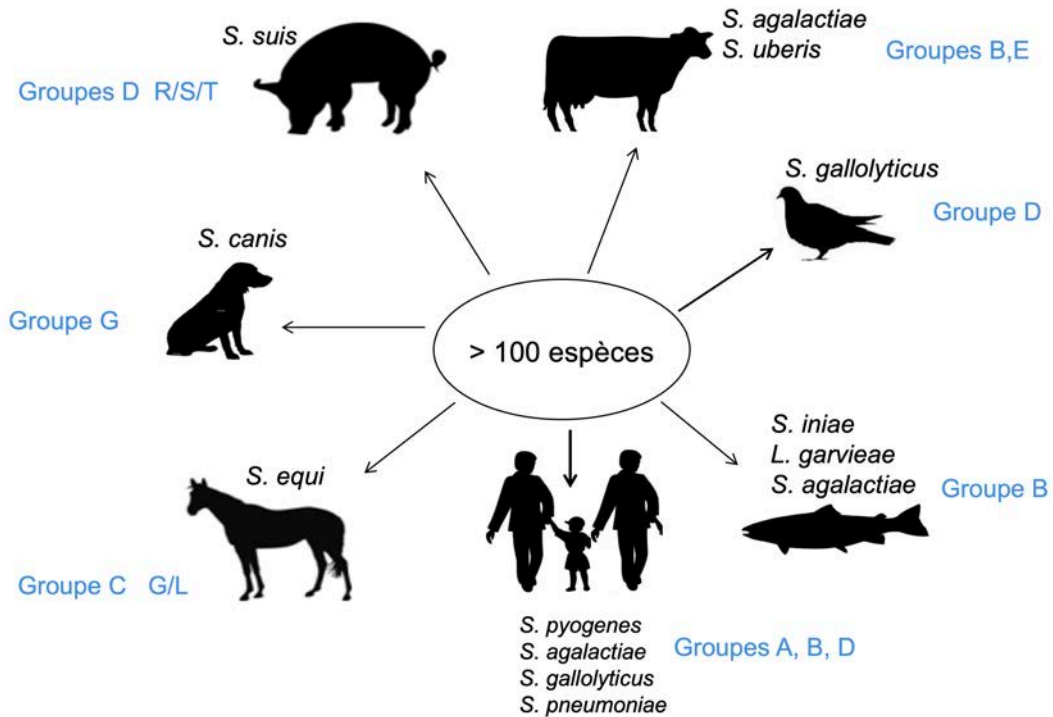


Figure 2 : Les différents groupes de Streptocoques responsables d'infections humaines et animales.

Les streptocoques principaux responsables d'infections chez le cheval (Harrington et al., 2002), le chien (DEVRIESE et al., 1986), le cochon (Goyette-Desjardins et al., 2014), la vache (Keefe, 1997), les oiseaux (Devriese et al., 1990), les poissons (Weinstein et al., 1997) et chez l'Homme (Boleij et al., 2011a; Cutforth et al., 2016; Glaser et al., 2002; Musher, 1992).

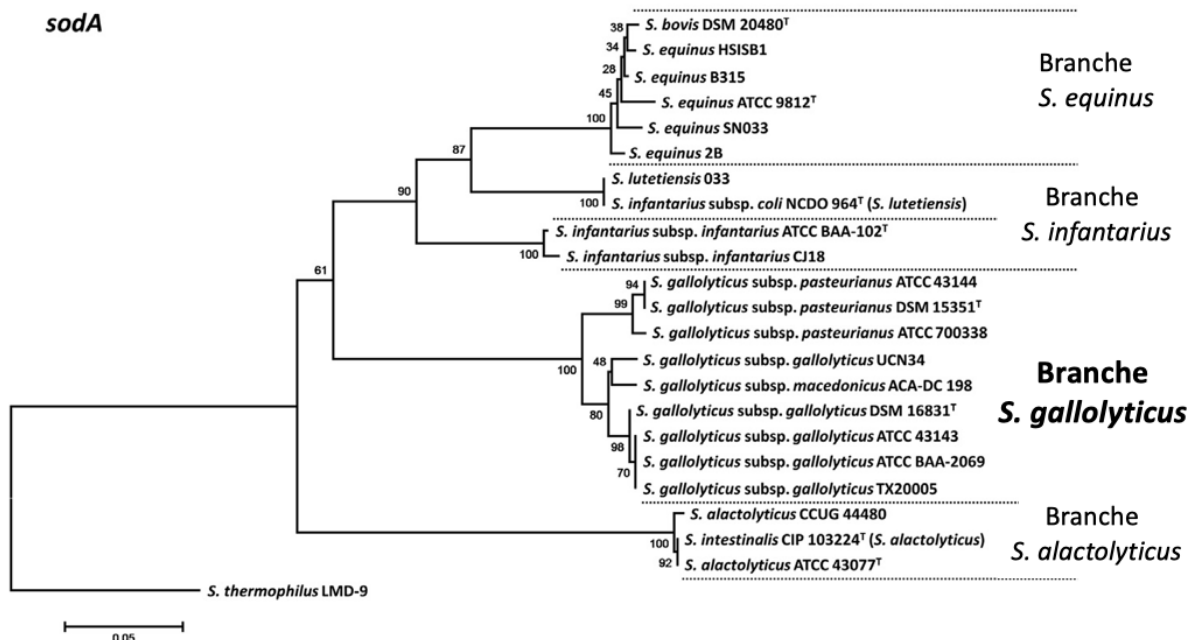


Figure 3 : Arbre phylogénétique des bactéries du complexe SBSEC basé sur la séquence du gène *sodA*. La comparaison de la séquence du gène *sodA* (et de celui codant l'ARNr16S et *groEL*), permis de distinguer 4 espèces distinctes dans le complexe SBSEC : *Streptococcus equinus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus alactolyticus* et *Streptococcus gallolyticus* et de diviser l'espèce *Streptococcus gallolyticus* en 3 sous-espèces : *Streptococcus gallolyticus* sous-espèce *gallolyticus*, *macedonicus* et *pasteurianus*. Adapté de Jans et al. (2015).

- *Streptococcus gallolyticus* (anciennement *S. bovis* biotype I), est responsable de bactériémies et d'endocardites chez les personnes âgées ou immunodéprimées. Bien que moins virulentes que les trois espèces précédentes, les infections à *S. gallolyticus* ont particulièrement attiré l'attention ces dernières années à cause de leur forte association avec le cancer du côlon.

## 2. Nouvelle classification des sous-espèces de *S. gallolyticus*

*S. gallolyticus* appartient aux streptocoques du groupe D selon la classification de Lancefield. Après la reclassification des entérocoques, qui appartenaient eux aussi aux streptocoques du groupe D, dans le genre *Enterococcus*, les streptocoques de groupe D restants furent regroupés dans le complexe *Streptococcus bovis* - *Streptococcus equinus* (SBSEC).

Le complexe SBSEC, très hétérogène, regroupe aussi bien des bactéries non-pathogènes utilisées dans la fermentation de produits laitiers que des bactéries commensales de l'intestin des animaux et des pathogènes opportunistes responsables principalement d'acidose, de ballonnements et de mammites chez les animaux ruminants et de septicémies et endocardites associées au cancer du côlon chez l'Homme (Jans et al., 2015). Afin de mieux distinguer les différentes espèces bactériennes de ce complexe, et notamment d'identifier les espèces à potentiel pathogène, des analyses génétiques basées sur le pourcentage d'hybridation ADN-ADN, sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S et du gène codant la superoxyde dismutase (*sodA*) furent réalisées au début des années 2000 (Poyart et al., 2002; Schlegel et al., 2003). Ces analyses permirent de diviser le complexe SBSEC en 4 espèces distinctes : *Streptococcus equinus*, *Streptococcus infantarius*, *Streptococcus alactolyticus* et *S. gallolyticus* (Figure 3).

L'espèce *S. gallolyticus* fut elle-même divisée en 3 sous-espèces : *Streptococcus gallolyticus* sous-espèce *gallolyticus* (*Sgg*, anciennement *S. bovis* biotype I), *Streptococcus gallolyticus* sous-espèce *macedonicus* (*Sgm*) et *Streptococcus gallolyticus* sous-espèce *pasteurianus* (*Sgp*). Cette classification génétique rigoureuse a permis de démontrer que *Sgg* est la cause majeure d'endocardites infectieuses associées à un cancer colorectal chez l'Homme et un commensal pouvant devenir un pathogène opportuniste chez les ruminants (Boleij et al., 2011a). *Sgp* est une bactérie moins virulente que *Sgg* responsable d'un nombre moins important d'endocardites, de bactériémies et associées parfois à des maladies hépatobiliaires (Boleij et al., 2011a; Kale et al., 2018; Schlegel et al., 2003). Pour finir, *Sgm* est considérée comme une bactérie non-pathogène retrouvée dans les produits laitiers (De Vuyst and Tsakalidou, 2008).

Tableau 1 : Différentes taxonomies du complexe *S. bovis* - *S. equinus* (SBSEC)

Résumé des différents noms attribués aux espèces et sous-espèces du complexe SBSEC dans la littérature. Adapté de (Jans et al., 2015).

<b>Classification recommandée</b>	<b>Ancienne classification</b>	<b>Classification par biotype</b>	<b>Synonymes</b>
<i>Streptococcus alactolyticus</i>	<i>Streptococcus alactolyticus</i>	Variable	<i>Streptococcus intestinalis</i>
<i>Streptococcus equinus</i>	<i>Streptococcus equinus</i>	Majoritairement biotype II.1	<i>Streptococcus bovis</i>
<i>Streptococcus gallolyticus</i> sous-espèce <i>gallolyticus</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	Biotype I	<i>Streptococcus caprinus</i>
<i>Streptococcus gallolyticus</i> sous-espèce <i>macedonicus</i>	<i>Streptococcus macedonicus</i>	Probablement biotype II.1	<i>Streptococcus waius</i>
<i>Streptococcus gallolyticus</i> sous-espèce <i>pasteurianus</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	Biotype II.2	<i>Streptococcus pasteurianus</i>
<i>Streptococcus infantarius</i> sous-espèce <i>infantarius</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	Biotype II.1	-
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	<i>Streptococcus bovis</i>	Biotype II.1	<i>Streptococcus infantarius</i> sous-espèce <i>coli</i>

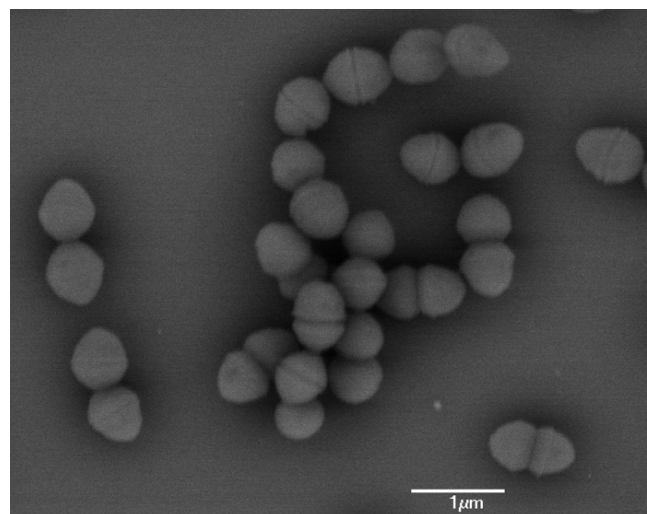


Figure 4 : Cliché de microscopie électronique à balayage de *Sgg* UCN34

Crédit photo : Adeline Mallet, Institut Pasteur

Les changements de nomenclature du complexe SBSEC ont généré des confusions dans la littérature qui continuent à perdurer avec la coexistence de deux systèmes de nomenclature dans les publications même très récentes (Jans et al., 2015). Le Tableau 1 résume les divers noms qui ont été attribués aux espèces du groupe SBSEC afin de rendre la littérature plus lisible et compréhensible même lorsque l'ancienne classification est utilisée.

### 3. Spécificités et identification de *Sgg*

*Sgg* est une bactérie facilement cultivable en laboratoire, notamment en milieu Todd-Hewitt à 37°C, en aérobie comme en anaérobie. Observé au microscope *Sgg* se présente sous forme de coques de moins de 1 µm de diamètre, formant des chainettes composée de 2 à dix bactéries environ et dont la taille varie selon le milieu de culture et la souche étudiée (Figure 4).

En milieu médical notamment, il est important d'être capable d'identifier rapidement la bactérie responsable d'une infection pour la combattre avec un traitement adapté. *Sgg* possède des caractères phénotypiques permettant son identification. Les bactéries appartenant au groupe *S. bovis* ont été distinguées des autres streptocoques selon les caractères suivants : groupe D au test de Lancefield, catalase-négative, alpha-hémolytiques ou non-hémolytiques sur gélose au sang, tolérants à la bile, intolérants au sel (6,5% NaCl), capables d'hydrolyser l'esculine, positifs au test leucine amino-peptidase et négatifs au test pyrrolidonyl- arylamidase. La classification en espèces et sous-espèces appartenant au groupe *S. bovis* est réalisée grâce aux tests β-glucuronidase, α et β-galactosidase, β-mannosidase et de production d'acide à partir d'amidon, de glycogène, d'inuline et de mannitol (Dekker and Lau, 2016). *Sgg* se distingue notamment des autres sous-espèces par sa capacité à fermenter le mannitol. Sur la base de ces tests phénotypiques, plusieurs tests commerciaux tels que « API 20 strep » ou « rapid ID32 Strep » ont été développés pour l'identification des différents streptocoques dont *Sgg*.

Une alternative récente et prometteuse à ces tests d'identification bactérienne classique est la spectrométrie de masse MALDI-TOF (« Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight »). Chaque espèce bactérienne analysée possédant un spectre de masses caractéristique, la comparaison du spectre obtenu avec une bactérie inconnue à des spectres obtenus avec des bactéries déjà identifiées peut permettre son identification. Cette méthode a notamment permis d'identifier *Sgg* jusqu'au niveau de la sous-espèce (Hinse et al., 2011). Bien



que le séquençage de gènes spécifiques (ARNr 16S, *sodA*) ou la comparaison du génome restent la référence pour la classification des bactéries, la rapidité et le faible coût de la spectrométrie de masse en font une approche particulièrement bien adaptée au milieu hospitalier pour identifier et traiter correctement les infections à streptocoques.

#### **4. Résistance aux antibiotiques**

Une étude sur 128 souches cliniques de *Sgg* a montré que 78% d'entre elles sont résistantes à la tétracycline et 60% sont résistantes à l'érythromycine. Ces résistances ont probablement été acquises grâce au transposon Tn916 dont l'intégrase a été détectée dans toutes les souches résistantes à la tétracycline et qui est régulièrement porteur des gènes impliqués dans la résistance à la tétracycline et à l'érythromycine (Leclercq et al., 2005). Cependant, les infections à *Sgg* ne posent pas de problèmes thérapeutiques puisqu'aucun cas de résistance aux pénicillines n'a été reporté à ce jour. Le traitement combinant une pénicilline à d'autres antibiotiques reste donc pour le moment efficace contre les infections à *Sgg* (Leclercq et al., 2005).

### **B. *S. gallolyticus*, une bactérie commensale de l'intestin des animaux**

#### **1. Un commensal des animaux**

*Sgg* a été retrouvé comme commensal chez la vache, le koala, le kangourou, les marsupiaux, le cheval, les cochons, etc ... (Osawa et al., 1995). Ces animaux consomment tous des tanins, un métabolite secondaire produit en grande quantité par les plantes qui possèdent aussi des propriétés antimicrobiennes. Les tanins, bien qu'ayant des effets positifs à faible dose, présentent des effets négatifs chez les animaux qui les consomment en grande quantité (perturbations de la digestion, diminutions de la prise alimentaire, de la prise de poids, de la production de lait, de la pousse de la laine, ...) (Min et al., 2003; Mueller-Harvey, 2006; Naumann et al., 2017).

*Sgg* est résistant aux tanins, (Scalbert, 1991), et est capable de les dégrader en acide gallique grâce à une tannase puis en pyrogallol par l'action d'une gallate décarboxylase, ce qui lui a donné son nom de *Streptococcus gallolyticus* (Jiménez et al., 2014). Il a donc été suggéré

que *Sgg* joue un rôle essentiel en tant que commensal chez les herbivores ayant un régime riche en tanins pour dégrader ces composés qui peuvent être néfastes à forte dose. Une étude a montré que l'utilisation de *Sgg* comme probiotique favorisait la croissance de chèvres nourries principalement avec des feuilles de chêne, qui sont particulièrement riches en tanins (Kumar et al., 2014).

## **2. Une bactérie adaptée à l'environnement intestinal**

Afin de mieux connaître l'ensemble des caractéristiques de *Sgg*, le séquençage complet du génome de plusieurs souches a été réalisé. Aujourd'hui, les génomes complets de 7 souches de *Sgg* sont disponibles sur la base de données du NCBI. Le génome de la souche UCN34 isolée d'un patient français atteint d'une endocardite à *Sgg* associée à un cancer colorectal, fut le premier entièrement séquencé en 2010 (Rusniok et al., 2010) et a permis d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans l'adaptation de *Sgg* à l'environnement intestinal.

### **Capacités métaboliques**

*Sgg* possède des gènes codant des enzymes impliquées dans la dégradation de polysaccharides de stockage d'origine végétale (amidon, inuline, lévane, ...), de polysaccharides insolubles retrouvés dans la paroi des cellules végétales (cellulose, pectines) ainsi que des glucides dont le mannitol, produit important de la photosynthèse chez les plantes (Lin et al., 2011; Rusniok et al., 2010). Ces analyses confortent donc les hypothèses sur le rôle important de *Sgg* dans la digestion des herbivores et son adaptation à leur environnement intestinal.

### **Résistance aux conditions hostiles**

En plus de résister aux tanins, *Sgg* est capable de résister aux acides biliaires (Chuard and Reller, 1998), qui sont des détergents sécrétés dans l'intestin facilitant la digestion des graisses et aux propriétés antimicrobiennes. Comme beaucoup de bactéries intestinales *Sgg* possède le gène *bsh* codant pour une choloylglycine hydrolase permettant de dégrader les acides biliaires, qui présente 63% d'identités avec la BSH décrite chez *Listeria monocytogenes* dont le rôle dans la résistance aux acides biliaires a été clairement démontré (Dussurget et al., 2002).

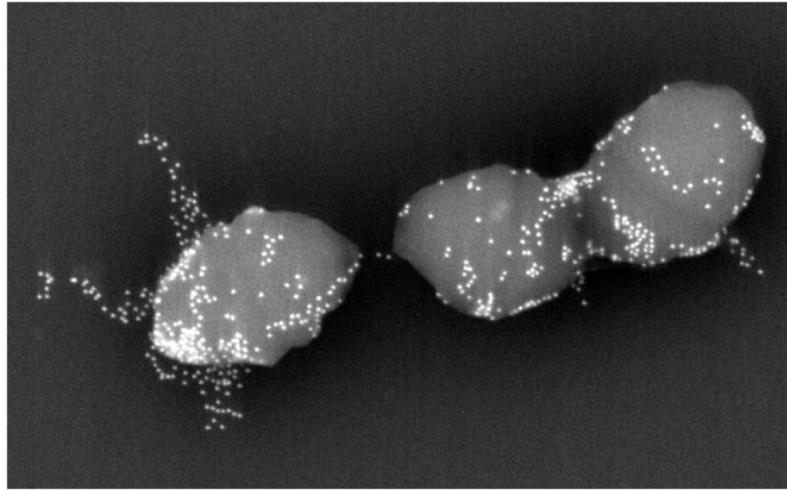


Figure 5 : Cliché de microscopie électronique à balayage de *Sgg* UCN34 où les pili Pil3 sont marqués spécifiquement par immunomarquage  
Crédit photo : Adeline Mallet.

## **Attachement aux cellules intestinales**

Trois opérons codants pour des pili : *pil1*, *pil2* et *pil3*, ont été identifiés dans le génome de *Sgg* UCN34 (Rusniok et al., 2010). Les pili sont de longs appendices exposés à la surface bactérienne et qui sont principalement impliqués dans la mobilité et l'attachement des bactéries à des surfaces. Il a été montré que le pilus Pil3 (Figure 5) a la capacité de se lier au mucus produit par les cellules calciformes (« goblet cells ») du tractus intestinal. Cette liaison permet à *Sgg* d'être retenu dans le côlon et est donc essentielle pour sa colonisation, comme cela a été montré dans un modèle murin (Martins et al., 2015). Curieusement, une protéine similaire aux histones nommée HlpA localisée à la surface bactérienne se lie aux héparanes sulfate protéoglycane présent à la surface des cellules intestinales (Boleij et al., 2009).

## **Évolution et adaptation aux conditions intestinales**

Des analyses comparatives de génomes montrent que certains gènes impliqués dans l'adaptation de *Sgg* aux conditions intestinales ont été acquis par transfert horizontal de gènes provenant d'autres Firmicutes du microbiote intestinal comme les entérocoques, lactobacilles ou clostridies (Lin et al., 2011; Rusniok et al., 2010). Ce transfert de gènes a pu être facilité par la capacité potentielle de *Sgg* à entrer dans un état de compétence naturelle, dans lequel la bactérie devient capable d'internaliser de l'ADN exogène et de l'intégrer à son génome par recombinaison homologue. En effet, *Sgg* possède tous les gènes nécessaires au développement de la compétence qui a déjà été observée chez d'autres bactéries du groupe *S. bovis* comme *S. infantarius* et *Sgm* (Morrison et al., 2013).

### **C. *S. gallolyticus*, un pathogène opportuniste**

#### **3. Épidémiologie des infections causées par *S. gallolyticus***

##### **Les infections à *Sgg* chez les animaux**

En plus d'être un commensal, *Sgg* est un pathogène opportuniste chez les animaux. En effet, il a été impliqué dans des septicémies chez le pigeon (De Herdt et al., 1992) et les poulets (Chadfield et al., 2007) et dans des mammites chez les bovins (Garvie and Bramley, 1979).

## ***Sgg* comme commensal humain**

Chez l'Homme, *Sgg* a été retrouvé comme commensal asymptomatique chez 2,5 à 15% de la population (Burns et al., 1985; Klein et al., 1977; Murray and Roberts, 1978; Sabbaj et al., 1971). Une étude récente où la présence de *Sgg* a été testée par PCR quantitative chez 99 volontaires en bonne santé a montré un taux de portage intestinal beaucoup plus élevé avec 62,5% de personnes positives à *Sgg* (Dumke et al., 2017). Cette différence peut s'expliquer par le fait que la plupart des études précédentes avaient été réalisées par des méthodes de cultures sélectives moins sensibles que la PCR quantitative. Ces résultats suggèrent donc que *Sgg* pourrait être un commensal fréquemment retrouvé dans le microbiote de l'Homme.

## ***Sgg* comme pathogène de l'Homme**

Chez l'Homme, *Sgg* peut aussi être un pathogène opportuniste responsable de septicémies et d'endocardites, principalement chez des sujets âgés ou immunodéprimés (Duval et al., 2001; Lazarovitch et al., 2013; Ruoff et al., 1989). Bien que quelques endocardites soient dues à *Sgp*, la majorité d'entre elles sont dues à *Sgg* qui est donc la sous-espèce principale de *S. gallolyticus* associée à des endocardites (Corredoira et al., 2008; Ruoff et al., 1989).

Auparavant, les streptocoques oraux du groupe viridans et les staphylocoques étaient les causes majeures d'endocardites. Les endocardites à *Sgg* sont une maladie émergente depuis les années 1990 et *Sgg* est aujourd'hui une cause majeure d'endocardite à streptocoques, particulièrement dans les pays du sud de l'Europe (France, Espagne, Italie) (Corredoira et al., 2008; Hoen et al., 2005). Bien que les raisons exactes de cette émergence ne soient pas connues, il est possible que le vieillissement de la population en soit responsable puisque les endocardites infectieuses à *Sgg* surviennent chez des sujets plus âgés que celles dues aux streptocoques oraux.

En plus de l'âge, le mode de vie rural constitue un facteur de risque au développement d'une endocardite à *Sgg* (Giannitsioti et al., 2007). Les personnes vivant à la campagne étant plus susceptibles d'être en contact avec des animaux, il a été suggéré qu'une transmission de l'animal à l'Homme pouvait expliquer ce résultat. En 2017, Dumke et coll. n'ont pas observé de lien entre la présence de *Sgg* dans l'intestin de personnes saines et le lieu de résidence, rural ou urbain. Cependant, ils ont montré que les personnes ayant des contacts rapprochés avec des animaux étaient plus susceptibles d'être porteurs sains de *Sgg*, confortant ainsi l'hypothèse d'une transmission zoonotique de l'animal à l'Homme.

#### 4. Facteurs de virulence de *Sgg*

Plusieurs étapes sont nécessaires pour que *Sgg* passe de l'état de commensal de l'intestin à celui de pathogène causant des endocardites. En effet, la bactérie doit tout d'abord franchir la barrière intestinale, passer dans le sang, survivre au système immunitaire, atteindre le cœur, s'attacher aux valves cardiaques lésées et s'y multiplier. Ceci est rendu possible par des facteurs de virulence exprimés par *Sgg* qui pourraient faciliter ces différentes étapes.

##### Les pili

Le pilus Pil1 est capable de se lier fortement aux collagènes de type I et IV notamment. Le collagène de type I est un composant structural interne des valves cardiaques qui se retrouve exposé lorsque les valves sont lésées ou endommagées. Il a été montré que Pil1 joue un rôle clé dans l'attachement et les étapes précoces initiant l'endocardite infectieuse dans un modèle d'endocardite chez le rat (Danne et al., 2011). Pil1 est aussi capable de se lier au facteur de coagulation XII, perturbant la cascade d'activation de la coagulation et ainsi favorisant le développement d'endocardites (Isenring et al., 2018).

Quant au rôle du pilus Pil2, il n'a pas encore été étudié chez *Sgg*. Contrairement à Pil1 et Pil3 qui sont des opérons très conservés dans les différentes souches de *Sgg* séquencées, Pil2 apparaît plus variable d'une souche à l'autre et est peu exprimé *in vitro* dans la souche UCN34 (données de RNAseq non-publiées).

Bien que jouant un rôle clé dans l'adhésion et la colonisation de l'hôte, les pili sont des structures de surface qui constituent des cibles de choix pour la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Il a notamment été montré que les mutants de *pil1* et *pil3* résistent mieux à la phagocytose par les macrophages que la souche sauvage (Danne et al., 2014; Isenring et al., 2018). D'ailleurs il a été montré que l'expression de *pil1* est hétérogène dans la population de *Sgg* UCN34, probablement pour limiter l'activation du système immunitaire. En effet, environ 2/3 des cellules expriment faiblement *pil1* tandis que le 1/3 restant de la population l'exprime fortement grâce à un mécanisme original de variation de phase et d'atténuation transcriptionnelle (Danne et al., 2014). Le même mécanisme de régulation contrôle l'expression du pilus *pil3*.

Le pilus Pil3 est capable de se lier au mucus et ainsi favoriser la colonisation du côlon dans un modèle murin (Martins et al., 2015). Pil3 est également capable de se fixer au fibrinogène, une

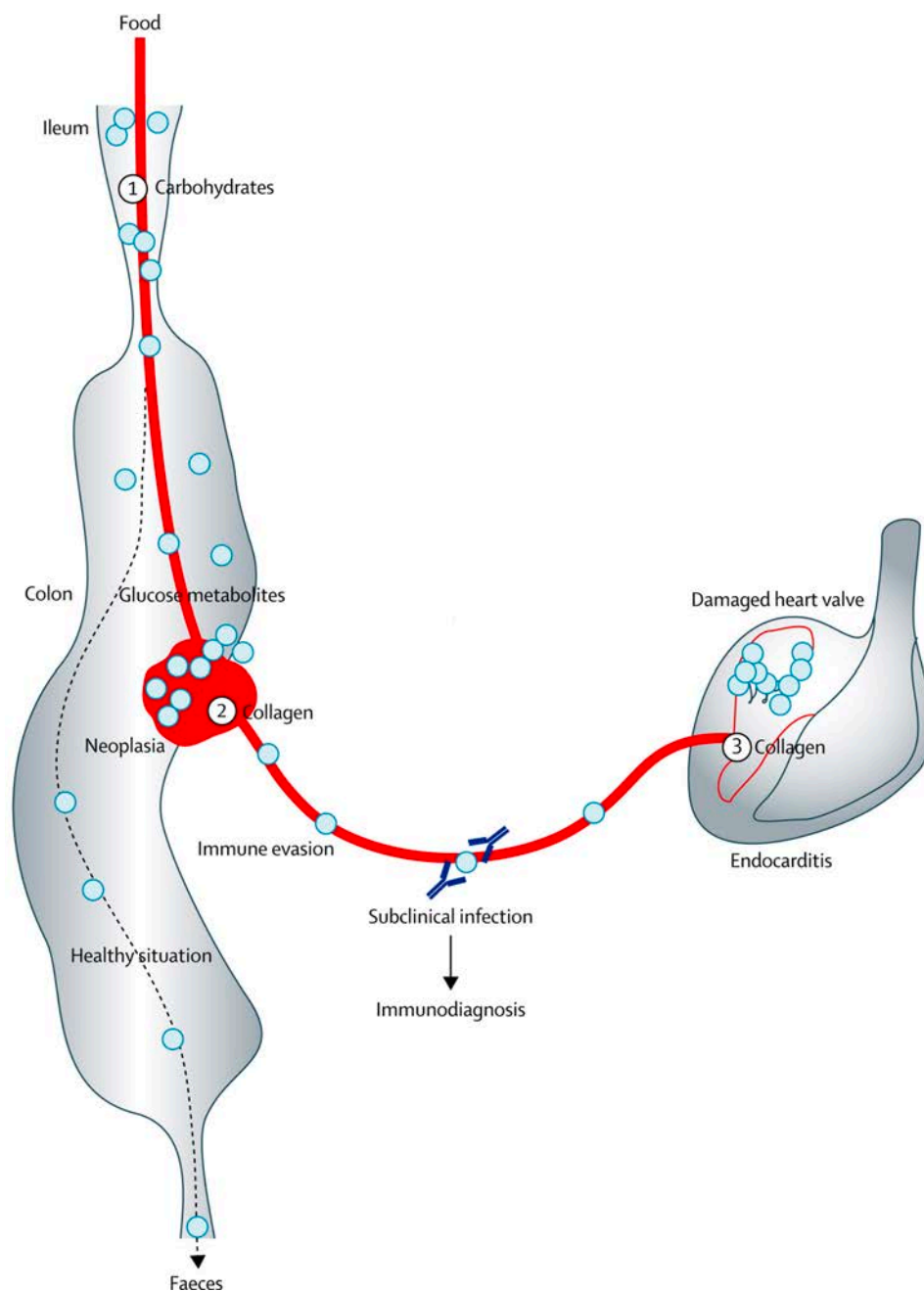


Figure 6 : Modèle représentant les différentes étapes de l'infection à *Sgg*

Chez l'individu sain, *Sgg* peut être présent dans le côlon mais est concurrencé par le microbiote et évacué par les selles (ligne en pointillés). Cependant, *Sgg* franchit parfois la barrière intestinale et se retrouve dans la circulation sanguine où il doit survivre au système immunitaire avant d'atteindre le cœur et de se développer sur les valves cardiaques lésées ou endommagées (ligne rouge). La présence d'une tumeur pourrait faciliter la colonisation du côlon par *Sgg*, ou entraîner des modifications de l'épithélium facilitant sa translocation dans le sang. Adapté de (Boleij and Tjalsma, 2013).

molécule présente dans le plasma sanguin et qui joue un rôle clé dans le contrôle de l'hémostase et la coagulation (Martins et al., 2016).

Enfin, il a été montré que l'expression hétérogène de *pil3* facilite la translocation de *Sgg* UCN34 à travers l'épithélium intestinal (Martins et al., 2020). Ces résultats sont en accord avec des travaux précédents montrant que *Sgg* a la capacité particulière de franchir une barrière intestinale de cellules Caco-2 par une voie paracellulaire (Boleij et al., 2011b). Ce franchissement n'induit pas de réponse pro-inflammatoire IL-8 et IL-1 $\beta$  comparé à d'autres bactéries comme par exemple *E. faecalis* (Boleij et al., 2011b). Cette caractéristique permettrait à *Sgg* d'échapper aux macrophages de la *lamina propria* et augmenterait ses chances d'atteindre le cœur et causer une endocardite. Un schéma récapitulant les principales étapes de l'infection par *Sgg* a été proposé (Figure 6) (Boleij and Tjalsma, 2013).

### **La capsule**

La capsule est un facteur de virulence présent chez la majorité des bactéries pathogènes extracellulaires. Elle empêche l'opsonisation des bactéries par le système alternatif du complément (Hyams et al., 2010). C'est donc tout naturellement l'un des premiers composants qui a été recherché chez *Sgg*. La production de polysaccharides extracellulaires, composant majeur des capsules bactériennes, a pu être observée dans des milieux de culture spécifique (De Herdt et al., 1992; Garvie and Bramley, 1979). Douze gènes codant pour des enzymes similaires à celles responsables de la synthèse des polysaccharides capsulaires chez d'autres streptocoques ont ensuite été identifiés dans le génome de *Sgg* UCN34 (Rusniok et al., 2010).

Un mutant non capsulé a été construit au laboratoire appelé  $\Delta cpsD$  (*gallo\_0947*) et il a été montré que celui-ci est plus sensible à la phagocytose et moins résistant dans le sang que la souche sauvage UCN34 (Isenring et al., 2018).

### **Antigène sialyl-Lewis**

Il a aussi été rapporté que des souches cliniques de *Sgg* expriment l'antigène sialyl-Lewis à leur surface. L'antigène sialyl-Lewis est un oligosaccharide exprimé à la surface des leucocytes humains et impliqué dans la liaison à l'endothélium. Il est exprimé par d'autres pathogènes responsables d'endocardites et pourrait favoriser l'adhésion de ces bactéries à



l'endothélium des vaisseaux sanguins (Hirota et al., 1996). Cette étude a été réalisée sur un très petit nombre de souches du Japon et ces résultats n'ont pas été reproduits au laboratoire en utilisant les souches cliniques européennes de *Sgg* par exemple UCN34.

## **D. Association des infections à *S. gallolyticus* avec le cancer colorectal**

### **1. Le cancer colorectal**

Le cancer colorectal (CCR) est une maladie touchant des millions de personnes dans le monde et responsable de centaines de milliers de morts chaque année. En 2018, 1,8 millions de nouveaux cas de CCR ont été recensés et 880 000 personnes sont décédées des suites d'un CCR selon le « Global Cancer Observatory » (<https://gco.iarc.fr/>).

Le cancer colorectal est avant tout une maladie génétique qui se développe au fil des années par l'apparition de mutations génétiques et épigénétiques selon un ordre précis connu comme la séquence adéno-carcinome (Brenner et al., 2014). Bien que des prédispositions génétiques familiales favorisent l'apparition de ce cancer (polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Lynch), la plupart des cas de CCR sont sporadiques (80%). Il a aussi été établi que d'autres facteurs comme les maladies provoquant une inflammation du tube digestif (maladie de Crohn, colite ulcéreuse), la consommation excessive d'alcool ou de viande rouge, le tabac, l'obésité et le diabète constituent des facteurs de risque de développement d'un CCR (Brenner et al., 2014).

En plus de ces facteurs, des études récentes pointent le rôle du microbiote intestinal dans le développement du CCR (Sears and Garrett, 2014; Zitvogel et al., 2015; Janney et al., 2020). Le côlon est un organe hébergeant une très grande diversité bactérienne. Ce microbiote contribue au maintien de l'homéostasie intestinale et constitue une barrière contre les agents pathogènes. Une étude princeps a montré que des souris axéniques (sans flore microbienne) développaient moins de tumeurs colorectales chimiquement induites que le groupe de souris contrôle avec une flore microbienne conventionnelle (Weisburger et al., 1975). De nombreuses études ont corroboré ces résultats et ont démontré que les patients ayant développé un CCR présentent une dysbiose colique à l'aide du séquençage de l'ARNr 16S. On retrouve trois phylums majoritaires dans la composition du microbiote colique normal humain : les Firmicutes (30-50%), les Bacteroidetes (20-40%) et les Actinobacteria (1-10%). Mais chez les patients atteints de CCR, ce microbiote peut alors être composé de bactéries passagères, comme

*Sgg*, *Bacteroides fragilis*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Fusobacterium*, *E. coli* pks+ qui tirent profit de l'environnement tumoral pour proliférer ou qui pourraient favoriser le développement du cancer (Wong and Yu, 2019). Cependant il est difficile de démontrer le rôle d'une seule bactérie comme cause étiologique du CCR parmi cette communauté bactérienne complexe, comme cela a été démontré dans le cas d'*Helicobacter pylori* pour le cancer de l'estomac (Polk and Peek, 2010).

## **2. *Sgg* et cancer colorectal**

Le premier cas d'association entre une endocardite à streptocoque et un CCR a été observé en 1951 (McCOY and Mason, 1951). Les données épidémiologiques soutenant cette association se sont ensuite multipliées au fil des années, d'abord entre les infections à *S. bovis* et le CCR puis plus précisément entre les infections à *Sgg* et le CCR (Boleij et al., 2011a). Une étude bibliographique sur une période de 40 ans (1970-2010) a montré que 60% des personnes atteintes d'une infection à *Sgg* possédaient un adénome ou un carcinome au niveau du côlon (Boleij et al., 2011a). L'infection invasive à *Sgg* survient souvent alors que le CCR est à un stade précoce (adénome) et souvent asymptomatique de la maladie (Corredoira et al., 2008, 2017). Dans une étude récente, il a été montré que sur 204 patients âgés de 67,8 ans en moyenne et ayant eu une infection à *Sgg* suivie d'une coloscopie dans trois hôpitaux différents en Espagne, 50,5% avaient un adénome et 12,2% un carcinome (Corredoira et al., 2017). Des recommandations ont été émises auprès des hôpitaux pour procéder à une coloscopie chez tous les patients ayant développé une infection invasive à *Sgg* afin de tester la présence d'un CCR de façon systématique (Ferrari et al., 2008), la détection précoce d'un CCR étant un facteur critique pour augmenter le taux de guérison de ce cancer.

Bien que l'association entre les infections à *Sgg* et le cancer colorectal soit clairement établie, les raisons de cette association ne sont pas complètement élucidées. Plusieurs études suggèrent que *Sgg* est capable d'accélérer le développement du CCR tandis que d'autres pointent les avantages que les conditions tumorales confèrent à *Sgg*.

## **3. *Sgg* favorise le développement du cancer colorectal**

En 2017, Kumar et coll. ont montré *in vitro* que *Sgg* TX20005 augmente la prolifération

des cellules issues de cancer du côlon HCT116, HT29 et LoVo. Aucun effet n'a cependant été observé sur les lignées SW480, SW1116 issues de cancer de côlon humain, ni sur les lignées coloniques non-cancéreuses (FHC, CCD 841 CoN), ni sur d'autres lignées cellulaires comme les cellules HEK293 issues de cancer du rein ou sur les cellules A549 provenant d'un cancer du poumon. Ces résultats suggèrent que *Sgg* est capable d'augmenter la prolifération des cellules seulement dans des contextes cellulaires très particuliers. Cette prolifération est spécifique de la sous-espèce *Sgg* puisque cet effet n'a pas été observé avec les sous espèces *Sgm* et *Sgp* et requiert un contact intime entre *Sgg* et les cellules (Kumar et al., 2017, 2018). L'effet pro-tumoral de *Sgg* TX20005 fut confirmé *in vivo* dans un modèle murin de cancer colorectal dans lesquelles le nombre et la taille des tumeurs étaient plus importants lorsque celles-ci étaient gavées avec *Sgg* comparé à des souris contrôles gavées avec *Lactococcus lactis*, une bactérie considérée comme non pathogène. A la fois *in vitro* et *in vivo*, le niveau de  $\beta$ -caténine était augmenté dans les cellules exposées à *Sgg*. L'activation de la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine jouant un rôle important dans l'apparition de certains cancers (Shang et al., 2017) il a été suggéré que *Sgg* augmentait la prolifération cellulaire en activant cette voie, favorisant ainsi le développement du CCR (Kumar et al., 2017). De plus en analysant par PCR quantitative la présence de *Sgg* dans 148 tumeurs du côlon et 128 tissus sains associés, les auteurs ont détecté *Sgg* dans 74% des tumeurs et 47% des tissus sains.

Une autre étude menée en Malaisie a montré que la colonisation des tumeurs coliques par *Sgg* était associée à l'augmentation de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1, COX-2 et l'IL-8 (Abdulmir et al., 2010). *Sgg* pourrait donc aussi jouer un rôle dans le développement du CCR en ayant un effet pro-inflammatoire au niveau du côlon, l'inflammation étant un facteur de risque important dans l'apparition du CCR.

Une étude récente suggère que *Sgg* pourrait aussi avoir un rôle indirect dans le développement du CCR en dégradant les tanins présents dans l'intestin (Oehmcke-Hecht et al., 2020). Présents dans le régime alimentaire de l'Homme (fruits, thé, café, vin), il a en effet été montré que les tanins pouvaient avoir des propriétés anti-tumorales en inhibant spécifiquement la croissance des cellules tumorales ou en diminuant l'inflammation (Al-Ayyoubi and Gali-Muhtasib, 2007; Al-Halabi et al., 2011). *Sgg* étant une des rares bactéries capables de dégrader très efficacement les tanins, il est possible que cette dégradation diminue les effets protecteurs des tanins et favorisent ainsi l'apparition du CCR.

#### 4. L'environnement tumoral favorise le développement de *Sgg*

Pour causer une bactériémie puis une endocardite, *Sgg* doit passer du côlon à la circulation sanguine. Pour ce faire, *Sgg* doit traverser l'épithélium intestinal qui forme une couche de cellules imperméable dont l'une des fonctions est d'empêcher le passage de bactéries du microbiote dans le reste de l'organisme. Cet épithélium est recouvert de deux couches de mucus protectrices, constituées principalement de la mucine MUC2, empêchant l'interaction directe entre les bactéries et les cellules de l'épithélium (Johansson et al., 2013). Le développement d'un CCR entraîne des perturbations physiques de l'épithélium qui pourraient perturber son intégrité ou diminuer l'épaisseur de la couche de mucus qui le recouvre, deux facteurs susceptibles de favoriser la translocation de *Sgg* vers la circulation sanguine. De plus, il a été montré que la mucine MUC5AC, absente du côlon sain, devient l'une des mucines prédominantes dans le mucus en présence d'un CCR (Bartman et al., 1999; Sylvester et al., 2001). Le pilus Pil3 de *Sgg* est capable de se lier à la fois aux mucines MUC2 et MUC5AC (Martins et al., 2015, 2016) et est donc adapté à la colonisation du mucus sain et du mucus en conditions tumorales. Si les autres bactéries du microbiote ne se fixent que sur la mucine MUC2, la présence de MUC5AC en conditions tumorales pourrait procurer un avantage de colonisation à *Sgg* dans ces conditions. Les cellules tumorales du côlon expriment aussi un niveau plus élevé de collagène de type IV (Skovbjerg et al., 2009) qui pourrait favoriser la liaison de *Sgg* par l'intermédiaire de Pil1 (Danne et al., 2011).

Il a aussi été suggéré que les métabolites générés par des cellules tumorales pourraient favoriser la croissance de *Sgg*. *In vitro*, *Sgg* pousse en effet mieux dans un milieu conditionné dans lequel les cellules Caco-2 (isolées d'un adénocarcinome humain) ont été cultivées, comparé à d'autres bactéries intestinales. L'augmentation de la glycolyse dans les cellules tumorales comme les cellules Caco-2 pourrait entraîner le relargage de produits dérivés de la glycolyse, tels que le fructose-6-phosphate et le glycerate-3-phosphate qui semblent favoriser la prolifération de *Sgg* dans ce milieu conditionné (Aymeric and Dramsi, 2018; Boleij et al., 2012).

En 2018, une étude clé de notre laboratoire a permis de montrer que *Sgg* colonise mieux le côlon de la souris ayant développé un CCR que le côlon sain, comme cela a été observé chez l'Homme (Aymeric et al., 2018). Cette colonisation préférentielle était due à l'action de la gallocine, une bactériocine capable de tuer les entérocoques commensaux de la souris et donc de favoriser la colonisation de *Sgg*, uniquement en conditions tumorales. L'activité bactéricide

de la gallocline nécessite la présence de détergents comme les acides biliaires secondaires, des métabolites présents en grande quantité dans le côlon. Dans le modèle génétique de cancer colorectal murin utilisé par Aymeric et coll., la mutation du gène suppresseur de tumeurs *apc* (*adenomatous polyposis coli*) qui est retrouvée dans 80% des CCR, a été corrélée à une diminution de l'expression d'un transporteur des acides biliaires secondaires (Slc10A2) au niveau de l'iléon et du côlon, et à une augmentation luminale d'acide deoxycholique (DCA) et d'acide lithocholique (LCA), les deux principaux acides biliaires secondaires, suggérant que les conditions tumorales augmentent l'activité de la gallocline.

## II. Diversité des bactériocines des bactéries à Gram-positif

Au fil de l'évolution, les bactéries ont développé un arsenal de molécules antimicrobiennes leur permettant de se combattre mutuellement. Cet arsenal comprend :

- Les antibiotiques : principalement produits par des bactéries du genre *Streptomyces* et d'autres actinomycètes (de Lima Procópio et al., 2012).
- Les systèmes de sécrétion, permettant aux bactéries d'injecter des toxines létales dans les bactéries cibles comme les système de sécrétion de type VI et VII (Coulthurst, 2019; Whitney et al., 2017).
- Les systèmes d'inhibition contact dépendants, capables de se lier à un récepteur sur les bactéries cibles pour y délivrer une toxine (Ruhe et al., 2013; Willett et al., 2015).
- Les bactériocines, des peptides sécrétés par des bactéries ayant une activité antimicrobienne.

Alors que les systèmes de sécrétion et les systèmes d'inhibition contact dépendant requièrent un contact avec la bactérie cible pour exercer leur activité antimicrobienne, les antibiotiques et les bactériocines sont des molécules sécrétées pouvant exercer cette activité à distance.

La découverte et l'utilisation des antibiotiques a permis de réduire considérablement le nombre de morts causés par les infections bactériennes et de sauver un nombre incalculable de vies. Les bactériocines ont quant à elles été utilisées comme conservateurs alimentaires naturels pour limiter l'apparition de pathogènes alimentaires. L'augmentation du nombre de bactéries résistantes aux antibiotiques observée ces dernières décennies a provoqué un regain d'intérêt

pour les bactériocines. En effet, elles pourraient servir d'alternative ou de complément aux traitements antibiotiques actuels pour limiter l'apparition et l'impact des bactéries résistantes aux antibiotiques sur la santé humaine (Cotter et al., 2013).

### **A. Définition et généralités sur les bactériocines**

Les bactériocines sont des peptides ou des protéines synthétisés par le ribosome des bactéries et qui ont une activité antibactérienne une fois sécrétés. Le spectre d'action des bactériocines est généralement étroit, tuant des bactéries apparentées à la bactérie productrice qui est protégée de sa propre bactériocine par une protéine d'immunité. Les gènes codant pour les bactériocines peuvent se trouver sur le chromosome mais aussi sur des plasmides ou à l'intérieur de transposons (Cotter et al., 2005).

La première observation d'activité antagoniste entre deux bactéries, possiblement due à une bactériocine, remonte à 1877 quand Louis Pasteur et Jules Joubert ont décrit l'activité antimicrobienne de souches de bactéries « communes » contre *Bacillus anthracis* (Pasteur and Joubert, 1877). Cet antagonisme fut à l'époque expliqué par la consommation d'un élément essentiel par la bactérie compétitrice. C'est le Dr. Garré, en 1887, qui suggéra la présence d'agents antimicrobiens diffusibles produits par les bactéries et actifs seulement contre quelques bactéries cibles. Il réalisa notamment un test très semblable à ceux utilisés aujourd'hui pour détecter la présence d'une bactériocine en montrant que la croissance du « *Staphylococcus pyogenes* » est inhibée lorsqu'il est cultivé sur la même gélose et à quelques millimètres du « bacille fluorescent » (Garré, 1888).

Les premières bactériocines proprement caractérisées furent les colicines, produites par *Escherichia coli*, dont la première identification remonte à 1925 (Gratia, 1925). Le terme bactériocine fut créé pour désigner l'ensemble des colicines (Jacob et al., 1953), avant d'être généralisé pour désigner toutes les molécules bactéricides produites par les bactéries et possédant une partie protéique (Tagg et al., 1976). Aujourd'hui les bactériocines sont définies comme des peptides antimicrobiens synthétisés par le ribosome des bactéries (Cotter et al., 2005).

### **B. Diversité et identification des bactériocines**

La production de bactériocines est un trait extrêmement répandu qui a été observé chez

la plupart des espèces bactériennes testées (Riley, 1998) et il a été montré que l'analyse d'un nombre suffisant de souches d'une espèce bactérienne résultait presque systématiquement en l'identification d'une bactériocine (Tagg et al., 1976). De plus, un nombre indéfini de bactériocines restent indétectables puisque leur identification se base principalement sur des tests phénotypiques de compétition entre bactéries dans des conditions données dans lesquelles les bactériocines ne sont pas forcément exprimées. Il a même été proposé que la quasi-totalité des bactéries isolées de communautés bactériennes naturelles produisent des bactériocines (Tagg, 1992). La macédocine, une bactériocine produite par une souche de *Sgm* isolée d'un fromage grec, montre bien la difficulté pour trouver les conditions expérimentales d'expression d'une bactériocine puisque celle-ci n'est produite que lorsque la bactérie est cultivée dans du lait écrémé supplémenté d'une source d'azote (Georgalaki et al., 2002).

A ce jour, des centaines de bactériocines ont été décrites et des bases de données comme Bactibase ou BAGEL4 ont pour but d'en référencer un maximum (Hammami et al., 2007; van Heel et al., 2018). Une grande partie des bactériocines référencées sur ces bases de données ont été identifiées dans l'ordre des Lactobacillales (qui inclue les genres *Lactococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus*).

Dans le but d'identifier plus facilement les gènes codant pour des bactériocines et de connaître leur répartition au sein des espèces bactériennes, des analyses bioinformatiques ont été réalisées. Cependant, la diversité et la petite taille des gènes codant les bactériocines rendent souvent ces analyses difficiles. Des logiciels comme BAGEL et BOA permettent l'identification de nouvelles bactériocines putatives en se basant notamment sur le contexte génétique de part et d'autre des gènes codant les bactériocines. En effet, on y trouve tous les gènes accessoires nécessaires à la production de la bactériocine (régulateurs, transporteurs, immunité, modificateurs) qui sont plus faciles à identifier que les gènes structuraux codant pour la bactériocine et sont de bons indicateurs de leur présence (van Heel et al., 2013; de Jong et al., 2006; Morton et al., 2015). De plus, BAGEL utilise en parallèle la reconnaissance de motifs retrouvés dans la séquence protéique de bactériocines connues. On peut citer en exemple l'étude de Alvarez-Sieiro et coll. qui ont identifié 785 clusters de gènes codant des bactériocines à partir de 238 génomes bactériens de 10 genres différents en utilisant le logiciel BAGEL3. Ces clusters étaient particulièrement abondants chez les streptocoques et les lactobacilles qui en contenaient respectivement 4,8 et 3,5 par génome en moyenne (Alvarez-Sieiro et al., 2016).

Tableau 2 : Classification des bactériocines des bactéries à Gram-positif

Classes	Sous classes	Caractéristiques principales	Exemples
Classe I : Les lantibiotiques	A : Linéaires	Contiennent les acides aminés modifiés lanthionine et/ou méthyllanthionine	Nisine, Subtiline
	B : Globulaires		Mersacidine
	C : à deux peptides		Lacticine 3147
Classe II : Les petites bactériocines non modifiées	IIa : apparenté à la pédiocine	Boite pédiocine (YGNGV/L) dans la partie N-terminale	Pédiocine PA-1, Entéroccine A
	IIb : à deux peptides	Contenant souvent des motifs GxxxG	Lactococcine G, Plantaricines EF et JK
	IIc : autres (ni IIa, ni IIb)	Peptides seuls, non-pédiocine. Classe très diversifiée	Lactococcine A, Divergicine A, Entéroccine Q
Classe III : Les bactériocines de grande taille (>10kDa)	Lytiques	Dégrade le peptidoglycane et provoque la lyse des bactéries cibles	Lysostaphine
	Non-lytiques	Inhibe la croissance sans provoquer la lyse	Helveticines J et M
Classe IV : Les bactériocines cycliques	-	Présence d'une liaison entre les acides aminés N- et C-terminaux	Entéroccine AS-48



### **C. Rôle des bactériocines**

Pour être aussi répandue chez les bactéries, la production de bactériocine doit jouer un rôle important. Le premier et probablement le plus évident est celui de donner un avantage compétitif à la bactérie productrice contre les bactéries sensibles à la bactériocine. Le spectre d'action étroit des bactériocines suggère que leur production permet de tuer des bactéries semblables (fratricidie) ou phylogénétiquement proches, qui consomment probablement les mêmes éléments nutritifs du milieu. Ainsi, il a été suggéré que les bactériocines permettent la colonisation ou la défense de niches écologiques spécifiques (Dobson et al., 2012). Cette production pourrait être particulièrement importante dans des milieux à forte densité microbienne comme le tractus intestinal. Il a notamment été montré que la production d'une bactériocine par une souche d'*E. faecalis* lui permet de coloniser l'intestin de la souris en remplaçant les entérocoques commensaux (Kommineni et al., 2015).

Chez les bactéries naturellement compétentes comme *S. pneumoniae* et *S. mutans*, la production de bactériocine est couplée au développement de la compétence naturelle (Shanker and Federle, 2017). Il a été proposé que l'expression coordonnée des bactériocines et de la compétence permet de tuer les bactéries cibles, libérer leur ADN dans le milieu et ainsi d'acquérir de nouveaux gènes potentiellement bénéfiques (Kreth et al., 2005; Salvadori et al., 2019).

Lorsque les gènes codant pour des bactériocines sont localisés sur des plasmides ou des transposons, il est possible que celles-ci jouent un rôle dans le maintien de ces éléments génétiques. En effet, au sein d'une population bactérienne contenant un plasmide codant pour la bactériocine et sa protéine d'immunité, toute bactérie perdant le plasmide devient sensible à la bactériocine et est donc tuée si la bactérie se trouve dans des conditions où la bactériocine est produite (Heng et al., 2007).

### **D. Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif**

Les bactériocines diffèrent par leurs séquences, leurs structures tridimensionnelles, les protéines accessoires nécessaires à leur production et leurs modes d'action. Cette grande diversité rend leur classification difficile mais permet tout de même de distinguer plusieurs grandes classes de bactériocines. Heng et coll. (2007) ont proposé une classification divisant les bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif en 4 classes (Tableau 2) :

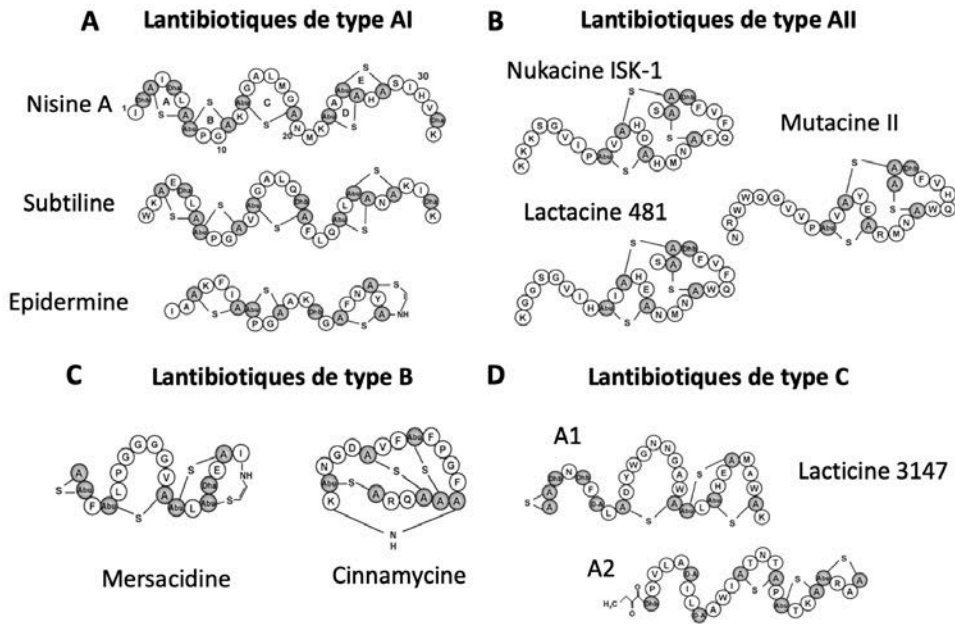


Figure 7 : Structure et classification des différents types de lantibiotiques

Les lantibiotiques de type AI ont une structure linéaire, ceux de type AII ont une partie linéaire et une autre globulaire, ceux de type B sont globulaires et ceux de type C sont constitués de deux peptides. Dha : Déhydroalanine ; Dhb : Déhydrobutyryne ; A-S-A : lanthionine ; Abu-S-A : méthyllanthionine. Adapté de Nagao et al. (2006).

	1	10	20	30	40
<b>Sous-groupe 1</b>					
Entéroïcine A	T	T	H	S	G
Diverïcine V41	K	F	Y	G	N
Diverïcine M35	T	K	F	Y	G
Coaguline	K	Y	G	N	G
Pédiocine PA-1	K	Y	G	N	G
Piscicocine CS526	K	Y	G	N	G
Sakacine P	K	Y	G	N	G
Listériocine 743A	K	Y	G	N	G
Mundticine KS	K	Y	G	N	G
Mundticine	K	Y	G	N	G
Piscicoline 126	K	Y	G	N	G
Sakacine 5X	K	Y	G	N	G
Leucocine C	K	Y	G	N	G
<b>Sous-groupe 2</b>					
Lactococine MMFII	T	S	Y	G	N
Leucocine A	K	Y	G	N	G
Mésentéricine Y105	K	Y	G	N	G
Sakacine G	K	Y	G	N	G
Plantaricine C19	K	Y	G	N	G
Plantaricine 423	K	Y	G	N	G
<b>Sous-groupe 3</b>					
Curvacine A	A	R	S	Y	G
Carnobactériocine BM1	A	I	S	Y	G
Entéroïcine P	A	T	R	S	Y
<b>Sous-groupe 4</b>					
Bactériocine 31	A	T	Y	G	N
Bactériocine RC714	A	T	Y	G	N
Bactériocine T8	A	T	Y	G	N
Pénoïcine A	K	Y	G	N	G
Entéroïcine SE-K4	A	T	Y	G	N
Carnobactériocine B2	V	N	Y	G	N

Figure 8 : Classification des bactériocines de classe IIa en quatre sous-groupes.

Les bactériocines de classes IIa ont été classifiées en quatre sous-groupes selon leur séquence en acides aminés. Un motif Y-G-N-G-V/L est présent dans la partie N-terminale de toutes les bactériocines de cette classe. Adapté de Nissen-Meyer et al. (2009)

**Les bactériocines de classe I** sont les lantibiotiques. Ce sont généralement des petits peptides de moins de 5 kDa qui contiennent les acides aminés modifiés lanthionine ou méthyllanthionine obtenus par des modifications post-traductionnelles et d'où ils tirent leur nom (lantibiotique pour « lanthionine containing antibiotic »). Ces acides aminés modifiés permettent la formation d'anneaux donnant une structure particulière à ces peptides et essentiels pour leur activité et leur stabilité. Les lantibiotiques ont été divisés en trois sous-classes selon leur structure (Figure 7).

La classe A contient les lantibiotiques ayant une structure linéaire, la classe B contient ceux ayant une structure globulaire et la classe C contient ceux dont l'action dépend de deux peptides. La classe A fut divisée en classe AI contenant les lantibiotiques entièrement linéaires et la classe AII contenant les lantibiotiques ayant une structure N-terminale linéaire et une structure C-terminale globulaire (Nagao et al., 2006).

**Les bactériocines de classe II** sont des petits peptides (< 10 kDa) ne possédant pas de modifications post-traductionnelles et qui sont généralement résistants à la chaleur. Cette classe est sous-divisée en trois sous classes : IIa : les bactériocines de type pédiocine ; IIb : les bactériocines à deux peptides ; IIc : les autres bactériocines de classe II.

- **La classe IIa** regroupe les bactériocines de type pédiocine, appelées ainsi en référence à la pédiocine PA-1 produite par *Pediococcus acidilactici* (Nieto Lozano et al., 1992). Elles sont caractérisées par la présence d'un motif Y-G-N-G-V/L, appelé boîte pédiocine, dans la région N-terminale du peptide mature (Fimland et al., 2005). La portion aminotermine contenant la boîte pédiocine est généralement conservée et chargée positivement tandis que la portion carboxyterminale est variable et plutôt hydrophobe (Nissen-Meyer et al., 2009). Elles ont été divisées en 4 sous-groupes sur la base de leurs séquences en acides aminés (Figure 8).

Les bactériocines de type pédiocine ont été largement étudiées et caractérisées pour leur activité anti-*Listeria*, un pathogène important en industrie agro-alimentaire, et le fait qu'elles sont souvent produites par des bactéries généralement reconnues inoffensives pouvant être utilisées en industrie agroalimentaire (bactéries GRAS: « Generally recognized as safe »). Elles sont produites par des bactéries lactiques des genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, mais aussi par d'autres genres bactériens tels que *Weissella* (Cui et al., 2012).

Lactococcine G	LcnG- $\alpha$	GTWDDI <b>GQGI</b> GRVAYWV <b>GKAM</b> CNMSDVNQASRINRKKKH
	LcnG- $\beta$	KKWGLAWVDPAYEFIK <b>GFGK</b> GAIKEGNKDKWKNI
Lactococcine Q	LcnQ $\alpha$	SIWDDI <b>GQGV</b> GKAAAYWV <b>GKAM</b> CNMSDVNQASRINRKKKH
	LcnQ $\beta$	KKWGLAWVEPAGEFLK <b>GFGK</b> GAIKEGNKDKWKNI
Entéroccine 1071	Ent $\alpha$	ESVFSKI <b>GN</b> AVGPAAYWILKGLGNMSDVNQADRINRKKH
	Ent $\beta$	GPGKWLPLQPAYDFVT <b>GLAK</b> GIGKEGNKNKWKNV
Plantaricine EF	PlnE	FNR <b>G</b> Y <b>N</b> F <b>G</b> KSVRHVVDAT <b>GS</b> VAGIRGILKSIR
	PlnF	VFHAYSARGVRNNYKSAVGPADWVISAVR <b>GFIHG</b>
Plantaricine JK	PlnJ	GAWKNFWSLRK <b>GF</b> YDGEAGRAIRR
	PlnK	RRSRKNGT <b>CYA</b> IGYAF <b>G</b> AVERAVLGGSRDYNK
Plantaricine S	Pls $\alpha$	RNKLAYNM <b>CH</b> Y <b>A</b> CKATIFGLAAWALLA
	Pls $\beta$	KKKKQSWYAAAGDAIVSFGE <b>G</b> FLNAW
Plantaricine NC8	PLNC8 $\alpha$	DLTTKLWSSW <b>G</b> Y <b>L</b> G <b>K</b> KARWNLKHPYVQF
	PLNC8 $\beta$	SVPTSVYTLG <b>I</b> KILWSAYK <b>H</b> RKTIEKSFNKGFYH
Lactacine F	LafA	RNNWQTNV <b>GG</b> AVGSAMIGATVGGT <b>IC</b> GPACAVAGAHYLPILWTGVTAAATGGFGKIRK
	LafX	NRWGDTVLSAAS <b>GACT</b> G <b>I</b> KACKSFGPWGMAICG <b>V</b> GAAIGGYFGYTHN
Brochocine-C	BrcA	YSSKDKLDIGK <b>I</b> GAGTVAGAAGGGLAAGL <b>GAT</b> PGAFVGAHF <b>GV</b> IGG <b>SAAC</b> I <b>GGL</b> LG <b>N</b>
	BrcB	KINW <b>GN</b> VGGSCVGGAVIGGAL <b>GGL</b> GGAGGGCIT <b>G</b> AIGSIWDQW
Thermophiline 13	ThmA	YSGKDKLDMGGYALACAGSGALWGAPAG <b>GV</b> GALPGAFVGAHVGA <b>IAG</b> GFACM <b>GGM</b> IGNKFN
	ThmB	QINW <b>GS</b> VVGHCI <b>G</b> GALIGGAFSGGAAAG <b>V</b> GCLVGS <b>GK</b> AIINGL
ABP-118	Abp118 $\alpha$	KRGPNCV <b>GN</b> FLGGLFAGAAAGVPL <b>G</b> PA <b>GI</b> VGGANLGMVGG <b>ALT</b> CL
	Abp118 $\beta$	KNGYGGSGNRWVHC <b>G</b> AGIVGGALIG <b>A</b> IG <b>GP</b> WSAVAGG <b>IS</b> GF <b>T</b> SCR
Salivaricine P	Sln1	KRGPNCV <b>GN</b> FLGGLFAGAAAGVPL <b>G</b> PA <b>GI</b> VGGANLGMVGG <b>ALT</b> CL
	Sln2	KNGYGGSGNRWVHC <b>G</b> AGIVGGALIG <b>A</b> IG <b>GP</b> WSAVAGG <b>IS</b> GF <b>F</b> ASCH
Mutacine IV	NlmA	KVSGGEAVAAIGICATASAA <b>I</b> GGLAGATLVTPYCVGTWGLIRSH
	NlmB	DKQAADTFLS <b>AV</b> G <b>GA</b> ASGF <b>TY</b> CASNGVWHPYILAGCAGVGAVG <b>SV</b> VFFPH
Lactocine 705	705 $\alpha$	<b>GMS</b> GY <b>I</b> Q <b>G</b> IPDFL <b>R</b> GYL <b>H</b> GISAA <b>N</b> K <b>H</b> KK <b>R</b> GL <b>G</b> Y
	705 $\beta$	<b>GF</b> W <b>G</b> L <b>G</b> Y <b>L</b> AGRV <b>GA</b> Y <b>G</b> HAQASANN <b>H</b> HSP <b>I</b> NG

Figure 9 : Séquence primaire de 14 bactériocines de classe IIb constituée chacune de 2 peptides.

La présence du motif GxxxG est indiquée en noir. Adapté de Nissen-Meyer et al. (2010).

- **La classe IIb** regroupe les bactériocines nécessitant l'action combinée de deux peptides pour être actives. En effet ces deux peptides sont inactifs ou très peu actifs individuellement mais fortement bactéricides lorsqu'ils sont combinés. Les deux peptides des bactériocines de classe IIb contiennent des motifs GxxxG (où G est une glycine et x n'importe quel acide aminé) qui favorisent leur interaction dans la membrane des bactéries cibles où ils exercent leur activité lytique en formant des pores (Figure 9). Dans de rares cas, le motif GxxxG peut être remplacé par un motif AxxxA (Plsβ de la plantaricine S) ou SxxxS (PLNC8β de la plantaricine NC8) (Nissen-Meyer et al., 2010).

- **La classe IIc** est très diversifiée composée de bactériocines produites par des bactéries lactiques ainsi que par des bactéries des genres *Staphylococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium* ou *Propionibacterium* (Heng et al., 2007; Nissen-Meyer et al., 2009). On y trouve par exemple la lactococcine A (Holo et al., 1991) ou la divergicine A (Worobo et al., 1995). Bien que la majorité des bactériocines soient produites sous forme de pré-peptide avec un peptide leader permettant probablement à la fois leur reconnaissance par la machinerie de sécrétion et leur maintien dans un état inactif dans la bactérie productrice (Aucher et al., 2005; Cotter et al., 2005), certaines bactériocines de classe IIc telles que l'entéroccine L50 (Cintas et al., 1998a) et les auréocines A53 et A70 (Netz et al., 2001, 2002) sont atypiques puisqu'elles sont produites sans peptide leader. Parmi elles, l'auréocine A70 et d'autres bactériocines sont composées de 3 ou 4 peptides inactifs seuls contenant des motifs GxxxG et bactéricides seulement une fois combinés (Ovchinnikov et al., 2016).

- **La classe III** regroupe les bactériocines de grande taille (> 10 kDa). Ces bactériocines sont de larges enzymes généralement sensibles à la chaleur et diffèrent donc des autres bactériocines qui sont de petits peptides résistants à la chaleur, hydrophobes et/ou cationiques. Elle est divisée en deux sous classes : les bactériolysines telle que la lysostaphine (Bastos et al., 2010), qui induisent la lyse des bactéries cibles en dégradant leur peptidoglycane, et les bactériocines de classe III non-lytiques telles que les helveticines J et M (Joerger and Klaenhammer, 1990; Sun et al., 2018), qui inhibent la croissance des bactéries cibles sans induire leur lyse.

Tableau 3 : Bactériocines produites par les bactéries de l'espèce *S. gallolyticus*

Bactériocine	Classe	Bactérie productrice	Référence
Bovicine HC5	I	<i>S. bovis</i> HC5	(Mantovani et al., 2002)
Bovicine HJ50	I	<i>S. bovis</i> HJ50	(Xiao et al., 2004)
Macedocine	I	<i>Sgm</i> ACA-DC 198	(Georgalaki et al., 2002)
Macedovicine	I	<i>Sgm</i> ACA-DC 198	(Georgalaki et al., 2013)
Nisine P	I	<i>Sgp</i> AB39	(Aldarhami et al., 2020)
Gallocine (A)	IIb	<i>Sgg</i> UCN34	(Aymeric et al., 2018)
Gallocine D	IIb	<i>Sgg</i> LL009	(Hill et al., 2020)
Bovicine 255	IIc	<i>S. bovis</i> LRC0255	(Whitford et al., 2001)
BLIS(MBF10-2)	N.D.	<i>Sgm</i> MBF10-2	(Grazia et al., 2017)
Macedocine ST91KM	N.D.	<i>Sgm</i> ST91KM	(Pieterse et al., 2010)

- **La classe IV** regroupe les bactériocines cycliques. Ce sont de petits peptides de 58 à 70 acides aminés généralement résistants à la chaleur, au pH et aux protéases (Perez et al., 2018). Elles sont caractérisées par la présence d'une liaison peptidique entre leur acides aminés N- et C- terminaux et sont produites en grande majorité par les bactéries appartenant au phylum des Firmicutes. A ce jour 14 bactériocines cycliques différentes, telles que l'entéroline AS-48, ont été identifiées. Elles ont été divisées en deux sous-groupes selon qu'elles sont fortement chargés positivement (groupe I) ou hydrophobes (groupe II) (Perez et al., 2018).

Les bactériocines étant difficiles à classer, plusieurs classifications diffèrent légèrement de celle présentée ici. Cotter *et al.* (2005, 2013) par exemple incluent les bactériocines cycliques (classe IV selon Heng *et al.*) dans la classe II et excluent les bactériocines de grande taille (classe III selon Heng *et al.*) de la classification, suggérant que le terme bactériocines devrait désigner uniquement les peptides ayant une action antimicrobienne et pas les protéines plus larges. La classe I fut quant à elle élargie à toutes les bactériocines modifiées post-traductionnellement pour inclure des classes de bactériocines nouvellement identifiées en plus des lantibiotiques. Chez les bactéries à Gram-positif, ces nouvelles classes incluent notamment les sactibiotiques, les linaridines, les thiopeptides, les bottromycines et les glycocines (Cotter et al., 2013).

#### **E. Les bactériocines de l'espèce *Streptococcus gallolyticus***

Puisque les bactéries de l'espèce *S. gallolyticus* colonisent l'intestin et le côlon des animaux, qui sont des environnements à forte densité bactérienne, il est probable qu'elles produisent des bactériocines pour faciliter cette colonisation. En 1976, une étude relate la production de bactériocines pour faciliter cette colonisation. En 1976, une étude relate la production de bactériocines chez 47 souches de *S. bovis* isolées à partir du rumen d'animaux ou de cas d'endocardites humains a été évaluée et il a été montré que 14 d'entre elles produisaient des bactériocines dans les conditions testées (Iverson and Millis, 1976). De manière intéressante, cette production était fortement corrélée à la capacité à fermenter le mannitol, une caractéristique majeure de *Sgg* suggérant que cette sous-espèce est particulièrement capable de produire des bactériocines. Depuis cette étude, des bactériocines ont été identifiées chez les 3 sous-espèces de *S. gallolyticus* et sont listées dans le Tableau 3.

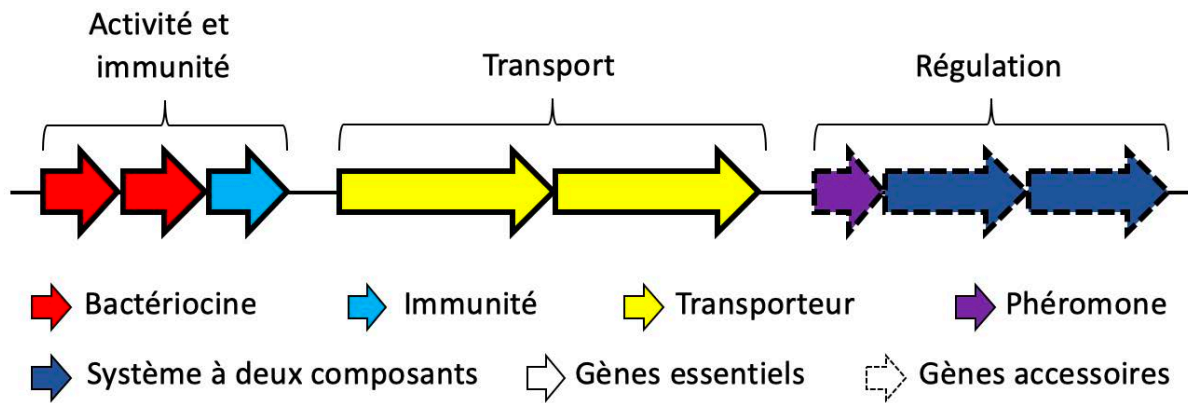


Figure 10 : Organisation générale d'un cluster de gènes codant une bactériocine de classe IIb

Un premier opéron code pour les deux peptides structuraux de la bactériocine et la protéine d'immunité, un deuxième code pour un ABC transporteur et une protéine accessoire de fonction inconnue et un troisième opéron est parfois présent et impliqué dans la régulation de la transcription des gènes de ce cluster. L'ABC transporteur et sa protéine accessoire peuvent aussi se trouver dans le même opéron que les gènes codant la bactériocine et la protéine d'immunité (Nissen-Meyer et al., 2010).



La bovicine HJ50 constitue le prototype d'un nouveau sous-groupe de lantibiotiques qui possèdent un pont disulfure atypique essentiel à leur activité (Wang et al., 2014). La gallocine quant à elle semble produite par la majorité des souches cliniques de *Sgg* (Aymeric et al., 2018). Cependant il a été montré que la souche de *Sgg* LL009, isolée à partir de lait cru de chèvre, possède une autre bactériocine appelée gallocine D à la place de la gallocine (renommée gallocine A) (Hill et al., 2020). La gallocine D a probablement été acquise par transfert horizontal car elle présente de très grandes similarités avec une bactériocine retrouvée chez *Streptococcus infantarius* (Hill et al., 2020).

### **III. Biosynthèse et modes d'action des bactériocines**

#### **A. Biosynthèse des bactériocines**

##### **1. Les clusters de gènes permettant la production de bactériocines**

La gallocine dont cette thèse fait l'objet étant prédite *in silico* comme étant une bactériocine à deux peptides (de classe IIb) (Aymeric et al., 2018), les clusters de gènes des bactériocines de classe II seront détaillés. La plupart de ces clusters contiennent (Heng et al., 2007) :

- Un ou plusieurs gènes codant le ou les pré-peptide(s) structuraux.
- Un gène codant une protéine d'immunité en opéron avec le(s) gène(s) structuraux.
- Un ou plusieurs gènes codant un ABC transporteur responsable de la sécrétion de la bactériocine et sa protéine accessoire.

Ces gènes peuvent être transcrits en un ou plusieurs opérons distincts. Leur régulation est parfois contrôlée par un système à trois composants constitué d'une histidine kinase, d'un régulateur de réponse et d'un peptide inducteur appelé phéromone (Oppegård et al., 2007). L'organisation d'un cluster typique codant une bactériocine de classe IIb est schématisé dans la (Figure 10).

## 2. Peptides leaders et mécanismes de sécrétion des bactériocines

Les bactériocines sont généralement synthétisées sous forme de pré-peptides contenant un peptide leader. Le peptide leader peut permettre la reconnaissance de la bactériocine par la machinerie de sécrétion (Aucher et al., 2005; van Belkum et al., 1997; Neis et al., 1997) et est ensuite clivé. Plusieurs types de peptides leaders ont été identifiés :

- **Les peptides leader de type FNLD**, présents chez les lantibiotiques de type AI (Nagao et al., 2006), sont composés d'environ 25 acides aminés et contiennent le motif spécifique FNLD (Repka et al., 2017). Les bactériocines possédant ce type de peptide leader sont sécrétées via un ABC transporteur spécifique et le peptide leader est clivé par une protéase spécifique (Nagao et al., 2006).

- **Les peptides leader de type double glycine (GG)** mesurent entre 15 et 30 acides aminés suivi d'un motif conservé constitué de deux glycines (GG) en position C-terminale. Ils sont présents chez les lantibiotiques de type AII (Nagao et al., 2006) et chez la majorité des bactériocines de classe II (Heng et al., 2007). Les bactériocines possédant ce type de peptide leader sont sécrétées via un ABC transporteur spécifique qui contient une extension N-terminale d'environ 150 acides aminés responsable du clivage du peptide leader en position C-terminale du motif GG (Franke et al., 1999; Havarstein et al., 1995).

- **Les peptides leaders de type Sec** permettent la sécrétion de protéines via la voie générale de sécrétion Sec présente chez les bactéries. Ils sont constitués d'une région N-terminale chargée, d'une région centrale hydrophobe et d'un motif AXA et sont clivés en position C-terminale de ce motif par une peptidase du système Sec (Freudl, 2018). Bien que ces cas restent rares, des bactériocines de classe IIa (Cintas et al., 1997; Kalmokoff et al., 2001), IIc (Faye et al., 2000; Worobo et al., 1995), et III (Heng et al., 2004, 2006) possèdent un peptide leader de type Sec.

Des peptides leader atypiques et moins bien caractérisés ont également été décrits dans la littérature chez les lantibiotiques de type B et les bactériocines cycliques (Gabrielsen et al., 2014; Nagao et al., 2006).

Pour finir, la sécrétion des bactériocines de classe IIc dépourvues de peptides leaders semble elle aussi dépendante d'un ABC transporteur spécifique et il a été suggéré que des protéines de fonctions inconnues pourraient être impliquées dans la reconnaissance de la bactériocine par son ABC transporteur malgré l'absence de peptide leader (Iwatani et al., 2013; Nascimento et al., 2012; Netz et al., 2001).

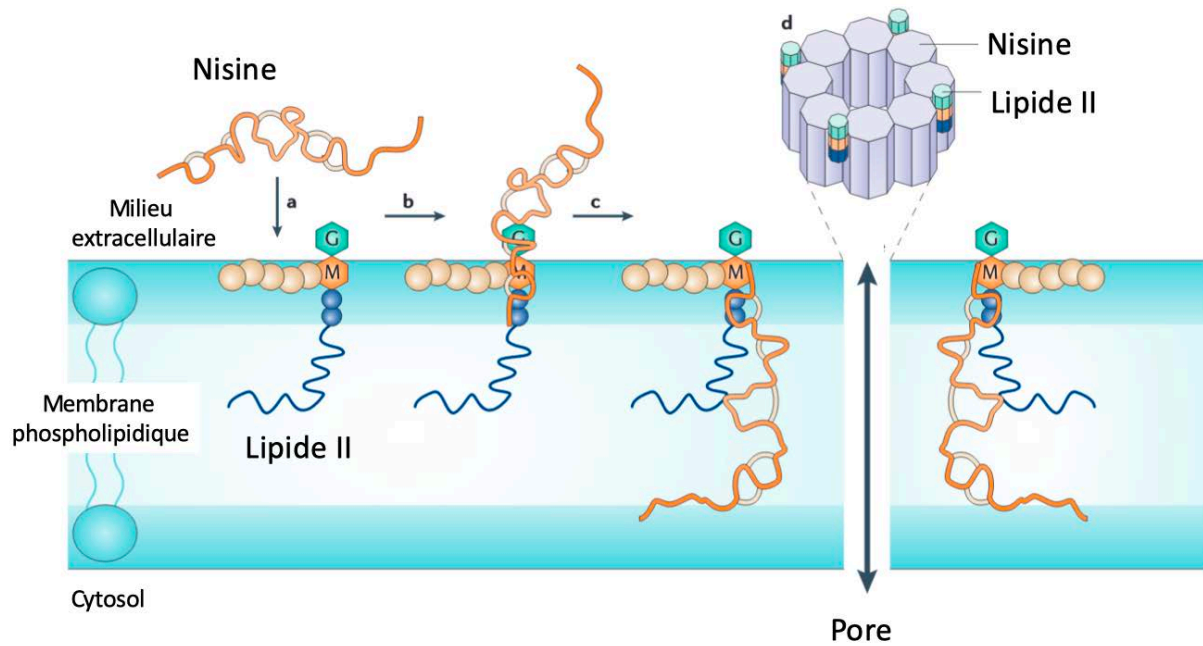


Figure 11 : Mécanisme d'action de la nisine

Après avoir atteint la membrane (a), la nisine se lie au lipide II (b) avant de s'orienter dans la membrane (c) pour y former un pore composé de 8 molécules de nisine et 4 de lipide II (d). Adapté de Breukink et de Kruijff (2006)

## **B. Mode d'action des bactériocines**

Beaucoup de bactériocines produites par les bactéries à Gram-positif agissent sur le peptidoglycane ou la membrane des bactéries cibles. Les thiopeptides et les bottromycines agissent quant à elles en inhibant la synthèse protéique. Certaines microcines, produites par des bactéries à Gram-négatif, agissent en inhibant des enzymes essentielles telles que l'ADN gyrase ou l'ARN polymérase (Arnison et al., 2012).

Les mécanismes d'actions bien caractérisés des lantibiotiques et des bactériocines de type pédiocine ainsi que celui des bactériocines de classe IIb seront présentés ci-dessous.

### **3. Les lantibiotiques (Classe I)**

Les lantibiotiques agissent principalement de deux façons : en formant des pores dans la membrane des bactéries cibles et/ou en inhibant la biosynthèse du peptidoglycane (Kuipers et al., 2011). La nisine est le lantibiotique dont le mode d'action est le mieux caractérisé.

Après avoir atteint la membrane, la nisine est capable de se lier au lipide II, un précurseur essentiel de la voie de biosynthèse du peptidoglycane. La nisine liée au lipide II peut ensuite former des pores composés de 8 molécules de nisine et 4 molécules de lipide II (Figure 11). Ces pores dissipent les gradients d'ions vitaux chez la bactérie cible (Hasper et al., 2004). Il est possible que la nisine inhibe aussi la biosynthèse du peptidoglycane en séquestrant le lipide II. En effet, l'activité antimicrobienne d'autres lantibiotiques tels que la mersacidine est due à l'inhibition de la synthèse du peptidoglycane en séquestrant le lipide II, sans former de pores (Breukink and de Kruijff, 2006).

Concernant les lantibiotiques à deux peptides, il a été suggéré qu'un des deux peptides permet la liaison au lipide II tandis que l'autre est responsable de la formation des pores dans la membrane des bactéries cibles. Ceci a été suggéré après avoir observé que le peptide 1 de la lacticine 3147 devait être ajouté avant le peptide 2 plutôt que l'inverse pour observer une activité antimicrobienne. Le peptide 1 permettrait donc la liaison au lipide II tandis que le peptide 2 permettrait ensuite la formation de pores (Morgan et al., 2005).

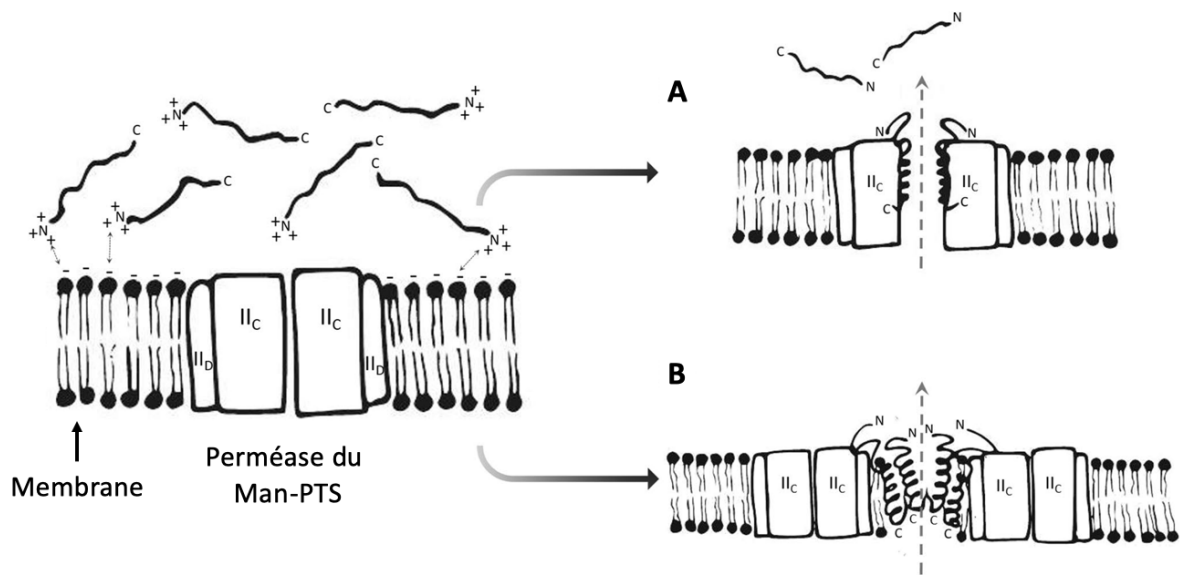


Figure 12 : Modèles proposés pour la formation de pores par les bactériocines de type pédiocines.

Les charges positives des bactériocines de classe IIa facilitent leur interaction avec la membrane chargée négativement. La bactériocine se lie ensuite à la perméase du Man-PTS. Il a été proposé que la formation de pores résulte soit A : de l'ouverture forcée de la perméase du Man-PTS ou B : de l'oligomérisation de la bactériocine dans la membrane. Adapté de Ríos Colombo et al. (2018)

#### **4. Les bactériocines de type pédiocine (Classe IIa)**

Les bactériocines de types pédiocine exercent leur activité antimicrobienne en formant des pores perméabilisant la membrane des bactéries cibles, provoquant une fuite d'ions et dissipant le potentiel transmembranaire (Chikindas et al., 1993; Herranz et al., 2001; Ríos Colombo et al., 2018). Il a été montré que cette activité est dépendante de la présence d'un récepteur, la perméase membranaire du système de transfert et de phosphorylation du mannose (Man-PTS). Deux modèles possibles impliquant ce récepteur ont alors été proposés (Figure 12).

Dans les deux cas, les charges positives de la bactériocine permettent un rapprochement avec la membrane, chargée négativement, par des interactions électrostatiques. Cette interaction est ensuite stabilisée par la liaison de la bactériocine aux sous-unités IIC et IID de la perméase du Man-PTS. Pour finir, la formation de pores résulte soit de l'ouverture forcée de cette perméase (Figure 12A), soit de l'oligomérisation de la bactériocine dans la membrane de la bactérie cible (Figure 12B) (Ríos Colombo et al., 2018).

#### **5. Les bactériocines à deux peptides (classe IIb)**

Les bactériocines de classe IIb nécessitent la présence des deux peptides pour être actives. Ces bactériocines perméabilisent la membrane des bactéries cibles en formant des pores provoquant ainsi une fuite d'ions et une dépolarisation membranaire (Abee et al., 1994; Cuzzo et al., 2003; Marciset et al., 1997; Moll et al., 1998). La lactococcine G par exemple perméabilise la membrane pour divers cations ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ), mais pas pour les protons  $\text{H}^+$ , la plantaricine EF laisse passer divers ions monovalents dont  $\text{H}^+$  et la lactacine F est perméable pour les ions  $\text{K}^+$  et le phosphate. Il semble donc que les bactériocines de classe IIb forment des pores complexes et sélectifs permettant uniquement le passage de certains ions (Nissen-Meyer et al., 2010).

Les peptides constituant les bactériocines de classe IIb sont non-structurés dans l'eau mais forment une hélice- $\alpha$  au contact d'entités membranaires (Fimland et al., 2008; Nissen-Meyer et al., 2010; Rogne et al., 2008). La structuration en hélice- $\alpha$  augmente lorsque les deux peptides sont ajoutés simultanément (Hauge et al., 1998a, 1999). Dans la membrane, les deux peptides interagissent via leurs motifs GxxxG, qui permettent un contact intime entre les

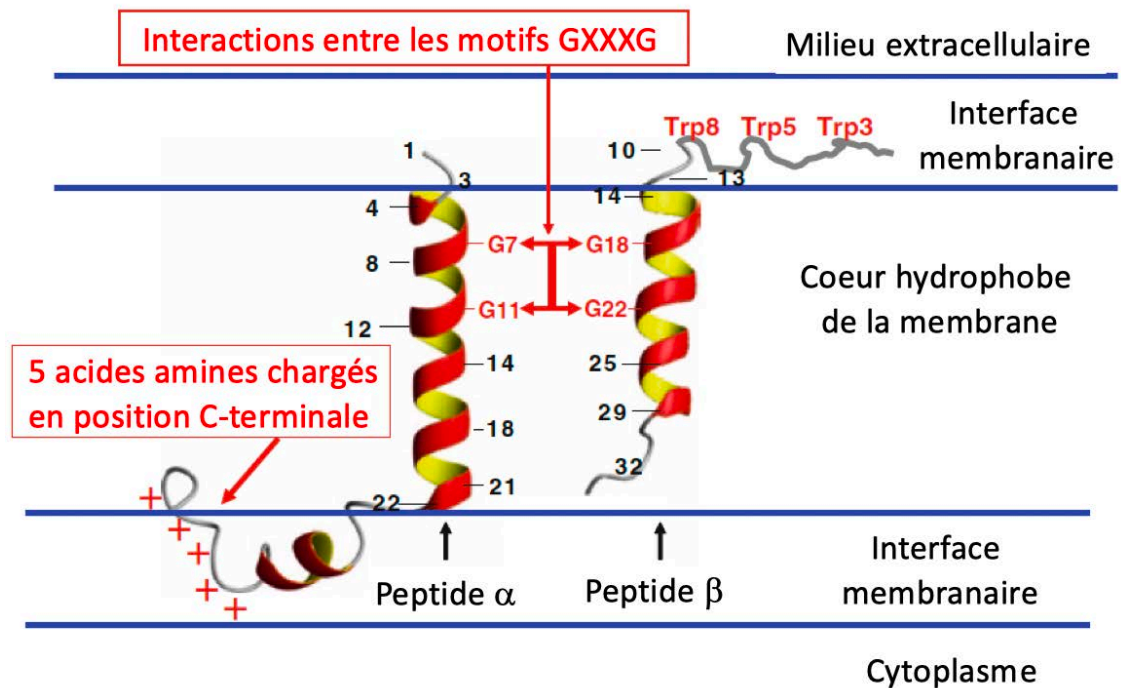


Figure 13 : Modèle d'interaction de la lactococcine G avec la membrane

Les peptides  $\alpha$  et  $\beta$  de la lactococcine G forment chacun une hélice- $\alpha$  dans la membrane. Ils interagissent via leurs motifs GxxxG (en positions 7-11 et 18-22 respectivement). Le peptide  $\alpha$  possède 5 acides aminés chargés positivement qui s'enfoncent dans la membrane et le peptide  $\beta$  possède 3 résidus tryptophanes se trouvant à l'interface membrane-milieu extracellulaire. Adapté de Nissen-Meyer *et al.* (2010).

hélices- $\alpha$ . Cette proximité maximise les interactions de type van der Waals et/ou les liaisons hydrogènes entre les deux hélices (Teese and Langosch, 2015). Des analyses mutationnelles ont confirmé l'importance des motifs GxxxG dans l'activité de la lactococcine G et de la plantaricine EF (Ekblad et al., 2016; Oppegård et al., 2008).

Il a été proposé que les peptides  $\alpha$  et  $\beta$  de la lactococcine G s'insèrent parallèlement dans la membrane et interagissent via leur motifs GxxxG en positions 7-11 et 18-22 respectivement (Figure 13). Il a aussi été suggéré que les 5 acides aminés chargés positivement se trouvant en position C-terminale du peptide  $\alpha$  s'enfoncent dans la membrane grâce au potentiel de membrane, facilitant ainsi le positionnement du peptide dans la membrane. À l'inverse, les trois résidus tryptophanes en position N-terminale du peptide  $\beta$  se positionneraient à l'interface membrane-milieu extracellulaire, facilitant eux aussi le positionnement du peptide dans la membrane (Nissen-Meyer et al., 2010). Le positionnement et l'interaction des deux peptides de la lactococcine G permettrait ensuite la formation des pores (Figure 13).

Bien que l'activité des bactériocines de classe IIb nécessite par définition la présence des deux peptides, un des deux peptides possède parfois une faible activité antimicrobienne à lui seul lorsqu'il est ajouté à forte concentration (Cuozzo et al., 2003; Marciset et al., 1997). Ceci suggère que les deux peptides pourraient avoir des rôles différents dans l'activité contre les bactéries cibles. Il a notamment été proposé qu'un des deux peptides permettrait la fixation à la membrane, par l'intermédiaire ou non d'un récepteur, tandis que l'autre permettrait la formation de pores (Cuozzo et al., 2003; Marciset et al., 1997), comme cela a été proposé pour les lantibiotiques de classe C. Le séquençage de mutants résistants à la lactococcine G (classe IIb) a notamment permis d'identifier UppP, un récepteur membranaire nécessaire à son activité, puisque des mutations étaient présentes dans ou à côté du gène codant cette protéine chez tous les mutants résistants à cette bactériocine (Kjos et al., 2014).

### **C. Mécanismes d'immunité**

La production de toute bactériocine nécessite que la bactérie productrice y soit immunisée. Cette immunité implique généralement une petite protéine d'immunité spécifique et/ou un ABC transporteur. La plupart du temps l'immunité à une bactériocine est spécifique, bien que quelques exemples de protéines d'immunité protégeant la bactérie contre plusieurs bactériocines similaires aient été rapportés dans la littérature (Cotter et al., 2005; Eijsink et al., 1998; Franz et al., 2000; Oppegård et al., 2010).



## **1. Immunité aux lantibiotiques**

L'immunité à la nisine implique l'ABC transporteur NisFEG dont la fonction est probablement d'expulser les molécules de nisine se trouvant dans la membrane vers le milieu extracellulaire (Stein et al., 2003). Elle implique aussi la protéine d'immunité NisI, qui peut être membranaire ou sécrétée, et qui séquestre les molécules de nisine (Draper et al., 2008; Takala and Saris, 2006). De manière générale, il a été proposé que l'ABC transporteur est important pour l'immunité aux lantibiotiques se liant au lipide II en permettant l'expulsion de la bactériocine (Draper et al., 2008), tandis que la protéine d'immunité est importante pour empêcher la formation de pores (Geiger et al., 2019).

## **2. Immunité aux pédiocines**

Concernant les bactériocines de type pédiocine, l'immunité est procurée par une seule protéine dont la taille varie entre 88 et 115 acides aminés (Johnsen et al., 2005). Cette protéine interagit avec le complexe formé entre la perméase du système Man-PTS et la bactériocine uniquement lorsque la bactériocine est présente (Diep et al., 2007). Elle a probablement pour but d'empêcher la formation de pores par la bactériocine ou d'obstruer ces pores pour éviter la fuite d'ions. En construisant des protéines d'immunités hybrides, il a été montré que c'est la partie C-terminale qui est impliquée dans la reconnaissance spécifique de la bactériocine associée. Cependant, aucune interaction directe entre la protéine d'immunité et la bactériocine n'a pu être observée *in vitro*. Il est donc possible que cette interaction n'ait lieu que lorsque la bactériocine est proprement structurée dans un environnement membranaire ou que cette interaction ne soit possible que lorsque la bactériocine est directement liée à son récepteur, la perméase du Man-PTS (Diep et al., 2007; Johnsen et al., 2005).

## **3. Immunité aux bactériocines de classe IIb**

L'immunité aux bactériocines de classe IIb est en général conférée par une petite protéine contenant des hélices transmembranaires (Nissen-Meyer et al., 2011). Cette localisation membranaire est cohérente avec le mode d'action de ces bactériocines. En utilisant des combinaisons de peptides hybrides de deux bactériocines de classe IIb similaires, la

lactococcine G et l'entéroccine 1071, il a été montré que la protéine d'immunité interagit avec une région spécifique de chacun des deux peptides composant la bactériocine. Cependant, le mécanisme d'action exact de la protéine d'immunité n'est pas connu (Oppegård et al., 2010).

Un autre type d'immunité a été décrit dans le cas de la plantaricine EF et la plantaricine JK. Elle est conférée par des protéines à domaine Abi. Chez les procaryotes, des gènes codant pour les protéines à domaine Abi sont fréquemment retrouvés dans des loci encodant des bactériocines. Les protéines à domaine abi associées aux loci des plantaricines EF et JK confèrent une immunité à ces bactériocines lorsqu'elles sont surexprimées chez une souche sensible (Kjos et al., 2010a). Cependant, le mécanisme exact par lequel les protéines à domaine abi confèrent l'immunité n'est pas connu.

## **IV. Régulation de la production de bactériocines**

### **A. Le coût de production des bactériocines**

La production de bactériocines est depuis longtemps décrite comme ayant un coût biologique significatif sur la croissance de la bactérie productrice. Ceci est particulièrement vrai pour les colicines, des bactériocines produites par des bactéries à Gram-négatif, qui nécessitent la lyse d'une partie de la population bactérienne pour être sécrétées dont le coût est évident pour la bactérie (Dykes and Hastings, 1997). Bien que les bactéries à Gram-positif possèdent des systèmes de transport spécifiques pour la sécrétion de leurs bactériocines, il a été montré que cette production peut réduire leur croissance lorsque le milieu est pauvre en éléments nutritifs (Maldonado-Barragán and West, 2020). Il est probable que le coût de production soit encore plus important dans les conditions naturelles où la compétition est plus forte et les éléments nutritifs plus rares que dans les milieux synthétiques utilisés au laboratoire.

### **B. Régulation par 'quorum-sensing'**

La production de bactériocines est souvent contrôlée par des systèmes de régulation de type « quorum sensing ». La production des bactériocines à forte densité cellulaire permettrait ainsi de réduire le coût associé à sa production à faible densité cellulaire

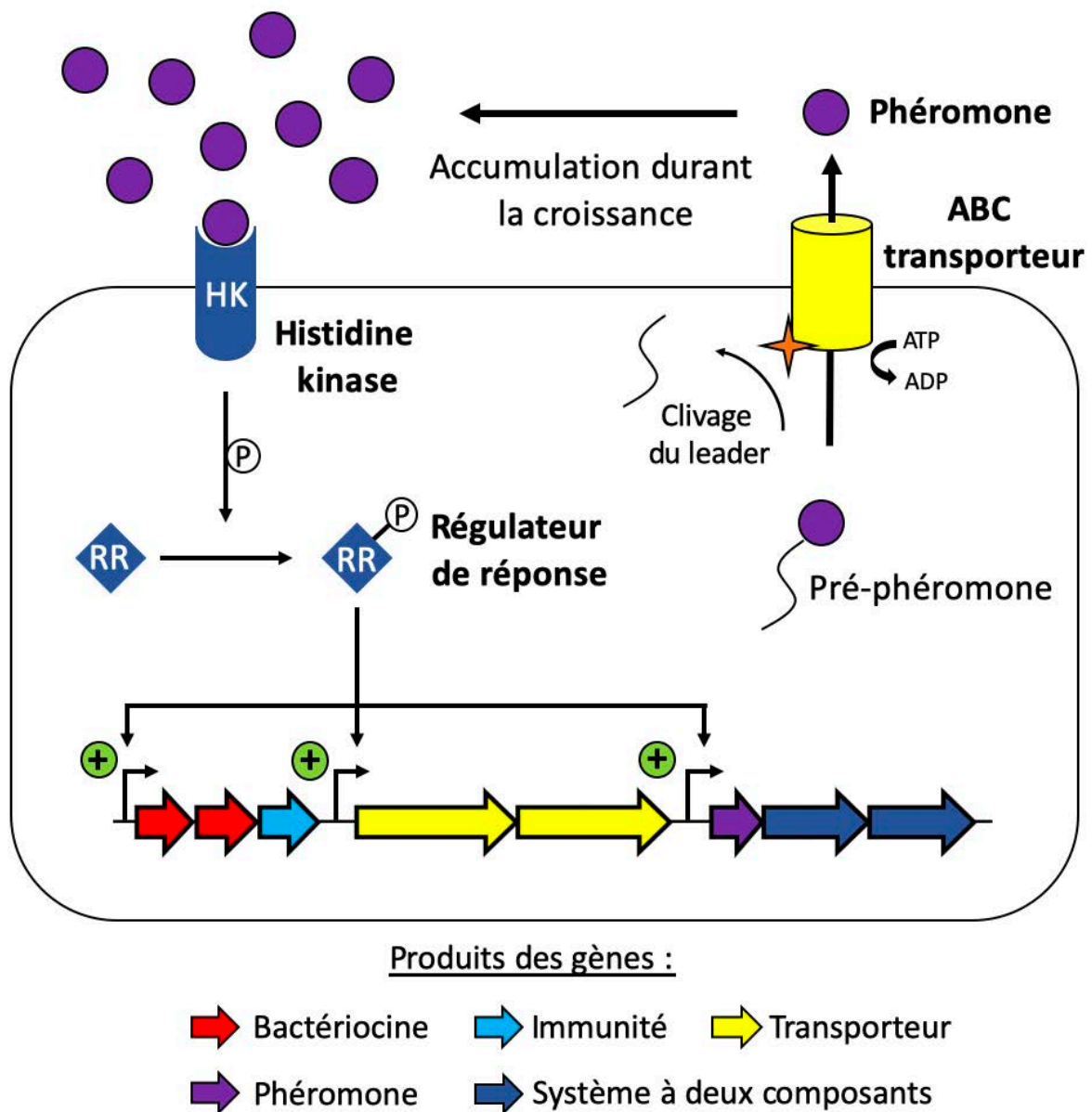


Figure 14 : Régulation de la production de bactériocines par « quorum-sensing » chez une bactériocine de classe IIb

Une phéromone sécrétée s'accumule durant la croissance avant d'activer une histidine kinase membranaire qui phosphoryle un régulateur de réponse, augmentant son affinité à l'ADN et lui permettant d'activer la transcription des gènes nécessaires à la production de la bactériocine et de ceux du système régulateur.

(Gonzalez and Mavridou, 2019). La régulation de la production de bactériocines par *quorum-sensing* repose sur 3 protéines : un régulateur de réponse, une histidine kinase et un peptide inducteur appelé phéromone (Figure 14).

Chez les bactériocines de classe II, une phéromone possédant un peptide leader de type GG est sécrétée et maturée via le même ABC transporteur que la bactériocine. Au fur et à mesure de la croissance, la phéromone s'accumule et sa concentration augmente dans le milieu extracellulaire jusqu'à atteindre une concentration suffisante pour activer son histidine kinase associée. L'histidine kinase phosphoryle alors le régulateur de réponse sur un domaine receveur ce qui augmente son affinité pour une séquence d'ADN conservée généralement retrouvée dans les promoteurs des gènes nécessaires à la production de la bactériocine dont il active la transcription. Il peut aussi augmenter aussi la transcription des 3 gènes codant ce système de régulation, qui peuvent être présents dans le même opéron ou divisé en deux opérons, l'un codant le système à deux composants et l'autre la phéromone, provoquant une boucle d'auto-activation qui amplifie le signal (Diep et al., 2003; Kleerebezem and Quadri, 2001; Wholey et al., 2016). Dans certains cas, la bactériocine elle-même peut servir de phéromone et induire sa propre production. C'est notamment les cas des lantibiotiques nisine et subtiline (Kleerebezem, 2004) ainsi que de la plantaricine A (Hauge et al., 1998b).

A ce système de base peuvent s'ajouter d'autres protéines impliquées dans la régulation de la production des bactériocines. Chez *Lactobacillus plantarum*, un deuxième régulateur de réponse codé dans le même opéron que le système à deux composants et fortement homologue au régulateur de réponse (>75% similarité) a été mis en évidence (Diep et al., 2001, 2003). De manière surprenante, le deuxième régulateur à l'effet inverse du premier et réduit la transcription des gènes permettant la production des bactériocines. Bien que les mécanismes d'activation et d'inhibition de la transcription par ces deux régulateurs aux rôles opposés et codés dans le même opéron ne soient pas entièrement compris, il a été suggéré que la présence d'un répresseur pouvait expliquer la diminution de la production de bactériocines observée chez certaines bactéries lactiques, notamment en début de phase stationnaire (Diep et al., 2001). Cette répression pourrait permettre de diminuer le coût associé à la production de la bactériocine.

Un autre système de régulation contrôlant l'expression de bactériocines et appelé LRS pour « LytTR Regulatory System » a été identifié chez *S. mutans*. Il est composé de deux protéines codées dans le même opéron : un régulateur contenant un domaine de liaison à l'ADN LytTR activant la transcription de cet opéron et de différents gènes, dont certains codent pour des bactériocines, et une protéine membranaire inhibant son activité (Zou *et al.*, 2018). Le système LRS composé de la protéine membranaire HdrM et du régulateur HdrR a été le mieux décrit chez *S. mutans* et il a été montré que HdrM inhibe l'activité de HdrR en le séquestrant au niveau de la membrane (Xie *et al.*, 2020). Un signal pourrait ensuite induire la libération de HdrR et lui permettre d'activer la transcription des gènes qu'il régule. Bien que ce signal n'ait pas été identifié précisément, il semble lui aussi avoir un lien avec la densité cellulaire puisque la transcription des gènes *hdrRM* et de ceux codant les bactériocines qu'ils régulent est activée à forte densité cellulaire (Merritt *et al.*, 2007 ; Okinaga *et al.*, 2010). L'activité des régulateurs des systèmes LRS étant contrôlée par séquestration, ils ne possèdent pas de domaine receveur phosphorylable et ne semblent pas subir de modification post-traductionnelle nécessaire à leur activité (Xie *et al.*, 2020).

## **V. Les applications des bactériocines**

L'utilisation d'agents antibactériens dans le milieu médical et en industrie agroalimentaire a permis de diminuer drastiquement le nombre et la gravité des infections microbiennes. Les infections bactériennes sont aujourd'hui traitées avec des antibiotiques tandis que les bactériocines telles que la nisine ont été utilisées comme conservateur alimentaire. Cependant, le nombre grandissant de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques a suscité un nouvel élan dans l'étude des bactériocines car elles pourraient servir d'alternative ou de compléments aux antibiotiques.

### **A. Les bactériocines en industrie agroalimentaire**

Les bactériocines sont probablement utilisées non-intentionnellement et depuis toujours pour la conservation des aliments fermentés. En effet, les bactéries faisant partie de la flore nécessaire à la fermentation produisent très probablement des bactériocines empêchant la colonisation par d'autres bactéries. Aujourd'hui, les bactériocines peuvent être utilisées en

ajoutant des souches produisant des bactériocines connues à la flore des aliments fermentés, en ajoutant directement la bactériocine purifiée à l'aliment ou en ajoutant parmi les ingrédients un produit fermenté qui contenait une bactérie produisant une bactériocine (Cotter et al., 2005).

**Malgré toutes ces possibilités, les deux seules bactériocines à avoir été utilisées industriellement sont la nisine A et la pédiocine PA-1.** La nisine A est utilisée sous forme purifiée et commercialisée sous le nom de Nisaplin (Danisco) tandis que la pédiocine PA-1 est issue d'un ferment obtenu avec une souche productrice de cette bactériocine et est commercialisée sous le nom de ALTA 2431 (Quest) (Cotter et al., 2005). La nisine A est celle qui a connu le plus de succès en étant utilisée pour lutter contre les pathogènes alimentaires des genres *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium* et *Bacillus* (Bintsis, 2017; Delves-Broughton et al., 1996). En plus d'être active contre les cellules végétatives de ces bactéries, il a été montré que la nisine pouvait inhiber la germination des spores de *Clostridium* (Lay et al., 2016), ou faciliter l'élimination des spores de *Bacillus* (Black et al., 2008; López-Pedemonte et al., 2003). La pédiocine PA-1, moins utilisée, présente néanmoins une plus forte activité anti-*Listeria* que la nisine et peut être utilisée pour combattre spécifiquement ce pathogène alimentaire (Cintas et al., 1998b).

Dans le cas où la bactériocine est produite par une bactérie « GRAS » non dangereuse pour l'Homme, il est possible d'ajouter directement cette bactérie productrice à la place de la bactériocine purifiée. Cette méthode est particulièrement utilisée pour les aliments fermentés. Dans ce cas, l'utilisation de bactériocines ayant un faible spectre d'action est préférable pour éviter de tuer les autres bactéries nécessaires à la fermentation (Cotter et al., 2005). En plus de lutter contre les pathogènes, les bactériocines peuvent aussi limiter l'apparition de bactéries indésirables lors du processus de fermentation (O'Sullivan et al., 2003).

## **B. Limites à l'utilisation des bactériocines**

### **1. Purification des bactériocines**

La plus grande contrainte quant à l'application des bactériocines en industrie alimentaire et médicale réside dans le coût et la difficulté de leur production (Jamaluddin et al., 2018). En effet, les bactériocines sont généralement des petits peptides plutôt hydrophobes, ce qui rend leur purification difficile.

Au laboratoire, la purification de bactériocines implique de nombreuses étapes incluant une précipitation au sulfate d'ammonium permettant de concentrer la bactériocine à partir du surnageant de la bactérie productrice ainsi que plusieurs étapes de chromatographie par échange d'ions, par interactions hydrophobes et en phase inverse notamment (De Vuyst and Leroy, 2007; Jamaluddin et al., 2018). Un protocole en trois étapes incluant i) une précipitation au sulfate d'ammonium, ii) une extraction/purification au chloroforme et au méthanol et iii) une chromatographie liquide à haute pression et en phase inverse a ensuite été développé pour standardiser ces méthodes (De Vuyst and Leroy, 2007).

Bien qu'efficaces au laboratoire, ces méthodes incluent des étapes qui sont difficilement applicables à l'échelle industrielle. Des méthodes alternatives visant notamment à éliminer les deux étapes de centrifugation (pour éliminer les cellules bactériennes et pour la précipitation au sulfate d'ammonium) ont été développées. Pour les bactériocines cationiques comme celles de la classe IIa, l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium peut être remplacée par une chromatographie d'échange de cations sur le surnageant ou directement sur la culture bactérienne (Guyonnet et al., 2000; Lohans and Vederas, 2012; Uteng et al., 2002). D'autres méthodes d'extraction facilitant la purification des bactériocines telles que la chromatographie d'adsorption en lit expansé (« expanded bed adsorption »), les systèmes à deux phases aqueuses et les systèmes à deux phases aqueuse et micellaire ont aussi été développées (Jamaluddin et al., 2018).

La production de bactériocine étant souvent régulée, il est aussi important d'optimiser les conditions de culture pour trouver celles permettant de produire une quantité maximale de bactériocine. La température et le pH notamment peuvent influencer la production de bactériocine, et les conditions optimales de production ne correspondent pas forcément aux conditions optimales de croissance (Lejeune et al., 1998; Van den Berghe et al., 2006). L'étude des mécanismes de régulation et notamment des facteurs activant/inhibant la production de bactériocines pourrait permettre la construction de souches produisant constitutivement la bactériocine et faciliter sa production.

## **2. Mécanismes de résistance aux bactériocines**

Comme observé pour les antibiotiques, les bactéries sensibles peuvent devenir résistantes aux bactériocines via différents mécanismes. L'évaluation des mécanismes de résistance est importante pour anticiper et limiter leur apparition. Les bactériocines n'ayant pas

encore été utilisées en milieu médical, les études sur la résistance aux bactériocines reposent pour l'instant sur des résultats obtenus *in vitro*.

Bien que peu étudié, le taux de mutants résistants à une bactériocine semble fortement dépendant de la souche sensible testée. Par exemple, le taux d'apparition de mutants résistants à la pédiocine PA-1 de 15 souches de *Listeria* varie de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$  environ, tandis que les taux d'apparition de résistants des même souches à la nisine A varient de  $10^{-2}$  à  $10^{-7}$  (Gravesen et al., 2002). D'autres facteurs comme le pH, la température ou la concentration en NaCl peuvent aussi faire varier le taux d'apparition de résistants comme cela a été observé pour la nisine (Gravesen et al., 2002).

Mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette résistance pourrait permettre de minimiser leur apparition et de mieux circonscrire le mode d'action des bactériocines. Par exemple, chez les bactériocines de classe IIa qui nécessitent la présence de la perméase du Man-PTS pour être actives, un mécanisme de résistance impliquant une diminution de l'expression de ce récepteur a été observé (Kjos et al., 2011a, 2011b). Concernant les lantibiotiques, plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits et peuvent être classés comme suit (Draper et al., 2015):

- Des changements de la composition en phospholipides ou en acides gras de la membrane.
- Un épaissement du peptidoglycane.
- Des altérations de surface induisant la présence de charges positives repoussant les bactériocines cationiques.
- La présence d'un gène codant une protéine d'immunité similaire à celle de la bactérie productrice (Draper et al., 2009).
- La présence d'une protéase capable de cliver spécifiquement la bactériocine, comme cela a été observé pour la nisine (Sun et al., 2009).



# *Résultats*

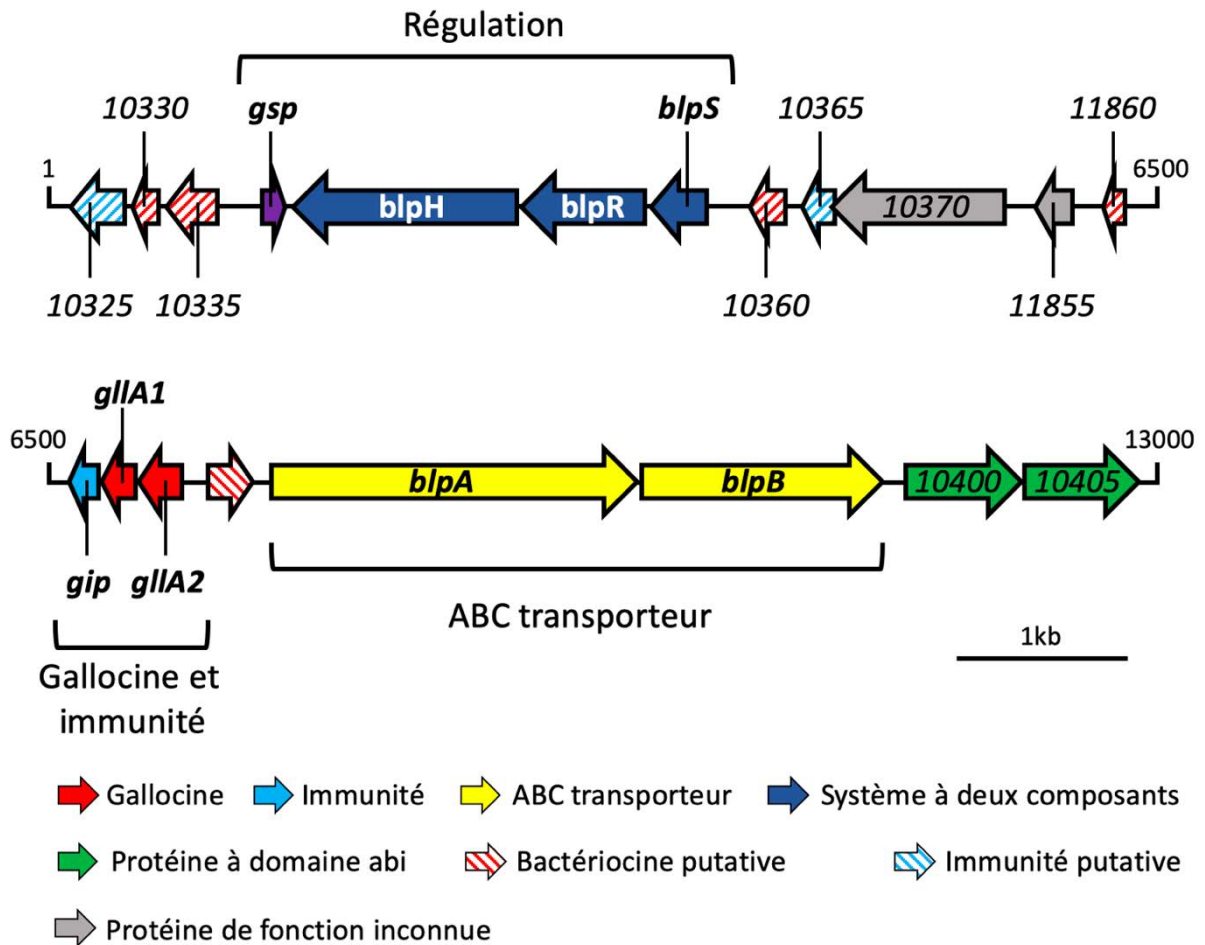


Figure 15 : Locus génétique de la gallocine.

Ce locus génétique de 13 kilobases (kb) contenant les gènes codant la gallocine est représenté schématiquement en deux parties de 6,5 kb par souci de clarté bien qu'elles soient contiguës sur le chromosome de *Sgg*. Les gènes de *Sgg* UCN34 sont annotés sous la forme *gallo\_rs* suivi d'un numéro d'annotation de 5 chiffres. Sur ce schéma, seul le numéro d'annotation (*10325* pour *gallo\_rs10325*) ou le nom donné aux différents gènes dans ce travail sont indiqués. *gsp*, *blpH*, *blpR* et *blpS* sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes du locus et correspondent respectivement aux gènes *gallo\_rs10340*, *10345*, *10350* et *10355*. Les gènes *gip*, *gllA1* et *gllA2* codant respectivement le peptide d'immunité et les deux peptides de la gallocine correspondent aux gènes *gallo\_rs11865*, *10375* et *10380*. Les gènes *blpA* et *blpB* codent un ABC transporteur et sa protéine accessoire et correspondent respectivement aux gènes *gallo\_rs10390* et *10395*.

# Résultats

## Objectifs de la thèse

Les thématiques de l'unité de recherche dans laquelle j'ai réalisé cette thèse sont centrées sur l'étude des Streptocoques pathogènes. Les travaux de recherche de ma directrice de thèse, la Dr Shaynoor Dramsi, se focalisent notamment sur l'étude de *Streptococcus gallolyticus* sous-espèce *gallolyticus* (*Sgg*), une cause émergente d'endocardites et de septicémies chez les personnes âgées dans le but de mieux comprendre sa pathogénicité et l'association des infections invasives dues à cette bactérie avec le cancer colorectal.

La gallocine a été identifiée comme un des facteurs responsables de l'association de *Sgg* au cancer colorectal. En effet, il a été montré dans un modèle murin que son activité augmente en conditions tumorales et permet la colonisation du côlon par *Sgg* en tuant les entérocoques commensaux (Aymeric et al., 2018). L'objectif de ma thèse a été d'identifier et caractériser les gènes impliqués dans la biosynthèse et la régulation de la gallocine ainsi que d'étudier son mécanisme d'action.

## Préambule

La gallocine est produite spécifiquement par *Sgg* c'est-à-dire qu'elle n'est pas produite par les deux autres sous-espèces du genre *S. gallolyticus* que sont *Sgm* et *Sgp*. Cette propriété a permis à Aymeric *et al.* (2018) d'identifier dans le génome de la souche UCN34 un opéron de 3 gènes (*gallo\_2021-2019*) codant pour une bactériocine appelée gallocine. En effet, une délétion de cet opéron dans la souche UCN34 entraîne l'absence de production de la gallocine (Aymeric et al., 2018). Lors de mon arrivée au laboratoire en stage de master en 2017, nous nous sommes intéressés aux gènes présents à proximité de ceux codants la gallocine afin d'évaluer leur rôle dans sa biosynthèse. Nous avons ainsi identifié un locus génomique de 13 kilobases (kb) possédant une organisation similaire à d'autres loci de bactériocines de classe IIb et contenant potentiellement l'ensemble des gènes nécessaires à la biosynthèse et à la régulation de la gallocine (Figure 15). Ce locus contient notamment :

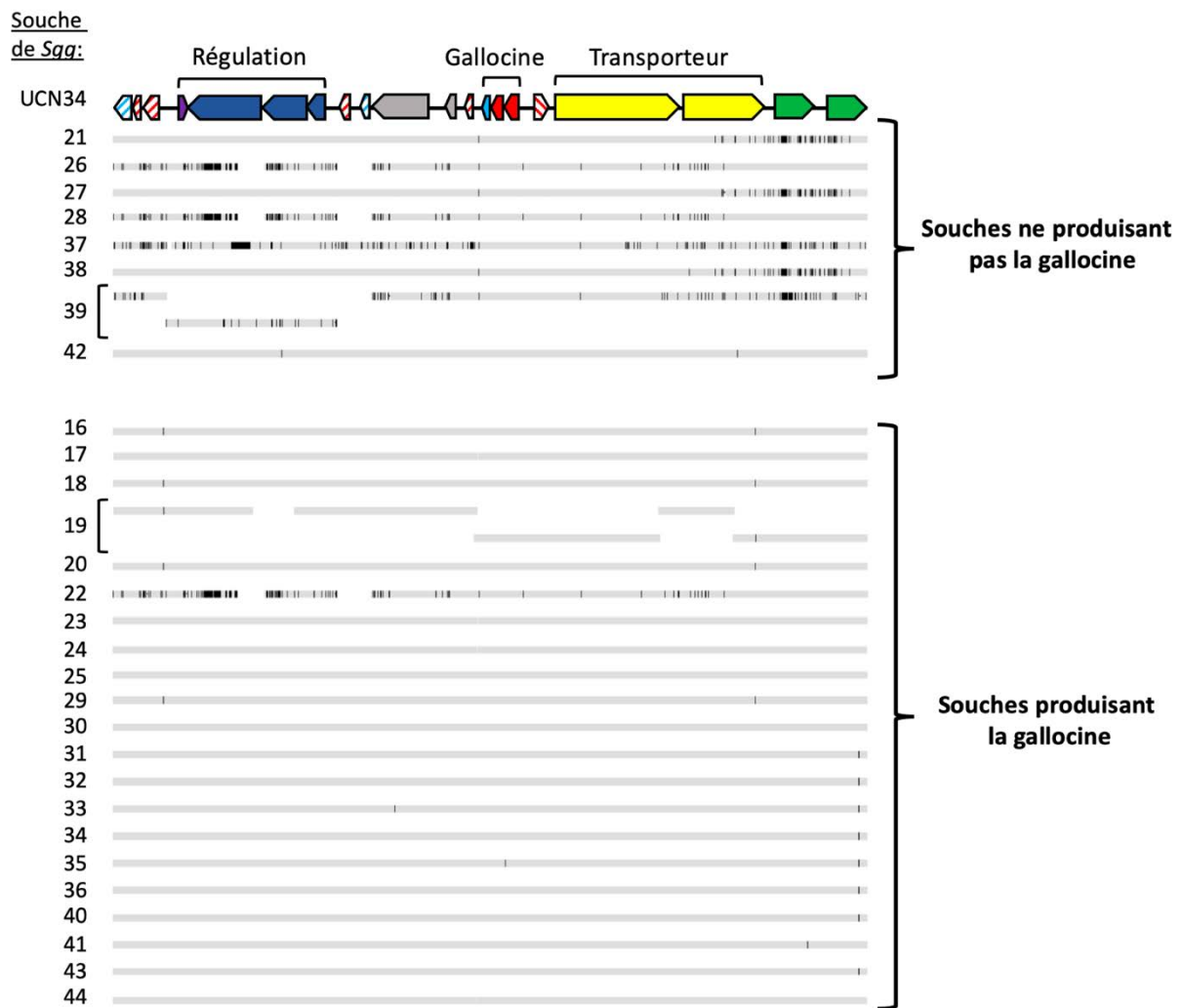


Figure 16 : Analyse comparative du locus génétique de la gallocine dans les isolats cliniques de Sgg par rapport à la souche de référence UCN34.

Le locus génétique codant la gallocine a été séquencé chez 29 souches cliniques de Sgg numérotées de 16 à 44. La production de gallocine dans ces souches a été publiée par Aymeric *et al.* (2018). Les polymorphismes nucléotidiques par rapport à la souche de référence UCN34 sont indiqués par des tirets noirs.

- L'opéron principal composé de trois gènes codant les deux peptides de la gallocine (*gllA1* et *gllA2*) et le peptide d'immunité putatif (« *gip* pour gallocin immunity peptide »).
- Un système de régulation composé de trois gènes codant pour un système à deux composants constitué d'un régulateur de réponse (*blpR*) et d'une histidine kinase (*blpH*) ainsi qu'un petit régulateur de fonction inconnue (*blpS*).
- En amont de l'opéron de régulation, un gène codant pour un peptide sécrété (*gsp*).
- Un opéron de deux gènes codant pour un ABC transporteur (*blpA*) et sa protéine accessoire (*blpB*).
- Un gène (*gallo\_rs10370*) codant une protéine conservée prédite comme « impliquée dans la biosynthèse de bactériocines ».
- Un opéron contenant deux gènes codant des protéines à domaine abi (*gallo\_rs10400* et *gallo\_rs10405*).
- De nombreux gènes codant des protéines hypothétiques de petite taille, souvent difficile à annoter, dont certaines ressemblent à des bactériocines ou à des protéines d'immunité.

Aymeric et al. (2018) avaient testé 29 souches cliniques de *Sgg* et avaient montré qu'une majorité d'entre elles produisaient la gallocine (21 sur 29). Dans le but de comprendre pourquoi 8 souches ne produisaient pas la gallocine, nous avons comparé la séquence du locus génétique de la gallocine dans toutes les souches cliniques (Figure 16).

Comme attendu, ce locus est parfaitement conservé chez une grande majorité des souches capables de produire la gallocine (19/21), avec moins de 2 mutations sur l'ensemble du locus de 13 kb (Figure 16). Ce locus est sans doute aussi parfaitement conservé chez la souche 19 mais la couverture incomplète du séquençage n'a pas permis de le confirmer. En revanche chez une grande majorité de souches ne produisant pas la gallocine (7 sur 8), de nombreuses mutations sont présentes et réparties sur tout le locus, notamment dans les gènes codant l'ABC transporteur et sa protéine accessoire (*blpAB*), le système de régulation (*gsp*, *blpSRH*), les protéines à domaine abi (*gallo\_rs10400* et *10405*) et la protéine « impliquée dans la biosynthèse de bactériocines » (*gallo\_rs10370*) (Figure 16). Ces résultats indiquent que certains de ces gènes sont impliqués dans la production de la gallocine mais ne nous permettent pas d'identifier lesquels le sont réellement. Aucune mutation n'a été observée dans l'opéron principal codant les peptides de la gallocine et la protéine d'immunité dans les 29 souches cliniques analysées.

L'analyse bioinformatique des loci des souches 22 et 42 ne permet pas d'expliquer simplement les résultats observés concernant la production de la gallocine et nécessiterait un re-séquençage du locus. Il serait également important de vérifier l'absence de contamination dans ces deux isolats cliniques. En effet, la souche 42 qui ne produit pas la gallocine ne contient qu'une mutation dans tout le locus gallocine dans le gène *blpR* entraînant la substitution d'une asparagine en thréonine en position 142 de BlpR. Cette substitution est située entre les deux domaines fonctionnels putatifs de BlpR et a donc peu de chance d'avoir un effet sur sa fonction. Dans le cas de la souche 22, de nombreux gènes du locus gallocine sont mutés mais la souche est toujours capable de produire une bactériocine dont le spectre d'action est similaire à celui de la gallocine.

Durant ce travail de thèse, nous avons cherché à déterminer la fonction de chacun des gènes potentiellement impliqués dans la biosynthèse et la régulation de la gallocine grâce à une approche génétique en construisant des mutants par délétion en phase dans ces différents gènes chez la souche de *Sgg* UCN34. Nous avons commencé par étudier le système de régulation composé de GSP, BlpH, BlpR et BlpS, avant de nous intéresser plus en détails au mécanisme de sécrétion et de maturation de la gallocine et du GSP par l'ABC transporteur BlpAB. Pour finir nous avons tenté de caractériser le rôle et le mode d'action des deux peptides de la gallocine GIIA1 et GIIA2 ainsi que du peptide d'immunité Gip.

## **Partie I : Régulation de la production de la gallocine**

### **Publication n°1: Characterization of a 4-component regulatory system controlling bacteriocin production in *Streptococcus gallolyticus***

Alexis Proutière, Laurence du Merle, Bruno Périchon, Hugo Varet, Myriam Gominet, Patrick Trieu-Cuot, Shaynoor Dramsi

#### Résumé de la publication :

Dans cette publication nous avons montré que le système de régulation composé du peptide sécrété GSP (« Gallocin Stimulating Peptide ») et du système à deux composants BlpRH active la production de la gallocine. GSP est sécrété par *Sgg* et active l'histidine kinase

BlpH lorsque sa concentration dans le milieu est suffisante. Une fois activée BlpH phosphoryle BlpR, ce qui augmente son affinité à l'ADN et lui permet d'activer la transcription des gènes nécessaires à la biosynthèse de la gallocine. Une analyse transcriptomique globale a permis de montrer que ce système active la transcription de tous les gènes du locus décrit dans la Figure 15, confirmant leur rôle potentiel dans la biosynthèse de la gallocine ou des autres bactériocines du locus. Le système GSP-BlpRH active seulement la transcription de 2 autres opérons bicistroniques localisés en dehors du locus gallocine dans le génome de *Sgg* UCN34. Contrairement à ce qui a été observé chez d'autres streptocoques, aucun gène impliqué dans la compétence ne semble induit par ce système.

Nous avons ensuite montré que BlpS inhibe la transcription de tous les gènes activés par le système GSP-BlpRH. Le rôle opposé de BlpR et BlpS est d'autant plus étonnant que les gènes codant ces deux protéines sont très probablement cotranscrits. Alors que BlpR est un régulateur de réponse classique composé d'un domaine receveur pouvant être phosphorylé et d'un domaine de liaison à l'ADN de type LytTR, BlpS est un régulateur atypique composé uniquement d'un domaine de liaison à l'ADN de type LytTR. Ceci suggère que BlpS pourrait être constitutivement actif, ne nécessitant pas la phosphorylation par une histidine kinase pour se lier à l'ADN.

Par des expériences de retard sur gel et d'empreinte à la DNase, nous avons montré que ces deux régulateurs se fixent sur la même séquence d'ADN dans les promoteurs des gènes qu'ils régulent. Une séquence consensus de 30 pb a été identifiée comme site potentiel de liaison des régulateurs BlpR/S. Un mutant délété de *blpR* et de *blpS* n'étant plus capable de produire la gallocine, nous en avons déduit que BlpS réduisait la transcription des gènes activés par BlpRH en se fixant sur le site de liaison de BlpR, empêchant ou réduisant sa fixation.

# Characterization of a 4-component regulatory system controlling bacteriocin production in *Streptococcus gallolyticus*

Alexis Proutière<sup>1,2,3</sup>, Laurence du Merle<sup>1,2</sup>, Bruno Périchon<sup>1,2</sup>, Hugo Varet<sup>4,5</sup>,  
Myriam Gominet<sup>1,2</sup>, Patrick Trieu-Cuot<sup>1,2</sup>, Shaynoor Dramsi<sup>1,2</sup> \*

<sup>1</sup> Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram-positif, Institut Pasteur, Paris, France ; <sup>2</sup> CNRS Unité Mixte de Recherches, UMR 2001, Paris, France ; <sup>3</sup> Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France ; <sup>4</sup> Institut Pasteur, Hub Bioinformatique et Biostatistique, Département de Biologie Computationnelle (USR 3756 IP CNRS), Paris, France. ; <sup>5</sup> Institut Pasteur, Biomics Platform, Centre de Ressources et Recherches Technologiques (C2RT), Paris, France.

\* Corresponding author: shaynoor.dramsi@pasteur.fr



## Abstract

Bacteriocins are natural antimicrobial peptides produced by bacteria to kill closely related competitors. The opportunistic pathogen *Streptococcus gallolyticus* (*Sgg*) was recently shown to outcompete commensal enterococci of the murine microbiota in tumoral conditions thanks to the production of a two-peptide bacteriocin named gallocin. We here identified 4 genes involved in the regulatory control of gallocin in *Sgg* UCN34 that encode a histidine kinase/response regulator two-component system (BlpH/BlpR), a secreted peptide (GSP), and a putative regulator of unknown function (BlpS). While BlpR is a typical 243-aa response regulator possessing a phospho-receiver domain and a LytTR DNA-binding domain, BlpS is a 108-aa protein containing only a LytTR domain. Our results showed that the secreted peptide GSP activates the dedicated two-component system BlpH/BlpR to induce gallocin transcription. A genome-wide transcriptome analysis indicates that this regulatory system (GSP-BlpH/BlpR) is specific for bacteriocin production. Importantly, as opposed to BlpR, BlpS was shown to repress gallocin gene transcription. A conserved operator DNA sequence of 30-bp was found in all promoter regions regulated by BlpR and BlpS. EMSA assays showed direct and specific binding of BlpS and BlpR to various regulated promoter regions in a dose dependent manner. Gallocin expression appears tightly controlled in *Sgg* by quorum sensing and antagonistic activity of 2 LytTR-containing proteins. Competition experiments in Gut Microbiota Medium and 5% CO<sub>2</sub> to mimic intestinal conditions demonstrate that gallocin production is functional in these *in vivo* like conditions.

## Significance

*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Sgg*), formerly known as *S. bovis* biotype I, is an opportunistic pathogen causing septicemia and endocarditis in the elderly often associated with asymptomatic colonic neoplasia. Recent studies indicate that *Sgg* is both a driver and a passenger of colorectal cancer. We previously showed that *Sgg* produces a bacteriocin, termed gallocin, enabling colonization of the colon in tumoral conditions by outcompeting commensal members of the murine microbiota such as *Enterococcus faecalis*. Here we identified and extensively characterized a 4-component system that regulates gallocin production. Gallocin genes transcription is activated by a secreted peptide pheromone (GSP) and a two-component signal transduction system composed of a transmembrane histidine kinase receptor (BlpH) and a cytosolic response regulator (BlpR). Finally, a DNA-binding protein (BlpS) was found to repress gallocin genes transcription, likely by antagonizing BlpR. Understanding gallocin regulation is crucial to prevent *Sgg* colon colonization in tumoral conditions.

## Introduction

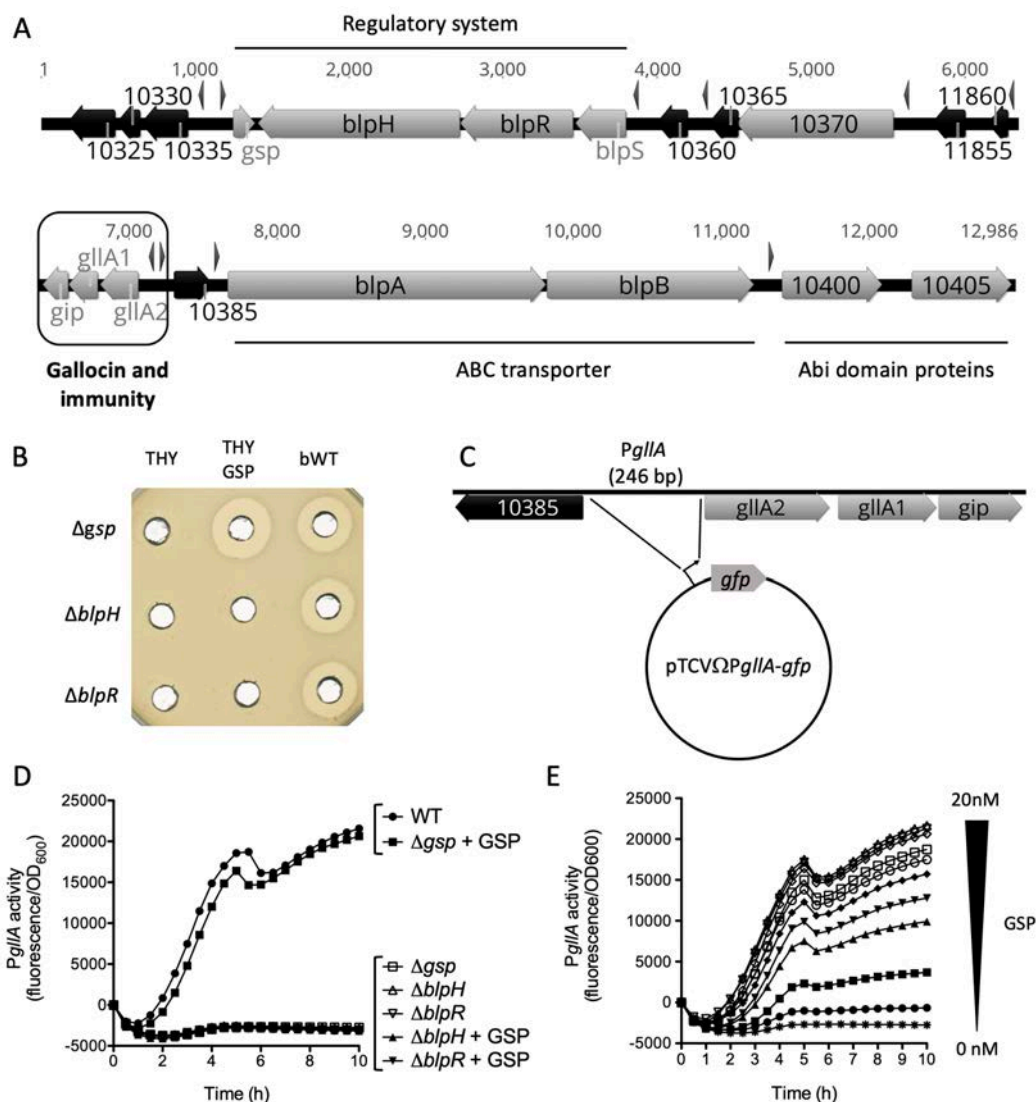
*Streptococcus gallolyticus* subspecies *gallolyticus* (*Sgg*), formerly known as *Streptococcus bovis* biotype I, is an opportunistic Gram-positive pathogen responsible for septicemia and endocarditis in the elderly (1). Invasive *Sgg* infections are strongly associated with asymptomatic colonic neoplasia but the mechanisms underlying this association are still unclear (2, 3). Recently, it was shown that *Sgg* produces a specific bacteriocin named gallocin, whose antimicrobial activity is enhanced by the increased level of secondary bile salts observed in tumoral conditions, allowing *Sgg* to colonize the murine gut by killing resident enterococci (4). As such, gallocin constitutes the first bacterial factor which could explain the *Sgg* association with colonic tumors.

Bacteriocins are natural antimicrobial peptides produced by many bacteria. Producer strains are protected from their own bacteriocin by the presence of an immunity system. Most bacteriocins have a narrow spectrum of activity restricted to bacteria closely related to the producer. Therefore, bacteriocin production is important for the colonization of specific niches, especially in competitive environments such as the gut (5). Bacteriocins of gram-positive bacteria have been divided into four classes based on size, amino acid composition, and structure (6). Class I includes small (< 5 kDa) linear peptides containing post-translationally modified amino acids called lantibiotics, class II small (< 10 kDa) linear peptides without post-translationally modified amino acids, class III large (> 10 kDa) proteins and class IV small cyclic peptides. Class II bacteriocins are further subdivided into three groups: class IIa consists of pediocin-like bacteriocins, class IIb of two or more peptides and class IIc of all other bacteriocins not fitting in IIa and IIb. *In silico* analysis indicates that gallocin likely belongs to class IIb bacteriocins (4). In general, these bacteriocins kill susceptible strains by forming pores in the target membranes, resulting in ion leakage and cell death (7).

Some class IIb bacteriocin loci encode a 3-component regulatory system composed of an inducing peptide and a dedicated two-component system (TCS) with a membrane-bound histidine kinase and a cytoplasmic response regulator. Activation of bacteriocin production through this regulatory system is similar to quorum-sensing regulatory systems. First, the inducing peptide is secreted into the extracellular medium and, upon reaching a threshold

concentration, binds to and activates the histidine kinase, resulting in phosphorylation of its associated response regulator. The phosphorylated response regulator then activates the transcription of genes necessary for class IIb bacteriocin production, including its own transcription, resulting in a rapid overexpression of the regulated genes (7–9). In streptococci, complex regulatory cross-talk has been identified between bacteriocin production and competence (10). Natural competence has been reported in the related *S. bovis* (11) but not in *Sgg*. A peptide previously identified in the extracellular medium of *Sgg* called CSP (due to its similarity with Competence Stimulating Peptide) was shown to induce bacteriocin production but did not allow capture and integration of foreign plasmid DNA (12). In this paper and in the accompanying paper, we demonstrate that CSP should be renamed GSP for Gallocin Stimulating Peptide.

The aim of the present study was to identify and characterize the regulatory system involved in gallocin production and to identify other potentially co-regulated genes. In addition to the three-component system, consisting of an inducing peptide, a histidine kinase and a response regulator, a fourth regulatory component allowing tight control of gallocin expression was identified in this work. Moreover, the presence of several putative novel bacteriocins co-expressed with gallocin highlights the importance of these antimicrobial peptides for the gut colonization by this pathobiont associated with colorectal cancer.



**Figure 1: A three-component system activates galloicin transcription in *Sgg* UCN34**

**A:** Galloicin locus in *Sgg* UCN34 (12,986 bp) extending from gene *gallo\_rs10325* to *gallo\_rs10405* (UCN34 genome ref seq: NC\_013798.1, new annotation). Genes with a predicted function are indicated in grey, hypothetical genes are in black. Gene names are those given in this work or referred to the novel “*gallo\_rs*” annotation (e.g.10325 for *gallo\_rs10325*). Arrowhead above the genes indicates the presence of the conserved motif identified in **fig. 4B**. **B:** Agar diffusion assay revealing *Sgg* UCN34  $\Delta gsp$ ,  $\Delta blpH$  and  $\Delta blpR$  capacity to inhibit the growth of the galloicin-sensitive *Sgm* strain. Mutants were cultured either in THY or in THY supplemented with 20 nM of synthetic GSP (THY GSP). Activity of each bWT counterpart is also shown on the right. **C:** Schematic representation of the reporter plasmid pTCV $\Omega$ PgIIA-*gfp* to monitor galloicin promoter activity. **D:** PgIIA activity (fluorescence divided by OD<sub>600</sub>) in *Sgg* UCN34 WT,  $\Delta gsp$ ,  $\Delta blpH$  and  $\Delta blpR$  in presence or absence of 20 nM of synthetic GSP. One representative curve of three independent experiments is shown here for each condition. **E:** PgIIA activity in *Sgg* UCN34  $\Delta gsp$  containing the reporter plasmid in presence of growing concentrations of synthetic GSP (curves from bottom to top were obtained in culture medium containing 0 to 20 nM GSP respectively, the concentration increasing by 2 nM between each curve. The three very similar upper curves were obtained with 16, 18 and 20 nM of GSP). One representative curve of three independent experiments is shown here for each condition.

# Results

## 1- Identification of a dedicated three-component regulatory system involved in gallocin production

To understand how gallocin production is regulated in *Sgg* UCN34 (13), the genomic locus encoding this putative class IIb bacteriocin was inspected for the presence of potential regulatory genes. Genes encoding a 3-component regulatory system were identified at one end of the gallocin locus (**Fig. 1A**). This module is composed of 3 genes: *blpH*, a putative histidine kinase, *blpR*, a putative response regulator and a divergently transcribed gene encoding a putative inducing peptide named *gsp* (gallocin-stimulating peptide). The regulatory genes are close to the genes encoding the gallocin peptides, recently renamed *gllA1* and *gllA2* (14), the putative immunity protein (*gip* for gallocin immunity protein), two genes encoding an ABC transporter (*blpA* and *blpB*) shown to be involved in gallocin peptide secretion (Harrington-Proutière et al., 2020, companion paper), and other conserved bacteriocin-associated proteins such as Abi domain proteins (*gallo\_rs10400-10405*) (**Fig. 1A**). A genetic approach was undertaken to demonstrate the role of these three regulatory genes in gallocin production. Markerless in-frame deletion mutants of *gsp*, *blpH* and *blpR* were obtained in *Sgg* UCN34. For each mutant, we also selected a clone that reverted to the wild-type genotype (bWT) following homologous recombination. Gallocin production is easily visualized through its antimicrobial activity against the very closely related bacterium *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* (*Sgm*) (**Fig. S1A**), which was used as a susceptible indicator strain in this work. As shown in **Fig. 1B**, gallocin production was abolished in the  $\Delta gsp$ ,  $\Delta blpH$  and  $\Delta blpR$  mutants as compared to their bWT strains. All three mutants did not exhibit any killing activity against the *Sgm* prey strain, indicating that these three genes are essential for gallocin production in *Sgg* UCN34. We reasoned that if *gsp* encodes a secreted inducing peptide that activates its cognate two-component system, addition of GSP peptide to the extracellular medium should restore gallocin production by the  $\Delta gsp$  mutant. We also hypothesized that GSP, like other inducing peptides, is synthesized as a precursor matured by cleavage upon secretion after a double glycine motif (15). The predicted mature GSP peptide corresponding to the 24 C-terminal amino acids encoded by *gsp* was synthesized (**Fig. S1B**). Addition of synthetic GSP to the culture medium restored gallocin production by the  $\Delta gsp$  mutant (**Fig. 1B**). Importantly,

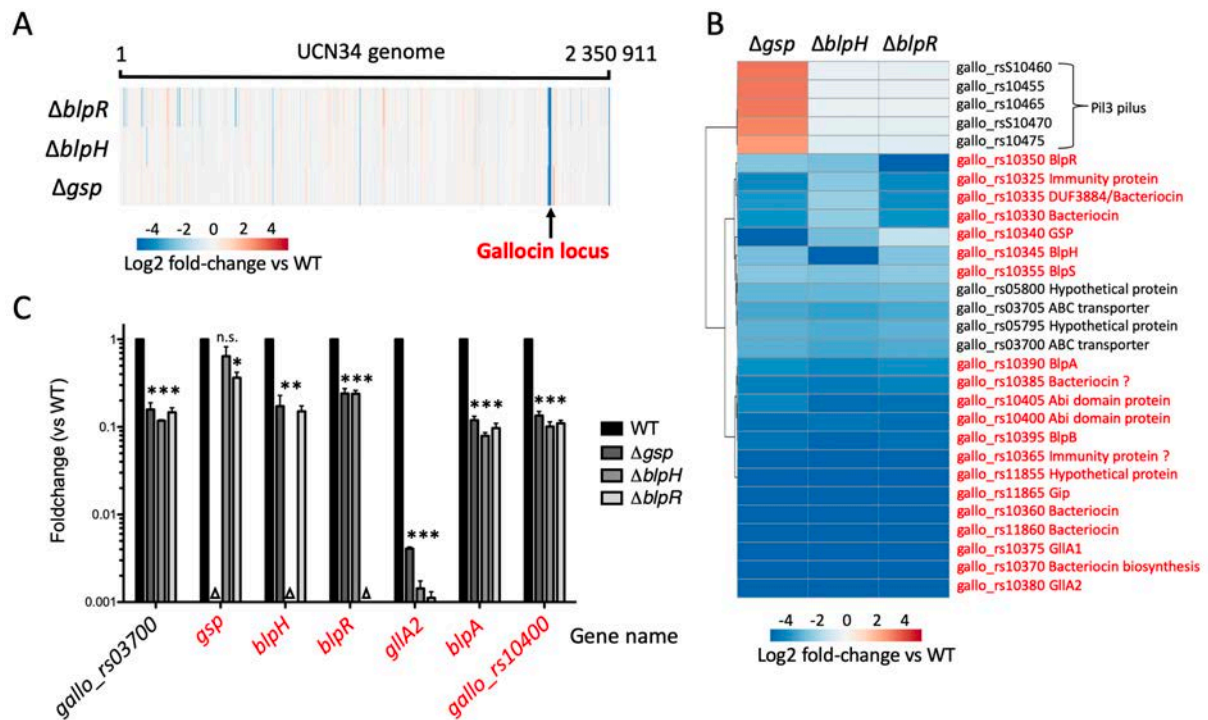
addition of GSP did not restore galloicin production in the  $\Delta blpH$  or  $\Delta blpR$  mutants, an epistatic relationship suggesting that GSP activates transcription of genes involved in galloicin production through the BlpH/R TCS.

To demonstrate that this regulatory system activates galloicin gene transcription, we constructed a reporter plasmid expressing *gfp* under the control of the galloicin operon promoter (pTCV $\Omega$ P*gllA-gfp*) to monitor the promoter activity by recording GFP fluorescence during growth (**Fig. 1C**). As shown in **Fig. S2**, P*gllA* activity in *Sgg* UCN34 WT was null at the beginning of the culture, increased throughout growth and was maximal at the end of the exponential phase. The persistence of the GFP signal beyond the late log phase was observed in the M9YE medium but not consistently in THY. To investigate more thoroughly galloicin gene expression along the growth curve, qRT-PCR experiments on selected genes were performed at various time points (early exponential, exponential, late-exponential, stationary). All the genes examined except *gsp* displayed a characteristic bell curve shape with maximal expression during late exponential. In contrast, *gsp* expression was maximal much earlier in the growth during exponential phase (data not shown).

Next, we showed that the P*gllA* was completely inactive in *Streptococcus agalactiae* NEM316, which does not contain the specific regulatory system *gsp-blpRH* (**Fig. S2**). This result demonstrates that galloicin promoter activity depends on a *Sgg*-specific regulatory system. Consistently, the P*gllA* promoter was found totally inactive in the three *Sgg* regulatory mutants  $\Delta gsp$ ,  $\Delta blpH$ , and  $\Delta blpR$  (**Fig. 1D**). Addition of increasing concentrations of GSP (2-20 nM) to the culture medium restored galloicin promoter activity in a dose-dependent manner in the *Sgg*  $\Delta gsp$  mutant, but not in the  $\Delta blpH$  and  $\Delta blpR$  strains (**Fig. 1D and 1E**), confirming that GSP activates galloicin gene transcription through the BlpRH TCS. As shown in **Fig. 1E**, GSP is active at very low concentrations (6 nM) and maximal activation of galloicin promoter was recorded with 16 nM of GSP.

## **2 –Identification of the regulon controlled by the 3- component regulatory system GSP / BlpHR in *S. galloyticus***

In order to identify genes potentially involved in the production, maturation, and secretion of galloicin, and to uncover new genes potentially co-regulated with galloicin genes, we performed a whole transcriptome analysis of the *Sgg* UCN34 WT,  $\Delta blpR$ ,  $\Delta blpH$ , and  $\Delta gsp$  mutants using total RNAs extracted from exponentially growing *Sgg* cultures (THY OD<sub>600</sub> 0.5). The



**Figure 2: The whole regulon controlled by GSP/BlpHR**

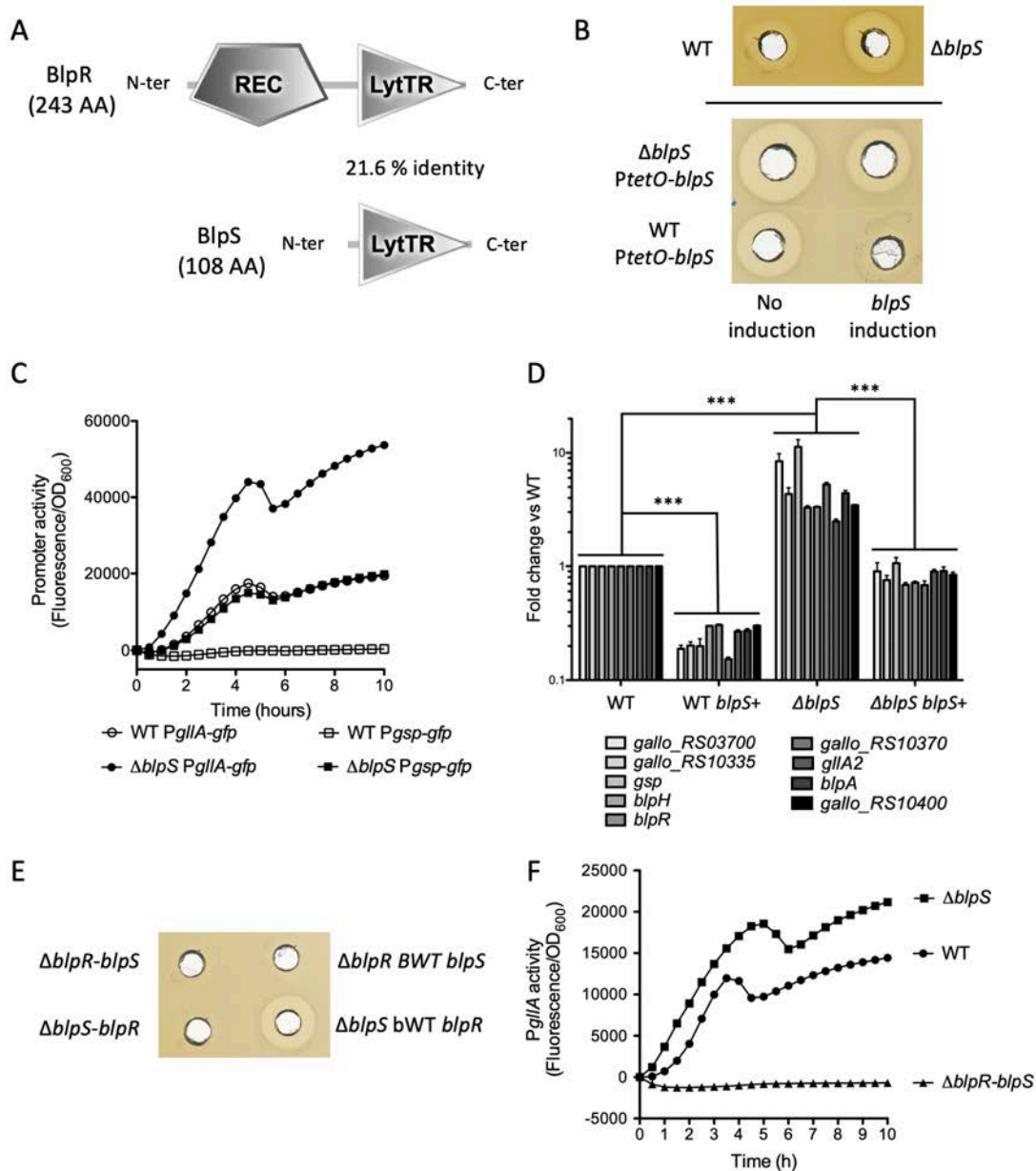
**A:** Heatmap representing the  $\log_2$ -foldchange in mRNA abundance (determined by whole transcriptomic analysis) of all the genes along the UCN34 genome in  $\Delta gsp$ ,  $\Delta blpH$  and  $\Delta blpR$  mutants compared to the parental *Sgg* UCN34 WT. **B:** Similar analysis as in A for selected genes whose  $\log_2$ -foldchange in mRNA abundance was significantly superior to 2 or inferior to -2 in at least one mutant (see details in material and methods). All the genes belonging to the gallocin locus are indicated in red with the corresponding gene product. Gene product was determined either with the genome annotation or by blast analysis. “?” indicates that the result of the blast analysis was not statistically significant. **C:** qRT-PCR data showing the foldchange in mRNA abundance in *Sgg* UCN34  $\Delta gsp$ ,  $\Delta blpH$  and  $\Delta blpR$  compare to the WT. The identity of each mutant was confirmed by the absence of transcript indicated by  $\Delta$ . Statistical analysis was performed to compare the expression of each gene in the three mutants compare to the WT by ANOVA (Significant difference was indicated with \*: p-value<0,05; \*\*: p-value<0,01; \*\*\*: p-value<0,001; n.s.: no significant difference)

transcriptional profiles of these three mutants were very similar and their comparison with that of parental UCN34 WT shows that the main target of the BlpRH regulatory system is the gallocin locus whose expression is strongly lowered in all three mutants (**Fig. 2A**).

Selecting those genes whose transcription is significantly different ( $\text{Log}_2$  fold-change  $<-2$  or  $>2$ ;  $p$ -value $<0.01$ ) in at least one mutant as compared to *Sgg* WT UCN34 showed that 24 genes were downregulated in the three mutants (**Fig. 2B**). Twenty out of these 24 upregulated genes were part of the gallocin locus displayed in **Fig. 1A** (indicated in red in **Fig. 2B**). These were: i) the regulatory module including *gsp*, *blpH*, *blpR*, plus the upstream adjacent *blpS* gene encoding a putative DNA binding protein; ii) the two genes encoding the gallocin peptides (*gllA1* and *gllA2*, *gallo\_rs10375/10380*) and the putative immunity protein (*gip*, *gallo\_rs11865*); iii) the two genes (*blpAB*) encoding the ABC transporter whose role in the secretion of gallocin and GSP peptides is demonstrated in the accompanying paper (Harrington-Proutière et al., 2020); iv) *gallo\_rs10370* which encodes a conserved protein with an undefined role in bacteriocin biosynthesis; v) *gallo\_rs10400/10405* encoding Abi domain proteins; and vi) several hypothetical genes (indicated by black arrows in **Fig. 1A**) that may encode two putative bacteriocin operons (*gallo\_rs10325/10335* and *gallo\_rs10360/10365*) and two others putative single gene bacteriocins (*gallo\_rs11860* and *gallo\_rs10385*). Beside the gallocin locus, only four genes clustered in two different loci were found to be downregulated in the three regulatory mutants. These were the two adjacent genes *gallo\_rs03700/03705* encoding a putative ABC transporter and *gallo\_rs05795/05800* encoding hypothetical proteins of unknown function. Of note, the strong upregulation of the Pil3 pilus operon in the  $\Delta$ *gsp* mutant (**Fig. 2B**) was shown to be due to a phase variation event as described previously (16).

To validate the transcriptome analysis, qRT-PCR was performed on 7 representative genes (**Fig. 2C**). qRT-PCR results confirmed the downregulation of these genes in absence of either GSP or BlpRH TCS. Transcription of the core gallocin *gllA* operon was more strongly reduced ( $>20$ -fold) as compared to the other genes of the locus such as those encoding the regulatory system (5-fold) and the ABC transporter (8-fold). It is worth noting that transcription of the *gsp* gene was only moderately altered in the  $\Delta$ *blpH* and  $\Delta$ *blpR* mutants as compared to the UCN34 WT (Fold-Change in  $\Delta$ *blpH* : 0.159 by transcriptome and 0.64 by qRT-PCR ; FC in  $\Delta$ *blpR* : 0.4 by transcriptome and 0.37 by qRT-PCR). Together, these results show that this regulatory system strongly activates the transcription of several genes involved in bacteriocin biosynthesis and also induces its own transcription, albeit at a lower level.





### Figure 3: BlpS inhibits galloicin gene transcription

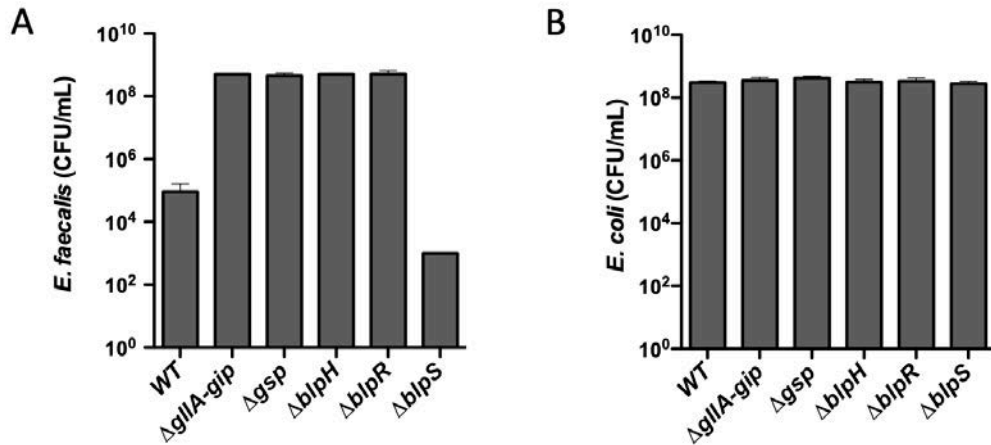
**A:** SMART domains identified in BlpR and BlpS proteins. REC stands for “cheY-homologous receiver domain” and LytTR for “LytTR DNA-binding domain”. The % of identity between the two LytTR domain was obtained using Geneious alignment. **B:** Agar diffusion assay showing galloicin activity in the culture supernatant against *Sgm*. Strain tested: *Sgg* UCN34 WT and  $\Delta blpS$  (top part) and the same strains containing pTCV $\Omega$ PtetO-*blpS* with or without induction of *blpS* expression with 200 ng/mL anhydrotetracycline (bottom part). **C:** Monitoring promoter activity of *PgIIA* (circle) and *Pgsp* (square) during growth in *Sgg* WT and  $\Delta blpS$  mutant. One representative curve of three independent experiments is shown here for each condition. **D:** qRT-PCR data showing the foldchange in mRNA abundance between *Sgg* UCN34 pTCV $\Omega$ PtetO-*blpS* (WT) and  $\Delta blpS$  pTCV $\Omega$ PtetO-*blpS* ( $\Delta blpS$ ). *blpS*<sup>+</sup> indicates the induction of *blpS* transcription with 200 ng/mL anhydrotetracycline. Statistical analysis was performed to compare the expression of each gene in the different conditions using ANOVA (\*\*\*) indicates that results are significantly different with a p-value <0,0001) **E:** Agar diffusion assay to test galloicin activity in the culture supernatant of *Sgg* UCN34  $\Delta blpS$ -*blpR* (deletion of *blpS* in  $\Delta blpR$ ),  $\Delta blpR$ -*blpS* (deletion of *blpR* in  $\Delta blpS$ ) and their respective bWT against *Sgm*. **F:** Monitoring *PgIIA* activity during growth in *Sgg* UCN34 WT,  $\Delta blpS$  and  $\Delta blpR$ -*blpS*. One representative curve of three independent experiments is shown here for each condition.

### 3 – Identification of a second regulator, BlpS, preventing transcriptional activation by BlpR

The *blpRH* genes encode a typical TCS composed of a response regulator BlpR that contain a CheY-homologous phospho-receiver domain and a LytTR DNA binding domain (**Fig. 3A**) and a sensor histidine kinase BlpH with 5 transmembrane regions. A second regulatory gene encoding a putative DNA-binding protein consisting entirely of a LytTR DNA-binding domain was found immediately upstream of *blpRH* (**Fig. 3A**). We thus decided to test the role in gallocin production of this additional gene, designated *blpS*, which is likely co-transcribed with *blpRH*. A clean in-frame deletion of this gene was performed in *Sgg* UCN34 to avoid polar effects on the downstream *blpRH* genes. Interestingly, the  $\Delta blpS$  strain produced about 4-fold more gallocin than the WT as determined by serial dilution of the supernatant necessary to kill *Sgm* prey strain, suggesting that *blpS* represses gallocin gene expression. We then overexpressed *blpS* in the WT and  $\Delta blpS$  mutant strains using an inducible expression vector (pTCV $\Omega$ PtetO-*blpS*). As a prerequisite, we first demonstrated that the inducible promoter PtetO is functional in *Sgg* using *gfp* as a reporter gene (pTCV $\Omega$ PtetO-*gfp*) (**Fig S2**). We then showed that induction of *blpS* transcription leads to a decrease in gallocin production in both the  $\Delta blpS$  and WT strains (**Fig. 3B**).

We next tested the effect of *blpS* deletion on the *gllA* and *gsp* promoters. Reporter plasmids in which *gfp* expression was placed under the control of the P*gllA* or P*gsp* promoters were introduced in the *Sgg* WT and  $\Delta blpS$  strains. As shown in **Fig. 3C**, expression from the *gllA*- and *gsp*- promoters is strongly increased in the  $\Delta blpS$  mutant as compared to the WT.

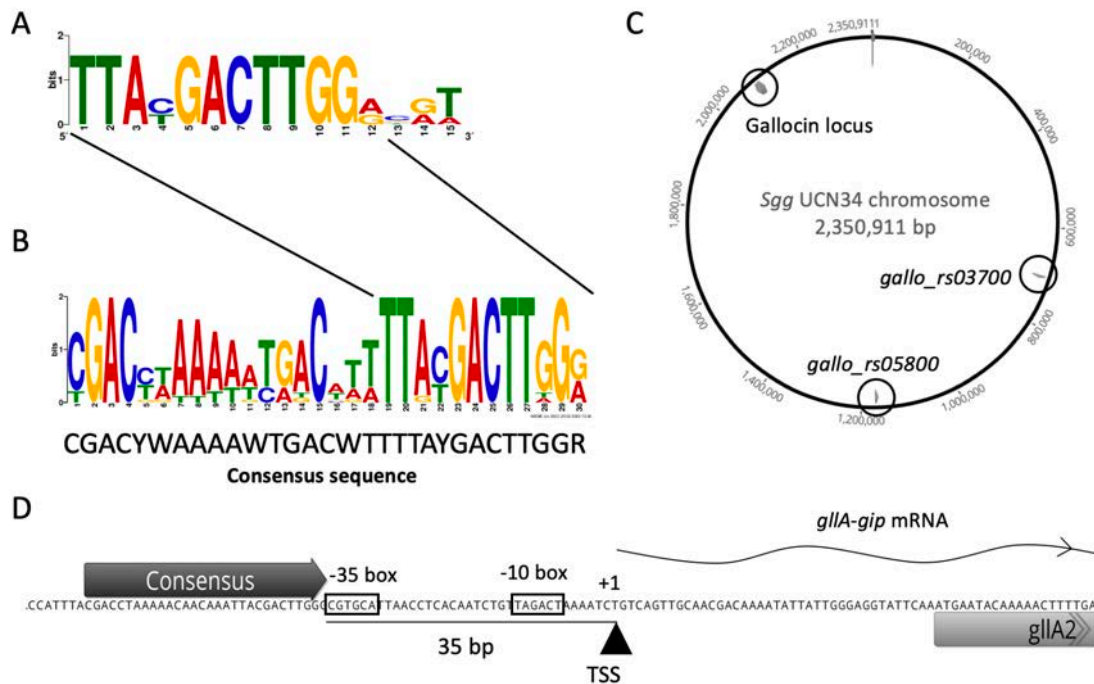
To determine the impact of BlpS on the whole regulon controlled by the GSP/BlpHR module, we quantified by qRT-PCR the transcription levels of 9 different genes of this regulon, one located outside (*gallo\_rs03700*) and eight within the gallocin genomic locus (*gallo\_rs10335*, a putative bacteriocin, *gsp*, *blpH*, *blpR*, *gallo\_rs10370*, *gllA2*, *blpA* and *gallo\_rs10400*) in the WT and  $\Delta blpS$  strains expressing *blpS* under the control of the inducible promoter PtetO. Expression of the 9 tested genes was increased in the  $\Delta blpS$  mutant compared to the WT strain in the absence of inducer (**Fig. 3D**). Induction of *blpS* expression reduced the transcription levels of the 9 tested genes in both the WT and  $\Delta blpS$  strains (**Fig. 3D**). Expression of *gsp* displayed the highest fold-change between the WT and  $\Delta blpS$ , which more than a 10-fold upregulation in the  $\Delta blpS$  mutant. These results indicate that BlpS provides a negative feedback loop to control gallocin gene expression (**Fig. 3D**).



**Figure 4: Overexpression of galloicin in *blpS* mutant allow a better killing of *E. faecalis* but not *E. coli* in a competition experiment in gut-like conditions**

A: *E. faecalis* V583 CFU/mL after a 5h competition against different strains of *Sgg*.

B: *E. coli* CFU/mL after a 5h competition against different strains of *Sgg*.



**Figure 5: A conserved DNA motif is present upstream all the genes regulated by GSP-BlpHR.**

A: 15 bp DNA motif obtained by alignment of the promoters of the regulatory system, the bacteriocin accessory protein, galloicin genes, the ABC transporter and abi domain protein on <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>. B: A 30 bp consensus sequence identified by MEME in the twelve putative promoters regulated by BlpHR. The initial 15 bp motif is located at the 3' end of this consensus motif. C: Mapping of the 30 bp consensus sequence on *Sgg* chromosome (with a maximum of 6 mismatches). The consensus sequences are represented by arrowheads and the name of the gene downstream the consensus is indicated. D: Determination of the transcription start site of *gIIA* mRNA and localization of the conserved motif. Putative -10 (TAGACT) and -35 (CGTGCA) promoter boxes were assigned based on the location of the (+1) transcription start site and the sequence of the canonical prokaryotic promoter (TTGACA-X17-TATAAT).

To establish the epistatic relationship of BlpR and BlpS on gallocin production, both genes were deleted, i.e. either by deleting the *blpS* gene in the  $\Delta blpR$  mutant or the reverse. As shown in **Fig. 3E and F**,  $\Delta blpS$ -*blpR* mutants were unable to produce gallocin and, consistently, the gallocin promoter *PgIIA* was totally inactive in these mutants. Together, these results demonstrate that BlpR is epistatic over BlpS.

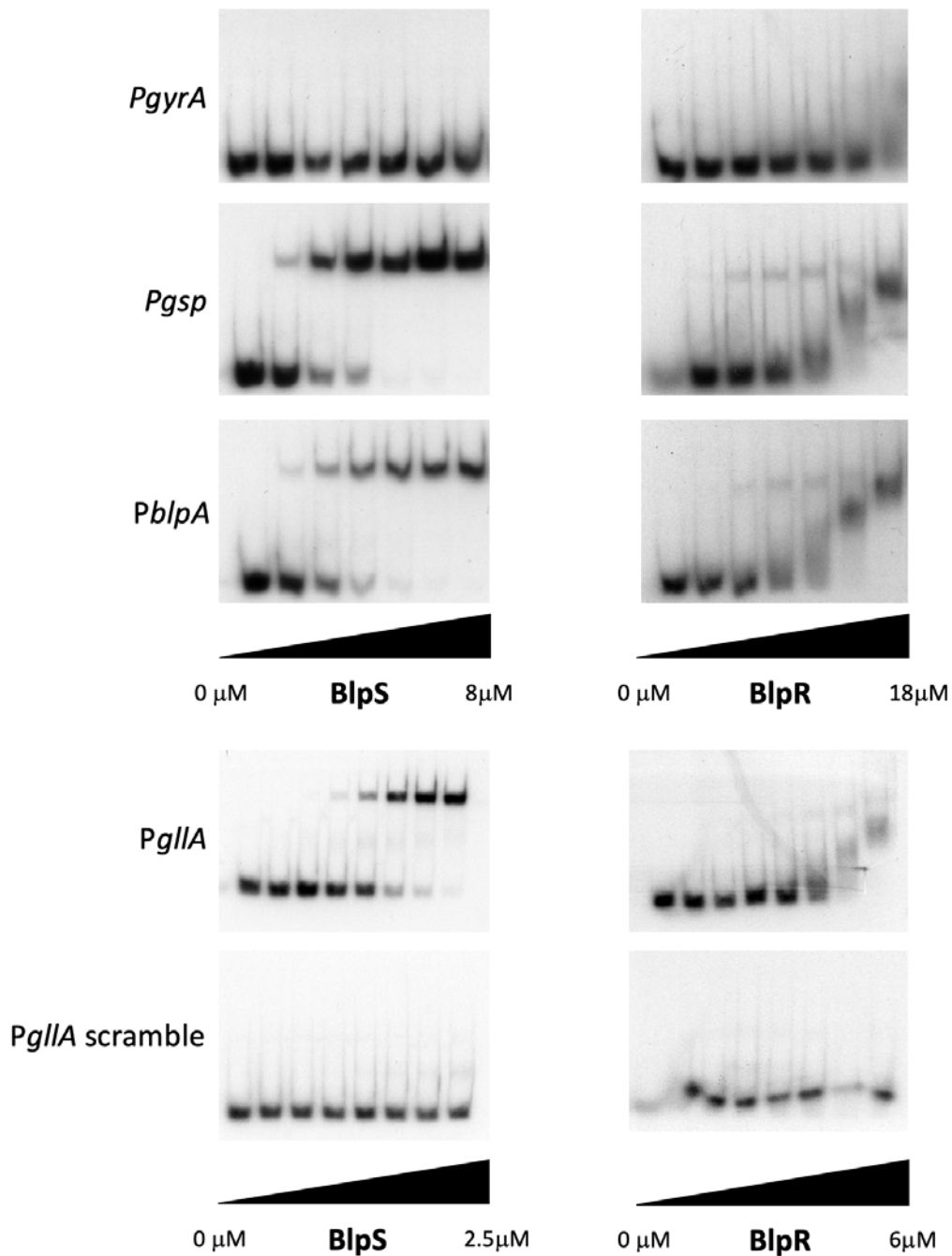
#### **4- Importance of gallocin expression for the killing of sensitive *Enterococcus faecalis* in gut-like conditions**

To measure experimentally the impact of gallocin production in relevant *in vivo* conditions, a bacterial competition assay has been developed between the different *Sgg* mutants used in this study and two other gut bacteria: *E. faecalis*, that is sensitive to gallocin, and *E. coli* that is resistant to gallocin. These competitions were performed at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator in gut microbiota medium in order to mimic the conditions that the bacteria encounter in the host intestinal tract.

*E. faecalis* CFU after competition were about 5,000 times lower with *Sgg* WT as compared to the gallocin defective mutants confirming the inhibitory activity of gallocin in these conditions (**Figure 4A**). This inhibition was even stronger with the *blpS* mutant as we did not observe any *E. faecalis* CFU on the selective Entero agar plates after competition (the lower detection threshold in these experiments was considered to be 1000 CFU/ml). Control competition experiments with gallocin resistant gut *E. coli* did not show any variations in *E. coli* CFU with the various *Sgg* mutants (**Figure 4B**). Growth defects were observed when comparing *Sgg* WT or  $\Delta blpS$  CFU/mL at the end of the competition experiment to that of the gallocin defective mutants ( $\Delta gsp$ ,  $\Delta blpH$ ,  $\Delta blpR$ ,  $\Delta gIIA$ -*gip*, data not shown). It suggests that gallocin production may have a biological cost in certain conditions, even if the results were not statistically significant.

#### **5- Identification of a consensus DNA motif upstream from genes controlled by the BlpRH TCS**

We next searched for conserved DNA motif(s) acting as putative binding site(s) in the promoter regions of the genes regulated by BlpR and BlpS. Our initial promoter sequence alignment of the gallocin locus genes (i.e. 250 base pairs upstream from the initiation codons) using Geneious software identified a conserved 15-bp motif (**Fig. 5A**). To improve the robustness of



**Figure 6: Binding of BlpR and BlpS to three regulated promoters**

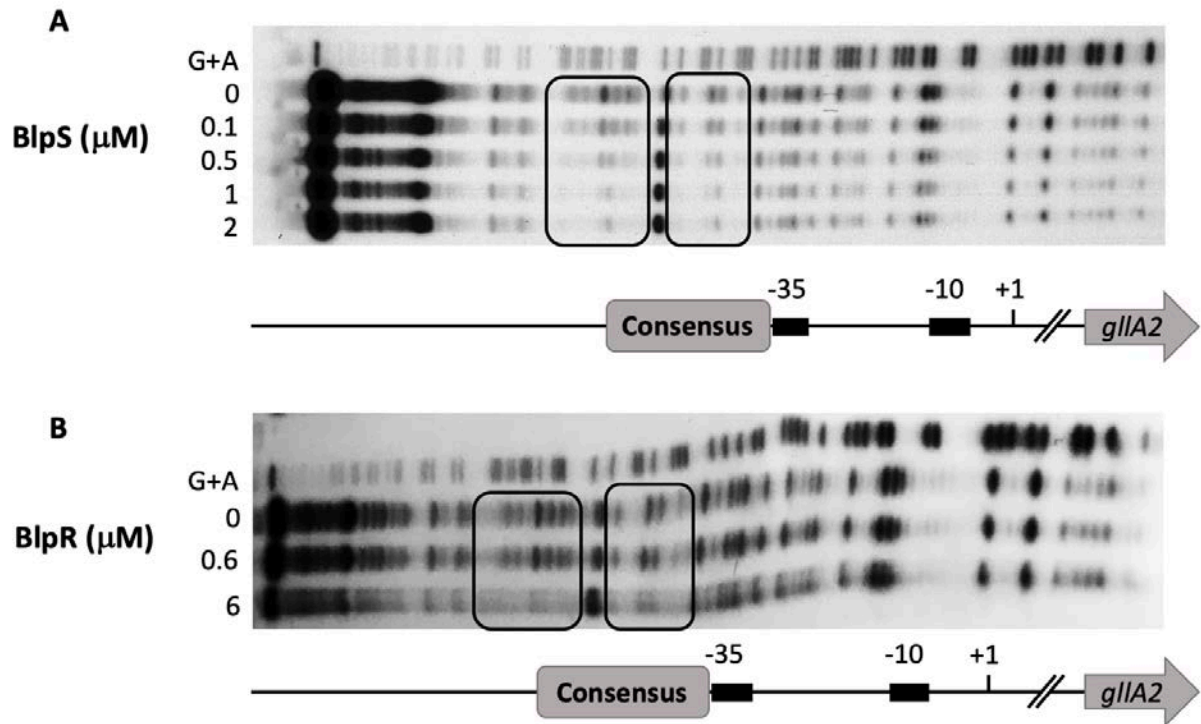
EMSA experiment demonstrating the binding of BlpS and BlpR to the promoter region of *gsp* (*Pgps*), *blpA*, *gllA* (*PgllA*) and *gllA* were the consensus sequence was randomly scrambled (*PgllA* scramble). *PgyrA* was used as a negative control. Serial two-fold dilution of the protein (from right to left) were incubated with purified radiolabelled promoters before migration. The leftmost band correspond to migration of the promoter alone. The full sequences of the various promoters are indicated in Table 3. All these experiments were carried out in presence of 0,1μg/μL poly dI:dC to prevent aspecific binding of proteins to DNA. One representative EMSA of three independent experiments is shown here for each condition.

the 15-bp consensus sequence, promoters of the twelve putative operons regulated by BlpH/R were analyzed with the MEME software (<http://meme-suite.org/tools/meme>). A larger consensus sequence of 30-bp including most nucleotides of the previously identified 15-bp motif (12 bp out of 15) was identified in all regulated promoters (**Fig. 5B**). Mapping of this motif on the whole *Sgg* UCN34 chromosome showed that it is highly specific as it is present only upstream from the operons in the gallocin locus, as well as two other bicistronic loci, *gallo\_rs03700* and *gallo\_rs05800*, identified by the transcriptome analysis (**Figs. 5C and 1A**). This 30-bp consensus motif, which is a likely binding site for BlpR and/or BlpS, contains 3 short repeats of 4 bp (C/TGAC). To map properly this motif in the *PgllA* promoter, we determined the transcription start sites (TSS) of the gallocin *gllA-gip* operon by RACE-PCR. The 30-bp consensus motif lies just upstream of the -35 region of the operon promoter (**Fig. 5D**).

## 6- Direct binding of BlpR and BlpS to various regulated promoters

To test the binding of BlpR and BlpS to the promoter regions that they control, electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were conducted on three regulated promoters *PgllA*, *Pgsp*, and *PblpA*, and the *PgyrA* promoter as a negative control. BlpR and BlpS were produced as recombinant N-terminally histidine-tagged proteins in *Escherichia coli* BL21(DE3) and purified by immobilized metal-ion affinity chromatography. The purified proteins migrated around their expected molecular mass (14.1 kDa and 29.3 kDa for the 6xHis-BlpS and 6xHis-BlpR, respectively) and were detected by Western blot using a His-tag monoclonal antibody (**Fig. S3A and B**). Direct binding of recombinant BlpR and BlpS to the three regulated promoters, i.e. *PgllA*, *PblpA* and *Pgsp* was observed by EMSA in a dose-dependent manner while no binding to the control promoter *PgyrA* was detected (**Fig 6**).

To demonstrate that the identified 30-bp consensus sequence is the binding site of BlpR and BlpS, EMSA experiments were repeated on a *PgllA* promoter in which the 30-bp motif was scrambled (**Fig S4**). As shown in **figure 6**, binding of both BlpR and BlpS was completely abolished. To define precisely the binding site of these two regulators, footprint assays were carried out with purified BlpR and BlpS on *gllA* and *blpA* promoters. As expected from the EMSA experiments, BlpS clearly binds and protects DNA on the identified consensus sequence in *gllA* and *blpA* promoters (**Fig 7A, Fig S5**). The footprint was even larger than the consensus sequence and includes about 12-bp upstream of the consensus. Interestingly, the putative -35 box of *gllA* appears free in presence of BlpS, suggesting that BlpS mediated inhibition proceeds

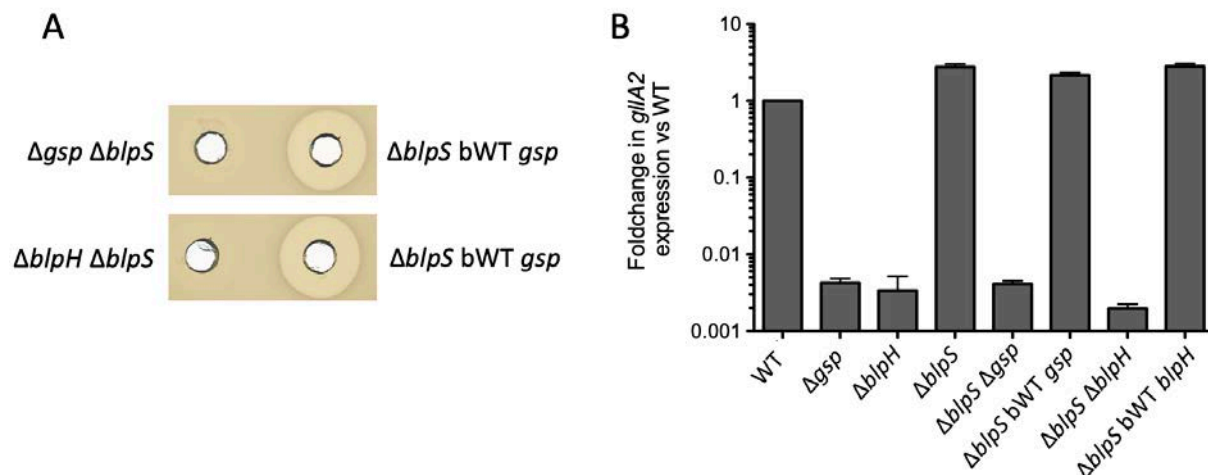


**Figure 7: The binding site of BlpR and BlpS is located on the identified consensus sequence**

Analysis of BlpR and BlpS footprint on *gllA* promoter. *gllA* promoter was incubated with growing concentration of BlpR or BlpS (indicated on the left) and digested by DNase. The sites protected from DNase by BlpR or BlpS binding are indicated by black squares. The sequence was determined by G+A sequencing and mapped on *gllA* promoter.

A: Footprint with BlpS protein

B: Footprint with BlpR protein



**Figure 8: Unphosphorylated BlpR can't activate gallicin genes transcription**

**A:** Agar diffusion assay showing gallicin activity in the culture supernatant against *Sgm*. Strain tested: *Sgg*  $\Delta blpS \Delta gsp$ , *Sgg*  $\Delta blpS$  bWT *gsp*, *Sgg*  $\Delta blpS \Delta blpH$  and *Sgg*  $\Delta blpS$  bWT *blpH*.

**B:** qRT-PCR data showing the foldchange in mRNA abundance of the *gllA2* gene between *Sgg* UCN34 WT and different *Sgg* mutants.



through competition with BlpR rather than inhibition of RNA polymerase binding by sequestration of the -35. Consistent with this hypothesis, BlpR binding site is apparently very similar to that of BlpS (**Fig 7B**). However, footprint experiments with BlpR were more difficult to obtain probably because BlpR appeared very instable.

## **6- Phosphorylated BlpR binds to *gllA* promoter with a higher affinity than non-phosphorylated BlpR**

*In vitro* phosphorylation of BlpR using acetyl phosphate as a non-specific donor increased its DNA binding affinity (**Fig S6**). Since unphosphorylated form of BlpR was still able to bind *gllA* promoter (**Fig 6**), we wonder if BlpS role could be to prevent the binding of unphosphorylated BlpR, while the phosphorylated form of BlpR could outcompete BlpS. To test this hypothesis, we constructed the two mutants  $\Delta blpS-gsp$  and  $\Delta blpS-blpH$  in *Sgg* UCN34 by deleting the *gsp* and *blpH* gene respectively in *Sgg*  $\Delta blpS$ . In these double mutants, BlpS is absent and BlpR should be unphosphorylated because either GSP or its associated histidine kinase BlpH is absent. The supernatants of these two mutants were not active against *Sgm* suggesting that unphosphorylated BlpR cannot activate gallocin expression even in the absence of the repressor BlpS (**Fig 8A**). To validate this result at the transcriptional level, qPCR experiments were carried out and showed that *gllA2* transcription is reduced at the same level in these double mutants as it is in  $\Delta gsp$  and  $\Delta blpH$  (**Fig 8B**). Taken together, these results show that only phosphorylated BlpR can activate gallocin transcription and that BlpS compete with phosphorylated BlpR to reduce gallocin expression.



## Discussion

*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Sgg*) belongs to Group D streptococci, a large group of phenotypically diverse bacteria known as the *S. bovis* /*S. equinus* complex (SBSEC), which consist of safe-graded bacteria used in food-fermentation, commensal bacteria of the gut and opportunistic pathogens in both humans and animals (17). *Sgg* is a commensal inhabitant of the rumen of herbivores, a complex ecological habitat harboring several thousand bacterial species. In humans, it is an opportunistic pathogen causing septicemia and endocarditis in elderly persons. Association between *Sgg* infections and underlying colon neoplasia has been reported by clinicians since the 1950s (2). Recently, we showed that *Sgg* strain UCN34 takes advantage of tumoral conditions to colonize the mouse colon (4). *Sgg* produces and secretes a specific bacteriocin, named gallocin, whose antimicrobial activity is potentiated by increased levels of secondary bile salts found in colonic neoplasia to inhibit the growth of closely related Enterococci commensals, thus creating a colonization niche for *Sgg* in tumoral conditions (4).

Gallocin is encoded by two genes, recently renamed *gllA1* and *gllA2*, which are absent from the most closely related bacteria belonging to the SBSEC, including *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus*. Another gallocin variant was recently reported in *Sgg* from a milk isolate and named gallocin D (14). Gallocin is a class II bacteriocin, and members of this family are widespread among lactic acid bacteria, including streptococci. These molecules are usually directed against closely related bacteria competing within the same environment. The genetic locus encoding gallocin in *Sgg* UCN34 is complex and shares similarities with other prototypical class II bacteriocin loci with genes encoding a putative immunity protein, a dedicated ABC transporter, several other putative bacteriocins and a regulatory system (7, 18).

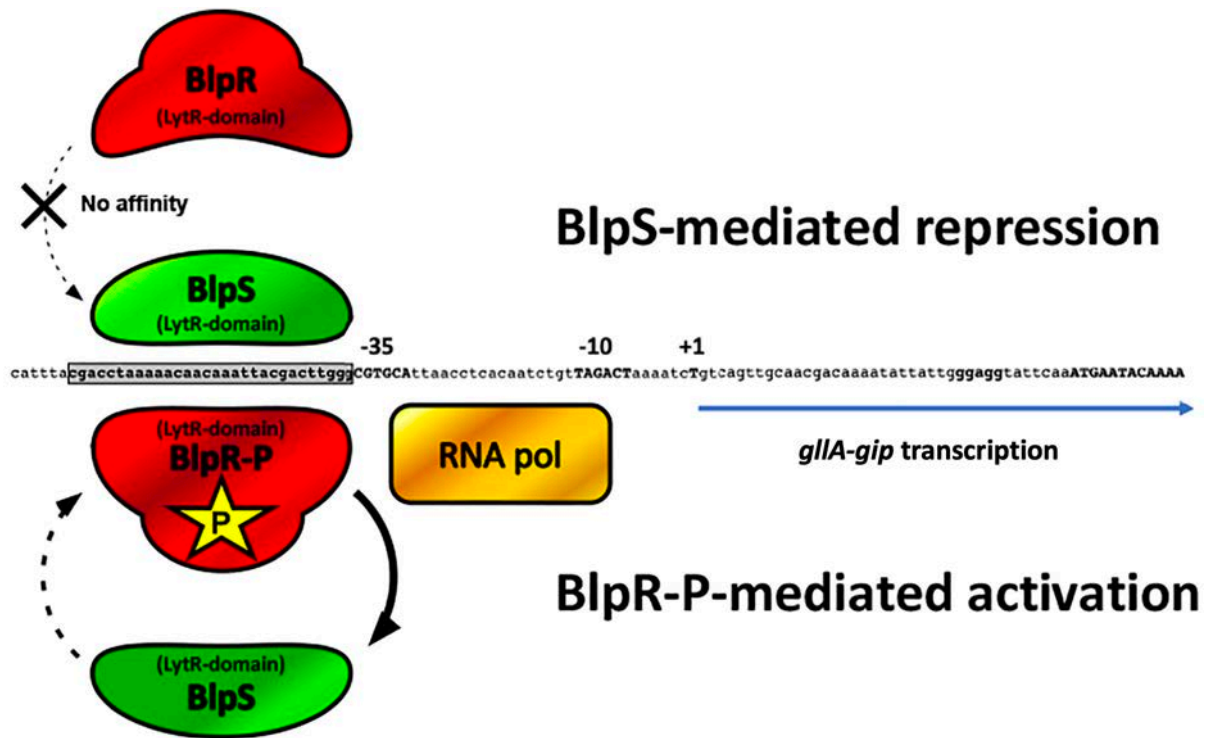
In this work, we demonstrated that gallocin production in *Sgg* is induced by a secreted peptide named GSP (for gallocin stimulating peptide) through the activation of a dedicated TCS composed of BlpH, a putative membrane histidine kinase, and BlpR, a putative cytoplasmic response regulator. Using a GFP-based reporter plasmid to monitor gallocin promoter (*PgllA*) activity, we showed that synthetic 24-mer GSP activates gallocin promoter in a dose-dependent manner. GSP was shown to be secreted through the gallocin ABC transporter (designated BlpAB). A structure/function analysis of the GSP peptide demonstrated the importance of its C-terminal half (Harrington-Proutière et al., accompanying paper). Since bacteriocin

production has been linked to natural competence in various streptococci, including *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. thermophilus*, we looked at competence induction in *Sgg* UCN34 using a reporter plasmid in which the *comX* promoter was cloned upstream of the *gfp*. We showed that *PcomX* was induced by XIP, the mature ComS peptide in agreement with previous result (19). However, no *PcomX* induction was observed using the GSP peptide (**Fig. S7**).

Our RNA-seq data revealed that transcription of five other putative bacteriocin genes was co-induced with gallocin genes, but whose roles are unknown. Only one of these has a double glycine motif in the N-terminal part, similar to the gallocin peptides while others have very different amino acid sequences (one being very rich in positively charged amino acids) suggesting that these other putative bacteriocins could have different roles. Only two additional operons encoding an ABC transporter and hypothetical proteins, located elsewhere in UCN34 genome, were co-induced with the gallocin locus.

We also uncovered the role of a second regulatory protein named BlpS which represses all the genes activated by GSP/BlpRH. This small 108-aa protein consists almost entirely of a LytTR DNA-binding domain. Most proteins containing a LytTR domain studied previously also contain an additional phospho-acceptor domain typical of TCS regulators (Interpro domain : IPR007492, (20)). Of note, two transcriptional regulators whose architecture is similar to that of BlpS were identified in *S. mutans*. However, these regulators are in operon with a transmembrane protein which inhibits their activity (21, 22). Thus, BlpS differs from these so-called LytTR Regulatory Systems (LRS) as it forms an operon with a classical TCS that it antagonizes. An *in silico* analysis revealed that 15,409 of the 80,096 LytTR-type regulators (Uniprot database) contained only this functional domain, and of these 1,565 have a size similar to BlpS (between 100 and 120 amino acids). These proteins were found both in gram-negative and gram-positive bacteria. Among them, we identified the homologous BlpS protein from *Streptococcus pneumoniae* belonging to the *blp* locus encoding pneumocins which is highly similar in its organization to the gallocin locus (23). We therefore speculate that *blpS* gene of *S. pneumoniae* potentially encodes a negative regulator of pneumocin production.

To define precisely the respective role of BlpR and BlpS in regulation, we constructed the mutant  $\Delta blpR-blpS$ . This mutant did not produce gallocin, showing that BlpR is necessary for transcriptional activation of gallocin genes even in the absence of the repressor BlpS. Then, we



**Figure 9: Hypothetical model of transcription regulation by BpR and BpS**

At low cell-densities, i.e. in the absence or at low concentrations of GSP, BpR is not phosphorylated by BpH and hence has not affinity for the conserved binding motif located in the promoter of galloicin genes which is occupied by the BpS repressor. At high cell-densities, the GSP concentration is sufficient to induce BpH-mediated phosphorylation of BpR. Phosphorylated BpR (BpR-P) outcompetes BpS, resulting in RNA-polymerase recruitment and transcription of galloicin genes. The antagonistic effect of BpS and BpR-P controls the level of expression of the galloicin genes which is shutdown when GSP concentration decreases.

showed by EMSA and by DNA footprint that both BlpR and BlpS bind directly on the same consensus sequence that is present in all the promoter regions of the genes whose transcription is activated by BlpR (**Fig 6 and 7**). Altogether, our results suggest that BlpS-mediated inhibition occurs through direct competition with BlpR at the same binding site.

Although the recombinant BlpR purified from *E. coli* is presumably non phosphorylated, it binds the tested promoters albeit less efficiently than its phosphorylated form (**Fig S6**). We thus hypothesized that the role of BlpS role was to prevent transcription activation by unphosphorylated BlpR. However, this possibility was ruled out in *Sgg* UCN34 through careful analysis of double mutants  $\Delta gsp-blpS$  or  $\Delta blpH-blpS$ , both unable to phosphorylate BlpR. In these mutants, no activation of *gllA2* transcription could be detected (**Fig. 8**). We thus propose the following working model to explain gallocin regulation through GSP-BlpRH-BlpS (**Fig. 9**). At low cell density, BlpR is unphosphorylated and cannot activate transcription while BlpS binds to the promoters of the genes involved in gallocin production to block their transcription. At higher cell-density, sufficient amounts of GSP are present to induce BlpH-mediated phosphorylation of BlpR which, in turn, competes with BlpS to bind to the promoter region and trigger transcription of gallocin genes. The role of BlpS is likely to reduce the over-activation of the GSP-BlpRH system to prevent self-toxicity or reduce the metabolic costs associated with gallocin production and to rapidly shut-down its synthesis when the concentration of inducer decreases.

In conclusion, we identified here an atypical 4-component system involved in the regulation of bacteriocin production in *Sgg* UCN34, which could represent a new prototype of bacteriocin regulation. Bacteria have developed complex regulatory systems to control bacteriocin production in order to reduce its fitness cost. Indeed, we previously showed that the  $\Delta blp$  mutant, which does not produce gallocin, colonize better than its *Sgg* WT counterpart in the non-tumoral murine intestinal tract. Although the  $\Delta blpS$  mutant, which overproduced gallocin, did not exhibit a significant growth defect *in vitro*, it remains possible that the increased production of gallocin could have an impact on its fitness *in vivo*, where nutrients are limited. Finally since gallocin is particularly active in tumoral conditions, it will be important in future studies to see if some tumoral metabolites could induce gallocin transcription *in vivo*.

## **Material and Methods:**

### **Cultures, bacterial strains, plasmids and oligonucleotides**

*Streptococci* used in this study were grown at 37°C in Todd-Hewitt broth supplemented with yeast extract 0.5% (THY) in standing filled flasks. When appropriate, 10µg/mL of erythromycin were added for plasmid maintenance.

Plasmid construction was performed by: PCR amplification of the fragment to insert in the plasmid with Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs), digestion with the appropriate FastDigest restriction enzyme (ThermoFisher), ligation with T4 DNA ligase (New England Biolabs) and transformation in commercially available TOP10 competent *E. coli* (ThermoFisher). *E. coli* transformants were cultured in LB Miller's supplemented with 150 µg/mL erythromycin (for pG1 derived plasmids) or 50 µg/mL kanamycin (pTCV- derived and pET28a plasmids). Verified plasmids were electroporated in *S. agalactiae* NEM316 and mobilized from NEM316 to *Sgg* UCN34 by conjugation as described previously (24). All the strains used and constructed in this study are listed in table 1, primers in table 2.

### **Construction of markerless deletion mutants in *Sgg* UCN34**

In frame deletion mutants were constructed as described previously (24). Briefly, the 5' and 3' region flanking the region to delete were amplified and assembled by splicing by overlap extension PCR and cloned into the thermosensitive shuttle vector pG1. Once transformed in UCN34, the cells were cultured at 38°C with erythromycin to select for the chromosomal integration of the plasmid by homologous recombination. About 4 single cross-over integrants were serially passaged at 30 °C without antibiotic to facilitate the excision of the plasmid resulting either in gene deletion or back to the WT (bWT). In-frame deletions were identified by PCR and confirmed by DNA sequencing of the chromosomal DNA flanking the deletion.

### **Gallocin production assays**

Briefly, one colony of the indicator strain, here *Streptococcus macedonicus*, was resuspended in 2 mL THY, grown until exponential phase, poured on a THY agar plate and the excess liquid was removed and left to dry under the hood for about 20 min. Using sterile tips, 5-mm-diameter wells were dug into the agar. Each well was then filled with 80 µL of filtered supernatant from 5 h cultures (stationary phase) of *Sgg* WT or mutant strains and supplemented with Tween 20 0.1% final concentration. Inhibition rings around the wells were observed the following morning after overnight incubation at 37°C.

### **Monitoring promoter activity using a fluorescent reporter**

Promoter sequences of genes encoding galloicin (*Pglla*) or GSP (*Pgsp*) were amplified with overhanging *EcoR*I and *Bam*H1 sites and cloned in the reporter pTCV $\Omega$ gfp vector upstream from the *gfp* gene to control its expression. Bacteria containing the plasmid were inoculated at an initial OD<sub>600</sub> of 0.1 from fresh agar plates in 200  $\mu$ L of media in 96-well black plates. Due to the high autofluorescence of the THY medium, we switched to M9 medium supplemented with yeast extract 0.5% and glucose 0.2% (M9Y). Promoter activity was then followed by continuous measurement of the growth and GFP fluorescence (one measure every 30 min during 10 h) of the cultures with the Synergy<sup>TM</sup>2 Multi-detection microplate reader (Biotek). Promoter activity was then estimated by dividing the fluorescence value by the OD<sub>600</sub> value for each time point.

### **Induction of *PtetO* promoter in *Sgg***

Using the reporter plasmid pTCV $\Omega$ *PtetO-gfp*, we defined the minimal concentration of anhydrotetracycline necessary to fully induce *PtetO* promoter in *Sgg* UCN34 to be 200 ng/mL. The *blpS* gene was cloned in the pTCV-*PtetO* in *E. coli* and then introduced in WT *Sgg* UCN34 and  $\Delta$ *blpS* and *blpS* expression was induced with 200 ng/mL anhydrotetracycline.

### **Transcriptomic analysis and Real-Time Quantitative Reverse Transcription**

Total RNAs were extracted from exponentially growing *Sgg* strains (OD<sub>600</sub>=0.5) in THY at 37°C with the MP Biomedicals<sup>TM</sup> FastRNA<sup>TM</sup> Pro Blue Kit following the manufacturer's recommendations. 20  $\mu$ g of bacterial RNA were treated with DNase I (Invitrogen<sup>TM</sup> Ambion<sup>TM</sup> TURBO DNA-free Kit) to remove residual genomic DNA and then DNase I was inactivated with the recommended reagent.

For whole transcriptomic analysis, rRNA were depleted from 0.5  $\mu$ g of total RNA using the Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria) from Illumina. Sequencing libraries were constructed using the TruSeq Stranded mRNA Sample preparation kit (20020595) following the manufacturer's instructions (Illumina). The directional libraries were controlled on Bioanalyzer DNA1000 Chips (Agilent Technologies) and concentrations measured with the Qubit® dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher). Sequences of 65 bases were generated on the

Illumina HiSeq 2500 sequencer. Reads were cleaned of adapter sequences and low-quality sequences using cutadapt version 1.11 (25). Only sequences at least 25 nt in length were considered for further analysis. Bowtie version 1.2.2 (26), with default parameters, was used for alignment on the reference genome (NC\_013798.1, from NCBI). Genes were counted using featureCounts version 1.4.6-p3 (27) from Subreads package (parameters: -t gene -g locus\_tag -s 1). Count data were analyzed using R version 3.5.1 and the Bioconductor package DESeq2 version 1.20.0 (28). The normalization and dispersion estimation were performed with DESeq2 using the default parameters and statistical tests for differential expression were performed applying the independent filtering algorithm. A generalized linear model was set in order to test for the differential expression between the WT,  $\Delta gsp$ ,  $\Delta blpH$  and  $\Delta blpR$  biological conditions. For each pairwise comparison, raw p-values were adjusted for multiple testing according to the Benjamini and Hochberg (BH) procedure (29) and genes with an adjusted p-value lower than 0.05 were considered differentially expressed. The raw data of this transcriptomic analysis are available on GEO data server (accession number: GSE148401).

The heatmaps representing the results in this paper were realized with all the genes from *Sgg* UCN34 genomes (figure 2A) or with genes whose expression is significantly different in at least one mutant compare to the WT (figure 2B). Here, gene expression was considered significantly different if the adjusted p-value was lower than 0.01 and if the  $\log_2$  fold-change in gene expression was inferior to -2 or superior to 2 compare to WT. Finally, some non-assigned genes whose expression was very low (50-150 reads per gene) but significantly different in the  $\Delta blpR$  mutant were also suppressed from this heat-map for clarity purpose.

For real-time quantitative reverse transcription, cDNAs were obtained from 1  $\mu$ g of RNA treated with DNase I using the iScript™ cDNA Synthesis Kit. Real-time quantitative PCR was carried out on three independent biological replicates in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) in 20  $\mu$ L mix containing 10  $\mu$ L EvaGreen Universal qPCR Supermix (Bio-Rad), 1  $\mu$ L gene specific primers (10  $\mu$ M) and 5  $\mu$ L of a 100-fold dilution of cDNA. Fold-change in expression compare to WT were obtained by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. For statistical analysis, RT-qPCR data were analyzed using ANOVA: for each gene a model that explains  $\Delta Ct$  values was fitted, including the replicate effect as random. The model also includes the strain (Fig. 2C) or the strain, the condition and their interactions (Fig. 3D) as fixed effects. Pairwise comparisons were tested thanks to the emmeans R package version 1.4.2 and p-values were adjusted for multiple testing using the Tukey method.

## **RACE-PCR**

RACE-PCR to determine the transcriptional start site was performed with the 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (ThermoFisher) following the manufacturer protocol. Briefly, total RNAs were purified from a *Sgg* UCN34 WT culture as indicated above. cDNA of *gllA-gip* mRNA was obtained by reverse transcription with a gene specific primer. A homopolymeric tail was added to the 3'-end of the cDNA, corresponding to the former 5' end of the mRNA. The cDNA was amplified by PCR with another gene specific primer located in the cDNA and a deoxyinosine-containing anchor primer provided in the kit that anneals to the homopolymeric tails of the cDNA. The resulting PCR fragment was cloned in the Zero Blunt™ TOPO™ plasmid (Thermofisher) and transformed in *E. coli*. After purification, plasmids were sequenced and sequence alignment was performed to identify the transcription start site.

## **Competition**

*Sgg* strains were inoculated from fresh agar plate at DO=0,05 together with *E. faecalis* V583 (30) or *E. coli* (31) in gut microbiota medium and incubated for 5h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator to mimic the anaerobic conditions of the gut. *E. faecalis* was also inoculated at DO=0,05 from a fresh agar plate while *E. coli* was inoculated at DO=0,1 from an overnight culture in GMM to overcome its lower growth rate in these conditions. After 5h, cultures were serially diluted and plate on selective agar plates. *Sgg* was selected on THY+tetracycline (2µg/mL) plates, *E. faecalis* on entero agar plates and *E. coli* on LB+erythromycin (10µg/mL). CFU were counted the following morning to determine the final concentration in CFU/mL in each competition.

## **Production and purification of His-tagged recombinant proteins**

Full length *blpR* and *blpS* were cloned in the pET28a vector in order to obtain 6His-tagged proteins at their N-terminus and after sequence verification the recombinant plasmids were transferred in the host expression vector *E. coli* BL21(DE3). Histidine-tagged proteins were purified as previously described (32). Briefly, *E. coli* cells carrying the plasmid were grown in 500 mL LB supplemented with kanamycin (50 µg/mL) at 37°C with agitation until reaching OD<sub>600</sub>~ 0.5. At this point, 1mM IPTG was added to the culture to induce protein expression and the culture was incubated for 3 h at 37°C with agitation. Cells were pelleted, incubated overnight at -20°C and resuspended in 20 mL of basis buffer (32) containing 1 mg/mL of lysozyme to lyse them. Cell debris were eliminated by centrifugation and 1 mL of Ni-NTA



superflow beads (Qiagen) was added to bind his-tagged proteins. After washing on a gravity flow column, his-tagged proteins were eluted with an elution buffer containing 500 mM imidazole (32). Fraction containing the recombinant protein were pooled and resuspended in the following buffer (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, DTT 1mM, glycerol 20%, pH=8) using PD10 columns. Purified proteins were conserved at -80°C. Just before utilization, proteins were concentrated around 10-fold on Vivaspin column (5kDa cutoff) and protein concentration was estimated by measurement of the OD<sub>280</sub>.

### **DNA-protein interactions**

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and footprint were performed as described previously (33). Briefly, promoter sequences (Table 3) of about 150 bp were amplified by PCR and cloned in the pTCV-lac vector (34). *gllA* promoter and its scrambled derivative were chemically synthesized by Genecust, amplified by PCR and cloned in the pTCV-lac vector. All promoters were then amplified by PCR with radiolabeled primer specific for the plasmid cloning site (VlacE, VlacB). Radiolabeled PCR diluted 100-fold were incubated 20 min in binding buffer (25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10% glycerol) supplemented with 0.02 µg / µl BSA and 0.1 µg / µl of Poly DI-DC (Sigma) in presence of serial two-fold dilution of purified BlpR/BlpS or buffer. After migration of the different reactions on a 6% polyacrylamide gel for 1 h, gels were analyzed by autoradiography. The same binding conditions were used for footprint. After binding, DNA was digested with 62,5 ng/mL of DNaseI (Worthington Biochemical) for 30 seconds at room temperature. The reaction was then stopped and the DNA purified by phenol extraction and ethanol precipitation. Purified DNA was migrated on 6% polyacrylamide/7 M urea sequencing gels that were analyzed by autoradiography. Maxam and Gilbert reactions (A + G) were carried out on the same promoters to determine their sequence and localize the observed footprints.

### **BlpR phosphorylation**

In vitro phosphorylation was performed by incubating BlpR at 37°C for one hour in presence of 35mM acetyl phosphate (Sigma) and 20mM MgCl<sub>2</sub>.

## **Acknowledgements**

We would like to thank particularly Odile Sismeiro for the construction of the transcriptome library and Rachel Legendre for the bioinformatic analysis of the transcriptome and its deposit on GEO database. We are also grateful to Christophe Rusniok for his help in the search of LytTR-only proteins, Christine Dang for the reporter plasmid construction and Tarek Msadek for careful and critical reading of the manuscript. We also thank Maria Vittoria Mazzuoli for providing their expertise in EMSA experiments and Gaël Millot for its help with the statistical analysis of qRT-PCR data. This study has been funded by the Institut National contre le Cancer (INCA) PLBIO 16-025 attributed to S. Dramsi.

## REFERENCES

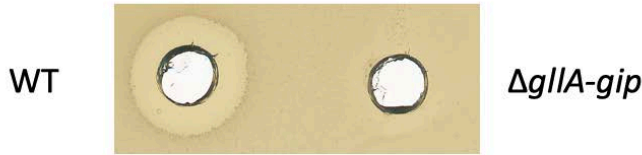
1. Hoen B, Chirouze C, Cabell CH, Selton-Suty C, Duchêne F, Olaison L, Miro JM, Habib G, Abrutyn E, Eykyn S, Bernard Y, Marco F, Corey GR, International Collaboration on Endocarditis Study Group. 2005. Emergence of endocarditis due to group D streptococci: findings derived from the merged database of the International Collaboration on Endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 24:12–16.
2. Boleij A, Tjalsma H. 2012. Gut bacteria in health and disease: a survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biol Rev* 87:701–730.
3. Corredoira-Sánchez J, García-Garrote F, Rabuñal R, López-Roses L, García-País MJ, Castro E, González-Soler R, Coira A, Pita J, López-Álvarez MJ, Alonso MP, Varela J. 2012. Association Between Bacteremia Due to *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis* I) and Colorectal Neoplasia: A Case-Control Study. *Clin Infect Dis* 55:491–496.
4. Aymeric L, Donnadiou F, Mulet C, du Merle L, Nigro G, Saffarian A, Bérard M, Poyart C, Robine S, Regnault B, Trieu-Cuot P, Sansonetti PJ, Dramsi S. 2018. Colorectal cancer specific conditions promote *Streptococcus gallolyticus* gut colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E283–E291.
5. Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, Chakraborty R, Hayward M, Simpson P, Cao Y, Bousounis P, Kristich CJ, Salzman NH. 2015. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian GI tract. *Nature* 526:719–722.
6. Heng NCK, Wescombe PA, Burton JP, Jack RW, Tagg JR. 2007. The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria, p. 45–92. *In* Riley, PDMA, Chavan, DMA (eds.), *Bacteriocins*. Springer Berlin Heidelberg.
7. Opegård C, Rogne P, Emanuelsen L, Kristiansen PE, Fimland G, Nissen-Meyer J. 2007. The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13:210–219.
8. de Saizieu A, Gardès C, Flint N, Wagner C, Kamber M, Mitchell TJ, Keck W, Amrein KE, Lange R. 2000. Microarray-Based Identification of a Novel *Streptococcus pneumoniae* Regulon Controlled by an Autoinduced Peptide. *J Bacteriol* 182:4696–4703.
9. van der Ploeg JR. 2005. Regulation of Bacteriocin Production in *Streptococcus mutans* by the Quorum-Sensing System Required for Development of Genetic Competence. *J Bacteriol* 187:3980–3989.
10. Shanker E, Federle MJ. 2017. Quorum Sensing Regulation of Competence and Bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and *mutans*. *Genes* 8.
11. Morrison DA, Guédon E, Renault P. 2013. Competence for Natural Genetic Transformation in the *Streptococcus bovis* Group *Streptococci* *S. infantarius* and *S. macedonicus*. *J Bacteriol* 195:2612–2620.
12. Harrington A, Tal-Gan Y. 2018. Identification of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (Biotype I) Competence-Stimulating Peptide Pheromone. *J Bacteriol* 200.
13. Rusniok C, Couvé E, Da Cunha V, El Gana R, Zidane N, Bouchier C, Poyart C, Leclercq R, Trieu-Cuot P, Glaser P. 2010. Genome sequence of *Streptococcus gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. *J Bacteriol* 192:2266–2276.
14. Hill D, O'Connor PM, Altermann E, Day L, Hill C, Stanton C, Ross RP. 2020. Extensive bacteriocin gene shuffling in the *Streptococcus bovis* / *Streptococcus equinus* complex reveals gallocin D with activity against vancomycin resistant enterococci. 1. *Sci Rep* 10:13431.
15. van Belkum MJ, Worobo RW, Stiles ME. 1997. Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 23:1293–1301.

16. Danne C, Dubrac S, Trieu-Cuot P, Dramsi S. 2014. Single cell stochastic regulation of pilus phase variation by an attenuation-like mechanism. *PLoS Pathog* 10:e1003860.
17. Jans C, Meile L, Lacroix C, Stevens MJA. 2015. Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis* 33:419–436.
18. Nissen-Meyer J, Oppegård C, Rogne P, Haugen HS, Kristiansen PE. 2010. Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2:52–60.
19. Fontaine L, Goffin P, Dubout H, Delplace B, Baulard A, Lecat-Guillet N, Chambellon E, Gardan R, Hols P. 2013. Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci. *Mol Microbiol* 87:1113–1132.
20. Nikolskaya AN, Galperin MY. 2002. A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. *Nucleic Acids Res* 30:2453–2459.
21. Xie Z, Okinaga T, Niu G, Qi F, Merritt J. 2010. Identification of a Novel Bacteriocin Regulatory System in *Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol* 78:1431–1447.
22. Zou Z, Qin H, Brenner AE, Raghavan R, Millar JA, Gu Q, Xie Z, Kreth J, Merritt J. 2018. LytTR Regulatory Systems: A potential new class of prokaryotic sensory system. *PLOS Genet* 14:e1007709.
23. Kjos M, Miller E, Slager J, Lake FB, Gericke O, Roberts IS, Rozen DE, Veening J-W. 2016. Expression of *Streptococcus pneumoniae* Bacteriocins Is Induced by Antibiotics via Regulatory Interplay with the Competence System. *PLoS Pathog* 12.
24. Danne C, Guérillot R, Glaser P, Trieu-Cuot P, Dramsi S. 2013. Construction of isogenic mutants in *Streptococcus gallolyticus* based on the development of new mobilizable vectors. *Res Microbiol* 164:973–978.
25. Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 1. *EMBnet.journal* 17:10–12.
26. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 10:R25.
27. Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinforma Oxf Engl* 30:923–930.
28. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
29. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 57:289–300.
30. Paulsen IT, Banerjee L, Myers GSA, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Heidelberg JF, Tettelin H, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac L, Beanan M, Daugherty S, DeBoy RT, Durkin S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, Vamathevan J, Tran B, Upton J, Hansen T, Shetty J, Khouri H, Utterback T, Radune D, Ketchum KA, Dougherty BA, Fraser CM. 2003. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299:2071–2074.
31. Moriel DG, Bertoldi I, Spagnuolo A, Marchi S, Rosini R, Nesta B, Pastorello I, Corea VAM, Torricelli G, Cartocci E, Savino S, Scarselli M, Dobrindt U, Hacker J, Tettelin H, Tallon LJ, Sullivan S, Wieler LH, Ewers C, Pickard D, Dougan G, Fontana MR, Rappuoli R, Pizza M, Serino L. 2010. Identification of protective and broadly conserved vaccine antigens from the genome of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 107:9072–9077.
32. Priestersbach A, Kubicek J, Schäfer F, Block H, Maertens B. 2015. Chapter One - Purification of His-Tagged Proteins, p. 1–15. *In* Lorsch, JR (ed.), *Methods in Enzymology*. Academic Press.
33. Devaux L, Sleiman D, Mazzuoli M-V, Gominet M, Lanotte P, Trieu-Cuot P, Kaminski

- P-A, Firon A. 2018. Cyclic di-AMP regulation of osmotic homeostasis is essential in Group B Streptococcus. PLoS Genet 14.
34. Poyart C, Trieu-Cuot P. 1997. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to  $\beta$ -galactosidase in Gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Lett 156:193–198.

## Supplementary Material and tables

**A**



**B**

GSP predicted sequence:

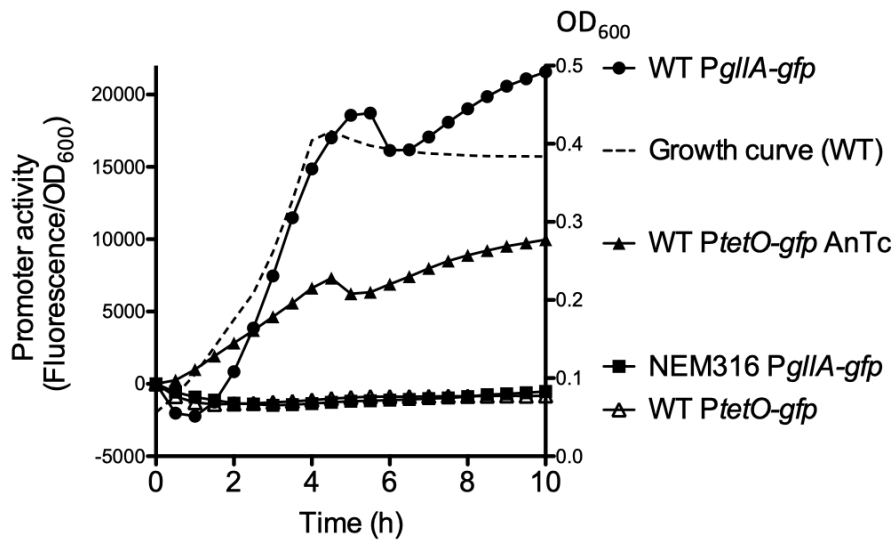
Nter-MMTEKMFKELNQSELEKTI**GG**KNKDFLIVGPFDWLKKNHKPTKHA-Cter



### Supplemental figure 1: Susceptibility of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* to gallocin and GSP amino acid sequence

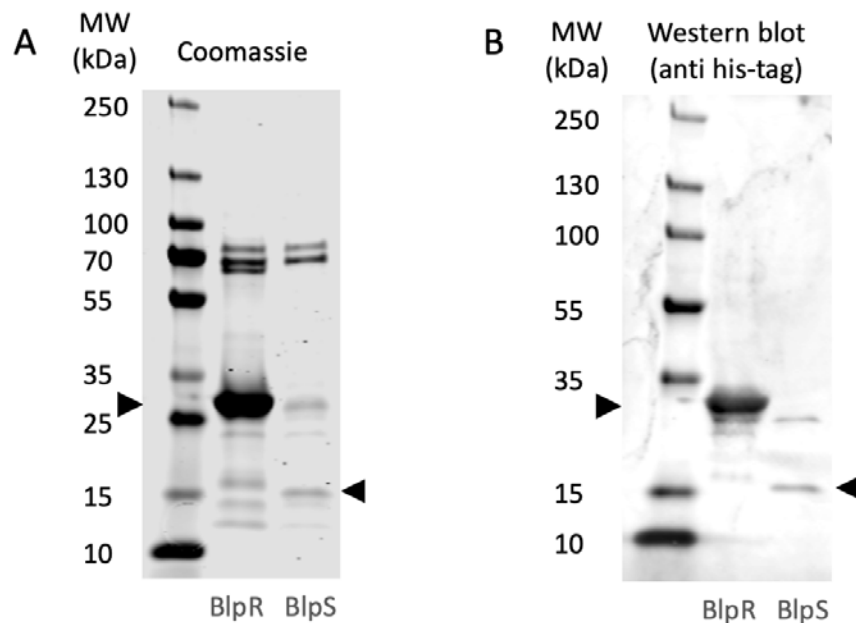
**A:** Agar diffusion assay of *Sgg* UCN34 WT and  $\Delta gIIA-gip$  supernatant on a lawn of *Sgm*.

**B:** Amino acid sequence of GSP obtained by translation of *gsp* gene. Predicted cleavage site indicated by a black arrowhead occurs after the double glycine motif in red. The synthetic peptide used in this study is composed of the 24 C-terminal residues in bold. The white arrowhead indicates the cleavage site identified after GSP purification from culture supernatant and sequencing (Harrington et Tal-Gan 2018 ; Harrington-Proutière et al., 2020, companion paper).



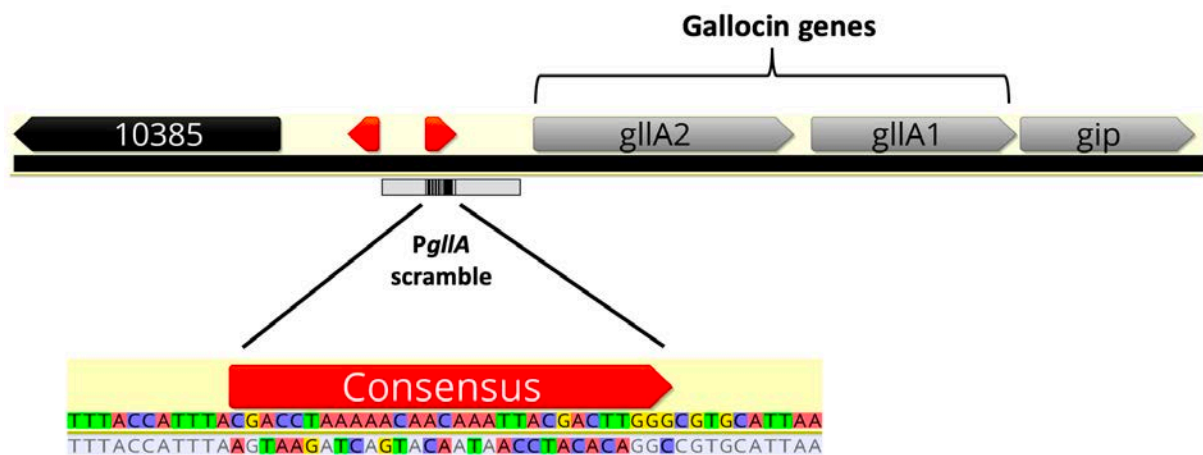
### Supplementary figure 2: Monitoring GFP fluorescence using *PgIIA*- or *PtetO*- inducible promoters

*PgIIA* is active in *Sgg* UCN34 WT but not in GBS NEM316. *PtetO* was induced with 200 ng/mL of anhydrotetracycline (AnTc) in *Sgg* UCN34. All the strains exhibited very similar growth. For clarity purpose, only the growth curve of *Sgg* WT (*pTCVΩPgIIA-gfp*) is presented here as a dotted curve. One representative curve of three independent experiments is shown here for each condition.



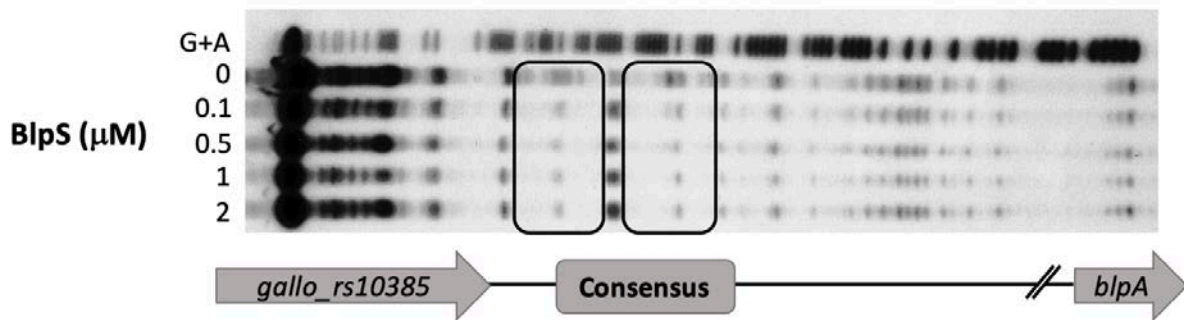
**Supplementary figure 3: SDS-PAGE and Western-blot analysis of purified histidine-tagged recombinant BlpR and BlpS proteins**

**A:** Visualization of purified recombinant BlpR and BlpS 10-fold concentrated on Vivaspin column (cut off 5,000 Da) by Coomassie staining and **B-** Western blotting using primary anti His tag monoclonal antibody followed by a secondary fluorescent conjugated goat anti mouse antibody. Position of BlpR and BlpS monomers is indicated with dark arrowhead.



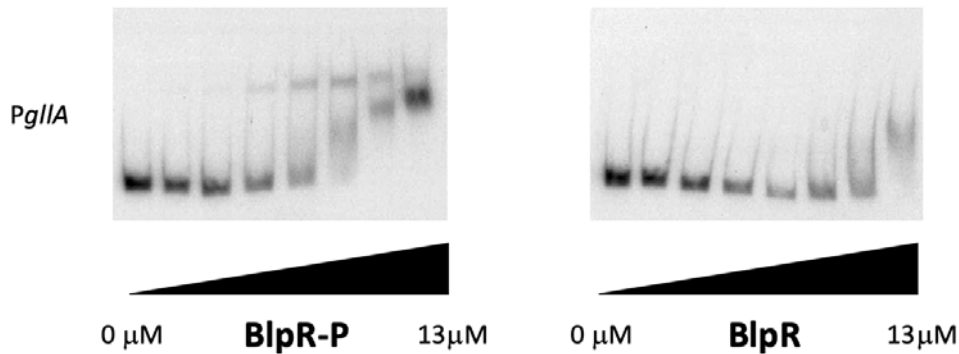
**Supplementary figure 4: Alignment between *PgIIA* and *PgIIA-scr***

Alignment of the *PgIIA*-scrambled promoter on the WT promoter region around the 30 bp conserved motif.



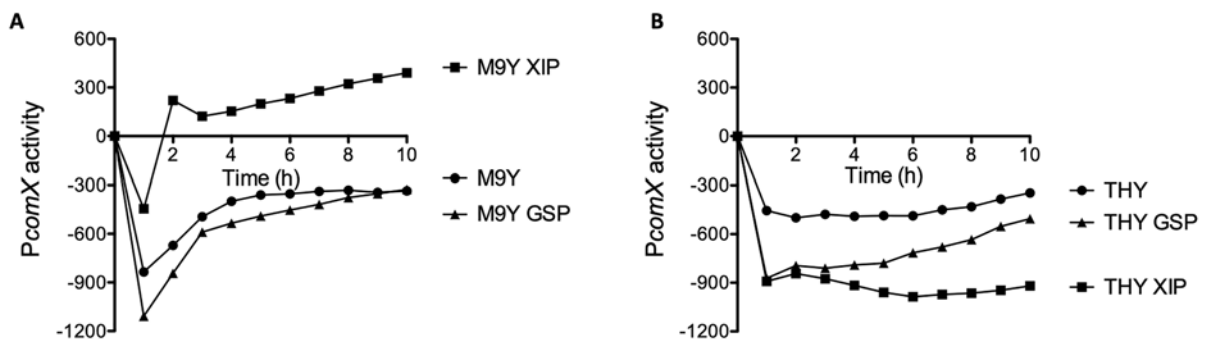
### Supplementary figure 5: BlpS binding on *blpA* promoter

Analysis of BlpS footprint on *blpA* promoter. *blpA* promoter was incubated with growing concentration of BlpS (indicated on the left) and digested by DNase. The sites protected from DNase by BlpS binding are indicated by black squares. The sequence was determined by G+A sequencing and mapped on *blpA* promoter.



### Supplementary figure 6: BlpR phosphorylation increases its DNA binding affinity

EMSA experiment demonstrating the binding of BlpR, phosphorylated (BlpR-P) or not (BlpR) by acetyl phosphate, to the promoter region of *gllA*.



### Supplementary figure 7: XIP but not GSP activates *comX* promoter

**A:** *comX* promoter (*PcomX*) activity in *Sgg* UCN34 pTCVΩ*PcomX-gfp* in presence of XIP (1 mM) or GSP (20 nM) in M9Y.

**B:** *comX* promoter (*PcomX*) activity in *Sgg* UCN34 pTCVΩ*PcomX-gfp* in presence of XIP (1 mM) or GSP (20 nM) in THY.



**Table 1: Strains used in this study**

N°	Strain	Source
NEM2431	<i>Streptococcus gallolyticus</i> subspecies <i>gallolyticus</i> UCN34	(Rusniok et al., 2010)
NEM2824	<i>Enterococcus faecalis</i> V583	(Paulsen et al., 2003)
	<i>E. coli</i> pks+	(Moriel et al., 2010)
NEM4838	UCN34 $\Delta$ <i>gllA-gip</i> (previously $\Delta$ <i>blpABC</i> )	(Aymeric et al., 2018)
NEM4522	<i>Escherichia coli</i> TOP10 pTCV $\Omega$ P <i>gllA-gfp</i>	This study
NEM4850	UCN34 $\Delta$ <i>gsp</i>	This study
NEM4853	UCN34 $\Delta$ <i>gsp</i> pTCV $\Omega$ P <i>gllA-gfp</i>	This study
NEM4858	UCN34 $\Delta$ <i>blpH</i>	This study
NEM4883	UCN34 $\Delta$ <i>blpH</i> pTCV $\Omega$ P <i>gllA-gfp</i>	This study
NEM4855	UCN34 $\Delta$ <i>blpR</i>	This study
NEM4872	UCN34 $\Delta$ <i>blpR</i> pTCV $\Omega$ P <i>gllA-gfp</i>	This study
NEM4851	UCN34 bWT <i>gsp</i>	This study
NEM4859	UCN34 bWT <i>blpH</i>	This study
NEM4856	UCN34 bWT <i>blpR</i>	This study
NEM5097	UCN34 $\Delta$ <i>blpS</i>	This study
NEM5098	UCN34 bWT <i>blpS</i>	This study
	UCN34 $\Delta$ <i>blpS</i> pTCV $\Omega$ P <i>gllA-gfp</i>	This study
NEM5171	<i>E. coli</i> pTCV $\Omega$ P <i>gsp-gfp</i>	This study
NEM5172	UCN34 pTCV $\Omega$ P <i>gsp-gfp</i>	This study
NEM5218	UCN34 $\Delta$ <i>blpS</i> pTCV $\Omega$ P <i>gsp-gfp</i>	This study
NEM5217	<i>E. coli</i> GM48 pTCV $\Omega$ P <i>tetO-blpS</i>	This study
NEM5202	UCN34 pTCV $\Omega$ P <i>tetO-blpS</i>	This study
NEM5204	UCN34 $\Delta$ <i>blpS</i> pTCV $\Omega$ P <i>tetO-blpS</i>	This study
NEM5227	UCN34 $\Delta$ <i>blpR</i> $\Delta$ <i>blpS</i>	This study
NEM5228	UCN34 bWT <i>blpR</i> $\Delta$ <i>blpS</i>	This study
NEM5229	UCN34 $\Delta$ <i>blpS</i> $\Delta$ <i>blpR</i>	This study
NEM5230	UCN34 bWT <i>blpS</i> $\Delta$ <i>blpR</i>	This study
NEM5394	UCN34 $\Delta$ <i>blpS</i> $\Delta$ <i>gsp</i>	This study
NEM5397	UCN34 $\Delta$ <i>blpS</i> bWT <i>gsp</i>	This study
NEM5425	UCN34 $\Delta$ <i>blpS</i> $\Delta$ <i>blpH</i>	This study
NEM5427	UCN34 $\Delta$ <i>blpS</i> bWT <i>blpH</i>	This study
NEM5214	<i>E. coli</i> bl21DE3 <i>pet28a</i> $\Omega$ <i>blpR</i>	This study
NEM5216	<i>E. coli</i> bl21DE3 <i>pet28a</i> $\Omega$ <i>blpS</i>	This study
NEM5255	<i>E. coli</i> TOP10 pTCVlac $\Omega$ P <i>gsp</i>	This study
NEM5258	<i>E. coli</i> TOP10 pTCVlac $\Omega$ P <i>blpA</i>	This study
NEM5257	<i>E. coli</i> TOP10 pTCVlac $\Omega$ P <i>gllA</i>	This study
NEM5456	<i>E. coli</i> TOP10 pTCVlac $\Omega$ P <i>gllA-scramble</i>	This study
NEM5287	<i>E. coli</i> TOP10 pTCVlac $\Omega$ P <i>gyrA</i>	This study
NEM4875	UCN34 pTCV $\Omega$ P <i>comX-gfp</i>	This study

**Table 2: Primers used in this study**  
Restriction sites are indicated in bold

<b>Primers</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
<b>Mutant construction</b>	
<i>gsp</i> deletion	TTCT <b>GAATT</b> CCCGTCGTAAATTCTAACT
	ATTTTTGGTTTAAGCGTGTTTTATAAACCTCCTTAG
	CTAAGGAGGTTTATAAAACACGCTTAAACCAAAAAT
	TTCT <b>GGGAT</b> CCTTTATTCAGCATAGTCGC
<i>blpH</i> deletion	TTCT <b>GAATTC</b> GTTTTACTGATGCCACTG
	AGATGAGGTGAAAAGCTACTGAAATAGTCGAATGAT
	ATCATTGACTATTTTCAGTAGCTTTTCACCTCATCT
	TTCT <b>GGGAT</b> CCCAAGGAATTGATGTCGCT
<i>blpR</i> deletion	TTCT <b>GAATTC</b> CCTTCCATACCTGTTAGAA
	GATTTTTAGAGGAGATTTGGTGAAAAGCTAATGAGC
	GCTCATTAGCTTTTCACCAAATCTCCTCTAAAAATC
	TTCT <b>GGGAT</b> CCATCTTTTCTCTAATATGG
<i>blpS</i> deletion	TTCT <b>GAATTC</b> CAGCAGGAGAGGTTTCAA
	GGAGGGAATAATGATTTATGGACTGATTTTTAGAGGA G
	CTCCTCTAAAAATCAGTCCATAAATCATTATTCCCTCC
	TTCT <b>GGATC</b> CTTGGCGAAAAAATCCTCG
<b>Promoters</b>	
<i>gsp</i> promoter	TTCT <b>GAATTC</b> TTTTCAACTCATAACGAA
	TTCT <b>GGATC</b> CCTTTTATAAACCTCCTTAG
<i>gllA</i> promoter	TTCT <b>GAATTC</b> GGTCCCAATCTCCCTT
	TTCT <b>GGATC</b> CCTTGAATACCTCCCAAT
<b>q-PCR</b>	
<i>rpoB</i>	CACCGTACACGTCGTAGC
	CCGTAAAGTTTGTAATCG
<i>gallo_rs03700</i>	CGAGGTATCCTTTTGTGT
	GGTATCACTCATAATTCC
<i>gallo_rs10335</i>	TTCCAACCTATACGCATG
	AGCTTGTTGAATGAAGGC
<i>gsp</i>	GATGACAGAAAAAATGTT
	GTGTTTAGTAGGCTTATG
<i>blpH</i>	ATGTTAGAGGAGCAAAGC
	ACTCTCTATAACCCATGG
<i>blpR</i>	AGAGGTGTTTAGTTCCGC
	CTACTAACGCTTGGTAGG
<i>blpS</i>	GGCTATTGACGATATCCT
	GTCGCTGCTCTCTATCCA

<i>gallo_10370</i>	CTGGCTCATCTGATGTGTC
	GTGCCTACAACCTGAAACGA
<i>gllA2</i>	GAAGGTGGTTACAGCAAGACAG
	CTACACAAGTAGCCCCACCAC
<i>blpA</i>	CTCGCTGGCTCATTTGAG
	GCGGGAGTTTGCCTTCTT
<i>gallo_rs10400</i>	GCGGTTTTTGGTAGCATT
	CAGCAGATAGTAAGCAATC
<b>Overexpression</b>	
<i>blpS</i>	TTCTCTGCAGCTCCTCTAAAAATCAGTC
	TTCTGGATCCGTTATTGGAGGGAATAATG
<b>RACE PCR</b>	
<i>gllA</i>	TACACCCGCCAATAGCAG
	CCACCACTAATTGTTTGC
<b>His-tagged BlpR and BlpS</b>	
BlpR	TTCTGGATCCTCACCTCATCTCATTAA
	TTCTCATATGATGTTAGATATTTATGTA
BlpS	TTCTGGATCCTCAGTCATTTGAGATGAT
	TTCTGCTAGCATGAAATATTTTAAATTTAC
<b>Promoters EMSA</b>	
<i>gsp</i>	TTCTGGATCCTCATTTTTATAAACCTCC
	TTCTGAATTCGATGGCTTGGACTTTTTTC
<i>blpA</i>	TTCTGGATCCCTTCTCATAACCTTTCCC
	TTCTGAATTCCTTGGGAAGAATGGTAAAG
<i>gyrA</i>	TTCTGGATCCTAAGGAAAAACACTCCTT
	TTCTGAATTCCTAAGTGAGATATGTCACG
<i>gllA</i>	TTCTGGATCCATAATTTTTGTCGTTGC
	TTCTGAATTCACGGTCAAAAAATCATGA
<b>Primers pTCV-lac</b>	
VlacE	GAGTCAAATAGATATGAACAAATG
VlacB	GCATTAGTGTATCAACAAGCTGGGG

**Table 3: Sequence of the promoters tested by EMSA**

The *PgIIA* sequence that is scrambled in *PgIIA-scr* is indicated in bold.

Promoters	Sequence	Length (bp)
<i>PgIIA</i>	ACGGTCAAAAAATCATGAAAATACAAAAAATTTACCATTTAC <b>GACCTAAAAACAACAATTACGACTTGGGCGTGCATTAACCTC</b> ACAATCTGTTAGACTAAAATCTGTCAGTTGCAACGACAAAATAT TAT	133
<i>PgIIA-scr</i>	ACGGTCAAAAAATCATGAAAATACAAAAAATTTACCATTTAA <b>GTAAGATCAGTACAATAACCTACACAGGCCGTGCATTAACCTC</b> ACAATCTGTTAGACTAAAATCTGTCAGTTGCAACGACAAAATAT TAT	133
<i>Pgsp</i>	GATGGCTTGGACTTTTTCAATATTCTTTGTTGCCGTTTACGACCGAAA AATGACTTTTTATGACTTAGAAAAAGCTTTTAAGAAGCTTTTCTGCTACA ATTAATCACTAAGGAGGTTTATAAAAATGA	127
<i>PblpA</i>	TTTGAAGAATGGTAAAGAAAAATAATTTTTGACCGTTTGCGACCTA TTTTGACTTTTTACGACTTGGGCGTTTTTAATCTTGTTTTATGGCAC AATAGTTCTAGTTTCATTTTTAAAAGGGAAAGGTTATGAGAAG	140
<i>PgyrA</i>	TAAGTGAGATATGTCACGAACTAAATTGTA AAAACTTTGAAAAAAG AAGAAAGCTAGTGATTCTGGCGAAAAAGCGCTATTTTTGCCAAAAT GTGGTATAATATAGTAGAGTTTTACACTAGAAAAGGAGTGTTCCT TA	144

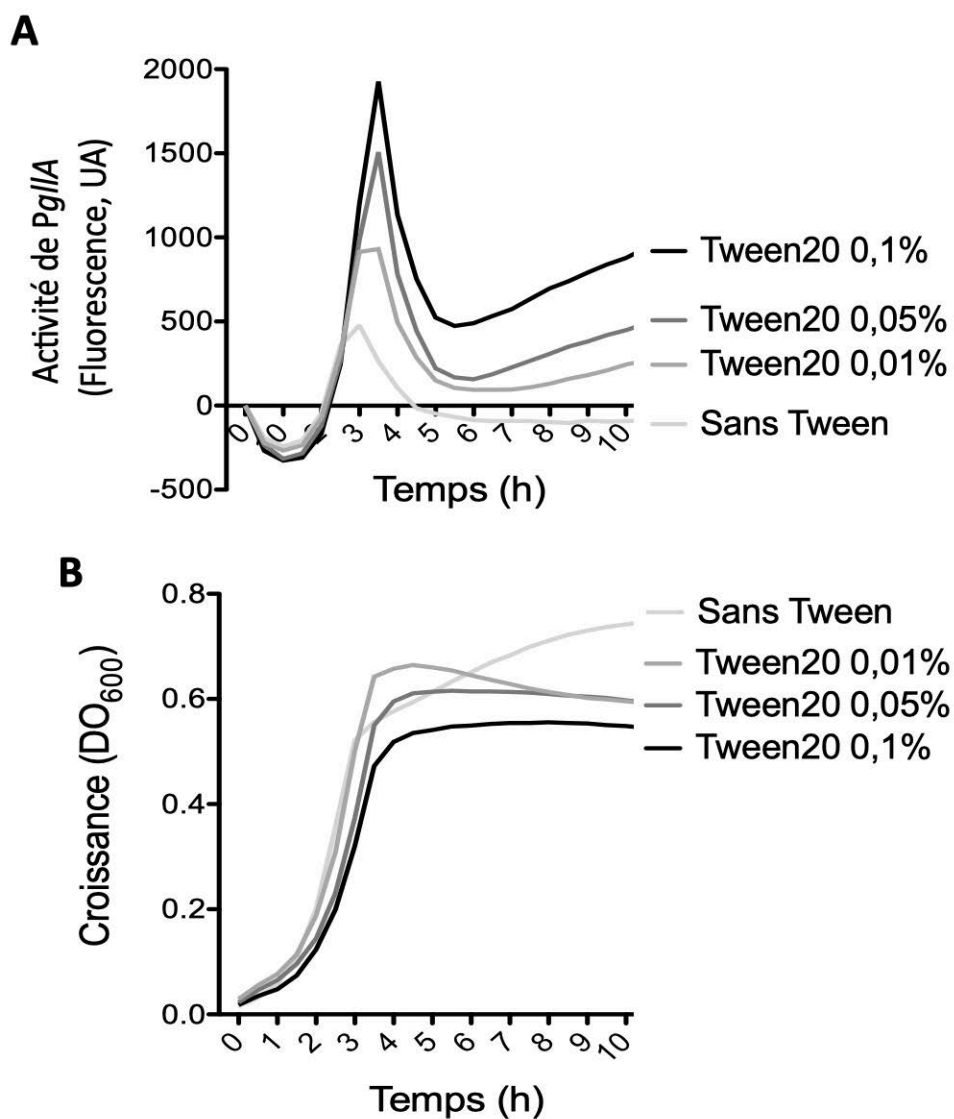


Figure 17 : Activation du promoteur des gènes de la gallocine (*PgIIA*) par le Tween20

A : Fluorescence de *Sgg pTCVΩPgIIA-gfp* (*PgIIA* étant le promoteur des gènes codant la gallocine) en THY supplémenté ou non avec du Tween 20 à différentes concentrations. B : Courbes de croissance de *Sgg pTCVΩPgIIA-gfp* dans les mêmes conditions

## Résultats complémentaires

Bien que l'activation transcriptionnelle de la gallocine soit fortement dépendante de la concentration en GSP dans le milieu, d'autres facteurs pourraient jouer un rôle.

Etant donné que la présence de détergents comme le tween ou les acides biliaires est nécessaire pour l'activité de la gallocine (Aymeric et al., 2018), nous avons voulu tester l'effet de ces détergents sur l'activité du promoteur des gènes codant la gallocine (*PgIIA*). Parmi les acides biliaires testés, aucun n'a permis d'activer le promoteur de l'opéron gallocine au-delà de son niveau basal. Cependant une augmentation significative a été observée en présence de Tween20 et de manière dose-dépendante (Figure 17). Cependant cet effet activateur du Tween20 observé initialement dans le milieu riche THY n'a pas été reproduit en M9YEG, le milieu utilisé dans la publication N°1. Il apparaît donc possible que dans certaines conditions, les acides biliaires puissent activer le promoteur de la gallocine en plus d'augmenter l'activité des peptides formant la gallocine elle-même. Il serait donc intéressant de vérifier dans le modèle murin Notch/APC si l'augmentation de la quantité des acides biliaires secondaires induit aussi la transcription de la gallocine. Dans ce but nous avons tenté de construire une souche bioluminescente exprimant les gènes *luxABCDE* (Francis et al., 2000) sous contrôle du promoteur de l'opéron gallocine afin de visualiser son activité *in vivo*. La construction de cette souche n'a malheureusement pas abouti, probablement à cause du fort coût métabolique associé à la production des gènes *luxABCDE*.

En plus des détergents, nous avons observé une diminution de l'activité du promoteur de la gallocine en présence de concentrations élevées de glucose. Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs peuvent influencer la production de la gallocine et il s'agira à l'avenir d'essayer de mieux définir ces facteurs et comment ils modulent son expression.



Figure 18 : Séquence du peptide GSP (Gallocin- Stimulating Peptide)

GSP est synthétisé sous forme d'un pré-peptide de 45 acides aminés. Le peptide mature théorique obtenu par clivage du peptide leader après le doublet glycine est GSP-24. GSP21 est le peptide qui a été isolé à partir du surnageant de *Sgg* TX20005 par Harrington et Tal-Gan (2018).

## Partie II : Sécrétion, maturation et analyse structurale du GSP

GSP est synthétisé sous la forme d'un pré-peptide de 45 acides aminés qui possède un peptide leader de type double glycine de 21 acides aminés (Pré-GSP). Ces peptides leaders sont connus pour être clivés en position C-terminale des deux glycines par l'ABC transporteur lors de la sécrétion du peptide. La forme mature théorique du GSP que nous avons utilisée dans l'article précédent est composée par les 24 acides aminés C-terminaux de ce pré-peptide (GSP-24, Figure 18). Cependant, Harrington et Tal-Gan (2018) ont isolé le peptide GSP dans le surnageant de *Sgg* TX20005 et ont montré qu'il s'agissait d'un peptide de 21 acides aminés (GSP-21) dépourvu des 3 acides aminés N-terminaux du GSP que nous avons utilisé (Figure 18). Ce peptide avait alors été annoté CSP (« competence stimulating peptide ») mais le nom GSP (« gallocin stimulating peptide ») a été retenu puisqu'aucun de nos deux laboratoires n'a réussi à induire la compétence avec ce peptide. Nous nous sommes donc intéressés aux mécanismes de sécrétion et de maturation du GSP ainsi qu'à l'importance des différents acides aminés pour son activité de peptide activateur.

### **Publication N°2: Secretion, maturation and activity of a quorum-sensing peptide (GSP) inducing bacteriocins transcription in *Streptococcus gallolyticus***

Alexis Proutiere<sup>☐</sup>, Anthony Harrington<sup>☐</sup>, Shaynoor Dramsi and Yftah Tal-Gan

☐ : Même contribution dans ce travail

#### Résumé de la publication :

Dans cette publication nous avons démontré que l'ABC transporteur BlpAB est responsable de la sécrétion des deux peptides de la gallocine (GIIA1 et GIIA2) ainsi que du peptide GSP. Nous avons ensuite synthétisé chimiquement les deux formes matures du peptide GSP, GSP-24 et GSP-21, et avons testé leur rôle activateur (Figure 18). Nous avons pu montrer que le GSP-21 est 100 fois plus efficace que le GSP-24 pour activer le promoteur de l'opéron gallocine *PgIIA*, ce qui confirme que GSP-21 constitue la forme la plus active du GSP et celle qui est sécrétée par *Sgg* TX20005 mais aussi par *Sgg* UCN34. Le clivage du pré-GSP se révèle donc atypique puisqu'il a lieu 3 acides aminés après le motif double glycine.



Un système de régulation et de sécrétion similaire à celui de la gallocine a été décrit chez *Streptococcus mutans* pour la biosynthèse et la sécrétion de la mutacine (Hossain and Biswas, 2012). Chez *S. mutans*, le peptide sécrété activant la production de la mutacine, homologue fonctionnel de GSP, est clivé après sa sécrétion par une protéase extracellulaire appelée SepM qui retire les trois acides aminés C-terminaux. Étant donné qu'il existe un gène homologue à SepM chez *Sgg*, nous avons donc testé son rôle dans la maturation du peptide GSP. SepM chez *Sgg* n'est pas impliquée dans la maturation du GSP-24 en GSP-21. En revanche, SepM de *Sgg* est capable de cliver correctement le peptide activant la mutacine de *S. mutans*. La maturation atypique du peptide GSP pourrait donc être réalisée soit par une autre protéase extracellulaire ou directement par l'ABC transporteur BlpAB, ce qui représenterait une exception au site de clivage habituel après le doublet glycine.

Par ailleurs, une analyse structure fonction fine du peptide GSP a été réalisée pour tester l'importance de chaque acide aminé composant ce peptide en mesurant l'activation du promoteur de la gallocine grâce à un gène rapporteur fluorescent *gfp*. Cette analyse a révélé l'importance critique des 12 acides aminés C-terminaux du GSP-21.

**Secretion, maturation and activity of a quorum-sensing peptide (GSP)  
inducing bacteriocins transcription in *Streptococcus gallolyticus***

Anthony Harrington,<sup>1,≠</sup> Alexis Proutiere,<sup>2,3,4,≠</sup> Shaynoor Dramsi,<sup>2,3,\*</sup> and Yftah Tal-Gan<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> *Department of Chemistry, University of Nevada, Reno, 1664 North Virginia Street, Reno, Nevada 89557, United States*

<sup>2</sup> *Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram-positif, Institut Pasteur, 75015 Paris, France*

<sup>3</sup> *CNRS UMR2001, Paris, France*

<sup>4</sup> *Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France*

≠ These authors contributed equally to this work.

\* To whom correspondence should be addressed: [ytalgan@unr.edu](mailto:ytalgan@unr.edu); [shaynoor.dramsi@pasteur.fr](mailto:shaynoor.dramsi@pasteur.fr).

## **Abstract** (182 words)

*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Sgg*) is an emerging opportunistic pathogen responsible for septicemia and endocarditis in the elderly. Invasive infections by *Sgg* are strongly linked to the occurrence of colorectal cancer (CRC). It was previously shown that increased secondary bile salts in CRC-conditions enhances the bactericidal activity of gallocin, a bacteriocin produced by *Sgg*, enabling it to colonize the mouse colon by outcompeting resident enterococci. In a separate study, we have shown that *Sgg* produces and secretes a 21-mer peptide that activates bacteriocin production. This peptide was named CSP because of its sequence similarity with competence stimulating peptides found in other streptococci. Here we demonstrate that CSP is a *bona fide* quorum-sensing peptide involved in activation of gallocin gene transcription. We therefore refer to CSP as GSP (gallocin stimulating peptide). GSP displays some unique features since its *N*-terminal amino-acid lies three residues after the double glycine leader sequence. Herein, we set out to investigate the processing and export pathway that leads to mature GSP. We also conducted the first comprehensive structure-activity relationship (SAR) of *Sgg* GSP to identify its key structural features.

## **Significance** (116 words)

*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Sgg*) is an opportunistic pathogen associated with colorectal cancer (CRC) and endocarditis. *Sgg* utilizes quorum-sensing (QS) to regulate the production of a bacteriocin (gallocin) and gain selective advantage in colonizing the colon. In this manuscript, we report 1) the first structure-activity relationship study of the *Sgg* QS pheromone that regulates gallocin production; 2) evidence that the active QS pheromone is processed to its mature form by a unique ABC transporter and not processed by an extracellular protease; and 3) supporting evidence of interspecies interactions between streptococci pheromones. Our results revealed the minimal pheromone scaffold needed for gallocin activation and uncovered unique interactions between two streptococci species QS signals that warrant further studies.

## Introduction

*Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Sgg*), previously known as *Streptococcus bovis* biotype I, is an emerging opportunistic human pathogen belonging to the highly diverse *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC) (1-3). *Sgg* is responsible for causing infective endocarditis, septicemia and has been consistently associated with colorectal cancer (CRC) (4, 5). Recent experimental data support both a passenger and driver role of *Sgg* in CRC development (6-8). Using a murine CRC model, it was shown that CRC-specific conditions strongly promote colonization of the colon by *Sgg* (9). Indeed, increased levels of secondary bile salts in tumor-bearing mice enhanced the bactericidal activity of gallocin, a putative class IIb bacteriocin encoded by the two genes *gllA1* and *gllA2* (formerly named *blpAB*) produced by *Sgg*, thus enabling it to colonize the mouse colon by outcompeting resident enterococci.

It was later reported that *Sgg* strain TX20005 secretes a 21-mer peptide that induces the production of unknown bacteriocins that are active against various oral streptococci (10). This peptide was named competence stimulating peptide (CSP) because of its sequence similarity with other CSPs found in other streptococci. However, under the conditions tested, *Sgg* CSP was unable to induce natural competence as measured by plasmid DNA uptake (10).

Originally discovered in *Streptococcus pneumoniae*, natural competence was shown to be a tightly regulated process involving a hormone-like cell product, termed pheromone (11). The nature of the molecule inducing competence in pneumococci was identified as a linear unmodified 17-residue peptide named CSP (for competence stimulating peptide) (12). CSP, encoded by *comC*, is synthesized as a precursor peptide of 41 residues containing the Gly-Gly consensus processing site found in peptide bacteriocins (13). CSP is secreted and matured by a specialized ATP-binding transporter, ComAB, that cleaves its *N*-terminal part just after the Gly-Gly motif (14). Once CSP has reached a threshold concentration in the extracellular medium, it binds to a transmembrane histidine kinase receptor, ComD, which in turn triggers phosphorylation of ComE, a response regulator that activates the transcription of *comX*, the master regulator of competence genes (14, 15). *comX*/*sigX* encodes an alternative sigma factor allowing the coordinated expression of a set of approximately 20 genes encoding the competence machinery. This *comABCDE* quorum sensing (QS) circuitry has been found to regulate competence in 12 streptococci species belonging to the *Mitis* and *Anginosus* groups (16-18). In 2010, two groups showed that natural competence could

be induced in a wide range of streptococci by a second QS circuitry involving a 7-amino acid peptide called XIP (for *sigX/comX* inducing peptide) (19, 20).

Importantly, competence and bacteriocin production in streptococci are often coupled processes that are regulated differentially by the two QS circuitries described above (21). For example, the *comABCDE* circuitry in *S. mutans* regulates the production of bacteriocins called mutacins directly and competence through activation of the *comRS* circuitry (14, 22-25). This observation has led to the proposal that the *S. mutans* CSP be renamed to mutacin inducing peptide (MIP) (14, 26, 27). Additionally, it was shown that the secreted 21-mer CSP/MIP peptide is inactive and requires further processing by the streptococcal extracellular protease (SepM), which cleaves the three C-terminal residues of 21-mer CSP/MIP to generate the active 18-mer CSP/MIP (28, 29).

*Sgg* possess both the *comABCDE* and *comRS* loci in its genome (30-32). In the accompanying paper, it is demonstrated that *Sgg* CSP 24-mer is a *bona fide* QS inducing peptide involved in activation of gallocin transcription (Proutière et al., 2020). However, despite several attempts, we failed to induce competence in *Sgg* with CSP (Harrington et al. 2018, Proutière et al., 2020) (9, 10). We therefore propose referring to *Sgg* CSP as GSP (gallocin stimulating peptide) and to renamed its putative associated genes *comAB* as *blpAB* (bacteriocin like peptide ABC transporter) and *comDE* as *blpHR* (bacteriocin like peptide histidine kinase and regulator, respectively). Since GSP is predicted to be a 24-mer peptide while the isolated GSP was found to be a 21-mer peptide starting three residues after the double glycine leader sequence of the precursor peptide, we first tested the activity of GSP 24-mer versus GSP 21-mer on gallocin transcription using a green fluorescent protein (GFP) reporter construct described in the accompanying paper (Proutière et al., 2020). Next, we set out to explore how GSP was processed and evaluated the potential role of *Sgg* extracellular protease, which is homologous to SepM. Finally, we undertook a comprehensive structure function analysis of the GSP pheromone, which revealed that almost half of the peptide sequence (first nine N-terminal residues) is dispensable and can be removed without significantly affecting the GSP ability to activate its cognate histidine kinase receptor, providing a minimal structure for the development of GSP-based QS inhibitors that could affect *Sgg* fitness during competition with the gut microflora.

## Results & Discussion

### GSP active form is a 21-mer peptide

We first aimed at determining the active form of GSP in *Sgg* strain UCN34. GSP is derived from a 45 residues precursor encoded by *gsp* gene, and is predicted to be processed to a 24-mer peptide by cleavage of the amino terminal leader sequence after a double glycine motif, then exported to the extracellular environment by the BlpAB transporter. However, GSP was previously isolated as a 21-mer peptide from *Sgg* TX20005 (10). We first confirmed by mass spectrometry analysis that GSP isolated from culture supernatants of strain UCN34 was strictly identical to the 21-mer peptide previously purified from strain TX20005 (**Fig. S1**). The predicted 24-mer GSP was shown to activate transcription of the galloicin genes (Proutière et al., accompanying paper). Therefore, we chemically synthesized GSP 21-mer and GSP 24-mer peptides to test their efficiency in activating galloicin gene transcription. To do so, we used a reporter *Sgg* UCN34 strain in which the endogenous *gsp* gene has been deleted and containing a plasmid expressing *gfp* under the control of the galloicin genes promoter (*PgIIA*) (Proutière et al., accompanying paper). No expression of *gfp* was observed in the absence of GSP whereas both 24-mer and 21-mer GSP peptides were able to activate *PgIIA*. The GSP 21-mer was found to be more active than the 24-mer, as can be seen from the EC<sub>50</sub> values of both peptides (i.e. the concentration of peptide needed to reach 50% of maximal receptor response). Indeed, GSP 21-mer peptide EC<sub>50</sub> (2.96 nM) was around 100 times lower than GSP 24-mer EC<sub>50</sub> (287 nM), indicating that the 21-mer is significantly more active than the 24-mer (**Table 1**). These results imply that GSP maturation to a 21-mer peptide increases GSP efficiency as compared to the 24-mer peptide, but is not absolutely required, unlike the CSP/MIP of *S. mutans* (28, 29).

**Table 1.** EC<sub>50</sub> values of *Sgg* GSP 21-mer and 24-mer in UCN34Δ*gsp*<sup>a</sup>

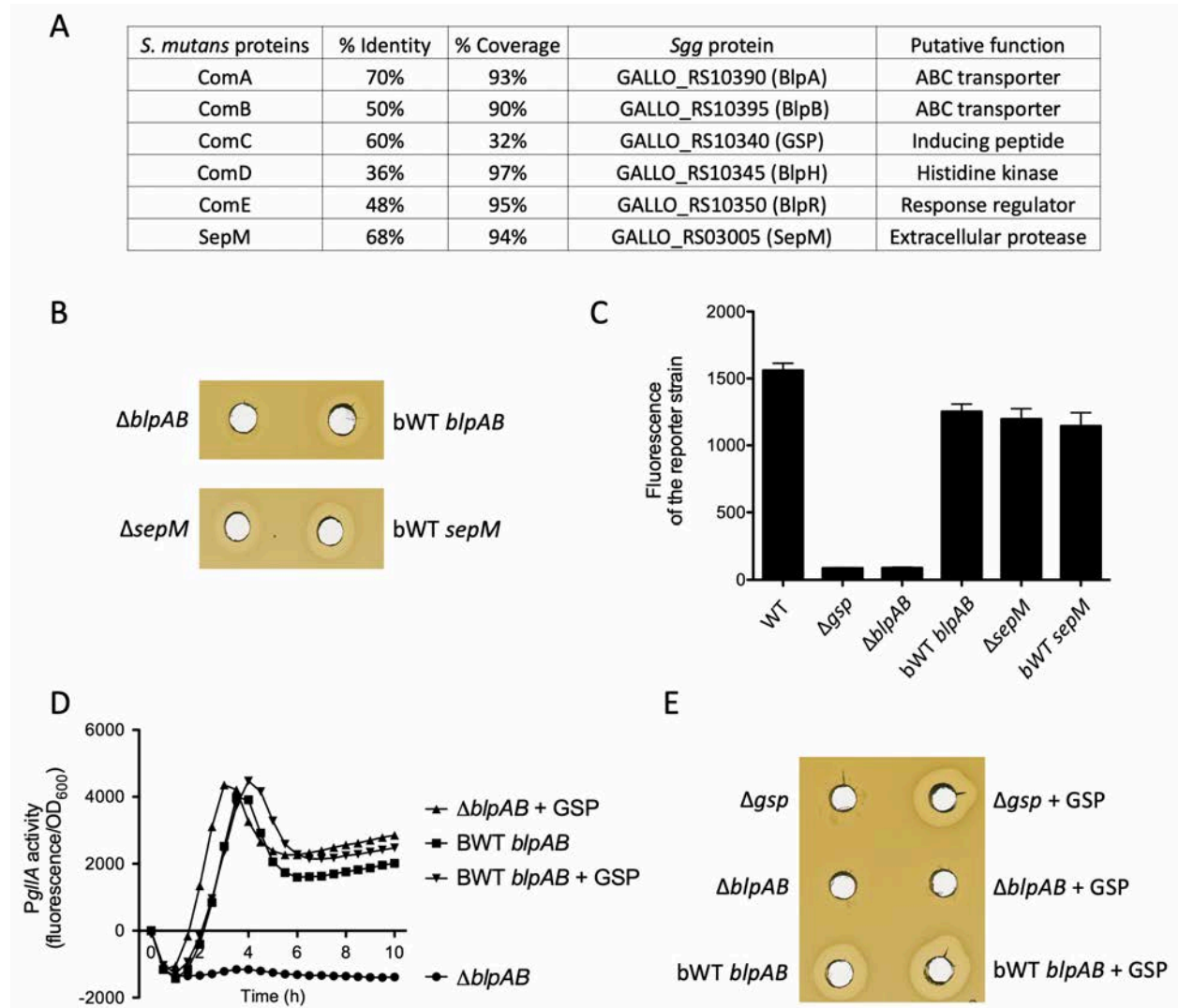
Compound	Sequence	EC <sub>50</sub> (nM) <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>
GSP 21-mer	DFLIVGPFDWLKKNHKPTKHA	2.96	1.70 – 5.14
GSP 24-mer	KNKDFLIVGPFDWLKKNHKPTKHA	287	145 – 568

<sup>a</sup> See Materials and Methods for details of reporter strains and methods. All assays were performed in triplicate. <sup>b</sup> EC<sub>50</sub> values were determined by testing peptides over a range of concentrations. <sup>c</sup> 95% confidence interval.

### **An ABC transporter is responsible for the secretion of GSP and galloicin peptides**

We next aimed at determining how GSP was secreted and processed into a 21-mer peptide in *Sgg* UCN34. In *S. mutans*, the equivalent 21-mer MIP peptide encoded by *comC* is secreted by a specific ABC transporter composed of ComA and ComB proteins (**Fig. 1A**). Two genes (*gallo\_rs10390/10395*) encoding a putative ABC transporter homologous to ComA/B were found in the vicinity of the GSP and galloicin genes (**Fig. 1A**). To test the role of this putative transporter in GSP secretion and maturation, an in-frame deletion mutant of *gallo\_rs10390/10395* was constructed in strain UCN34 and will be referred to as UCN34: $\Delta$ *blpAB*. For each deletion mutant generated in *Sgg* clinical isolate UCN34, we also selected a clone that reverted to the WT genotype (bWT) following homologous recombination. These bWT strains should display the WT phenotype and are isogenic to their mutant counterparts. Basic phenotypic characterization of several clones for a given mutation was carried out systematically (growth curve, immunofluorescence microscopy, antibiotic resistance profile) to rule out any major secondary mutations that may have occurred during the engineering process. We then determined galloicin activity against a highly sensitive bacteria, *Streptococcus gallolyticus* subspecies *macedonicus* (*Sgm*) using the supernatants of the  $\Delta$ *blpAB* mutant compared to its bWT strain. As shown in **Fig. 1B**, galloicin activity was completely absent in the  $\Delta$ *blpAB* mutant supernatant while present in the bWT. Three possibilities can explain these results: i) absence of GSP in the supernatant of  $\Delta$ *blpAB* mutant; ii) absence of the two structural peptides (GIIA1/GIIA2) constituting the active galloicin in the supernatant of  $\Delta$ *blpAB* mutant; or iii) absence of both GSP and galloicin peptides in the supernatant of  $\Delta$ *blpAB* mutant. To differentiate between these alternatives, we first tested the ability of the  $\Delta$ *blpAB* supernatant to activate *gfp* transcription in the UCN34  $\Delta$ *gsp* pTCV $\Omega$ P*gIIA-gfp* reporter strain mentioned above. To do so, we resuspended the reporter strain in different supernatants. If GSP is present in the supernatant, the galloicin promoter will be activated, turning on GFP and the bacteria will be fluorescent. As shown in **Fig. 1C**, the reporter strain is not fluorescent in the absence of GSP (THY only and  $\Delta$ *gsp* supernatant) and becomes fluorescent in the presence of GSP (THY + GSP and WT supernatant). No GFP fluorescence could be detected using the  $\Delta$ *blpAB* supernatant, while a strong signal was detected in the bWT supernatant, demonstrating that GSP is not secreted in the  $\Delta$ *blpAB* mutant, an observation that was verified by LC-MS (**Fig. 1C** and **Fig. S2**). These results were further confirmed by introducing the reporter plasmid (pTCV $\Omega$ P*gIIA-gfp*) into the  $\Delta$ *blpAB* mutant and measuring GFP fluorescence. Galloicin

promoter was inactive in the  $\Delta blpAB$  pTCV $\Omega$ PgIIA-gfp strain, while addition of synthetic GSP in the culture medium restored full gallocin promoter activity (**Fig. 1D**).



**Figure 1.** The ABC transporter BlpAB secretes both GSP and gallocin peptides. **A:** Summary table of blast results comparing the ComABCDE system and SepM proteins of *S. mutans* with their homologous counterpart in *Sgg*. **B:** Agar diffusion assay showing gallocin activity in the culture supernatant against *Sgm*. Strain tested: *Sgg* UCN34  $\Delta blpAB$  and  $\Delta sepM$  and their bWT counterpart. **C:** Fluorescence of the reporter strain *Sgg* UCN34  $\Delta gsp$  pTCV $\Omega$ PgIIA-gfp resuspended in the supernatant of *Sgg* UCN34 WT,  $\Delta gsp$ ,  $\Delta blpAB$ , bWT *blpAB*,  $\Delta sepM$  and bWT *sepM*. The fluorescence of the reporter strain increases only if the supernatant contains GSP. **D:** *PgIIA* activity in *Sgg* UCN34  $\Delta blpAB$  and its bWT counterpart with or without addition of 20 nM synthetic GSP. **E:** Agar diffusion assay showing gallocin activity in the culture supernatant against *Sgm*. Strain tested: *Sgg* UCN34  $\Delta gsp$ ,  $\Delta blpAB$  and bWT *blpAB* cultivated with or without addition of 20 nM synthetic GSP.

We next investigated whether the same ABC transporter (named BlpAB) could also secrete the gallocin GIIA1/GIIA2 peptides, and thus analyzed gallocin activity in the  $\Delta blpAB$  mutant in the presence of synthetic GSP. As shown in **Fig. 1D**, addition of GSP in the culture medium restored



gallocin production in the control  $\Delta gsp$  mutant. However, no gallocin activity could be detected in the  $\Delta blpAB$  mutant even in the presence of synthetic GSP, although the gallocin promoter was fully active under these conditions as mentioned above. Altogether, these results indicate that the ABC transporter secretes both GSP and the gallocin peptides.

### **SepM is not involved in GSP maturation in *Sgg* UCN34**

In *S. mutans* an extracellular protease, SepM, is responsible for CSP/MIP maturation by cleaving the three C-terminal amino acids of ComC after its secretion. Blast analysis revealed that *Sgg* UCN34 possess a close SepM homolog (**Fig. 1A**). Therefore, we reasoned that *Sgg* SepM could be involved in GSP maturation by cleaving the three N-terminal residues of GSP 24-mer after secretion by the ABC transporter. To test this hypothesis, we deleted *sepM* in *Sgg* UCN34. As shown in **Fig. 1B**, gallocin production appears slightly reduced in the  $\Delta sepM$  mutant as compared to the isogenic bWT. To test whether the  $\Delta sepM$  mutant was able to produce the fully active GSP 21-mer, we first analyzed the capacity of  $\Delta sepM$  supernatants to induce gallocin promoter activity in the reporter strain  $\Delta gsp$  pTCV $\Omega$ PgIIA-*gfp*. We found that the  $\Delta sepM$  supernatant was able to fully activate PgIIA promoter in the reporter strain, suggesting that  $\Delta sepM$  supernatants possess the active form of GSP. We then further assessed the  $\Delta sepM$  supernatant using LC-MS and detected the presence of the mature 21-mer GSP (**Fig. S3**). Together, our results indicate that SepM is not involved in GSP maturation in UCN34.

To further evaluate if a cell-bound protease is involved in GSP maturation, we incubated KNK-GSP (24-mer) and GSP (21-mer) with washed UCN34  $\Delta gsp$  or  $\Delta sepM$  cells in sterile saline solution for 30 minutes and analyzed the filtrates using LC-MS. Degradation of KNK-GSP to GSP was not observed following incubation with either UCN34 $\Delta sepM$  or UCN34 $\Delta gsp$  (**Figs. S4-S5**). Both GSP and KNK-GSP were degraded into GSP-des-D1-L3, suggesting that another cell-bound protease exists in *Sgg* (**Figs. S4-S6**). We hypothesize that in *Sgg*, the specific BlpAB ABC transporter has a unique feature that allows it to process GSP to the mature GSP 21-mer, which if true will challenge the double glycine cleavage rule.

Biswas and co-workers have previously shown that the SepM proteases are quite promiscuous and can process CSP signals of other species (28). We wanted to confirm that the *Sgg* SepM is a

functional protease and repeated the cell-washed processing assays described above, but this time added the *S. mutans* 21-CSP to washed UCN34 $\Delta$ *gsp* or UCN34 $\Delta$ *sepM* cells. The 18-CSP was found in filtrates treated with UCN34  $\Delta$ *gsp* but not in filtrates treated with UCN34  $\Delta$ *sepM* indicating that *Sgg* SepM is functional and capable of processing *S. mutans* inactive 21-CSP into active 18-CSP (**Figs. S7-S8**) (28). Our results therefore support Biswas findings that SepM found in some streptococci can process *S. mutans* 21-mer CSP into 18-mer CSP. Lastly, we tested 21-mer *Sgg* GSP with *S. mutans*  $\Delta$ *comC* washed cells. Surprisingly, we observed that *S. mutans* is capable of processing GSP into GSP des-D1-L3 (**Fig. S9**). Combined, our results indicate potential interspecies QS interactions between *Sgg* and *S. mutans*, although their exact nature is currently unclear.

### Structure-Activity Relationships of *Sgg* GSP

Our second aim in this study was to evaluate and determine the key structural motifs that drive GSP binding to its cognate histidine kinase, BlpH, thus activating gallocin gene transcription.

### Alanine scan of *Sgg* GSP

We first set out to perform a full alanine scan of the 21-mer GSP signal. Peptides were synthesized using standard solid-phase peptide synthesis (SPPS) conditions using a CEM Liberty1 microwave synthesizer on Cl-MPA Protide resin (LL). The peptides were then purified to homogeneity (>95%) using RP-HPLC and validated using Mass Spectrometry (for full experimental details and peptide characterization, see Supporting Information). The alanine scan revealed several residues that are important for receptor binding, as mutating them to alanine resulted in significant reduction in activity, yet no one residue was found to be critical for receptor activation, leading to the identification of a competitive inhibitor (**Table 2**). Specifically, the alanine scan revealed that the C-terminal half of the peptide (residues W10 – H20) was more important for receptor binding compared to the N-terminal half (residues D1 – D9), as modifications to the C-terminal half

resulted in a significant decrease in potency, with the most important residue being W10 (**Table 2**).

**Table 2.** EC<sub>50</sub> values of *Sgg* GSP alanine analogs in UCN34Δ*gsp*<sup>a</sup>

<b>Compound</b>	<b>Sequence</b>	<b>EC<sub>50</sub> (nM)<sup>b</sup></b>	<b>95% CI<sup>c</sup></b>
<i>Sgg</i> GSP	DFLIVGPFDWLKKNHKPTKHA	2.96	1.70 – 5.14
<i>Sgg</i> GSP D1A	AFLIVGPFDWLKKNHKPTKHA	24.7	12.6 – 48.3
<i>Sgg</i> GSP F2A	DALIVGPFDWLKKNHKPTKHA	19.9	8.79 – 45.3
<i>Sgg</i> GSP L3A	DFAIVGPFDWLKKNHKPTKHA	156	121 – 200
<i>Sgg</i> GSP I4A	DFLAIVGPFDWLKKNHKPTKHA	137	61.5 – 307
<i>Sgg</i> GSP V5A	DFLIAGPFDWLKKNHKPTKHA	79.6	51.4 – 123
<i>Sgg</i> GSP G6A	DFLIVAPFDWLKKNHKPTKHA	276	138 – 553
<i>Sgg</i> GSP P7A	DFLIVGAFDWLKKNHKPTKHA	76.5	63.3 – 92.4
<i>Sgg</i> GSP F8A	DFLIVGPADWLKKNHKPTKHA	397	248 – 635
<i>Sgg</i> GSP D9A	DFLIVGPFAWLKKNHKPTKHA	32.6	19.9 – 53.6
<i>Sgg</i> GSP W10A	DFLIVGPFDAKKNHKPTKHA	>1000	--
<i>Sgg</i> GSP L11A	DFLIVGPFDWAKKNHKPTKHA	718	535 – 963
<i>Sgg</i> GSP K12A	DFLIVGPFDWLAKNHKPTKHA	299	259 – 346
<i>Sgg</i> GSP K13A	DFLIVGPFDWLKANHKPTKHA	297	253 – 348
<i>Sgg</i> GSP N14A	DFLIVGPFDWLKKAHKPTKHA	93.5	61.4 – 142
<i>Sgg</i> GSP H15A	DFLIVGPFDWLKKNAKPTKHA	152	130 – 177
<i>Sgg</i> GSP K16A	DFLIVGPFDWLKKNHAPTCHHA	893	515 – 1550
<i>Sgg</i> GSP P17A	DFLIVGPFDWLKKNHKATKHA	188	89.3 – 395
<i>Sgg</i> GSP T18	DFLIVGPFDWLKKNHKPAKHA	992	722 – 1360
<i>Sgg</i> GSP K19A	DFLIVGPFDWLKKNHKPTAHA	106	64.4 – 175
<i>Sgg</i> GSP H20A	DFLIVGPFDWLKKNHKPTKAA	273	198 – 375

<sup>a</sup> See Materials and Methods for details of reporter strains and methods. All assays were performed in triplicate. <sup>b</sup> EC<sub>50</sub> values were determined by testing peptides over a range of concentrations. <sup>c</sup> 95% confidence interval.

### Truncation studies of *Sgg* GSP

To further evaluate the roles of the *N*- and *C*-termini in receptor binding and to determine the minimal sequence required for effective receptor activation, we conducted sequential truncations of the *Sgg* GSP signal from both ends. We also wanted to identify the residues in KNK-*Sgg* GSP that lead to a ~100-fold reduction in potency compared to *Sgg* GSP, thus we included in our analysis the sequential truncation of KNK-*Sgg* GSP to *Sgg* GSP. Starting with KNK-*Sgg* GSP, removal of a single residue (K) from the *N*-terminus was sufficient to increase the potency of the peptide by 20-fold, resulting in an analog, NK-*Sgg* GSP, that was only ~5-fold less potent than *Sgg* GSP (**Table 3**). Removal of an additional residue resulted in an analog, K-*Sgg* GSP, that was as potent as *Sgg* GSP. These results are very intriguing as they indicate that the *N*-terminus of *Sgg* GSP is quite promiscuous, with the exception of the first residue after the double glycine leader,

the position most commonly processed in streptococci. Moving to the native *Sgg* GSP, the importance of the C-terminus was validated as truncation of even a single residue led to loss of activity (**Table 3**). Contrary to the C-terminus and to our surprise, we found that the N-terminus region is completely dispensable up to the seventh position (P7) and can accommodate the loss of up to nine residues without a significant reduction in potency (*Sgg* GSP-des-D1-D9 exhibiting an EC<sub>50</sub> value of 26.9 nM, only 9-fold lower as compared to *Sgg* GSP; **Table 3**). Removal of the tenth residue (W10) resulted in >35-fold reduction in potency compared to the analog lacking nine residues and >330-fold reduction in potency compared to *Sgg* GSP. Interestingly, it appears that removal of entire residues is more tolerated than replacement of the side chains of these residues with that of alanine, suggesting that although the N-terminus does not play a significant role in receptor binding, modifications to this region may lead to conformational changes that result in steric clashes and thus significantly lowered potency.

**Table 3.** EC<sub>50</sub> values of elongated and truncated *Sgg* GSP analogs in UCN34Δ*gsp*<sup>a</sup>

Compound	Sequence	EC <sub>50</sub> (nM) <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>
<b>KNK-<i>Sgg</i> GSP</b>	<b>KNKDFLIVGPFDWLKKNHKPTKHA</b>	287	145 – 568
<b>NK-<i>Sgg</i> GSP</b>	<b>NKDFLIVGPFDWLKKNHKPTKHA</b>	14.1	8.01 – 24.7
<b>K-<i>Sgg</i> GSP</b>	<b>KDFLIVGPFDWLKKNHKPTKHA</b>	2.33	1.45 – 3.76
<b><i>Sgg</i> GSP-des-D1</b>	<b>FLIVGPFDWLKKNHKPTKHA</b>	9.21	4.29 – 19.8
<b><i>Sgg</i> GSP-des-D1F2</b>	<b>LIVGPFDWLKKNHKPTKHA</b>	6.49	3.03 – 13.9
<b><i>Sgg</i> GSP-des-D1-L3</b>	<b>IVGPFDWLKKNHKPTKHA</b>	2.22	1.41 – 3.52
<b><i>Sgg</i> GSP-des-D1-I4</b>	<b>VGPFDWLKKNHKPTKHA</b>	3.80	2.49 – 5.80
<b><i>Sgg</i> GSP-des-D1-V5</b>	<b>GPFDWLKKNHKPTKHA</b>	3.60	3.34 – 3.89
<b><i>Sgg</i> GSP-des-D1-G6</b>	<b>PFDWLKKNHKPTKHA</b>	3.19	2.54 – 3.99
<b><i>Sgg</i> GSP-des-D1-P7</b>	<b>FDWLKKNHKPTKHA</b>	7.21	3.79 – 13.7
<b><i>Sgg</i> GSP-des-D1-F8</b>	<b>DWLKKNHKPTKHA</b>	39.7	21.4 – 73.6
<b><i>Sgg</i> GSP-des-D1-D9</b>	<b>WLKKNHKPTKHA</b>	26.9	18.3 – 39.7
<b><i>Sgg</i> GSP-des-D1-W10</b>	<b>LKKNHKPTKHA</b>	>1000	--
<b><i>Sgg</i> GSP-des-A21</b>	<b>DFLIVGPFDWLKKNHKPTKH</b>	>1000	--
<b><i>Sgg</i> GSP-des-H20A21</b>	<b>DFLIVGPFDWLKKNHKPTK</b>	>1000	--
<b><i>Sgg</i> GSP-des-K19-A21</b>	<b>DFLIVGPFDWLKKNHKPT</b>	>1000	--

<sup>a</sup> See Materials and Methods for details of reporter strains and methods. All assays were performed in triplicate. <sup>b</sup> EC<sub>50</sub> values were determined by testing peptides over a range of concentrations. <sup>c</sup> 95% confidence interval.

## Conclusions

We previously found that *Sgg* produces and secretes a 21-mer peptide that activates bacteriocin production (10). This peptide was named CSP due to its sequence similarity with competence stimulating peptides found in other streptococci. In this work, we showed that the CSP peptide is involved in the activation of gallocin transcription, therefore, we propose to change its name to

GSP (gallocin stimulating peptide). GSP displays some unique features since its *N*-terminal amino-acid lies three residues after the double glycine in the leader sequence.

Our results indicate that *Sgg* GSP is secreted by a unique ABC transporter named B1pAB and that the SepM-like protease in *Sgg* is not involved in maturation of GSP, but is capable of processing *S. mutans* CSP/MIP to its mature form. Moreover, our SAR studies revealed that Tryptophan at position 10 is important for GSP activity and that nearly half of the GSP signal from the *N*-terminus is entirely dispensable (up to nine residues) for GSP's ability to activate gallocin expression, while the *C*-terminus is essential for gallocin expression. Our findings provide the groundwork for rationally designing peptide inhibitors targeting gallocin production.

## **Acknowledgments**

This work was supported in part (Tal-Gan lab) by a grant from the National Science Foundation (CHE-1808370). We want to thank C. R. Bikash (University of Nevada, Reno) for providing purified *S. mutans* 21-CSP and D. G. Cvitkovitch (University of Toronto) for generously providing *S. mutans* SMCOM2 ( $\Delta comC$ , *pcomX::lacZ*).

## Materials and Methods

All chemical reagents and solvents were purchased from Sigma-Aldrich or Chem-Impex and used without further purification. Water (ddH<sub>2</sub>O) was purified using a Millipore Analyzer Feed System. Solid-phase Cl-MPA Protide™ resin was purchased from CEM Corporation. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) protected L- $\alpha$ -amino acids were purchased from Advanced ChemTech.

Reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was performed using a Shimadzu UFLC system equipped with a CBM-20A communications bus module, two LC-20AT pumps, a SIL-20A auto sampler, a SPD-20A UV/Vis detector, a CTO-20A column oven, and a FRC-10A fraction collector. All RP-HPLC solvents (ddH<sub>2</sub>O and HPLC-grade acetonitrile (ACN) contained 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)). Preparative RP-HPLC was performed using a Phenomenex Kinetex 5  $\mu$ m 100 Å C18 column (250 x 10 mm) while analytical RP-HPLC was performed using a Phenomenex Kinetex 5  $\mu$ m 100 Å C18 column (250 x 4.6 mm). Fmoc-based solid-phase peptide synthesis was performed on a Discover Microwave and Liberty1 Automated peptide synthesizer (CEM Corp). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) data were obtained by mixing 0.75  $\mu$ L of sample with 0.75  $\mu$ L of matrix solution ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid dissolved in ddH<sub>2</sub>O:ACN (1:1) with 0.1% TFA) on a MSP 96 polished steel target plate (Bruker Daltonics) and allowing it to air dry. Data were obtained using a Bruker Microflex spectrometer equipped with a 60 Hz (337 nm wavelength) nitrogen laser and a reflectron. MALDI-TOF MS data were obtained using reflectron positive ion mode with the following settings: ion source 1 = 19 kV, ion source 2 = 15.9 kV, lens = 8.75 kV, reflector = 20 kV, up to 300 Da matrix suppression, 200 laser shots per sample, and detector gain = 1594 V. Exact mass (EM) data were obtained on an Agilent Technologies 6230 time-of-flight mass spectrometer (TOF-MS) with the following settings for positive electrospray ionization mode (ESI+): capillary voltage = 3500 V, fragmentor voltage = 175 V, skimmer voltage = 65 V, octopole RF (Oct 1 RF Vpp) = 750 V, gas temperature = 325 °C, drying gas flow rate = 3 L/min and nebulizer = 25 psi.

**Bacterial growth conditions.** The strains used in this study were: *Sgg* UCN34 (wildtype), *Sgg* UCN34  $\Delta$ *gallo\_rs10340* ( $\Delta$ *gsp*), *Sgg* UCN34  $\Delta$ *gsp* pTCV $\Omega$ *PgllA-gfp*, *Sgg* UCN34  $\Delta$ *gallo\_rs03005* ( $\Delta$ *sepM*), *Sgg* UCN34  $\Delta$ *sepM* pTCV $\Omega$ *PgllA-gfp*, *Sgg* UCN34

*Δgallo\_rs10390/10395 (ΔblpAB)*, *Sgg* UCN34 *ΔblpAB* pTCVΩP*gllA-gfp*. The following procedure was followed for each obtained isolate: a freezer stock was streaked onto a plate of Todd-Hewitt agar supplemented with 0.5% yeast extract (THY plate). Strains containing the pTCVΩP*gllA-gfp* plasmid were grown in the presence of erythromycin (EM) at a final concentration of 10 μg/μL. The plates were incubated for 12-24 h in a CO<sub>2</sub> incubator (37 °C with 5% CO<sub>2</sub>). Fresh colonies were picked and inoculated into a sterilized culture tube containing 2 mL of sterile THY broth and incubated statically in a CO<sub>2</sub> incubator overnight. The overnight culture was used for the experiments describe below.

**Solid-phase peptide synthesis.** Peptide synthesis and purification of analogs was conducted using previously established methods (10). All peptides were purified to homogeneity (>95%) and their identity validated via mass spectrometry (**Table S1**).

**General assay considerations.** Fluorescence and absorbance measurements were recorded using a Biotek Synergy H1 microplate reader using Gen5 data analysis software (v.3.03). Biological assays were performed in triplicate per trial. EC<sub>50</sub> values from three trials were calculated using GraphPad Prism software (v. 7.0) using a sigmoidal curve fit.

Stock solutions of peptides (1 mM) were prepared in DMSO and stored at 4 °C in sealed glass vials. The maximum concentration of DMSO used in all biological assays did not exceed 2% (v/v). Black polystyrene 96-well microtiter plates (Costar) were used for the GFP cell-based reporter assays.

**Gallocin Induction Reporter Gene Assay Protocol.** Peptide stock solutions were serially diluted with DMSO in either 1:2, 1:3 or 1:5 dilutions and 2 μL of the diluted solution was added to each of the wells in a black 96-well microtiter plate. Each concentration was tested in triplicate with DMSO only used as a negative control. Screening of peptide analogs was conducted using the *Sgg* UCN34 *Δgsp* pTCVΩP*gllA-gfp* strain. An overnight culture was used to make a fresh 2 mL culture without EM using a 1:10 dilution on the day of the experiment and incubated in a CO<sub>2</sub> incubator (37 °C with 5% CO<sub>2</sub>) for 3-4 hr to reach mid to late log phase of growth (OD<sub>600</sub> = 0.6 - 0.9). A final 1:10 dilution was made on a larger scale (20 mL) without EM and used for the assay, where 198 μL diluted bacterial culture was added to each well of the microtiter plate containing peptides. Plates were incubated at 37 °C with shaking at 200 rpm. Fluorescence (EX 485 nm and EM 516 nm) and optical density (600 nm) readings were recorded for each well using a plate reader.

Measurements were taken 1 hr after inoculation and were recorded every 20-30 min for up to 3 hr to capture the maximum fluorescence signal. The maximum fluorescence signal was normalized with the OD<sub>600</sub> value and used to construct dose-curves to determine the EC<sub>50</sub>.

**Gallocin Inhibition Screening.** Peptide analogs that exhibited less than 50% activation at 10,000 nM relative to 1,000 nM *Sgg* GSP were screened for competitive inhibition. Competitive inhibition was tested by mixing 10,000 nM peptide analog with 20 nM *Sgg* GSP and compared to activation by 20 nM *Sgg* GSP without the addition of synthetic analogs. Peptide analogs were tested in triplicate per trial for three trials (**Data not shown**).

**PDZ domain containing protease/SepM function LC-MS experiment.** *Sgg* strains ( $\Delta$ *gsp*,  $\Delta$ *sepM*) and *S. mutans* SMCC3 ( $\Delta$ *comC*) were grown in 60 mL THY overnight at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and centrifuged at 4,000 x g for 15 min. The supernatant was discarded, and the cell pellets were washed with 30 mL of sterile saline solution (0.9% w/v NaCl). The cell suspensions were centrifuged at 4,000 x g for 15 min and the supernatant was discarded. The cell pellet was resuspended in 6 mL sterile saline solution and used for the SepM function experiment. The peptides tested: *Sgg* GSP, KNK-*Sgg* GSP and *S. mutans* 21-mer CSP, were resuspended in sterile H<sub>2</sub>O to a final concentration of 1 mM. For each strain tested, around 900  $\mu$ L of the cell suspension was mixed with 100  $\mu$ L of each peptide separately to give a 100  $\mu$ M concentration. “Cell only” control for each strain was made with 900  $\mu$ L of each cell suspension with 100  $\mu$ L of sterile saline solution. “Peptide only” control for each peptide was made in sterile saline solution at 100  $\mu$ M concentration. All variables tested were conducted in sterile 1.5 mL microcentrifuge tubes. All samples were incubated at 37 °C with shaking at 200 rpm for 30 min. After 30 min, the samples were centrifuged at 5,000 x g for 1 min. A 200  $\mu$ L aliquot from each sample was filter thru a sterile 0.45  $\mu$ m syringe filter (Phenomenex Phenex™-RC 4mm Syringe Filter) into a sterile 1.5 mL microfuge tube. LC-MS analysis of each sample was performed using XBridge C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm) on an Agilent Technology 1200 series LC connected to Agilent Technologies 6230 TOF-MS. The solvents used for LC-MS were mobile phase A = ddH<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid and mobile phase B = ACN + 0.1% formic acid. The LC-MS method used to analyze components in the filtrates had an injection volume of 100  $\mu$ L and the following linear gradient with a flow rate of 0.5 mL per minute: 5% → 95% B over 25 min.



**LC-MS identifying secreted GSP pheromone.** *Sgg* strains (wild-type,  $\Delta sepM$  and  $\Delta blpAB$ ) were grown in 40 mL of sterile THY at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> for 12 hrs. The cultures were centrifuged at 4,000 x g for 15 min, the supernatant was discarded, and the cell pellets were resuspended in 5 mL of sterile THY. The resuspended cells were incubated for 16 hrs and centrifuged at 4,000 x g for 15 min. The supernatant was filter-steriled using a 0.22  $\mu$ m syringe filter (CELLTREAT PES 30 mm diameter Syringe Filter) into a sterile 1.5 mL microfuge tube. LC-MS analysis of each sample was performed using XBridge C18 column (5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm) on an Agilent Technology 1200 series LC connected to Agilent Technologies 6230 TOF-MS. The solvents used for LC-MS were mobile phase A = ddH<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid and mobile phase B = ACN + 0.1% formic acid. The LC-MS method used to analyze components in the filtrates had an injection volume of 50  $\mu$ L and the following linear gradient with a flow rate of 0.5 mL per minute: 5%  $\rightarrow$  95% B over 25 min.

**Bacteriocin Activity Assay.** For well diffusion assays, 2 mL of prey bacteria (here exponentially growing SGM OD<sub>600</sub>  $\approx$  0.5) were poured on a THY agar plate. After removal of excess liquid, the plate was dried for 15 min. Using sterile tips, 5-mm-diameter wells were dug into the agar. Wells were filled with 80  $\mu$ L of *Sgg* filtered supernatant supplemented with 0.1% Tween 20. When the wells were dry, plates were incubated inverted overnight at 37 °C and the inhibition rings were observable the next day.

**Construction of deletion mutants in *Sgg* strain UCN34.** The  $\Delta blpAB$  (*gallo\_rs10390-10395*) and  $\Delta sepM$  (*gallo\_rs03005*) mutants were constructed as reported previously in *Sgg* strain UCN34 (33). The primers used are listed in **Table 4**. Briefly, a 1 kb fragment corresponding to the 5' and 3' ends of the region to delete was obtained by splicing-by-overlap extension PCR and digested with the restriction enzymes *EcoRI* and *BamHI* and cloned into the thermosensitive vector pG1-oriT<sub>TnGBS1</sub>. The resulting plasmids pG1 $\Omega abc$  and pG1 $\Omega sepM$  were electroporated in *Streptococcus agalactiae* NEM316 and transferred to *Sgg* UCN34 by conjugation. Chromosomal integration of the plasmid was selected on THY containing erythromycin (10  $\mu$ g/mL) at 38 °C, a non-permissive temperature for plasmid replication. Then, excision of the plasmid from the chromosome by a second event of homologous recombination was obtained by successive cultures at 30 °C in THY broth without erythromycin resulting in either gene deletion or back to the wild type (bWT) clones. Mutants were systematically tested for erythromycin sensitivity to confirm the loss of the plasmid and confirmed by PCR and sequencing of the chromosomal locus flanking the deletion region.

**Table 4.** Primers used in this study

Primer	Sequence	Fragment length
UCN34 : $\Delta blpAB$		
Del <i>abc-1</i>	TTCTGAATTCGTCTAACAGATTGTGAGG	571 bp
Del <i>abc-2</i>	ATGGCTGGACTTATCATCTTCTCATAACCTTTCCC	
Del <i>abc-3</i>	GGGAAAGGTTATGAGAAGATGATAAGTCCAGCCAT	552 bp
Del <i>abc-4</i>	TTCTGGATCCAACGCCTGCGGTGAGTGA	
UCN34 : $\Delta sepM$		
Del <i>sepM-1</i>	TTCTGAATCCGGGGTCTTTTGACCCTG	513 bp
Del <i>sepM-2</i>	TCGTAGATAGTCAATTGCGCGATATAAAATACGACC	
Del <i>sepM-3</i>	GGTCGTATTTTATATCGCGCAATTGACTATCTACGA	507 bp
Del <i>sepM-4</i>	TTCTGGATCCAATTAGCACATTTGCACC	

### Indirect detection of GSP in the supernatant

Strains tested for GSP production were inoculated at  $DO_{600}=0,1$  in THY and grown at 37°C. At  $DO_{600}=1$ , the cells were pelleted and the supernatants tested for GSP presence were harvested and filtered. After an overnight culture, 100 $\mu$ L of the reporter strain *Sgg*  $\Delta gsp$  pTCV $\Omega$ PgllA-*gfp* were pelleted and resuspended in 1mL of the tested supernatant. After 3 hours of incubation at 37°C, the fluorescence of the reporter strain was measured by flow cytometry using MACSQuant® VYB flow cytometer.

## References

1. Schlegel L, Grimont F, Ageron E, Grimont PA, & Bouvet A (2003) Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(3):631-645.
2. Dekker JP & Lau AF (2016) An update on the *Streptococcus bovis* group: classification, identification, and disease associations. *Journal of clinical microbiology* 54(7):1694-1699.
3. Dumke J, et al. (2015) Potential transmission pathways of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. *PLoS One* 10(5):e0126507.
4. Boleij A, van Gelder MM, Swinkels DW, & Tjalsma H (2011) Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* infection among colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* 53(9):870-878.
5. Boleij A, et al. (2011) Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* with colorectal cancer. *Journal of Infectious Diseases* 203(8):1101-1109.
6. Tjalsma H, Boleij A, Marchesi JR, & Dutilh BE (2012) A bacterial driver-passenger model for colorectal cancer: beyond the usual suspects. *Nature Reviews Microbiology* 10(8):575.
7. Geng J, et al. (2014) Co-occurrence of driver and passenger bacteria in human colorectal cancer. *Gut pathogens* 6(1):26.
8. Kumar R, et al. (2017) *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* promotes colorectal tumor development. *PLoS pathogens* 13(7):e1006440.
9. Aymeric L, et al. (2018) Colorectal cancer specific conditions promote *Streptococcus gallolyticus* gut colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(2):E283-E291.
10. Harrington A & Tal-Gan Y (2018) Identification of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (biotype I) competence stimulating peptide pheromone. *Journal of bacteriology*:JB. 00709-00717.
11. Tomasz A (1966) Model for the Mechanism Controlling the Expression of Competent State in *Pneumococcus* Cultures. *Journal of Bacteriology* 91(3):1050-1061.
12. Håvarstein LS, Coomaraswamy G, & Morrison DA (1995) An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(24):11140-11144.
13. Havarstein LS, Diep DB, & Nes IF (1995) A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. *Molecular microbiology* 16(2):229-240.
14. Shanker E & Federle MJ (2017) Quorum Sensing Regulation of Competence and Bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and mutants. *Genes* 8(1):15.
15. Luo P, Li H, & Morrison DA (2003) ComX is a unique link between multiple quorum sensing outputs and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular microbiology* 50(2):623-633.
16. Håvarstein LS, Hakenbeck R, & Gaustad P (1997) Natural competence in the genus *Streptococcus*: evidence that streptococci can change pherotype by interspecies recombinational exchanges. *Journal of bacteriology* 179(21):6589-6594.
17. Ween O, Teigen S, Gaustad P, Kilian M, & Håvarstein LS (2002) Competence without a competence pheromone in a natural isolate of *Streptococcus infantis*. *Journal of bacteriology* 184(13):3426-3432.
18. Tong H, et al. (2006) Establishing a genetic system for ecological studies of *Streptococcus oligofermentans*. *FEMS microbiology letters* 264(2):213-219.

19. Fontaine L, *et al.* (2010) A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *Journal of bacteriology* 192(5):1444-1454.
20. Mashburn-Warren L, Morrison DA, & Federle MJ (2010) A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Molecular microbiology* 78(3):589-606.
21. Wang CY & Dawid S (2018) Mobilization of Bacteriocins during competence in Streptococci. *Trends in microbiology* 26(5):389-391.
22. Ahn S-J, Wen ZT, & Burne RA (2006) Multilevel Control of Competence Development and Stress Tolerance in *Streptococcus mutans* UA159. *Infection and Immunity* 74(3):1631-1642.
23. Li Y-H, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, & Cvitkovitch DG (2001) Natural genetic transformation of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *Journal of bacteriology* 183(3):897-908.
24. Li Y-H, *et al.* (2002) A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *Journal of bacteriology* 184(10):2699-2708.
25. Lemme A, Gröbe L, Reck M, Tomasch J, & Wagner-Döbler I (2011) Subpopulation-specific transcriptome analysis of competence-stimulating-peptide-induced *Streptococcus mutans*. *Journal of bacteriology* 193(8):1863-1877.
26. Reck M, Tomasch J, & Wagner-Döbler I (2015) The alternative sigma factor SigX controls bacteriocin synthesis and competence, the two quorum sensing regulated traits in *Streptococcus mutans*. *PLoS genetics* 11(7):e1005353.
27. Premnath P, Reck M, Wittstein K, Stadler M, & Wagner-Döbler I (2018) Screening for inhibitors of mutacin synthesis in *Streptococcus mutans* using fluorescent reporter strains. *BMC microbiology* 18(1):24.
28. Biswas S, Cao L, Kim A, & Biswas I (2016) SepM, a streptococcal protease involved in quorum sensing, displays strict substrate specificity. *Journal of bacteriology* 198(3):436-447.
29. Hossain MS & Biswas I (2012) An extracellular protease, SepM, generates functional CSP in *Streptococcus mutans* UA159. *Journal of bacteriology*:JB. 01381-01312.
30. Fontaine L, *et al.* (2013) Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci. *Molecular microbiology* 87(6):1113-1132.
31. Lin I-H, *et al.* (2011) Sequencing and comparative genome analysis of two pathogenic *Streptococcus gallolyticus* subspecies: genome plasticity, adaptation and virulence. *PLoS One* 6(5):e20519.
32. Morrison DA, Guédon E, & Renault P (2013) Competence for natural genetic transformation in the *Streptococcus bovis* group streptococci *S. infantarius* and *S. macedonicus*. *Journal of bacteriology* 195(11):2612-2620.
33. Danne C, Guerillot R, Glaser P, Trieu-Cuot P, & Dramsi S (2013) Construction of isogenic mutants in *Streptococcus gallolyticus* based on the development of new mobilizable vectors. *Res Microbiol* 164(10):973-978.

# Secretion, Maturation and Activity of a Quorum Sensing Peptide (GSP) inducing bacteriocins transcription in *Streptococcus gallolyticus*

Anthony Harrington,<sup>1,‡</sup> Alexis Proutiere<sup>2,3,‡</sup> Shaynoor Dramsi,<sup>2,3,\*</sup> and Yftah Tal-Gan<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Chemistry, University of Nevada, Reno, 1664 North Virginia Street, Reno, Nevada 89557, United States

<sup>2</sup> Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram-positif, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

<sup>3</sup> CNRS UMR 2001, 75015 Paris, France

‡ These authors contributed equally to this work.

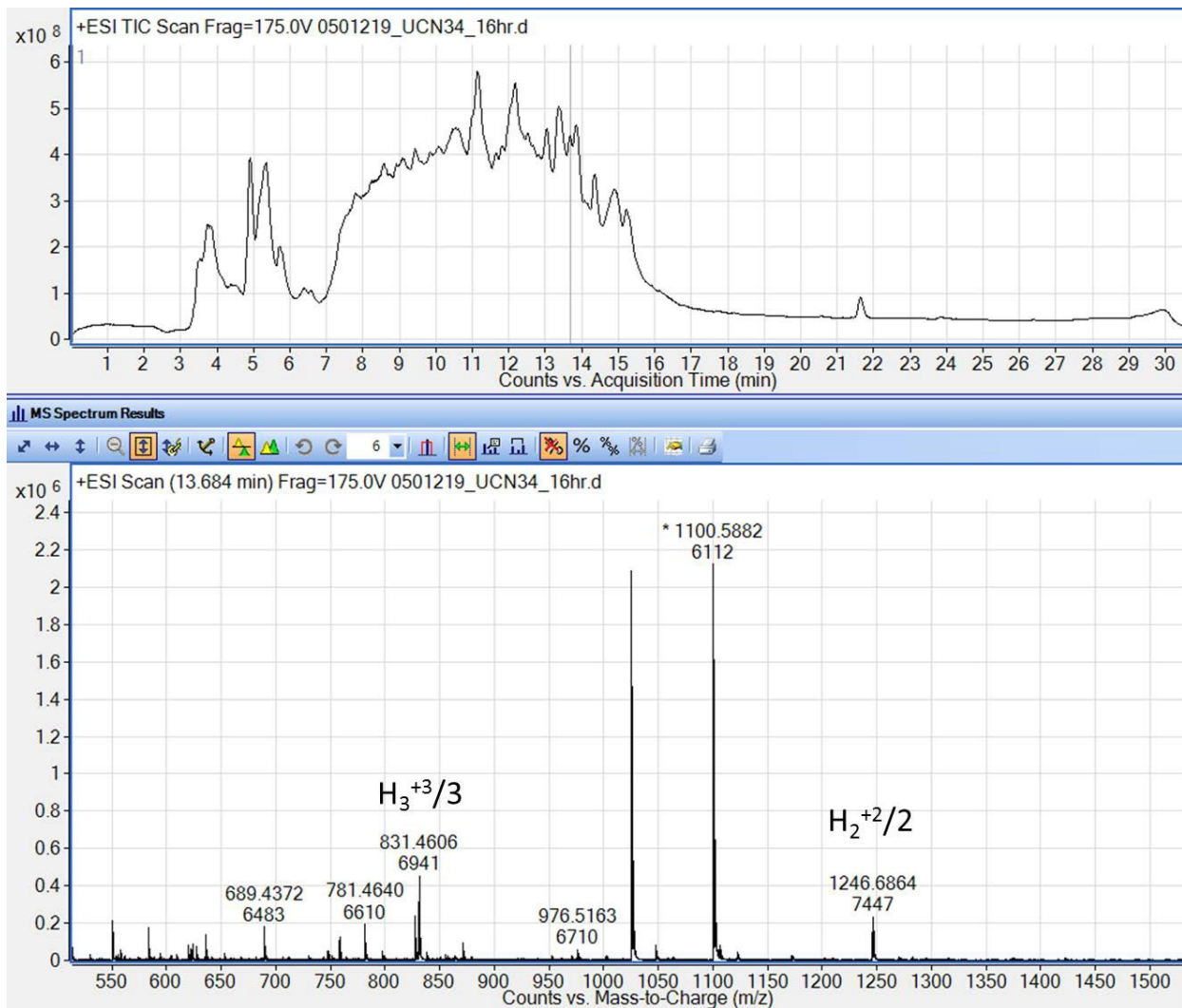
\*Address correspondence to Yftah Tal-Gan, [ytalgan@unr.edu](mailto:ytalgan@unr.edu), or Shaynoor Dramsi, [shaynoor.dramsi@pasteur.fr](mailto:shaynoor.dramsi@pasteur.fr).

Supporting information Table of Contents

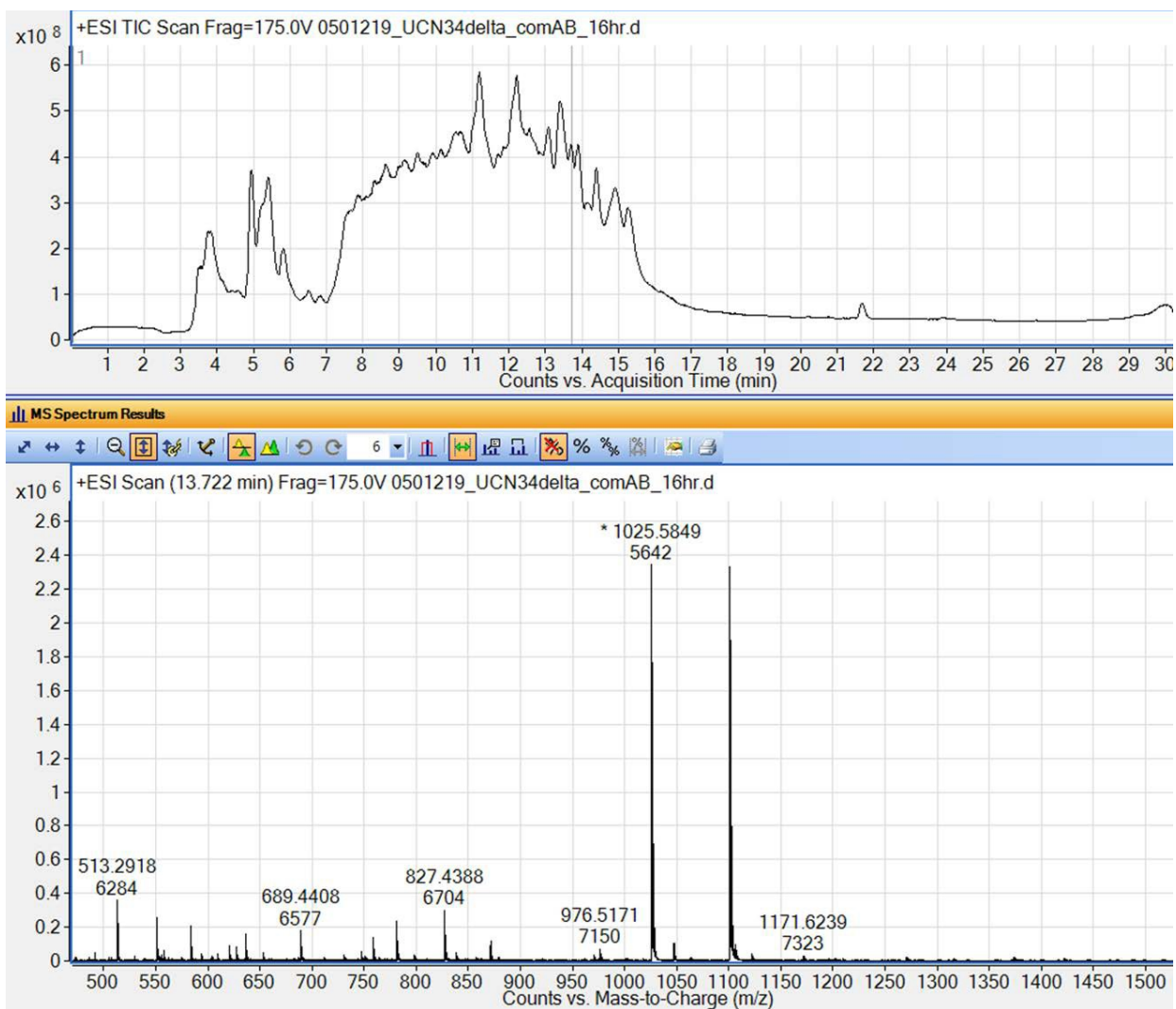
## Contents

LC-MS identifying secreted GSP pheromone .....	2
LC-MS results of SepM Studies.....	5
MS and HPLC data of <i>Sgg</i> GSP analogs.....	11

## LC-MS identifying secreted GSP pheromone



**Figure S1.** LC-MS of UCN34 supernatant after 16 hours incubation. *Sgg* GSP expected: H<sub>2</sub><sup>+2</sup>/2 [1246.6855 Da] and H<sub>3</sub><sup>+3</sup>/3 [831.4594 Da].



**Figure S2.** LC-MS of UCN34Δ*blpAB* supernatant after 16 hours incubation. No *Sgg* GSP is detected.



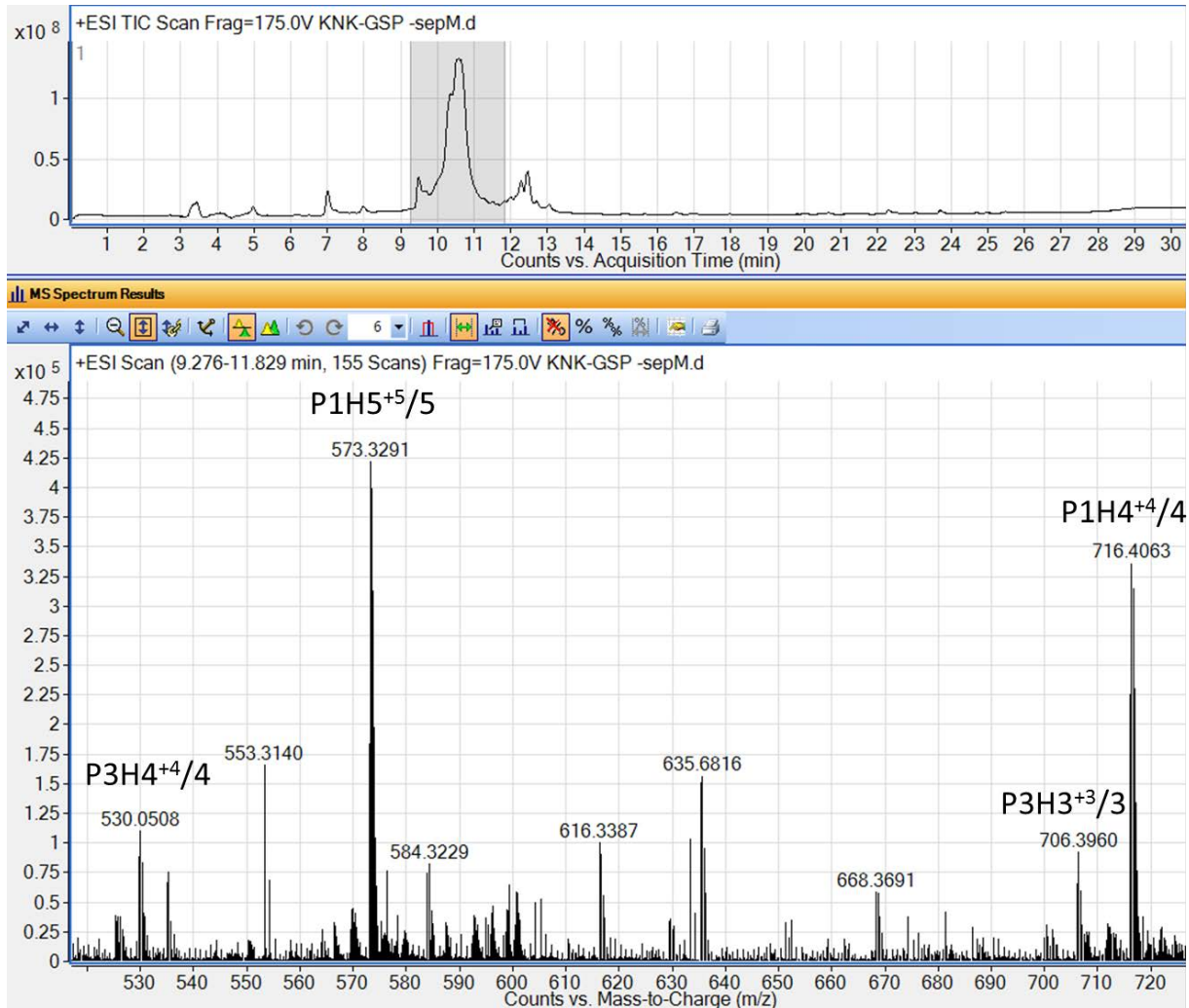
**Figure S3.** LC-MS of UCN34 $\Delta$ *sepM* supernatant after 16 hours incubation. *Sgg* GSP expected:  $H_2^{+2}/2$  [1246.6855 Da] and  $H_3^{+3}/3$  [831.4594 Da].



## LC-MS results of SepM Studies

KNK-*Sgg* GSP = P1

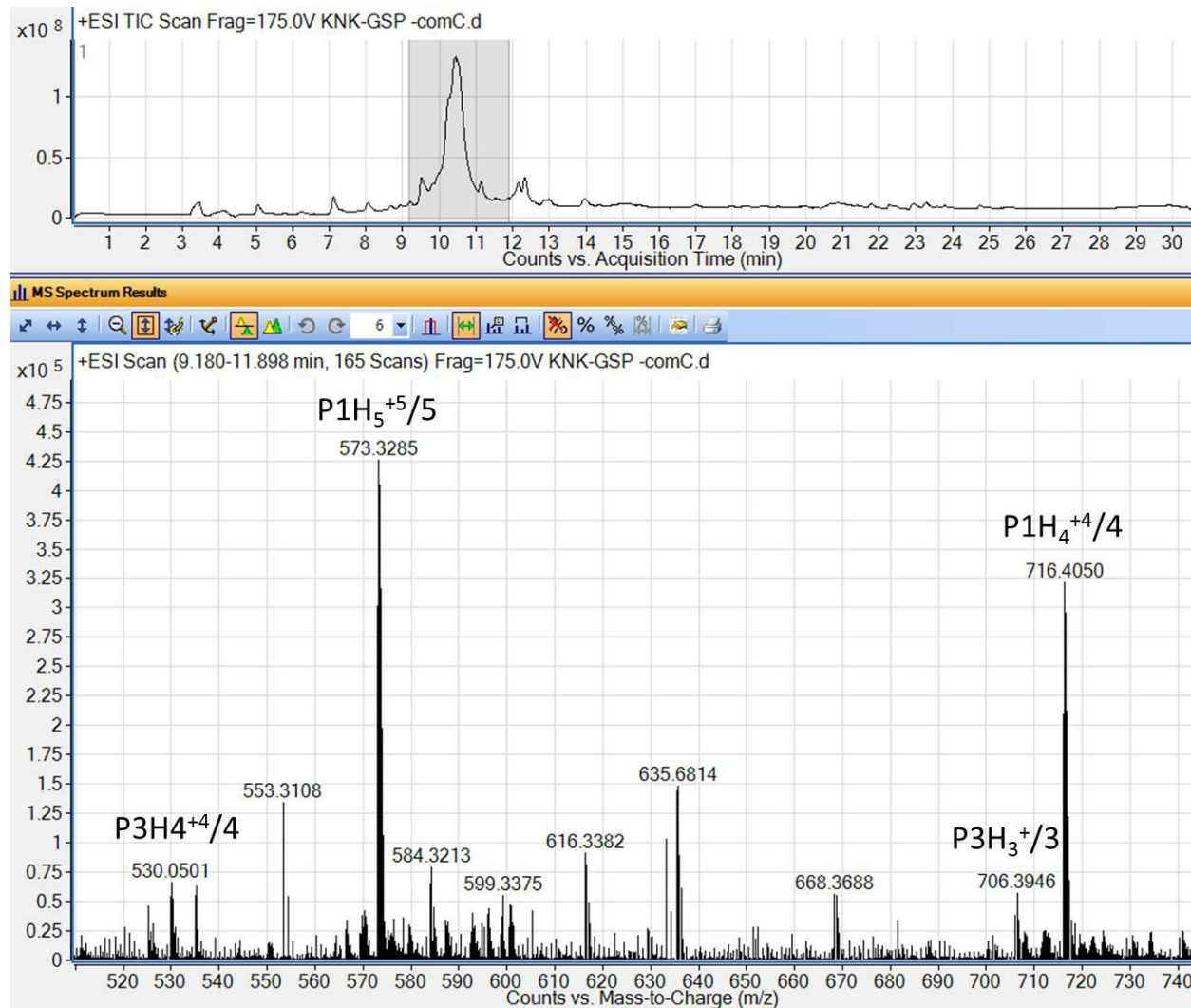
*Sgg* GSP-des-D1-L3 = P3



**Figure S4.** LC-MS of KNK-*Sgg* GSP incubated with UCN34 $\Delta$ *sepM* cells in saline solution for 30 min. KNK-*Sgg* GSP (P1) expected: P1H<sub>4</sub><sup>+</sup>4/4 [716.4046 Da] and P1H<sub>4</sub><sup>+</sup>5/5 [573.3251 Da]. *Sgg* GSP-des-D1-L3 (P3) expected: P3H<sub>3</sub><sup>+</sup>3/3 [706.3996 Da] and P1H<sub>4</sub><sup>+</sup>4/4 [530.0515 Da].

KNK-*Sgg* GSP = P1

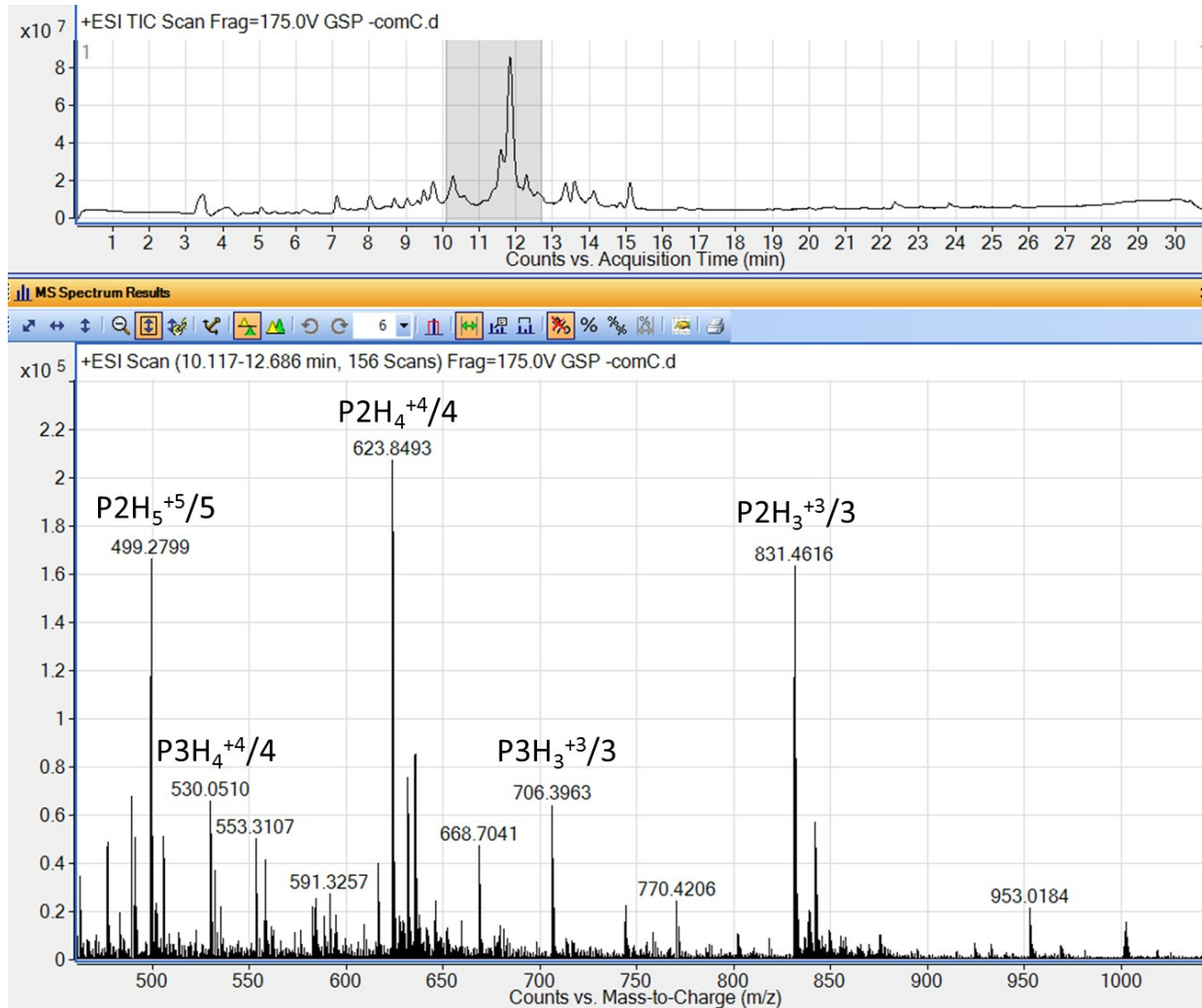
*Sgg* GSP-des-D1-L3 = P3



**Figure S5.** LC-MS of KNK-*Sgg* GSP incubated with UCN34Δ*gsp* cells in saline solution for 30 min. KNK-*Sgg* GSP expected: P1H<sub>4</sub><sup>+4/4</sup> [716.4046 Da] and P1H<sub>5</sub><sup>+5/5</sup> [573.3251 Da]. *Sgg* GSP-des-D1-L3 expected: P3H<sub>3</sub><sup>+3/2</sup> [706.3996 Da] and P3H<sub>4</sub><sup>+4/4</sup> [530.0515 Da].

*Sgg* GSP = P2

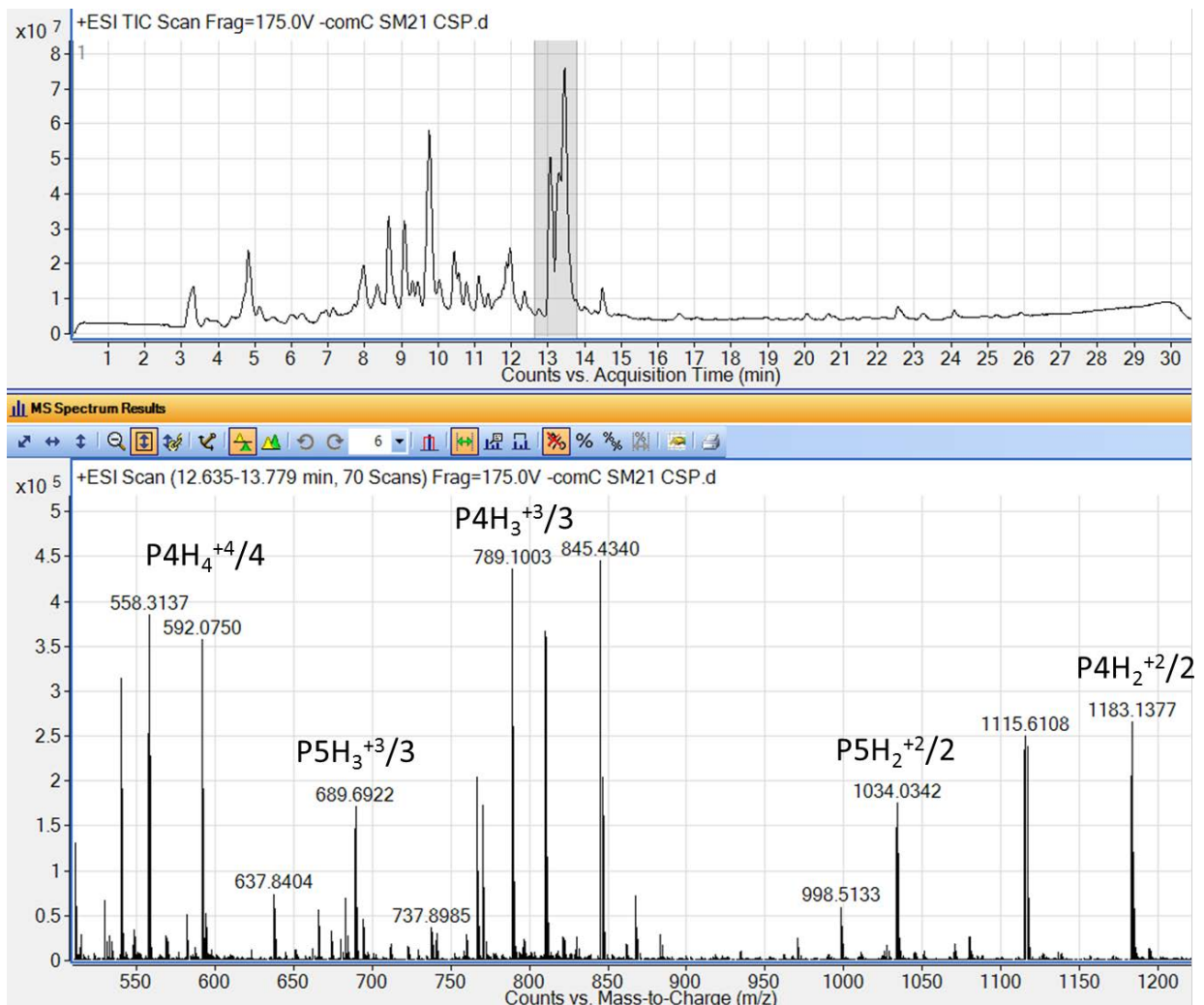
*Sgg* GSP-des-D1-L3 = P3



**Figure S6.** LC-MS of *Sgg* GSP incubated with UCN34Δ*gsp* cells in saline solution for 30 min. *Sgg* GSP (P2) expected: P2H<sub>3</sub><sup>+3/3</sup> [831.4594 Da], P2H<sub>4</sub><sup>+4/4</sup> [623.8464 Da] and P2H<sub>5</sub><sup>+5/5</sup> [499.2786 Da]. *Sgg* GSP-des-D1-L3 (P3) expected: P3H<sub>3</sub><sup>+3/3</sup> [706.3996 Da] and P3H<sub>4</sub><sup>+4/4</sup> [530.0515 Da].

*S. mutans* 21-mer CSP = P4

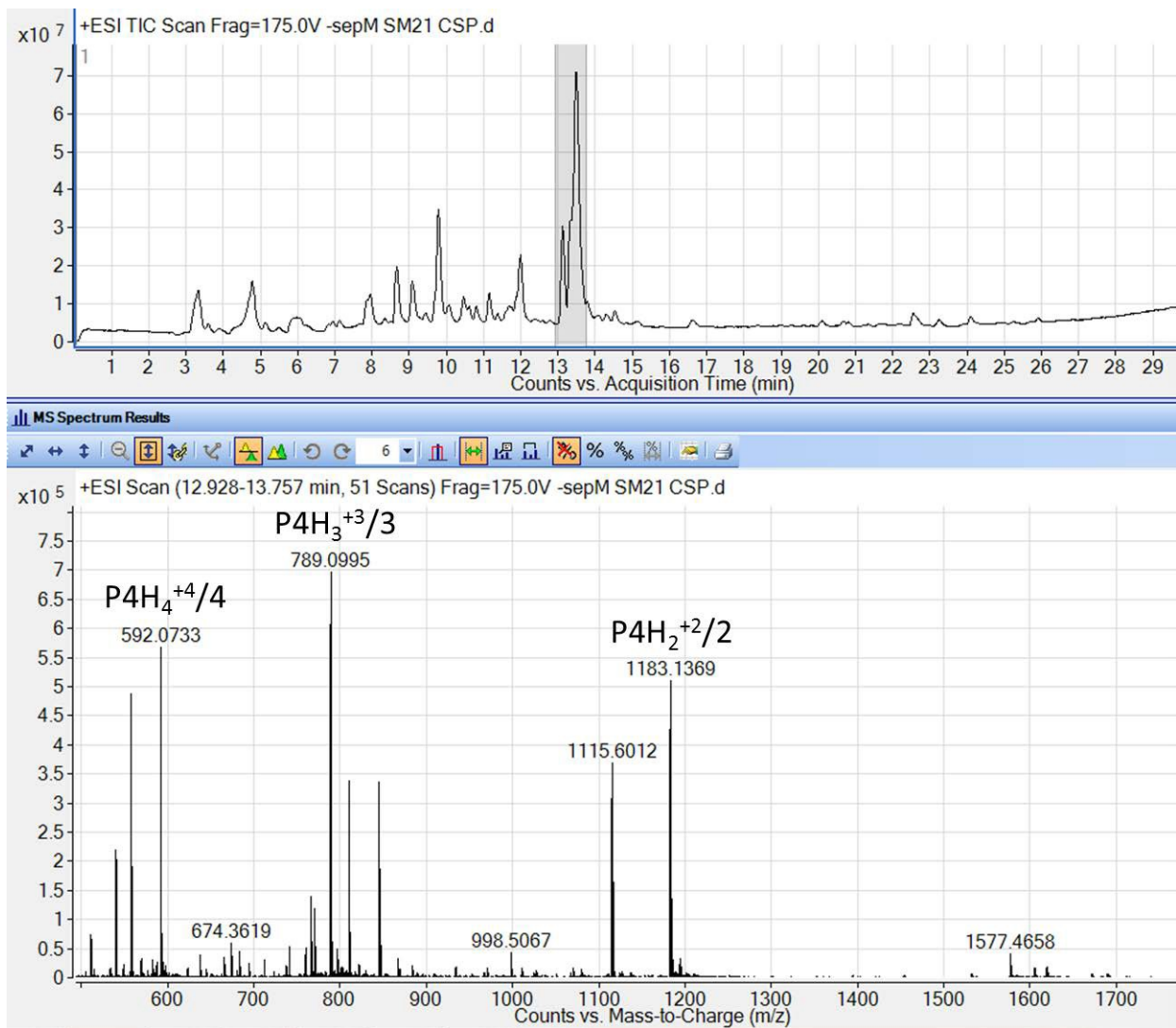
*S. mutans* 18-mer CSP = P5



**Figure S7.** LC-MS of *S. mutans* 21-mer CSP incubated with UCN34Δ*gsp* cells in saline solution for 30 min. *S. mutans* 21-mer (P4) expected: P4H<sub>2</sub><sup>+2</sup>/2 [1183.128 Da], P4H<sub>3</sub><sup>+3</sup>/3 [789.0878 Da] and P4H<sub>4</sub><sup>+4</sup>/4 [592.0676 Da]. *S. mutans* 18-mer CSP (P5) expected: P5H<sub>2</sub><sup>+2</sup>/2 [1034.0278 Da] and P4H<sub>3</sub><sup>+3</sup>/3 [689.6876 Da].

*S. mutans* 21-mer CSP = P4

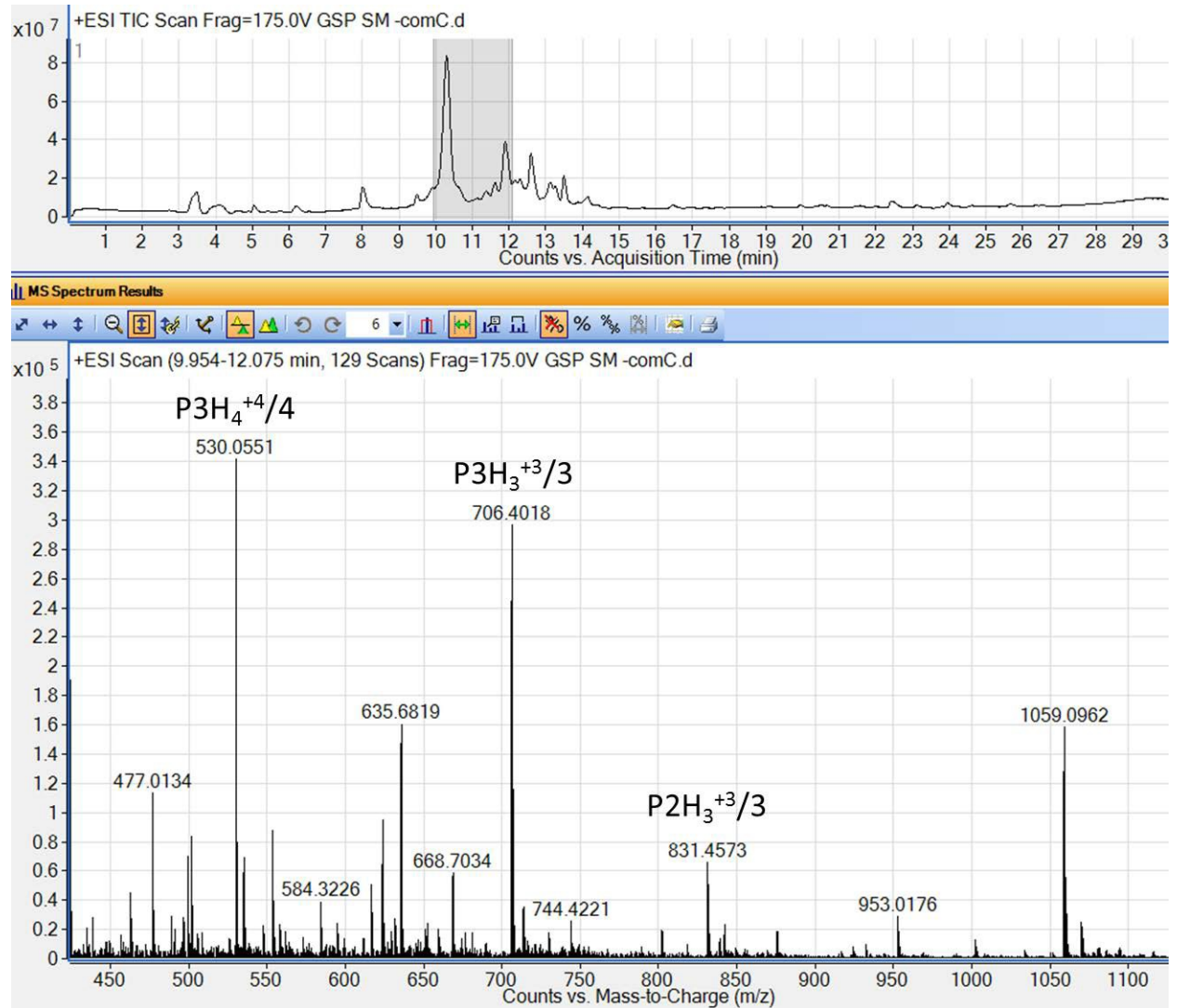
*S. mutans* 18-mer CSP = P5



**Figure S8.** LC-MS of *S. mutans* 21-mer CSP incubated with UCN34 $\Delta$ sepM cells in saline solution for 30 min. *S. mutans* 21-mer (P4) expected: P4H<sub>2</sub><sup>+2</sup>/2 [1183.128 Da], P4H<sub>3</sub><sup>+3</sup>/3 [789.0878 Da] and P4H<sub>4</sub><sup>+4</sup>/4 [592.0676 Da].

*Sgg* GSP = P2

*Sgg* GSP-des-D1-L3 = P3



**Figure S9.** LC-MS of *Sgg* GSP incubated with *S. mutans*  $\Delta comC$  cells in saline solution for 30 min. *Sgg* GSP (P2) expected: P2H<sub>3</sub><sup>+3</sup>/3 [831.4594 Da]. *Sgg* GSP-des-D1-L3 (P3) expected: P3H<sub>3</sub><sup>+3</sup>/3 [706.3996 Da] and P3H<sub>4</sub><sup>+4</sup>/4 [530.0515 Da].

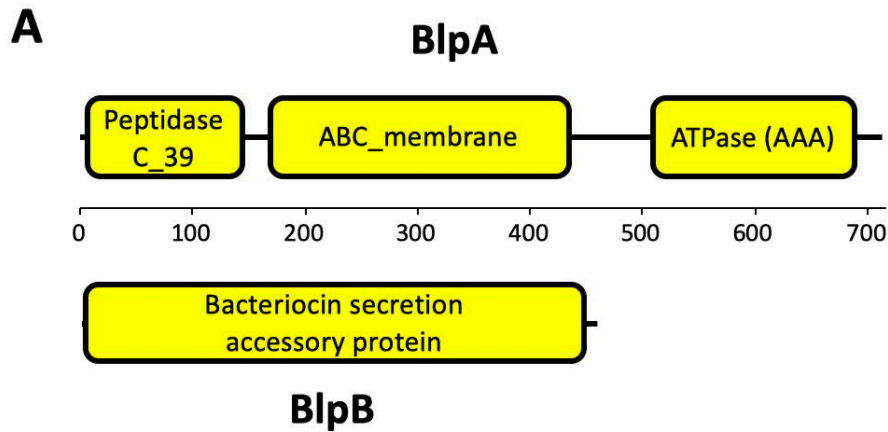
## **MS and HPLC data of Sgg GSP analogs**

**Table S1.** MS and HPLC data of Sgg GSP analogs

Compound Name	Calc. EM [MH <sub>3</sub> ] <sup>+3</sup> /3	Obs. EM [MH <sub>3</sub> ] <sup>+3</sup> /3	Purity (%)
Sgg GSP D1A	816.7962	816.7961	> 99
Sgg GSP F2A	806.1157	806.1149	> 96
Sgg GSP L3A	817.4438	817.4423	> 98
Sgg GSP I4A	817.4438	817.4420	> 99
Sgg GSP V5A	822.1157	822.1125	> 99
Sgg GSP G6A	836.1313	836.1272	> 99
Sgg GSP P7A	617.3425 [MH <sub>4</sub> ] <sup>+4</sup> /4	617.3395 [MH <sub>4</sub> ] <sup>+4</sup> /4	> 99
Sgg GSP F8A	806.1157	806.1132	> 99
Sgg GSP D9A	816.7962	816.7952	> 99
Sgg GSP W10A	793.1120	793.1087	> 97
Sgg GSP L11A	817.4438	817.4406	> 99
Sgg GSP K12A	812.4402	812.4377	> 98
Sgg GSP K13A	812.4402	812.4396	> 99
Sgg GSP N14A	817.1242	817.1244	> 97
Sgg GSP H15A	809.4522	809.4504	> 99
Sgg GSP K16A	812.4402	812.4375	> 99
Sgg GSP P17A	822.7876	822.7867	> 98
Sgg GSP T18A	616.3438 [MH <sub>4</sub> ] <sup>+4</sup> /4	616.3413 [MH <sub>4</sub> ] <sup>+4</sup> /4	> 95
Sgg GSP K19A	609.5819	609.5796	> 99
Sgg GSP H20A	809.4522	809.4485	> 98
KNK-Sgg GSP	716.4046 [MH <sub>4</sub> ] <sup>+4</sup> /4	716.4021 [MH <sub>4</sub> ] <sup>+4</sup> /4	> 99
NK-Sgg GSP	912.1721	912.1726	> 98
K-Sgg GSP	874.1578	874.1547	> 97
Sgg GSP-des-D1	595.0897 [MH <sub>4</sub> ] <sup>+4</sup> /4	595.0869 [MH <sub>4</sub> ] <sup>+4</sup> /4	> 97
Sgg GSP-des-D1F2	558.3226 [MH <sub>4</sub> ] <sup>+4</sup> /4	558.3211 [MH <sub>4</sub> ] <sup>+4</sup> /4	> 96
Sgg GSP-des-D1-L3	706.3996	706.3964	> 99
Sgg GSP-des-D1-I4	668.7049	668.7026	> 98
Sgg GSP-des-D1-V5	635.6821	635.6801	> 96
Sgg GSP-des-D1-G6	616.6750	616.6745	> 99
Sgg GSP-des-D1-P7	583.9898	583.9899	> 97
Sgg GSP-des-D1-F8	801.9468 [MH <sub>2</sub> ] <sup>+2</sup> /2	801.9448 [MH <sub>2</sub> ] <sup>+2</sup> /2	> 98
Sgg GSP-des-D1-D9	744.4333 [MH <sub>2</sub> ] <sup>+2</sup> /2	744.4365 [MH <sub>2</sub> ] <sup>+2</sup> /2	> 96
Sgg GSP-des-D1-W10	434.5982	434.5997	> 98
Sgg GSP-des-A21	807.7804	807.7769	> 96
Sgg GSP-des-H20A21	762.0941	762.0955	> 98
Sgg GSP-des-K19-A21	719.3958	719.3952	> 99

EM = Exact Mass





**B**

Peptides leaders :

GSP	MMTEKMFKELNQSELEKTI GG
GIIA1	MSLNKFTNFQELDKNHLQTI SGG
GIIA2	MNTKTFEQFDVMTDEALSKVEGG

Figure 19 : Sécrétion et maturation des peptides GIIA1, GIIA2 et GSP

A : Domaines fonctionnels annotés (SMART et BLAST) du transporteur BlpA et BlpB (715 et 464 acides aminés respectivement). B : Alignement des séquences en acides aminés des peptides leaders de GSP, GIIA1 et GIIA2.



## Résultats complémentaires

Le système de transport BlpAB est composé de BlpA, un ABC transporteur, et BlpB, sa protéine accessoire dont le rôle exact n'est pas connu. BlpA est une protéine de 716 acides aminés qui contient un domaine transmembranaire (ABC\_membrane) et un domaine ATPase (AAA) caractéristiques des ABC transporteurs (Figure 19A). Il contient aussi un domaine peptidase (Peptidase\_C39) en position N-terminale conservé dans les ABC transporteurs responsables du clivage des peptides leaders de type double glycine des bactériocines lors de leur sécrétion (Havarstein et al., 1995).

Puisque le système BlpAB sécrète les peptides GSP, GIIA1 et GIIA2, et que les peptides leaders semblent importants pour la reconnaissance du peptide sécrété par l'ABC transporteur (Aucher et al., 2005), nous avons comparé la séquence des peptides leaders de ces trois peptides. De manière surprenante, les peptides leaders de GSP, GIIA1 et GIIA2 possèdent très peu de similarités en termes de séquence primaire (Figure 19B). Le mécanisme de reconnaissance de ces peptides par l'ABC transporteur reste donc énigmatique. Il sera intéressant de mieux comprendre le mécanisme de reconnaissance par l'ABC transporteur et de voir si les quelques résidus conservés dans ces trois peptides leaders jouent un rôle.

Des expériences d'expression hétérologue de BlpAB et du peptide GSP sont en cours chez *Lactococcus lactis* afin de tester si BlpAB seul est suffisant pour obtenir la forme mature GSP-21. Les 3 gènes ont été clonés sur un plasmide sous contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotétracycline (AnTc) et le plasmide a été introduit dans la souche de *L. lactis* NZ9000. Cette souche a été construite récemment et le surnageant de la souche induite à l'AnTc était capable d'activer le promoteur de la gallocine *PgIIA-gfp* chez *Sgg*  $\Delta$ *gsp*, contrairement au surnageant de la même souche sans induction. Ce résultat prometteur montre que cette souche recombinante de *L. lactis* est capable de sécréter et maturer le GSP grâce au transporteur BlpAB. Le surnageant est en cours d'analyse par spectrométrie de masse par nos collaborateurs aux États-Unis pour déterminer s'il s'agit du GSP-24 ou du GSP-21.

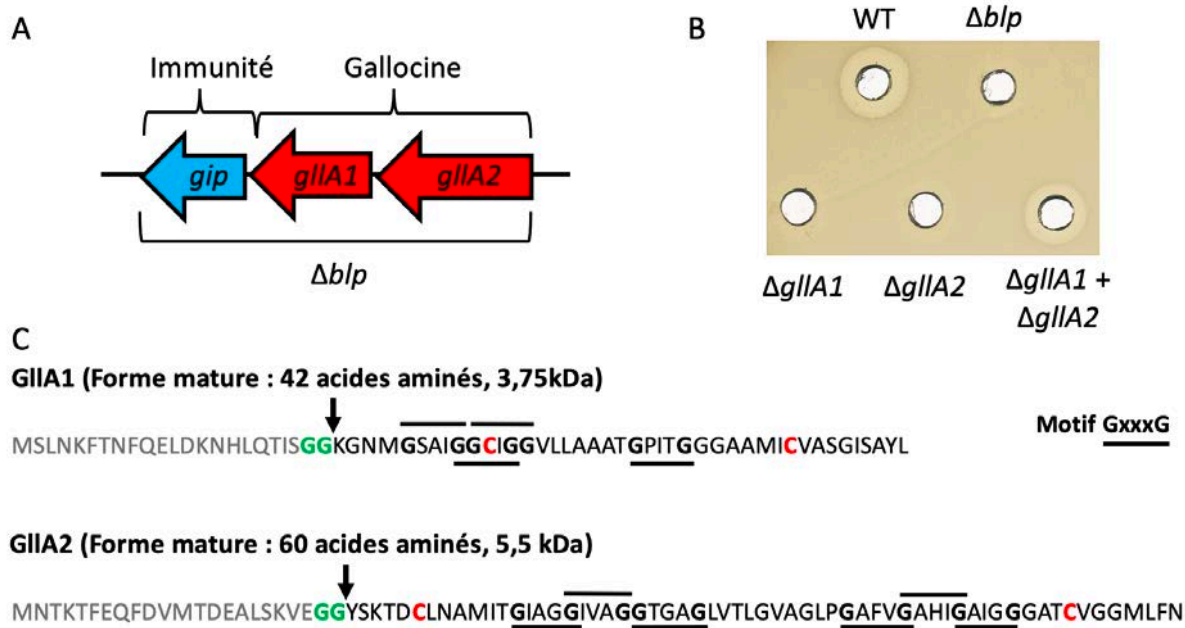


Figure 20 : La gallocine est une bactériocine à deux peptides

A : Opéron structural codant pour la gallocine. Les deux gènes de la gallocine sont indiqués en rouge (*gllA1* et *gllA2*) et le troisième gène codant le peptide d'immunité putatif *gip* en bleu. B : Test de l'activité gallocine de surnageants issus des mutants de *Sgg* UCN34  $\Delta gllA1$ ,  $\Delta gllA2$  et  $\Delta blp$  par diffusion sur gélose contre un tapis de *Sgm*. C : Séquence en acides aminés des deux peptides codés par les gènes *gllA1* et *gllA2* (du N-terminus au C-terminus). Le peptide leader putatif et le motif double glycine sont indiqués en gris et en vert respectivement. La flèche indique le site de clivage putatif du peptide leader. Les motifs GxxxG sont indiqués par un trait noir. Les deux cystéines présentes dans chaque peptide sont indiquées en rouge.

### Partie III : Activité et spectre d'action de la gallocine

#### A- La gallocine est une bactériocine de classe IIb (à deux peptides)

Les gènes codant pour les peptides constituant la gallocine (anciennement annoté *gallo\_2020* et *gallo\_2021*) avaient été nommés *blpA* et *blpB* par Aymeric *et al.* (2018). Dans ce travail, ils ont été renommés *gllA1* et *gllA2* (Figure 20A) pour reprendre la nomenclature utilisée dans une publication récente qui décrit l'existence d'un nouveau variant de la gallocine appelée gallocine D (Hill *et al.*, 2020). Le mutant construit initialement par Aymeric *et al.*, appelé  $\Delta blp$ , est délété pour les 3 gènes *gllA1*, *gllA2* et *gip* et ne possède plus d'activité antibactérienne contre *Sgm* (Figure 20A et B) (Aymeric *et al.*, 2018).

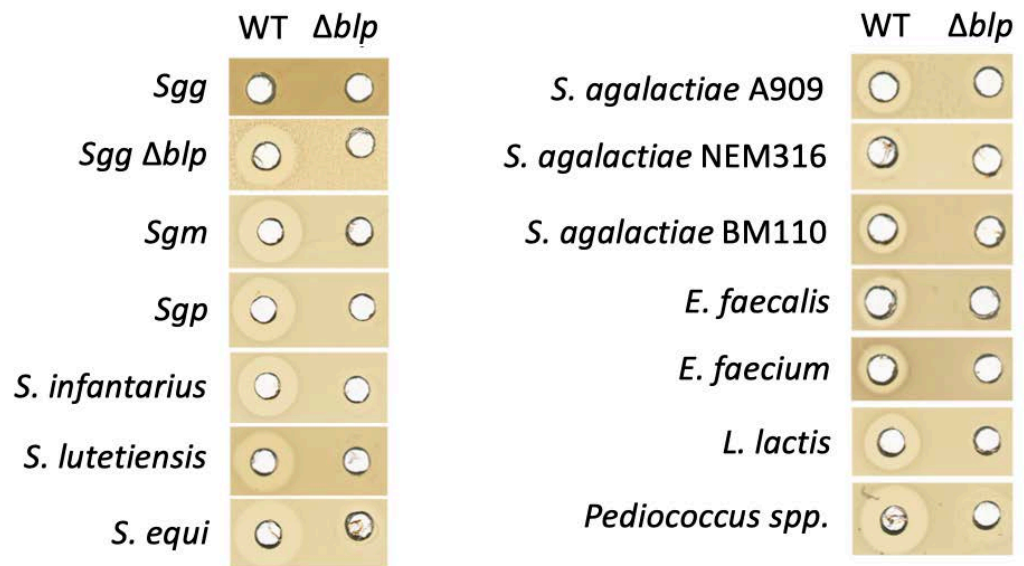
Les peptides codés par les gènes *gllA1* et *gllA2* présentent les caractéristiques des bactériocines de classe IIb avec un peptide leader de type double glycine et des motifs GxxxG dans les peptides matures (Figure 20C). Cependant, contrairement à d'autres bactériocines, ils contiennent très peu d'acides aminés chargés positivement.

Les bactériocines de classe IIb par définition sont constituées de deux peptides inactifs seuls et actifs une fois combinés dans un ratio 1/1. Afin de vérifier que la gallocine est une bactériocine de classe IIb, les mutants individuels des gènes *gllA1* et *gllA2* ont été construits dans la souche *Sgg* UCN34 en effectuant des délétions en phase dans cet opéron ( $\Delta gllA1$  et  $\Delta gllA2$ ). La capacité à produire la gallocine de ces deux mutants a été testée par la méthode de diffusion sur gélose contre la souche *Sgm*. Nous avons ainsi confirmé que la gallocine est une bactériocine de classe IIb puisque les surnageants de *Sgg*  $\Delta gllA1$  et  $\Delta gllA2$  ne possèdent plus d'activité gallocine lorsqu'ils sont seuls mais redeviennent actifs une fois combinés (Figure 20B). Nous avons également essayé de combiner les surnageants de  $\Delta gllA1$  et  $\Delta gllA2$  dans différentes proportions mais l'activité optimale été observée lorsque la même quantité des deux surnageants a été ajoutée, suggérant que le ratio optimal est de 1 pour 1.

#### B- La gallocine est active contre les streptocoques, les entérocoques, les lactocoques et les pédiocoques

Le test de diffusion sur gélose a ensuite été utilisé pour déterminer la sensibilité d'autres espèces bactériennes à la gallocine (Figure 21).

## Sensibles



## Résistantes

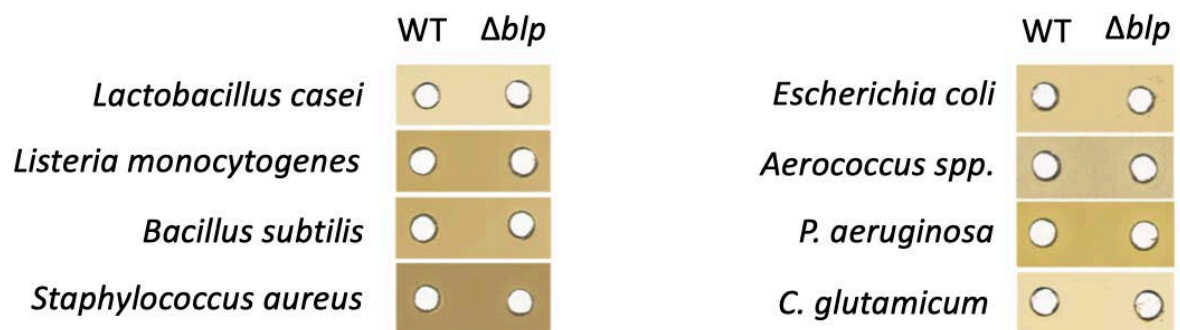


Figure 21 : Test de la sensibilité à la gallocine de diverses bactéries

La sensibilité à la gallocine a été déterminée par le test de diffusion sur gélose. Les souches indiquées en haut sont toutes sensibles à la gallocine (sauf *Sgg* qui est utilisé en contrôle) tandis que les souches indiquées en bas y sont résistantes. *S.* : *Streptococcus* ; *E.* *Enterococcus* ; *L.* : *Lactococcus* ; *P.* : *Pseudomonas* ; *C.* : *Corynebacterium*.

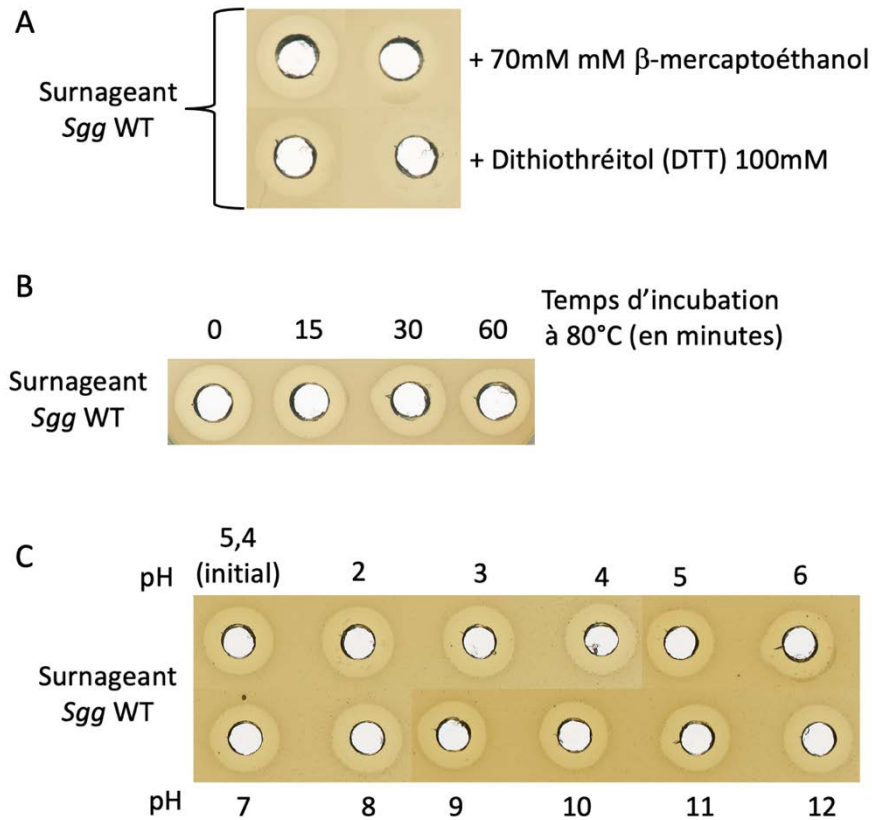
Comme la majorité des bactériocines, la gallocine inhibe la croissance de bactéries phylogénétiquement proches de *Sgg*. Elle est active contre divers Streptocoques, Entérocoques et Lactocoques ainsi que contre une bactérie du genre *Pediococcus*. Les bactéries à Gram-positif d'espèces plus éloignées (*Lactobacillus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Aerococcus* et *Corynebacterium*) ainsi que celles à Gram-négatif (*Escherichia*, *Pseudomonas*) ne sont pas sensibles à la gallocine.

Parmi les bactéries sensibles, la taille du halo d'inhibition observé est variable, suggérant que la sensibilité à la gallocine varie selon les espèces bactériennes. On observe notamment une différence entre les halos obtenus avec les trois souches différentes de *Streptococcus agalactiae* dont l'une se révèle très sensible (A909), une autre sensible (BM110) et une peu sensible (NEM316) à la gallocine.

### C- La gallocine contient des ponts disulfures et est résistante à la chaleur et au pH.

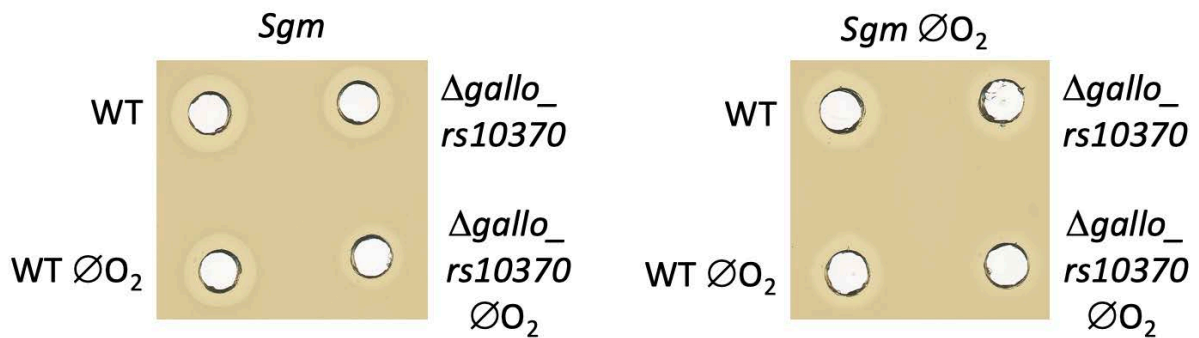
Les peptides matures GIIA1 et GIIA2 constituant la gallocine contiennent chacun deux résidus cystéines (Figure 20C), suggérant qu'ils pourraient former des ponts disulfures intra- ou inter-moléculaires. Le pont disulfure est une liaison covalente qui se forme par oxydation entre les atomes de soufre des fonctions thiols de deux cystéines de manière post-traductionnelle. Afin de tester l'importance des ponts disulfures potentiels dans les peptides GIIA1 et GIIA2 sur l'activité de la gallocine, nous avons testé l'effet de deux agents réducteurs, le DTT (Dithiothréitol) et le  $\beta$ -mercaptoéthanol, qui sont capables de détruire les ponts disulfures. L'addition de DTT (100mM) ou de  $\beta$ -mercaptoéthanol (70mM) au surnageant de la souche sauvage de *Sgg* inhibe totalement l'activité de la gallocine (Figure 22A), ce qui suggère que la gallocine contient effectivement des ponts disulfures essentiels à son activité. **Il est important de noter que l'existence de ces ponts disulfures a été confirmée par analyse de la masse des peptides GIIA1 et GIIA2 par LC/MS dans le surnageant de *Sgg*** (Harrington et Tal-Gan, communication personnelle).

Une caractéristique importante des bactériocines de classe II est qu'elles sont souvent résistantes au pH et à une haute température (80°C, 45 min). Nous avons donc analysé la résistance de la gallocine à un choc thermique et à une large gamme de pH. Bien qu'une légère diminution de l'activité ait été observée, la gallocine est résistante à la chaleur puisqu'elle est toujours active même après avoir été chauffée pendant une heure à 80°C (Figure 22B). Elle est aussi très résistante au pH puisqu'elle conserve son activité dans une large gamme de pH allant de 2 à 12 (Figure 22C).



**Figure 22 : Résistance de la gallocine à différents stress.**

Test de l'activité gallocine dans le surnageant de *Sgg* WT par diffusion sur gélose contre *Sgm* après différents traitements physico-chimiques. A : Ajout d'agents réducteurs dans le surnageant (à droite) par rapport au surnageant non traité (à gauche). B : Surnageant chauffé à 80°C pendant 15, 30 et 60 minutes. C : Modification du pH du surnageant (pH initial = 5,4) par l'ajout d'acide (HCl) ou de base forte (NaOH).



**Figure 23 : Production de la gallocine par le mutant  $\Delta gallo_{rs10370}$**

Test par diffusion sur gélose de l'activité gallocine présente dans le surnageant de *Sgg* WT et  $\Delta gallo_{rs10370}$  produit en aérobiose ou en anaérobiose totale ( $\text{ØO}_2$ ) déposé sur un tapis de *Sgm* incubé en aérobiose ou en anaérobiose totale (*Sgm*  $\text{ØO}_2$ ).

#### D- Rôle de Gallo\_RS10370 dans la formation des ponts disulfures

Le gène *gallo\_rs10370* code pour une protéine potentiellement impliquée dans la biosynthèse de la gallocine puisqu'il est induit par le système de régulation GSP-BlpRH.

Nous avons donc réalisé une délétion en phase de ce gène dans la souche *Sgg* UCN34 et avons testé le surnageant du mutant pour sa capacité à produire la gallocine (Figure 23). Bien qu'une légère diminution de l'activité gallocine ait été observée plusieurs fois dans le surnageant du mutant  $\Delta$ *gallo\_rs10370*, ces résultats n'étaient pas toujours reproductibles (Figure 23). Une analyse avec le logiciel SMART suggère que Gallo\_RS10370 contient un peptide signal et un domaine fonctionnel de type « thioredoxin-like ». Les protéines contenant un domaine thiorédoxine chez les procaryotes permettent la réduction ou la formation de ponts disulfures entre deux cystéines et contiennent dans leur site catalytique un motif CxxC (Atkinson and Babbitt, 2009; Fabianek et al., 2000) qui est conservé dans la protéine Gallo\_RS10370. Par ailleurs, il a été montré que la formation de ponts disulfures peut survenir spontanément en présence d'oxygène (Meehan et al., 2017). Ces mêmes expériences ont donc été reproduites en condition d'anaérobiose, une condition sans doute retrouvée dans l'environnement du côlon. Les surnageants de *Sgg* WT et  $\Delta$ *gallo\_rs10370* ont été produits en anaérobiose totale et testés contre un tapis de *Sgm* incubé 12h en aérobie ou en anaérobiose totale. Le surnageant de  $\Delta$ *gallo\_rs10370* semble moins actif lorsqu'il est produit en anaérobiose et encore moins actif lorsque la boîte sur laquelle le surnageant est déposé est elle aussi incubée en anaérobiose. Ces résultats suggèrent que la protéine Gallo\_RS10370 est importante pour l'activité gallocine en condition anaérobies, probablement en favorisant la formation des ponts disulfures des peptides de la gallocine lorsqu'ils ne se forment pas spontanément. Cependant ces résultats n'ont cependant pas toujours été facile à reproduire et des expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer le rôle de Gallo\_RS10370.

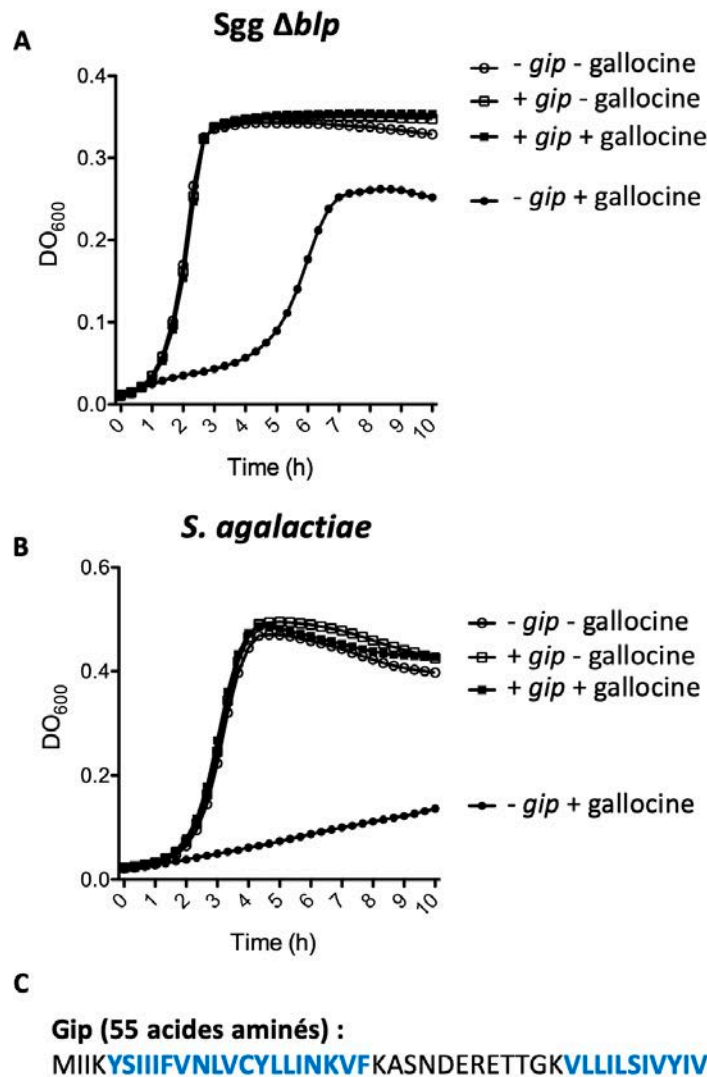


Figure 24 : Le peptide Gip confère l'immunité à la gallocine

A et B : Courbes de croissance de souches contenant le plasmide pTCVΩ*Ptet-gip* (+*gip*), ou en contrôle le plasmide vide pTCVΩ*Ptet* (-*gip*) en milieu THY contenant 33% de surnageant filtré de *Sgg* WT (+ gallocine) ou *Δblp* (- gallocine) et du Tween20 à 0.1%. A : Croissance de *Sgg Δblp*. B : Croissance de *S. agalactiae* A909. C : Séquence primaire du peptide Gip. Les régions transmembranaires putatives prédites par SMART sont indiquées en bleu.



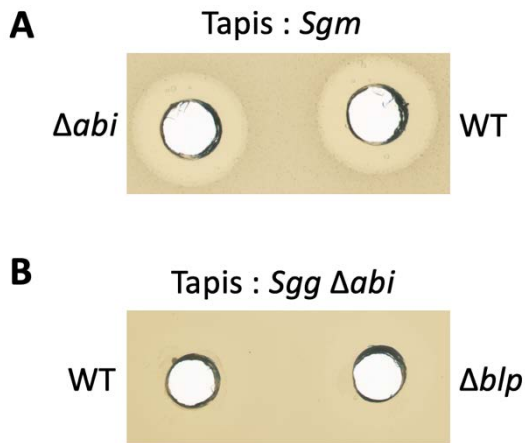
## Partie IV : Mécanismes d'action et de résistance à la gallocine.

### A- Le peptide Gip confère l'immunité à la gallocine

Il a été observé par le test de diffusion sur gélose que la souche *Sgg Δblp* initialement construite et délétée pour les 3 gènes *gllA1/gllA2/gip* est sensible à la gallocine, contrairement à *Sgg* WT (Figure 21). Ce résultat suggère que le gène *gip* code pour un peptide d'immunité conférant la résistance à la gallocine. Pour vérifier cette hypothèse, un plasmide permettant l'expression constitutive du gène *gip* (pTCVΩ*Ptet-gip*) a été construit et introduit dans la souche *Sgg* UCN34 *Δblp* ainsi que dans la souche sensible *S. agalactiae* A909. La croissance des souches exprimant le peptide d'immunité a été comparée à celle des souches contenant le plasmide vide en présence ou en absence de gallocine en milieu liquide. La croissance de *Sgg Δblp* et de *S. agalactiae* A909 est inhibée en présence de gallocine et l'expression du gène *gip* a permis de la restaurer (Figure 24A et B). L'expression hétérologue de *gip*, qui code pour un polypeptide de 55 acides aminés, chez *S. agalactiae* A909 confère la résistance à la gallocine et démontre que Gip est nécessaire et suffisant pour procurer l'immunité à la gallocine. L'analyse de la séquence primaire de Gip révèle l'existence de deux domaines transmembranaires (Figure 24C) ce qui suggère une localisation membranaire et un mécanisme d'action par neutralisation de l'action des peptides de la gallocine au niveau de la membrane, comme cela a été suggéré pour d'autres peptides d'immunités de bactériocines de classe IIb (Britton et al., 2019). Cependant le mécanisme exact par lequel Gip confère l'immunité n'a pas été déterminé.

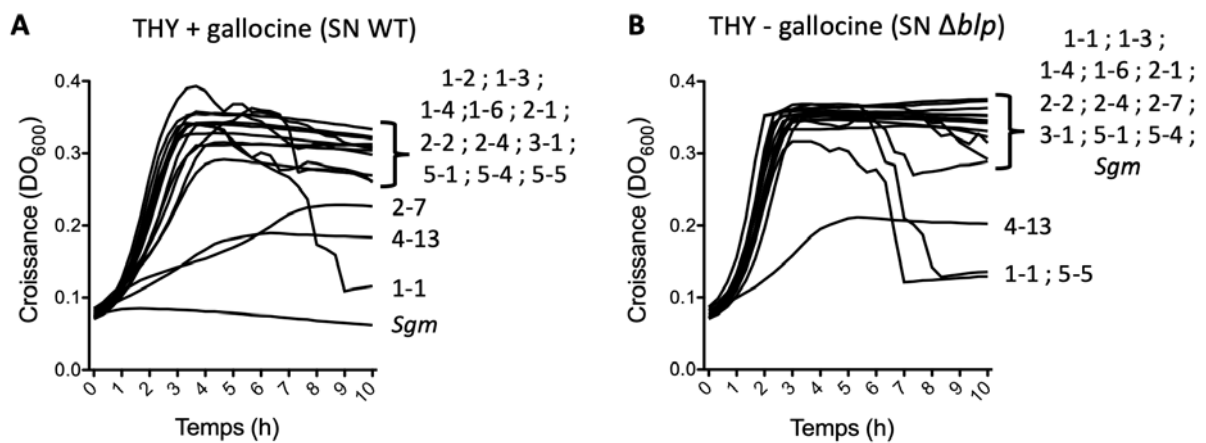
### B- Rôle des protéines à domaine abi dans l'immunité

Chez les eucaryotes, les protéines à domaine abi sont généralement connues sous le nom de CAAX-protéases et sont impliquées dans des modifications post-traductionnelles permettant l'ancrage des protéines à la membrane (Manolaridis et al., 2013). Chez les procaryotes, elles sont régulièrement associées à des loci codant des bactériocines et pourraient jouer un rôle dans l'immunité (Kjos et al., 2010b). Elles ont aussi été décrites comme 3<sup>e</sup> composant modulant l'activité de systèmes à deux composants comme le système CovSR chez *S. agalactiae* et le système WalkR chez *Staphylococcus aureus* (Firon et al., 2013; Poupel et al., 2018).



**Figure 25 : Caractérisation du mutant  $\Delta abi$**

A : Test par diffusion sur gélose de l'activité gallocine présente dans les surnageants de *Sgg* WT et  $\Delta abi$ . B : Test par diffusion sur gélose de la sensibilité à la gallocine du mutant  $\Delta abi$  contre les surnageant de *Sgg* WT et  $\Delta blp$



**Figure 26 : Courbes de croissance de mutants de *Sgm* résistants à la gallocine**

Croissance des différents mutants de *Sgm* résistants à la gallocine (issus des 5 expériences de génération de mutants résistants et numérotés de 1-1 à 5-5) ainsi que de *Sgm* en THY+0,1% Tween20 contenant A : 33% de surnageant de *Sgg* WT (THY + gallocine) ou B : 33% de surnageant de *Sgg*  $\Delta blp$  (THY - gallocine).

Les gènes *gallo\_rs10400* et *gallo\_rs10405* présents dans le locus de la gallocine et formant probablement un opéron sont co-régulés avec ceux codant la gallocine et codent pour deux protéines à domaine *abi*. Ces protéines ne sont pas essentielles à la biosynthèse de la gallocine puisque le mutant  $\Delta abi$  délété de ces deux gènes est toujours capable de produire la gallocine (Figure 25A). Le mutant  $\Delta abi$  ne semble pas non plus avoir de défaut d'immunité à la gallocine puisque son obtention n'a posé aucun problème et qu'aucun halo n'a été observé en testant l'activité de la gallocine dans le surnageant de *Sgg* WT contre ce mutant (Figure 25B).

Des expériences complémentaires sont en cours pour déterminer plus précisément le niveau de sensibilité à la gallocine d'un mutant délété des protéines à domaine *abi* et du peptide Gip. Nous souhaitons aussi surexprimer les gènes codant pour les protéines *abi* dans une souche sensible à la gallocine et tester si elle devient résistante à la gallocine.

### C- Analyse de mutants résistants à la gallocine

La présence d'un récepteur dans la membrane des bactéries cibles est nécessaire à l'activité de certaines bactériocines. C'est notamment le cas de la lactococcine G, une bactériocine de classe IIb, dont le récepteur a été identifié en séquençant le génome de mutants spontanés résistants à cette bactériocine. Ces mutants possédaient tous des mutations dans ou à proximité du gène codant le récepteur membranaire UppP (Kjos et al., 2014). Afin d'identifier un potentiel récepteur, nous avons suivi la même approche et obtenu des mutants résistants à la gallocine chez *Sgm* en étalant une culture de *Sgm* sur des boîtes gélosées contenant la gallocine. La croissance de ces mutants en milieu liquide et en présence de gallocine fut ensuite testée pour vérifier leur résistance à la gallocine. Quatorze mutants étaient en effet capables de pousser en milieu liquide en présence de gallocine, contrairement à la souche parentale *Sgm* (Figure 26 A et B). La croissance de deux mutants présente des altérations (2-7 et 4-13) tandis que deux autres mutants (1-1 et 5-5) ont tendance à précipiter en phase stationnaire.

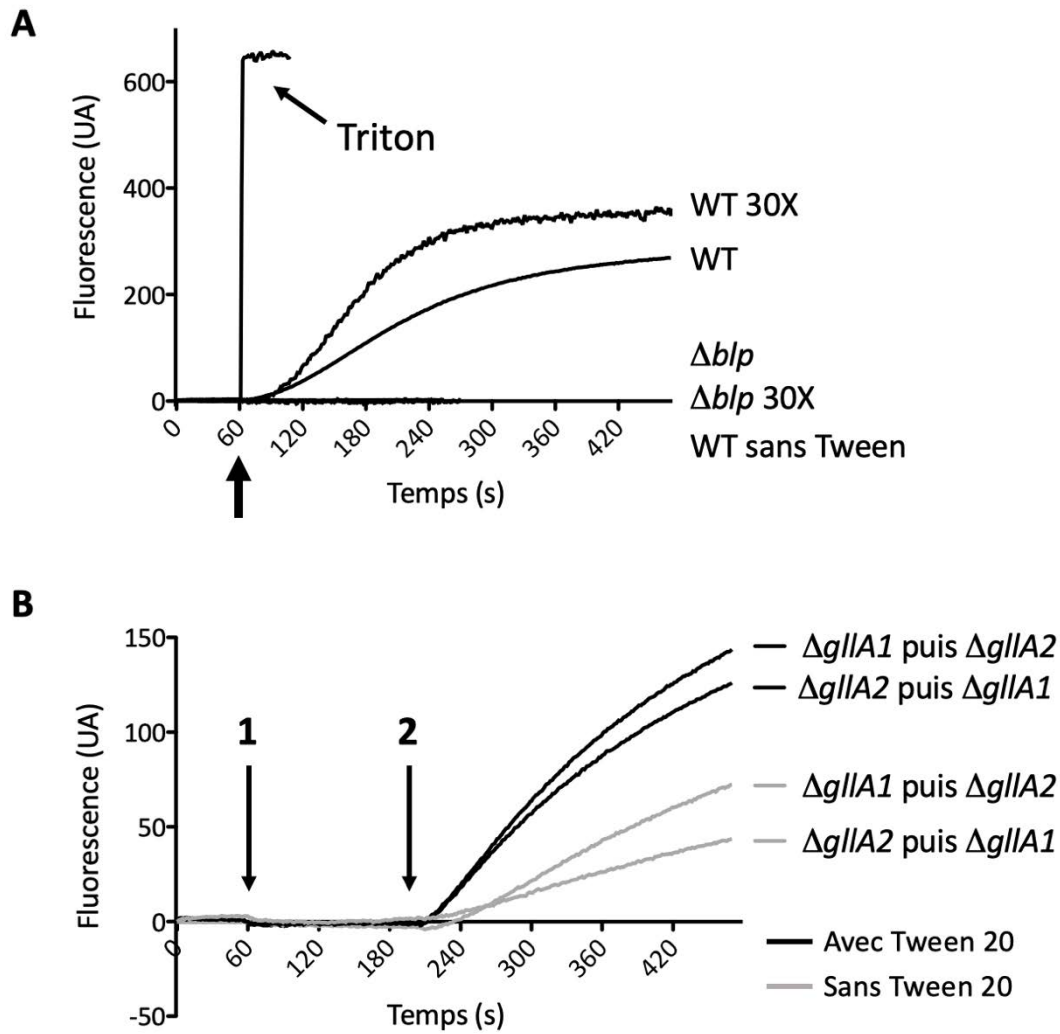
Le génome des quatorze mutants de *Sgm* résistants à la gallocine a été entièrement séquencé et comparé au génome du *Sgm* parental. Le séquençage a été réalisé par le pôle Biomics de l'Institut Pasteur en utilisant la technique Illumina. Nous n'avons pas trouvé un locus génétique ou un gène muté dans l'ensemble des mutants séquencés. Néanmoins, des mutations dans un système homologue au système à deux composants WalRK (aussi appelé VicRK ou YycFG)

ont été identifiées chez sept mutants (1-1, 1-2, 1-4, 1-6, 2-1, 5-1 et 5-5). Ce système est impliqué dans la régulation de la biosynthèse du peptidoglycane chez plusieurs espèces de bactéries à Gram-positif (Bisicchia et al., 2010; Dubrac and Msadek, 2004; Dubrac et al., 2007; Stipp et al., 2013). Bien que l'histidine kinase membranaire WalK puisse constituer un potentiel récepteur, les mutations identifiées dans les souches *Sgm* 5-1 et 2-1 ont été localisées dans le gène codant le régulateur de réponse WalR qui est lui cytoplasmique. Ces résultats suggèrent un rôle plutôt indirect des mutations dans ce système dans la résistance à la gallocine, par exemple en augmentant l'épaisseur du peptidoglycane et/ou sa réticulation, empêchant ainsi les peptides de la gallocine d'atteindre la membrane et d'y former des pores.

Des mutations dans un autre gène qui code potentiellement pour un « facteur de promotion de l'agrégation » ont été retrouvées dans trois mutants (2-2, 2-4 et 3-1). Cette protéine 'd'agrégation' possède un domaine LysM de liaison au peptidoglycane (Buist et al., 2008; Luo et al., 2019) et un domaine cd13925 pour «core lysozyme-like domain of resuscitation-promoting factor proteins », qu'on retrouve dans les facteurs de résurrection comme RPF, qui permettent la reprise du métabolisme des cellules bactériennes dormantes. Bien que le mécanisme exact ne soit pas connu, il implique le clivage du peptidoglycane (Nikitushkin et al., 2013) et cette activité est dépendante d'un glutamate conservé présent dans le domaine « lysozyme-like » (Cohen-Gonsaud et al., 2004, 2005). Les mutations identifiées dans le « facteur d'agrégation » des mutants 2-2, 2-4 et 3-1 de *Sgm* entraînent la formation d'un codon stop au début du domaine « lysozyme-like » (2-2 et 2-4) ou la substitution du résidu glutamate catalytique putatif de ce domaine (selon BLAST) en lysine. Ces résultats suggèrent que cette protéine joue un rôle dans la dégradation du peptidoglycane chez *Sgg* et que son inactivation, soit par la formation d'un codon stop ou par la substitution d'un glutamate probablement essentiel à son activité, confère une résistance à la gallocine probablement via l'épaississement du peptidoglycane.

#### E- La gallocine est fonctionnelle dans des membranes artificielles dépourvues de récepteur

Afin de savoir si la gallocine est capable de former des pores dans une bicouche lipidique simple (dépourvue de récepteur), nous avons testé l'effet des surnageants de *Sgg* sauvage,  $\Delta blp$ ,  $\Delta gllA1$



**Figure 27 : La gallosine entraîne une fuite du contenu intracellulaire des liposomes**

Mesure de la fluorescence correspondant à l'efflux de la sonde ANTS (excitation à 390nm et émission à 515nm) contenue dans de larges liposomes unilamellaires en présence de différents surnageants de *Sgg* ou de triton (contrôle positif). A : A 60 secondes, du triton ou le surnageant de *Sgg* WT,  $\Delta blp$ , WT 30X (concentré 30 fois sur colonne vivaspin) ou  $\Delta blp$  30X supplémentés de 0,01% de Tween 20 ont été ajoutés. B : A 60 secondes, les surnageants des souches  $\Delta gIIA1$  ou  $\Delta gIIA2$  contenant ou non 0,01% de Tween 20 ont été ajoutés (1). A 200 secondes, le surnageant de l'autre souche, contenant ou non du tween 20, est ajouté à son tour (2). UA : unité arbitraire.

et *ΔgllA2* sur de larges liposomes unilamellaires anioniques contenant une molécule fluorescente permettant de mesurer leur perméabilisation. Ces liposomes étaient composés des lipides POPC (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) et POPG (1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-(phospho-rac-(1-glycerol))) à un ratio molaire de 4:1. Ce modèle est souvent utilisé pour modéliser les membranes bactériennes chargées négativement puisque POPG est un lipide anionique (Russell et al., 2010; Urushibara and Hicks, 2013). Une molécule fluorescente (ANTS) liée à un quencher (DPX) inhibant sa fluorescence ont été encapsulés dans ces liposomes (Voegelé et al., 2017) afin de pouvoir mesurer leur perméabilisation. En effet, si le contenu intracellulaire des liposomes est libéré, l'ANTS diffuse dans le milieu extracellulaire et se détache de son quencher DPX par un effet de dilution. La mesure de la fluorescence de l'ANTS est réalisée en continu (excitation à une longueur d'onde de 390 nm et émission mesurée à 515 nm) après exposition des liposomes aux différents surnageants de *Sgg*. Si la gallocine forme des pores dans la membrane des liposomes ou induit leur lyse, l'ANTS sera libéré dans le milieu, se détachera de son quencher et la fluorescence mesurée augmentera.

Le surnageant de la souche WT, en présence de tween, entraîne une augmentation de la fluorescence et donc la libération du contenu intracellulaire des liposomes tandis que le surnageant de la souche *Δb1p* (auquel du tween a été ajouté à la même concentration) n'a aucun effet (Figure 27A). L'effet du surnageant WT est encore plus fort lorsqu'il est concentré 30 fois. Ces résultats montrent que la gallocine sécrétée est capable de former des pores ou de lyser des membranes de liposomes de manière dose dépendante. Cet effet n'est pas observé en absence de tween20 ce qui confirme l'importance de la présence d'un détergent pour l'activité des peptides formant la gallocine (Figure 27A).

Un contrôle positif de lyse totale des liposomes à l'aide de Triton (0,12% final) a aussi été réalisé et provoque une augmentation instantanée du niveau de fluorescence de 650 UA, correspondant à la libération de la totalité des molécules d'ANTS contenues dans les liposomes. Les surnageants WT non-concentré et concentré provoquent une hausse de fluorescence de 270 et 360 UA respectivement (Figure 27A), ce qui correspond à la libération d'environ la moitié de toutes les molécules d'ANTS encapsulées dans les liposomes. Ceci suggère qu'une partie des liposomes n'a pas été affectée par la gallocine, probablement parce que la concentration ajoutée n'était pas suffisante, ou que les pores formés par la gallocine n'entraînent pas une lyse totale des liposomes.

La même expérience a ensuite été réalisée avec les surnageants des souches *ΔgllA1* et

*ΔgIIA2*, qui contiennent un seul des deux peptides de la gallocine, et qui ont été ajoutés séquentiellement sur les liposomes. Comme attendu, ces surnageants seuls n'ont eu aucun effet sur les liposomes confirmant que GIIA1 et GIIA2 sont inactifs seuls. De plus, l'ajout du surnageant contenant le deuxième peptide a provoqué la libération du contenu intracellulaire des liposomes et ce quel que soit l'ordre d'ajout (Figure 27B), confirmant que les deux peptides GIIA1 et GIIA2 sont requis pour perméabiliser la membrane. Cette activité était tout de même moins forte que celle observée avec le surnageant de la souche sauvage (augmentation de la fluorescence de 143 UA au maximum), probablement parce que les peptides n'ont pas été laissés assez longtemps au contact des liposomes dans cette deuxième expérience. De manière intéressante, une lyse non négligeable des liposomes a aussi été observée en absence de Tween20 lorsque les deux peptides de la gallocine sont ajoutés séquentiellement (Figure 27B). Ces résultats suggèrent que le Tween20 pourrait permettre de dissocier des complexes inactifs formés entre GIIA1 et GIIA2 dans le surnageant de la souche sauvage (Figure 27A). La présence de ces « agrégats » a été suggérée par le fait que la gallocine est retenue sur une colonne Vivaspin avec un cut-off de 10 kDa ou 30 kDa bien que les peptides GIIA1 et GIIA2 font 3,75 et 5,5 kDa respectivement.

*Discussion générale*

*et Perspectives*



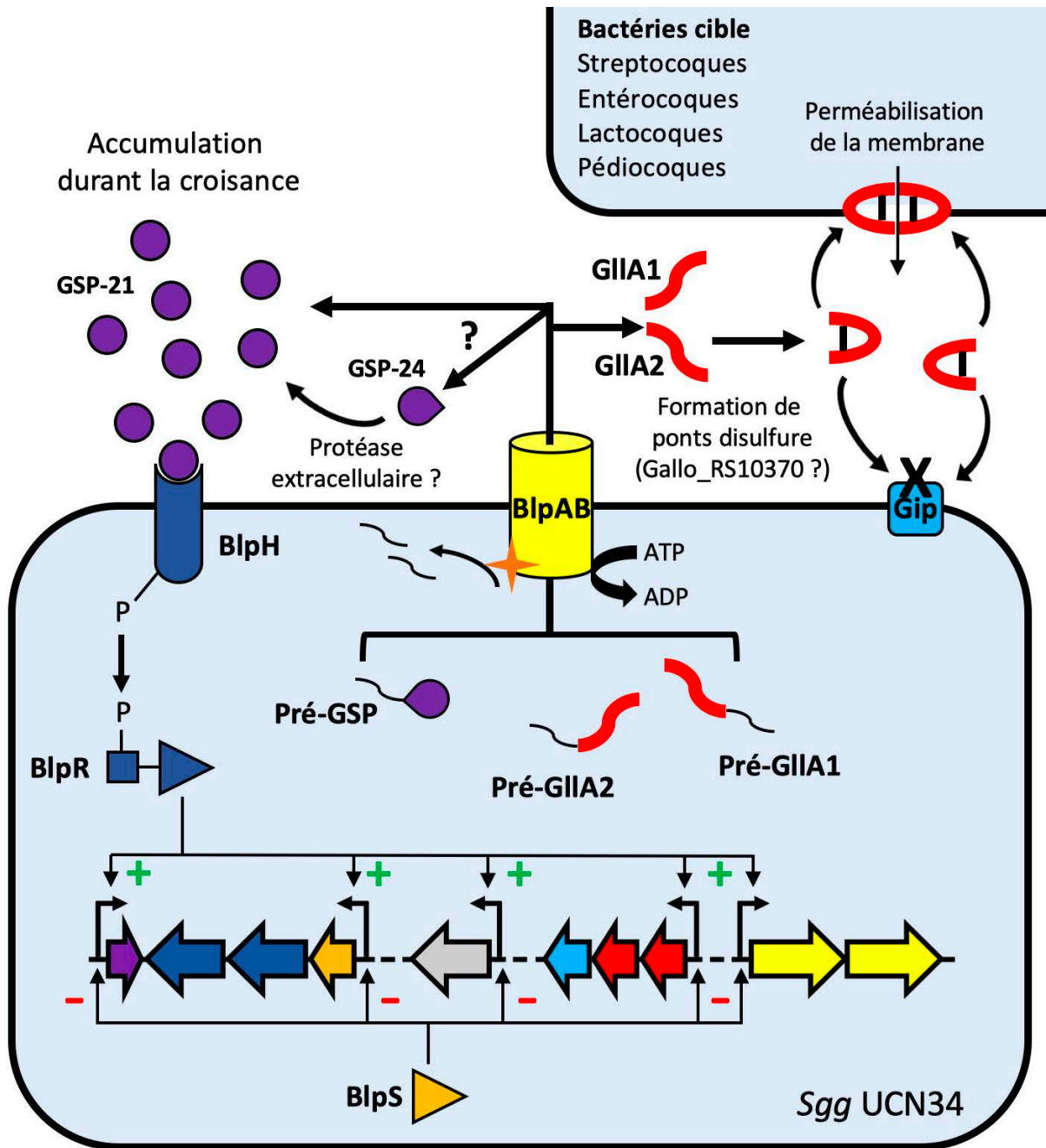


Figure 28 : Modèle de biosynthèse de la gallocine par *Sgg UCN34*

Code couleur : GSP : violet ; BpRH : bleu foncé ; BpS : orange ; Gip : bleu ciel ; Gallocine : rouge ; BpAB : jaune ; Gallo\_RS10370 : Gris.

## Discussion générale et perspectives

*Sgg* est un pathogène émergent responsable d'endocardites et de septicémies, notamment chez le sujet âgé ou immunodéprimé. Ces infections invasives sont régulièrement associées à un cancer colorectal (CCR). Il a été montré au laboratoire que l'augmentation de la concentration des acides biliaires secondaires en conditions tumorales favorisent la colonisation du côlon par *Sgg* grâce à l'activité d'une bactériocine appelée gallocine qui permet à *Sgg* UCN34 de tuer les entérocoques commensaux du côlon murin (Aymeric et al., 2018).

**Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la biosynthèse, la sécrétion, la maturation et la régulation de la gallocine.** L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail permettent de proposer le modèle suivant qui est résumé dans la Figure 28.

Tout commence par la production du peptide pré-GSP de 45 acides aminés qui contient un peptide leader N-terminal de type double glycine. Le pré-GSP est sécrété et son peptide leader clivé par l'ABC transporteur BlpAB. A l'extrémité amino-terminale du GSP, trois acides aminés supplémentaires (KNK) sont clivés générant la forme la plus active, le GSP-21. Cette maturation du GSP-24 en GSP-21 est soit réalisée directement par BlpAB, ou par une protéase extracellulaire de *Sgg* autre que SepM. La concentration de GSP-21 augmente progressivement dans le milieu extracellulaire durant la croissance bactérienne jusqu'à atteindre une concentration suffisante pour activer l'histidine kinase BlpH. BlpH phosphoryle alors le régulateur de réponse BlpR sur son domaine receveur ce qui a pour effet d'augmenter l'affinité à l'ADN de son domaine de liaison LytTR. Il active alors la transcription des vingt gènes du locus potentiellement impliqués dans la biosynthèse de la gallocine ainsi que du système de régulation lui-même. Un deuxième régulateur appelé BlpS et contenant uniquement un domaine de liaison à l'ADN LytTR inhibe la fixation de BlpR en se fixant sur les mêmes promoteurs. BlpR phosphorylé est capable d'activer la transcription de l'opéron principal de ce locus codant les deux peptides de la gallocine et le peptide d'immunité Gip. Les deux peptides de la gallocine sont synthétisés avec un peptide leader de type double glycine (pré-GIIA1 et pré-GIIA2). Ils sont reconnus, maturés et sécrétés par BlpAB. Les peptides GIIA1 et GIIA2 matures identifiés dans le surnageant possèdent un pont disulfure et la protéine Gallo\_RS10370 qui possède un domaine thiorédoxine contribue potentiellement à leur formation, notamment en conditions anaérobies. Les 2 peptides matures de la gallocine GIIA1 GIIA2 peuvent alors former des pores

dans la membrane des bactéries cibles pour les perméabiliser. *Sgg*, la bactérie productrice, est protégée de la gallocine grâce au peptide d'immunité membranaire Gip.

### **Identification d'un nouveau régulateur, BlpS, inhibant la transcription de la gallocine**

Le système GSP-BlpRH est similaire aux systèmes de type « quorum-sensing » contrôlant la production de bactériocine de classe IIb (Nissen-Meyer et al., 2010). L'originalité réside dans le 4<sup>e</sup> composant de ce système BlpS, une petite protéine de 108 acides aminés contenant uniquement un domaine de fixation à l'ADN de type LytTR, qui inhibe la transcription des gènes activés par BlpR (Publication 1). BlpS diffère donc de BlpR qui possède à la fois un domaine LytTR et un domaine receveur phosphorylable comme les régulateurs de réponse classiques. Bien que ces 2 régulateurs se fixent sur la même séquence conservée de 30 pb retrouvée dans tous les promoteurs qu'ils contrôlent, les domaines LytTR de BlpR et BlpS sont significativement différents au niveau de leur séquence primaire. Le rôle de BlpS est probablement de limiter l'auto-activation du système GSP-BlpRH et d'empêcher son emballage qui pourrait engendrer une surproduction de la gallocine ayant un fort coût métabolique ou une toxicité pour *Sgg*.

Un système de régulation à quatre composants très similaire est présent chez *Streptococcus pneumoniae* (Kjos et al., 2016). Le gène codant BlpS chez *S. pneumoniae* est présent dans les génomes de 336 souches analysées, suggérant un rôle important, et code aussi pour une protéine contenant uniquement un domaine de liaison à l'ADN LytTR (Bogaardt et al., 2015). Cependant, BlpS semble tronquée dans certaines de ces souches (Bogaardt et al., 2015). Il sera intéressant de vérifier si BlpS joue le même rôle chez *S. pneumoniae* et si les souches dans lesquelles BlpS est tronquée produisent des quantités anormalement élevées de pneumocines.

Un autre système à quatre composants a été décrit chez *Lactobacillus plantarum*. Il implique le régulateur PlnC qui active la production de bactériocines et le régulateur PlnD qui l'inhibe. Dans ce cas, les deux régulateurs sont co-transcrits et fortement homologues (75% de similarité) et sont tous les deux des régulateurs de réponse classiques (Diep et al., 2001). Il a été proposé que ce régulateur négatif joue un rôle dans l'arrêt de la production de bactériocines observé lors de l'entrée en phase stationnaire (Diep et al., 1996, 2001).

## **Design de peptides inhibiteurs de GSP**

GSP-21 est le peptide sécrété qui active le système à deux composants BlpRH. Une analyse structure fonction de GSP-21 a montré que les 14 acides aminés C-terminaux sont suffisants pour activer l'histidine kinase BlpH et a permis d'identifier certains acides aminés importants pour son activité (Publication 2). Une application de cette étude pourrait être le design de formes modifiées de GSP-21 toujours capables de se lier à l'histidine kinase BlpH mais incapables de l'activer. Ces formes pourraient être utilisées comme des inhibiteurs compétitifs du GSP-21 afin de bloquer l'activation de la production de gallocine. Cependant, aucun des peptides modifiés caractérisés dans ce travail n'avait d'effet inhibiteur sur le peptide GSP-21 dans des expériences de compétition, suggérant que la diminution de l'activité observée était liée à une diminution de l'affinité des peptides modifiés pour BlpH. Dans des études futures, il sera important de déterminer quelle est la portion extracellulaire de BlpH qui interagit avec le peptide GSP et de déterminer les résidus clés de cette interaction pour développer des inhibiteurs et mieux comprendre le mécanisme d'activation.

## **Maturation et sécrétion des peptides de la gallocine et du peptide GSP**

Les deux peptides de la gallocine GIIA1 et GIIA2 ainsi que peptide activateur GSP sont sécrétés via l'ABC transporteur BlpAB qui possède un domaine peptidase probablement responsable du clivage des peptides leaders. De manière surprenante, les peptides leaders de ces trois peptides possèdent peu de similarités à part deux résidus glycine fortement conservés. Ils possèdent quelques similitudes avec le consensus (LSXXELXXIXGG) décrit pour les peptides leaders de type double glycine (Nes et al., 1996). Une mutagénèse dirigée permettrait de tester l'importance des résidus conservés pour la reconnaissance et la sécrétion des peptides GIIA1, GIIA2 et GSP par BlpAB. Afin de déterminer si le peptide leader est suffisant pour la reconnaissance par BlpAB, nous pourrions aussi essayer de faire sécréter d'autres peptides ou protéines en les fusionnant aux peptides leaders de GIIA1, GIIA2 et GSP.

## **Mécanisme d'action de la gallocine**

La gallocine est une bactériocine de classe IIb puisque son activité dépend de la présence des deux peptides GIIA1 et GIIA2, probablement en concentrations équimolaires bien que nous ne l'ayons pas formellement démontré puisque GIIA1 et GIIA2 n'ont pas encore été purifiés.

Les expériences réalisées sur des liposomes anioniques suggèrent que la gallocine agit en formant des pores dans les membranes en l'absence de récepteur. Contrairement à la plupart des bactériocines, les peptides de la gallocine contiennent très peu d'acides aminés chargés positivement. Les charges négatives des membranes, importantes pour d'autres bactériocines de classe IIb chargées positivement (Hauge et al., 1998a, 1999), auront sans doute un rôle moindre dans le cas de la gallocine. Pour le tester nous évaluerons l'effet de la gallocine sur des liposomes zwitterioniques et nous émettons l'hypothèse que la gallocine restera active dans ces conditions.

GIIA1 et GIIA2 contiennent aussi chacun un pont disulfure essentiel à leur activité et reliant deux cystéines proches de leurs extrémités N- et C-terminales. Ces ponts disulfures pourraient donc donner une conformation atypique et presque circulaire à la gallocine, comparée aux peptides de la lactococcine G ou de la plantaricine S dont la structure prédite dans les membranes est constituée d'une longue hélice alpha linéaire suivi d'une extrémité N- ou C-terminale elle aussi linéaire (Ekblad and Kristiansen, 2019; Nissen-Meyer et al., 2010). D'autres bactériocines de classe IIb comme la brochocine-C ou la salivaricine P possèdent aussi deux cystéines dans leurs peptides et pourraient donc contenir des ponts disulfures (Barrett et al., 2007; Garneau et al., 2003).

Il sera donc très intéressant d'étudier la structure de GIIA1 et GIIA2 dans les membranes. Ceci pourra être réalisé par dichroïsme circulaire dans le modèle liposome que nous avons utilisé lorsque GIIA1 et GIIA2 auront été purifiés. Une analyse mutationnelle des motifs GxxxG, jouant un rôle clé dans les autres bactériocines de classe IIb, permettra de définir s'ils sont importants pour l'interaction entre GIIA1 et GIIA2 dans la membrane.

## **Formation des ponts disulfures de GIIA1 et GIIA2**

La formation des ponts disulfures de la gallocine pourrait être facilitée par la protéine Gallo\_RS10370 qui contient un domaine thiorédoxine, et ce notamment en conditions anaérobies. Une protéine contenant un site catalytique caractéristique des domaines thiorédoxines (CxxC) semble impliquée dans la formation des ponts disulfures de la pédiocine PA-1 (Oppegård et al., 2015). Par ailleurs, le locus génomique codant pour la bovicine HJ50, un lantibiotique atypique contenant un pont disulfure, contient lui aussi une protéine contenant un domaine thiorédoxine. Bien que les auteurs concluent que cette protéine n'est pas impliquée dans la biosynthèse de la bovicine HJ50, une réduction d'environ 30% de la quantité de bovicine

HJ50 sécrétée dans le surnageant fut observée dans un mutant délété du gène codant cette protéine (Liu et al., 2009). De plus, l'expression hétérologue de la bovicine HJ50 sans le gène codant la protéine à domaine thiorédoxine entraîne la production d'une forme de la bovicine HJ50 probablement dépourvue du pont disulfure (Liu et al., 2009). Bien que le rôle des protéines contenant un domaine thiorédoxine dans la biosynthèse de bactériocines ne soit pas clairement élucidé à ce jour, elles pourraient contribuer à la formation des ponts disulfure.

Par analyse bioinformatique, il serait informatif de tester s'il existe une corrélation entre la présence d'une protéine contenant un domaine thiorédoxine et celle d'une bactériocine contenant plusieurs cystéines dans les loci codant des bactériocines.

### **Immunité à la gallocine**

Nous avons montré que la résistance à la gallocine chez *Sgg* est procurée principalement par le peptide Gip. Son mode d'action n'est pas connu mais il possède deux domaines transmembranaires, comme cela a été observé pour d'autres peptides d'immunité aux bactériocines de classe IIb (Nissen-Meyer et al., 2011). Il serait intéressant de voir si la protéine d'immunité Gip est capable d'interagir avec les peptides de la gallocine. Pour tester cette hypothèse, nous envisageons de réaliser des expériences de double hybride ou de co-immunoprécipitation en étiquetant le peptide Gip.

### **Conservation de la gallocine dans les souches cliniques de *Sgg***

Bien que les gènes codant des bactériocines varient selon les souches dans certaines bactéries comme *Streptococcus pneumoniae* (Bogaardt et al., 2015), les gènes codant la gallocine et la protéine d'immunité apparaissent très conservés chez toutes les souches cliniques de *Sgg* qui ont été séquencées. Malgré tout, une minorité d'entre elles ne produisent plus la gallocine. Trois d'entre elles présentent uniquement des mutations dans les gènes codant l'ABC transporteur et les protéines Abi. Chez *S. pneumoniae* il a été montré que des souches mutées uniquement dans l'ABC transporteur et appelées « tricheurs » (« cheaters ») peuvent résister à la bactériocine produite par des souches isogéniques sauvages sans avoir à la produire. Ces « tricheurs » profitent probablement de l'avantage compétitif conféré par la présence de la bactériocine produite par leurs bactéries sœurs sans avoir à payer le coût métabolique de la production (Son et al., 2011). Il serait intéressant de vérifier si les souches cliniques de *Sgg*

mutées dans l'ABC transporteur sont toujours immunisées à la gallocine bien qu'elles ne soient plus capables de la produire. Ces observations confortent l'hypothèse que la production de la gallocine a un coût métabolique non négligeable. Ceci est cohérent avec l'observation faite par Aymeric et al. (2018) montrant que dans les souris contrôles Notch en l'absence de tumeurs, le mutant  $\Delta blp$  colonise mieux le côlon de souris que la souche sauvage UCN34.

### **Impact de la gallocine sur le microbiote**

La gallocine est capable de tuer les entérocoques, les lactocoques et les streptocoques. A noter qu'une étude indique que les streptocoques et entérocoques commensaux sont plus abondants dans le microbiote de patients atteints d'un cancer colorectal que dans des individus sains (Wang et al., 2012).

Dans le futur nous aimerions évaluer l'impact de la gallocine sur le microbiote, en colonisant la souris avec les différents mutants de *Sgg* et en évaluant leur impact sur le microbiote par séquençage global de l'ARNr 16S. En parallèle, nous aimerions utiliser un modèle d'intestin artificiel tel que le SHIME (« Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem ») afin de pouvoir tester l'effet de la gallocine sur un microbiote humain sans les contraintes imposées par l'expérimentation animale (Van de Wiele et al., 2015). Le modèle SHIME est composé de 5 compartiments qui reproduisent *in vitro* les paramètres physicochimiques principaux de l'estomac, du petit intestin, et des différentes parties du côlon (ascendant, transverse et descendant). Les compartiments du côlon peuvent êtreensemencés à partir d'échantillons fécaux humains afin d'obtenir une communauté microbienne semblable au microbiote humain (Van de Wiele et al., 2015). Il serait particulièrement judicieux de tester le mutant  $\Delta blpS$  qui surproduit la gallocine pour évaluer le coût et l'impact de cette surproduction dans une communauté microbienne complexe.

Le locus de la gallocine code pour d'autres bactériocines et il serait intéressant d'évaluer leur impact potentiel sur le microbiote. Cependant rien n'indique pour le moment que ces bactériocines putatives sont fonctionnelles, du moins dans les conditions testées, puisqu'aucune activité antibactérienne n'a jamais été détectée dans le surnageant du mutant  $\Delta blp$ .

## **Influence de l'environnement tumoral sur la transcription des gènes codant la gallocine**

Une propriété intéressante de la gallocine est qu'elle nécessite la présence d'un détergent comme le tween ou les acides biliaires pour être active dans le surnageant de *Sgg* (Aymeric et al., 2018). En plus d'augmenter l'activité de la gallocine elle-même, l'ajout de petites quantités de Tween20 (0.01%) est suffisant pour augmenter la transcription des gènes codant la gallocine dans certains milieux. Il sera important de déterminer l'expression des gènes de la gallocine dans un modèle murin dans des conditions normales et tumorales. Si l'expression est augmentée en conditions tumorales, nous tenterons d'identifier quel(s) facteur(s) spécifique(s) ou métabolites induisent la transcription.

L'utilisation du modèle intestinal SHIME pourrait aussi nous permettre de mesurer la transcription des gènes de la gallocine dans des conditions similaires à celles retrouvées *in vivo* et en présence d'un microbiote humain. Ce système pourrait aussi permettre d'évaluer l'expression des gènes de la gallocine dans des conditions proches de celles retrouvées dans le côlon humain et mimant ou non la présence d'un CCR. Les paramètres de ce système étant ajustables, nous pourrions aussi tester des conditions similaires à celles retrouvées en présence d'un CCR, notamment en ajoutant des acides biliaires, sur l'activité de la gallocine et son effet sur la composition du microbiote.

## **Utilisation de la gallocine en tant qu'agent antimicrobien**

Bien qu'ayant un faible spectre d'action, la gallocine est active contre des bactéries pathogènes comme le streptocoque du groupe B (SGB) et *Enterococcus faecium*. Il nous semble intéressant de tester le potentiel de la gallocine en tant qu'agent antimicrobien soit en la produisant chez une bactérie non-pathogène ou après l'avoir purifiée.

Aujourd'hui les infections néonatales à SGB sont évitées en administrant des antibiotiques à la femme enceinte lors de l'accouchement si elle est porteuse de SGB. Bien qu'efficace puisque le nombre d'infections néonatales a diminué depuis l'application de cette recommandation, ce traitement antibiotique à large spectre pourrait avoir un effet sur le bon développement du microbiote du nouveau-né (Stearns et al., 2017; Tapiainen et al., 2019; Zimmermann and Curtis, 2020). L'utilisation de la gallocine pour prévenir et combattre les infections à SGB tout en préservant le microbiote nous semble une alternative intéressante à tester au laboratoire.



La découverte de nouveaux agents antimicrobiens pour combattre les infections à *Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine a été placée en priorité élevée par l'Organisation Mondiale de la Santé. La gallocine s'est révélée capable de tuer les isolats cliniques d'*Enterococcus faecium* résistants à la vancomycine que nous possédons au laboratoire et il sera intéressant de poursuivre cette nouvelle voie de recherche.

*Matériel*  
*et Méthodes*

Tableau 4 : Liste des souches utilisées

Certaines souches sont issues du soucier de l'Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram-positif (BBPG) et d'autres de la collection de l'Institut Pasteur (CIP).

N°	Souche	Source
<i>Souches de Streptococcus gallolyticus</i>		
NEM2431	<i>S. gallolyticus</i> sous-espèce <i>gallolyticus</i> UCN34	(Rusniok et al., 2010)
NEM4838	UCN34 $\Delta blp$ (ou $\Delta gllA-gip$ )	(Aymeric et al., 2018)
NEM4694	UCN34 $\Delta gllA1$	Ce travail
NEM4812	UCN34 $\Delta gllA2$	Ce travail
NEM4988	UCN34 $\Delta gallo\_rs10370$	Ce travail
NEM4814	UCN34 $\Delta abi$	Ce travail
NEM1765	<i>S. gallolyticus</i> sous-espèce <i>macedonicus</i>	CIP 105683T
	<i>S. gallolyticus</i> sous-espèce <i>pasteurianus</i>	Souchier BBPG
<i>Expression du gene gip</i>		
NEM4710	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$ pTCV $\Omega$ Ptet- <i>gip</i>	Ce travail
NEM4801	UCN34 $\Delta blp$ pTCV $\Omega$ Ptet- <i>gip</i>	Ce travail
NEM4825	<i>Streptococcus agalactiae</i> A909 pTCV $\Omega$ Ptet- <i>gip</i>	Ce travail
<i>Test des bactéries sensibles à la galloicine</i>		
NEM1867	<i>Streptococcus infantarius</i>	CIP106105
	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	Souchier BBPG
NEM739	<i>Streptococcus equi</i>	Souchier BBPG
NEM2526	<i>S. agalactiae</i> A909	Souchier BBPG
NEM3525	<i>S. agalactiae</i> NEM316	Souchier BBPG
NEM2312	<i>S. agalactiae</i> BM110	Souchier BBPG
NEM409	<i>Enterococcus faecalis</i>	Souchier BBPG
NEM489	<i>Enterococcus faecium</i>	Souchier BBPG
NEM4906	<i>Lactococcus lactis</i>	Souchier BBPG
NEM640	<i>Pediococcus spp.</i>	Souchier BBPG
NEM4703	<i>Lactobacillus casei</i>	Souchier BBPG
NEM140	<i>Listeria monocytogenes</i>	Souchier BBPG
NEM466	<i>Bacillus subtilis</i>	Souchier BBPG
NEM416	<i>Staphylococcus aureus</i> RN4220	Souchier BBPG
NEM453	<i>Escherichia coli</i>	Souchier BBPG
NEM761	<i>Aerococcus spp.</i>	Souchier BBPG
NEM486	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souchier BBPG
NEM602	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Souchier BBPG

## Matériel et Méthodes

### Culture, souches bactériennes, plasmides et oligonucléotides :

La liste des souches non listées dans les publications 1 et 2 est présentée dans le Tableau 4. La souche de référence de *Sgg* utilisée tout au long de ce travail est UCN34 (Rusniok et al., 2010). Les souches cliniques de *Sgg* sont les mêmes que celles utilisées par Aymeric *et al.* (2018). Le locus génomique de la gallocine a été séquencé dans toutes les souches cliniques par notre collaborateur à Singapour (Dr Wooi TEH). L'analyse et la comparaison des séquences ont été réalisées avec le logiciel Geneious prime 2019.2.1.

Sauf indication contraire, les bactéries utilisées ont été cultivées en milieu Todd-Hewitt supplémenté de 0,5% d'extrait de levure (THY) à 37°C et sans agitation. Si nécessaire, l'érythromycine à une concentration finale de 10 µg/mL a été ajoutée pour le maintien des plasmides. La construction des plasmides a été réalisée comme indiquée dans la **Publication n°1**. Brièvement, les fragments à insérer dans les plasmides ont été amplifiés par PCR, clonés par digestion enzymatique dans les plasmides voulus puis introduits par transformation chez *Escherichia coli*. Les plasmides ont ensuite été purifiés, vérifiés par digestion enzymatique et séquençage puis transformés par électroporation dans *Streptococcus agalactiae* NEM316 puis mobilisés vers *Sgg* UCN34 par conjugaison. Les oligonucléotides utilisés pour les constructions plasmidiques sont listés dans le Tableau 5. Les délétions en phase de différents gènes ont été réalisées comme indiqué dans la **publication n°1**.

### Test de sensibilité à la gallocine par diffusion sur gélose et en milieu liquide :

Le test par diffusion sur gélose a été réalisé comme décrit par Aymeric et al. (2018). *Sgg* a été ensemencé à une densité optique initiale  $DO_{600}=0,1$  à partir d'une boîte fraîche en milieu THY et incubé 5 h à 37°C pour atteindre la phase stationnaire. Le surnageant de *Sgg* a été récupéré après centrifugation et passé sur un filtre de 0,2 µm pour éliminer les bactéries restantes. 1 mL d'une culture de nuit de *Sgm* diluée au dixième a été en parallèle étalé sur milieu gélosé THY et le surplus de liquide a été éliminé. Après séchage environ 20-30 min sous la hotte à température ambiante, des puits ont été creusés dans cette gélose et 80 µL de surnageant supplémenté de 0,1% de Tween20 y ont été déposés. Après séchage d'environ 20-30 min, la boîte a été incubée une nuit à 37°C et les zones d'inhibition ont été observées le lendemain.

Tableau 5 : Liste des primers utilisés (5' vers 3')

Les sites de restriction sont indiqués en gras.

Primers	Séquence (5'-3')
<b>Délétions</b>	
<i>gllA1</i>	TTCT <b>GAATT</b> CGAAACTAGAACTATTGTGCC
	TTCTATAAGTATGCTGAAATACTCTCTCCTTATAAA
	TTTATAAGGAGAGAGTATTT <b>CAGCATA</b> CTTATAGA
	TTCT <b>GGATCCC</b> CAGGCAATATTATTGCCAT
<i>gllA2</i>	TTCT <b>GAATT</b> C <b>T</b> AATGCGGGAGTTTGCCT
	ACTCTCTCCTTATAAAAATTATTGAATACCTCCCAATAA
	TTATTGGGAGGTATTCAATAATTTTATAAGGAGAGAGT
	TTCT <b>GGATCCC</b> CAGGCAATATTATTGCCA
<i>gallo_rs10370</i>	TTCT <b>GAATT</b> CAATCC <b>CAG</b> ATAGACCGCC
	GCAACTGTTTTATCAATGGGCAGAGGAAAAGTAGCA
	TGCTACTTTTCTCTGCCCATTGATAAAACAGTTGC
	TTCT <b>GGATCCC</b> GACAGACGGTATGTTAG
<i>gallo_rs10400- gallo_rs10405 (Δabi)</i>	TTCT <b>GAATT</b> CCAAACGCTCTTGCCGCAA
	CATTATTATGGCTGGGGTTAAGTACTCCTTTAATAAG
	CTTATTAAAGGAGTACTTAACCC <b>CAG</b> CCATAATAATG
	TTCT <b>GGATCCT</b> CCAATTAAGGTCGTGGC
<b>Surexpression</b>	
<i>gip</i>	TTCT <b>GGATCC</b> ATTGGGAGGTATTCAAATGATTATAAAATATAG
	TTCTCT <b>GCAG</b> CAATAGTAATACATTAT

La sensibilité à la gallocine en milieu liquide a été évaluée en ensemençant les bactéries à  $DO_{600}=0,1$  en milieu THY contenant 33% de surnageant de la souche sauvage de *Sgg* ou de la souche ne produisant plus la gallocine (*Sgg Δblp*) et 0,1% de Tween20. Leur croissance a été suivie en plaque 96 puits en mesurant la  $DO_{600}$  toutes les 30 min pendant 10 h grâce au Synergy™2 Multi-detection microplate reader (Biotek).

### **Détermination des souches sensibles à la gallocine**

La sensibilité de différentes espèces listées dans le Tableau 4 à la gallocine a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose. Afin de s'assurer que la concentration en gallocine dans le surnageant soit suffisante pour tuer les bactéries qui y sont sensibles, le surnageant de *Sgg* utilisé contre ces souches a été concentré 10 fois sur une colonne Vivaspin avec un seuil de 10 kDa. Le milieu THY très riche obstruant ce type de colonne, les surnageants ont été produits en milieu M9 supplémenté de 0,5% d'extrait de levure et de 0,2% de glucose (M9YEG) de la même manière qu'en THY. Bien que GIIA1 et GIIA2 soient des petits peptides de 3,75 et 5,5 kDa respectivement, cette concentration a permis d'obtenir une activité gallocine environ 4 fois plus forte dans le surnageant.

### **Résistance de la gallocine à différents stress**

Les surnageants de *Sgg* UCN34 ont été prétraités en y ajoutant un agent réducteur (70mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol ou 100mM de dithiothréitol), en les incubant 15, 30 ou 60 min à 80°C, ou en acidifiant ou basifiant leur pH en ajoutant de l'acide chloridrique (HCl) ou de l'hydroxyde de sodium (NaOH). Les pH ont été mesurés à l'aide d'un pH-mètre. L'activité de ces surnageants traités a ensuite été testée par la méthode de diffusion sur gélose contre *Sgm*.

### **Obtention de mutants résistants à la gallocine**

Afin d'obtenir une concentration suffisante de gallocine et couler des milieux gélifiés la contenant, nous avons réalisé une concentration du surnageant au sulfate d'ammonium 20%. Pour ce faire, 200g de sulfate d'ammonium ont été dissous dans 800mL de surnageant d'une culture de *Sgg* obtenus comme décrit plus haut. Après incubation une nuit à 4°C, ce surnageant a été centrifugé 1h à 6200g à 4°C. Le surnageant a alors été jeté et le culot présent au fond du

récepteur correspondant aux protéines ayant précipitées a été resuspendu dans 4 mL d'eau et conservé à 4°C. Cette concentration a permis d'obtenir un surnageant concentré 20 à 60 fois plus actif que le surnageant initial.

Des boîtes de THY agar contenant 1mL de surnageant concentré de la souche sauvage de *Sgg* ou de *Sgg*  $\Delta blp$  (dépourvu de gallocine), 19 mL de THY agar et 200  $\mu$ L de Tween20 à 10% (concentration finale 0,1%) ont ensuite été coulées. 100  $\mu$ L d'une culture de nuit de *Sgm* et *S. agalactiae* A909 ont été inoculés sur ces boîtes. Ces bactéries étaient capables de pousser normalement sur la boîte contenant le surnageant concentré ne contenant pas la gallocine mais étaient inhibées sur la boîte contenant le surnageant concentré contenant la gallocine. Cette inhibition était particulièrement forte pour *Sgm* qui ne poussait plus du tout sur la boîte contenant la gallocine. Après 24-48 h, une dizaine de colonies de *Sgm* apparurent sur la boîte contenant la gallocine, suggérant que ces clones y étaient devenus résistants. Cette expérience fut répétée 5 fois afin de générer un nombre suffisant de *Sgm* résistants à la gallocine.

Le séquençage du génome des mutants résistants et de la souche sauvage de *Sgm* ainsi que l'identification des polymorphismes nucléotidiques (mutations) entre ces génomes fut réalisé par Juliana Pipoli Da Fonseca et Thomas Cokelaer de la plateforme Biomics de l'Institut Pasteur de Paris.

### **Perméabilisation de liposomes par la gallocine**

Les expériences sur les liposomes ont été réalisées en collaboration avec Alexis Voegelé et Alexandre Chenal, membres du laboratoire « Biochimie des interactions macromoléculaires » à l'Institut Pasteur de Paris comme décrit dans leur publication (Voegelé et al., 2017). Brièvement, une molécule fluorescente (ANTS) liée à un quencher (DPX) inhibant sa fluorescence ont été encapsulés dans des liposomes unilamellaires (diamètre d'environ 200nm) composés de POPC et de POPG à un ratio molaire de 4:1 et à une concentration finale en lipides de 300  $\mu$ M. L'émission de fluorescence de l'ANTS (longueur d'onde d'excitation à 390nm et d'émission à 515nm) a été mesurée en continu durant toute l'expérience pour visualiser la fuite d'ANTS résultant de la perméabilisation des liposomes. Après 60 secondes d'incubation des liposomes dans le tampon, 100  $\mu$ L de surnageants de *Sgg* supplémentés ou non de 0,01% de Tween20 sont ajoutés à 1 mL de tampon contenant les liposomes. Dans le cas des mutants de *Sgg*  $\Delta gllA1$  et  $\Delta gllA2$ , 100  $\mu$ L du surnageant complémentaire ont été de nouveau

ajouté au bout de 200 s. Les surnageants de *Sgg* testés contre les liposomes ont été produits en M9YEG car la fluorescence du milieu THY était trop forte. Une augmentation de fluorescence plus faible était toujours observée lors de l'ajout du surnageant produit en M9YEG et a été soustraite par souci de clarté dans les graphiques présentés ici. Si nécessaire les surnageants ont été concentrés 30 fois sur une colonne Vivaspin ayant un seuil de 10 kDa.



*Références*

*Bibliographiques*

## Références bibliographiques

- Abdulmir, A.S., Hafidh, R.R., and Bakar, F.A. (2010). Molecular detection, quantification, and isolation of *Streptococcus gallolyticus* bacteria colonizing colorectal tumors: inflammation-driven potential of carcinogenesis via IL-1, COX-2, and IL-8. [Mol Cancer](#) 9, 249.
- Abee, T., Klaenhammer, T.R., and Letellier, L. (1994). Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. [Appl Environ Microbiol](#) 60, 1006–1013.
- Al-Ayyoubi, S., and Gali-Muhtasib, H. (2007). Differential apoptosis by gallotannin in human colon cancer cells with distinct p53 status. [Mol Carcinogen](#) 46, 176–186.
- Aldarhami, A., Felek, A., Sharma, V., and Upton, M. (2020). Purification and characterization of nisin P produced by a strain of *Streptococcus gallolyticus*. [J Med Microbiol](#) 69, 605–616.
- Al-Halabi, R., Chedid, M., Abou Merhi, R., El-Hajj, H., Zahr, H., Schhneider-stock, R., Bazarbachi, A., and Gali-Muhtasib, H. (2011). Gallotannin inhibits NFκB signaling and growth of human colon cancer xenografts. [Cancer Biol Ther](#) 12, 59–68.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., and Kuipers, O.P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. [Appl Microbiol Biotechnol](#) 100, 2939–2951.
- 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. (2012). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. [Nat. Prod. Rep.](#) 30, 108–160.
- Atkinson, H.J., and Babbitt, P.C. (2009). An Atlas of the Thioredoxin Fold Class Reveals the Complexity of Function-Enabling Adaptations. [PLOS Comput Biol](#) 5, e1000541.

Aucher, W., Lacombe, C., Héquet, A., Frère, J., and Berjeaud, J.-M. (2005). Influence of Amino Acid Substitutions in the Leader Peptide on Maturation and Secretion of Mesentericin Y105 by *Leuconostoc mesenteroides*. *J Bacteriol* 187, 2218–2223.

Aymeric, L., and Dramsi, S. (2018). *Streptococcus gallolyticus* - Un pathogène opportuniste associé au cancer du côlon. *Med Sci (Paris)* 34, 784–787.

Aymeric, L., Donnadieu, F., Mulet, C., du Merle, L., Nigro, G., Saffarian, A., Bérard, M., Poyart, C., Robine, S., Regnault, B., et al. (2018). Colorectal cancer specific conditions promote *Streptococcus gallolyticus* gut colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E283–E291.

Barrett, E., Hayes, M., O'Connor, P., Gardiner, G., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., and Hill, C. (2007). Salivaricin P, one of a Family of Two-Component Antilisterial Bacteriocins Produced by Intestinal Isolates of *Lactobacillus salivarius*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3719–3723.

Bartman, A.E., Sanderson, S.J., Ewing, S.L., Niehans, G.A., Wiehr, C.L., Evans, M.K., and Ho, S.B. (1999). Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps. *Int. J. Cancer* 80, 210–218.

Bastos, M. do C. de F., Coutinho, B.G., and Coelho, M.L.V. (2010). Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals (Basel)* 3, 1139–1161.

van Belkum, M.J., Worobo, R.W., and Stiles, M.E. (1997). Double-glycine-type leader peptides direct secretion of bacteriocins by ABC transporters: colicin V secretion in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* 23, 1293–1301.

Bintsis, T. (2017). Foodborne pathogens. *AIMS Microbiol* 3, 529–563.

Bisicchia, P., Lioliou, E., Noone, D., Salzberg, L.I., Botella, E., Hübner, S., and Devine, K.M. (2010). Peptidoglycan metabolism is controlled by the WalRK (YycFG) and PhoPR two-component systems in phosphate-limited *Bacillus subtilis* cells. *Mol. Microbiol.* 75, 972–989.

Black, E.P., Linton, M., McCall, R.D., Curran, W., Fitzgerald, G.F., Kelly, A.L., and Patterson, M.F. (2008). The combined effects of high pressure and nisin on germination and inactivation of *Bacillus* spores in milk. [J Appl Microbiol](#) 105, 78–87.

Bogaardt, C., van Tonder, A.J., and Brueggemann, A.B. (2015). Genomic analyses of pneumococci reveal a wide diversity of bacteriocins – including pneumocyclacin, a novel circular bacteriocin. [BMC Genomics](#) 16. 554.

Boleij, A., and Tjalsma, H. (2013). The itinerary of *Streptococcus gallolyticus* infection in patients with colonic malignant disease. [The Lancet Infectious Diseases](#) 13, 719–724.

Boleij, A., Schaeps, R.M.J., de Kleijn, S., Hermans, P.W., Glaser, P., Pancholi, V., Swinkels, D.W., and Tjalsma, H. (2009). Surface-Exposed Histone-Like Protein A Modulates Adherence of *Streptococcus gallolyticus* to Colon Adenocarcinoma Cells. [Infect Immun](#) 77, 5519–5527.

Boleij, A., van Gelder, M.M.H.J., Swinkels, D.W., and Tjalsma, H. (2011a). Clinical Importance of *Streptococcus gallolyticus* Infection Among Colorectal Cancer Patients: Systematic Review and Meta-analysis. [Clin Infect Dis](#) 53, 870–878.

Boleij, A., Muijtens, C.M.J., Bukhari, S.I., Cayet, N., Glaser, P., Hermans, P.W.M., Swinkels, D.W., Bolhuis, A., and Tjalsma, H. (2011b). Novel clues on the specific association of *Streptococcus gallolyticus* subsp *gallolyticus* with colorectal cancer. [J Infect Dis](#) 203, 1101–1109.

Boleij, A., Dutilh, B.E., Kortman, G.A.M., Roelofs, R., Laarakkers, C.M., Engelke, U.F., and Tjalsma, H. (2012). Bacterial Responses to a Simulated Colon Tumor Microenvironment. [Mol Cell Proteomics](#) 11, 851–862.

Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C.P. (2014). Colorectal cancer. *The Lancet* 383, 1490–1502.  
Breukink, E., and de Kruijff, B. (2006). Lipid II as a target for antibiotics. [Nat Rev Drug Discov](#) 5, 321–323.

Britton, A.P., van der Ende, S.R., van Belkum, M.J., and Martin-Visscher, L.A. (2020). The membrane topology of immunity proteins for the two-peptide bacteriocins carnobacteriocin

XY, lactococcin G, and lactococcin MN shows structural diversity. [Microbiologyopen](#) 9 e00957.

Buist, G., Steen, A., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. [Mol. Microbiol.](#) 68, 838–847.

Burns, C.A., McCaughey, R., and Lauter, C.B. (1985). The association of *Streptococcus bovis* fecal carriage and colon neoplasia: possible relationship with polyps and their premalignant potential. [Am J Gastroenterol](#) 80, 42–46.

Chadfield, M.S., Christensen, J.P., Decostere, A., Christensen, H., and Bisgaard, M. (2007). Geno- and Phenotypic Diversity of Avian Isolates of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* (*Streptococcus bovis*) and Associated Diagnostic Problems. [J Clin Microbiol](#) 45, 822–827.

Chikindas, M.L., García-Garcerá, M.J., Driessen, A.J., Ledebøer, A.M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N., and Venema, G. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. [Appl Environ Microbiol](#) 59, 3577–3584.

Chuard, C., and Reller, L.B. (1998). Bile-Esculin Test for Presumptive Identification of Enterococci and Streptococci: Effects of Bile Concentration, Inoculation Technique, and Incubation Time. [J Clin Microbiol](#) 36, 1135–1136.

Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E., and Nes, I.F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. [Appl Environ Microbiol](#) 63, 4321–4330.

Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., and Håvarstein, L.S. (1998a). Enterocins L50A and L50B, Two Novel Bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, Are Related to Staphylococcal Hemolysins. [J Bacteriol](#) 180, 1988–1994.

Cintas, L.M., Casaus, P., Fernández, M.F., and Hernández, P.E. (1998b). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. [Food Microbiol](#) 15, 289–298.

Cohen-Gonsaud, M., Keep, N.H., Davies, A.P., Ward, J., Henderson, B., and Labesse, G. (2004). Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain. [Trends Biochem Sci](#) 29, 7–10.

Cohen-Gonsaud, M., Barthe, P., Bagnéris, C., Henderson, B., Ward, J., Roumestand, C., and Keep, N.H. (2005). The structure of a resuscitation-promoting factor domain from *Mycobacterium tuberculosis* shows homology to lysozymes. [Nat Struct Mol Biol](#) 12, 270–273.

Corredoira, J., Alonso, M.P., Coira, A., Casariego, E., Arias, C., Alonso, D., Pita, J., Rodriguez, A., López, M.J., and Varela, J. (2008). Characteristics of *Streptococcus bovis* endocarditis and its differences with *Streptococcus viridans* endocarditis. [Eur J Clin Microbiol Infect Dis](#) 27, 285–291.

Corredoira, J., Grau, I., Garcia-Rodriguez, J.F., García-País, M.J., Rabuñal, R., Ardanuy, C., García-Garrote, F., Coira, A., Alonso, M.P., Boleij, A., et al. (2017). Colorectal neoplasm in cases of *Clostridium septicum* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* bacteraemia. [Eur J Intern Med](#) 41, 68–73.

Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. [Nat Rev Microbiol](#) 3, 777–788.

Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2013). Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? [Nat Rev Microbiol](#) 11, 95–105.

Coulthurst, S. (2019). The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. [Microbiology \(Reading\)](#) 165, 503–515.

Cui, Y., Zhang, C., Wang, Y., Shi, J., Zhang, L., Ding, Z., Qu, X., and Cui, H. (2012). Class IIa Bacteriocins: Diversity and New Developments. [Int J Mol Sci](#) 13, 16668–16707.

Cuozzo, S.A., Castellano, P., Sesma, F.J.M., Vignolo, G.M., and Raya, R.R. (2003). Differential Roles of the Two-Component Peptides of Lactocin 705 in Antimicrobial Activity. [Curr Microbiol](#) 46, 0180–0183.

Cutforth, T., DeMille, M.M., Agalliu, I., and Agalliu, D. (2016). CNS autoimmune disease after *Streptococcus pyogenes* infections: animal models, cellular mechanisms and genetic factors. [Future Neurol](#) 11, 63–76.

Danne, C., Entenza, J.M., Mallet, A., Briandet, R., Débarbouillé, M., Nato, F., Glaser, P., Jouvion, G., Moreillon, P., Trieu-Cuot, P., et al. (2011). Molecular Characterization of a *Streptococcus gallolyticus* Genomic Island Encoding a Pilus Involved in Endocarditis. [J Infect Dis](#) 204, 1960–1970.

Danne, C., Dubrac, S., Trieu-Cuot, P., and Dramsi, S. (2014). Single Cell Stochastic Regulation of Pilus Phase Variation by an Attenuation-like Mechanism. [PLoS Pathog](#) 10. e1003860.

De Herdt, P., Haesebrouck, F., Devriese, L.A., and Ducatelle, R. (1992). Biochemical and antigenic properties of *Streptococcus bovis* isolated from pigeons. [J Clin Microbiol](#) 30, 2432–2434.

De Vuyst, L., and Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. [J Mol Microbiol Biotechnol](#) 13, 194–199.

De Vuyst, L., and Tsakalidou, E. (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. [International Dairy Journal](#) 18, 476–485.

Dekker, J.P., and Lau, A.F. (2016). An Update on the *Streptococcus bovis* Group: Classification, Identification, and Disease Associations. [J Clin Microbiol](#) 54, 1694–1699.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., and Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. [Antonie van Leeuwenhoek](#) 69, 193–202.

- Devriese, L.A., Hommeez, J., Kilpper-bälz, R., and Schleifer, K.-H. (1986). *Streptococcus canis* sp. nov.: A Species of Group G Streptococci from Animals. [Int J Syst Evol Microbiol](#) 36, 422–425.
- Devriese, L.A., Uyttebroek, E., Gevaert, D., Vandekerckhove, P., and Ceyskens, K. (1990). *Streptococcus bovis* infections in Pigeons. [Avian Pathol](#) 19, 429–434.
- Diep, D.B., Håvarstein, L.S., and Nes, I.F. (1996). Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. [J Bacteriol](#) 178, 4472–4483.
- Diep, D.B., Johnsborg, O., Risøen, P.A., and Nes, I.F. (2001). Evidence for dual functionality of the operon *plnABCD* in the regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum*. [Mol Microbiol](#) 41, 633–644.
- Diep, D.B., Myhre, R., Johnsborg, O., Aakra, Å., and Nes, I.F. (2003). Inducible bacteriocin production in *Lactobacillus* is regulated by differential expression of the *pln* operons and by two antagonizing response regulators, the activity of which is enhanced upon phosphorylation. [Mol Microbiol](#) 47, 483–494.
- Diep, D.B., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., and Nes, I.F. (2007). Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. [Proc Natl Acad Sci U S A](#) 104, 2384–2389.
- Dobson, A., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2012). Bacteriocin Production: a Probiotic Trait? [Appl Environ Microbiol](#) 78, 1–6.
- Draper, L.A., Ross, R.P., Hill, C., and Cotter, P.D. (2008). Lantibiotic immunity. [Curr Protein Pept Sci](#) 9, 39–49.
- Draper, L.A., Grainger, K., Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2009). Cross-immunity and immune mimicry as mechanisms of resistance to the lantibiotic lactacin 3147. [Mol Microbiol](#) 71, 1043–1054.



Draper, L.A., Cotter, P.D., Hill, C., and Ross, R.P. (2015). Lantibiotic Resistance. [Microbiol Mol Biol Rev](#) 79, 171–191.

Dubrac, S., and Msadek, T. (2004). Identification of genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Staphylococcus aureus*. [J Bacteriol](#) 186, 1175–1181.

Dubrac, S., Boneca, I.G., Poupel, O., and Msadek, T. (2007). New insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) essential signal transduction pathway reveal a major role in controlling cell wall metabolism and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. [J Bacteriol](#) 189, 8257–8269.

Dumke, J., Vollmer, T., Akkermann, O., Knabbe, C., and Dreier, J. (2017). Case-control study: Determination of potential risk factors for the colonization of healthy volunteers with *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*. [PLoS ONE](#) 12, e0176515.

Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Cossart, P., and European Listeria Genome Consortium (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. [Mol Microbiol](#) 45, 1095–1106.

Duval, X., Papastamopoulos, V., Longuet, P., Benoit, C., Perronne, C., Leport, C., and Vildé, J.L. (2001). Definite *Streptococcus bovis* endocarditis: characteristics in 20 patients. [Clin Microbiol Infect](#) 7, 3–10.

Dykes, G.A., and Hastings, J.W. (1997). Selection and fitness in bacteriocin-producing bacteria. [Proc Biol Sci](#) 264, 683–687.

Eijsink, V.G.H., Skeie, M., Middelhoven, P.H., Brurberg, M.B., and Nes, I.F. (1998). Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. [Appl Environ Microbiol](#) 64, 3275–3281.

Ekblad, B., and Kristiansen, P.E. (2019). NMR structures and mutational analysis of the two peptides constituting the bacteriocin plantaricin S. [Sci Rep](#) 9, 2333.

Ekblad, B., Kyriakou, P.K., Oppedgård, C., Nissen-Meyer, J., Kaznessis, Y.N., and Kristiansen, P.E. (2016). Structure–Function Analysis of the Two-Peptide Bacteriocin Plantaricin EF. [Biochemistry](#) 55, 5106–5116.

Fabianek, R.A., Hennecke, H., and Thöny-Meyer, L. (2000). Periplasmic protein thiol: disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. [FEMS Microbiol Rev](#) 24, 303–316.

Faye, T., Langsrud, T., Nes, I.F., and Holo, H. (2000). Biochemical and Genetic Characterization of Propionicin T1, a New Bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*. [Appl Environ Microbiol](#) 66, 4230–4236.

Ferrari, A., Botrugno, I., Bombelli, E., Dominioni, T., Cavazzi, E., and Dionigi, P. (2008). Colonoscopy is mandatory after *Streptococcus bovis* endocarditis: a lesson still not learned. Case report. [World J Surg Oncol](#) 6, 49.

Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., and Nissen-Meyer, J. (2005). Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure, and mode of action. [J Pept Sci](#) 11, 688–696.

Fimland, N., Rogne, P., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Kristiansen, P.E. (2008). Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. [Biochim Biophys Acta](#) 1784, 1711–1719.

Firon, A., Tazi, A., Da Cunha, V., Brinster, S., Sauvage, E., Dramsi, S., Golenbock, D.T., Glaser, P., Poyart, C., and Trieu-Cuot, P. (2013). The Abi-domain Protein Abx1 Interacts with the CovS Histidine Kinase to Control Virulence Gene Expression in Group B Streptococcus. [PLoS Pathog](#) 9. e1003179.

Francis, K.P., Joh, D., Bellinger-Kawahara, C., Hawkinson, M.J., Purchio, T.F., and Contag, P.R. (2000). Monitoring Bioluminescent *Staphylococcus aureus* Infections in Living Mice Using a Novel *luxABCDE* Construct. [Infect Immun](#) 68, 3594–3600.

Franke, C.M., Tiemersma, J., Venema, G., and Kok, J. (1999). Membrane topology of the lactococcal bacteriocin ATP-binding cassette transporter protein LcnC. Involvement of LcnC in lactococcal maturation. *J Biol Chem* 274, 8484–8490.

Franz, C.M.A.P., van Belkum, M.J., Worobo, R.W., Vederas, J.C., and Stiles, M.E. (2000). Characterization of the genetic locus responsible for production and immunity of carnobacteriocin A: the immunity gene confers cross-protection to enterocin B. *Microbiology (Reading)* 146, 621–631.

Freudl, R. (2018). Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb Cell Fact* 17, 52.

Gabrielsen, C., Brede, D.A., Nes, I.F., and Diep, D.B. (2014). Circular Bacteriocins: Biosynthesis and Mode of Action. *Appl Environ Microbiol* 80, 6854–6862.

Garneau, S., Ference, C.A., van Belkum, M.J., Stiles, M.E., and Vederas, J.C. (2003). Purification and characterization of brochocin A and brochocin B (10-43), a functional fragment generated by heterologous expression in *Carnobacterium piscicola*. *Appl Environ Microbiol* 69, 1352–1358.

Garré (1888). Sur les antagonismes entre les bactéries. *Ann Inst Pasteur* 2, 218–220.

Garvie, E.I., and Bramley, A.J. (1979). *Streptococcus bovis*—an Approach to its Classification and its Importance as a Cause of Bovine Mastitis. *J Appl Bacteriol* 46, 557–566.

Geiger, C., Korn, S.M., Häslar, M., Peetz, O., Martin, J., Kötter, P., Morgner, N., and Entian, K.-D. (2019). LanI-Mediated Lantibiotic Immunity in *Bacillus subtilis*: Functional Analysis. *Appl Environ Microbiol* 85, e00534-19.

Georgalaki, M., Papadimitriou, K., Anastasiou, R., Pot, B., Van Driessche, G., Devreese, B., and Tsakalidou, E. (2013). Macedovicin, the second food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Food Microbiol* 33, 124–130.

Georgalaki, M.D., Van den Berghe, E., Kritikos, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Kalantzopoulos, G., De Vuyst, L., and Tsakalidou, E. (2002). Macedocin, a Food-Grade Lantibiotic Produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. [Appl Environ Microbiol](#) 68, 5891–5903.

Giannitsioti, E., Chirouze, C., Bouvet, A., Béguinot, I., Delahaye, F., Mainardi, J.-L., Celard, M., Mihaila-Amrouche, L., Moing, V.L., and Hoen, B. (2007). Characteristics and regional variations of group D streptococcal endocarditis in France. [Clin Microbiol Infect](#) 13, 770–776.

Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., Zouine, M., Couvé, E., Lalioui, L., Poyart, C., et al. (2002). Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. [Mol Microbiol](#) 45, 1499–1513.

Gonzalez, D., and Mavridou, D.A.I. (2019). Making the Best of Aggression: The Many Dimensions of Bacterial Toxin Regulation. [Trends Microbiol](#) 27, 897-905.

Goyette-Desjardins, G., Auger, J.-P., Xu, J., Segura, M., and Gottschalk, M. (2014). *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. [Emerg Microbes Infect](#) 3, e45.

Gratia, A. (1925). Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacille. [Comptes Rendus Hebdomadaires de La Société de Biologie](#) 93, 1040–1041.

Gravesen, A., Jydegaard Axelsen, A.-M., Mendes da Silva, J., Hansen, T.B., and Knøchel, S. (2002). Frequency of Bacteriocin Resistance Development and Associated Fitness Costs in *Listeria monocytogenes*. [Appl Environ Microbiol](#) 68, 756–764.

Grazia, S.E., Sumayyah, S., Haiti, F.S., Sahlan, M., Heng, N.C.K., and Malik, A. (2017). Bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) activity of *Streptococcus macedonicus* MBF10-2 and its synergistic action in combination with antibiotics. [Asian Pac J Trop Med](#) 10, 1140–1145.

Guyonnet, D., Fremaux, C., Cenatiempo, Y., and Berjeaud, J.M. (2000). Method for Rapid Purification of Class IIa Bacteriocins and Comparison of Their Activities. [Appl Env Microbiol](#) 66, 1744-8.

Hammami, R., Zouhir, A., Ben Hamida, J., and Fliss, I. (2007). BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. [BMC Microbiol](#) 7, 89.

Harrington, D.J., Sutcliffe, I.C., and Chanter, N. (2002). The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. [Microbes Infect](#) 4, 501–510.

Hasper, H.E., de Kruijff, B., and Breukink, E. (2004). Assembly and Stability of Nisin–Lipid II Pores. [Biochemistry](#) 43, 11567–11575.

Hauge, H.H., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., and Eijsink, V.G.H. (1998a). Amphiphilic  $\alpha$ -helices are important structural motifs in the  $\alpha$  and  $\beta$  peptides that constitute the bacteriocin lactococcin G. [Eur J Biochem](#) 251, 565–572.

Hauge, H.H., Mantzilas, D., Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J.M., Eijsink, V.G.H., and Nissen-Meyer, J. (1998b). Plantaricin A Is an Amphiphilic  $\alpha$ -Helical Bacteriocin-like Pheromone Which Exerts Antimicrobial and Pheromone Activities through Different Mechanisms. [Biochemistry](#) 37, 16026–16032.

Hauge, H.H., Mantzilas, D., Eijsink, V.G.H., and Nissen-Meyer, J. (1999). Membrane-Mimicking Entities Induce Structuring of the Two-Peptide Bacteriocins Plantaricin E/F and Plantaricin J/K. [J Bacteriol](#) 181, 740–747.

Havarstein, L.S., Diep, D.B., and Nes, I.F. (1995). A family of bacteriocin ABC transporters carry out proteolytic processing of their substrates concomitant with export. [Mol Microbiol](#) 16, 229–240.

van Heel, A.J., de Jong, A., Montalbán-López, M., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2013). BAGEL3: Automated identification of genes encoding bacteriocins and (non-)bactericidal posttranslationally modified peptides. [Nucleic Acids Res](#) 41, W448-453.

van Heel, A.J., de Jong, A., Song, C., Viel, J.H., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Res* 46, W278–W281.

Heng, N.C.K., Burtenshaw, G.A., Jack, R.W., and Tagg, J.R. (2004). Sequence analysis of pDN571, a plasmid encoding novel bacteriocin production in M-type 57 *Streptococcus pyogenes*. *Plasmid* 52, 225–229.

Heng, N.C.K., Ragland, N.L., Swe, P.M., Baird, H.J., Inglis, M.A., Tagg, J.R., and Jack, R.W. (2006). Dysgalacticin: a novel, plasmid-encoded antimicrobial protein (bacteriocin) produced by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiology (Reading)* 152, 1991–2001.

Heng, N.C.K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W., and Tagg, J.R. (2007). The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In *Bacteriocins*, P.D.M.A. Riley, and D.M.A. Chavan, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 45–92.

Herranz, C., Chen, Y., Chung, H.-J., Cintas, L.M., Hernández, P.E., Montville, T.J., and Chikindas, M.L. (2001). Enterocin P Selectively Dissipates the Membrane Potential of *Enterococcus faecium* T136. *Appl Environ Microbiol* 67, 1689–1692.

Hill, D., O'Connor, P.M., Altermann, E., Day, L., Hill, C., Stanton, C., and Ross, R.P. (2020). Extensive bacteriocin gene shuffling in the *Streptococcus bovis* / *Streptococcus equinus* complex reveals gallocin D with activity against vancomycin resistant enterococci. *Sci Rep* 10, 13431.

Hinse, D., Vollmer, T., Erhard, M., Welker, M., Moore, E.R.B., Kleesiek, K., and Dreier, J. (2011). Differentiation of species of the *Streptococcus bovis/equinus*-complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry in comparison to *sodA* sequence analyses. *Syst Appl Microbiol* 34, 52–57.

Hirota, K., Osawa, R., Nemoto, K., Ono, T., and Miyake, Y. (1996). Highly expressed human sialyl Lewis X antigen on cell surface of *Streptococcus gallolyticus*. *The Lancet* 347, 760.

Hoen, B., Chirouze, C., Cabell, C.H., Selton-Suty, C., Duchêne, F., Olaison, L., Miro, J.M., Habib, G., Abrutyn, E., Eykyn, S., et al. (2005). Emergence of endocarditis due to group D

streptococci: findings derived from the merged database of the International Collaboration on Endocarditis. [Eur J Clin Microbiol Infect Dis](#) 24, 12–16.

Holo, H., Nilssen, O., and Nes, I.F. (1991). Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. [J Bacteriol](#) 173, 3879–3887.

Hossain, M.S., and Biswas, I. (2012). An Extracellular Protease, SepM, Generates Functional Competence-Stimulating Peptide in *Streptococcus mutans* UA159. [J Bacteriol](#) 194, 5886–5896.

Hyams, C., Camberlein, E., Cohen, J.M., Bax, K., and Brown, J.S. (2010). The *Streptococcus pneumoniae* capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms. [Infect Immun](#) 78, 704–715.

Isenring, J., Köhler, J., Nakata, M., Frank, M., Jans, C., Renault, P., Danne, C., Dramsi, S., Kreikemeyer, B., and Oehmcke-Hecht, S. (2018). *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* endocarditis isolate interferes with coagulation and activates the contact system. [Virulence](#) 9, 248–261.

Iverson, W.G., and Millis, N.F. (1976). Bacteriocins of *Streptococcus bovis*. [Can J Microbiol](#) 22, 1040–1047.

Iwatani, S., Horikiri, Y., Zendo, T., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2013). Bifunctional Gene Cluster InqBCDEF Mediates Bacteriocin Production and Immunity with Differential Genetic Requirements. [Appl Environ Microbiol](#) 79, 2446–2449.

Jacob, F., Lwoff, A., Siminovitch, A., and Wollman, E. (1953). Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. [Ann Inst Pasteur](#) 84, 222–224.

Jamaluddin, N., Stuckey, D.C., Ariff, A.B., and Wong, F.W.F. (2018). Novel approaches to purifying bacteriocin: A review. [Crit Rev Food Sci Nutr](#) 58, 2453–2465.

Janney, A., Powrie, F., and Mann, E.H. (2020). Host–microbiota maladaptation in colorectal cancer. [Nature](#) 585, 509–517.

Jans, C., Meile, L., Lacroix, C., and Stevens, M.J.A. (2015). Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). [Infect Genet Evol](#) 33, 419–436.

Jiménez, N., Reverón, I., Esteban-Torres, M., López de Felipe, F., de las Rivas, B., and Muñoz, R. (2014). Genetic and biochemical approaches towards unravelling the degradation of gallotannins by *Streptococcus gallolyticus*. [Microbial Cell Fact](#) 13, 154.

Joerger, M.C., and Klaenhammer, T.R. (1990). Cloning, expression, and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. [J. Bacteriol.](#) 172, 6339–6347.

Johansson, M.E.V., Sjövall, H., and Hansson, G.C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. [Nat Rev Gastroenterol Hepatol](#) 10, 352–361.

Johnsen, L., Fimland, G., and Nissen-Meyer, J. (2005). The C-terminal Domain of Pediocin-like Antimicrobial Peptides (Class IIa Bacteriocins) Is Involved in Specific Recognition of the C-terminal Part of Cognate Immunity Proteins and in Determining the Antimicrobial Spectrum. [J Biol Chem](#) 280, 9243–9250.

de Jong, A., van Hijum, S.A.F.T., Bijlsma, J.J.E., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2006). BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. [Nucleic Acids Res](#) 34, W273–W279.

Kale, P., Khillan, V., and Sarin, S.K. (2018). Novel association of *Streptococcus gallolyticus* subspecies *pasteurianus* and hepatocellular carcinoma: opening new frontiers. [Scand J Gastroenterol](#) 53, 1354–1357.

Kalmokoff, M.L., Banerjee, S.K., Cyr, T., Hefford, M.A., and Gleeson, T. (2001). Identification of a New Plasmid-Encoded sec-Dependent Bacteriocin Produced by *Listeria innocua* 743. [Appl Environ Microbiol](#) 67, 4041–4047.

Keefe, G.P. (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. [Can Vet J](#) 38, 429–437.



Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I.F., and Diep, D.B. (2010a). The Abi Proteins and Their Involvement in Bacteriocin Self-Immunity. *J Bacteriol* 192, 2068–2076.

Kjos, M., Snipen, L., Salehian, Z., Nes, I.F., and Diep, D.B. (2010b). The Abi Proteins and Their Involvement in Bacteriocin Self-Immunity. *J Bacteriol* 192, 2068–2076.

Kjos, M., Nes, I.F., and Diep, D.B. (2011a). Mechanisms of Resistance to Bacteriocins Targeting the Mannose Phosphotransferase System. *Appl Environ Microbiol* 77, 3335–3342.

Kjos, M., Borrero, J., Opsata, M., Birri, D.J., Holo, H., Cintas, L.M., Snipen, L., Hernández, P.E., Nes, I.F., and Diep, D.B. (2011b). Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 157, 3256–3267.

Kjos, M., Oppedgård, C., Diep, D.B., Nes, I.F., Veening, J.-W., Nissen-Meyer, J., and Kristensen, T. (2014). Sensitivity to the two-peptide bacteriocin lactococcin G is dependent on UppP, an enzyme involved in cell-wall synthesis. *Mol Microbiol* 92, 1177–1187.

Kjos, M., Miller, E., Slager, J., Lake, F.B., Gericke, O., Roberts, I.S., Rozen, D.E., and Veening, J.-W. (2016). Expression of *Streptococcus pneumoniae* Bacteriocins Is Induced by Antibiotics via Regulatory Interplay with the Competence System. *PLoS Pathog* 12, e1005422.

Kleerebezem, M. (2004). Quorum sensing control of lantibiotic production; nisin and subtilin autoregulate their own biosynthesis. *Peptides* 25, 1405–1414.

Kleerebezem, M., and Quadri, L.E. (2001). Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides* 22, 1579–1596.

Klein, R.S., Recco, R.A., Catalano, M.T., Edberg, S.C., Casey, J.I., and Steigbigel, N.H. (1977). Association of *Streptococcus bovis* with Carcinoma of the Colon. *New Engl J Med* 297, 800–802.

Kommineni, S., Bretl, D.J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P., Cao, Y., Bousounis, P., Kristich, C.J., and Salzman, N.H. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian GI tract. *Nature* 526, 719–722.

Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., and Qi, F. (2005). Coordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species. *Mol Microbiol* 57, 392–404.

Kuipers, A., Rink, R., and Moll, G.N. (2011). Genetics, Biosynthesis, Structure, and Mode of Action of Lantibiotics. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*, D. Drider, and S. Rebuffat, eds. (New York, NY: Springer), pp. 147–169.

Kumar, K., Chaudhary, L.C., Agarwal, N., and Kamra, D.N. (2014). Effect of feeding tannin degrading bacterial culture (*Streptococcus gallolyticus* strain TDGB 406) on nutrient utilization, urinary purine derivatives and growth performance of goats fed on *Quercus semicarpifolia* leaves. *J Anim Physiol Anim Nutr* 98, 879–885.

Kumar, R., Herold, J.L., Schady, D., Davis, J., Kopetz, S., Martinez-Moczygemba, M., Murray, B.E., Han, F., Li, Y., Callaway, E., et al. (2017). *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* promotes colorectal tumor development. *PLoS Pathog* 13. e1006440

Kumar, R., Herold, J.L., Taylor, J., Xu, J., and Xu, Y. (2018). Variations among *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* strains in connection with colorectal cancer. *Sci Rep* 8, 1514.

Lancefield, R.C. (1933). a serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* 57, 571–595.

Lay, C.L., Dridi, L., Bergeron, M.G., Ouellette, M., and Fliss, I.L. (2016). Nisin is an effective inhibitor of *Clostridium difficile* vegetative cells and spore germination. *J Med Microbiol* 65, 169–175.

Lazarovitch, T., Shango, M., Levine, M., Brusovansky, R., Akins, R., Hayakawa, K., Lephart, P.R., Sobel, J.D., Kaye, K.S., and Marchaim, D. (2013). The relationship between the new

taxonomy of *Streptococcus bovis* and its clonality to colon cancer, endocarditis, and biliary disease. [Infection](#) 41, 329–337.

Leclercq, R., Huet, C., Picherot, M., Trieu-Cuot, P., and Poyart, C. (2005). Genetic Basis of Antibiotic Resistance in Clinical Isolates of *Streptococcus gallolyticus* (*Streptococcus bovis*). [Antimicrob Agents Chemother](#) 49, 1646–1648.

Lejeune, Callewaert, Crabbé, and Vuyst, D. (1998). Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. [J Appl Microbiol](#) 84, 159–168.

de Lima Procópio, R.E., da Silva, I.R., Martins, M.K., de Azevedo, J.L., and de Araújo, J.M. (2012). Antibiotics produced by Streptomyces. [Braz J Infect Dis](#) 16, 466–471.

Lin, I.-H., Liu, T.-T., Teng, Y.-T., Wu, H.-L., Liu, Y.-M., Wu, K.-M., Chang, C.-H., and Hsu, M.-T. (2011). Sequencing and Comparative Genome Analysis of Two Pathogenic *Streptococcus gallolyticus* Subspecies: Genome Plasticity, Adaptation and Virulence. [PLoS One](#) 6. e20519

Liu, G., Zhong, J., Ni, J., Chen, M., Xiao, H., and Huan, L. (2009). Characteristics of the bovicin HJ50 gene cluster in *Streptococcus bovis* HJ50. [Microbiology](#) (Reading, England) 155, 584–593.

Lohans, C.T., and Vederas, J.C. (2012). Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents. [Int J Microbiol](#) 2012, 386410.

López-Pedemonte, T.J., Roig-Sagués, A.X., Trujillo, A.J., Capellas, M., and Guamis, B. (2003). Inactivation of Spores of *Bacillus cereus* in Cheese by High Hydrostatic Pressure with the Addition of Nisin or Lysozyme. [J Dairy Sci](#) 86, 3075–3081.

Luo, D., Chen, J., Xie, G., Yue, L., and Wang, Y. (2019). Enzyme characterization and biological activities of a resuscitation promoting factor from an oil degrading bacterium *Rhodococcus erythropolis* KB1. [PeerJ](#) 7, e6951–e6951.

Maldonado-Barragán, A., and West, S.A. (2020). The cost and benefit of quorum sensing-controlled bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum*. *J Evol Biol* 33, 101–111.

Manolaridis, I., Kulkarni, K., Dodd, R.B., Ogasawara, S., Zhang, Z., Bineva, G., Reilly, N.O., Hanrahan, S.J., Thompson, A.J., Cronin, N., et al. (2013). Mechanism of farnesylated CAAX protein processing by the integral membrane protease Rce1. *Nature* 504, 301-5.

Mantovani, H.C., Hu, H., Worobo, R.W., and Russell, J.B. (2002). Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. *Microbiology* (Reading, England) 148, 3347–3352.

Marciset, O., Jeronimus-Stratingh, M.C., Mollet, B., and Poolman, B. (1997). Thermophilin 13, a nontypical antilisterial poration complex bacteriocin, that functions without a receptor. *J Biol Chem* 272, 14277–14284.

Martins, M., Aymeric, L., du Merle, L., Danne, C., Robbe-Masselot, C., Trieu-Cuot, P., Sansonetti, P., and Dramsi, S. (2015). *Streptococcus gallolyticus* Pil3 Pilus Is Required for Adhesion to Colonic Mucus and for Colonization of Mouse Distal Colon. *J Infect Dis* 212, 1646–1655.

Martins, M., Porrini, C., du Merle, L., Danne, C., Robbe-Masselot, C., Trieu-Cuot, P., and Dramsi, S. (2016). The Pil3 pilus of *Streptococcus gallolyticus* binds to intestinal mucins and to fibrinogen. *Gut Microbes* 7, 526–532.

McCoy, W.C., and Mason, J.M. (1951). Enterococcal endocarditis associated with carcinoma of the sigmoid; report of a case. *J Med Assoc State Ala* 21, 162–166.

Meehan, B.M., Landeta, C., Boyd, D., and Beckwith, J. (2017). The Disulfide Bond Formation Pathway Is Essential for Anaerobic Growth of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 199. e00120-17

Merritt, J., Zheng, L., Shi, W., and Qi, F. (2007). Genetic characterization of the *hdrRM* operon: a novel high-cell-density-responsive regulator in *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 153, 2765–2773.

Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., and McNabb, W.C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. [Animal Feed Science and Technology](#) 106, 3–19.

Moll, G., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Konings, W.N., and Driessen, A.J.M. (1998). Mechanistic Properties of the Two-Component Bacteriocin Lactococcin G. [J Bacteriol](#) 180, 96–99.

Morgan, S.M., O'Connor, P.M., Cotter, P.D., Ross, R.P., and Hill, C. (2005). Sequential Actions of the Two Component Peptides of the Lantibiotic Lactacin 3147 Explain Its Antimicrobial Activity at Nanomolar Concentrations. [Antimicrob Agents Chemother](#) 49, 2606–2611.

Morrison, D.A., Guédon, E., and Renault, P. (2013). Competence for Natural Genetic Transformation in the *Streptococcus bovis* Group Streptococci *S. infantarius* and *S. macedonicus*. [J Bacteriol](#) 195, 2612–2620.

Morton, J.T., Freed, S.D., Lee, S.W., and Friedberg, I. (2015). A large scale prediction of bacteriocin gene blocks suggests a wide functional spectrum for bacteriocins. [BMC Bioinformatics](#) 16, 381.

Mueller-Harvey, I. (2006). Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. [J Sci Food Agricult](#) 86, 2010–2037.

Murray, H.W., and Roberts, R.B. (1978). *Streptococcus bovis* Bacteremia and Underlying Gastrointestinal Disease. [Arch Intern Med](#) 138, 1097–1099.

Musher, D.M. (1992). Infections Caused by *Streptococcus pneumoniae*: Clinical Spectrum, Pathogenesis, Immunity, and Treatment. [Clin Infect Dis](#) 14, 801–807.

Nagao, J., Asaduzzaman, S.M., Aso, Y., Okuda, K., Nakayama, J., and Sonomoto, K. (2006). Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. [J Biosci Bioeng](#) 102, 139–149.

Nascimento, J. dos S., Coelho, M.L.V., Ceotto, H., Potter, A., Fleming, L.R., Salehian, Z., Nes, I.F., and Bastos, M. do C. de F. (2012). Genes Involved in Immunity to and Secretion of

Aureocin A53, an Atypical Class II Bacteriocin Produced by *Staphylococcus aureus* A53. [J Bacteriol](#) 194, 875–883.

Naumann, H.D., Tedeschi, L.O., Zeller, W.E., Huntley, N.F., Naumann, H.D., Tedeschi, L.O., Zeller, W.E., and Huntley, N.F. (2017). The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. [Revista Brasileira de Zootecnia](#) 46, 929–949.

Neis, S., Bierbaum, G., Josten, M., Pag, U., Kempter, C., Jung, G., and Sahl, H.-G. (1997). Effect of leader peptide mutations on biosynthesis of the lantibiotic Pep5. [FEMS Microbiol Lett](#) 149, 249–255.

Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., and Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. [Antonie Van Leeuwenhoek](#) 70, 113–128.

Netz, D.J.A., Sahl, H.-G., Marcolino, R., dos Santos Nascimento, J., de Oliveira, S.S., Soares, M.B., and do Carmo de Freire Bastos, M. (2001). Molecular characterisation of aureocin A70, a multi-peptide bacteriocin isolated from *Staphylococcus aureus*. [J Mol Biol](#) 311, 939–949.

Netz, D.J.A., Pohl, R., Beck-Sickinger, A.G., Selmer, T., Pierik, A.J., Bastos, M. do C. de F., and Sahl, H.-G. (2002). Biochemical Characterisation and Genetic Analysis of Aureocin A53, a New, Atypical Bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. [J Mol Biol](#) 319, 745–756.

Nieto Lozano, J.C., Meyer, J.N., Sletten, K., Peláz, C., and Nes, I.F. (1992). Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. [J Gen Microbiol](#) 138, 1985–1990.

Nikitushkin, V.D., Demina, G.R., Shleeva, M.O., and Kaprelyants, A.S. (2013). Peptidoglycan fragments stimulate resuscitation of “non-culturable” mycobacteria. [Antonie Van Leeuwenhoek](#) 103, 37–46.

Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Opegård, C., Haugen, H.S., and Kristiansen, P.E. (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. [Curr Pharm Biotechnol](#) 10, 19–37.

Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H.S., and Kristiansen, P.E. (2010). Structure and Mode-of-Action of the Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins. [Probiotics Antimicrob Proteins](#) 2, 52–60.

Nissen-Meyer, J., Oppegård, C., Rogne, P., Haugen, H.S., and Kristiansen, P.E. (2011). The Two-Peptide (Class-IIb) Bacteriocins: Genetics, Biosynthesis, Structure, and Mode of Action. In *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*, D. Drider, and S. Rebuffat, eds. (New York, NY: Springer), pp. 197–212.

Nobbs, A.H., Lamont, R.J., and Jenkinson, H.F. (2009). Streptococcus Adherence and Colonization. [Microbiol Mol Biol Rev](#) 73, 407–450.

Oehmcke-Hecht, S., Mandl, V., Naatz, L.T., Dühring, L., Köhler, J., Kreikemeyer, B., and Maletzki, C. (2020). *Streptococcus gallolyticus* abrogates anti-carcinogenic properties of tannic acid on low-passage colorectal carcinomas. [Sci Rep](#) 10, 4714.

Okinaga, T., Niu, G., Xie, Z., Qi, F., and Merritt, J. (2010). The *hdrRM* operon of *Streptococcus mutans* encodes a novel regulatory system for coordinated competence development and bacteriocin production. [JBacteriol](#) 192, 1844–1852.

Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P.E., Fimland, G., and Nissen-Meyer, J. (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. [J Mol. Microbiol Biotechnol](#) 13, 210–219.

Oppegård, C., Schmidt, J., Kristiansen, P.E., and Nissen-Meyer, J. (2008). Mutational Analysis of Putative Helix–Helix Interacting GxxxG-Motifs and Tryptophan Residues in the Two-Peptide Bacteriocin Lactococcin G. [Biochemistry](#) 47, 5242–5249.

Oppegård, C., Emanuelsen, L., Thorbek, L., Fimland, G., and Nissen-Meyer, J. (2010). The lactococcin G immunity protein recognizes specific regions in both peptides constituting the two-peptide bacteriocin lactococcin G. [Appl Environ Microbiol](#) 76, 1267–1273.

Oppegård, C., Fimland, G., Anonsen, J.H., and Nissen-Meyer, J. (2015). The Pediocin PA-1

Accessory Protein Ensures Correct Disulfide Bond Formation in the Antimicrobial Peptide Pediocin PA-1. [Biochemistry](#) 54, 2967–2974.

Osawa, R., Fujisawa, T., and Sly, L.I. (1995). *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; Gallate Degrading Organisms Formerly Assigned to *Streptococcus bovis*. [Systematic and Appl Microbiol](#) 18, 74–78.

O’Sullivan, L., Ross, R.P., and Hill, C. (2003). A lacticin 481-producing adjunct culture increases starter lysis while inhibiting nonstarter lactic acid bacteria proliferation during Cheddar cheese ripening. [J Appl Microbiol](#) 95, 1235–1241.

Ovchinnikov, K.V., Chi, H., Mehmeti, I., Holo, H., Nes, I.F., and Diep, D.B. (2016). Novel Group of Leaderless Multi-peptide Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. [Appl Environ Microbiol](#) 82, 5216–5224.

Pasteur, L., and Joubert, J. (1877). Charbon et sépticémie. [Compt Rend Acad Sci](#) 85, 101–115.

Perez, R.H., Zendo, T., and Sonomoto, K. (2018). Circular and Leaderless Bacteriocins: Biosynthesis, Mode of Action, Applications, and Prospects. [Front Microbiol](#) 9, 2085

Pieterse, R., Todorov, S.D., and Dicks, L.M.T. (2010). Mode of action and *in vitro* susceptibility of mastitis pathogens to macedocin ST91KM and preparation of a teat seal containing the bacteriocin. [Braz J Microbiol](#) 41, 133–145.

Polk, D.B., and Peek, R.M. (2010). *Helicobacter pylori* : gastric cancer and beyond. [Nature Rev Cancer](#) 10, 403–414.

Poupel, O., Proux, C., Jagla, B., Msadek, T., and Dubrac, S. (2018). SpdC, a novel virulence factor, controls histidine kinase activity in *Staphylococcus aureus*. [PLoS Pathogens](#) 14, e1006917.

Poyart, C., Quesne, G., and Trieu-Cuot, P. (2002). Taxonomic dissection of the *Streptococcus bovis* group by analysis of manganese-dependent superoxide dismutase gene (*sodA*) sequences: reclassification of “*Streptococcus infantarius* subsp. *coli*” as *Streptococcus lutetiensis* sp. nov.



and of *Streptococcus bovis* biotype 11.2 as *Streptococcus pasteurianus* sp. nov. [Int J Syst Evol Microbiol](#) 52, 1247–1255.

Repka, L.M., Chekan, J.R., Nair, S.K., and van der Donk, W.A. (2017). Mechanistic Understanding of Lanthipeptide Biosynthetic Enzymes. [Chem Rev](#) 117, 5457–5520.

Riley, M.A. (1998). Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. [Annu Rev Genet](#) 32, 255–278.

Ríos Colombo, N.S., Chalón, M.C., Navarro, S.A., and Bellomio, A. (2018). Pediocin-like bacteriocins: new perspectives on mechanism of action and immunity. [Curr Genet](#) 64, 345–351.

Rogne, P., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., and Kristiansen, P.E. (2008). Three-dimensional structure of the two peptides that constitute the two-peptide bacteriocin lactococcin G. [Biochimica et Biophysica Acta \(BBA\) - Proteins and Proteomics](#) 1784, 543–554.

Ruhe, Z.C., Low, D.A., and Hayes, C.S. (2013). Bacterial contact-dependent growth inhibition (CDI). [Trends Microbiol](#) 21, 230–237.

Ruoff, K.L., Miller, S.I., Garner, C.V., Ferraro, M.J., and Calderwood, S.B. (1989). Bacteremia with *Streptococcus bovis* and *Streptococcus salivarius*: clinical correlates of more accurate identification of isolates. [J Clin Microbiol](#) 27, 305–308.

Rusniok, C., Couvé, E., Da Cunha, V., El Gana, R., Zidane, N., Bouchier, C., Poyart, C., Leclercq, R., Trieu-Cuot, P., and Glaser, P. (2010). Genome sequence of *Streptococcus gallolyticus*: insights into its adaptation to the bovine rumen and its ability to cause endocarditis. [J Bacteriol](#) 192, 2266–2276.

Russell, A.L., Kennedy, A.M., Spuches, A.M., Venugopal, D., Bhonsle, J.B., and Hicks, R.P. (2010). Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity. [Chem Phys Lipids](#) 163, 488–497.

Sabbaj, J., Sutter, V.L., and Finegold, S.M. (1971). Comparison of Selective Media for Isolation of Presumptive Group D Streptococci from Human Feces. [Appl Microbiol](#) 22, 1008–1011.

Salvadori, G., Junges, R., Morrison, D.A., and Petersen, F.C. (2019). Competence in *Streptococcus pneumoniae* and Close Commensal Relatives: Mechanisms and Implications. [Front Cell Infect Microbiol](#) 9, 94.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. [Phytochemistry](#) 30, 3875–3883.

Schlegel, L., Grimont, F., Ageron, E., Grimont, P.A.D., and Bouvet, A. (2003). Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. [Int J Syst Evol Microbiol](#) 53, 631–645.

Schleifer, K.H., and Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. [Int J Syst Evol Microbiol](#) 34, 31–34.

Schleifer, K.H., and Kilpper-Bälz, R. (1987). Molecular and Chemotaxonomic Approaches to the Classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: A Review. [Syst Appl Microbiol](#) 10, 1–19.

Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Bälz, R., Collins, M.D., and Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and Related Streptococci to the Genus *Lactococcus* gen. nov. [Syst Appl Microbiol](#) 6, 183–195.

Sears, C.L., and Garrett, W.S. (2014). Microbes, Microbiota and Colon Cancer. [Cell Host Microbe](#) 15, 317–328.

Shang, S., Hua, F., and Hu, Z.-W. (2017). The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. [Oncotarget](#) 8, 33972–33989.

Shanker, E., and Federle, M.J. (2017). Quorum Sensing Regulation of Competence and Bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and *mutans*. [Genes](#) (Basel) 8, 15.

Sherman, J.M. (1937). The Streptococci. [Bacteriol Rev](#) 1, 3–97.

Skovbjerg, H., Anthonsen, D., Lothe, I.M., Tveit, K.M., Kure, E.H., and Vogel, L.K. (2009). Collagen mRNA levels changes during colorectal cancer carcinogenesis. [BMC Cancer](#) 9, 136.

Son, M.R., Shchepetov, M., Adrian, P.V., Madhi, S.A., de Gouveia, L., von Gottberg, A., Klugman, K.P., Weiser, J.N., and Dawid, S. (2011). Conserved Mutations in the Pneumococcal Bacteriocin Transporter Gene, *blpA*, Result in a Complex Population Consisting of Producers and Cheaters. [MBio](#) 2. e00179-11

Spickler, A.R. (2005). Streptococcosis. 1-11.

Stackebrandt, E., and Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. [Microbiol Today](#) 8, 6–9.

Stearns, J.C., Simioni, J., Gunn, E., McDonald, H., Holloway, A.C., Thabane, L., Mousseau, A., Schertzer, J.D., Ratcliffe, E.M., Rossi, L., et al. (2017). Intrapartum antibiotics for GBS prophylaxis alter colonization patterns in the early infant gut microbiome of low risk infants. [Sci Rep](#) 7. 16527

Stein, T., Heinzmann, S., Solovieva, I., and Entian, K.-D. (2003). Function of *Lactococcus lactis* Nisin Immunity Genes *nisI* and *nisFEG* after Coordinated Expression in the Surrogate Host *Bacillus subtilis*. [J Biol Chem](#) 278, 89–94.

Stipp, R.N., Boisvert, H., Smith, D.J., Höfling, J.F., Duncan, M.J., and Mattos-Graner, R.O. (2013). CovR and VicRK Regulate Cell Surface Biogenesis Genes Required for Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. [PLoS ONE](#) 8, e58271.

Sun, Z., Zhong, J., Liang, X., Liu, J., Chen, X., and Huan, L. (2009). Novel Mechanism for Nisin Resistance via Proteolytic Degradation of Nisin by the Nisin Resistance Protein NSR. [Antimicrob Agents Chemother](#) 53, 1964.

Sun, Z., Wang, X., Zhang, X., Wu, H., Zou, Y., Li, P., Sun, C., Xu, W., Liu, F., and Wang, D. (2018). Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *J Ind Microbiol Biotechnol* 45, 213–227.

Sylvester, P.A., Myerscough, N., Warren, B.F., Carlstedt, I., Corfield, A.P., Durdey, P., and Thomas, M.G. (2001). Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer. *J Pathol* 195, 327–335.

Tagg, J.R. (1992). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria: An Opinion Regarding their Nature, Nomenclature and Numbers. In *Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics*, R. James, C. Lazdunski, and F. Pattus, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 33–35.

Tagg, J.R., Dajani, A.S., and Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40, 722–756.

Takala, T.M., and Saris, P.E.J. (2006). C terminus of NisI provides specificity to nisin. *Microbiology* (Reading) 152, 3543–3549.

Tapiainen, T., Koivusaari, P., Brinkac, L., Lorenzi, H.A., Salo, J., Renko, M., Pruikkonen, H., Pokka, T., Li, W., Nelson, K., et al. (2019). Impact of intrapartum and postnatal antibiotics on the gut microbiome and emergence of antimicrobial resistance in infants. *Sci Rep* 9, 10635.

Teese, M.G., and Langosch, D. (2015). Role of GxxxG Motifs in Transmembrane Domain Interactions. *Biochemistry* 54, 5125–5135.

Urushibara, T., and Hicks, R. (2013). Effect of Liposome Surface Charge and Peptide Side Chain Charge Density on Antimicrobial Peptide-Membrane Binding as Determined by Circular Dichroism. *J Membra Sci Technol* 3, 1–9.

Uteng, M., Hauge, H.H., Brondz, I., Nissen-Meyer, J., and Fimland, G. (2002). Rapid Two-Step Procedure for Large-Scale Purification of Pediocin-Like Bacteriocins and Other Cationic Antimicrobial Peptides from Complex Culture Medium. *Appl Environ Microbiol* 68, 952.

Van de Wiele, T., Van den Abbeele, P., Ossieur, W., Possemiers, S., and Marzorati, M. (2015). The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). In *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*, K. Verhoeckx, P. Cotter, I. López-Expósito, C. Kleiveland, T. Lea, A. Mackie, T. Requena, D. Swiatecka, and H. Wichers, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 305–317.

Van den Berghe, E., Skourtas, G., Tsakalidou, E., and De Vuyst, L. (2006). *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 produces the lantibiotic, macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture. *Int J Food Microbiol* 107, 138–147.

Voegele, A., Subrini, O., Sapay, N., Ladant, D., and Chenal, A. (2017). Membrane-Active Properties of an Amphitropic Peptide from the CyaA Toxin Translocation Region. *Toxins* (Basel) 9, 369.

Wang, J., Ma, H., Ge, X., Zhang, J., Teng, K., Sun, Z., and Zhong, J. (2014). Bovicin HJ50-Like Lantibiotics, a Novel Subgroup of Lantibiotics Featured by an Indispensable Disulfide Bridge. *PLoS ONE* 9, e97121.

Wang, T., Cai, G., Qiu, Y., Fei, N., Zhang, M., Pang, X., Jia, W., Cai, S., and Zhao, L. (2012). Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers. *ISME J* 6, 320–329.

Weinstein, M.R., Litt, M., Kertesz, D.A., Wyper, P., Rose, D., Coulter, M., McGeer, A., Facklam, R., Ostach, C., Willey, B.M., et al. (1997). Invasive Infections Due to a Fish Pathogen, *Streptococcus iniae*. *New Engl J Med* 337, 589–594.

Weisburger, J.H., Reddy, B.S., Narisawa, T., and Wynder, E.L. (1975). Germ-free status and colon tumor induction by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Proc Soc for Exp Biol Med* 148, 1119–1121.

Whitford, M.F., McPherson, M.A., Forster, R.J., and Teather, R.M. (2001). Identification of Bacteriocin-Like Inhibitors from Rumen *Streptococcus* spp. and Isolation and Characterization of Bovicin 255. *Appl Environ Microbiol* 67, 569–574.

Whitney, J.C., Peterson, S.B., Kim, J., Pazos, M., Verster, A.J., Radey, M.C., Kulasekara, H.D., Ching, M.Q., Bullen, N.P., Bryant, D., et al. (2017). A broadly distributed toxin family mediates contact-dependent antagonism between gram-positive bacteria. [ELife](#) 6. e26938.

Wholey, W.-Y., Kochan, T.J., Storck, D.N., and Dawid, S. (2016). Coordinated Bacteriocin Expression and Competence in *Streptococcus pneumoniae* Contributes to Genetic Adaptation through Neighbor Predation. [PLoS Pathogens](#) 12, e1005413.

Willett, J.L.E., Ruhe, Z.C., Goulding, C.W., Low, D.A., and Hayes, C.S. (2015). Contact-Dependent Growth Inhibition (CDI) and CdiB/CdiA Two-Partner Secretion Proteins. [J Mol Biol](#) 427, 3754–3765.

Wong, S.H., and Yu, J. (2019). Gut microbiota in colorectal cancer: mechanisms of action and clinical applications. [Nat Rev Gastroenterol Hepatol](#) 16, 690–704.

Worobo, R.W., Van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C., and Stiles, M.E. (1995). A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. [J Bacteriol](#) 177, 3143–3149.

Xiao, H., Chen, X., Chen, M., Tang, S., Zhao, X., and Huan, L. (2004). Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. [Microbiology](#) (Reading, England) 150, 103–108.

Xie, Z., Zou, Z., Raz, A., Qin, H., Fischetti, V., Zhang, S., Kreth, J., and Merritt, J. (2020). Regulatory control of the *Streptococcus mutans* HdrRM LytTR Regulatory System functions via a membrane sequestration mechanism. [Mol Microbiol](#) 114, 681–693.

Zimmermann, P., and Curtis, N. (2020). Effect of intrapartum antibiotics on the intestinal microbiota of infants: a systematic review. [Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed](#) 105, 201–208.

Zitvogel, L., Galluzzi, L., Viaud, S., Vétizou, M., Daillère, R., Merad, M., and Kroemer, G. (2015). Cancer and the gut microbiota: An unexpected link. [Sci Transl Med](#) 7, 271.

Zou, Z., Qin, H., Brenner, A.E., Raghavan, R., Millar, J.A., Gu, Q., Xie, Z., Kreth, J., and Merritt, J. (2018). LytTR Regulatory Systems: A potential new class of prokaryotic sensory system. [PLoS Genet](#) 14, e1007709.