ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUT OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Agriculture
Alimentation
Food
Biologie
Biology
Environnement
Environment
Santé
Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement

(AgroParisTech)

Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

Benoît THEVENARD

le 23 Septembre 2011

Implication des systèmes à deux composants dans les réponses de *Streptococcus thermophilus* à des changements environnementaux, dont la coculture avec *Lactobacillus bulgaricus*

Directeur de thèse : **Véronique MONNET**
Co-encadrement de la thèse : **Françoise RUL**

Jury

M. Ivan MIJAKOVIC	Président
Mme Nathalie LEBLOND-BOURGET	Rapporteur
M. Yannick AUFFRAY	Rapporteur
Mme Véronique MONNET	Examinateur
Mme Françoise RUL	Examinateur
M. Pascal FOURCASSIE	Examinateur

AgroParisTech
Nom de l'Unité de recherche
Adresse de l'Unité de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Nathalie Leblond-Bourget et Yannick Auffray de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail malgré les contretemps rédactionnels et de surcroît pendant la période des vacances d'été. Je remercie également Ivan Mijakovic d'avoir accepté d'être le président du jury et pour l'intérêt qu'il a manifesté pour le projet, notamment lors de ces précieux comités de thèse.

Je voudrais ensuite exprimer toute ma reconnaissance aux cinq femmes qui sont à mes yeux une référence scientifique : Véronique Monnet, Françoise Rul, Rozenn Gardan, Mireille Yvon et Marie-Pierre Chapot Chartier. Je pense sincèrement que vous pouvez être fières d'avoir su conjuguer carrière scientifique et vie familiale, en particulier mères de famille. Alors voilà sachez que j'ai beaucoup de respect pour vous toutes et je vous remercie encore de m'avoir convaincu de poursuivre en thèse l'aventure commencée plus tôt en master recherche.

Véronique, je ne te remercierais jamais assez pour ne pas m'avoir lâché aussi bien au début qu'en fin de thèse où mes facultés neuronales faisaient des siennes… C'est bien toi au départ qui m'as ramené au labo, alors que tout espoir de bourse était perdu ! Alors, merci pour la confiance que tu as placée en moi et la pugnacité dont tu as fait preuve pour me dénicher ce fameux contrat CIFRE en partenariat avec DANISCO. Quelle chance, moi qui voulait allier recherche fondamentale et monde industriel ! Si j'ai pu travailler avec Patrick Boyaval et Pascal Fourcassié, c'est uniquement parce qu'ils avaient confiance en toi et, adhéré au projet que toi et Françoise avaient dessiné. Merci de m'avoir fait confiance du début jusqu'à la fin et soutenu pendant ces années. Merci de m'avoir aussi confié des responsabilités plus collectives, me laisser conduire ce projet librement et surtout de ton indulgence lorsque je n'étais clairement pas au niveau… Merci aussi de m'avoir appris à structurer mes idées, à mieux valoriser mon travail même si j'ai encore largement du travail dans ce domaine tout comme celui des délais à respecter… Enfin et par dessus tout, j'ai apprécié ton management, ta faculté à enchainer les projets, les réunions, parfois stressantes, sans pour autant que cela rejaillisse sur nous les petits thésards. Enfin bref, Véronique tu l'as compris, je t'admire ; je pense que tu es un des plus beaux exemples prouvant que les femmes devraient être plus souvent mises à l'honneur tout en haut de la direction. Douceur, patience, humilité, esprit de synthèse et d'initiative, souvent des qualités qui font défauts aux hommes !

Je tiens tout particulièrement à remercier Françoise qui m'a encadré tout au long de ce projet. Je pense que tu m'as très bien cerné dès le début de notre rencontre en master et

je crois que si tout a plutôt bien marché entre nous pendant ces 4 années, c'est parce que notre relation était fondée sur une franche communication et une humilité de tous les instants. Françoise, tu es un peu ma chargé de recherche de mère, à la fois soucieuse et à l'écoute sans pour autant materner son petit thésard préféré. C'est vraiment une chance de pouvoir travailler avec quelqu'un qui vous considère comme un chercheur, qui prend en compte vos impressions et suggestions. Merci aussi d'avoir pris en compte mes attentes et ainsi de m'avoir laissé libre dans ma conduite du projet, en particulier des manipulations même si mes idées étaient parfois farfelues. Je me suis souvent perdu de passion dans la bibliographie (LDAP & REVELEC, la plus belle chose qui soit à l'INRA après le site en lui-même bien sûr !), dans l'analyse bioinformatique des génomes et je te suis reconnaissant de ne me l'avoir jamais reproché malgré souvent mon incapacité à retranscrire tout cela par écrit (ahhhh l'analyse des génomes, des voies métaboliques, de régulation, quelle magnifique mécanique, franchement nullement besoin d'avoir une Rolex pour être heureux !). Enfin bon, heureusement que je ne suis pas muet ; promis toujours à ta disposition pour te livrer mes élucubrations : c'est un bonheur à chaque fois de pouvoir en discuter avec toi ! Je te remercie également de ta patience et notamment de toutes les suggestions, corrections du manuscrit qui ont permis d'éclaircir un peu plus mes messages trop souvent confus… Grâce à toi, j'ai aussi appris à mettre de la couleur dans mes présentations, figures : tu as en quelque sorte déteint sur moi !
Merci également de m'avoir laissé encadré, « managé » et partager ma passion avec Caroline, Niriaina, Sandrine et Jérôme et surtout d'avoir pris le relais dans les derniers mois plus difficiles. Je leur suis également reconnaissant pour tout le travail accompli d'avoir été toujours solidaire, malgré les soucis techniques. J'ai pu ainsi me rendre compte que finalement, lâcher la paillasse a ses avantages : avoir la joie d'expliquer le projet, motiver les « troupes » mais aussi d'avoir plus de temps à consacrer à la bibliographie et prendre ainsi plus de recul sur les résultats, trouver d'autres idées enfin que du bonheur quoi ! Au-delà de tous ces aspects professionnels, je crois que tu le sais, mais comme on dit, il n'y a que les écrits qui restent, j'ai franchement beaucoup de respect pour toi. J'ai apprécié ta personnalité pleine d'humour et ton cœur si généreux ! C'était vraiment un plaisir de discuter avec toi de musique, gastronomie, d'éducation des enfants, de voyages ou de la vie plus simplement… En somme, je pense qu'on a formé une bonne équipe et j'espère que notre collaboration ne s'arrêtera pas trop brusquement… Encore merci pour tout !

Je tiens également à saluer plus généralement toute l'unité de m'avoir accepté tel que je suis malgré mon impatience, ce côté speed à courir après le temps (et le RER bien sûr), à calculer tout à la seconde (du moins pour les manipulations…) ce qui a pu en stresser plus d'un je pense. Alors je n'oublie surtout pas mes premiers collègues de

paillasse Stéphane et Christophe qui m'ont enseigné respectivement les bases de la biologie moléculaire et de la protéomique. Malgré une tendance parkinsonienne (et ça va pas en s'arrangeant malheureusement), vous avez su être patient et répondre à toutes mes interrogations techniques.

Je remercie tous les scientifiques du bâtiment, Mireille, Marie-pierre, Marie, Monique, Vincent, Stéphane, Rozenn mais aussi Muriel (du 440) pour vos encouragements et nos nombreux échanges scientifiques. Vos avis ont toujours été précieux et les réunions de labo à vos côtés particulièrement enrichissantes. J'en profite également pour remercier plus particulièrement Rozenn, Marie et Monique pour nos petites séances de psychologie « prise de recul et revalorisation de soi ». Y a encore du boulot mais ça avance !

Je tiens à remercier tous les thésards de l'unité pour leurs conseils et leur sympathie à commencer par ma petite Betty, sœurette de labo ! C'était vraiment sympa de pouvoir parler franchement de tout, d'avoir pu partager des moments ensemble et se soutenir pendant les congrès. Saches également que je reste à ta disposition en cas de pépins « psychologiques ». Je te souhaite à présent de poursuivre ta réussite et de continuer à prendre du plaisir à percevoir les mystères de la microbiologie mais franchement pour cela je ne me fais pas de soucis pour toi. Merci également à Leila de m'avoir accompagner et rassasié pendant la fin de thèse et je te souhaite également de réussir ta thèse et ton après mariage.

Mais je n'oublie pas les plus anciens thésards et thésardes : Liliana et Sybille, la force tranquille ! Karine, Mariam pour tous les conseils que vous m'avez donné pendant mon master. Omar jamais plaintif et toujours aussi jovial ainsi que Stathis pour sa bonne humeur que j'espère tu as conservé malgré la mauvaise passe économique que traverse ton pays la Grèce. Luciana comme moi fan de thermophilus, de m'avoir ouvert la voie sur ce beau sujet de thèse. Grand merci à Jasna pour son adorable petit accent venu des Balkans, pour son rire communicatif et pour sa gentillesse à mon attention. Merci également à Elvis pour ses conseils de clonage, les blagues « belges » à prendre au troisième degré et surtout la Duvel®, une merveille de bière !

Plus généralement, je remercie tout le personnel de l'unité mais aussi l'unité FLEC pour leur gentillesse et leur disponibilité à mon égard. Grand merci à ma petite Colette qui a bien fait de passer du côté de la paillasse. Je suis tellement heureux pour toi si tu savais. Merci pour ton excellent café et tes douces remarques à la Madame McCluskey. J'espère que tu ne m'oublieras pas pour ton pot de retraite ! Merci également à toutes les autres charmantes collègues du secrétariat Danielle, Isabelle (sympa d'avoir pu décompresser

avec toi au tennis), Yolande, Valérie, Laurence et Françoise Jubin pour votre dévouement et votre sympathie. Je remercie également Emilie, la douceur incarnée, pour son implication dans son travail et sa disponibilité. Mickael pour la bonne ambiance que tu as mis au labo et ta passion pour la plongée ! Je vous souhaite, à toi et à Sybille, de continuer à prendre votre pied aux Etats-Unis. Je remercie Christine pour m'avoir fait connaître ses adorables enfants. Céline pour ta jovialité dans ton travail. Sandeep pour m'avoir fait parlé anglais. Mylène, Sandrine et Christophe (notre PRI de compétition), encore merci pour la mise en forme du manuscrit et votre soutien moral. Didier, merci pour ton rire et ta bonne humeur ! J'ai aimé notre petite collaboration sur les données de LC-MS mais plus généralement merci vraiment pour ta gentillesse, ton plaisir à me charrier mais aussi à partager avec moi tes musiques préférées, tes lectures ou films de Clint Eastwood !

Pour finir sur mes compagnons de JOUY, un grand bravo à vous tous d'avoir tenu malgré mon fort penchant à parler de sport à la moindre perche tendue. Merci donc à Stéphane d'avoir partagé cela avec moi et Christophe et Pascal d'avoir supporté ma conduite Jean Alésienne sur les pistes de karting ! A fond, à fond, à fond ! Je n'oublie pas également mes partenaires de tennis Hervé, Bernard, Vincent, Isabelle et surtout Alain avec qui on peut parler des heures aussi bien de protéomique que de technique tennistique ! Un vrai bonheur qui va aussi me manquer…

Je remercie également tous mes collègues de DANISCO à commencer par Pascal et Patrick, de supers BOSS très compréhensifs avec qui j'ai passé de bons moments au téléphone ou lors des comités de thèse. J'aurai aimé apporter plus en terme d'applications à la société mais on ne choisit pas. Je me console en me disant que finalement mon travail suit le credo de DANISCO « First you add knowledge ». En tout cas, je vous remercie de m'avoir laissé beaucoup de liberté et permis de connaître toutes les personnes formidables qui travaillent à Dangé saint romain que malheureusement je ne pourrais pas tous citer (il y en a tellement). Un grand merci quand même à Christian, Elvire, enfin toute l'équipe culture et développement qui m'a super bien accueilli.

Enfin et par-dessus tout je remercie ma famille et tous mes amis pour leur soutien. J'ai la chance d'avoir des parents merveilleux, un frère qui va bientôt me rendre tonton et surtout deux magnifiques petites sœurs qui sont mes plus fidèles complices. Je pensais qu'en grandissant, le plaisir allait s'estomper avec les « désirs de la jeunesse » mais en fait il ne fait que se renforcer jour après jour. Je remercie donc mes parents de m'avoir donné tout cela et enseigné l'humilité, qualité la plus importante qui soit pour moi dans ce monde et qu'une simple bactérie, *S. thermophilus* s'est amusé à me le rappeler !

LISTE DES ABREVIATIONS

aa: acide aminé

ABC: ATP Binding Cassette

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messager

Asp: acide aspartique

ATP: adénosine tri-phosphate

BSA: sérum albumine bovine

CDS: coding sequence (régio codante)

DEPC: diéthyl pyrocarbonate

dNTP: désoxyribonucléotide

DTT: dithiothreitol

His: histidine

HK: histidine kinase

HPT: protéine transmetteur de phosphate à histidine

kDa: kiloDalton

L. bulgaricus: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*

MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight

MCD: milieu chimiquement défini

ORF: open reading frame (phase ouverte de lecture)

pb: paire de bases

PCR: Polymerase Chain Reaction

RT: reverse transcription

RNase : ribonuclease

RR: régulateur de réponse

SDS: sodium dodécil sulfate

ssp. : sous-espèce

S. thermophilus : *Streptococcus thermophilus*

Tris: tris-(hydrométhyl)aminométhane

UFC: unité formant colonie

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 4

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 6

1) Présentation générale de *Streptococcus thermophilus* 6
1.1) Taxonomie 6
1.2) Utilisation industrielle de *Streptococcus thermophilus* 8
1.3) Une bactérie adaptée au lait 9
1.4) Interaction avec *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus (L. bulgaricus)* 13
1.5) Capacités générales de résistance aux stress 14

2) Mécanismes généraux d'adaptation à l'environnement par des régulateurs transcriptionnels 16
2.1) Les systèmes à un composant ou facteurs de transcription 17
2.2) Les systèmes à deux composants 18
2.3) Les systèmes à multiples composants 18

3) Structures des TCS et modulation de leur activité 20
3.1) Structure des RR 20
3.1.1) Structure et rôle du domaine receveur REC 20
3.1.2) Structure et rôle du domaine effecteur 21
3.2) Structure des HK 24
3.2.1) Principaux domaines des HK 25
3.3) Modulation de l'activité d'un TCS 26
3.3.1) Transmission du signal HK-RR 26
3.3.2) Régulation de l'activité du TCS 28

4) Diversité des fonctions contrôlées par les TCS 31
4.1) TCS répondant aux stimuli physiques 31
4.1.1) Osmolarité (OmpR/EnvZ) 31
4.1.2) Température (DesR/DesK) 32
4.1.3) Photodétection (LovR/LovK) 33
4.1.4) Radiorésistance (DrrA/DrrK) 34
4.2) TCS répondant aux stimuli chimiques 35
4.2.1) Détection de dihydrogène chez *Ralstonia eutropha* (système Hox) 35
4.2.2) Réponse aux nitrates et nitrites chez *E. coli* (systèmes Nar) 35
4.3) TCS répondant à des peptides 37
4.3.1) Quorum sensing et système Agr contrôlant la virulence chez *S.aureus* 37
4.3.2) Régulation de la production de bactériocines par des TCS 38
4.4) Des exemples de TCS répondant à des stimuli multifactoriels 40
4.4.1) Système PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica* 40
4.5) Conclusion 43

5) Grandes fonctions régulées par les TCS des streptocoques…….…….45

5.1) TCS impliqués dans la virulence des streptocoques pathogènes 44
5.1.1) CovR, régulateur global des facteurs associés à la virulence 44
5.1.2) TrxR/S, système de virulence contrôlé par CovR 46
5.1.3) FasBCAX, système régulateur de l'adhérence aux cellules épithéliales 46
5.1.4) Ihk/ Irr, système contournant le système immunitaire 46
5.1.5) SilA/B, système impliqué dans la virulence 47
5.2) TCS impliqués dans la physiologie générale bactérienne 47
5.2.1) CiaR/H et compétence 47
5.2.2) WalR/H et métabolisme de la paroi 49
5.3) TCS contribuant à l'adaptation des streptocoques à leur niche écologique 49
5.3.1) Rel/RS ou Spt/RS : adaptation à la salive 49
5.3.2) BfrA/B : formation de biofilms 51
5.3.3) LevR/S : métabolisme des sucres 51
5.3.4) BceABRS : résistance à la bacitracine 52
5.3.5) le locus Blp de *S. thermophilus* : production d'une bactériocine 53

RESULTATS EXPERIMENTAUX 54

CHAPITRE 1 : Caractérisation générale des TCS de S. thermophilus LMD-9 54

1) Analyse *in silico* 54
1.1) Les TCS de la famille des *Streptococcacae* 54
1.1.1) Introduction à l'analyse 54
1.1.2) Démarche employée 55
1.2) Place des RR de *S. thermophilus* au sein des *Streptococaceae* 63
1.2.2) TCS01 64
1.2.3) TCS02 64
1.2.4) TCS04 65
1.2.5) TCS05 65
1.2.6) TCS06 68
1.2.7) TCS07 68
1.2.8) TCS08 68
1.2.9) TCS09 69

2) Caractérisation générale des TCS de *S. thermophilus* LMD-9 70
2.1) Expression des *rr* 70
2.2) Inactivation des *rr* 70
2.3) Cinétique d'acidification des mutants Δ*rr* 71

3) Article « Characterization of *Streptococcus thermophilus* two-component systems: *in silico* analysis, functional analysis and expression of response regulator genes in pure or mixed culture with its yogurt partner, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* » 73

CHAPITRE 2 : Caractérisation du TCS06 de S. thermophilus LMD-9……85

1) Matériel et méthodes.....86
1.1) Souches bactériennes, plasmides et milieux de culture......86
1.2) Construction de différents mutants du locus TC06 chez la souche LMD-9 de *S. thermophilus*.....86
1.3) Construction de fusions transcriptionnelles rapportrices à activité luminescente.....87
1.4) Méthode de mesure de l'activité luciférase......88
1.5) Electrophorèse monodimensionnelle suivie d'une analyse chromatographique en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (SM) en tandem (LC/MS/MS).....88
1.6) Extraction d'ARN et analyses RT-PCR quantitative.....89

2) Résultats.....90
2.1) Analyse transcriptomique des gènes du locus TCS06.....90
2.2) Etude du régulon du TCS06 : analyse protéomique.....92
2.3) Implication du locus TCS06 dans la résistance à la bacitracine.....95
2.4) Confirmation des gènes régulés par RR06 par analyse transcriptomique.....95

3) Discussion et proposition d'un modèle de régulation.....96

CHAPITRE 3 : Discussion et perspectives.....99

1) Les régulateurs de réponse sont-ils essentiels à la physiologie de *S. thermophilus* LMD-9 ?.....99

2) Comment un TCS devient-il actif ?.....103

3) Que sait-on de la taille des régulons des TCS ?.....105

4) Les TCS de *S. thermophilus* perçoivent-ils la présence de *L. bulgaricus* ?.....106

5) Qu'implique le fait que RR06 module la voie de biosynthèse des RGP ?.....132

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....111

Annexe 1: Souches bactériennes et plasmides utilisés.....130

Annexe 2: Oligonucléotides utilisés pour la construction des mutants, des fusions transcriptionnelles et pour la RT-PCR quantitative.....131

INTRODUCTION GENERALE

L'industrie agroalimentaire utilise nombre de bactéries lactiques pour élaborer des aliments fermentés. Les bactéries lactiques forment un groupe hétérogène rassemblant des bactéries capables de produire de l'acide lactique par fermentation et les procédés enzymatiques accompagnant leur développement influencent les qualités organoleptiques et la préservation de nombreux aliments. Les différentes applications des bactéries lactiques en agroalimentaires reposent principalement sur l'utilisation des genres *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Oenococcus et Streptococcus*. Ces bactéries lactiques, occupant des niches écologiques variées, sont constamment soumises à des fluctuations extérieures (variation quantitative et qualitative des paramètres physico-chimiques environnants) et doivent en conséquence y répondre efficacement et rapidement afin de pouvoir survivre et se développer.

Un des enjeux de la recherche actuelle pour les industries agroalimentaires consiste à mieux comprendre et favoriser la capacité de réponse et d'adaptation des bactéries lactiques à ces variations afin d'optimiser leur performance dans les applications industrielles. Ainsi, une meilleure compréhension de leurs schémas de régulation permettrait de contrôler, prédire ou modifier le comportement des bactéries lactiques dans des conditions environnementales données.

Ces dernières années, beaucoup de publications ont montré l'implication des systèmes à deux composants (TCS), composés typiquement d'une histidine kinase (HK) associée à un régulateur de réponse (RR), pour percevoir et répondre efficacement à de tels changements environnementaux. Par exemple, le système CovRS est impliqué dans la régulation de la réponse générale aux stress et dans la virulence des souches de streptocoques pathogènes. Néanmoins, jusqu'à maintenant, l'essentiel des études concernant les TCS a porté sur des souches pathogènes avec une attention plus particulière sur leur lien avec la virulence. Parmi le genre *Streptococcus, Streptococcus thermophilus* est atypique dans le sens où cette espèce est non pathogène et largement utilisée dans l'industrie laitière. En tant que ferment lactique de choix, *Streptococcus thermophilus* doit faire face aux contraintes de son environnement, quelles soient de nature biotiques ou abiotiques.

Ainsi, cette thèse s'inscrit dans cet effort essentiel qui nous permettra de mieux appréhender les phénomènes de régulation résultant des changements environnementaux que rencontre la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus*, en particulier la souche LMD-9. Les systèmes à deux composants constituant un des mécanismes principaux de l'adaptation des bactéries à des changements d'environnement, nous avons trouvé pertinent d'évaluer la contribution de chacun des 8 TCS de *S. thermophilus* LMD-9 à son fonctionnement physiologique en lait. Pour répondre à cette problématique, le présent manuscrit s'organise en trois chapitres.

Nous commencerons dans le premier chapitre par une revue bibliographique présentant succinctement *S. thermophilus* et son adaptabilité à la niche écologique laitière. Puis nous verrons plus généralement quels sont les types de systèmes génétiques qu'utilisent les bactéries pour s'adapter à leur environnement et pourquoi s'intéresser aux systèmes à deux composants. De nombreux exemples tirés du monde microbien seront donnés à cet effet avant de se focaliser plus particulièrement sur l'information bibliographique disponible sur les TCS des streptocoques.

La deuxième partie rassemblera quant à elle l'ensemble des résultats expérimentaux portant sur les TCS de *S. thermophilus*. On s'attachera dans un premier temps à replacer les TCS de *S. thermophilus* dans le contexte d'une analyse *in silico* globale de l'ensemble des TCS appartenant à la famille des Streptococcaceae qui contient les genres *Streptococcus* et *Lactococcus*. Puis nous présenterons notre étude de caractérisation générale des TCS de la souche LMD-9, cette partie s'achevant par la valorisation de ce travail au travers d'une publication dans « International Journal of Food Microbiology ». Enfin, nous présenterons des résultats et des perspectives découlant de notre étude portant sur le sixième TCS de *S. thermophilus* LMD-9 dont les fonctions n'ont jamais pu être mises en évidence auparavant même chez les plus proches orthologues.

Pour finir, une troisième partie discutera de l'ensemble des points et apports de cette thèse et des perspectives qui en découlent.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1) Présentation générale de *Streptococcus thermophilus*

1.1) Taxonomie

Streptococcus thermophilus est une bactérie lactique thermophile appartenant à la famille des *Streptococcaceae* comportant deux genres phylogénétiquement très proches : *Streptococcus* et *Lactococcus*. D'un point de vue génomique, 70 souches (génomes complets publiés au 1er juin 2011), sont référencées au sein de cette famille où l'on peut distinguer des espèces pathogènes de l'homme (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae*) ou de l'animal (*Streptococcus suis, Streptococcus equi*), d'autres espèces commensales de la bouche et pathogènes opportunistes (*Streptococcus salivarius, Streptococcus vestibularis, Streptococcus mitis, Streptococcus mutans, Streptococcus sanguinis* et *Streptococcus gordonii)* et enfin des espèces non pathogènes et largement utilisées dans l'industrie laitière avec notamment *Streptococcus thermophilus* et *Lactococcus lactis*.

Les caractères communs que partage cette famille sont une morphologie en coques à Gram positif de 0,5 à 1 μm de diamètre, présentant un groupement typique en diplocoques ou en chaînettes de longueur variable, immobiles, dépourvus de spores et rarement capsulés. Toutes ces espèces utilisent la voie fermentaire de dégradation des sucres simples et sont par ailleurs dépourvues de catalase.

La classification originelle des espèces de streptocoques est assez complexe car pour des raisons historiques, elle a été a effectuée au départ sur la base de différences macroscopiques de pouvoir hémolytique des espèces (système Lancefield) qui ont été rapprochées à des différences immmunologiques de polysaccharides de paroi (groupes A, B, C, F et G) ou d'acides lipotéchoïques (groupe D) (Facklam, 2002). Cette classification, encore utilisée en microbiologie clinique, présente des inconvénients. En effet, par exemple *S. pyogenes*, auquel on associe souvent l'attribut GAS pour « Groupe A *Streptococcus* » n'est finalement pas le seul streptocoque à posséder l'antigène A puisque *S. anginosus* ou *S. dysgalactiae equisimilis* l'expriment également. De plus, il n'est pas rare qu'une souche donnée puisse porter en même temps plusieurs antigènes (Facklam,

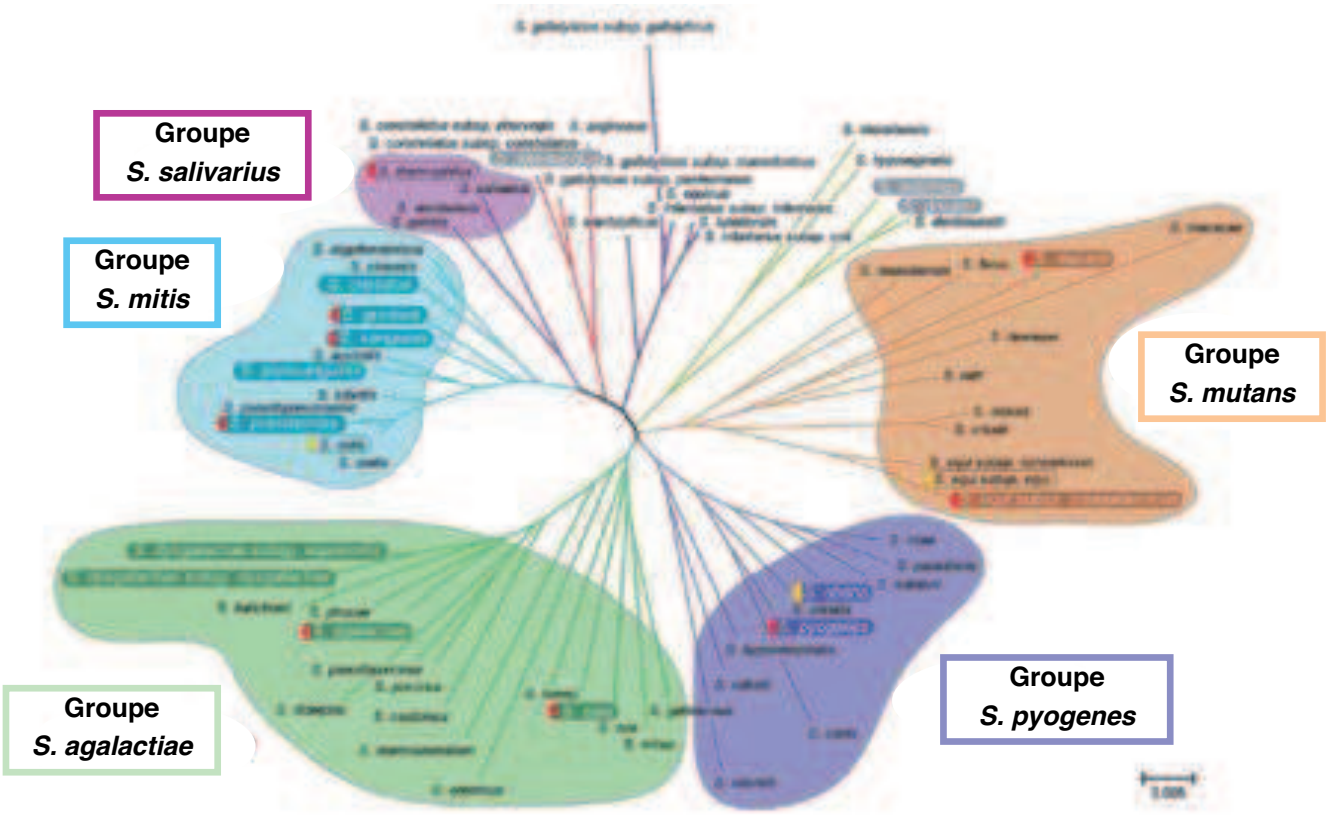


Figure 1: Arbre phylogénétique proposé pour les streptocoques basé sur la conservation de l'ARNr 16S.

Moschioni *et al.*, 2010

Les génomes surlignés en couleur sont ceux où des adhesines ont été décrites. Les espèces pour lesquelles un ou plusieurs génomes complets sont disponibles sont marquées par un demi-cercle, rouge si la séquence a été récupérée à partir du site NCBI et jaune à partir du Sanger Institute ou du J.C. Venter Institute.

2002). Il n'est donc pas évident de classer facilement les souches de streptocoques par cette méthode et particulièrement les streptocoques non béta-hémolytiques.

Avec les avancées méthodologiques, des classifications sur la base de typage moléculaire ont vu le jour et permis d'établir plus solidement les relations phylogénétiques entre les espèces. Ainsi, une analyse récente, basée sur les séquences de l'ARN 16S a permis d'identifier 5 groupes majeurs appartenant au genre *Streptococcus* (Moschioni *et al*., 2010): *S. mitis, S. mutans, S. salivarius*, *S. agalactiae et S. pyogenes* (Figure 1). Cette classification présente l'atout non négligeable qu'elle est quasi parfaitement corrélée avec le potentiel pathogénique des souches ainsi qu'avec leur niche écologique préférentielle (Kawamura *et al*., 1995). La seule exception concerne le groupe *mitis* qui contient *S. pneumoniae*, pathogène avéré, parmi d'autres espèces commensales des voies respiratoires hautes telles que *S. mitis, S. oralis* ou encore *S. infantis*.

Selon la dernière classification, *S. thermophilus* appartient au groupe *salivarius* qui comprend aussi les espèces *S. salivarius, S. vestibularis et S. peroris*. *S. thermophilus* est une bactérie homofermentaire stricte, microaérophile et dont la température optimale de croissance est de 42°C (selon les souches de 37 à 42°C). Les souches de *S. thermophilus* ont été isolées à partir d'environnements laitiers, mais quelques souches pourraient provenir de plantes (Michaylova *et al*., 2007).

Afin de mieux associer les isolats atypiques, d'identifier d'éventuelles espèces nouvelles et de mieux discriminer les espèces très proches en terme de séquences d'ARNr 16S, des travaux récents proposent des alignements de séquences à partir de séquences concaténées de gènes conservés (MLST) associés à une analyse de la présence de gènes de virulence spécifiques. Ainsi par exemple, la diversité génétique de 27 souches de *S. thermophilus* isolées à partir de différentes sources laitières a été déterminée. Grâce à la technique de MLST basée sur la variation de la séquence des nucléotides de 8 gènes de ménage (*ilvC*, *pepO*, *pyrE*, *grcK*, *ddlA*, *thrS*, *dnaE* et *tkt*), il a été démontré une très faible divergence des séquences entre les souches de *S. thermophilus* (en moyenne 0,19%), qui suggère que cette espèce représente une population qui a émergé récemment (Delorme *et al*., 2007). En effet, le même type d'analyse effectuée sur 22 souches de *S. salivarius* et 9 souches de *S. vestibularis* isolées à partir de la cavité orale et du sang humain, montre une divergence de séquences intra-espèces plus importante (6,6% et 3,6%, respectivement). Il convient néanmoins de nuancer ces résultats du fait du biais de sélection des souches, beaucoup plus important pour *S. thermophilus* car provenant quasiment toutes du même environnement laitier et sélectionnées par l'industrie laitière pour les mêmes fonctions.

1.2) Utilisation industrielle de *Streptococcus thermophilus*

S. thermophilus est le seul streptocoque présentant un intérêt industriel au sein du genre *Streptococcus*. Il est d'ailleurs également le seul dans son genre reconnu comme GRAS (Generally Recognized As Safe). Les autres espèces du groupe *salivarius* sont des bactéries commensales de la cavité orale et du tractus gastro-intestinal. Les espèces du sous-groupe *salivarius* étaient considérées comme non pathogènes jusqu'à l'implication récente de *S. vestibularius* et *S. salivarius* dans des cas d'endocardite et de méningite (Doyuk *et al*., 2002; Idigoras *et al*., 2001); seul *S. thermophilus* n'a pas été impliqué, jusqu'à présent, dans des maladies infectieuses. Le séquençage complet des génomes de 4 souches de *S. thermophilus* et leur analyse révèlent l'absence ou l'inactivation des gènes liés à la virulence chez les streptocoques pathogènes (Bolotin *et al*., 2004; Makarova *et al*., 2006; Sun *et al*., 2011).

En plus de son usage traditionnel en culture mixte avec *Lactobacillus bulgaricus* pour la fabrication de yaourt, *S. thermophilus* est utilisé pour produire nombre de fromages tels que l'Emmental, le Parmesan, le Provolone, la Mozzarella et l'Asiago (Parente & Cogan, 2004). On l'utilise aussi depuis peu pour la production de fromages de type Cheddar en combinaison avec d'autres ferments mésophiles (Awad *et al*., 2005). Au final, *S. thermophilus* joue donc son rôle essentiel de ferment dans l'industrie laitière dans la fabrication de produits laitiers dont la valeur économique est supérieure à 300 milliards de dollars par an (Datamonitor's Dairy: Global Industry Guide, Datamonitor, 2010), les français consommant à eux seuls plus d'un million et demi de tonnes de yaourts et laits fermentés chaque année (L'économie laitière en chiffres, CNIEL, 2010).

L'un des rôles principal joué par *S. thermophilus* en industrie laitière est de garantir une acidification rapide du lait lors de la fermentation lactique. Cette vitesse d'acidification dépendra bien sûr de la souche utilisée, de sa vitesse de production de lactate mais aussi de son potentiel génétique par rapport au système protéolytique (Courtin *et al*., 2002) et à l'activité uréasique (Juillard *et al*., 1988; Monnet *et al*., 2004; Mora *et al*., 2004). Toutefois, l'utilisation de *S. thermophilus* ne repose pas uniquement sur la production d'acide lactique mais également à des niveaux moindres de formate, d'acétoïne, de diacétyle et d'acétaldéhyde qui participent également à la flaveur du produit fini. D'autres aspects technologiques importants tels que la production d'exopolysaccharides (EPS) ou de bacteriocines dépendent également du potentiel génétique de la souche employée.

1.3) Adaptation au lait

Les génomes de quatre souches de *S. thermophilus*, la souche CNRZ1066, la souche LMG18311, la souche LMD9 et la souche ND03 ont été séquencés (Bolotin *et al*., 2004; Makarova *et al*., 2006; Sun *et al*., 2011). Ces génomes sont très similaires, les deux génomes des souches CNRZ1066 et LMG18311 étant les plus proches. Leur chromosome est unique et circulaire et d'une taille d'environ 1,8 Mb, avec un pourcentage en bases G + C de 39%. Chacun de ces génomes code approximativement 1900 CDS dont plus de 90% sont identiques entre les deux souches. Les différences principales concernent les gènes impliqués dans la biosynthèse de polysaccharides extracellulaires (*eps*, *rgp*), la synthèse d'une bactériocine et les gènes d'immunité associés (Bolotin *et al*., 2004). Les analyses comparatives des deux génomes des souches CNRZ1066 et LMG18311 ont montré que 80% des gènes de *S. thermophilus* sont des orthologues de gènes d'autres streptocoques, ce qui confirme bien la proximité génétique existant entre les différentes espèces de streptocoques (Hols *et al*., 2005).

L'évolution de *S. thermophilus* par la perte de gènes, notamment ceux reconnus comme importants pour le pouvoir pathogène de *S. pneumoniae* ou *S. pyogenes*, est reflétée par la présence de ces gènes sous une forme non fonctionnelle (pseudogènes) ou par leur absence dans les génomes connus. La proportion relativement élevée (10-11%) des gènes de *S. thermophilus* correspondant à des pseudogènes, pourrait résulter de l'adaptation de *S. thermophilus* à l'environnement laitier. Ces pseudogènes sont, entre autres, homologues à des gènes impliqués dans le métabolisme carboné, dans le transport et la régulation.

Même s'il est certain que l'évolution du génome de *S. thermophilus* s'est traduite par la perte d'un grand nombre de gènes, de nouveaux gènes peuvent être acquis par transfert horizontal et contribuent aussi à l'adaptation du génome à sa niche écologique. On dénombre ainsi chez cette bactérie plus de 50 séquences d'insertion dont les pourcentages en GC présentent une déviation évidente par rapport au reste du génome. Par exemple, une portion du génome de *S. thermophilus* provient vraisemblablement de *L. bulgaricus* puisqu'elle contient le gène *metC* qui lui est identique à 95% (Bolotin *et al*., 2004). Ce gène est impliqué dans la biosynthèse de la méthionine, un acide aminé faiblement présent dans le lait. Ceci suggère que l'utilisation conjointe des souches de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* pour la fabrication des yaourts pourrait conduire à des transferts horizontaux comme le montre une étude plus récente. Celle-ci montre qu'un groupe de gènes (*cbs-cblB*/*cglB-cysE*) impliqués dans le métabolisme des acides aminés soufrés a été

probablement transféré du lactobacille au streptocoque ainsi que deux autres groupes de gènes impliqués dans la production de polysaccharides (Liu *et al*., 2009). Enfin, une autre équipe a montré que des souches de *S. thermophilus* isolées de fromages traditionnels italiens ont acquis la résistance à la tétracycline via des éléments génétiques mobiles (Rizzotti *et al*., 2009). Ainsi, il semblerait que les espèces bactériennes proches phylogéniquement et appartenant à la même niche écologique, naturellement ou du fait de leur utilisation technologique, puissent s'échanger des gènes par transfert horizontal. L'évolution du génome de *S. thermophilus* repose sur trois mécanismes principaux lui permettant de moduler l'intégration de nouveaux éléments génétiques : sa capacité de transformation via la compétence naturelle, la conjugaison par l'intermédiaire d'éléments intégratifs et conjugatifs (ICEs) et enfin l'existence une certaine immunité contre les virus et plasmides étrangers avec les séquences CRISPR (clustered regularly interspaced short palindrimic repeats).

Récemment, *S. thermophilus* a été démontré comme étant naturellement compétente c'est-à- dire capable d'acquérir de l'ADN étranger (Blomqvist *et al*., 2006; Fontaine *et al*., 2010; Gardan *et al*., 2009). Pour les streptocoques en général, l'étape clé du développement de la compétence réside en l'induction du facteur sigma alternatif σ^X ou *comX*. Celui-ci contrôle positivement les gènes requis pour les mécanismes permettant la transformation bactérienne et la recombinaison homologue (Johnsborg and Havarstein, 2009). Chez *S. thermophilus*, on sait depuis peu que l'induction de ComX repose sur l'activation d'un système de type quorum-sensing impliquant le régulateur transcriptionnel ComR et sa phéromone peptidique ComS. Actuellement, nous savons que ComS est sécrétée, maturée et réimportée à l'intérieur de la cellule par le transporteur d'oligopeptide Ami/Opp pour finalement interagir et activer ComR qui peut ainsi se fixer sur le promoteur de *comX*. Nous savons également que l'addition de l'heptapeptide synthétique correspondant à la partie C-terminale de ComS est suffisante pour activer le système ComRS (Fontaine *et al*., 2010; Gardan *et al*., 2009). Ainsi ce système original ComRS est à la base de l'acquisition potentielle de nouveaux éléments génétiques.

Un autre élément génétique contribuant à l'acquisition de nouveaux gènes dans le génome de *S. thermophilus* est la présence de transposons notamment les ICEs (integrative conjugative elements), des îlots génomiques capables de s'exciser et de s'intégrer par recombinaison site-spécifique (Burrus *et al*., 2000; Guedon *et al*., 2000; Pavlovic *et al*., 2004). Depuis peu, il a été démontré que ces deux éléments intégratifs conjugatifs ICESt1 et ICESt3 se transféraient par conjugaison vers d'autres souches de *S. thermophilus*,

d'autres bactéries lactiques telles que *L. lactis* (Bellanger *et al*., 2009) ainsi que des bactéries pathogènes opportunistes telles que *S. pyogenes* et *Enteroccus faecalis*. Ceci suggère que ces îlots génomiques pourraient jouer un rôle majeur dans les échanges de gènes entre *S. thermophilus* et les autres espèces bactériennes présentes en milieu laitier.

Enfin, comme nombre de bactéries, il existe chez *S. thermophilus* un mécanisme de défense ciblant la multiplication des phages empêchant ainsi indirectement l'incorporation de gènes supplémentaires. En effet, son génome contient une structure dite CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), composée de répétitions de 36 bp, entrecoupées de régions appelées «spacers» qui proviennent d'ADN extrachromosomique et qui généralement suivent une série de quatre gènes *cas* (CRISPR-associated), nommés *cas*5, 1, 2 et 7 (Horvath *et al*., 2008). L'acquisition de ces spacers n'est pas sans effet car elle est directement reliée à une immunité contre le phage auquel appartient l'ADN du spacer. Ces CRISPR sont donc en quelque sorte la trace des invasions d'une bactérie par des éléments extrachromosomiques mais surtout confèrent aux bactéries qui les portent une immunité contre ces éléments (Barrangou *et al*., 2007). Les mécanismes moléculaires régissant ce véritable « système immunitaire » bactérien sont toujours à l'étude aujourd'hui et les perspectives en industrie laitière nombreuses, l'augmentation de l'immunité des souches de bactéries lactiques industrielles contre les phages dépendant de l'optimisation des loci CRISPR.

Toutes ces adaptations génomiques se répercutent à l'échelle physiologique. Ainsi *S. thermophilus* est particulièrement bien adaptée à la croissance en présence de lactose, la principale source de carbone du lait et le convertit rapidement en lactate par fermentation. Le lactose est transporté à l'intérieur de la cellule par une perméase à lactose LacS particulièrement efficace (Foucaud and Poolman, 1992). Une fois transporté à l'intérieur de la cellule, le lactose est hydrolysé par une beta-galactosidase en glucose et galactose. Dès lors, la majorité des souches de *S. thermophilus* métabolise uniquement le glucose alors que le galactose est excrété dans le milieu (Hutkins *et al*., 1985). On notera toutefois qu'en fin de croissance dans le lait ou après le passage dans le tractus digestif où les conditions de croissance sont plus difficiles (Rul *et al*., 2011), il utilise probablement le galactose dans la mesure où cette voie du métabolisme avait déjà été démontrée chez la souche LMG18311 comme induite lors de l'ultime phase de croissance en lait (Herve-Jimenez *et al*., 2008).

L'importance des voies de biosynthèse des acides aminés pour la croissance en lait de *S. thermophilus* est clairement établie (Hols *et al*., 2005) mais plus particulièrement

celle concernant les acides aminés branchés qui constitue un facteur clé permettant la croissance optimale de *S. thermophilus* dans le lait (Garault *et al*., 2000; Herve-Jimenez *et al*., 2008). Puisque le lait est relativement pauvre en acides aminés libres et en peptides mais riche en caséines (80% des protéines du lait), *S. thermophilus* doit à la fois hydrolyser les caséines, puis transporter et dégrader les peptides ainsi générés. Afin d'hydrolyser ces caséines, la plupart des bactéries lactiques possède une protéase ancrée à la paroi dont l'activité est variable selon les souches. Dans le cas de *S. thermophilus*, cette fonction est assurée par la protéase PrtS, qui lorsque elle est présente, permet à la bactérie de satisfaire à ses exigences nutritionnelles et d'atteindre une population maximale en lait dix fois plus importante que les souches n'en possédant pas (Courtin *et al*., 2002; Fernandez-Espla *et al*., 2000; Garault *et al*., 2002; Letort *et al*., 2002).

Pour ce qui est du transport proprement dit des peptides issus de la dégradation des caséines, l'analyse des génomes montre que *S. thermophilus* en possède plusieurs qui pourraient assurer cette fonction mais qui restent à caractériser. Seul le système Ami a été démontré comme transporteur d'oligopeptides allant de 3 à 23 acides aminés (Garault *et al*., 2002). Par ailleurs, *S. thermophilus* possède une vingtaine de peptidases intracellulaires lui permettant de dégrader ces peptides en acides aminés (Fernandez-Espla *et al*., 2000; Rul and Monnet, 1997; Thomas *et al*., 2010).

Plus récemment, une analyse protéomique comparative de la croissance de *S. thermophilus* en milieu M17 et en lait a montré une augmentation des quantités de protéines telles que la pyruvate formate lyase contribuant indirectement à la synthèse de purines, composés connus aussi pour être limitants dans le lait, mais aussi d'autres protéines impliquées dans la synthèse des purines (Derzelle *et al*., 2005). Cette étude confirme par ailleurs l'augmentation d'enzymes impliqués dans la synthèse d'acides aminés lorsque *S. thermophilus* est cultivé en lait (Garault *et al*., 2000).

Enfin, une étude de la physiologie de *S. thermophilus* au cours de sa croissance en lait combinant à la fois protéomique et transcriptomique confirme bien cette activation des voies d'assimilation des composés azotées et de biosynthèse des acides aminés et révèle également une diversification des voies d'assimilation des sucres en phase stationnaire (Herve-Jimenez *et al*., 2008). Ainsi, les éléments présentés ici montrent que *S. thermophilus* est particulièrement bien adaptée pour se développer dans le lait.

1.4) Interaction avec *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (L. bulgaricus)*

Beaucoup de produits alimentaires sont fermentés à partir de cultures mixtes comprenant des bactéries, des levures ou des champignons filamenteux. C'est particulièrement le cas des produits contenant *S. thermophilus* qui n'est jamais utilisé seul mais dans des écosystèmes plus ou moins complexes. Ainsi par exemple la fabrication du yaourt nécessite, de part la législation française, une fermentation effectuée par les deux bactéries lactiques *S. thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Durant la fermentation du lactose, les deux espèces contribuent à l'acidification, à la texture et à la flaveur du produit fini en produisant des exopolysaccharides et des composés aromatiques comme l'acétaldéhyde. Bien que les deux espèces soient capables de se développer individuellement dans le lait, il a été démontré que celles-ci voyaient leur croissance et leur production d'acide stimulées lorsqu'elles étaient associées. Ce phénomène est appelé proto-coopération et s'explique par la mise en place d'échanges nutritionnels entre les deux espèces. Comme énoncé précédemment, le lait contient peu d'acides aminés libres et toutes les souches de *S. thermophilus* ne possèdent pas la protéase de paroi PrtS. Ainsi, les souches de *S. thermophilus* dégradant difficilement les caséines du lait peuvent profiter directement de l'action de la protéase PrtB de *L. bulgaricus* (Courtin *et al*., 2002). A son tour, *S. thermophilus* stimule la croissance de *L. bulgaricus* par la production de certains métabolites comme l'acide formique, le CO_2, l'acide pyruvique et l'acide folique (Crittenden *et al*., 2003; Derzelle *et al*., 2005; Driessen *et al*., 1982).

Plus récemment, deux études postgénomiques ont permis d'affiner la compréhension des interactionns liant ces deux espèces (Herve-Jimenez *et al*., 2008; Herve-Jimenez *et al*., 2009). Une stimulation de la voie de biosynthèse des acides aminés branchés ainsi que la mise en place probable d'une réponse à un stress oxydant chez *S. thermophilus* a été mise en évidence en coculture avec *L.bulgaricus*. L'hypothèse proposée par les auteurs est que *S. thermophilus*, en réponse à la production de peroxyde d'hydrogène par *L. bulgaricus*, adapte son métabolisme de façon à diminuer la concentration de fer intracellulaire et ainsi minimiser les dégâts provoqués par les espèces oxygénées réactives (ROS) générées par la réaction de Fenton. Enfin, la répression de gènes du métabolisme des purines et à l'inverse l'induction d'une perméase type xanthine/uracile chez le streptocoque suggère que les purines ou leurs précurseurs seraient fournis par *L. bulgaricus* et consommés par les streptocoques. Une partie seulement de ces adaptations métaboliques liées à la coculture avec *L. bulgaricus* ont depuis été confirmées avec un autre couple *S. thermophilus*/*L.*

Locus Tag	Gène	Description du gène
STER_0108	*ctsR*	Transcriptional repressor of class III stress genes
STER_0161	*hrcA*	heat-inducible transcription repressor HrcA
STER_0164	*dnaJ*	DnaJ-class molecular chaperone with C-terminal Zn finger domain
STER_0230	*hslO*	Disulfide bond chaperones of the HSP33 family
STER_0252	*groES*	Co-chaperonin GroES (HSP10)
STER_0253	*groEL*	Chaperonin GroEL (HSP60 family)
STER_0395	*clpP*	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit ClpP
STER_0625	*clpX*	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX
STER_0879	*cspA*	cold-shock DNA-binding protein family
STER_0880	*cspB*	cold-shock DNA-binding protein family

Tableau 1: Gènes potentiellement impliqués dans la réponse générale aux stress chez la souche *S. thermophilus* LMD-9

bulgaricus (Sieuwerts *et al*., 2010). Dans ce cas, les pourcentages de populations finales des deux bactéries sont très différents de ce qui avait été observé par Hervé-Jimenez *et al*. Les auteurs proposent que *S. thermophilus* LMD-9 produiraient de l'acide formique, folique ainsi que des acides gras. La protéolyse de *L. bulgaricus* contribuerait de façon partielle à satisfaire la demande en acides aminés soufrés et branchés des deux souches ce qui expliquerait la surexpression en coculture des gènes de biosynthèse de ces acides aminés chez *L. bulgaricus*. Cette étude montre également que les gènes associés à la production d'exopolysaccharides sont favorisés chez les deux bactéries lorsqu'elles sont associées.

Ces deux exemples d'étude post-génomique de cocultures *S. thermophilus*/*L. bulgaricus* montrent que cette association reste très variable selon les souches. C'est pourquoi à ce jour, la résultante de leurs interactions reste impossible à prédire et contraint d'ailleurs les industriels à multiplier les tests de couples de souches *S. thermophilus*/*L. bulgaricus*.

1.5) Capacités générales de résistance aux stress

Au cours des procédés de l'industrie agroalimentaire, dans leur environnement ou lors de la traversée du transit digestif, les bactéries lactiques peuvent rencontrer de nombreux stress allant du stress nutritionnel, thermique (hyper ou hypothermique), osmotique aux stress oxydant ou acide. La plupart du temps et ce, pour n'importe quel microorganisme, l'exposition à un stress conduit à la dénaturation des protéines qui perdent leur configuration tridimensionnelle native, ceci pouvant même à terme provoquer des agrégats irréversibles. Les différents acteurs de la réponse non spécifique à un stress pour la souche de *S. thermophilus* LMD-9 sont représentés dans le tableau 1 réalisé d'après l'analyse *in silico* de son génome. Ces gènes sont également conservés dans les autres souches séquencées.

Pour se protéger de ces effets dévastateurs, les bactéries utilisent des protéines dites de stress qui ont pour rôle de protéger les protéines de la dénaturation, de participer à leur renaturation voire même d'éliminer les protéines dénaturées. A noter néanmoins que ces protéines de stress agissent aussi en conditions normales en participant à la biogénèse des protéines, assistant leur repliement ou l'assemblage des autres protéines. Voilà pourquoi on leur associe généralement le nom de protéines chaperones. Néanmoins, en référence aux conditions thermiques qui ont permis de les mettre en évidence, on peut distinguer les HSP pour Heat Shock Protein et les CSP pour Cold Shock Protein, ces dernières étant plus

spécifiquement associées à un stress thermique froid. Parmi les HSP, on retrouve ainsi les systèmes DnaK, GroES/L ainsi que les protéases de la famille Clp. Le système DnaK est composé de trois protéines DnaK (Hsp70), DnaJ (Hsp40) et GrpE alors que GroES/L n'en contient que deux, GroEL et GroES. Toutes ces protéines sont impliquées non seulement dans le repliement protéique mais aussi dans le transport des protéines à travers la membrane et la réactivation de protéines endommagées suite à stress quelconque. Pour ce qui est de la famille Clp (Hsp100), ce sont des protéases ATP-dépendantes qui peuvent aussi fonctionner comme chaperones comme c'est le cas par exemple pour la protéine ClpB. Enfin plusieurs CSP ont été mises en évidence plus particulièrement en condition de stress thermique froid (Perrin *et al*., 1999). Ce sont de petites protéines généralement inférieures à 10 kDa possédant un domaine de liaison aux acides nucléiques simple brin via un domaine CSD (cold shock domain). Ces CSP pourraient servir de chaperones ARN permettant de prévenir l'apparition de structures secondaires dans l'ARN et de promouvoir l'initiation de la traduction. Chez *S. thermophilus*, la régulation générale aux stress fait intervenir la protéine HrcA, qui, activée sous sa conformation dimérique, contrôle plus particulièrement l'expression du gène *dnaK* et de l'opéron *groE* en se fixant sur des séquences inversées répétées nommées CIRCE pour Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression (Martirani *et al*., 2001). Les Clp quant à eux sont sous le contrôle non seulement d'HrcA mais aussi de CtsR, une protéine de stress chez *S. salivarius* (Chastanet and Msadek, 2003). De plus, HrcA et CtsR contrôlent aussi chez *S. thermophilus* des gènes importants permettant la tolérance à l'acidité et à la carence nutritionelle (Arena *et al*., 2006).

Afin de se développer convenablement et persister dans sa niche écologique, *S. thermophilus*, comme toute bactérie, doit adapter sa physiologie pour répondre aux variations inhérentes de son environnement qui peuvent être d'ordre nutritionnel ou physiques. D'un point de vue génétique, cette adaptation métabolique nécessite donc des modulations plus ou moins importantes de l'expression de gènes pour répondre à ces changements environnementaux. Voyons à présent ces mécanismes généraux et différents systèmes génétiques pour répondre à ces changements.

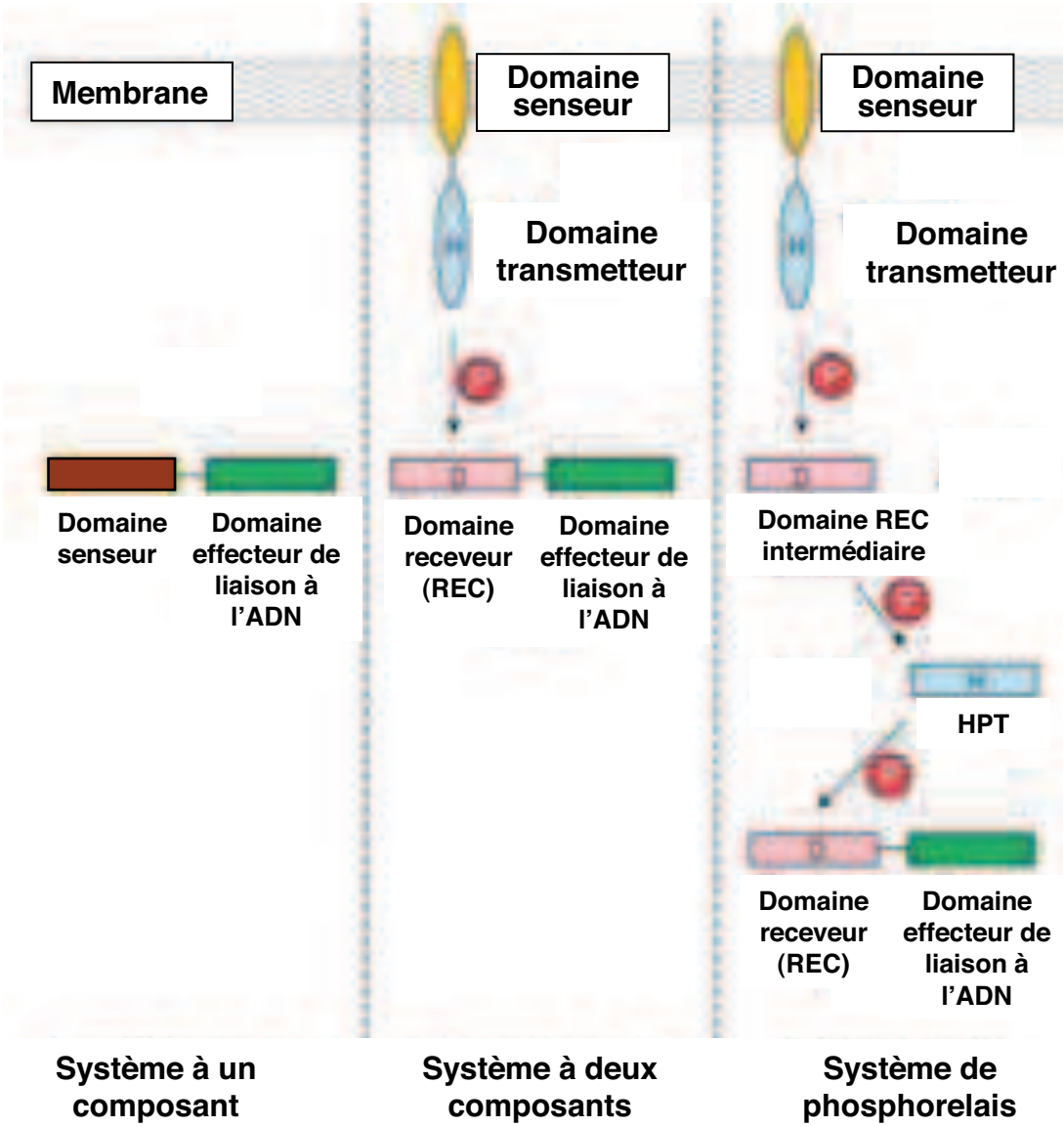


Figure 2: Les différents types de systèmes de régulation chez les procaryotes

D'après Cashin *et al.,* 2006

H: Histidine conservé de l'HK

D: Acide aspartique conservé du RR

HPT: "Histidine Phosphotransfert Protein"

: Transfert de Phosphate

2) Mécanismes généraux d'adaptation à l'environnement par des régulateurs transcriptionnels

Pour s'adapter à leur environnement, les bactéries disposent de systèmes extrêmement variés allant de régulateurs transcriptionnels comportant une seule protéine aux systèmes faisant intervenir de multiples composants (Cashin *et al*., 2006). Cette partie donne les principes généraux du contrôle transcriptionnel pour chacun de ces systèmes. Ainsi, nous proposons ici de les classer en 3 catégories par ordre croissant de complexité (Figure 2):

- ➔ les régulateurs transcriptionnels ou systèmes à un composant
- ➔ les systèmes à deux composants (TCS)
- ➔ les systèmes à multiples composants

Rappelons tout d'abord quelques éléments de base permettant de contrôler l'activité de l'ARN polymérase, l'enzyme clé de la transcription. Alors que les eucaryotes disposent de plusieurs types d'ARN polymérases, les bactéries n'en possèdent qu'un seul. Afin d'initier la transcription d'une région promotrice sur la matrice d'ADN, ce complexe multi-protéique doit s'associer avec un des multiples facteurs sigma qui influe directement sur l'affinité et l'activité de l'ARN polymérase pour le promoteur du gène cible. Chaque espèce bactérienne possède au moins un facteur σ de ménage et un nombre variable de facteurs σ alternatifs dépendant du niveau de complexité du cycle de vie de l'organisme. Typiquement, le facteur σ de ménage fait partie de la famille des facteurs σ^{70} qui reconnaît des motifs de 5-6 paires de bases spécifiques centrés entre les positions -10 et -35 du site d'initiation de la transcription. On notera par ailleurs que les facteurs σ alternatifs ne sont pas essentiels à la survie mais, peuvent permettre à l'organisme à répondre à un changement d'état physiologique (phase stationnaire, choc thermique, stress oxydant, etc…). Au final, ces facteurs σ, associés à des facteurs de transcription plus spécifiques ou des systèmes à multiples composants, vont permettre de guider l'ARN polymérase pour contrôler un pool de gènes cibles donné. L'analyse *in silico* du génome de *S. thermophilus* montre qu'il possède le facteur σ de ménage *rpoD* ainsi qu'un facteur alternatif *comX* lui permettant d'induire si nécessaire des gènes associés à la compétence (cf ci-dessus).

2.1) Les systèmes à un composant ou facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines se liant à l'ADN et permettent soit d'activer soit de réprimer la transcription du gène cible en réponse à un changement environnemental. D'un point de vue structural, cela signifie que la protéine possède nécessairement un domaine de reconnaissance ou de liaison au signal dit « receveur » et un domaine de liaison à l'ADN dit « effecteur » agissant sur la régulation des gènes cibles. Il existe différentes familles de régulateurs transcriptionnels qui sont définies par la conservation d'un domaine particulier de liaison à l'ADN (composé généralement de variations d'un domaine ayant un motif HTH pour hélice-tour-hélice).

On notera toutefois une architecture typique dans le cas des régulateurs appartenant à la famille des Rgg, particulièrement bien distribués chez les bactéries à Gram + à bas pourcentage en GC. En effet, ceux-ci ont une taille proche de 200 acides aminés et possèdent toujours un domaine conservé en C-terminal (TIGR01716) ainsi qu'un domaine HTH en position N-terminale appartenant toujours à la famille PFAM01381. Ces protéines de type Rgg contrôlent des fonctions bien précises notamment chez les streptocoques. Ainsi par exemple, chez *S. gordonii*, la protéine Rgg induit l'expression d'une glucosyltransferase extracellulaire (Sulavik *et al*., 1992; Sulavik and Clewell, 1996); chez *S. mutans*, la protéine MutR régule l'expression de la mutacine, une bactériocine (Qi *et al*., 1999) et enfin chez *S. pyogenes*, la protéine RopB participe au contrôle de l'expression de protéines sécrétées comme SpeB (Chaussee *et al*., 1999). On trouve par ailleurs des exemples de protéines Rgg autres que chez les streptocoques comme par exemple chez *L. sakei* avec la protéine LacX contrôlant l'expression d'une lactocine (Rawlinson *et al*., 2002; Skaugen *et al*., 2002) et chez *L. lactis* un mécanisme de tolérance à l'acidité glutamate-dépendant est sous le contrôle de la protéine GadR (Sanders *et al*., 1998).

Certains régulateurs peuvent être activateurs pour certains gènes et répresseurs pour d'autres : les régulateurs de la famille LysR par exemple, activent en général la transcription de leurs gènes cibles et répriment leur propre expression (Schell, 1993). Les répresseurs ont leurs sites de fixation dans la région promotrice du gène régulé. Une fois le répresseur fixé, l'encombrement stérique empêche l'ARN polymérase de se fixer sur le promoteur, le gène ne peut être transcrit. Un activateur fixé sur son opérateur aura un effet inverse, son interaction avec l'ARN polymérase va augmenter l'affinité de celle-ci pour le promoteur du gène régulé, qui sera transcrit de manière plus efficace. Par ailleurs, certaines familles de facteurs de transcriptions peuvent réguler un large éventail de fonctions (cas de

LysR par exemple) et d'autres sont plus spécialisées comme c'est le cas de ArsR, spécialisée dans la réponse à des stress induits par des métaux lourds (Murphy and Saltikov, 2009). Enfin, une analyse récente effectuée sur 145 génomes procaryotes montre que 97% des facteurs de transcription ne comportent pas de régions transmembranaires ce qui, comme le suggère l'étude, montre que ce type de système ne perçoit pas directement des stimuli extracellulaires et donc détecte majoritairement des stimuli cytosoliques (Marijuán *et al*., 2010).

2.2) Les systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants (TCS) constituent un des mécanismes essentiels qu'utilisent les bactéries pour percevoir et s'adapter à des changements environnementaux (Stock *et al*., 2000) tels que l'osmolarité, le chimiotactisme, les carences nutritionnelles, la résistance aux antibiotiques et la virulence bactérienne. D'un point de vue structural, les TCS sont constitués de deux composants : un senseur ou protéine histidine kinase (HK) qui s'auto-phosphoryle en réponse à un stimulus puis transfère son groupement phosphate au régulateur de réponse (RR), le deuxième composant. Celui-ci se comporte alors le plus souvent comme un régulateur transcriptionnel permettant une réponse physiologique adaptée mais certains RRs possèdent des activités enzymatiques ou peuvent se lier à d'autres protéines. Ainsi, à l'inverse du facteur de transcription comportant à la fois un domaine senseur et effecteur, ici c'est l'HK qui constitue le module senseur et le RR pour la partie effectrice (Figure 2). L'élément clé dans cette voie de transduction est le niveau de phosphorylation du RR puisque c'est celui-ci qui module l'affinité du RR pour ses cibles (Stock *et al*., 2000). Toutefois, nombre de TCS font intervenir d'autres protéines et même des peptides qui peuvent jouer également un rôle dans la perception du signal (cas des systèmes de quorum sensing) et la transmission du signal. Les différentes architectures retrouvées ainsi que les aspects mécanistiques propres aux TCS seront développés plus en détail dans la partie 3.

2.3) Les systèmes à multiples composants

Les systèmes à deux composants sont souvent intégrés à des réseaux de régulation plus complexes dits de phosphorelais qui offrent de meilleurs niveaux de contrôle et facilitent le décodage de multiples signaux positifs ou négatifs. Contrairement aux TCS où

il n'y a qu'une seule réaction de phospho-transfert, les systèmes phosphorelais en contiennent de multiples. Le transfert du phosphate se fait toujours entre un résidu histidine et un résidu aspartate pour donner lieu à des réactions de type His→Asp→His→Asp qui font parfois intervenir des protéines intermédiaires dites Hpt pour « Histidine Phosphotransfert Protein » (Figure 2). L'exemple typique de système phosphorelais multiple est celui de *Bacillus subtilis*, Spo0, qui contrôle l'initiation de la sporulation. Ce système sera développé en détails dans la section 4. D'autres phosphorelais multiples procaryotes existent, notamment le système BvgS-BvgA impliqué dans le contrôle de la virulence chez *Bordetella pertussis* (Beier and Gross, 2006) et le système Rcs impliqué, chez *E. coli*, dans la contrôle de la production d'exopolysaccharides comme l'acide colanique (Majdalani and Gottesman, 2005).

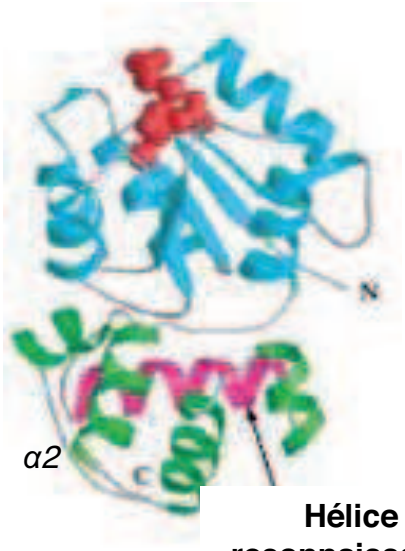


Figure 3: Représentation tridimensionnelle des domaines REC (cyan) et HTH-luxR ou GerE (vert) du RR NarL d'*E.coli*.

D'après Stock *et al.,* 2000

La structure du domaine HTH-LuxR ou GerE est composée exclusivement de 4 hélices α, les deux centrales formant le motif HTH classique, les deux autres hélices pouvant être impliqué dans le fréquent assemblage en dimère observé pour ce type de RR. Les résidus impliqués dans la réaction de phosphorylation du domaine REC sont représentés par des sphères rouges

3) Structures des TCS et modulation de leur activité

3.1) Structure des RR

L'alignement de centaines de RR a montré que la plupart de ces régulateurs possède deux domaines, en N-terminal un domaine receveur conservé (REC) d'environ 125 acides aminés qui peut être phosphorylé sur un résidu conservé aspartate et un domaine effecteur variable en C-terminal (Stock *et al*., 2000).

3.1.1) Structure et rôle du domaine receveur REC

Le domaine conservé REC est appelé « Response-reg domain » dans la base de données Pfam. Il joue un rôle dans au moins trois fonctions : premièrement, il interagit avec les HK phosphorylées et catalyse le transfert du groupement phosphoryl sur leur propre résidu Asp typiquement autour de la position 55 ; deuxièmement, il assure sa propre auto-déphosphorylation et troisièmement, bien sûr, il régule l'activité phosphorylation-dépendante du ou des domaines effecteurs associés au RR.

Néanmoins, bien que la plupart du temps le domaine receveur REC soit associé à un ou plusieurs domaines effecteurs, le domaine REC seul peut fonctionner indépendamment ; c'est le cas de 17% des RRs bactériens qui existent sous cette forme monomodulaire. D'ailleurs, historiquement le terme régulateur de réponse a été défini en 1977 par Daniel Kosland pour décrire la protéine de chimiotactisme CheY consistant uniquement en un domaine REC. Depuis, la protéine CheY est restée le modèle référent de structure du domaine REC des RRs.

D'une taille d'environ 120 acides aminés, sa structure secondaire présente une alternance de feuillets β et d'hélices α donnant lieu à une structure tertiaire où les feuillets β forment le noyau de la protéine « enrobée » par les hélices (Figure 3). On peut aussi ajouter que 3 groupes de résidus sont essentiels et régissent l'activité de phosphorylation :

1) un groupe de résidus hydrophobes entourant le site de phosphorylation (Asp57) en C-terminal du troisième feuillet β
2) des résidus participant à la catalyse de la réaction de phosphorylation (Asp12, 13 et Lys109)

3) les résidus Thr87 et Tyr106 impliqués dans le changement de conformation phosphorylation-dépendant.

La plupart des RRs possédant uniquement ce domaine REC joue un rôle dans les processus de chimiotactisme du fait des nombreuses interactions intermoléculaires avec les protéines motrices. Ce type de RR peut aussi être retrouvé dans les systèmes de type phosphorelais en tant qu'intermédiaire de phosphorylation. Au final, on peut donc dire que le domaine REC est la structure conservée du RR qui fait office de référence pour leur détection *in silico* lors de l'annotation de nouveaux génomes. De cette observation découle néanmoins une autre problématique : comment attribuer avec justesse une fonction à un RR quand deux RR de fonctions totalement différentes partagent souvent plus de 30% d'identité, notamment sur le domaine REC ?

En réalité, même s'il existe une certaine variabilité de séquence du domaine REC, le moyen le plus simple de distinguer deux RR passe par l'analyse de leur partie effectrice. C'est la raison pour laquelle il a été choisi dès le départ de les classer en fonction de leur partie effectrice, ce que nous proposons d'examiner dans la partie suivante de manière exhaustive.

3.1.2) Structure et rôle du domaine effecteur

Les RRs des génomes procaryotes se caractérisent par une très grande diversité de domaines effecteurs. Comme énoncé auparavant, 17% des RRs bactériens sont constitués simplement du domaine REC. Les 83 % restant possédant un domaine effecteur peuvent être classés en 3 grandes catégories :

- les domaines effecteurs de liaison aux acides nucléiques (60%)
- les domaines effecteurs à activité enzymatique (21%)
- les domaines effecteurs de liaison à des protéines (2%)

<u>Les domaines effecteurs de liaison aux acides nucléiques</u>

La grande majorité des RRs bactériens comprend un domaine effecteur de liaison à l'ADN et se comporte ainsi comme des régulateurs transcriptionnels. Ces domaines ont été classés en sous-familles bien caractérisées par rapport à la structure tridimensionnelle de leur domaine effecteur (un ou plusieurs domaines Pfam associés). Ces sous-familles sont en fait des variantes du motif HTH (hélice-tour-hélice) permettant la liaison à l'ADN et incluent principalement la famille OmpR (30% de tous les RRs), NarL (17%), NtrC (9%),

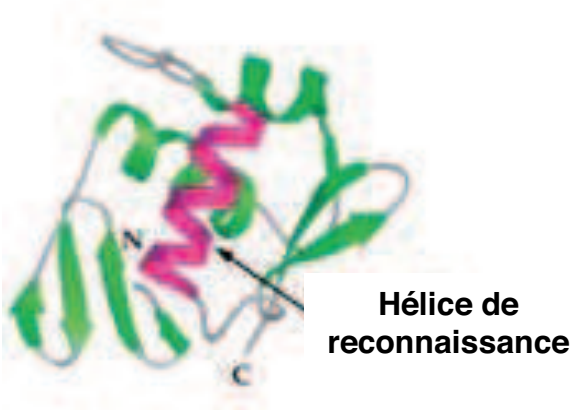


Figure 4: Représentation tridimensionnelle du domaine effecteur wHTH du RR OmpR d'*E.coli*.

D'après Stock *et al.,* 2000

La structure du domaine wHTH consiste en 3 hélices α "enrobées" par 2 modules à feuillets β antiparallèles. L'hélice de reconnaissance du motif est représentée en rose sur la figure.

LytR (3%) en enfin AraC (1%). On notera par ailleurs l'existence de quelques domaines effecteurs possédant un domaine de liaison à l'ARN (1%), la plupart de la famille ANTAR (AmiR and NasR transcription antitermination regulators) et fonctionnant comme des anti-terminateurs de transcription.

La sous-famille OmpR tient son nom du régulateur de la pression osmotique via le contrôle global des porines chez *E. coli*. Les RRs de ce type sont caractérisés par un domaine de liaison à l'ADN de type wHTH pour winged helix (trans_reg_C dans la base Pfam). Leur structure globale consiste en 3 hélices α "enrobées" par deux modules à feuillets β antiparallèles (Figure 4). Les hélices α2 et α3 ainsi que la dizaine de résidus de la boucle les connectant forment la structure typique HTH, α2 et α3 étant respectivement l'hélice de positionnement et l'hélice de reconnaissance (en rouge sur la figure). Enfin, les deux boucles reliant chacun des deux feuillets β antiparallèles constituent les ailes ou « wings » entourant l'hélice α3 de reconnaissance, participant aussi mais dans une moindre mesure à la liaison à l'ADN.

Une autre famille de RRs est représentée par NarL, un facteur de transcription agissant aussi bien comme activateur que répresseur de gènes ciblant le métabolisme des nitrates et nitrites. Les RRs de type NarL possèdent tous un domaine de liaison à l'ADN de type GerE dans la base Pfam dont la structure tridimensionnelle est composée exclusivement de 4 hélices α, les deux centrales formant le motif classique HTH (Figure 3). Les deux autres hélices jouent un rôle dans le fréquent assemblage en dimère observé pour ce type de RR.

Les domaines effecteurs de type NtrC, un RR participant à la régulation du métabolisme azoté chez les entérobactéries par exemple, sont structuralement plus complexes car ils présentent à la fois un domaine ATPase et un domaine Fis, pour facteur de stimulation inversé. Fis est un type d'HTH à faible spécificité de séquence et capable d'activer le facteur alternatif σ^{54}. L'activité de ces régulateurs dépend aussi bien de leur état de phosphorylation que de leur niveau d'oligomérisation (cf partie modulation de l'activité).

La famille AraC tire à l'origine son nom du facteur de transcription AraC, activateur de l'opéron arabinose chez *E. coli*. Sa structure tridimensionelle se rapproche de la famille NarL car composée d'hélices α (7 ici), à la différence près que le motif HTH est en deux parties connectés par une hélice α (Rhee *et al*., 1998), la première partie en N terminale (3 hélices α) et la deuxième en C-terminale (3 hélices α). Peu d'études existent

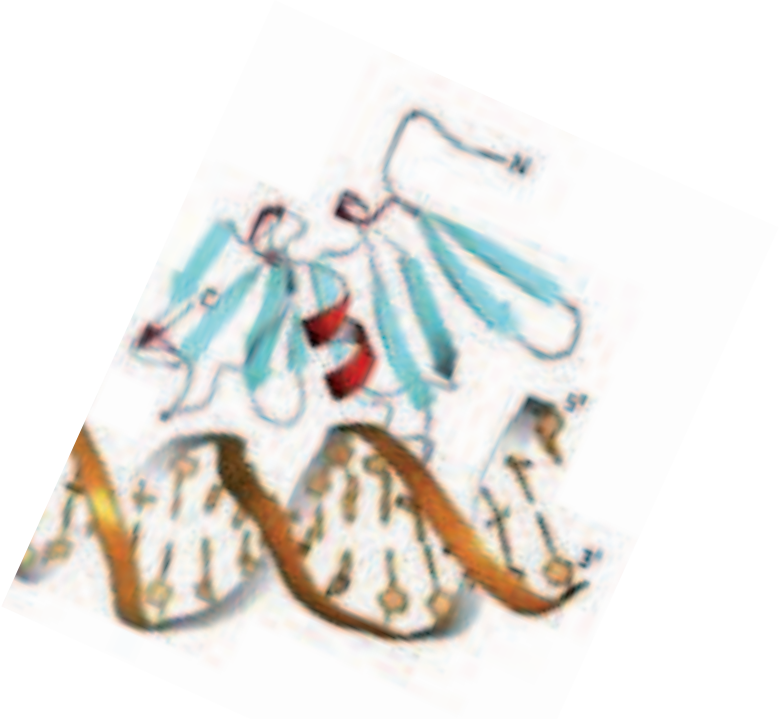


Figure 5: Représentation tridimensionnelle du domaine effecteur LytTR d'AgrA de *S. aureus* lié à l'ADN

Sidote *et al.,* 2008

Le domaine effecteur LytTR est une structure très majoritairement constituée de feuillets β, organisés symétriquement autour d'une hélice α unique.

sur les RRs de type AraC mis à part celle sur TrxR, impliqué chez les GAS dans la virulence sur un modèle murin (Leday *et al*., 2008).

Enfin, la famille LytR constitue la dernière grande sous-famille de RR en termes d'abondance et n'a été caractérisée structuralement que récemment. Le domaine Pfam associé, LytTR, est assez inhabituel en ce sens que le domaine de liaison à l'ADN n'est pas un HTH mais est prédominé par une structure en feuillets β (Sidote *et al*., 2008), organisé symétriquement autour d'une unique hélice α (en rouge sur la figure 5). Les régulateurs de ce type sont souvent associés à la régulation de la production de facteurs de virulence ou de bactériocines.

Les domaines effecteurs à activité enzymatique

Même si la majorité des RRs sont avant tout des régulateurs de la transcription, certains RRs possèdent des domaines effecteurs présentant une activité enzymatique et jouant un rôle dans la réponse physiologique à un ou des signaux donnés. Ainsi, associés au domaine REC, on peut trouver des doamines effecteurs à activité méthylestérases, adénylate cyclases, diguanylate cyclases, histidine kinases (cas des protéines intermédiaires de phosphorelais), sérine/thréonine kinases et phosphatases. CheB par exemple, une des protéines du système de chimiotactisme combine ainsi un domaine REC avec un domaine à activité méthylestérase. Dans ce système, des substances attractives ou répulsives sont détectées par des protéines MCP membranaires dites acceptrices de méthyle (Methyl-accepting Chemotaxis Protein). La fixation d'un attractif ou d'un répulsif induit un changement de conformation de la MCP qui permet sa méthylation par une méthylase spécifique. Lorsque la concentration de l'attractif ou du répulsif n'augmente pas, CheB entre autre, déméthyle progressivement la protéine (Wadhams and Armitage, 2004).

La dégradation du di-GMP cyclique est effectuée par des protéines à activité phosphodiesterasique possédant un motif conservé d'acides aminés EAL ou HD-GYP. Les RRs possédant ces types de domaines permettraient ainsi de contrôler finement les pools intracellulaires d'AMP et de di-GMP cyclique en fonction de leur niveau de phosphorylation, lui-même dépendant du ou des signaux perçus initialement par leur histidine kinase associée. Chez les bactéries, l'AMP cyclique et le di-GMP cyclique sont utilisés comme second messager dans la signalisation cellulaire. Ils participent au contrôle de fonctions clés dont la virulence, la formation de biofilms, la synthèse de surfactant ou plus généralement à l'adaptation métabolique dans le cas de l'AMP cyclique. Typiquement, le di-GMP cyclique est synthétisé par des protéines à activité diguanilate cyclase possédant un motif caractéristique GGDEF.

HK type	H-box consensus*
Type I	H E h R · P
Type II	H E · · N ·
Type III	R E h H D · h · ·
Type IV	P H F h · N ·
CheA	H S h K G ·

Tableau 2: Classification des HK en fonction des variations de la H-box

Kim and Forst, 2001

La lettre **H** en gras représente l'histidine phosphorylable conservée de la H-box. Les résidus conservés hydrophobes (I, L,V,M) l'entourant sont notés par un 'h'

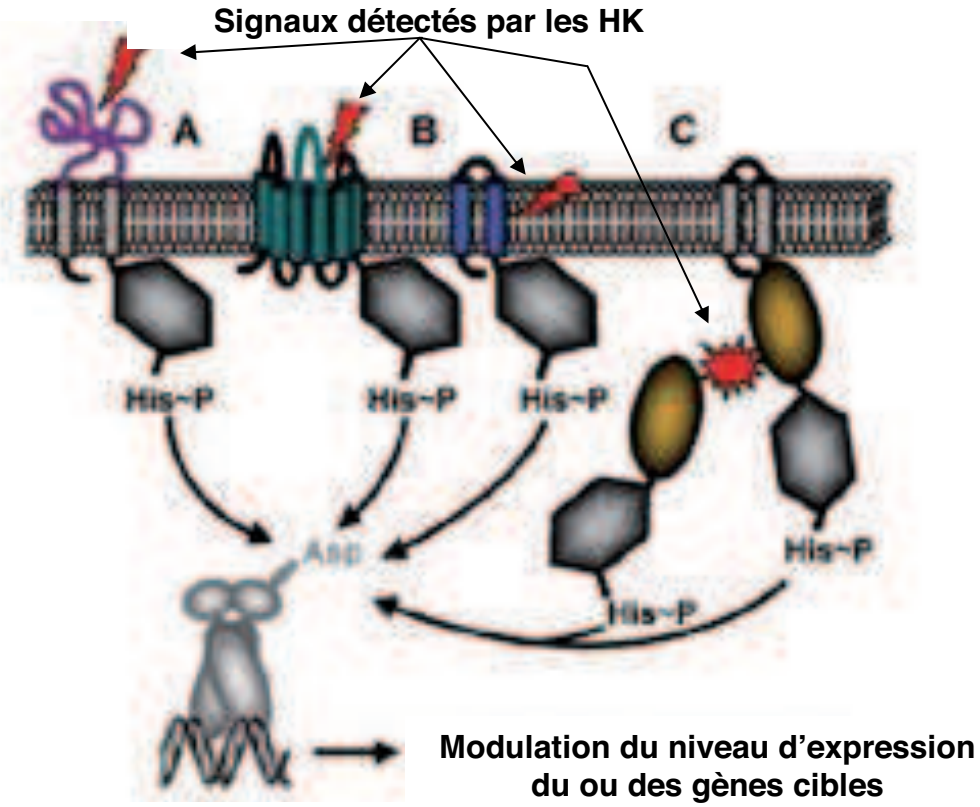


Figure 6: Représentation schématique des HK à perception extracellulaire (A), membranaire (B) et cytoplasmique (C)

D'après Mascher *et al.*, 2006

Enfin, certains RRs possèdent un domaine effecteur de la famille des sérine/thréonine phosphatases et sont souvent associés à la régulation de facteurs sigma (Galperin, 2006).

Les domaines effecteurs de liaison à des protéines

Ils forment un petit groupe très diversifié permettant de moduler l'interaction avec d'autres protéines ou ligands. Environ la moitié de ces RRs interviennent dans le processus de chimiotactisme et sont constitués principalement d'effecteurs de type CheW appartenant à la famille des protéines CheV. Toutes ces protéines ont des rôles auxiliaires et participent, de manière phospho-dépendante, à l'association des chimiorécepteurs (MCP) avec CheA, une histidine kinase cytoplasmique.

3.2) Structure des HK

Les HK possèdent un domaine senseur extracellulaire N-terminal couplé à un domaine à activité kinase dit transmetteur à l'extrémité C-terminale. Il existe une grande diversité architecturale des régions N-terminales des HK, ce qui suggère une grande variabilité des signaux qu'elles peuvent percevoir. Ces signaux peuvent être perçus directement par l'HK ou indirectement par des interactions protéine-protéine. Chez les procaryotes, le signal perçu par l'HK, lorsqu'il est connu, est dans 96% des cas une petite molécule qui se lie à elle (Ulrich, 2005). Contrairement à la plupart des kinases, une HK ne catalyse pas un transfert direct de phosphate d'une molécule d'ATP vers son RR cible. Lorsqu'elle est activée, l'HK va en effet s'autophosphoryler, puis le groupement phosphate va être transféré au niveau d'un résidu aspartate conservé du RR.

A l'instar des RRs, une comparaison des séquences des HKs a été effectuée avec l'objectif de mieux les classer. Les premières classifications (Kim and Forst, 2001) furent axées sur le domaine transmetteur de l'HK, plus particulièrement sur la variabilité de la H-box (site de phosphorylation) et permirent de subdiviser les HKs en sous-familles (Tableau 2). Néanmoins, ces classifications ne rendent pas complètement compte des différences de perception et de transmission du signal des HK. En effet, la variabilité de structure des histidines kinase se fait essentiellement sur le domaine senseur, le domaine transmetteur étant lui conservé de part sa fonction. Ainsi, on retrouve au niveau de la partie C-terminale le domaine catalytique de phosphorylation HATPase_c (base Pfam) associé souvent au domaine HisKA permettant l'association des HKs en dimères.

Ainsi, récemment, Mascher et ses collaborateurs (2006) ont proposé une classification des HKs plus fonctionnelle, basée sur le mode de perception du signal. Ainsi, les HK sont classées ici en 3 familles selon la topologie de leur domaine senseur (Figure 6).

Le premier groupe (A) comprend les HKs à perception extracellulaire, d'ions ou de nutriments. Il est caractérisé par une partie sensorielle extracellulaire, liée à la membrane cytoplasmique par au moins deux hélices transmembranaires. Le second groupe (B) semble percevoir des perturbations associées à la membrane puisqu'il y a absence de domaines extra-membranaires et présence de multiples hélices transmembranaires (de 2 à 20). Le troisième groupe (C) rassemble les HKs répondant aux stimuli internes, qu'elles soient ancrées ou non à la membrane cytoplasmique.

Voyons à présent les principales familles de domaines les plus fréquents retrouvés dans l'architecture des HKs plus particulièrement dans la partie senseur.

3.2.1) Principaux domaines des HK

Le domaine PAS

Environ 33% des HKs (toutes classes confondues) contiennent au moins un domaine PAS. On retrouve des protéines à domaines PAS aussi bien chez les bactéries que chez les archaea et eucaryotes. La capacité de ces protéines à percevoir les variations de l'environnement (lumière, potentiel redox, ligands chimiques) dépend de l'efficacité du domaine PAS. Celui-ci constitue un domaine d'environ 100 acides aminés permettant à la fois la détection du signal et de sa transmission à d'autres domaines partenaires par l'intermédiaire de changements conformationnels (Watts *et al*., 2011). Même s'il existe une très grande variabilité de séquences de ces domaines PAS, on trouve néanmoins une forte conservation de leur structure secondaire organisée autour de 5 feuillets β encadrés de part et d'autres par une longue hélice α et un autre groupe de 3 petites hélices α. Dans beaucoup de protéines de signalisation, les domaines PAS détectent leur signal grâce à un cofacteur associé. Celui-ci peut lier des petites molécules et percevoir des changements de lumière, de potentiel redox ou du niveau global d'énergie de la cellule (Ponting and Aravind, 1997). La détection de stimuli divers comme la lumière, les gaz diatomiques ou le potentiel redox requiert des cofacteurs différents. Dans les protéines à domaines PAS qui détectent la lumière, PYP est un récepteur bactérien qui capte la lumière bleue par le chromophore 4-hydroxycinnamyl. FixL, est un récepteur d'oxygène dans lequel l'oxygène se lie directement à un cofacteur hème, coordonné par un résidu histidine dans le domaine

PAS. D'autres, comme la protéine Aer, sont des protéines transductrices qui détectent l'oxygène indirectement à travers des changements du potentiel redox.

Le domaine HAMP

Contrairement aux domaines PAS, les domaines HAMP, présents dans 31% des HKs, ne participent pas à la détection du signal. Ils jouent néanmoins un rôle majeur dans la transmission du signal détecté par la partie senseur (Mascher *et al*., 2006b). En effet, la cinquantaine d'acides aminés du domaine HAMP forme 2 hélices α reliées par une boucle, qui assemblé en dimère se comporte un peu à la manière du piston d'un vérin pneumatique. Des études structurales montrent que l'intégration du signal perçu entraîne au niveau du domaine HAMP des mouvements de rotations des 4 hélices parfaitement coordonnées aboutissant à l'activation du domaine transmetteur C-terminal de l'HK et donc à l'autophosphorylation de celle-ci.

Les domaines CHASE

Le domaine CHASE pour cyclase/histidine kinase associated sensing extracellular est retrouvé aussi bien chez les procaryotes que les eucaryotes et, comme son nom l'indique, est un domaine de perception extracellulaire (Mascher *et al*., 2006b). Des alignements multiples de plusieurs protéines ont permis de décliner cette famille CHASE en 6 domaines conservés (CHASE, CHASE 2 jusqu'à CHASE 6). Ces domaines ont une taille variable allant de 150 à 300 acides aminés et sont présents dans la région N-terminale d'HKs, d'adenylate cyclases et d'autres protéines telles que les serine/théonine kinases dans le cas du domaine CHASE 2 par exemple. Les domaines CHASE sont toujours bordés par des régions transmembranaires et souvent associées aux domaines PAS et HAMP.

3.3) Modulation de l'activité d'un TCS

3.3.1) Transmission du signal HK-RR

La transmission du signal entre l'histidine kinase senseur et le régulateur de réponse fait intervenir le domaine transmetteur du senseur et le domaine receveur du régulateur (REC).

Le module transmetteur de l'histidine kinase, commun à toutes les HKs, est impliqué dans la première étape de transfert de phosphate. Lorsqu'un signal est perçu par le domaine détecteur de l'HK, le module transmetteur s'autophosphoryle sur un résidu conservé histidine à partir d'une molécule d'ATP. Ce domaine possède deux sous-domaines fonctionnels : le sous-domaine de dimérisation (les HKs fonctionnant en dimères) contenant le résidu histidine conservé, site de la phosphorylation, et le sous-domaine catalytique responsable de l'activité autokinase et contenant un site de liaison à l'ATP nécessaire à cette activité.

La dernière étape du transfert de phosphate se fait du résidu histidine autophosphorylé de l'histidine kinase vers le domaine receveur du régulateur de réponse, au niveau d'un résidu aspartate conservé. Une interaction entre les hélices α de l'histidine kinase et du régulateur de réponse permet d'aligner les résidus histidine et aspartate dans une conformation et à une distance permettant le transfert du groupement phosphoryl (Hoch, 2000). Les domaines receveurs catalysent eux-mêmes le transfert du phosphate vers leur résidu aspartate en interagissant avec les domaines portant un résidu histidine phosphorylé. Bien que les structures des différents modules receveurs soient très similaires, il existe de nombreuses variations conduisant à une modification de la surface de contact avec le partenaire donneur de phosphate qui pourraient être à l'origine de la spécificité entre les deux partenaires du TCS (Yoshida *et al.,* 2002 ; Xu *et al.,* 2003).

Une fois la phosphorylation du module receveur du régulateur de réponse réalisée, deux principaux modèles d'activation des domaines effecteurs ont été proposés. Dans le premier modèle, le module receveur inhibe le module effecteur et la phosphorylation du résidu aspartate entraîne un changement de conformation. Ceci permet de lever l'inhibition et de rendre le régulateur actif (Baikalov *et al*., 1996; Ireton *et al*., 1993). Dans le second modèle, la phosphorylation du module receveur entraîne la dimérisation (Fiedler and Weiss, 1995) ou l'oligomérisation du régulateur de réponse, augmentant son affinité pour l'ADN ou pour des protéines (Flashner *et al*., 1995). Parfois, l'activation du régulateur de réponse peut combiner ces deux modèles (Stock *et al*., 2000). La réponse cellulaire à l'activation du régulateur de réponse est proportionnelle à son degré d'activation. Ce dernier dépend lui-même de l'efficacité de l'autophosphorylation du senseur et du transfert de phosphate mais aussi d'une activité phosphatase intrinsèque au régulateur et/ou de l'histidine kinase (Marina *et al.,* 2005).

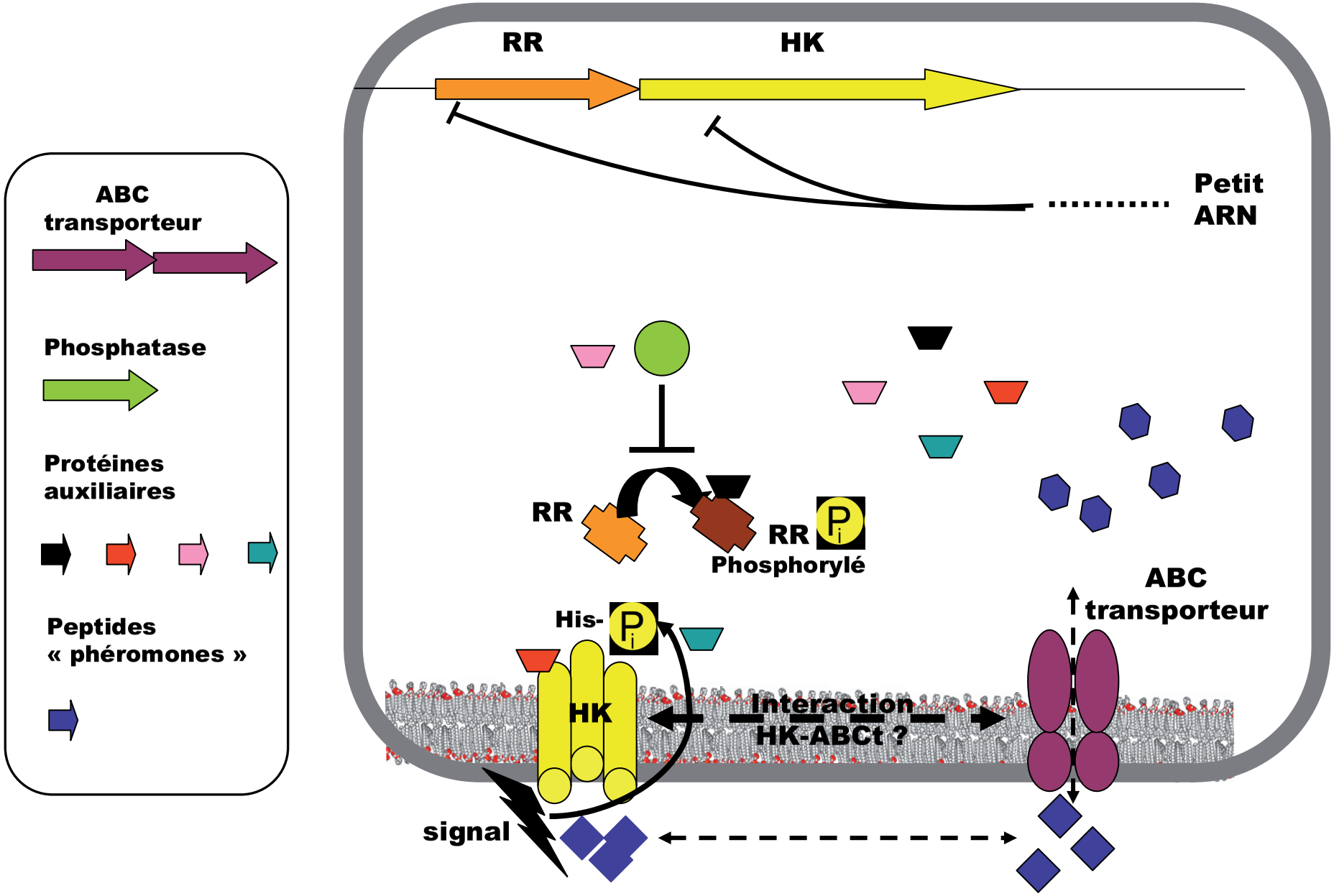


Figure 7: Modulateurs potentiels de l'activité d'un système à deux composants

3.3.2) Régulation de l'activité du TCS

L'activité des TCS doit être régulée afin de permettre l'adaptation aux changements environnementaux. L'ensemble des acteurs pouvant agir potentiellement sur l'activité d'un TCS est représenté sur la figure 7 et détaillé ci-dessous.

Elle peut déjà être contrôlée par l'intermédiaire de la régulation du niveau d'expression du RR. Il peut s'agir d'une autorégulation positive lorsque le régulateur phosphorylé active sa propre expression. Ceci a pour conséquence d'augmenter la quantité de régulateur dans la bactérie, ce qui pourrait permettre à cette dernière de répondre plus vite et de manière plus importante lors d'une nouvelle détection du même signal ou de permettre une expression séquentielle et hiérarchisée des gènes contrôlés par le TCS (Bijlsma et Groisman, 2003). Il peut s'agir également d'autorégulation négative lorsqu'il y a fixation du régulateur phosphorylé sur son propre promoteur, ceci afin de limiter la quantité de régulateur dans la bactérie (Ansaldi *et al.,* 2000).

Plusieurs mécanismes permettent la **déphosphorylation** du régulateur de réponse lorsque le signal détecté par le senseur disparaît ou si un signal déclenchant un processus opposé apparaît :

- la déphosphorylation du RR peut être réalisée par le régulateur lui-même lorsqu'il possède une activité phosphatase intrinsèque due à la demi-vie très courte et à la sensibilité aux variations de pH du groupement phosphate.
- elle peut être réalisée également, et dans la majorité des cas, par l'histidine kinase partenaire qui possède une activité phosphatase permettant un retour très rapide à l'état initial du régulateur (Georgellis *et al.,* 1998 ; Ansaldi *et al.,* 2001). Le phosphate peut éventuellement retourner sur le résidu histidine du senseur (Hsing et Silhavy, 1997).
- la déphosphorylation du régulateur de réponse peut aussi faire intervenir une ou plusieurs phosphatases auxiliaires telles que les protéines Rap dans le cas du contrôle de la sporulation (voir la partie suivante consacrée à la sporulation). Des protéines « anti-RR » peuvent également bloquer l'action d'un TCS en venant se fixer au niveau du domaine de fixation à l'ADN du régulateur de réponse. Ceci empêche ce dernier par un effet de compétition de se fixer en amont de son gène cible bien qu'il soit phosphorylé.

Des **protéines de connection** peuvent également cibler l'HK ou le RR et changer le niveau global de RR phosphorylé et/ou leur capacité à réguler l'expression des gènes

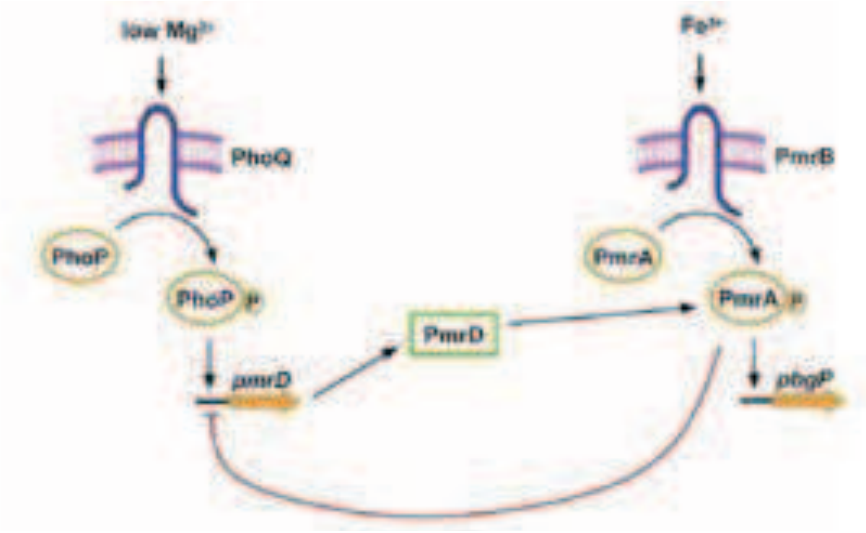


Figure 8: Relations entre les systèmes TCS PhoP/Q et PmrA/B par la protéine connectrice PmrD

Mitrophanov and Groisman, 2008



Figure 9: Relations entre les systèmes TCS EvgA/EvgS et PhoP/Q par la protéine connectrice B1500

Mitrophanov and Groisman, 2008

cibles. Tous les cas de figures existent. Ainsi, elles peuvent inhiber la déphosphorylation du RR ou favoriser le maintien de la forme phosphorylée mais aussi activer une histidine kinase (Mitrophanov and Groisman, 2008). Par exemple, chez *S. enterica*, une faible concentration en magnésium active le système PhoP/PhoQ ce qui aboutit à l'induction de l'expression d'une protéine de connection, PmrD. En effet, il se trouve que PrmD peut se lier à la forme phosphorylée du RR de PmrA, prévenant sa déphosphorylation. Or, PmrA fait partie d'un autre TCS, le système PmrA/PrmB qui lui est activé directement en présence de fer ferrique. Ainsi PmrD, petite protéine de 85 acides aminés, permet de connecter deux TCS, PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB permettant ainsi aux gènes sous contrôle de PmrA d'être activés dans les conditions activant le système PhoP/PhoQ (Figure 8). Un autre exemple remarquable de connection entre deux TCS existe chez *E. coli* où la protéine connectrice active ou favorise l'état phosphorylé d'un RR. Ainsi, la protéine B1500 connecte les TCS EvgA/EvgS et PhoP/PhoQ. En réponse à un signal non déterminé, le système Evg active l'expression de B1500 qui va par la suite favoriser l'activation de l'histidine kinase PhoQ (en inhibant l'activité phosphatase de l'HK) et donc par voie de conséquence la phosphorylation du RR PhoP, permettant ainsi d'activer son régulon (Figure 9). Une fois de plus, ce type de régulation permet d'activer indirectement le régulon d'un système, alors que les conditions environnementales étaient a priori peu favorables.

D'autres **protéines membranaires auxiliaires** peuvent jouer un rôle dans la stabilisation et la reconnaissance du signal perçu par l'histidine kinase. Par exemple les deux protéines auxiliaires YycH et YycI activent l'HK YycG chez *B. subtilis*. Ainsi les hélices α transmembranaires des protéines auxiliaires et de l'HK forment un complexe permettant l'activation de l'histidine kinase (Szurmant *et al*., 2007b).

Un autre type de régulation bien particulier concernant les TCS correspond aux mécanismes liés au **quorum sensing**. En effet, les cellules bactériennes peuvent communiquer entre elles et coordonner des activités métaboliques. Ce mode de signalisation bactérien repose sur la production de petites molécules médiatrices appelées « autoinducteurs » ou phéromones qui sont produites lors de la croissance bactérienne. Lorsqu'un seuil de concentration est atteint, correspondant à un certain niveau de population, ces phéromones interagissent avec un régulateur transcriptionnel, permettant l'expression spécifique, en réponse à une forte concentration de cette phéromone, d'un groupe de gènes bien précis. Dans le cas des bactéries à Gram positif, ces phéromones sont majoritairement des peptides courts (5-9 acides aminés), au départ synthétisés dans le

cytoplasme sous forme de précurseurs qui sont ensuite clivés, sécrétés et parfois modifiés. Les peptides identifiés jusqu'à maintenant sont soit codés par des petits gènes, soit des fragments de peptides signaux de lipoprotéines. Une fois sécrétés, ces peptides peuvent exercer leur fonction de deux manières. Soit ils sont réimportés à l'intérieur de la cellule par un transporteur d'oligopeptide. Dans la bactérie, ils interagissent avec un régulateur transcriptionnel qui, ainsi activé, va permettre l'expression de gènes cibles. Soit les peptides agissent à l'extérieur de la bactérie en interagissant avec l'HK, qui en les reconnaissant, s'autophosphoryle et donc active la voie de transduction du signal typique des TCS. Les peptides perçus par une HK sont fréquemment modifiés (thiolactones, lactones, isoprenylation) ce qui leur permet sans doute d'être plus résistants à la protéolyse et d'être spécifiquement reconnus. De tels mécanismes sont impliqués par exemple dans le contrôle de la virulence, de la compétence ou de la production de bactériocine.

Par ailleurs, dans les génomes des Firmicutes, on retrouve très fréquemment des TCS colocalisés avec des **ABC-transporteurs**. Des auteurs ont donc suggéré que l'ensemble TCS-ABC transporteurs a évolué en tant qu'unité fonctionnelle propre pour répondre à une fonction physiologique (Mascher, 2006). L'étude du système de perception de la bacitracine Bce chez *B. subtilis* va dans ce sens. En effet, l'ABC transporteur BceAB agit à la fois comme une pompe détoxifiante par l'efflux de la bacitracine mais aussi comme cosenseur du TCS BceRS (Rietkotter *et al.*, 2008). La bacitracine perçue par BceAB active le TCS, qui, à son tour, induit l'expression du transporteur. Ce couplage parait donc plus que pertinent car dès lors que la concentration en bacitracine diminue en dessous du seuil de sensibilité, il n'y a plus d'activation du TCS et donc absence de dépense d'énergie inutile pour la bactérie.

Enfin, d'autres moyens de régulation des TCS ont été mis en évidence dans des études récentes. C'est le cas par exemple de la phosphorylation du résidu thréonine 65 du RR CovR par une sérine/thréonine kinase qui empêche la fixation de CovR pour ses cibles en diminuant notamment la quantité du résidu conservé aspartate 53 phosphorylé (Lin *et al.*, 2009). On trouve également dans le cas de CheY plusieurs résidus dont l'acétylation diminue aussi l'affinité de la protéine pour ses cibles (Liarzi *et al.*, 2010). Ce type d'interaction est peu étudié mais ces résultats suggèrent que beaucoup de modifications post-traductionelles peuvent avoir lieu sur les RR, modulant leur capacité à se fixer sur leurs cibles et donc à exercer leur activité régulatrice.

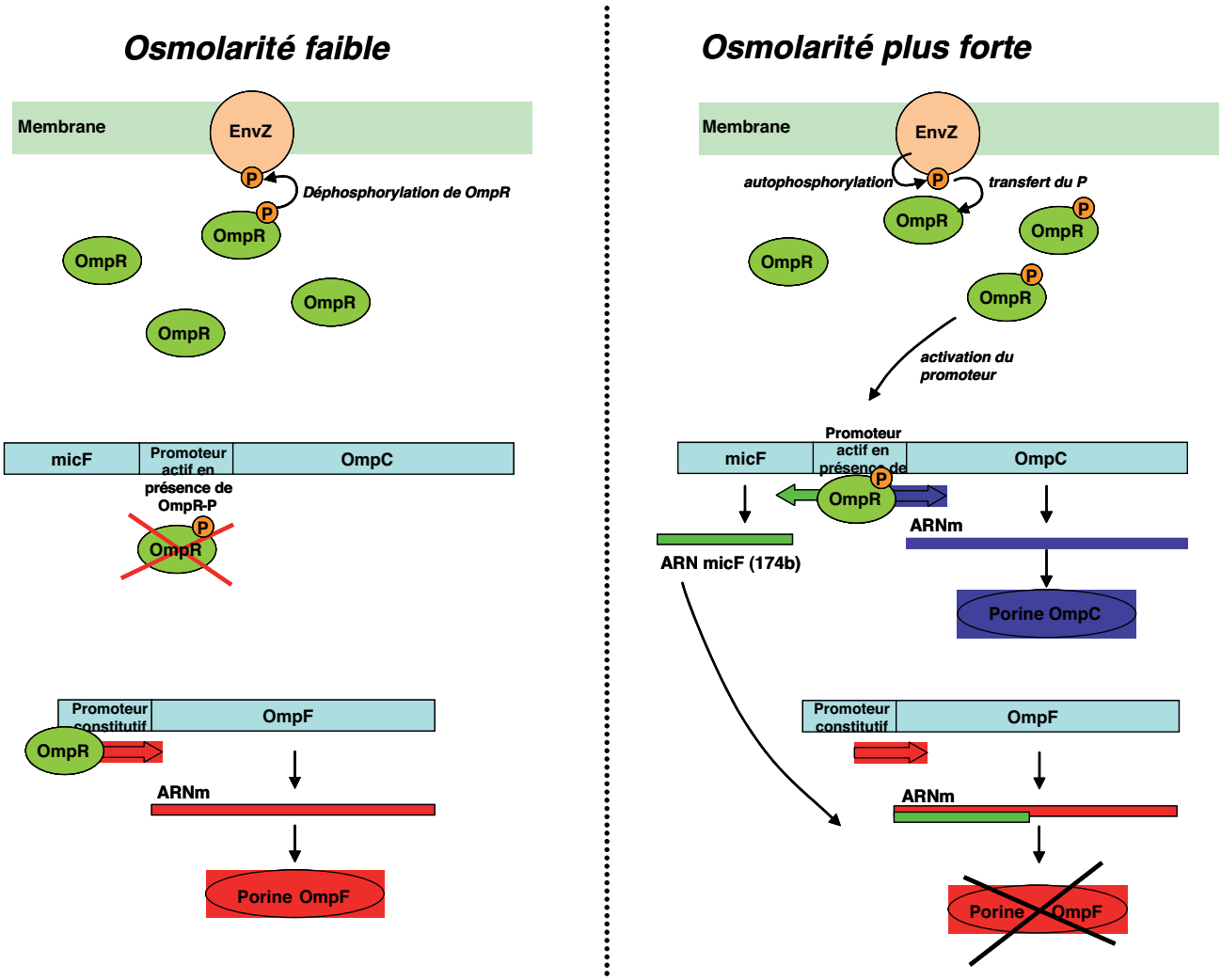


Figure 10: Schéma simplifié de l'adaptation au niveau d'osmolarité par le système OmpR/EnvZ chez *E.coli*.

4) Diversité des fonctions contrôlées par les TCS

Comme nous venons de le voir, derrière l'apparente simplicité de fonctionnement des systèmes à deux composants se cache une incroyable diversité et modularité des domaines retrouvés chez les TCS tant au niveau de la perception du signal que de sa transmission et de son intégration dans la physiologie bactérienne. Dès lors, une telle diversité d'architecture laisse entrevoir une grande variété aussi bien des stimuli perçus par les TCS que des mécanismes de régulation mis en place pour répondre de façon optimale. Cette section se propose d'illustrer concrètement cette diversité au travers d'exemples de TCS tirés du monde microbien en général allant d'espèces pathogènes ou non, retrouvées dans des environnements aussi divers que l'écosystème intestinal, le sol ou l'océan (une autre partie sera dédiée uniquement aux TCS des streptocoques). En outre, ces exemples permettent également d'illustrer plus concrètement les différents types de régulation possibles pour un TCS donné.

4.1) TCS répondant aux stimuli physiques

Nous avons souligné précédemment que les signaux moléculaires perçus par les HKs étaient rarement connus. L'une des raisons est que l'activation d'une HK peut se faire de manière indirecte lorsqu'elle dépend d'un paramètre purement physique comme le pH par exemple dont la valeur est la résultante des concentrations relatives en bases ou en acides, donc d'un ensemble de molécules. Illustrons ces propos au travers d'exemples de TCS répondant à des stimuli physiques.

4.1.1) Osmolarité (OmpR/EnvZ)

Chez *E. coli*, le système à deux composants EnvZ/OmpR, l'un des systèmes modèles d'étude, contrôle la synthèse des deux porines OmpF et OmpC et est impliqué dans la perception des variations d'osmolarité du milieu. Ces 2 porines présentent d'importantes similitudes de séquences (40% d'identité), mais elles forment des pores de diamètres différents au niveau de la membrane externe. Ainsi, OmpF forme des pores plus grands que ceux d'OmpC. Cette différence affecte la vitesse de diffusion des osmolytes et permet l'adaptation des bactéries à l'osmolarité du milieu (Wurgler-Murphy and Saito, 1997).

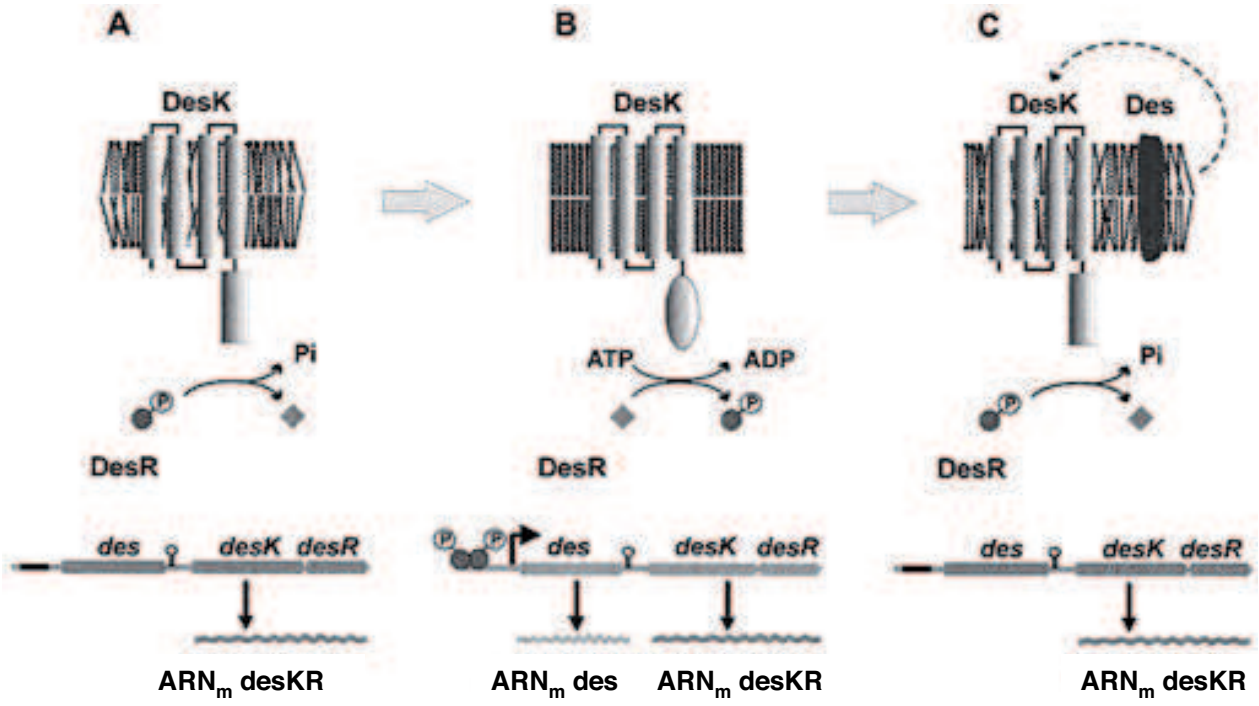


Figure 11: Contrôle de la fluidité membranaire par le système DesR/DesK chez *B.subtilis*.

D'après Mansilla *et al.*, 2004

A) Lorsque la fluidité membranaire est normale (maintien du ratio acides gras saturés/insaturés), DesK possède une activité phosphatase dominante sur DesR.

B) Une baisse soudaine de la température ou de la disponibilité en acides gras insaturés rigidifie la membrane cytoplasmique. DesK a en conséquence une activité kinase sur DesR, qui à l'état phosphorylé, active l'expression de la désaturase *des.*

C) La synthèse de Des entraine la désaturation des chaines saturées des phospholipides membranaires. Lorsque la fluidité membranaire est restaurée, DesK perd son activité kinase et déphosphoryle DesR, inhibant ainsi la transcription de la désaturase *des.*

La protéine EnvZ, qui fonctionne comme un récepteur membranaire périplasmique, est un modèle typique des HKs procaryotes (Khorchid and Ikura, 2006). Elle possède une courte extrémité N-terminale cytoplasmique, deux segments transmembranaires encadrant un domaine périplasmique osmosenseur et une extrémité C-terminale cytoplasmique. Sous l'effet d'une variation osmotique qu'elle perçoit d'une manière indéterminée, EnvZ s'autophosphoryle au niveau du résidu histidine conservé de son domaine kinase. Le phosphate est ensuite transféré au RR OmpR, qui contrôle l'expression des porines. Le RR OmpR est également composé de deux domaines : un domaine receveur N-terminal comportant un résidu aspartate conservé, site de la phosphorylation et un domaine de liaison à l'ADN situé à l'extrémité C-terminale (Wurgler-Murphy and Saito, 1997).

La régulation du TCS s'effectue en fonction de l'osmolarité (Figure 10). En condition d'hypo-osmolarité, le RR OmpR n'est pas phosphorylé et la protéine OmpF est préférentiellement exprimée, tandis qu'en condition d'hyper-osmolarité le RR OmpR phosphorylé va induire l'expression du gène *OmpC* ainsi que celle de *micF*, un ARN complémentaire à l'ARNm d'OmpF, empêchant d'autant plus la production des porines les plus petites (OmpF). On notera par ailleurs que d'autres gènes chez *E. coli* sont régulés par ce système ; ainsi la transcription de 125 gènes est modifiée dans le mutant EnvZ/OmpR (Oshima *et al*., 2002). On retrouve par exemple des gènes impliqués dans la mobilité, la formation de biofilm ou le métabolisme d'acides aminés tels que la cystéine et l'arginine.

4.1.2) Température (DesR/DesK)

L'adaptation des bactéries à des températures basses entraîne une modification de la quantité et de la composition lipidique membranaire dont le but est d'assurer une fluidité membranaire optimale. Ainsi, l'insaturation des acides gras, l'augmentation de la proportion d'acides gras à double liaison, leur ramification ou encore la diminution de la taille de leurs chaînes sont autant de moyens permettant le maintien d'une fluidité adéquate à basse température. La désaturase Des est un élément clé dans cette régulation car elle va créer rapidement des doubles liaisons au niveau des acides gras saturés déjà existants de la membrane. Par contre, les changements de ramification et de longueur de chaîne d'acides gras sont des processus longs car ils nécessitent une synthèse *de novo* de toute la molécule lipidique par des enzymes cytoplasmiques qui sont généralement liées à la croissance (Beranova *et al*., 2010).

Chez *B. subtilis*, la perception du signal froid se fait notamment par un TCS membranaire, DesK étant l'HK senseur et DesR le régulateur (Mansilla *et al*., 2004;

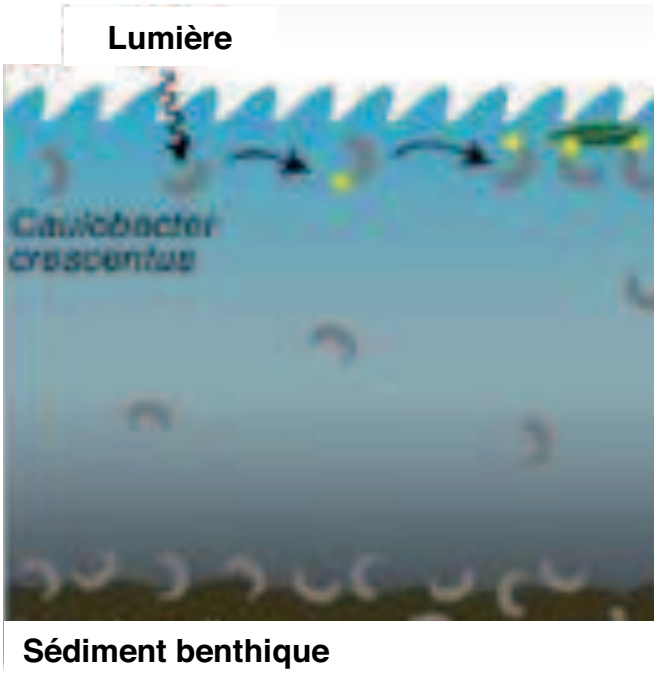


Figure 12: Adhésion photodépendante de *Caulobacter crescentus* par le système LovK/LovR

D'après Purcell *et al*., 2007

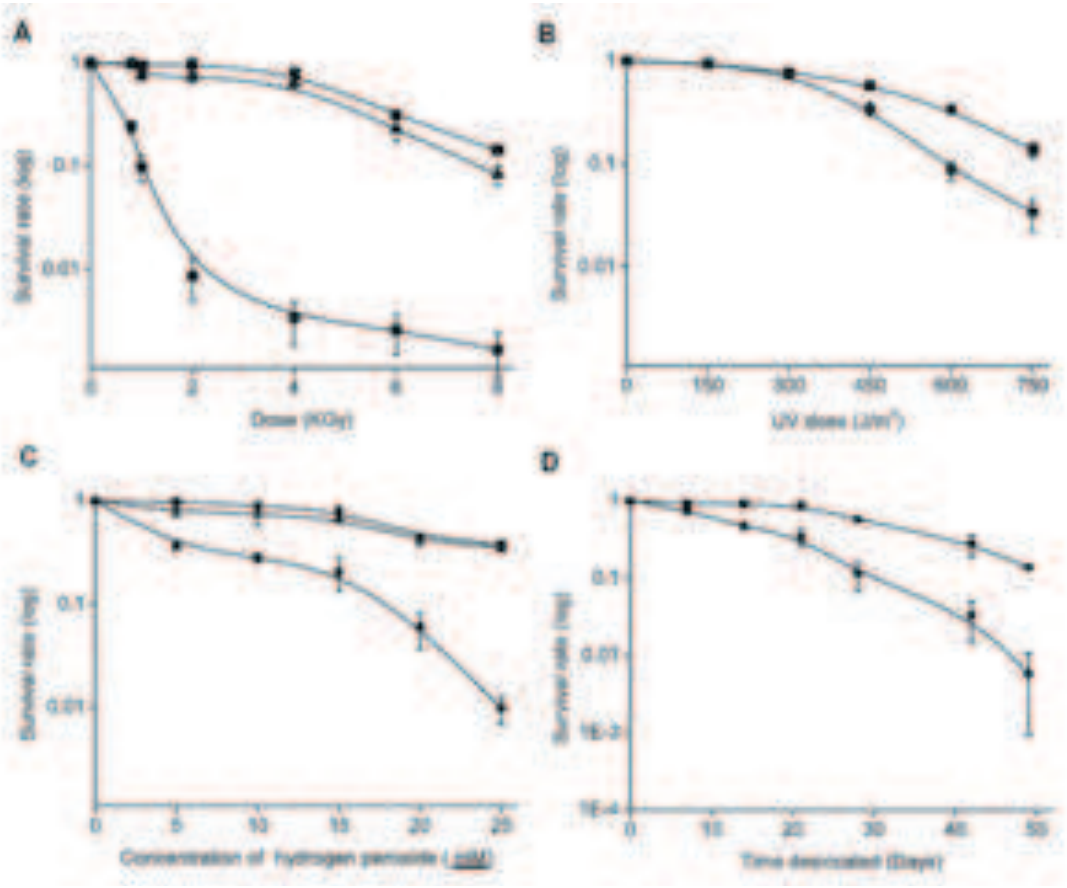
Le système LovK/LovR, activé par la lumière, induit la synthèse d'une protéine (en jaune) permettant l'adhésion de la bactérie à la première particule de nutriment en suspension.

Mansilla and de Mendoza, 2005). L'inactivation de l'un ou l'autre des composants inhibe l'induction de l'expression du gène codant la désaturase *des* (Aguilar *et al*., 2001). En fait, la rigidification de la membrane est le signal déclencheur du TCS. Cette perception est rendue possible par les 4 segments transmembranaires en position N-terminale de DesK, affectant mécaniquement (via un domaine HAMP) son activité de phosphorylation à l'égard de DesR. Ainsi à des températures avoisinant les 37°C, DesK agit essentiellement comme une phosphatase, maintenant ainsi DesR dans sa forme non phosphorylée. A l'inverse, à des températures inférieures à 30°C, DesK possède une activité kinase dominante sur DesR, qui ainsi phosphorylé, induit l'expression de la désaturase *de*s et donc la formation d'acides gras insaturés (Figure 11). Ceux-ci permettront le réajustement progressif de la fluidité membranaire au niveau perçu par DesK dans sa conformation originale.

4.1.3) Photodétection (LovR/LovK)

Les domaines LOV flavine-dépendants sont des modules photosenseurs de la lumière « bleue » que l'on peut retrouver aussi bien chez les plantes, les champignons et les bactéries. Ces domaines sont en fait des dérivés du domaine PAS nommés ainsi pour leurs capacités de réaction à la lumière, à l'oxygène et à des variations du potentiel d'oxydoréduction du milieu. Les domaines LOV des génomes bactériens sont principalement retrouvés dans la partie senseur des HKs. Ainsi par exemple, une bactérie oligotrophe d'eau douce, *Caulobacter crescentus*, possède un TCS photosenseur comprenant une HK à domaine LOV, LovK, et LovR, un RR activateur de l'adhésion cellulaire (Purcell *et al*., 2007). L'exposition à la lumière bleue d'une souche de cette bactérie surexprimant le TCS augmente nettement ces capacités d'adhésion, ce qui suggère une activation du TCS par la lumière bleue plus particulièrement.

Quel est l'intérêt physiologique pour cette bactérie à percevoir cette lumière ? *C. crescentus* vit essentiellement dans les rivières et les lacs et est capable de se développer sur toute la hauteur de la colonne d'eau. Les auteurs proposent donc que l'intensité lumineuse constitue un signal environnemental permettant à *C. crescentus* de se positionner par rapport à la colonne d'eau (Figure 12). Les longueurs d'ondes du spectre visible associées au bleu sont particulièrement adaptées pour servir de signaux puisque ce sont celles qui pénètrent le plus profondément dans l'eau. Ceci peut être relié à la disponibilité en nutriments. En effet, la quantité de nutriments à la surface d'un lac est beaucoup moins abondante que celle procurée par les sédiments benthiques. Ainsi, la



■ Wt
● Mutant △*DrrA* Mutant
▲ △*DrrA* complémenté avec *DrrA*

Figure 13: Courbes de survie de *Deinococcus radiodurans* suite à une exposition aux rayons gamma (A), au peroxyde d'hydrogène (B), aux UV (C) et à la dessiccation (D)

D'après Wang *et al.*, 2008

lumière « informerait » les cellules restées en surface qu'elles devraient adhérer le plus vite possible à la première particule ou source de nutriments rencontrée. Des systèmes analogues à LovK/LovR sont également rencontrés chez d'autres espèces bactériennes aquatiques telles que *Erythrobacter litoralis, Novosphingobium aromaticivorans*, ou encore *Oceanicola granulosus* suggérant une stratégie commune adaptée à ce type de niche écologique (Purcell and Crosson, 2008).

4.1.4) Radiorésistance (DrrA/DrrK)

En 1956, on découvrit qu'une bactérie survivait dans les conserves de viande après le traitement choc que constitue une stérilisation par rayonnement gamma (Anderson, 1956). La bactérie isolée, *Deinococcus radiodurans*, reste encore aujourd'hui la championne de la survie et de la résistance à la radioactivité. Elle se révèle résistante à un grand nombre de conditions extrêmes, comme l'exposition aux produits chimiques génotoxiques, aux dommages de l'oxydation, aux rayonnements ionisants et ultraviolets, et à la déshydratation. Elle résiste à des niveaux de radiation 5 000 fois plus important que la dose susceptible de tuer un homme (Makarova *et al*., 2001). Parmi les nombreuses études menées pour comprendre de tels mécanismes de résistance et de réparation, celle parue en 2008 montre encore une fois l'implication d'un TCS (Wang *et al*., 2008). En effet, il a été montré qu'un gène codant un RR est essentiel dans la résistance aux rayons gamma, ultraviolets, au peroxyde d'hydrogène ainsi qu'à la dessiccation (Figure 13). De plus, le mutant RR, malgré la complémentation par un plasmide produisant le RR substitué sur le résidu conservé aspartate, reste toujours radiosensible. Ceci suggère que la transduction du signal est nécessaire pour que le RR soit actif. Même si l'étude ne fait pas mention de l'histidine kinase associée au locus, on peut supposer qu'elle perçoit ces stimuli extrêmes, témoins les nombreux domaines PAS retrouvés dans sa séquence, puis phosphoryle ce RR pour répondre à tous ces stress. D'ailleurs, des analyses post-génomiques effectuées par les auteurs montrent que les gènes de réponse aux stress, de réparation et plusieurs gènes de réponse à la dessiccation homologues à ceux de plantes sont moins exprimés ou produits chez le mutant. Ainsi, ces données montrent que ce TCS contribue grandement à la résistance extrême et pléïotrope de *Deinococcus radiodurans*.

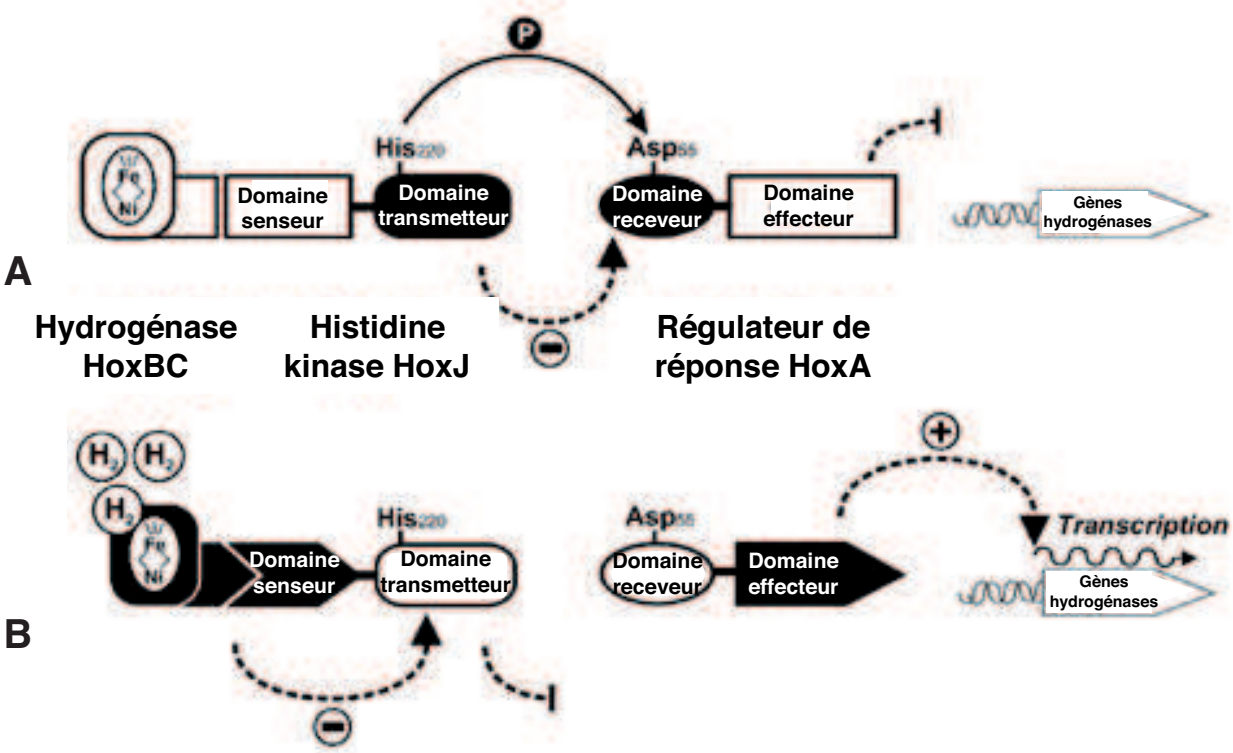


Figure 14: Régulation des hydrogénases chez *Ralstonia Eutropha* par le système HoxJ/HoxA en absence (A) ou en présence d'hydrogène (B)

D'après Lenz *et al.*, 2002

Les protéines et/ou domaines actifs dans la régulation du système en absence (A) ou en présence (B) d'hydrogène sont représentés sur fond noir.

4.2) TCS répondant aux stimuli chimiques

4.2.1) Détection de dihydrogène chez *Ralstonia eutropha* (système Hox)

Ralstonia eutropha est une bactérie chimiolithotrophe facultative, retrouvée aussi bien dans le sol que dans des milieux aquatiques, qui est capable, si nécessaire, de tirer son énergie à partir de dihydrogène. Cette capacité implique nécessairement un contrôle de l'expression d'un cluster d'hydrogénases, dans le cas présent de type [NiFe]. Cette fonction est assurée par un système à deux composants atypique aussi bien du point de vue structural que fonctionnel. En effet, la reconnaissance du signal H_2 se fait via la formation d'un complexe associant une hydrogénase multimodulaire (gènes *HoxBC*) à une histidine kinase HoxJ cytoplasmique à domaine PAS (Lenz *et al*., 2002) (Figure 14). Il a été suggéré que la quantité d'H_2 génère un signal redox au niveau du site actif de l'hydrogénase qui serait alors transmis et reconnu par la kinase (au niveau du domaine PAS) modulant ainsi l'activité du système (Buhrke *et al*., 2004). C'est donc ici un complexe et non uniquement l'HK qui contrôle ici l'état de phosphorylation du régulateur de réponse HoxA, de type NtRC, ce qui est peu commun et d'autant plus rare que sa phosphorylation entraîne son inactivation (Lenz and Friedrich, 1998). Ainsi, en absence d'hydrogène, HoxJ joue bien son rôle de kinase en phosphorylant et donc en inactivant le RR HoxA (Figure 14A). A l'inverse, en présence d'H_2, l'hydrogénase senseur HoxBC devient réduite par H_2 et inhibe l'autophosphorylation de la kinase HoxJ. Le RR HoxA devient alors déphosphorylé et active donc l'expression globale de l'ensemble des hydrogénases (Figure 14B).

4.2.2) Réponse aux nitrates et nitrites chez *E. coli* (systèmes Nar)

De très nombreuses bactéries, en particulier les entérobactéries, sont capables de "respiration nitrate". Or généralement, ces bactéries sont aussi capables de "respiration oxygène" et elles s'abstiennent de respirer le nitrate dès que de l'oxygène devient disponible, parce qu'il est énergétiquement plus rentable de respirer sur l'oxygène que sur le nitrate. Cette alternance entre aérobiose et anaérobiose doit donc être parfaitement gérée et s'accompagne nécessairement de profonds bouleversements dans l'expression de nombreux gènes, modifiant des enzymes du métabolisme et les chaînes de transport d'électrons. Ce phénomène d'adaptation a été particulièrement bien étudié chez *E. coli* et fait intervenir en premier lieu un facteur de transcription global, la protéine FNR qui contrôle cette transition aérobiose-anaérobiose (Spiro and Guest, 1990). Ainsi lorsqu'*E.*

coli est placée en anaérobiose et en présence de nitrates, FNR donnera le feu vert pour une activation des gènes de la dénitrification. Toutefois, en fonction des ressources disponibles, d'autres régulateurs peuvent ouvrir ou fermer les voies autorisées par FNR. Par exemple, l'utilisation du fumarate ne sera mise en route qu'en anaérobiose et en absence de nitrate. Si ce dernier est disponible, la fumarate réductase sera au contraire réprimée pour donner la préférence à la dénitrification. Le choix des différentes voies autorisées par FNR nécessite donc des contrôles secondaires, assurés, dans le cas de la respiration nitrate, par deux TCS, NarQ/P et NarX/L, répondant aux nitrates et nitrites (Rabin and Stewart, 1993). Dans les deux cas, les HK associées à la membrane (NarX et NarQ) s'autophosphorylent en présence de ces derniers puis transfèrent le groupement phosphate sur leur RR respectif (NarL et P). Ceux-ci ainsi activés peuvent donc se lier à des séquences spécifiques de l'ADN pour moduler l'expression des gènes cibles. Le partage des compétences réelles entre ces deux TCS est aujourd'hui mieux compris et s'explique notamment par des différences de sensibilité de détection aux nitrates et nitrites mais aussi d'activité de phosphorylation des kinases. En effet, l'activité autokinase de NarX est plus de 100 fois plus sensible à la présence de nitrates que de nitrites (Lee *et al*., 1999). De plus, alors que NarX phosphoryle, en présence de nitrates, à la fois NarL et NarP, NarX phosphoryle en présence de nitrites uniquement NarP et se comporte comme une phosphatase pour NarL (Williams and Stewart, 1997). Ceci permet d'affiner encore mieux les changements d'expression suivant la présence de nitrate ou nitrites (Goh *et al*., 2005). Il faut de plus ajouter à cela que les deux protéines RR NarL et NarP, partageant 44% d'identité sur leur séquence protéique, reconnaissent toutes les deux le même type de séquences heptamériques dans les régions promotrices des gènes cibles mais de façon remarquable se lient différemment suivant leur arrangement (Tyson *et al*., 1994). Ainsi, il a été démontré que NarP se lie uniquement à des configurations de type heptamères inversés répétés séparés par deux paires de bases (7-2-7) alors que NarL n'a pas un arrangement préférentiel particulier (Darwin *et al*., 1997). Or, plusieurs heptamères échelonnés en différents motifs peuvent exister dans les régions promotrices des gènes régulés. La transcription en aval est donc le résultat d'un jeu subtil de reconnaissance du promoteur par les RR et d'interaction avec l'ARN-polymérase. Au final, les différences de perception des deux HKs NarX et NarQ pour le nitrate et le nitrite et de reconnaissance des promoteurs par les RR NarL et NarP permettent une régulation parfaitement maîtrisée.

4.3) TCS répondant à des peptides

4.3.1) Quorum sensing et système Agr contrôlant la virulence chez *S. aureus*

S. aureus est une bactérie commensale de l'homme et d'autres mammifères mais peut se révéler responsable d'une grande variété d'infections (pathogène opportuniste). Pour coloniser et infecter son hôte, *S. aureus* possède, en plus des entérotoxines, de nombreux facteurs de virulence lui permettant de résister aux systèmes de défense de l'hôte. Ces facteurs de virulence (protéines de surface, exotoxines et enzymes extra-cellulaires) sont impliqués dans les différentes étapes nécessaires à l'infection par le staphylocoque (colonisation par adhésion, invasion par échappement aux défenses de l'hôte, infection par pénétration et diffusion dans les tissus) dans l'objectif d'inhiber à chacune de ces étapes la réponse immunitaire de l'hôte. L'expression de ces différents facteurs est temporellement régulée au cours de la croissance bactérienne *in vitro* et au cours de l'infection (Wright and Holland, 2003). En début d'infection, les staphylocoques présents en faible quantité, expriment leurs protéines de surface de manière à se fixer aux tissus et, ainsi, à échapper au système immunitaire de l'hôte. Lorsque le site initial d'infection devient pauvre en nutriments, suite à l'accumulation d'un grand nombre de bactéries, celles-ci augmentent la production et la sécrétion des protéines à fonction cytolytique afin de détruire les tissus environnants et, par conséquent, de proliférer dans l'organisme hôte.

Chez *S. aureus*, le principal système régulateur contrôlant l'expression des facteurs de virulence est le système à deux composants *Agr* pour Accessory Gene Regulator (Vandenesch, 1997) dont l'expression est étroitement liée au quorum sensing (Novick and Geisinger, 2008). Ce locus *agr* comprend deux unités transcriptionelles bien différentes, ARN II et ARN III, transcrites à partir des promoteurs P2 et P3, respectivement (Figure 15 A). L'effecteur de ce système est l'ARN III, réprimant l'expression de facteurs d'adhésion et des protéines associées à la paroi en phase exponentielle de croissance et contrôlant positivement l'expression de protéines extracellulaires à fonction cytolytique, telles que l'hémolysine ou les « fibronectin binding protein » (Morfeldt *et al*., 1995; Novick *et al*., 1993; Saravia-Otten *et al*., 1997). La transcription de l'ARN III est largement dépendante de l'activation des gènes *agrA, B, C et D* formé par l'ARN II. AgrC et AgrA constituent respectivement l'HK et le RR répondant finement à la concentration extracellulaire d'un peptide signal dit autoinducteur (PAI) ou phéromone formé par l'action d'AgrB sur le

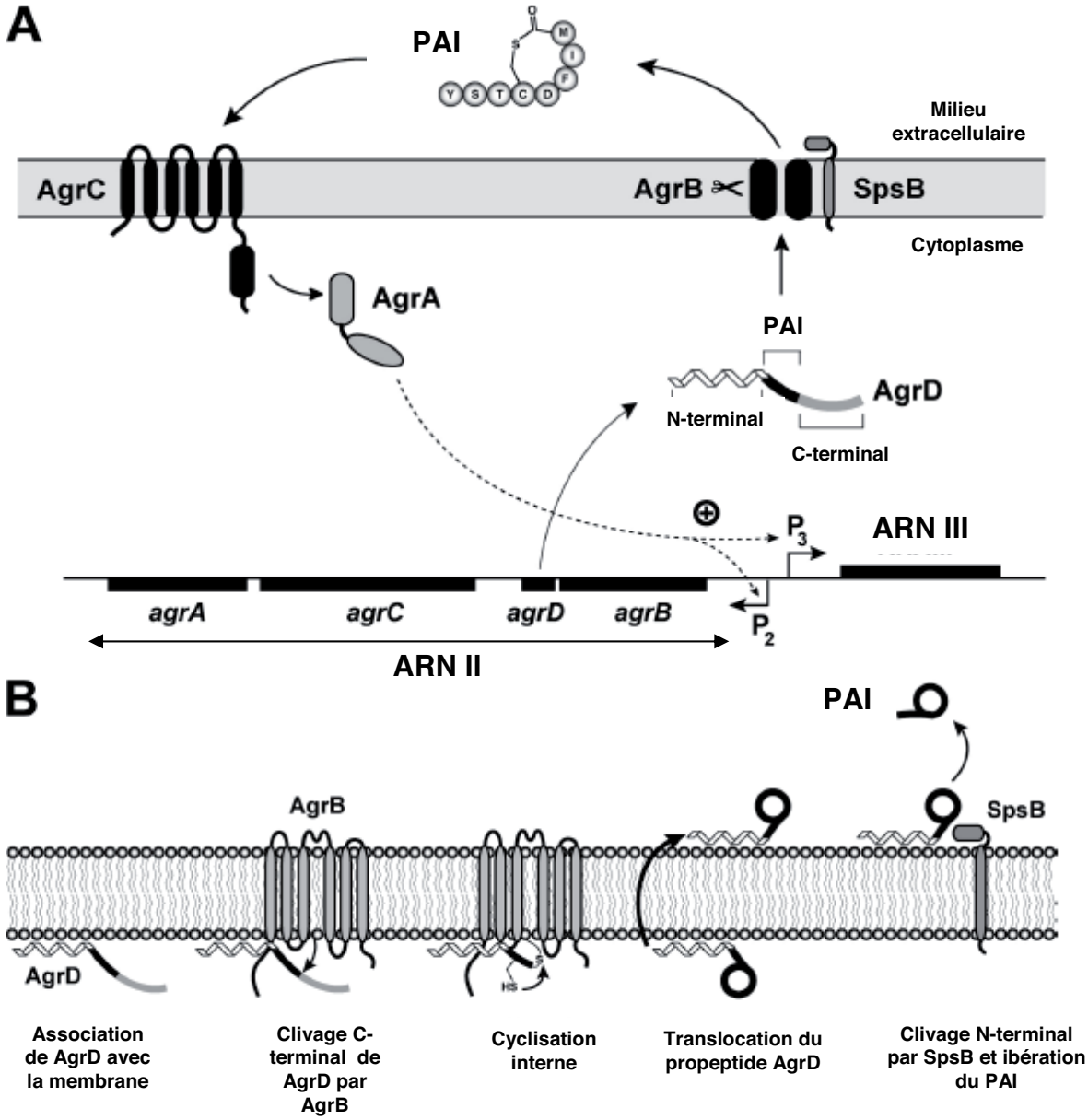


Figure 15: Représentation du locus *agr*, de sa régulation (A) et voie de biosynthèse du peptide signal autoinducteur (B)

D'après Thoendel and Horswill, 2009

Le locus *agr* est composé de unités transcriptionelles divergentes, ARN II et ARNIII. AgrD est le peptide précurseur du peptide autoinducteur (PAI). AgrB et SpsB sont des peptidase permettant la maturation du PAI à partir d'AgrD. AgrC est une histidine kinase membranaire possédant un domaine extracellulaire senseur de PAI. AgrA est le régulateur de réponse associé à AgrC.

propeptide AgrD (Morfeldt *et al*., 1996; Novick *et al*., 1995). Ainsi, au cours d'une infection, à mesure que la concentration bactérienne augmente, la concentration en phéromone s'élèvera ce qui activera d'autant plus la phosphorylation de l'HK AgrC puis par phosphotransfert le RR AgrA, qui ainsi activé, induira la transcription des deux promoteurs P2 et P3 (Figure 15 A).

Pour ce qui est de la phéromone, elle est formée à partir d'une modification d'AgrD, via l'activité d'AgrB, endopeptidase transmembranaire, responsable de la modification puis de la sécrétion de la protéine AgrD en une phéromone « mature » de taille variant de 7 à 9 aa suivant les souches (Ji *et al*., 1995; Ji *et al*., 1997). D'un point de vue mécanistique (Figure 15B), le propeptide AgrD s'associerait à la membrane cytoplasmique par sa partie hydrophobe N-terminale puis AgrB cliverait la partie C-terminale. Un complexe intermédiaire AgrB-AgrD conduirait à la cyclisation d'AgrD par une liaison thio-esther impliquant un résidu cysteine de l'un et l'autre acteur. Ce peptide néocyclisé serait alors déplacé sur la face externe de la membrane cytoplasmique (par AgrB ou une autre protéine, ce mécanisme reste à déterminer) et finalement la signal peptidase de type I SpsB achèverait la maturation du peptide en phéromone fonctionnelle en clivant la partie N-terminale hydrophobe (Thoendel and Horswill, 2009).

4.3.2) Régulation de la production de bactériocines par des TCS

Les bactériocines sont une famille de peptides ou protéines synthétisés naturellement par certaines bactéries. Ce ne sont pas des antibiotiques mais elles possèdent des propriétés bactériocides ou bactériostatiques dont le spectre d'action est variable selon la bactériocine considérée. Les bactériocines jouent un rôle important dans la compétition entre souches bactériennes. Différentes protéines sont impliquées dans la production des bactériocines et de leur régulation. Les bactériocines sont produites sous la forme d'un prépeptide non-biologiquement actif qui subira des modifications post-traductionnelles pour aboutir au peptide actif. Cette production est souvent régulée par un mécanisme de quorum sensing faisant encore une fois intervenir des TCS. Les gènes de biosynthèse des lantibiotiques, une sous-classe de bactériocine (peptides de taille inférieure à 5 kDa, stables à la chaleur et qui contiennent des acides aminés inhabituels soufrés formés post-traductionnellement, c'est-à-dire la lanthionine, la β-méthyl lanthionine, la déhydrobutyrine et la déhydroalanine) ont été désignés par le symbole commun *lan*, avec un nom plus spécifique pour chaque lantibiotique (*nis* pour la nisine par exemple). Le gène de structure, *lanA*, code pour un peptide précurseur du lantibiotique contenant une séquence N-

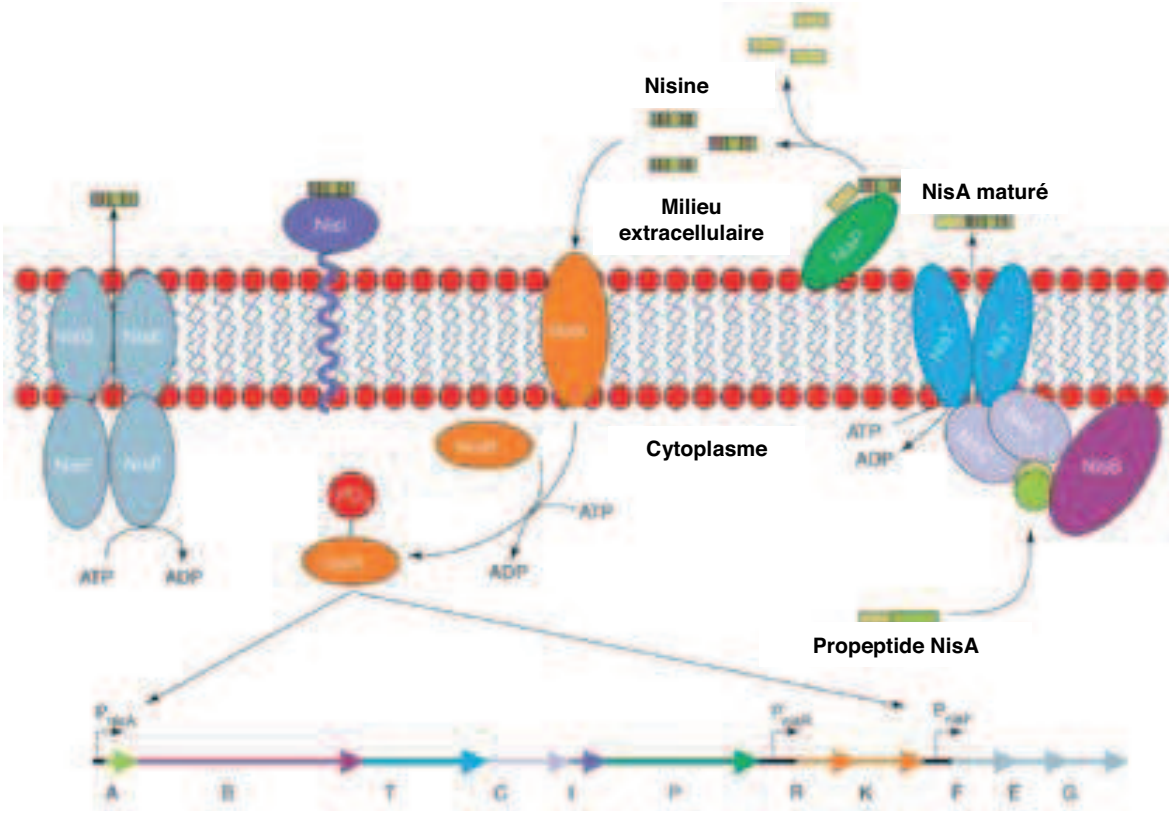


Figure 16: Régulation de la production de nisine et auto-immunité chez *Lactococcus lactis*

D'après Patton and van der Donk, 2005

Les différentes protéines permettant la production et la régulation de la nisine sont représentés ci-dessus. NisA est le propeptide initial conduisant à la formation de nisine après une succession de maturations postraductionelles. Ainsi, NisB et NisC participe respectivement à sa déshydration et cyclisation, NisT et NisC à son exportation sur la face externe de la membrane cytoplasmique. Enfin NisP achève sa maturation en clivant le peptide signal du propeptide ce qui conduit à la production de nisine active. Le RR NisR et l'HK NisK forme le TCS régulant la production de nisine, l'immunité étant assuré par les protéines NisE, NisF, NisG et NisI.

terminale de 23 à 30 acides aminés qui est clivée lors du transport à l'extérieur de la cellule. Ce propeptide subit différentes modifications post-traductionnelles afin d'acquérir les acides aminés inhabituels que sont la lanthionine et la β-méthyllanthionine. Les enzymes impliquées sont une déshydratase et une cyclase codées soit par les gènes *lanB* et *lanC* ou le gène *lanM*. Après ces modifications, le prépeptide sera clivé lors de l'excrétion hors de la cellule par la protéase codée par *lanP* ou le domaine protéasique de l'ABC transporteur codé par le gène *lanT*. Cette dernière modification permettra d'avoir le peptide biologiquement actif (Kleerebezem, 2004; McAuliffe *et al*., 2001; Patton and van der Donk, 2005; Xie and van der Donk, 2004).

Le TCS joue ici un rôle majeur dans la régulation du locus. Ainsi, l'histidine kinase codée par le gène *lanK* réagit à un stimulus extérieur et induit la phosphorylation du régulateur de réponse LanR. Une fois phosphorylé, il va permettre l'activation de l'expression de l'opéron. En fait, le stimulus extérieur est la bactériocine elle-même qui est présente dans la culture à basse concentration en début de croissance. Celle-ci s'accumule et, quand un certain seuil est atteint, elle interagit avec le système de régulation pour activer la transcription du gène de structure mais également de ceux d'immunité et de transport. C'est donc un système autorégulateur (Patton and van der Donk, 2005). Les gènes d'immunités sont *lanI* qui code pour une protéine d'immunité et *lanF*, *lanE* et *lanG* qui codent pour un ABC transporteur. Ces protéines permettent de protéger la bactérie productrice de l'action de sa propre bactériocine.

L'organisation génétique permettant la production d'un lantibiotique, la nisine, produit par *Lactococcus lactis* dont l'utilisation est autorisée dans l'industrie agroalimentaire est montrée ci-contre (Figure 16). NisA est le propeptide non biologiquement actif qui est déshydraté par NisB et cyclisé par NisC avant sa translocation par l'ABC transporteur NisT et le clivage de la séquence signal par la protéase NisP. Ces modifications conduisent au peptide biologiquement actif. La nisine interagit avec l'histidine kinase NisK, ce qui induit à la phosphorylation du régulateur de réponse NisR et l'activation de la transcription des gènes nécessaires à la production de la nisine et à sa propre protection contre l'action de celle-ci. La protection de la cellule vis-à-vis de la nisine est réalisée par deux mécanismes : la lipoprotéine d'immunité NisI et l'ABC transporteur formé par NisG, NisE et NisF.

On retrouve également ce même type de régulation pour nombre d'autres TCS producteurs de bactériocines avec des systèmes de type quorum-sensing impliquant un TCS et un peptide d'induction, le plus souvent co-transcrits (Risoen *et al*., 2000), ainsi

qu'un système de transport et des gènes d'immunité dans la continuité du locus ou proche d'un point de vue génétique.

4.4) Des exemples de TCS répondant à des stimuli multifactoriels

4.4.1) Système PhoP/PhoQ de *Salmonella enterica*

Ce TCS permet la régulation d'un grand nombre de gènes différents, à la fois impliqués dans la virulence de *S. enterica* et dans des résistances aux antibiotiques. PhoQ est un senseur membranaire retrouvé chez de nombreuses bactéries pathogènes à Gram négatif, comme *P. aeruginosa* ou *E. coli* (Kwon and Lu, 2006), et est associé au régulateur PhoP, un RR modèle de type OmpR dans une cascade de signalisation. Ce système est essentiel à la virulence de *S. enterica* chez la souris et l'homme et à la virulence de nombreuses autres bactéries à Gram négatif (Bader *et al*., 2005). Il a été montré que ce TCS co-régule les gènes de virulence et des gènes de résistances aux peptides antimicrobiens cationiques, comme la polymyxine et la magainine (Navarre *et al*., 2005; Shi *et al*., 2004). Des souches délétées du gène *phoP* sont hypersensibles à la magainine 2, à la cécropine A (Groisman *et al*., 1992), aux défensines (Miller *et al*., 1990) et à la polymyxine B (Kox *et al*., 2000). Par ailleurs, le senseur PhoQ module son activité en fonction de la concentration en ions divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} qu'il est capable de lier. Une forte concentration de ces cations inactive le système PhoP/PhoQ alors qu'une faible concentration l'active (Groisman, 2001). Pour faire le lien entre antibiotiques cationiques et ions dicationiques perçus par le système PhoP/PhoQ, une équipe a proposé un modèle d'activation du senseur par ces peptides antimicrobiens en s'appuyant sur le fait qu'une carence en ions dicationiques peut activer le TCS (Bader *et al*., 2005; Garcia Vescovi *et al*., 1996). Les cations divalents interagissent avec la surface acide du domaine détecteur de PhoQ et forment un pont avec les phospholipides membranaires ce qui maintient PhoQ dans une conformation inactive. Les peptides cationiques antimicrobiens interagissent avec les phospholipides membranaires et sont donc proches de l'interface d'interaction des cations divalents avec PhoQ. Ils viennent donc altérer cette interaction en se substituant aux cations divalents. Ceci provoque un changement conformationnel de PhoQ engendrant l'activation du senseur par autophosphorylation. Ce système permettrait ainsi aux salmonelles de reconnaître la position par rapport à leur environnement, soit en milieu extracellulaire soit en milieu intracellulaire.

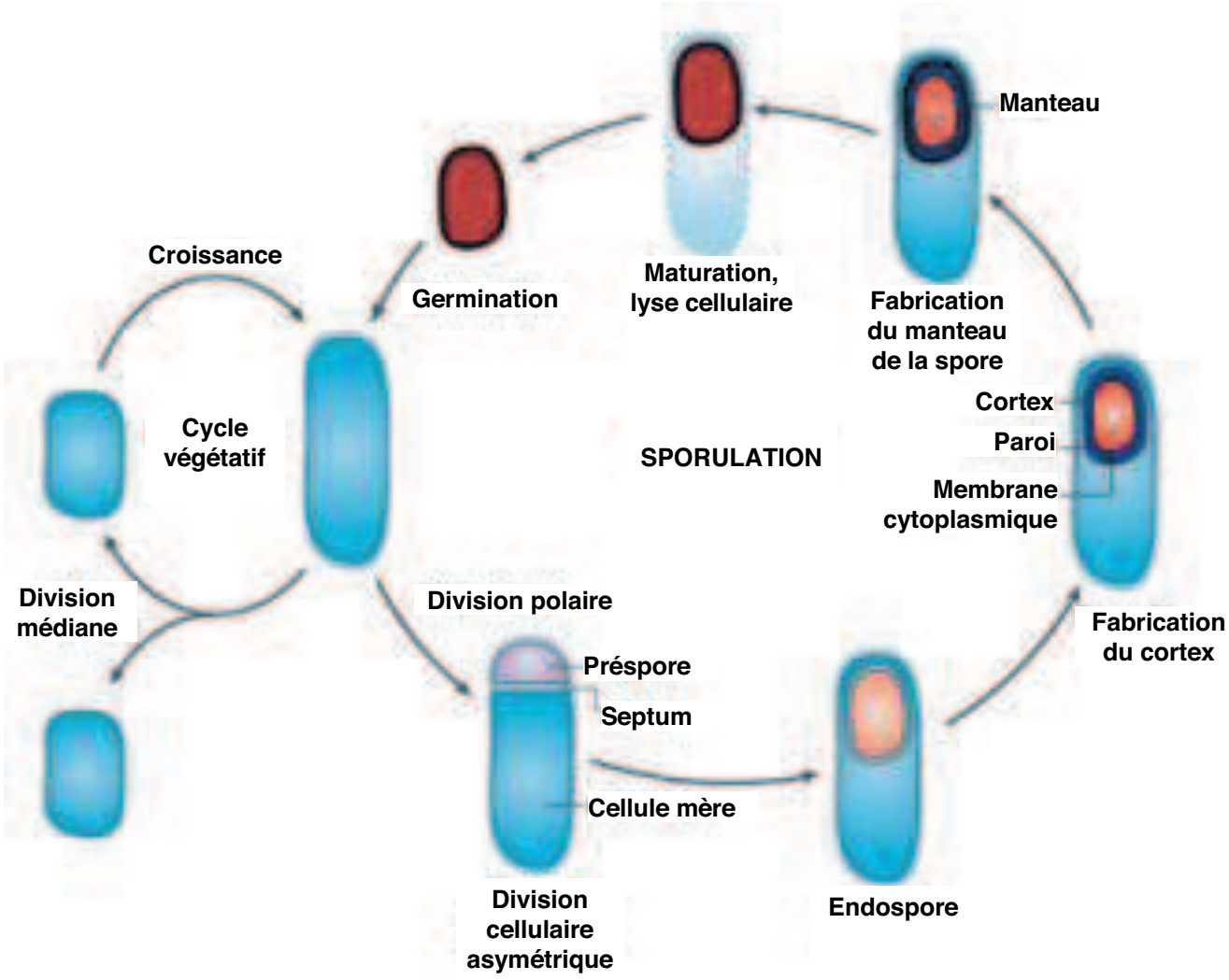


Figure 17: Représentation schématique simplifiée du cycle de sporulation chez *B. subtilis.*

D'après Errington, 2003

4.4.2) La régulation de la sporulation chez *B. subtilis*

Dans une population bactérienne en phase exponentielle de croissance, chaque cellule peut choisir de poursuivre sa croissance ou de s'engager dans le processus de sporulation. Ce phénomène de sporulation est déclenché par l'épuisement des ressources nutritives dans un contexte physico-chimique variable selon les espèces. La sporulation chez *B. subtilis* se déroule en plusieurs étapes. La première consiste en la formation d'une endospore suite à un événement de division asymétrique comme illustré ci-contre (Figure 17). Ensuite, la petite cellule issue de cette division asymétrique s'engouffre dans la plus grande cellule (cellule mère ou sporange) de manière à créer la préspore. S'en suit une série de modifications, qui permettent la maturation de la préspore ainsi que la dégradation de la cellule mère (Errington, 2003). Les voies d'intégration des signaux déclencheurs de la sporulation sont complexes et multiples, et l'une d'entre elles est centrée sur le régulateur de réponse Spo0A qui contrôle plus d'une centaine de gènes. Ces voies de régulation mènent à l'activation de certains gènes spécifiques de la sporulation, tels que *spoIIA, spoIIE* et *spoIIG*. Le second acteur central permettant d'initier la sporulation est le facteur σ^H qui contrôle à lui seul près de 90 gènes (Britton *et al*., 2002). La complexité avec laquelle l'initiation de la sporulation est régulée reflète sans doute le fait que *B. subtilis* doit faire face à des conditions très stringentes dans son milieu naturel qu'est le sol, sans nécessairement initier de façon systématique la sporulation. En fait, la sporulation est sans doute à considérer comme une réponse ultime utilisée uniquement comme dernier ressort permettant à la bactérie de se disséminer et d'attendre un retour à des conditions physiologiques favorables.

Du point de vue régulation, l'initiation de la transcription des premiers gènes de la sporulation est induite par Spo0A. Pour exercer son activité, ce RR doit être phosphorylé. Une fois activé par phosphorylation, Spo0A est capable de se lier à une séquence de 7 bp (TGNCGAA) et d'induire ou de réprimer l'expression de gènes nécessaires à l'initiation de la sporulation. Cette séquence se retrouve dans des promoteurs reconnus par les facteurs sigma végétatif et alternatif, σ^A et σ^H, respectivement. Plus précisément, Spo0A contrôle directement l'expression de 121 gènes, dont approximativement un tiers est induit et le reste réprimé. Parmi ces 121 gènes, 25 codent des régulateurs expliquant l'impact global de Spo0A sur près de 13% du génome de *B. subtilis* (Molle *et al*., 2003). Plusieurs loci sont induits par Spo0A induisant la cascade d'initiation de la sporulation. Parmi ceux-ci, nous retrouvons les facteurs σ^F et σ^E, *spoIIE* codant une phosphatase requise notamment pour l'activation de σ^F et *racA* codant l'effecteur de formation du filament axial. En

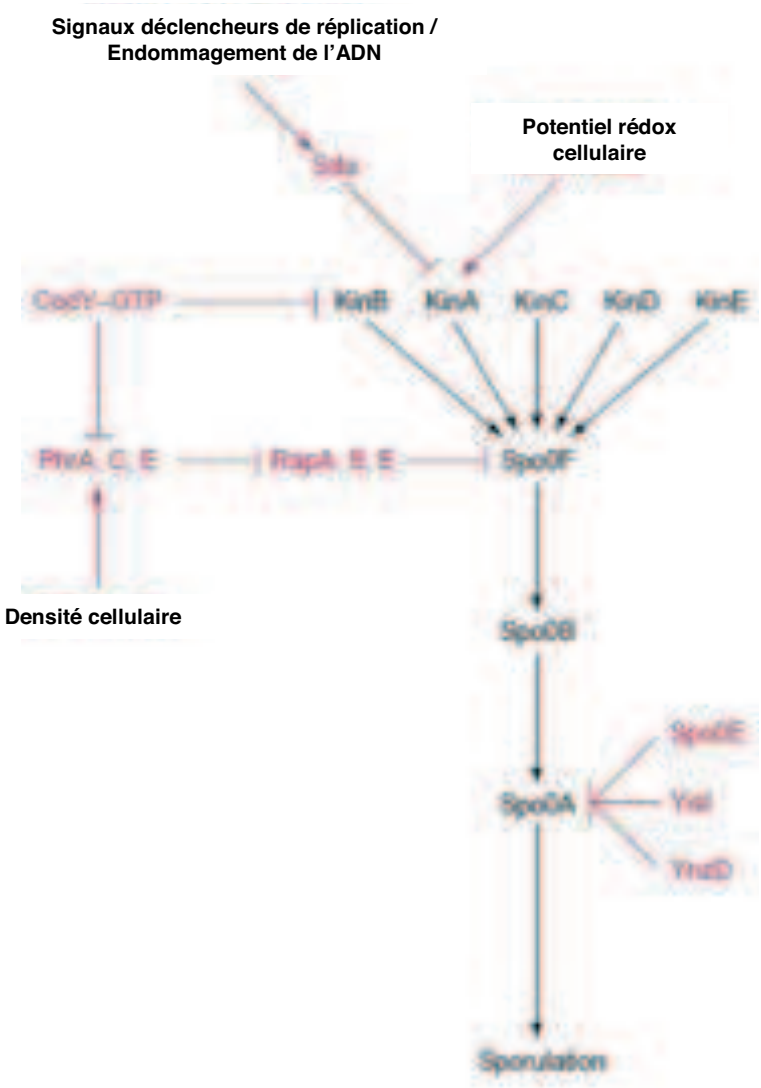


Figure 18: Système de phosphorelais activant la sporulation chez *B. subtilis* (en noir) et modulateurs associés (en rouge)

D'après Piggot and Hilbert, 2004

Une grande variété de signaux nutritionnels et environnementaux sont percus par les HK Kin A,B,C,D et E conduisant à leur autophosphorylation. Leur groupement phosphate est alors transféré sur les RR Spo0F puis Spo0A via la phosphotransférase Spo0B. L'état de phosphorylation des deux RR est par ailleurs contrôlé par des phosphatases Rap agissant au niveau de Spo0F et des phosphatases Spo0E et ses homologues YisI et YnzD au niveau de Spo0A. Lorsque le seuil de Spo0A phosphorylé est atteint, le processus de sporulation est mis en route.

d'autres termes, Spo0A active la synthèse de facteurs impliqués dans le remodelage du chromosome, la division asymétrique et l'expression d'autres gènes non directement liés à la sporulation.

Comme expliqué précédemment, cette régulation séquentielle est contrôlée par l'état de phosphorylation de Spo0A. Un système de phosphorelais complexe centré sur Spo0A et impliquant plusieurs HK et RR a été caractérisé (Piggot and Hilbert, 2004). Cinq HK interviennent en amont de Spo0A, KinA, KinB, KinC, KinD et KinE (Jiang *et al*., 2000), toutes capables de phosphoryler un autre régulateur de réponse particulier, Spo0F. L'ensemble des acteurs intervenant dans la régulation de la sporulation de *B. subtilis* est représenté ci-contre (Figure 18). KinA est probablement l'HK jouant un rôle prépondérant dans l'initiation de la sporulation. Cette HK possède 3 domaines PAS, décrits dans d'autres HKs comme étant des domaines capables de sentir les changements de niveaux d'oxygène disponible et/ou de potentiel redox. Le domaine N-terminal de KinA est capable de lier l'ATP (Stephenson and Hoch, 2001). L'activité de KinA est régulée par la protéine Sda, qui lie KinA pour former un hétérodimère au sein duquel Sda isole le domaine catalytique du domaine de phosphotransfert. Cette liaison a comme conséquence de prévenir l'autophosphorylation de KinA (Rowland *et al*., 2004). L'expression de *sda* est induite en cas de dégradation de l'ADN ou d'inhibition de la réplication, ce qui suggère que Spo0A n'est pas phosphorylé dans ces cas de figure. KinA, ainsi que les 4 autres HK, phosphorylent Spo0F, un RR sans domaine de liaison à l'ADN ne possédant que le domaine REC avec l'aspartate conservé. Le groupement phosphate transitera alors par l'histidine phosphotransférase Spo0B avant d'aboutir au RR Spo0A, l'acteur majeur de la sporulation. Ce système de transduction du signal implique donc trois transferts de phosphate (Hoch and Varughese, 2001). Ce système complexe permet ainsi un contrôle plus fin du phosphorelais à différents niveaux dans la voie de phosphorylation.

Plusieurs régulateurs exercent une fonction répressive sur les différents acteurs de cette cascade de phosphorylation, favorisant ainsi la forme végétative. Tout d'abord la phosphatase Spo0E, dont le système de régulation est moins connu et qui empêche la phosphorylation de Spo0A (Ohlsen *et al*., 1994), ainsi que deux de ces homologues, YisI et YnzD (Perego, 2001). Au moins trois autres phosphatases agissent sur Spo0F, les protéines RapA, RapB et RapE dont l'activité est contrôlée respectivement par les peptides PhrA, PhrC (aussi appelée CSF pour Competence and Sporulation stimulating Factor) et PhrE (Jiang *et al*., 2000; Perego, 1997). Les gènes *phr* codent des peptides d'une quarantaine d'acides aminés portant un peptide signal d'exportation par la machinerie Sec. Les

protéines Phr sécrétées sont alors clivées par des peptidases non identifiées pour donner un pentapeptide de séquence ARNQT pour PhrA, ERGMT pour PhrC et SRNVT pour PhrE (Stephenson *et al*., 2003). Ces pentapeptides, une fois réinternalisés, vont exercer une fonction répressive spécifique de mécanisme inconnu sur les protéines Rap. En d'autres termes, les protéines Rap se dissocient de Spo0F en présence de pentapeptides, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'état de phosphorylation de Spo0F, et donc celui de Spo0A (Ishikawa *et al*., 2002). En inhibant l'activité de ces phosphatases, les peptides Phr favorisent donc le déclenchement du processus de sporulation. Enfin, un autre mécanisme de contrôle se situe au niveau de la concentration en GTP et GDP qui est critique pour l'initiation de la sporulation. CodY joue un rôle central dans ce mécanisme en tant que senseur du niveau de GTP, puisqu'en présence d'une faible concentration en GTP, CodY lève la répression des gènes *phrA*, *phrE* et *kinB*. CodY joue dès lors un rôle central dans la voie de phosphorylation de Spo0A contrôlant le flux de phosphate à différents niveaux en fonction de la concentration en GTP (Ratnayake-Lecamwasam *et al*., 2001).

4.5) Conclusion

Tous ces exemples montrent bien que la voie de transduction du signal entre l'HK et le RR est loin d'être simple et qu'il existe nombre d'éléments modulateurs de l'activité du TCS, aussi bien au niveau du RR que sur l'HK. Même si la liste des exemples est loin d'être exhaustive, elle suffit à démontrer l'incroyable finesse des processus de régulation des TCS avec une importante modularité des acteurs qui en font véritablement des systèmes à multi-composants (autre que les phosphorelais comme le système Spo0A décrit précédemment) comme c'est le cas par exemple pour la production d'une bactériocine. Nous avons vu également que deux TCS pouvaient intervenir sur une même voie métabolique avec l'exemple des systèmes Nar d'*E. coli* mais également qu'un même TCS peut contrôler plusieurs fonctions physiologiques (cas de PhoP/ PhoQ). Mais peut-on généraliser ces observations relevées sur des bactéries appartenant à des phyli bien différents sur des bactéries appartenant à une même famille ? Dans la partie suivante, nous nous intéresserons plus particulièrement aux études concernant les principaux TCS des streptocoques avec l'objectif de déterminer quelles sont les grandes fonctions physiologiques régulées par ces TCS.

5) Grandes fonctions régulées par les TCS des streptocoques

Dans la partie précédente nous avons donné une illustration de la diversité des fonctions régulées par les TCS dans les génomes microbiens en général. Les exemples proposés avaient trait pour la plupart à des fonctions bien précises, souvent caractéristiques du genre bactérien voire même de l'espèce considérée (*Deinococcus radiodurans,* par exemple). Néanmoins, qu'en est-il dans un phylum plus restreint où la variabilité de taille des génomes et de complexité d'environnements est moindre ? Retrouve-t-on nécessairement entre deux bactéries phylogénétiquement proches les mêmes TCS ? Si c'est le cas, les régulons sont-ils les mêmes ? Existe-t-il des TCS spécifiques de certaines espèces de streptocoques ?

Cette section se propose d'apporter des éléments de réponse à partir d'exemples de TCS de différentes espèces de streptocoques, pathogènes ou non. Voici donc une synthèse bibliographique de quelques-uns de ces systèmes qui sont souvent dénommés de façon différente selon les espèces.

5.1) TCS impliqués dans la virulence des streptocoques pathogènes

5.1.1) CovR, régulateur global des facteurs associés à la virulence

Un des systèmes les plus étudiés chez les streptocoques et plus particulièrement chez les pathogènes est le système CovRS, aussi appelé CsrR (pour capsule synthesis regulator). Comme son nom l'indique, il réprime l'expression de la synthèse de la capsule (via l'opéron *has*) chez les streptocoques du groupe A (GAS) (Levin and Wessels, 1998) mais aussi d'une grande variété de gènes associés à la virulence ou favorisant la dissémination bactérienne chez l'hôte (Federle *et al*., 1999). Parmi ceux-ci on retrouve des gènes codant des adhésines, des enzymes extracellulaires telles SpeB, Ska et SagA ainsi que des protéines de réponses aux stress (DnaJ, DnaK et GrpE).

De plus, CovRS régule d'autres TCS tels que CiaR/H, IhR/K et TrxR/S (dont nous reparlons plus loin) mais aussi d'autres régulateurs plus généraux contribuant ainsi à la grande variété de fonctions contrôlées directement ou non par CovRS. Au final, puisqu'il module la transcription d'environ 15% du potentiel génomique des GAS dans la très grande majorité de façon répressive (Graham *et al*., 2002), il est considéré comme un système globalement répresseur. D'ailleurs, des modèles d'infection chez la souris

montrent une plus grande virulence des mutants dépourvus du système CovRS (Engleberg *et al*., 2001).

D'un point de vue plus « mécanistique », des auteurs ont montré que la concentration en magnésium influe l'activité de CovR (Gryllos *et al*., 2003; Gryllos *et al*., 2007). En effet chez les GAS, CovR est réprimé pour des concentrations faibles en Mg^{2+} correspondant à celles retrouvées dans le sang ou les sécrétions mucosales. A l'inverse, le système est exprimé lorsque la concentration atteint 10mM. Voilà qui explique pourquoi les gènes de virulence sont particulièrement exprimés *in vivo* puisqu'il y a levée de la répression de CovR pour cette concentration.

On notera néanmoins que chez les streptocoques du groupe B, contrairement aux GAS, le système est à la fois activateur et répresseur. Il est intéressant de constater que le système répond aux changements de pH (Santi *et al*., 2009) et que dans ce cas, son inactivation atténue sa virulence (Lamy *et al*., 2004). On peut donc penser que ces différences d'activation du système reflètent une adaptation différente à l'environnement des souches de streptocoques, GAS ou GBS, notamment au cours de l'infection de l'hôte. D'ailleurs des mutations ponctuelles du système CovR/S ont été observées parmi des isolats cliniques de GAS très hétérogènes du point de vue de leur virulence (Aziz *et al*., 2010; Sumby *et al*., 2006; Trevino *et al*., 2009).

S. mutans possède un RR orphelin orthologue à CovR nommé GcrR qui joue un rôle important dans la formation de biofilm et la virulence en régulant positivement la transcription de gènes tels que des glycosyltransférases (GtfB/C) ainsi que des protéines de liaisons aux glucanes (GbpC).

En effet, l'expression de ces gènes s'avère cruciale pour que la bactérie adhére à la surface dentaire et enclenche la cariogenèse (Biswas and Biswas, 2006; Matsumoto-Nakano *et al*., 2007; Stipp *et al*., 2008; Zafar, 2003). Par ailleurs, on notera que l'expression de *covR* est maximale en fin de phase exponentielle et qu'elle est stimulée en présence de magnésium ou d'un pH légèrement alcalin (7.2) proche de celui quelle rencontre dans la salive. Il a été aussi montré que CovR peut induire l'expression de gènes impliqués dans la tolérance au stress acide. Ainsi, le système CovR contribue à la pathogénicité de *S. mutans* puisqu'il lui confère à la fois une meilleure résistance au stress acide ainsi qu'une meilleure capacité d'adhérence à la surface dentaire. Une dernière étude portant sur le régulon de CovR chez *S. mutans* confirme la régulation de gènes associés à la virulence mais également de compétence (Dmitriev *et al*., 2011).

Enfin, on retrouve également un RR orphelin orthologue à CovR chez *S. pneumoniae*, RitR (regulator of iron transport), lui aussi impliqué dans la virulence. En effet, l'inactivation de celui-ci réduit d'un facteur 100 la population bactérienne retrouvée dans un modèle murin (Throup *et al*., 2000). Cette contribution à la virulence a par la suite été confirmée par une étude qui montrait de plus qu'elle était tissu-dépendante, le mutant se développant moins bien que la souche sauvage dans le poumon mais pas après injection dans la cuisse. Les auteurs ont par ailleurs montré que RitR réprime des gènes permettant l'importation de fer. En effet la concentration en fer intracellulaire doit être limitée pour éviter la production de ROS via la réaction de Fenton. L'étude montre également que l'expression d'autres gènes impliqués dans la réponse aux stress oxydant est altérée dans le mutant RitR.

5.1.2) TrxR/S, système de virulence contrôlé par CovR

Ce système décrit récemment chez les GAS est lui aussi impliqué dans la virulence. Un mutant déficient pour celui-ci présente une virulence atténuée sur un modèle murin. Il contrôle l'expression de MgA, un activateur transcriptionnel des gènes de virulence chez les GAS. Les auteurs ont montré par ailleurs qu'il est réprimé par CovR (Leday *et al*., 2008).

5.1.3) FasBCAX, système régulateur de l'adhérence aux cellules épithéliales

Le système FasBCAX (fibronectin binding haemolytic activity streptokinase regulator) présente une structure particulière car il possède deux HKs, FasB et FasC, et FasA comme RR lui permettant donc potentiellement d'intégrer différents signaux pour s'adapter efficacement. On sait par exemple que l'expression des gènes FasBCA varie lorsque la température passe de 29°C à 37°C (Sitkiewicz and Musser, 2006). L'opéron Fas présent chez les GAS contrôle lui aussi l'expression de facteurs de virulence tels que des adhésines. En outre, le système Fas, à l'instar du système Agr présenté précédemment, est lui-même contrôlé par un ARN régulateur non traduit de 300 nucléotides appelé FasX (Kreikemeyer *et al*., 2001). Ainsi ce système contribue à la virulence de *S. pyogenes* (Klenk *et al*., 2005).

5.1.4) Ihk/ Irr, système contournant le système immunitaire

Ce système est lui aussi impliqué dans la virulence puisqu'il permet aux souches pathogènes le possédant d'échapper d'une certaine façon au système immunitaire. En effet,

il contrôle l'expression de gènes le protégeant des globules blancs, plus précisément des polynucléaires neutrophiles (Federle *et al*., 1999; Voyich *et al*., 2003). Il réprime des gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi, la réponse au stress oxydant et la virulence. Un mutant du système est d'ailleurs plus sensible au peroxyde d'hydrogène ainsi qu'aux granules des polynucléaires neutrophiles (Musser and DeLeo, 2005; Voyich *et al*., 2003).

5.1.5) SilA/B, système impliqué dans la virulence

Le locus Sil (*streptococcus* invasive locus) est présent chez 18% des isolats cliniques des GAS. Ce système possède une architecture particulière composé du TCS (SilA, SilB), d'un ABC transporteur (SilD,SilE) et de deux petites ORF codant pour des petits peptides (SilC et SilCR). Cette structure rappelle celles des systèmes impliqués dans la compétence (Com) et dans la production de bactériocines (Blp). D'ailleurs, il s'avère que le système Sil fonctionne également comme un système de quorum sensing. Ainsi, le peptide SilC agirait comme un activateur transcriptionnel du gène *silC* mais aussi de facteurs de virulence tels l'opéron *blp* et la streptolysine ainsi qu'une transposase favorisant potentiellement les remaniements génétiques lors de l'infection microbienne. L'originalité du système réside dans le fait que la transcription de *silC* est réprimée par SilCR, le peptide complémentaire et chevauchant (Kizy and Neely, 2009; Salim *et al*., 2008). Des études ont par ailleurs montré qu'il pouvait y avoir cross-sensing de SilCR entre deux espèces pathogènes ce qui pourrait influencer la capacité de ces bactéries à coloniser leur hôte (Eran *et al*., 2007).

5.2) TCS impliqués dans la physiologie générale bactérienne

5.2.1) CiaR/H et compétence

Le système Cia fut le premier identifié chez les pneumocoques. L'influence de ce TCS sur la physiologie du pneumocoque est complexe et variée puisque des études ont montré son implication dans la virulence, la compétence et la résistance à des antibiotiques (Dagkessamanskaia *et al*., 2004; Dawid *et al*., 2009; Guenzi *et al*., 1994; Mascher *et al*., 2006a; Sebert *et al*., 2005). Ainsi, l'analyse de cellules prêtes à être transformées suggère que CiaRH protège les cellules du stress lié à la mise en place du phénomène de compétence (Dagkessamanskaia *et al*., 2004). En l'absence de CiaR, les cultures présentent une autolyse accrue en réponse à l'induction de la compétence. Son rôle dans la virulence a

été démontré par plusieurs études travaillant à partir de mutants délétés pour ce système. La cible principale du système est sans conteste HtrA, une sérine protéase de réponse au stress induit par CiaR, permettant au pneumocoque de croître à des températures plus élevées, de résister au stress oxydant et de favoriser la transformation. Le fait qu'un mutant CiaRH dont l'expression de *htrA* est restaurée retrouve son niveau de virulence initial suggère que HtrA est un facteur clé de virulence, son rôle exact restant encore à éclaircir (Ibrahim *et al*., 2004).

A côté de cela, le système Cia semble impliqué également dans le métabolisme des acides téchoïques largement responsable de la charge globalement négative de la paroi des pneumocoques. En effet, une étude a montré qu'il module également l'expression des opérons *dlt* et *lic*, impliqués respectivement dans l'incorporation d'alanine et de choline dans les acides téchoiques du pneumocoque (Mascher *et al*., 2003).

Enfin, une analyse transcriptomique globale récente confirme l'ensemble de ce régulon tout en identifiant en plus 5 petits ARNs non codants (Halfmann *et al*., 2007). Ceux-ci sont particulièrement induits par CiaR et semblent, pour deux d'entre eux du moins, contribuer à la résistance à la lyse des cellules en phase stationnaire. Leur rôle physiologique exact reste encore à éclaircir.

On notera par ailleurs que *S. mutans* possède la particularité d'avoir un troisième composant, CiaX en amont du TCS correspondant à un peptide de 87 acides aminés liant efficacement le calcium et modulant la régulation du système via l'HK CiaH d'une manière qui reste encore à éclaircir (He *et al*., 2008). Néanmoins, il est clair que l'opéron est réprimé en présence de calcium pour des concentrations de l'ordre de 0.5mM.

A l'instar des études menées chez *S. pneumoniae*, celles conduites chez *S. mutans* ont également montré l'implication du système CiaRH dans la compétence, la tolérance au stress acide et la production de mutacine (Qi *et al*., 2004).

Il est intéressant de constater que tous ces phénotypes ont été observés sur un mutant de l'HK CiaH, la physiologie des mutants du RR CiaR et du double mutant CiaRH n'étant nullement affectée. Récemment, une étude a permis de mieux comprendre cette régulation peu banale. En effet, il se trouve qu'en réalité, l'HK CiaH réprime environ 25 fois l'expression de *ciaR*. Les auteurs ont par la suite démontré par transcriptomique que les phénotypes observés pour un mutant CiaH correspondaient rigoureusement à ceux retrouvés pour une souche surproductrice de CiaR (Wu *et al*., 2010). Enfin, la séquence consensus reconnue par CiaR de *S. mutans* a été mise en évidence et correspond à une séquence répétée, NTTTAAG-N5-WTTAAG, qui est d'ailleurs très proche de celle,

TTAAG-N5-TTAAG déterminée antérieurement chez *S. pneumoniae* (Halfmann *et al*., 2007).

5.2.2) WalR/K et métabolisme de la paroi

Le système WalR/K de *S. aureus* (Dubrac *et al*., 2007), fut le premier TCS décrit comme étant essentiel chez les bactéries à Gram + (Fabret and Hoch, 1998). Il est d'ailleurs retrouvé chez tous les Lactobacillaceae ; néanmoins quelques études ont démenti son essentialité notamment chez *L. lactis* (O'Connell-Motherway *et al*., 2000) et *S. gordonii* (Liu and Burne, 2009) où des mutants de *walR* (ou *yycF*) restent viables.

Chez *B. subtilis*, il a tout d'abord été montré que ce système régule directement l'opéron *ftsAZ* dont les gènes sont impliqués dans la division cellulaire mais ceci ne suffisait pas à expliquer le caractère essentiel de *yycF/G* ou *walR/K* (Fukuchi *et al*., 2000). Plus tard, d'autres auteurs ont montré qu'YycF ou WalR est capable d'activer l'expression de *yocH* codant une autolysine. Cette activation semble avoir lieu seulement lors de la phase exponentielle de croissance, ce qui suggère que le signal activant le système à deux composants est présent uniquement durant cette phase. La séquence reconnue par le régulateur YycF a été déterminée et un régulon potentiel a été identifié ; il comporte des gènes impliqués dans le métabolisme de la paroi et la synthèse de protéines membranaires (Bisicchia *et al*., 2007; Howell *et al*., 2003; Szurmant *et al*., 2007a). Depuis, une étude a montré que le gène *yycJ* présente un domaine β-lactamase caractéristique d'enzymes inhibant les β- lactamines qui inhibent la synthèse et la polymérisation des peptidoglycanes (Biller *et al*., 2011).

5.3) TCS contribuant à l'adaptation des streptocoques à leur niche écologique

5.3.1) RelR/S ou SptR/S : adaptation à la salive

Ce système est présent chez les espèces pathogènes ou pathogènes opportunistes *S. mutans, S. salivarius, S. gordonii, S. agalactiae, S. pyogenes, S. sanguinis* et *S. gallolyticus*. Son rôle a pour la première fois été mis en évidence lors d'une étude transcriptomique de l'adaptation à la salive de *S. pyogenes*. Le RR et l'HK étant particulièrement exprimés en phase stationnaire, les auteurs ont construit un mutant du RR et ont montré que celui-ci est essentiel à la survie du streptocoque, non pas dans un milieu

riche ou semi-synthétique mais uniquement dans la salive (Shelburne *et al*., 2005). Les analyses post-génomiques menées par la suite ont montré que le RR induit l'expression des facteurs clés de colonisation et d'infection de l'oropharynx mais aussi de protéines impliquées dans l'acquisition et l'utilisation de sucres complexes. En conséquence, les auteurs ont nommé le système *spt* pour saliva persistence, *sptR* et *sptS* correspondant respectivement au RR et à l'HK.

Plus récemment, un lien entre RelR/S, le système orthologue étudié chez *S. mutans*, et la production de l'alarmone (p)ppGpp a été établi (Lemos and Burne, 2008). En effet, une des stratégies qu'utilisent les bactéries pour faire face aux variations de disponibilité des nutriments implique la production de ce type d'alarmones pour déclencher ce qui est communément appelé la « réponse stringente ». Celle-ci entraine la répression de gènes de biosynthèse des complexes macromoléculaires (à hauts coûts énergétiques) et à l'inverse l'induction de gènes permettant la dégradation des protéines, la synthèse d'acides aminés et la tolérance aux stress (Potrykus and Cashel, 2008).

La majorité des bactéries à $Gram^+$ produit l'alarmone (p)ppGpp par l'intermédiaire d'une seule enzyme, RelA, à partir de GTP et GDP. Toutefois *S. mutans* ainsi que les autres espèces citées précédemment possèdent en plus de RelA, deux autres protéines, RelP et RelQ (Lemos *et al*., 2007), RelP étant de façon remarquable cotranscrit avec le TCS RelRS. Les auteurs ont par la suite montré que le système RelR/S active l'expression de RelP ce qui suggère que *S. mutans* pourrait moduler la quantité de (p)ppGpp en réponse à des stimuli, probablement liés aux stress oxydants. En effet les auteurs ont montré qu'une souche délétée pour RelP présente un meilleur taux de croissance en présence de paraquat et proposent en conséquence que la production de l'alarmone en présence d'un stress oxydant via le système RelR/S permette à la cellule de ralentir sa croissance et privilégier la réponse au stress oxydant.

Prises ensembles, ces études menées sur ces deux systèmes orthologues suggèrent très fortement que ce TCS confère une meilleure compétitivité aux streptocoques le possédant, en les rendant plus réactifs face aux stress oxydant ou de nature nutritionnel qu'ils rencontrent fréquemment dans leur niche écologique, notamment dans la salive.

5.3.2) BfrA/B : formation de biofilms

Chez les streptocoques oraux, la formation de biofilms s'avère cruciale pour s'implanter sur la surface des dents et former ainsi la plaque dentaire qui abrite plusieurs dizaines ou centaines d'espèces microbiennes. Le système BfrAB est un exemple de TCS contribuant à la persistance dans cette niche écologique particulière via la formation de biofilm. Ce système est d'ailleurs retrouvé exclusivement chez des streptocoques capables de coloniser la cavité buccale tels que *S. mutans, S. mitis, S. sanguinis* et enfin *S. gordonii* chez qui ce TCS a été pour la première fois mis en évidence. Ainsi, un mutant Bfr n'est plus capable de former un biofilm *in vitro*. A coté de cela, des suivis de l'expression du transcrit *bfrAB* ont permis de constater que celle-ci est dépendante de la phase de croissance et que le système est plus exprimé en phase stationnaire (Zhang *et al*., 2004). Plus récemment, une étude transcriptomique montre que BfrAB régule positivement l'expression de deux ABC transporteurs, BfrCD et BfrEFG ainsi que d'une métalloprotéase potentielle BfrH. Les molécules transportées ou maturées par ces protéines ne sont pas connues à ce jour tout comme le ou les signau(x) perçu(s) par l'histidine kinase BfrB (Zhang *et al*., 2009). Quoiqu'il en soit, il est clair que ce système confère un avantage sélectif pour les souches le possédant et il est d'ailleurs intéressant de constater que les espèces possédant BfrAB correspondent aux premiers colonisateurs de la surface dentaire.

5.3.3) LevR/S : métabolisme des sucres

Le métabolisme des sucres est capital pour *S. mutans* pour qu'il puisse s'implanter et persister dans la bouche et plus particulièrement à la surface dentaire. Les systèmes PTS permettent classiquement aux microorganismes de transporter rapidement une grande variété de sucres. En plus de tout cela, *S. mutans* produit des polysaccharides extracellulaires qui lui permettent d'accroître, sous la forme de biofilm, son efficacité de colonisation. Ainsi *S. mutans* possède 3 glucosyltransférases pour convertir le glucose sous la forme de polymères de glucanes, éléments fondateurs permettant la formation du biofilm. Cette bactérie produit également des polymères de fructanes qui lui servent de réserve énergétique au sein du biofilm. Ceci est rendu possible par l'action de fructosyltransférases à partir de fructose. L'opération inverse, lorsque nécessaire, est réalisée par la fructosidase FruA qui dépolymérise les polymères de fructane en fructoses. Des études ont ainsi montré que la fructosidase FruA, augmente la quantité d'acide produit dans le temps, contribuant ainsi à la persistance de *S. mutans* qui résiste mieux à l'acidité que les autres espèces environnantes comme *S. gordonii* et *S. mitis* (Zeng *et al*., 2006).

L'expression de *fruA* est sensible à la répression catabolique ce qui signifie qu'elle est réprimée en présence de sucres rapidement assimilables comme le glucose. L'induction de *fruA* est contrôlée par un système à quatre composants faisant intervenir deux protéines affines aux sucres extracellulaires (LevQ, LevT) avec un TCS formé par l'HK LevS et le RR levR. Chacun des gènes est requis pour activer *fruA* et une concentration basse en fructose, le produit final de la réaction catalysée par FruA sur les polymères de fructanes sert de signal inducteur. D'ailleurs, ce système contrôle également l'activation des gènes du complexe enzyme II de la voie PTS fructose/mannose (LevD, LevE, LevF et LevG) qui sont codés par les gènes situés en aval du système LevQRST (Zeng and Burne, 2008). Les auteurs ont pu aussi mettre en évidence une répression de *fruA* par un homologue de CcpA se fixant au site conservé CRE (catabolite response element) de la région promotrice de *fruA*.

5.3.4) BceABRS : résistance à la bacitracine

Le système BceABRS récemment caractérisé chez *S. mutans* (Ouyang *et al*., 2010), permet, à l'instar de son homologue chez *B. subtilis*, de résister à la bacitracine, un polypeptide cyclique inhibant le recyclage d'un composé essentiel à la synthèse de la paroi, l'undecaprenyl pyrophosphate. Comme son nom l'indique, ce système forme en réalité un système à 4 composants codé dans un même opéron, le TCS étant associé à un ABC transporteur composé de deux protéines. Chacun des gènes joue un rôle dans cette résistance, les mutants individuels étant plus sensibles que la souche sauvage. Plus précisément, l'histidine kinase BceS détecte la présence de bacitracine, puis phosphoryle BceR, augmentant ainsi son affinité d'environ 20 fois pour une séquence inversée répétée retrouvée en amont de l'opéron BceABRS. Ainsi BceRS contrôle positivement son propre opéron en réponse à la bacitracine. De plus, le fait que des cellules dépourvues de l'ABC transporteur BceAB, malgré la présence de BceRS, ne présentent plus aucune induction en présence de bacitracine suggère que la perception de la bacitracine par le TCS requiert la présence du transporteur. BceAB jouerait donc, en plus de son rôle de pompe de détoxification, un rôle de co-senseur du TCS. Ainsi, la détoxification opérée par le transporteur éliminerait progressivement le stimulus jusqu'à éteindre la réponse du TCS dès que la concentration en bacitracine est inférieure à une valeur seuil.

Si on se place à présent du point de vue « écosystème », l'existence d'un tel système permettrait aux streptocoques d'assurer une défense efficace contre des bactéries

productrices de bacitracine qui pourraient être présentes transitoirement dans la bouche à partir d'eau ou d'aliments contaminés.

5.3.5) le locus Blp de *S. thermophilus* : production d'une bactériocine

Chez *S. thermophilus*, seul un TCS a été caractérisé. Ce locus Blp contenant le TCS09 de la souche LMD-9 de *S. thermophilus* est impliqué dans la production de bactériocines (Fontaine *et al*., 2007). Chez cette souche, le locus Blp contient toute l'information génétique nécessaire pour la production de la thermophiline 9 et des gènes lui conférant l'immunité contre celle-ci. Il est régulé au niveau transcriptionnel par un mécanisme de quorum-sensing qui fait intervenir la phéromone BlpC maturée et exportée par un ABC transporteur dédié et le système à deux composants BlpRH (Fontaine *et al*., 2007). Le spectre d'inhibition de la thermophiline 9 est assez ciblé puisque la bactériocine est active sur des bactéries à Gram positif proches phylogénétiquement (Fontaine and Hols, 2008). Ainsi, presque toutes les autres souches de *S. thermophilus* testées, mais aussi des souches des espèces *S. salivarius*, *E. faecalis* et *L. lactis* sont inhibées par cette bactériocine. Ce système permettrait donc à la souche LMD-9 d'être plus compétitive dans sa niche écologique naturelle qu'est le lait en inhibant un certain nombre de bactéries indésirables voire pathogènes.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

CHAPITRE 1 :

Caractérisation générale des TCS de S. thermophilus LMD-9

1) Analyse *in silico*

1.1) Les TCS de la famille des Streptococcacae

1.1.1) Introduction à l'analyse

Dans la section bibliographique précédente, nous avons donné une illustration de la diversité des TCS des génomes microbiens en général, tant au niveau des fonctions qu'ils contrôlent que des mécanismes qui régissent leur activité. Nous nous sommes intéressés par la suite aux principales études portant sur les TCS de la famille des *Streptococcacae*, la plupart concernant les espèces pathogènes. Ceci nous a permis de confirmer qu'il existe des TCS assurant tout aussi bien des fonctions métaboliques vitales (la division cellulaire par exemple) que des fonctions supplémentaires conférant aux streptocoques des propriétés de virulence ou d'adaptation à un environnement particulier. Ces simples observations nous amènent à la question de savoir plus précisément quels sont les TCS les plus communément retrouvés dans cette famille mais aussi de mettre en évidence les plus atypiques. Cette section se propose d'apporter des éléments de réponses à cette question à travers un recensement de l'ensemble des protéines appartenant aux TCS de la famille des *Streptococcaceae*. Cette famille, comprenant des bactéries ayant des génomes de petite taille (~2Mpb), est particulièrement propice à une analyse exhaustive. De plus, cette famille comprend des streptocoques et des lactocoques comprenant à la fois des bactéries pathogènes et non pathogènes dont les bactéries lactiques *S. thermophilus* et *L. lactis*. Cette analyse permet ainsi de cribler l'ensemble des TCS des *Streptococcacae* pour dissocier les TCS hautement conservés de ceux propres à une espèce bactérienne ou en lien avec une niche écologique particulière. Enfin, cette analyse permet également de positionner les TCS de *S. thermophilus* dans l'ensemble des TCS de cette famille.

CODE LOCUS_TAG	NOM DU GENOME	TAILLE (Mpb)	NOMBRE DE GENES
llmg	*Lactococcus lactis cremoris* MG1363	2.53	2624
LACR	*Lactococcus lactis cremoris* SK11	2.60	2617
L0	*Lactococcus lactis lactis* Il1403	2.37	2434
LLKF	*Lactococcus lactis lactis* KF147	2.64	2560
SAG	*Streptococcus agalactiae* 2603V/R	2.16	2246
SAK	*Streptococcus agalactiae* A909, ATCC BAA-1138	2.13	2152
gbs	*Streptococcus agalactiae* NEM316	2.21	2257
SDEG	*Streptococcus dysgalactiae equisimilis* GGS_124	2.11	2167
SEQ	*Streptococcus equi equi* 4047	2.25	2095
SZO	*Streptococcus equi zooepidemicus* H70	2.15	1961
GALLO	*Streptococcus gallolyticus* UCN34	2.35	2312
SGO	*Streptococcus gordonii* Challis CH1	2.20	2149
smi	*Streptococcus mitis* B6	2.15	2095
SMU	*Streptococcus mutans* UA159	2.03	2059
SPD	*Streptococcus pneumoniae* D39	2.05	2090
spr	*Streptococcus pneumoniae* R6	2.04	2141
SP	*Streptococcus pneumoniae* TIGR4	2.16	2298
Spy	*Streptococcus pyogenes* M1, GAS SF370	1.85	1830
SpyM5	*Streptococcus pyogenes* M2, MGAS10270	1.93	2091
MGAS10270_Spy	*Streptococcus pyogenes* M3, MGAS315	1.90	1971
MGAS10750_Spy	*Streptococcus pyogenes* M4, MGAS10750	1.94	2085
SpyM3	*Streptococcus pyogenes* Manfredo (M5)	1.84	1915
STRSA	*Streptococcus salivarius* SK126	2.13	2029
SSA	*Streptococcus sanguinis* SK36	2.39	2367
SSU	*Streptococcus suis* P1/7	2.01	1905
SSUSC84	*Streptococcus suis* SC84	2.10	1979
str	*Streptococcus thermophilus* CNRZ1066	1.80	2020
STER	*Streptococcus thermophilus* LMD-9	1.86	1820
stu	*Streptococcus thermophilus* LMG 18311	1.80	1994
SUB	*Streptococcus uberis* 0140J	1.85	1843

Tableau 3: Nom, taille et nombre de gènes des génomes des 30 souches de *Streptococaceae* sélectionnées pour l'analyse *in silico* des TCS

1.1.2) Démarche employée

Une recherche bioinformatique de l'ensemble des régulateur de réponse (RR) et des histidine kinases (HK) des *Streptococcacae* a été effectuée sur la base de 30 génomes séquencés (Tableau 3) appartenant aux espèces *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (2 souches), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (2), *Streptococcus agalactiae* (3), *Streptococcus dysgalactiae* (1), *Streptococcus equi* (2), *Streptococcus gallolyticus* (1), *Streptococcus gordonii* (1), *Streptococcus mitis* (1), *Streptococcus mutans* (1), *Streptococcus pneumoniae* (3), *Streptococcus pyogenes* (5), *Streptococcus salivarius* (1), *Streptococcus sanguinis* (1), *Streptococcus suis* (2), *Streptococcus thermophilus* (3) et enfin *Streptococcus uberis* (1).
La base de données IMG pour **I**ntegrated **M**icrobial **G**enomes (http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi) a été utilisée pour récupérer toutes les séquences protéiques correspondant aux HK et aux RR. L'identification des HK et des RR a été réalisée sur la base de multiples requêtes faisant appel aux domaines conservés Pfam ou COG qui leur sont caractéristiques. Les RR ont ainsi été classés en 5 sous-familles (type OmpR, COG0745: pfam00072 et pfam00486 ; type NarL, COG2197: pfam00072 et pfam00196 ; type LytR, COG3279: pfam00072 et pfam04397 ; type AraC, COG4753 : pfam00072 pfam00165 ; autres types de RR non classifiables: COG4565, COG2204, COG3707). Pour ce qui est du recensement des HKs, il a été effectué sur la base des COG : COG0642, COG2205, COG2972, COG3275, COG3290, COG4585 et COG5002. Les locus-tag des gènes correspondant à chacune des protéines sélectionnées ont été récupérés par souci de lisibilité, les numéros d'accession des protéines ne permettant pas facilement l'identification de la souche (exemple : à la protéine YP_820666 correspond le gène STER_1290 de *S. thermophilus* LMD-9).

Les alignements des séquences des RR ont été effectués sur le portail de l'EBI (European Bioinformatics Institute) avec le programme MAFFT (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/) pour **M**ultiple **A**lignment using **F**ast **F**ourier **T**ransform avec ClustalW comme format de sortie du fichier d'alignement. Enfin, les arbres phylogénétiques de type Neighbor-Joining des séquences protéiques RR ont été générés en utilisant le programme Jalview (http://www.jalview.org/). De cette façon, les différents clusters de protéines orthologues (ayant au minimum 60% d'identité en acides aminés) apparaissent clairement et correspondent dans la grande majorité à des systèmes ayant fait l'objet d'une ou plusieurs publications scientifiques (avec attribution d'un rôle ou d'ue fonction) dans au moins une des souches appartenant à la sous-famille. Cette valeur de 60% a été choisie car elle correspond à la valeur minimale permettant de séparer

GENOME	HK+RR	HK	RR	Type de RR					TCS complets	HK orphan	RR orphan	Nb Systèmes
				OMPR	NAR	LYT	ARAc	AUTRES				
Lactococcus lactis cremoris MG1363	15	8	7	6	1	0	0	0	7	1	0	8
Lactococcus lactis cremoris SK11	18	9	9	8	1	0	0	0	9	0	0	9
Lactococcus lactis lactis Il1403	14	7	7	6	1	0	0	0	7	0	0	7
Lactococcus lactis subsp. lactis KF147	20	10	10	8	2	0	0	0	10	0	0	10
Streptococcus thermophilus CNRZ1066	15	7	8	4	2	2	0	0	7	0	1	8
Streptococcus thermophilus LMD-9	14	6	8	4	2	2	0	0	6	0	2	8
Streptococcus thermophilus LMG 18311	16	8	8	4	2	2	0	0	8	0	0	8
Streptococcus salivarius SK126	33	19	14	8	2	4	0	0	14	4	0	18
Streptococcus agalactiae 2603V/R	39	19	20	13	1	3	1	2	18	1	2	21
Streptococcus agalactiae A909	42	21	21	14	2	2	1	2	20	1	1	22
Streptococcus agalactiae NEM316	40	19	21	13	2	3	1	2	19	0	2	21
Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis GGS_124	35	18	17	8	2	3	3	1	17	0	0	17
Streptococcus equi equi 4047	31	16	15	6	2	4	3	0	15	0	0	15
Streptococcus equi zooepidemicus H70	34	17	17	8	3	3	3	0	16	0	1	17
Streptococcus gallolyticus UCN34	28	14	14	8	4	2	0	0	14	0	0	14
Streptococcus gordonii Challis CH1	31	15	16	9	3	2	2	0	15	0	1	16
Streptococcus mitis B6	31	15	16	8	3	3	2	0	15	0	1	16
Streptococcus mutans UA159	28	14	14	9	3	2	0	0	13	1	1	15
Streptococcus pneumoniae D39	27	13	14	8	2	2	2	0	13	0	1	14
Streptococcus pneumoniae R6	27	13	14	8	2	2	2	0	13	0	1	14
Streptococcus pneumoniae TIGR4	27	13	14	8	2	2	2	0	13	0	1	14
Streptococcus pyogenes M1 GAS	25	13	12	5	2	1	3	1	10	2	2	14
Streptococcus pyogenes Manfredo	25	13	12	5	2	1	3	1	12	1	0	13
Streptococcus pyogenes MGAS10270	29	16	13	6	2	1	3	1	13	1	0	14
Streptococcus pyogenes MGAS10750	30	16	14	6	2	2	3	1	14	1	0	15
Streptococcus pyogenes MGAS315	27	15	12	5	2	1	3	1	12	1	0	13
Streptococcus sanguinis SK36	28	13	15	9	3	1	1	1	13	0	2	15
Streptococcus suis P1/7	19	9	10	6	2	1	1	0	9	0	1	10
Streptococcus suis SC84	23	11	12	7	3	1	1	0	11	0	1	12
Streptococcus uberis 0140J	26	15	11	6	2	2	0	1	11	4	0	15
TOTAL	797	402	395	223	64	54	40	14	374	18	21	413

Tableau 4: Recensement du nombre total de protéines TCS (HK +RR) dans chacune des 30 souches de *Streptococaceae*

dans des clusters fonctionnels distincts l'ensemble des protéines paralogues. Ainsi par exemple, CovR et WalR, deux protéines paralogues de *S. mutans* UA159, partagent environ 40% d'identité mais sont biologiquement bien différentes. En conséquence, ces deux protéines ne peuvent faire partie du même cluster fonctionnel. Chacun des clusters fonctionnels d'un arbre phylogénétique ne peut donc contenir au mieux qu'1 protéine par souche autrement dit la taille maximale d'un cluster d'orthologues est de 30. Avant d'aborder plus en détails chacun de ces systèmes, intéressons nous tout d'abord aux aspects plus généraux que l'on peut retirer du recensement total des TCS chez les Streptococcacae.

1.1.3) Aspects statistiques généraux

Sur les 30 souches de streptocoques et lactocoques testées, on dénombre un total de 797 protéines de TCS réparties globalement de façon homogène en 402 HK et 395 RR (Tableau 4). On constate donc qu'un membre des *Streptococaceae* possède en moyenne 26 protéines de TCS. Cette moyenne concorde d'ailleurs assez bien avec la moyenne du nombre de gènes TCS retrouvés pour des génomes d'environ 2 Mb qui est d'une vingtaine (Kim *et al*., 2010).

Toutefois, derrière cette moyenne du nombre de TCS se cache en réalité une variabilité de la quantité de TCS suivant les espèces considérées. En effet, alors que les souches de GBS possèdent une quarantaine de gènes TCS, entre 25 et 35 pour les autres souches pathogènes ou pathogènes opportunistes, on en compte seulement une quinzaine pour *S. thermophilus* et *L. lactis*. Ces différences d'abondance peuvent s'expliquer du fait de la diversité, de la variabilité de l'environnement ou de la niche écologique à laquelle doit faire face la bactérie. Ainsi les souches de *S. thermophilus* ont été isolées à partir d'une niche écologique limitée au lait et aux produits laitiers pour lesquels elles sont les mieux adaptées. A l'inverse, les souches pathogènes ou pathogènes opportunistes ne bénéficient pas d'un environnement stable et la présence d'un nombre plus important de TCS participe probablement à leur capacité d'adaptation à la diversité des stress ou changements d'environnement rencontrés. Ainsi, comme nous le verrons par la suite ces souches possèdent des systèmes leur conférant des atouts pour coloniser et persister dans leur niche écologique. On peut citer rapidement des facteurs d'adhésion ou de formation de biofilm, de résistance aux stress, de résistance à des antibiotiques, de production de bactériocines ou encore d'évasion du système immunitaire dans le cas des pathogènes avérés tels que les GAS et les GBS. Ainsi, même si globalement on peut corréler le nombre de TCS d'un organisme à la taille de son génome (Galperin, 2005), c'est avant tout la complexité de

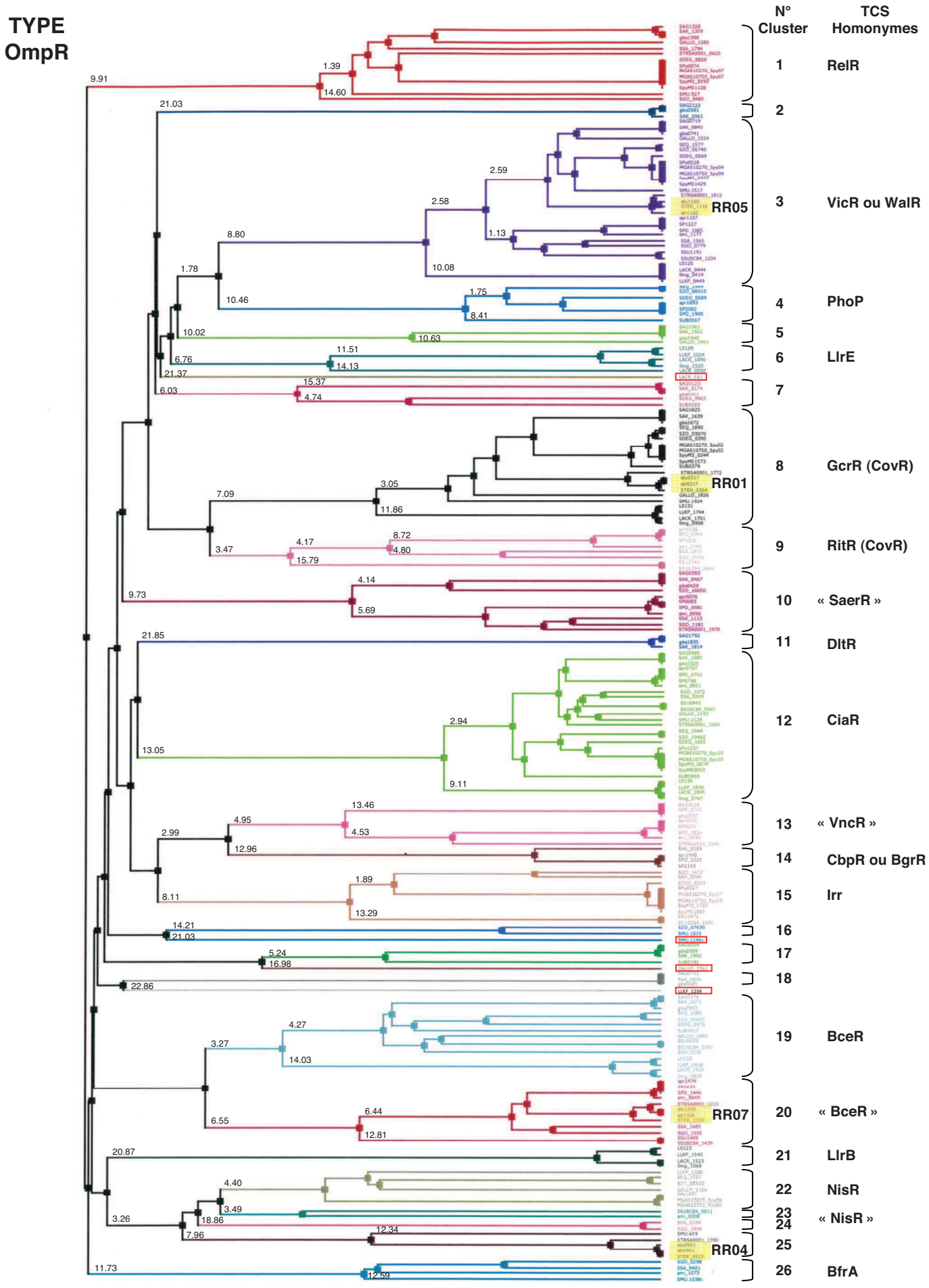

TYPE
OmpR
N°
Cluster
TCS
Homonymes
1
RelR
2
3
VicR ou WalR
RR05
4
PhoP
5
6
LlrE
7
8
GcrR (CovR)
RR01
9
RitR (CovR)
10
« SaerR »
11
DltR
12
CiaR
13
« VncR »
14
CbpR ou BgrR
15
Irr
16
17
18
19
BceR
20
« BceR »
RR07
21
LlrB
22
NisR
23
« NisR »
24
25
RR04
26
BfrA

Figure 19 (à gauche): Arbre phylogénétique des RR de type OmpR de 30 souches appartenant à la famille des *Streptococcaceae*

Les alignements des séquences des RR de type OmpR ont permis d'obtenir l'arbre phylogénétique associé. Les protéines orthologues ayant entre elles au minimum 60% d'identité en acides aminés permettent de former un cluster « fonctionnel ». Les RR de *S. thermophilus* sont mises en évidence par un rectangle jaune au niveau des numéros d'accession des locus_tag. Les RRs présents uniquement dans une souche sont encadrés en rouge. Chacun des cluster est représenté par une accolade et un numéro de cluster. Lorsque c'était possible, nous avons mentionné le nom du RR du système à deux composants (TCS) qui lui est associé dans ou une ou plusieurs publications scientifiques. Un code couleur a également été ajouté dans les accolades en fonction du type de souches caractérisant le cluster:

- Présent dans toutes les souches de GAS ou GBS + quelques autres pathogènes
- Présent chez des streptocoques oraux
- Présent dans toutes les souches de *S. pneumoniae* + quelques autres pathogènes
- Présent dans toutes les souches de *S. agalactiae* + quelques autres pathogènes
- Présent dans toutes les souches de *S. pyogenes* + quelques autres pathogènes
- Présent uniquement chez les souches de *S. agalactiae*
- Présent uniquement chez les souches de *S. suis*
- Présent uniquement chez les souches de *L. lactis*

Tableau 5: Nombre d'orthologues, particularités et fonctions proposées pour chacun des clusters des RR de type OmpR

N°cluster	Homonymes du TCS	Nb d'orthologues	Particularités / Composition du cluster	Fonctions Proposées ou avérées
1	RelR/S	14	GAS + GBS et souches "buccales"	adaptation à la salive
2	?	3	Spécifique aux *S. agalactiae*	virulence ou adaptation à l'hôte
3	YycF/G / WalR/IK VicR/K	29	"Universel" sauf *S. uberis*	division, paroi stress oxydant…
4	PhoP/B et PnpR/S	7	Tous les *S. pneumoniae* et souches pathogènes d'animaux	détection [phosphate]
5	?	4	Tous les *S. agalactiae* + *S. gallolyticus*	virulence ou adaptation à l'hôte
6	LlrE	4	Spécifique aux *L. lactis*	Intermédiaire CovR /WalR ?
7	?	5	Tous les GBS + *S. uberis*	virulence ou adaptation à l'hôte
8	CovR/S-GcrR	21	"Universel" sauf *S. pyogenes* M1GAS (Oublié à l'annotation)	virulence, biofilm…
9	RitR (CovR like)	8	Orphelin	détection [Fer] -Lien avec pentose phosphate
10	"SaeR like"	11	Souches pathogènes	adhésion -pilli
11	DltR	3	Spécifique aux *S. agalactiae*	biosynthése acides téichoiques
12	CiaR/K	27	Toutes les souches sauf les *S. thermophilus*	résistance stress, virulence, competence, calcium…
13	"VncR"	8	Tous les *S. pneumoniae* + *S. agalactiae*, *S. salivarius*, *S. mitis*	virulence ou adaptation à l'hôte
14	CbpR - BgrR	4	Tous les *S. pneumoniae* + 1 *S. agalactiae*	adhésion -pilli
15	Irr-Ikr	10	Souches pathogènes	évasion après phagocytose
16	?	2	*S. mutans* + *S. equi zooepidemicus*	virulence ou adaptation à l'hôte ?
17	?	4	Tous les *S. agalactiae* + *S. uberis*	virulence ou adaptation à l'hôte ?
18	?	3	Spécifique aux *S. agalactiae*	virulence ou adaptation à l'hôte ?
19	BceABRS (*S. mutans*)	11	*L. lactis* + GBS+ *S. mutans* +2 *S. suis* + *S. gallolyticus* + *S. uberis*	résistance à la bacitracine
20	"BceABRS like"	12	Tous les *S.thermophilus* + quelques souches pathogènes	résistance ATB?
21	LlrB	4	Spécifique aux *L. lactis* (pas d'orthologue)	?
22	"NisR"	7	1 *L.lactis* + 3 *S. pyogenes* + 2 *S. equi* + *S.gallolyticus*	production et résistance à un lantibiotique ?
23	"NisR like"	2	1 *S. suis* + *S. mitis*	production et résistance à un lantibiotique ?
24	"NisR like"	2	*S. sanguinis* + *S. gordonii*	production et résistance à un lantibiotique ?
25	RR04 thermophilus	5	Tous les *S. thermophilus* + *S. mutans* + *S. salivarius*	production et résistance à un lantibiotique ?
26	BfrA/B	4	*S. gordonii* + *S. mutans* + *S. sanguinis* + *S. mitis*	biofilm

4 RR uniques: LACR_C61, SMU.1146c, GALLO_1562, LLKF_1239

l'environnement rencontré ou du cycle de vie de la bactérie qu'il faut mettre en relation avec le nombre de TCS. D'ailleurs, d'autres études ont montré que pour des génomes de tailles identiques, les espèces symbiotiques ou parasites possèdent systématiquement moins de TCS (Galperin, 2005; Kim *et al*., 2010).

Tout ceci se traduit également à l'échelle des familles des régulateurs de réponse rencontrés. Une plus grande diversité dans la nature des RR est retrouvée pour les souches pathogènes. Ainsi certaines souches possèdent plus de régulateurs de type LytR et, contrairement aux souches de *S. thermophilus* et *L. lactis*, sont les seuls à posséder des RR de type AraC, une famille peu étudiée jusqu'à présent et contribuant certainement directement ou indirectement à leur virulence. On retrouve également plus d'HKs et de RRs orphelins pour les streptocoques pathogènes que pour les souches de *S. thermophilus* et *L. lactis* (Kim *et al*., 2010). L'intérêt de la présente analyse globale des TCS est qu'elle permet d'établir assez finement des groupes de protéines orthologues parmi les 797 protéines récupérées au départ en les reliant aux fonctions proposées ou démontrées dans la littérature. Voyons à présent les interprétations que l'on peut retirer de l'analyse des RR pour chacune de leurs sous-familles.

1.1.4) RR de type OmpR (Figure 19 et Tableau 5)

Les 223 RR appartenant aux types OmpR s'organisent en 26 groupes d'orthologues auxquels il faut ajouter 4 RR spécifiques d'une seule souche (encadrés en rouge sur la figure 19) parmi les trente sélectionnées au départ. Un des premiers constats est la présence de 3 clusters de RR hautement conservés car présent chez plus des deux tiers des souches analysées: WalR, GcrR (CovR) et CiaR qui correspondent tous à des RR contrôlant des fonctions essentielles telles que la division cellulaire, l'adaptation au stress ou la compétence. Ces RR font donc partie en quelque sorte du cœur des RR des *Streptococaceae*. On note par ailleurs la présence de 4 clusters d'orthologues proches de WalR et CovR dont 3 retrouvés chez des souches pathogènes (clusters 4, 5 et 7) et 1 (cluster 6) uniquement chez des souches de lactocoques.

Par ailleurs, pas moins de 12 clusters comprennent des souches pathogènes (clusters marron, violet, vert, rouge et bleu), deux d'entre eux étant spécifiques des souches de *S. agalactiae* (clusters en bleu). Par exemple, le groupe 10, « SaerR-like », permet aux streptocoques de mieux s'implanter puisqu'il contrôle la formation de pili. Le groupe 15 correspond à Irr qui permet à ces streptocoques de mieux résister aux défenses immunitaires de leur hôte lors d'une infection.

TYPE
NarL

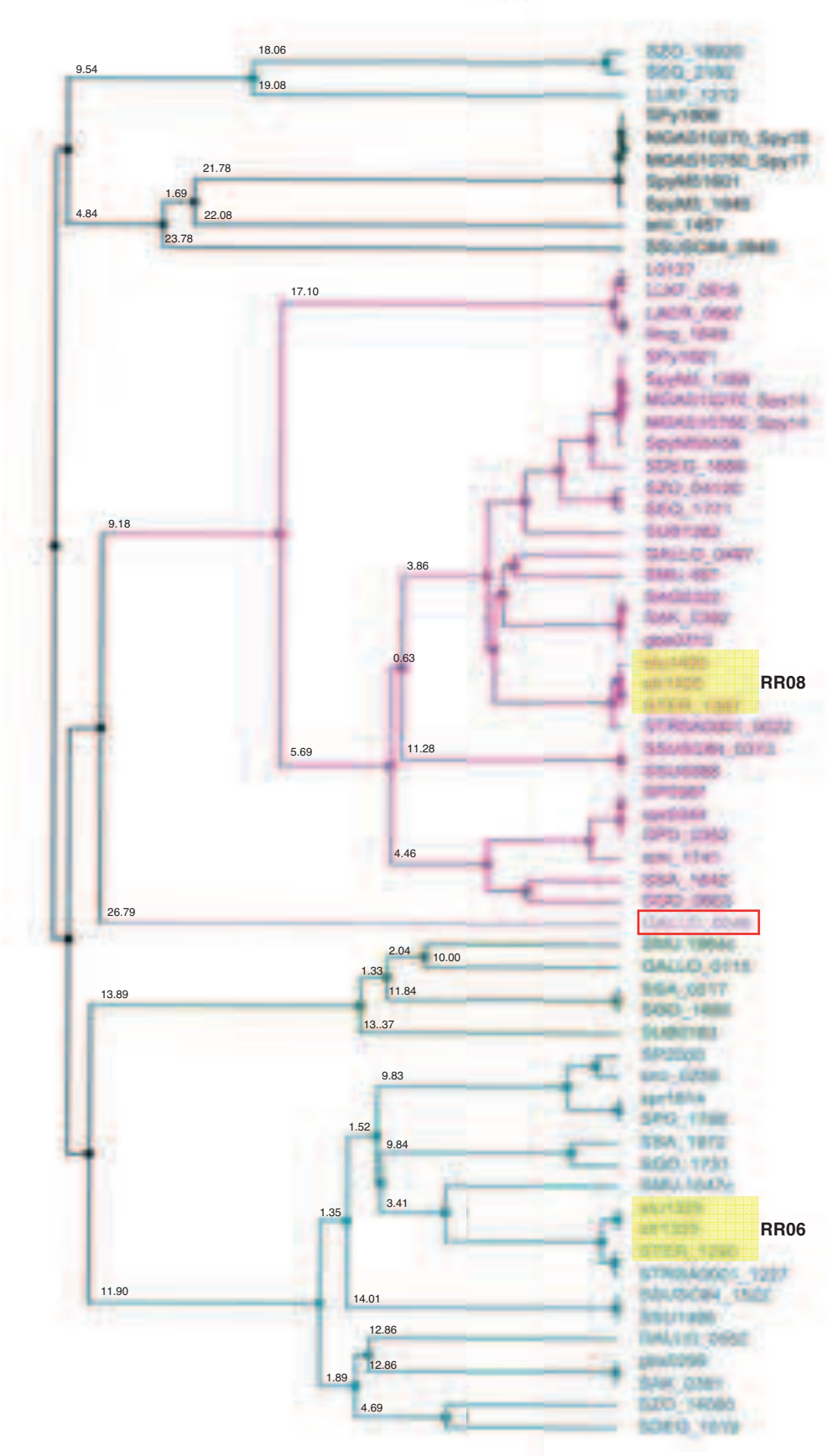

N° Cluster
TCS Homonymes
1
2
SalR
3
LiaR
4
LevR
5
RR08
RR06
18.06
19.08
9.54
21.78
1.69
22.08
4.84
23.78
17.10
9.18
3.86
0.63
5.69
11.28
4.46
26.79
2.04
10.00
1.33
11.84
13.89
13..37
9.83
1.52
9.84
3.41
1.35
11.90
14.01
12.86
12.86
1.89
4.69

Figure 20 (à gauche): Arbre phylogénétique des RR de type NarL de 30 souches appartenant à la famille des *Streptococcaceae*

Les alignements des séquences des RR de type NarL ont permis d'obtenir l'arbre phylogénétique associé. Les protéines orthologues ayant entre elles au minimum 60% d'identité en acides aminés permettent de former un cluster « fonctionnel ». Les RR de *S. thermophilus* sont mises en évidence par un rectangle jaune au niveau des numéros d'accession des locus_tag. Les RRs présents uniquement dans une souche sont encadrés en rouge. Chacun des cluster est représenté par une accolade et un numéro de cluster. Lorsque c'était possible, nous avons mentionné le nom du RR du système à deux composants (TCS) qui lui est associé dans ou une ou plusieurs publications scientifiques. Un code couleur a également été ajouté dans les accolades en fonction du type de souches caractérisant le cluster:

- Présent dans toutes les souches de GAS ou GBS + quelques autres pathogènes
- Présent chez des streptocoques oraux
- Présent dans toutes les souches de *S. pneumoniae* + quelques autres pathogènes
- Présent dans toutes les souches de *S. agalactiae* + quelques autres pathogènes
- Présent dans toutes les souches de *S. pyogenes* + quelques autres pathogènes
- Présent uniquement chez les souches de *S. agalactiae*
- Présent uniquement chez les souches de *S. suis*
- Présent uniquement chez les souches de *L. lactis*

Tableau 6: Nombre d'orthologues, particularités et fonctions proposées pour chacun des clusters des RR de type NarL

N°cluster	Homonymes du TCS	Nb d'orthologues	Particularités / Composition du cluster	Fonctions Proposées ou avérées
1	?	3	1 *L. lactis* + 2 *S. equi*	?
2	SalR	7	Tous les *S. pyogenes* + *S. mitis* + 1 *S. suis*	bacteriocine "salivaricin like"
3	LiaR	30	Universel	stress de paroi
4	LevR	5	*S. mutans*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. uberis* et *S. gallolyticus*	assimilation fructose / mannose
5	RR06	18	Tous les *S. pneumoniae* et GBS sauf 1 *S. agalactiae* + *S. mutans* + *S. gordonii*, *S. suis*, *S. sanguinis* et *S. gallolyticus*	?

+ 1 RR unique GALLO_0046

TYPE
LytR

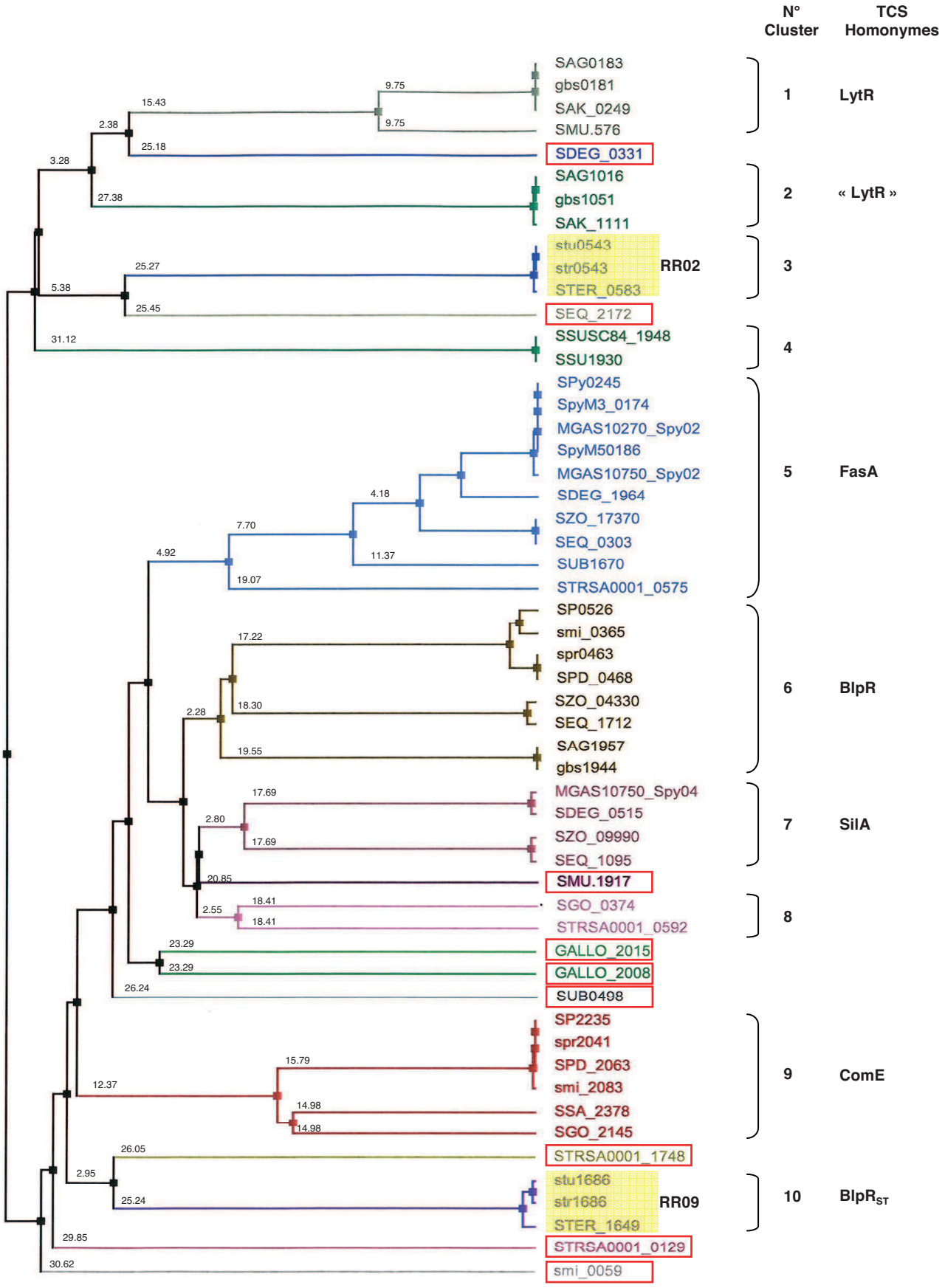

N° Cluster
TCS Homonymes
SAG0183
gbs0181
SAK_0249
SMU.576
SDEG_0331
SAG1016
gbs1051
SAK_1111
stu0543
str0543
STER_0583
RR02
SEQ_2172
SSUSC84_1948
SSU1930
SPy0245
SpyM3_0174
MGAS10270_Spy02
SpyM50186
MGAS10750_Spy02
SDEG_1964
SZO_17370
SEQ_0303
SUB1670
STRSA0001_0575
SP0526
smi_0365
spr0463
SPD_0468
SZO_04330
SEQ_1712
SAG1957
gbs1944
MGAS10750_Spy04
SDEG_0515
SZO_09990
SEQ_1095
SMU.1917
SGO_0374
STRSA0001_0592
GALLO_2015
GALLO_2008
SUB0498
SP2235
spr2041
SPD_2063
smi_2083
SSA_2378
SGO_2145
STRSA0001_1748
stu1686
str1686
STER_1649
RR09
STRSA0001_0129
smi_0059
1
LytR
2
« LytR »
3
4
5
FasA
6
BlpR
7
SilA
8
9
ComE
10
BlpR_ST

Figure 21 (à gauche): Arbre phylogénétique des RR de type LytR de 30 souches appartenant à la famille des *Streptococcaceae*

Les alignements des séquences des RR de type NarL ont permis d'obtenir l'arbre phylogénétique associé. Les protéines orthologues ayant entre elles au minimum 60% d'identité en acides aminés permettent de former un cluster « fonctionnel ». Les RR de *S. thermophilus* sont mises en évidence par un rectangle jaune au niveau des numéros d'accession des locus_tag. Les RRs présents uniquement dans une souche sont encadrés en rouge. Chacun des cluster est représenté par une accolade et un numéro de cluster. Lorsque c'était possible, nous avons mentionné le nom du RR du système à deux composants (TCS) qui lui est associé dans ou une ou plusieurs publications scientifiques. Un code couleur a également été ajouté dans les accolades en fonction du type de souches caractérisant le cluster:

- Présent dans toutes les souches de GAS ou GBS + quelques autres pathogènes
- Présent chez des streptocoques oraux
- Présent dans toutes les souches de *S. pneumoniae* + quelques autres pathogènes
- Présent dans toutes les souches de *S. agalactiae* + quelques autres pathogènes
- Présent dans toutes les souches de *S. pyogenes* + quelques autres pathogènes
- Présent uniquement chez les souches de *S. agalactiae*
- Présent uniquement chez les souches de *S. suis*
- Présent uniquement chez les souches de *L. lactis*

Tableau 7: Nombre d'orthologues, particularités et fonctions proposées pour chacun des clusters des RR de type LytR

N° cluster	Homonymes du TCS	Nb d'orthologues	Particularités / Composition du cluster	Fonctions Proposées ou avérées
1	LytR	4	Tous les *S. agalactiae* + *S. mutans*	contrôle de l'autolyse
2	"LytR like"	3	Tous les *S. agalactiae* (paralogue au cluster 1)	contrôle de l'autolyse
3	RR02	3	Spécifique aux *S. thermophilus*	mécanisme défense?
4	?	2	Spécifique aux *S. suis*	?
5	FasA	10	Souches pathogènes	fibronectin streptokinase
6	BlpR	8	Tous les *S. pneumoniae* + *S. mitis* + 2 *S. equi* + 2 *S. agalactiae*	bacteriocine
7	SilA	4	1 *S. pyogenes* + *S. dysagalactiae* + 2 *S. equi*	régule blp et sert à l'invasion
8	?	2	*S. gordonii* + *S. salivarius*	?
9	ComE	6	Tous les *S. pneumoniae* + *S. mitis* + *S. salivarius* + *S. gordonii*	compétence via csp
10	RR09 (Blp)	3	Spécifique aux *S. thermophilus*	production thermophiline 9

8 RR uniques: GALLO_2008, GALLO_2015, STRSA0001_0129, STRSA0001_1748, SUB0498, SEQ_2172, smi_0059, SDEG_0331, SMU.1917

Deux groupes sont quant à eux spécifiques des souches de lactocoques et pourraient être impliqués dans des fonctions qui leur sont bien spécifiques (clusters orange). Le groupe 26 (cluster gris) correspond à BfrA, RR que possèdent uniquement des streptocoques présents dans la cavité buccale et qui permet comme on l'a vu précédemment à ces souches de coloniser la surface dentaire pour former des biofilms. On notera également que cette analyse permet de discriminer les « sous-types de CovR », dont RitR, un RR orphelin uniquement présent chez les pneumocoques et d'autres pathogènes permettant d'amoindrir l'effet de stress oxydant lié à la présence de fer.

1.1.5) RR de type NarL (Figure 20 et Tableau 6)

Seuls 5 groupes suffisent à discriminer les 64 RR appartenant à cette famille, *Streptococcus gallolyticus* étant la seule espèce à posséder un RR situé entre les clusters 3 et 4 dont la fonction est inconnue (encadré en rouge sur la figure 20). Peu d'informations sont à retenir pour la sous famille NarL si ce n'est la présence du RR LiaR chez l'ensemble des souches du panel *Streptococaceae*. LiaR a fait l'objet d'études de caractérisation plus particulièrement chez *S. mutans* et *S. pneumoniae* montrant l'implication de ce système dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe cellulaire notamment en répondant aux stress pariétaux de type antibiotiques (Eldholm *et al*., 2010; Suntharalingam *et al*., 2009). Le cluster 5 contient 18 orthologues non caractérisés jusqu'à présent. En outre, ce cluster comprend à la fois des souches pathogènes (*S. agalactiae, S. pneumoniae* par exemple) et non pathogènes comme *S. thermophilus* (RR06). Le cluster 4, comprenant en grande partie des souches buccales, correspond aux RR représentés par LevR qui intervient dans la régulation du fructose à partir de fructanes (voir partie 5.3.3). Enfin le cluster 2 comprend uniquement des souches pathogènes, notamment les GAS, et possèdent le RR SalR contrôlant la production de bactériocines souches spécifiques (Upton *et al*., 2001).

1.1.6) RR de type LytR (Figure 21 et Tableau 7)

Cette famille est particulièrement intéressante car c'est elle qui présente la plus forte diversité de RR rencontrés. On détermine en effet 10 groupes d'orthologues pour seulement 54 RR de type LytR, soit deux fois plus de groupes que la famille NarL qui contient pourtant 64 RR. Ces RR correspondent vraisemblablement à des fonctions beaucoup plus spécifiques, témoins les 9 RR n'ayant aucun orthologues et donc présents uniquement dans une seule des souches de *Streptococaceae* analysées (encadrés en rouge sur la figure). Comme le montre la Figure 21, les souches possédant ces RR sont

TYPE
AraC

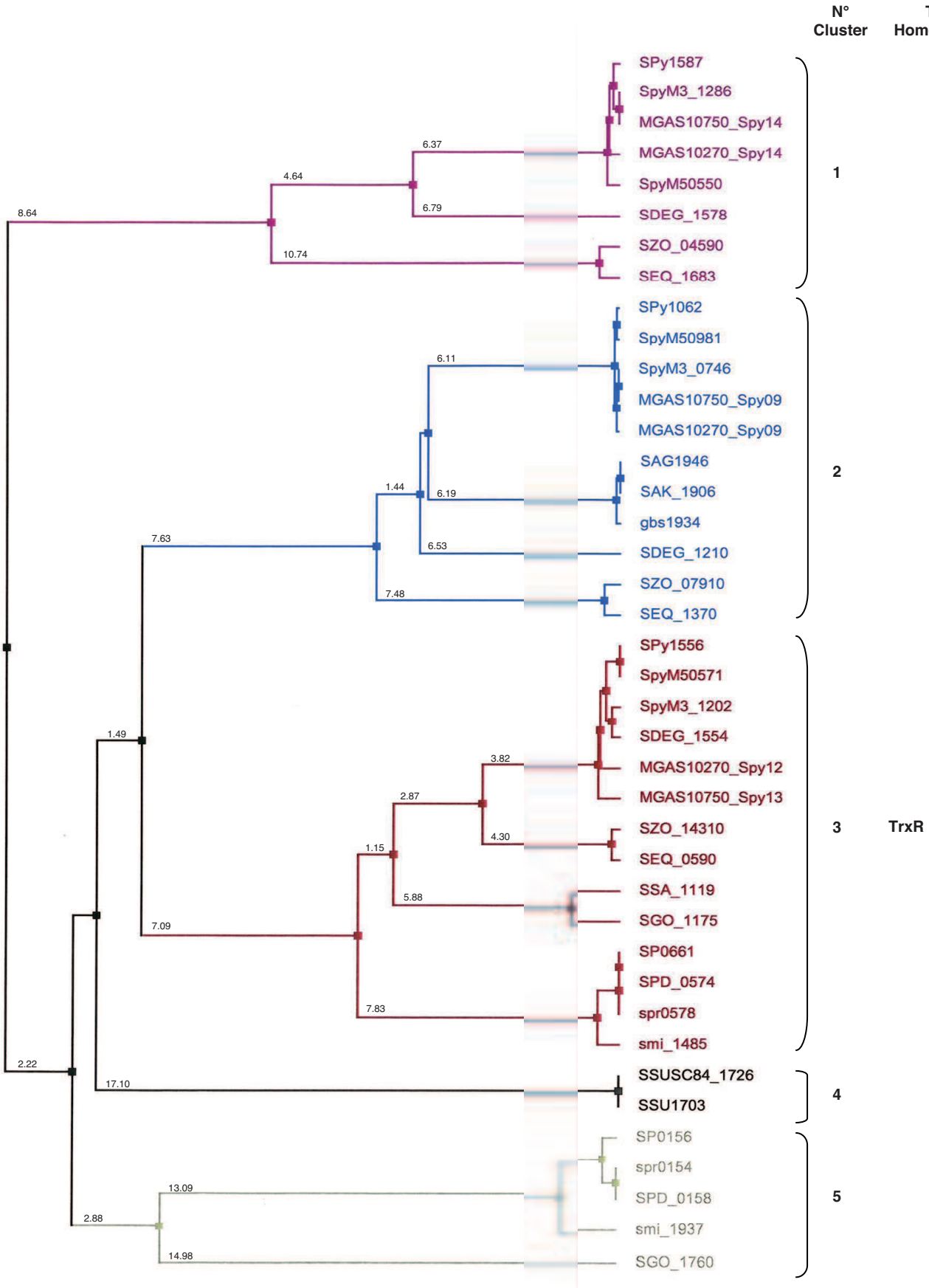

N° Cluster
TCS Homonymes
SPy1587
SpyM3_1286
MGAS10750_Spy14
MGAS10270_Spy14
SpyM50550
SDEG_1578
SZO_04590
SEQ_1683
1
SPy1062
SpyM50981
SpyM3_0746
MGAS10750_Spy09
MGAS10270_Spy09
SAG1946
SAK_1906
gbs1934
SDEG_1210
SZO_07910
SEQ_1370
2
SPy1556
SpyM50571
SpyM3_1202
SDEG_1554
MGAS10270_Spy12
MGAS10750_Spy13
SZO_14310
SEQ_0590
SSA_1119
SGO_1175
SP0661
SPD_0574
spr0578
smi_1485
3
TrxR
SSUSC84_1726
SSU1703
4
SP0156
spr0154
SPD_0158
smi_1937
SGO_1760
5
8.64
4.64
6.37
6.79
10.74
6.11
1.44
6.19
6.53
7.48
7.63
1.49
3.82
2.87
4.30
1.15
5.88
7.09
7.83
2.22
17.10
13.09
2.88
14.98

Figure 22 (à gauche): Arbre phylogénétique des RR de type AraC de 30 souches appartenant à la famille des *Streptococcaceae*

Les alignements des séquences des RR de type NarL ont permis d'obtenir l' arbre phylogénétique associé. Les protéines orthologues ayant entre elles au minimum 60% d'identité en acides aminés permettent de former un cluster « fonctionnel ». Les RR de *S. thermophilus* sont mises en évidence par un rectangle jaune au niveau des numéros d'accession des locus_tag. Les RRs présents uniquement dans une souche sont encadrés en rouge. Chacun des cluster est représenté par une accolade et un numéro de cluster. Lorsque c'était possible, nous avons mentionné le nom du RR du système à deux composants (TCS) qui lui est associé dans ou une ou plusieurs publications scientifiques. Un code couleur a également été ajouté dans les accolades en fonction du type de souches caractérisant le cluster:

- Présent dans toutes les souches de GAS ou GBS + quelques autres pathogènes
- Présent chez des streptocoques oraux
- Présent dans toutes les souches de *S. pneumoniae* + quelques autres pathogènes
- Présent dans toutes les souches de *S. agalactiae* + quelques autres pathogènes
- Présent dans toutes les souches de *S. pyogenes* + quelques autres pathogènes
- Présent uniquement chez les souches de *S. agalactiae*
- Présent uniquement chez les souches de *S. suis*
- Présent uniquement chez les souches de *L. lactis*

Tableau 8: Nombre d'orthologues, particularités et fonctions proposées pour chacun des clusters des RR de type AraC

N°cluster	Homonymes du TCS	Nb d'orthologues	Particularités / Composition du cluster	Fonctions Proposées ou avérées
1	?	8	Tous les *S. pyogenes* + *S. equi* + *S. dysgalactiae*	virulence ou adaptation à l'hôte
2	?	11	Tous les *S. pyogenes* + GBS + 2 *S. equi*	virulence ou adaptation à l'hôte
3	TrxR	14	Souches pathogènes	modulateur CovR
4	?	2	Spécifique aux *S. suis*	virulence ou adaptation à l'hôte
5	?	5	Tous les *S. pneumoniae* + *S. mitis* + *S. gordonii*	virulence ou adaptation à l'hôte

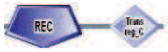
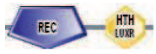
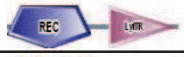
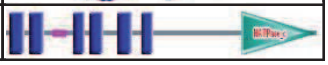
Nom du TCS (Homologue dans la littérature)	Organisation génétique (Rouge: HK Orange: RR)	Protéine	Locus_Tag	Taille (aa)	Principaux domaines retrouvés (Base de données SMART)
TCS01 CovR, GcrR		RR	STER_0354	229	
TCS02		HK	STER_0582	431	
		RR	STER_0583	236	
TCS04		RR	STER_0925	219	
		HK	STER_0926	431	
TCS05 WalR/K,VicR/K, YycF/G		HK	STER_1115	446	
		RR	STER_1116	235	
TCS06		RR	STER_1290	200	
		HK	STER_1291	364	
TCS07		HK	STER_1309	323	
		RR	STER_1310	226	
TCS08 LiaR/S		RR	STER_1387	214	
TCS09 BlpR/H		RR	STER_1649	245	
		HK	STER_1650	446	

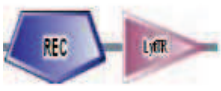
Tableau 9: Environnement et domaines conservés de chacun des 8 systèmes à deux composants de *S. thermophilus* LMD-9

L'environnement proche de chacun des TCS est représenté. Les gènes sur fond vert codent pour des transporteurs, ceux sur fond gris pour des protéines annotées comme hypothétiques. L'architecture des RR et des HK est représenté selon la base de donnée SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/).

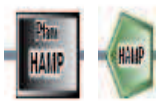
Type de RR:


OmpR


NarL


LytR

Domaines ou régions des HK :


HAMP


PAS


PAC


HisKA


HATPase_c


Régions transmembranaires

Régions de faible complexité

Régions « coiled coils »

majoritairement des souches pathogènes. D'ailleurs cinq clusters concernent uniquement ces souches, trois étant essentiellement composés de souches de streptocoques du groupe A ou B (GAS ou GBS) et deux plus spécifiques des pneumocoques. On notera la présence du groupe 4 propre à *S. suis*, potentiellement impliqué dans la spécificité de virulence de cette espèce vis-à-vis des porcs, mais aussi du groupe 8 qui contient un RR spécifique de deux espèces de la cavité buccale *S. gordonii* et *S. salivarius*.

1.1.7) RR de type AracC (Figure 22 et Tableau 8)

Là encore, on ne retrouve pratiquement que des souches pathogènes possédant ce type de RR. Les fonctions contrôlées par ces RR confèrent très certainement des propriétés physiologiques avantageuses telles qu'une capacité accrue à se disséminer dans l'hôte. TrxR, le seul ayant fait l'objet d'une étude chez les GAS est d'ailleurs essentiel à la virulence dans un modèle murin (Leday *et al*., 2008).

1.2) Place des RR de *S. thermophilus* au sein des *Streptococaceae*

1.2.1) Introduction

D'après l'analyse *in silico*, la souche LMD-9 de *S. thermophilus* comprend 8 TCS dont l'environnement et les domaines sont représentés dans le tableau 9. On voit donc que la souche LMD-9 posssède 2 RR orphelins de leur HK et 6 TCS complets, 5 d'entre eux ayant dans leur environnement des gènes codant pour des transporteurs non caractérisés (en vert dans le tableau 9). On trouve 4 RR de type OmpR, 2 de type NarL et 2 de type LytR.

A ce jour, un seul des ses TCS a fait l'objet d'une étude approfondie, le TCS09. Il est impliqué dans la production de bactériocine et des protéines d'immunité associées (Fontaine *et al*., 2007; Fontaine and Hols, 2008).

Si l'on se base sur les homologies de séquences, les autres TCS de cette souche pourraient être impliqués dans la production de bactériocines ou de mécanismes de défenses contre des molécules antimicrobiennes, dans la réponse à différents stress (général, acide, osmotique, salin) ainsi que dans la viabilité bactérienne. Examinons à présent chacun de ces systèmes en reconsidérant leur positionnement dans l'arbre phylogénétique associé et en comparant également leur environnement génétique à celui des principaux orthologues.

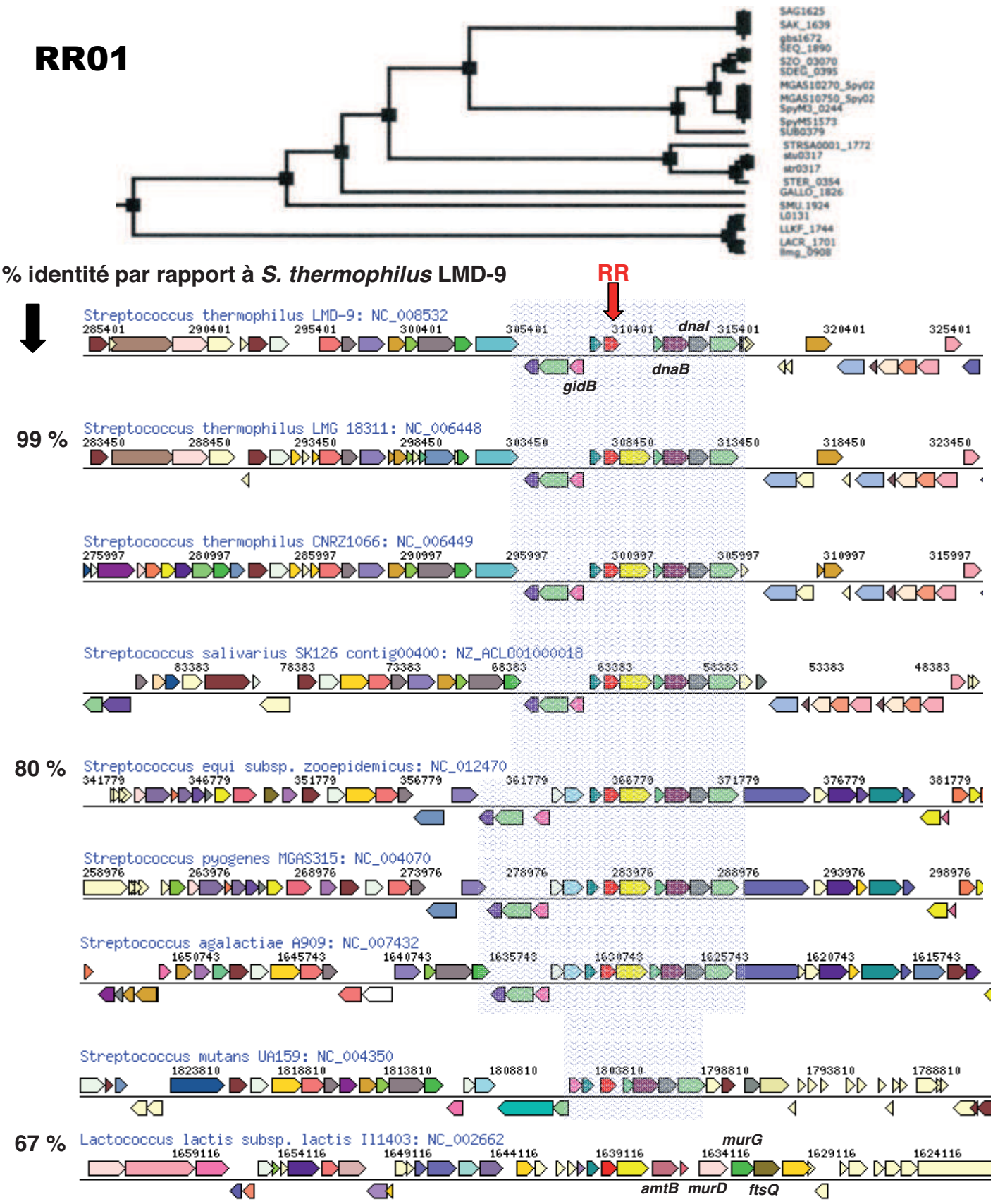


Figure 23: Environnement génétique du TCS01 de *S. thermophilus* et de quelques uns de ses plus proches orthologues

L'environnement génétique des orthologues de RR01de *S. thermophilus* est symbolisé par la zone hachurée.

1.2.2) TCS01 (homologue à CovR/S)

Le système CovR/S fait partie des systèmes TCS les plus universels chez les procaryotes (voir partie bibliographique). CovR/S (Cov pour « control of virulence ») est l'un des TCS les plus étudiés chez les streptocoques en particulier chez les pathogènes du groupe A (GAS). Il régule environ 15% des gènes chez les GAS tels que les gènes de virulence dont l'opéron *has* chargé de la synthèse de la capsule, la streptokinase, la streptolysine et une protéaseà cystéine (Dalton and Scott, 2004; Gryllos *et al*., 2007). Ce système est également impliqué dans le contrôle de facteurs de virulence ou d'adhésion cellulaire chez *S. mutans* (Biswas *et al*., 2007; Biswas and Biswas, 2006; Matsumoto-Nakano *et al*., 2007).

Chez la souche LMD-9, seul RR01, identique à plus de 80% au CovR des streptocoques pathogènes, est présent et les gènes environnants jouent potentiellement un rôle dans la réplication de l'ADN (*dnaB, dnaI* et *gidB*) (Figure 23). Seules les souches de lactocoques (en bas du cluster) présentent un environnement génétique différent avec notamment des gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi (*murD*, *murG*) dans la division cellulaire (*ftsQ*) et un transporteur d'ammonium (*amtB*). Il faut ajouter aussi une particularité de notre souche d'étude *S. thermophilus* LMD-9 et de la souche *S. mutans* UA159 par rapport aux autres streptocoques. Elles sont dépourvues d'histidine kinase HK01, ce qui a certainement des implications sur la régulation du locus TCS01 et des gènes qu'il contrôle. Cette analyse a permis également de discriminer CovR de RitR (respectivement clusters 8 et 9 de la Figure 19) qui est souvent confondu à l'annotation avec le système paralogue CovR. En effet, RitR est un système atypique car toutes les souches le possédant (pneumocoques et quelques autres pathogènes) n'ont pas d'HK et présentent un environnement génétique totalement différent de celui de CovR (Figure 24). Deux études ont montré que RitR est phosphorylé par une sérine/thréonine kinase, agit comme un répresseur du transport de fer et est impliqué dans la résistance au peroxyde d'hydrogène, la réparation de l'ADN, le transport des sucres et la biosynthèse de la capsule (Ulijasz *et al*., 2004; Ulijasz *et al*., 2009).

1.2.3) TCS02

Comme le rappelle la Figure 25, TCS02 appartient à un cluster spécifique à *S. thermophilus*. Le contexte génétique du TCS02 de *S. thermophilus* présente deux ABC transporteurs non décrits dans la littérature en amont (*ster_585, ster_586*) et en aval (*ster_578, ster_579*) du TCS. Par ailleurs, on trouve un orthologue (40% d'identité) non

RitR

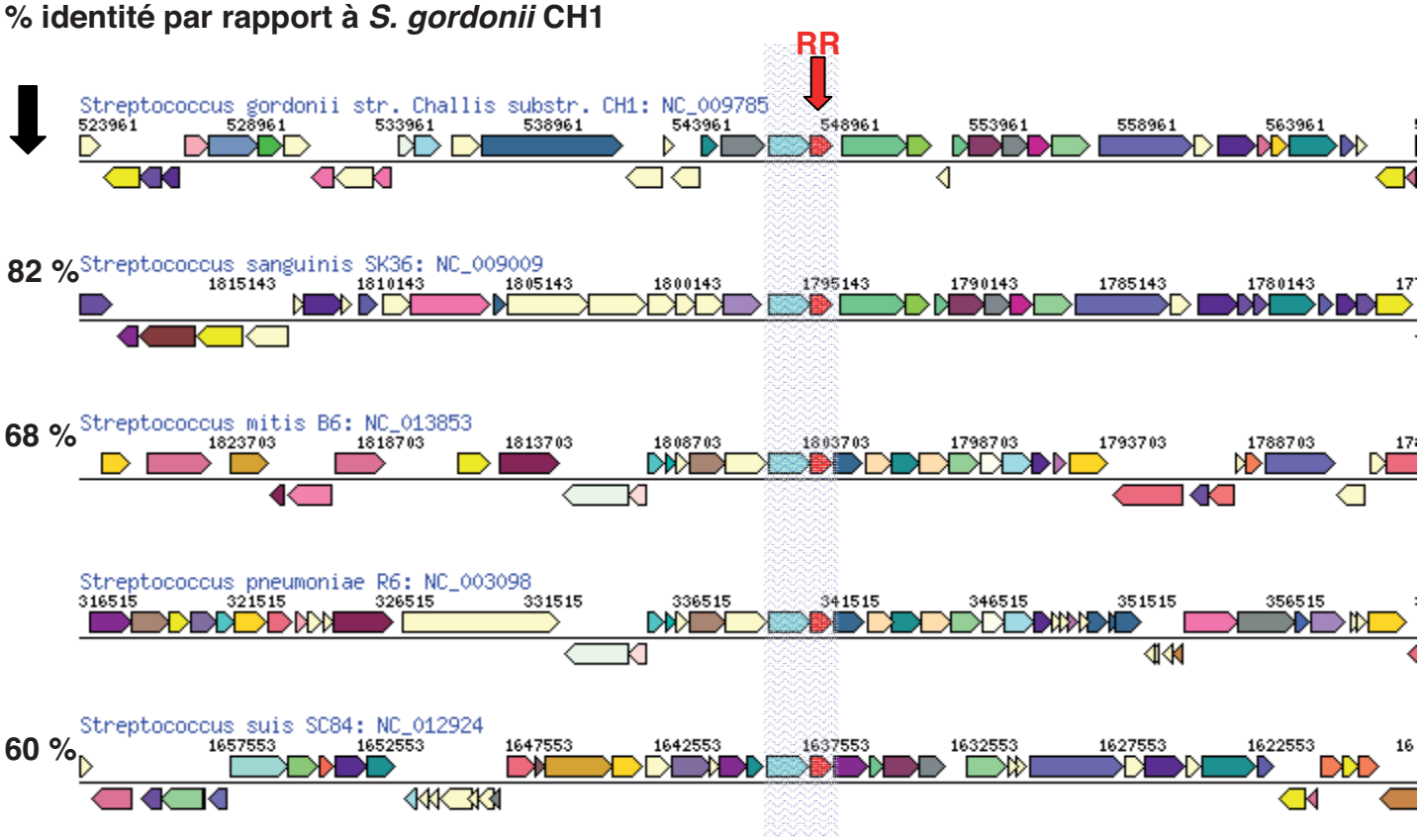


Figure 24: Environnement génétique de RitR, paralogue de RR01 et de quelques uns de ses plus proches orthologues

L'environnement génétique de RitR est totalement différent de celui de CovR et n'est pas très bien conservé parmi les orthologues. Il est représenté par la zone hachurée.

caractérisé chez *E. faecalis* et, fait intéressant, son organisation génétique est sensiblement la même. Le fait que le TCS02 présente un % GC local (32%) plus faible d'environ 10% par rapport aux gènes de l'environnement suggère un transfert horizontal potentiel de gène, peut-être à partir de l'entérocoque qui possède lui aussi un % GC local à 32 %. Actuellement, rien n'est décrit dans la littérature sur ce système.

1.2.4) TCS04

TCS04 appartient à un cluster restreint (Figure 26). Il présente 65% d'identités avec des TCS de *S. mutans* et certaines clostridies apparentés à SpaR de *B. subtilis* qui est impliqué dans la régulation de la biosynthèse d'une bactériocine, la subtlilisine (Kleerebezem *et al*., 2004). Toutefois, le contexte génétique chez la LMD-9 est encore une fois bien différent de ces souches et ne s'apparente pas à celle d'un système producteur d'une bactériocine. On retrouve d'ailleurs dans l'environnement proche et conservé dans le cluster une protéine membranaire de fonction inconnue (*ster_0924*) ainsi que la topoisomérase TopA favorisant le décompactage de l'ADN lors de la réplication. Il est donc difficile de prédire une fonction au TCS04 et actuellement, rien n'est décrit dans la littérature sur ce système.

1.2.5) TCS05 (homologue à YycG/F, WalK/R, VicK/R, voir partie biblio)

Ce système est très conservé chez la plupart des Firmicutes mais se révèle le plus souvent absent des génomes des bactéries à Gram négatif. Sur les 30 souches étudiées, seule la souche de *S. uberis* ne le possède pas (Figure 27). La souche LMD-9 possède bien l'intégralité du système identique à 90% à celui des streptocoques pathogènes. On trouve dans le contexte génomique associé 4 gènes codant un transporteur d'acides aminés polaires (*ster_1117 à 1120*) et deux enzymes intervenant dans la modification de la paroi (*murM, murA*). Ce système tout comme le locus le comprenant est particulièrement conservé, les souches de lactocoques les plus éloignées gardant 75% d'identité avec RR05. TCS05 est impliqué dans la viabilité des bactéries en contrôlant la division cellulaire et notamment la restructuration de la paroi durant cette phase (voir partie bibliographique).

RR02



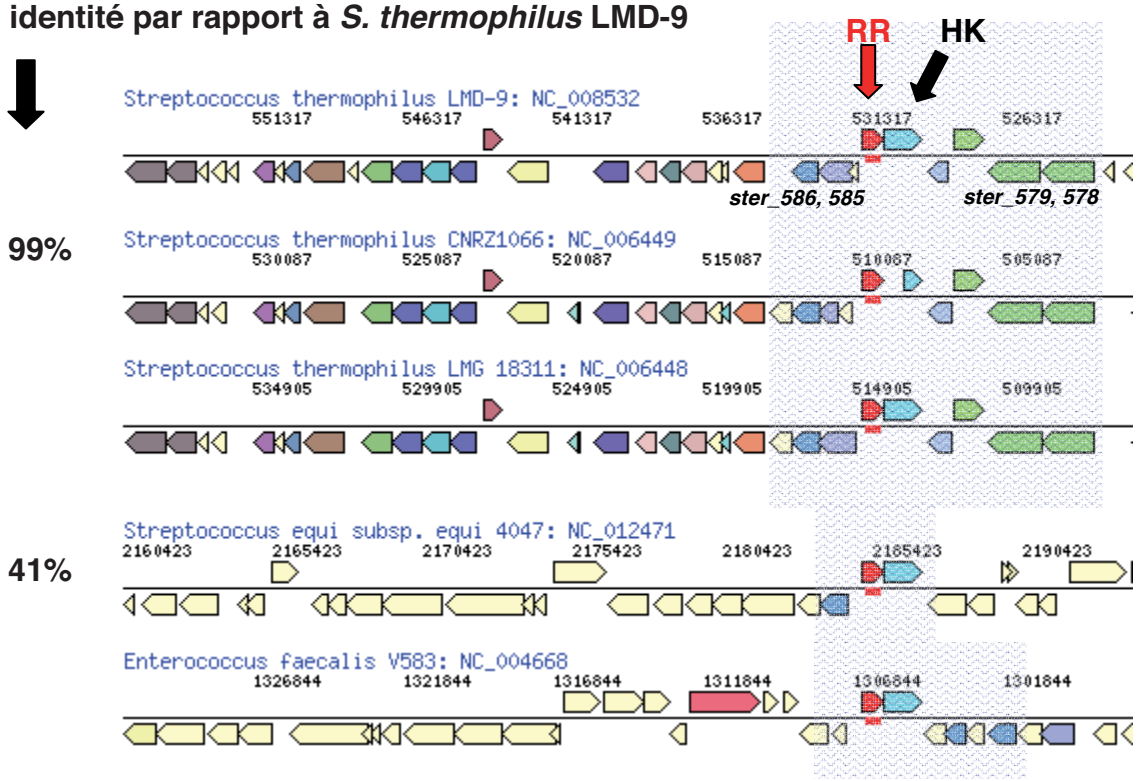


Figure 25: Environnement génétique du TCS02 de *S. thermophilus* et de quelques uns de ses plus proches orthologues

L'environnement génétique des orthologues de RR02 de *S. thermophilus* est symbolisé par la zone hachurée.

RR04

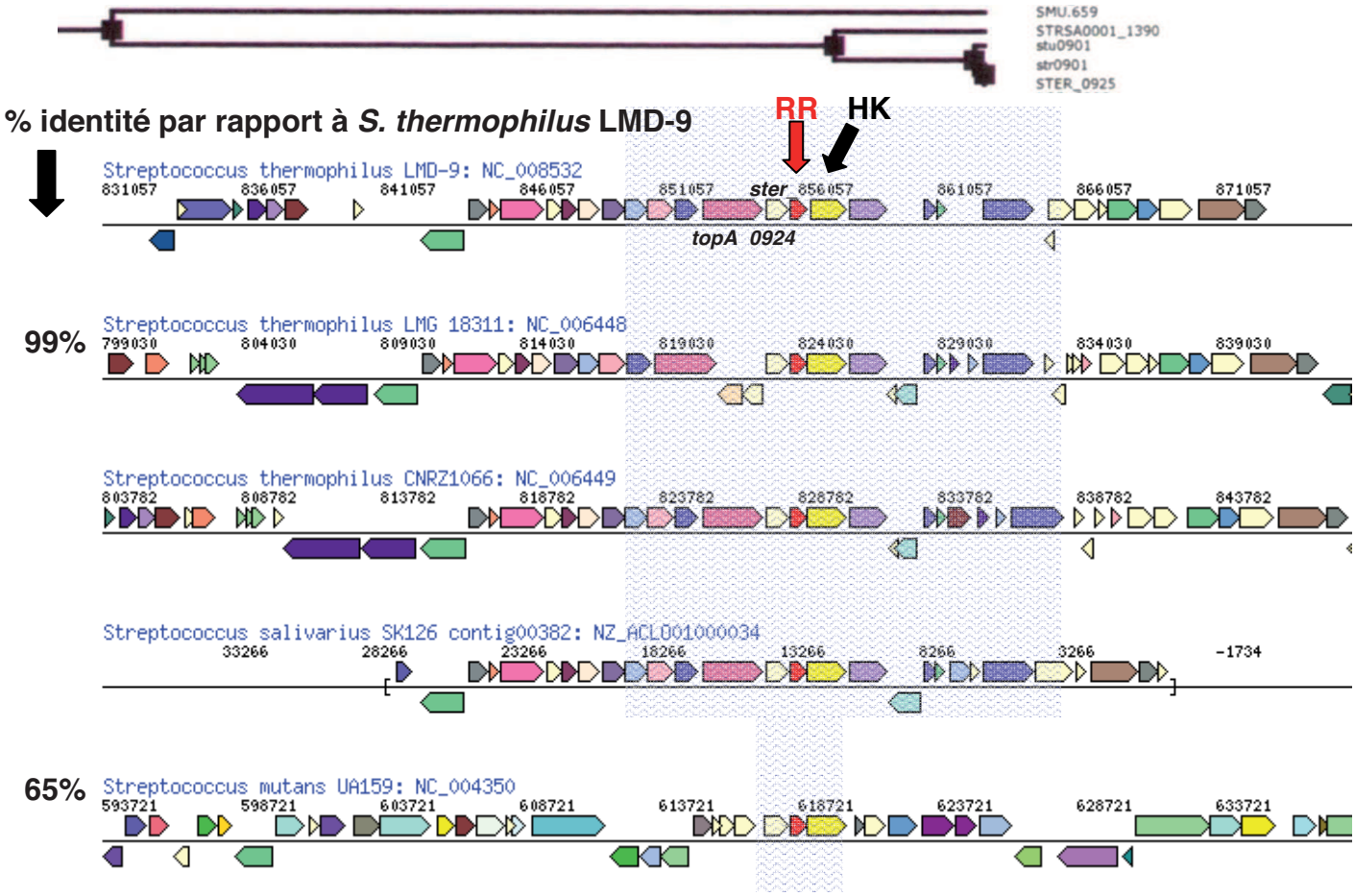


Figure 26: Environnement génétique du TCS04 de *S. thermophilus* et de quelques uns de ses plus proches orthologues

L'environnement génétique des orthologues de RR04 de *S. thermophilus* est symbolisé par la zone hachurée.

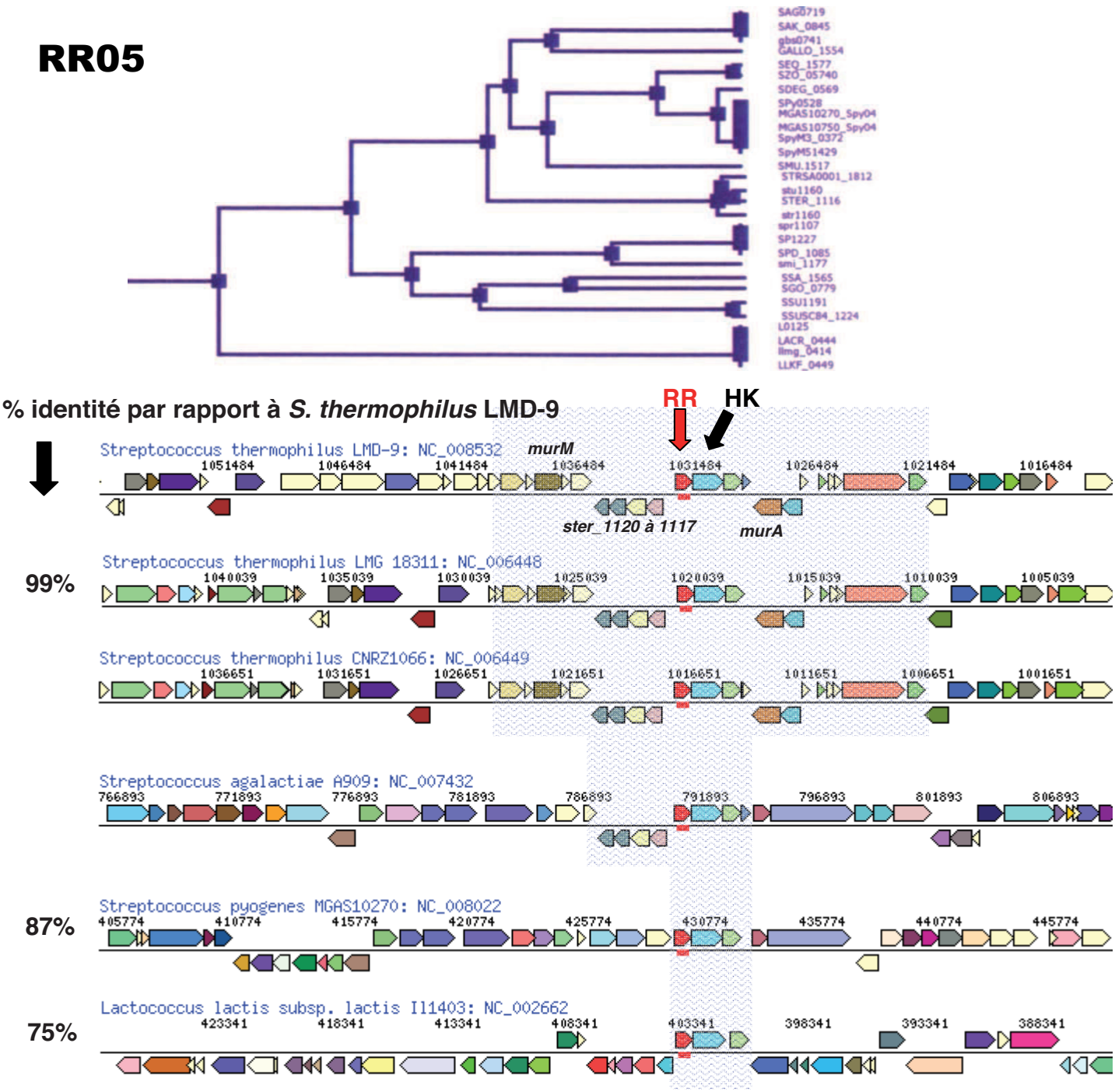
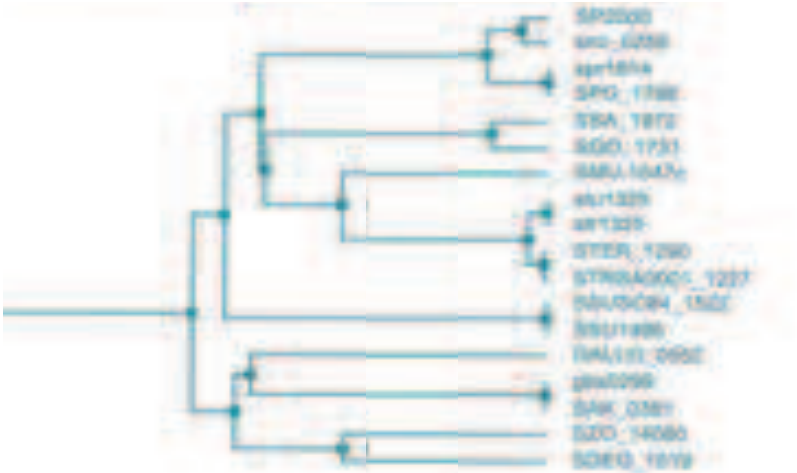


Figure 27: Environnement génétique du TCS05 de *S. thermophilus* et de quelques uns de ses plus proches orthologues

L'environnement génétique des orthologues de RR05 de *S. thermophilus* est symbolisé par la zone hachurée.

RR06



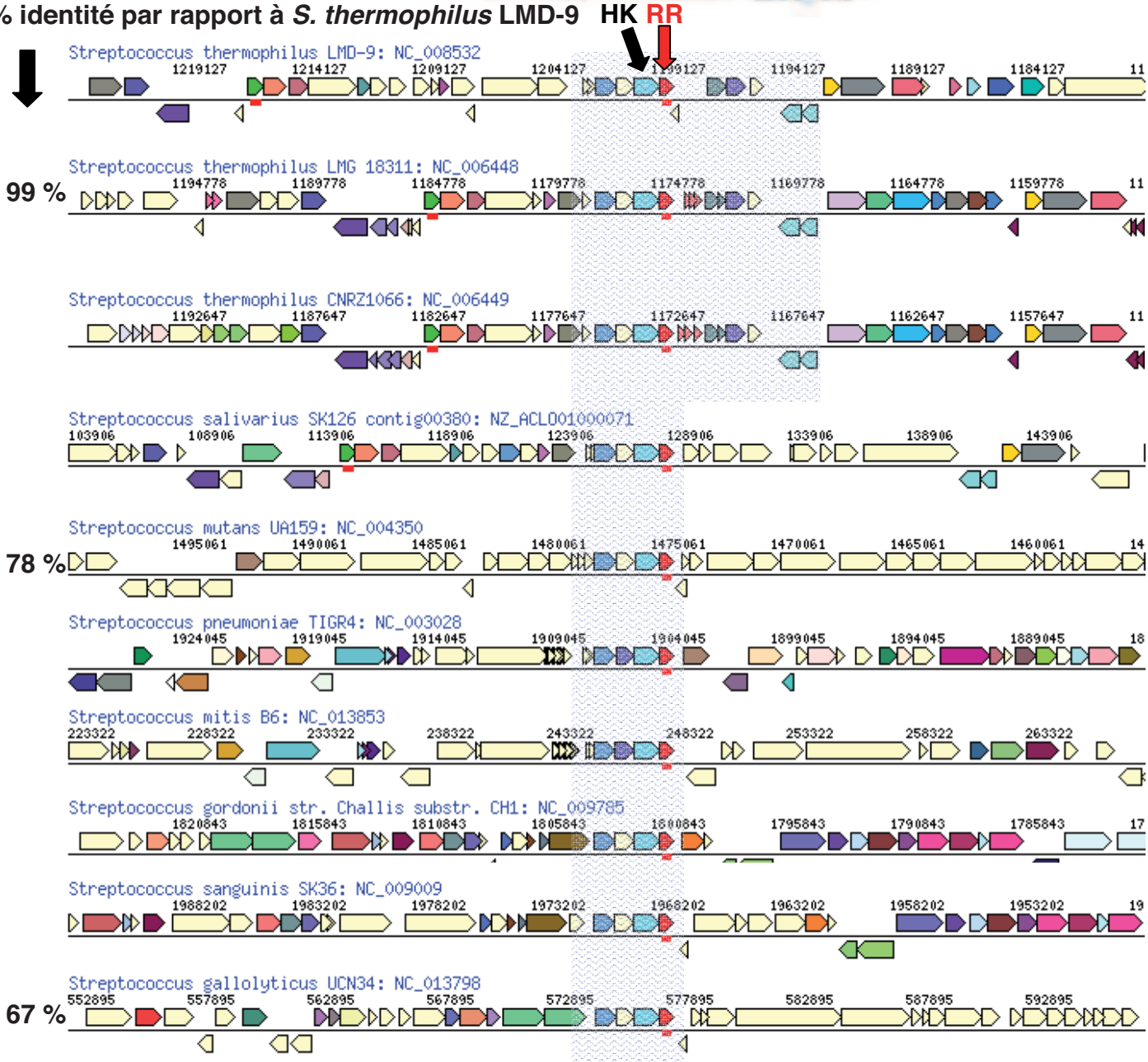


Figure 28: Environnement génétique du TCS06 de *S. thermophilus* et de quelques uns de ses plus proches orthologues

L'environnement génétique des orthologues de RR06 de *S. thermophilus* est symbolisé par la zone hachurée.

RR07

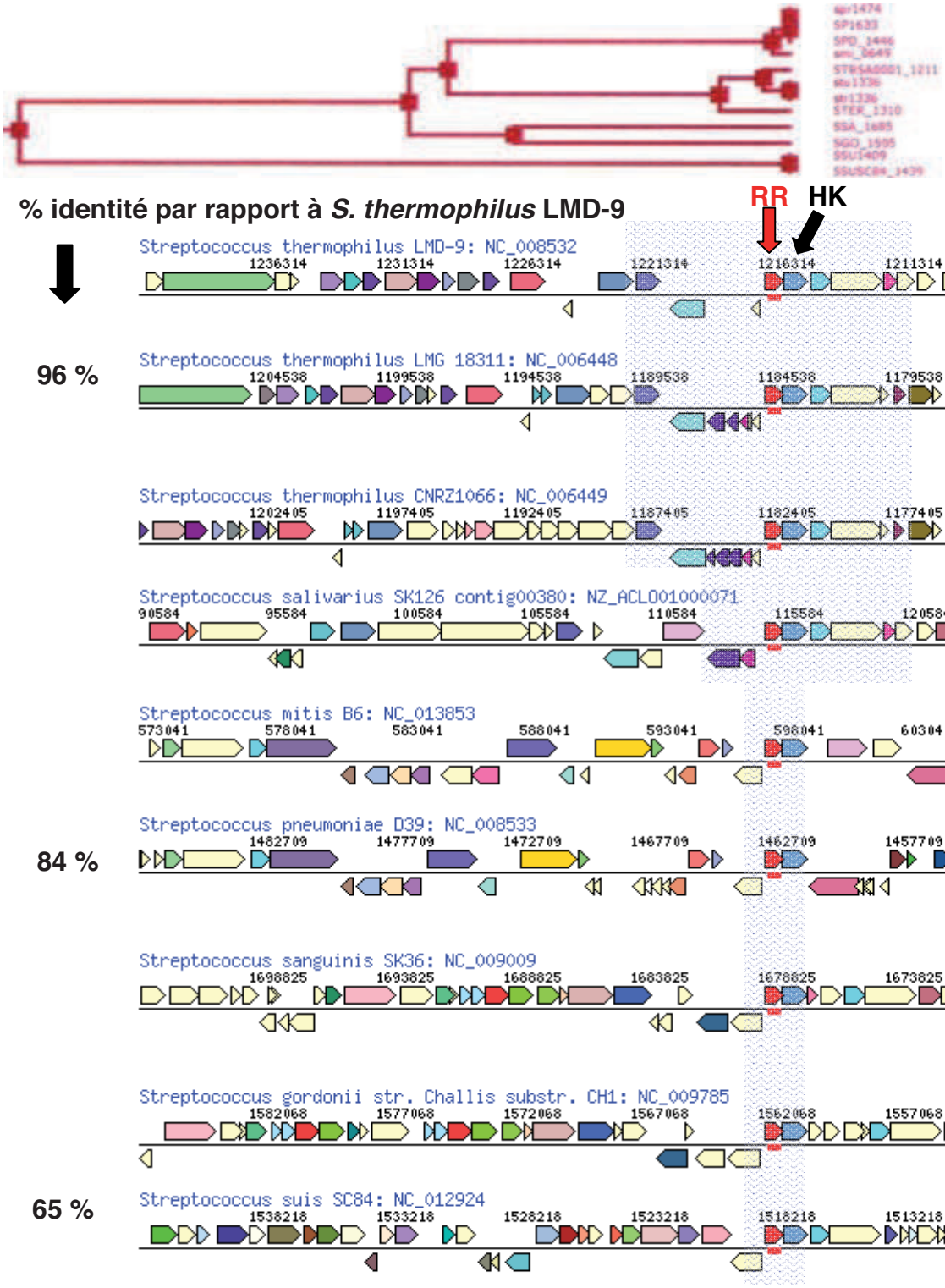


Figure 29 : Environnement génétique du TCS07 de *S. thermophilus* et de quelques uns de ses plus proches orthologues

L'environnement génétique des orthologues de RR07 de *S. thermophilus* est symbolisé par la zone hachurée.

1.2.6) TCS06

Ce système n'est pas une originalité de *S. thermophilus* puisqu'on le retrouve chez des souches pathogènes exceptées les souches de *S. pyogenes*. On ne connaît actuellement rien de sa régulation ni des fonctions dans le quel ce système est impliqué.

TCS06 présente 70% d'identité avec un TCS non caractérisé de *S. pneumoniae* avec un contexte génétique proche conservé (Figure 28). Ce locus TCS06 est singulier de part sa structure, atypique par rapport aux autres TCS de *S. thermophilus*, puisque le gène *rr06* se trouve en aval du gène codant l'histidine kinase correspondante. La protéine RR06 potentielle, de type NarL, possède un domaine HTH-luxR pouvant être associé aux mécanismes de régulation de type quorum-sensing (McAnulla *et al*., 2007; Upton *et al*., 2001). De plus, dans son environnement proche se trouvent un ABC transporteur non caractérisé ainsi que deux gènes codant potentiellement pour deux petits peptides d'une trentaine d'acides aminés (en aval) et qui pourraient jouer un rôle dans la régulation du système. Certains outils bioinformatiques tels APD2 (, http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php) et Bactibase (http://bactibase.pfba-lab-tun.org/hmm) suggèrent que ces peptides pourraient être des bactériocines du fait qu'ils forment théoriquement une hélice hydrophobe chargée positivement.

1.2.7) TCS07

Un peu à la manière du TCS06, TCS07 est également présent chez des souches pathogènes exceptées les souches de *S. pyogenes et S. agalactiae*. Il présente une forte identité (85%) avec un TCS de *S. pneumoniae* mais un environnement génétique différent avec un « antimicrobial peptide ABC transporteur » présent en aval du TCS et absent chez *S. pneumoniae* (Figure 29). L'organisation génétique autour du TCS07 ressemble à celle du système BceRS (cluster 19 de la Figure 19) qui, est impliqué chez *S. mutans* dans la perception et la détoxification de la bacitracine (voir partie bibliographique). On peut supposer que le TCS07 est analogue à BceRS au sens où il permettrait d'exporter une molécule, probablement autre que la bacitracine comme une bactériocine.

1.2.8) TCS08

On retrouve ce TCS dans toutes les souches sélectionnées avec une organisation des gènes du locus conservée. Seules les souches de lactocoques présentent un environnement différent; néanmoins on retrouve toujours une structure à 3 composants, structure ayant fait

RR08



% identité par rapport à *S. thermophilus* LMD-9

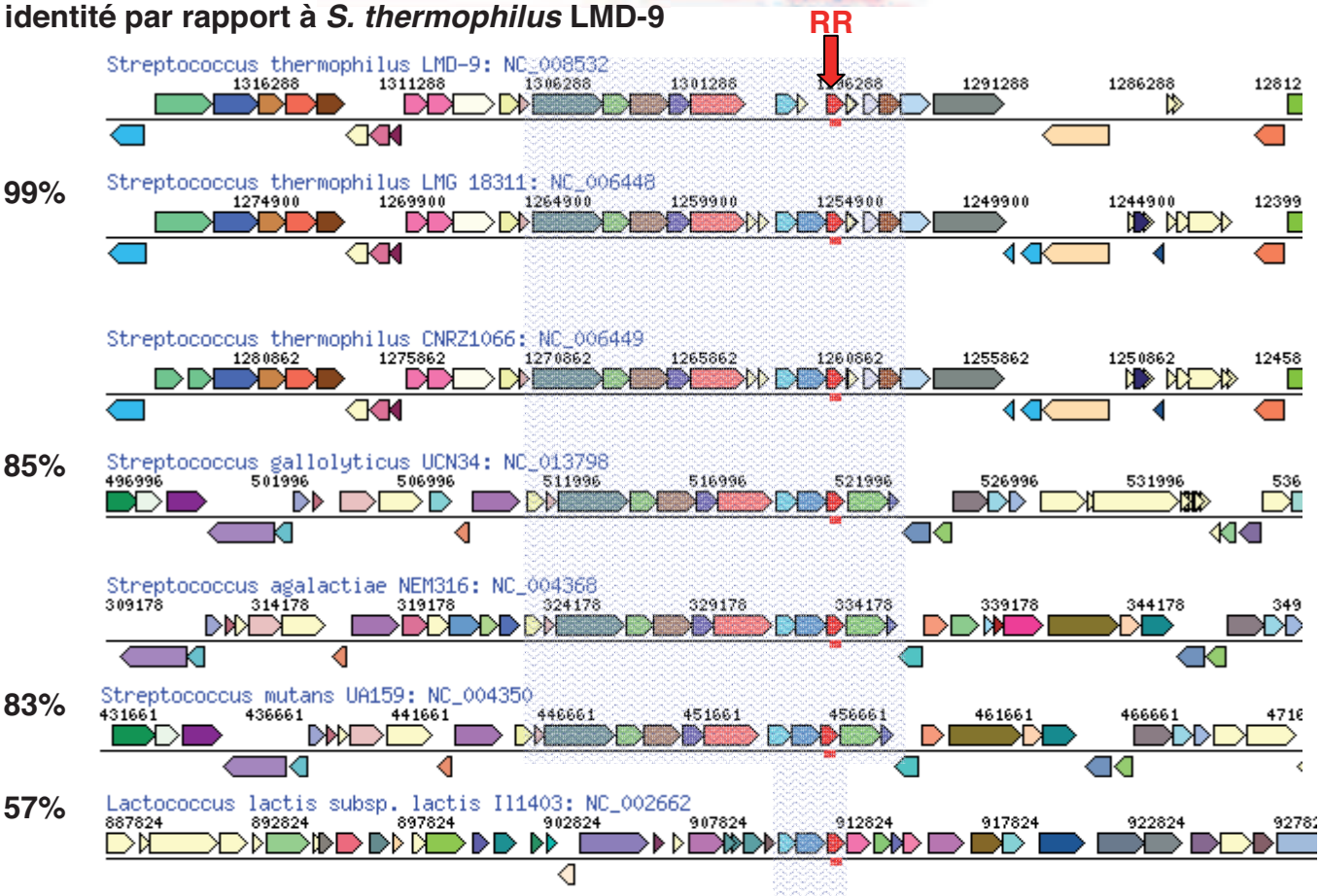


Figure 30: Environnement génétique du TCS08 de *S. thermophilus* et de quelques uns de ses plus proches orthologues

L'environnement génétique des orthologues de RR08 de *S. thermophilus* est symbolisé par la zone hachurée.

l'objet d'une récente étude chez *S. mutans* (Suntharalingam *et al*., 2009) dont le système LiaFSR est à 83% identique à *S. thermophilus* LMD-9 (Figure 30). Ce système permet le maintien de l'intégrité de la paroi en percevant les stress pariétaux qu'ils soient de nature antimicrobienne ou chimique. Il participe également à la tolérance au stress acide et à la formation de biofilm. LiaF serait un co-senseur cytoplasmique de stress, qui en absence de stress réprimerait l'expression du TCS (Suntharalingam *et al*., 2009). On note cependant que la souche LMD-9 ne possède pas l'histidine kinase LiaS, ce qui pose la question de savoir si le système est fonctionnel.

1.2.9) TCS09

Comme énoncé précédemment et détaillé dans la partie bibliographique, le système TCS09 est un système exclusif aux souches de *S. thermophilus* qui permet de produire, via un mécanisme quorum sensing-dépendant, une bactériocine. On notera cependant que parmi les 4 souches séquencées de *S. thermophilus*, seule la souche LMD-9 possède l'intégralité des gènes nécessaires à la production et à l'immunité contre la thermophiline 9 (Figure 31), suggérant une absence potentielle de fonctionnalité de l'ensemble du système chez les 3 autres souches.

Conclusion

L'analyse *in silico* a permis de situer chacun des TCS de *S. thermophilus* LMD-9 par rapport aux autres systèmes des streptocoques et lactocoques. Cependant, il est difficile de prédire les fonctions qu'ils pourraient contrôler car soit les systèmes sont très spécifiques aux *S. thermophilus* soit les fonctions sont connues mais l'absence de l'HK associée ne permet pas de proposer un régulon potentiel (cas du TCS01 et TCS08). Enfin, les informations disponibles dans la littérature ne nous permettent pas de savoir si ces TCS sont tous exprimés chez *S. thermophilus* LMD-9. Ainsi, dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier l'ensemble des TCS présents chez la souche LMD-9 de *S. thermophilus* avec pour objectif principal d'identifier les TCS impliqués dans la réponse à des changements environnementaux, rencontrées en particulier au cours des processus technologiques. Cette caractérisation générale fait l'objet d'une publication dans International Journal of Food Microbiology (qui fait suite à cette partie) dont les principaux résultats sont rapportés ici avec quelques compléments notamment sur les cinétiques d'acidification des mutants Δ*rr* délétés pour chacun des régulateur de réponse.

RR09



% identité par rapport à *S. thermophilus* LMD-9

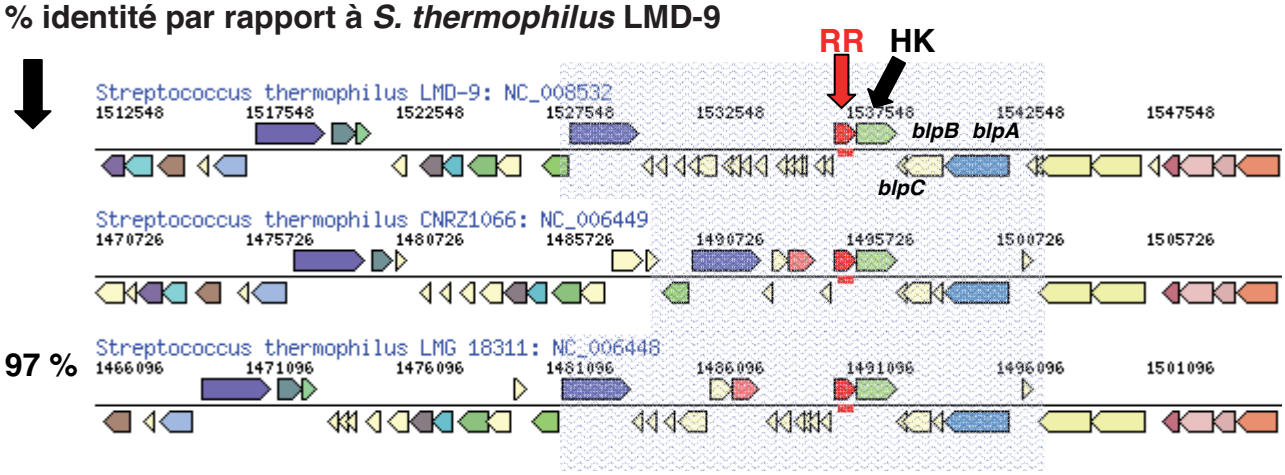


Figure 31 : Environnement génétique du TCS09 de *S. thermophilus* et de quelques uns de ses plus proches orthologues

L'environnement génétique des orthologues de RR09 de *S. thermophilus* est symbolisé par la zone hachurée.

2) Caractérisation générale des TCS de *S. thermophilus* LMD-9

2.1) Expression des *rr*

Avant de caractériser plus en détail les RR de *S. thermophilus* et notamment d'étudier leur rôle, nous avons tout d'abord cherché à déterminer s'ils étaient exprimés et donc potentiellement fonctionnels. Pour cela, nous en avons déterminé le niveau d'expression (par PCR quantitative) au cours de la croissance de la souche LMD-9 en lait (Figure 3 de l'article). Les 8 *rr* sont exprimés, à des niveaux différents et selon des profils différents au cours de la croissance. Ainsi *rr02* est le moins exprimé de tous les *rr*, à toutes les phases de croissance, suivi de *rr04* et *rr09*, *rr07* et *rr06* (par ordre décroissant d'expression). Les transcrits *rr01*, *rr05* et *rr08* sont environ 1000 fois plus exprimés que *rr02* et 10-30 fois plus abondants que *rr04*, *rr06*, *rr07* et *rr09*.

L'abondance des transcrits *rr* de *S. thermophilus* a également été établie en présence *Lb. bulgaricus* (souche ATCC11842) lors de la phase exponentielle de croissance en lait et comparée à celle des cultures pures correspondantes de *S. thermophilus* (Figure 4 de l'article). Globalement, l'expression de tous les *rr* n'est pas réprimée en co-cultures par rapport aux cultures pures : les transcrits *rr02* et *rr09*, tous deux membres de la famille LytTR, sont 5 à 6 fois plus abondants et ceux des gènes *rr01* et *rr05*, génétiquement proches, 2 fois plus abondants. Pour ce qui est des *rr rr04*, *rr06*, *rr07* et *rr08*, les niveaux d'expression sont similaires en cultures pures et en co-cultures. Ces résultats indiquent que la présence de *Lb. bulgaricus* induit des modifications d'expression de certains régulateur de réponse chez *S. thermophilus*.

2.2) Inactivation des *rr*

Des mutants négatifs de chacun des régulateurs de réponses ont ensuite été construits dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus* afin d'en explorer l'implication et le rôle dans la croissance dans différentes conditions environnementales. Nous avons pu inactiver les gènes *rr01*, *rr02*, *rr04*, *rr06*, *rr07 et rr08,* le mutant *Δrr09* étant déjà disponible (Fontaine *et al*., 2007). Pour *rr05*, il n'a pas été possible d'inactiver le gène, et nous avons démontré, par construction d'un mutant conditionnel, qu'il était essentiel à la

croissance de *S. thermophilus* comme c'est le cas dans la plupart des espèces de bactéries à Gram positif.

2.3) Cinétique d'acidification des mutants Δ*rr*

Les mutants négatifs ont été caractérisés en culture pure, par suivi de leur cinétique d'acidification en lait dans différentes conditions environnementales, à l'aide d'un système de type CINAC (Corrieu, 1988). La cinétique d'acidification en lait est très bien corrélée à la croissance de *S. thermophilus*. Afin d'obtenir des résultats comparables entre les différentes conditions de culture testées, des stocks congelés des différentes cultures (-80°C) en lait ont été réalisés. De cette façon, les cultures ont pu être ensemencées uniformément à 10^6 UFC/mL. Enfin, 3 lots de lait ont été utilisés de façon à obtenir 3 répétitions indépendantes pour chacun des paramètres testés. Au final une trentaine de CINAC auront été nécessaires pour tester tous ces paramètres. Les conditions environnementales suivantes ont été testées avec l'objectif d'identifier d'éventuels phénotypes des mutants *Δrr :*

- conditions de stress acide (ajout de lactate, produit au cours de la croissance en lait), ou oxydant (ajout d'H_2O_2, molécule potentiellement produite lors de co-cultures *S. thermophilus*/*Lb. bulgaricus* lors de la fabrication des yaourts)
- conditions pouvant stimuler la croissance (ajout de guanine ou formate) (Derzelle *et al*., 2005; Sieuwerts *et al*., 2010), ou l'activité de certains régulateur de réponse (ajout de magnésium) (Chong *et al*., 2008)
- co-culture avec l'une des 2 souches de *Lb. bulgaricus* DGCC4113 et ATCC11842, le partenaire bactérien de *S. thermophilus* dans le yaourt. Une de ces souches conduit en général à une forte stimulation des souches de *S. thermophilus* (souche Danisco DGCC4113, dénommée LB^+ ci-après) et l'autre ayant peu d'effet stimulant (la souche séquencée ATCC11842, dénommée LB° ci-après)

Principaux résultats obtenus

Effet de supplémentations en métabolites :

- Mg^{2+} (5mM) :

Nous avons choisi de tester l'effet de l'ajout de magnésium car il avait été montré dans le cas de CovR que des concentrations de l'ordre de 10 mM conduisent à sa surexpression (Chong *et al*., 2008). On note un effet légèrement pour toutes les souches

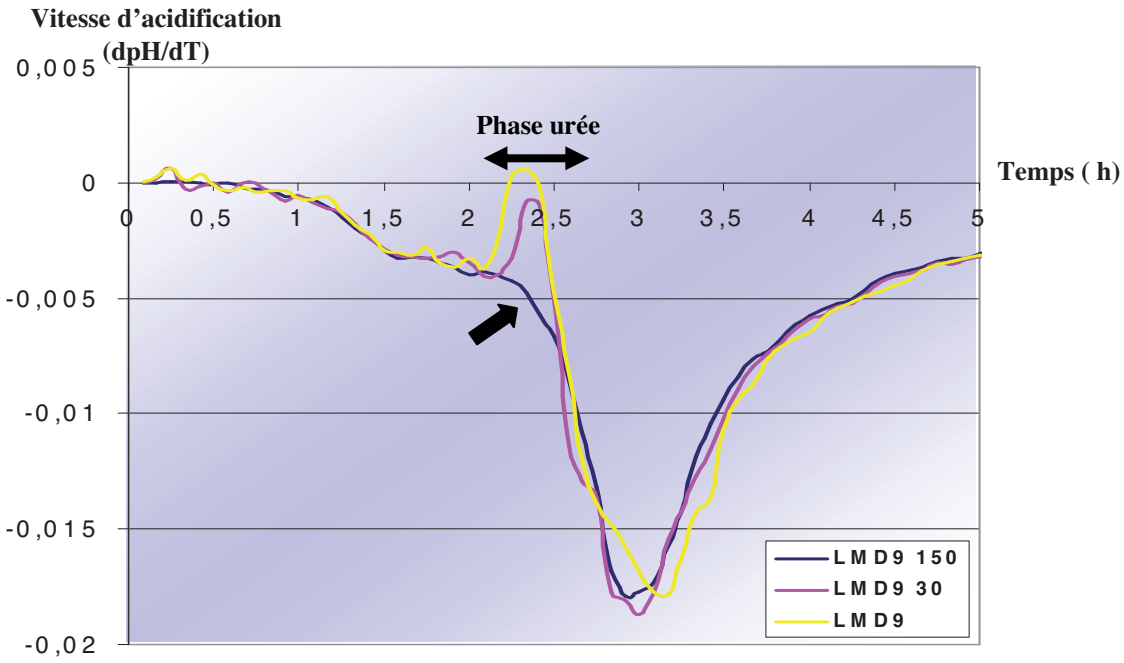


Figure 32: Vitesse d'acidification de *S. thermophilus* LMD-9 cultivé en lait non supplémenté (courbe jaune) ou supplémenté soit à 30μM (courbe rose) soit à 150μM (courbe bleue) avec du formate

(latence plus longue de 5 minutes, pente d'acidification 5% plus faible) mais aucune différence de comportement spécifique à une souche plutôt qu'une autre.

- Formate (30 et 150 μM)

Aucun effet significatif de l'ajout de formate n'a pu être constaté pour l'ensemble des souches. Seul fait intéressant révélé dans la Figure 32, la supplémentation à 10 ppm de formate permet d'éliminer la courte phase « urée » d'une fermentation classique en lait yaourt quelle que soit la souche considérée. En effet, le lait contient naturellement une faible quantité d'urée qui peut être dégradée en ammonium par l'uréase de *S. thermophilus* (Monnet *et al*., 2004). Ainsi au cours de cette phase « urée », le pH du lait se stabilise voire même augmente légèrement ralentissant ainsi la cinétique de la fermentation lactique.

- Guanine (30 et 150 μM)

L'ajout de purines a été également testé puisque des effets stimulants sur la croissance en lait des souches LMG18311 et CNRZ1066 avaient été démontrés (Derzelle *et al*., 2005; Sieuwerts *et al*., 2010). Néanmoins aucun effet significatif de l'ajout de guanine n'a pu être constaté sur la souche LMD-9 et l'ensemble des mutants *Δrr*.

Effet de stress :

- oxydant (1 mM H_2O_2)

D'un point de vue général, l'ajout d'H_2O_2 se traduit par une augmentation de la phase de latence d'environ 40 minutes et d'une diminution de 40% de la pente d'acidification. Néanmoins aucune souche n'est plus impactée qu'une autre.

- choc acide (passage pH 6,4 à 5,6)

Le choc acide réalisé induit là encore une augmentation de la phase de latence ainsi qu'une baisse du pouvoir acidifiant des souches. Néanmoins, aucune différence très marquée de comportement des mutants par rapport à la souche sauvage n'a pu être observée si ce n'est un temps de reprise d'acidification légèrement plus court pour les mutants RR01, RR07 et RR09.

- osmotique salin (0,2 M NaCl; 1,2% NaCl)

Ce choc salin provoque des effets négatifs pour toutes les souches. On note ainsi une baisse globale de 35% suite au stress de la pente d'acidification comprise entre les pH6 et 5,3 ainsi qu'un pH final à 20h augmenté de 0,1 pour toutes les souches.

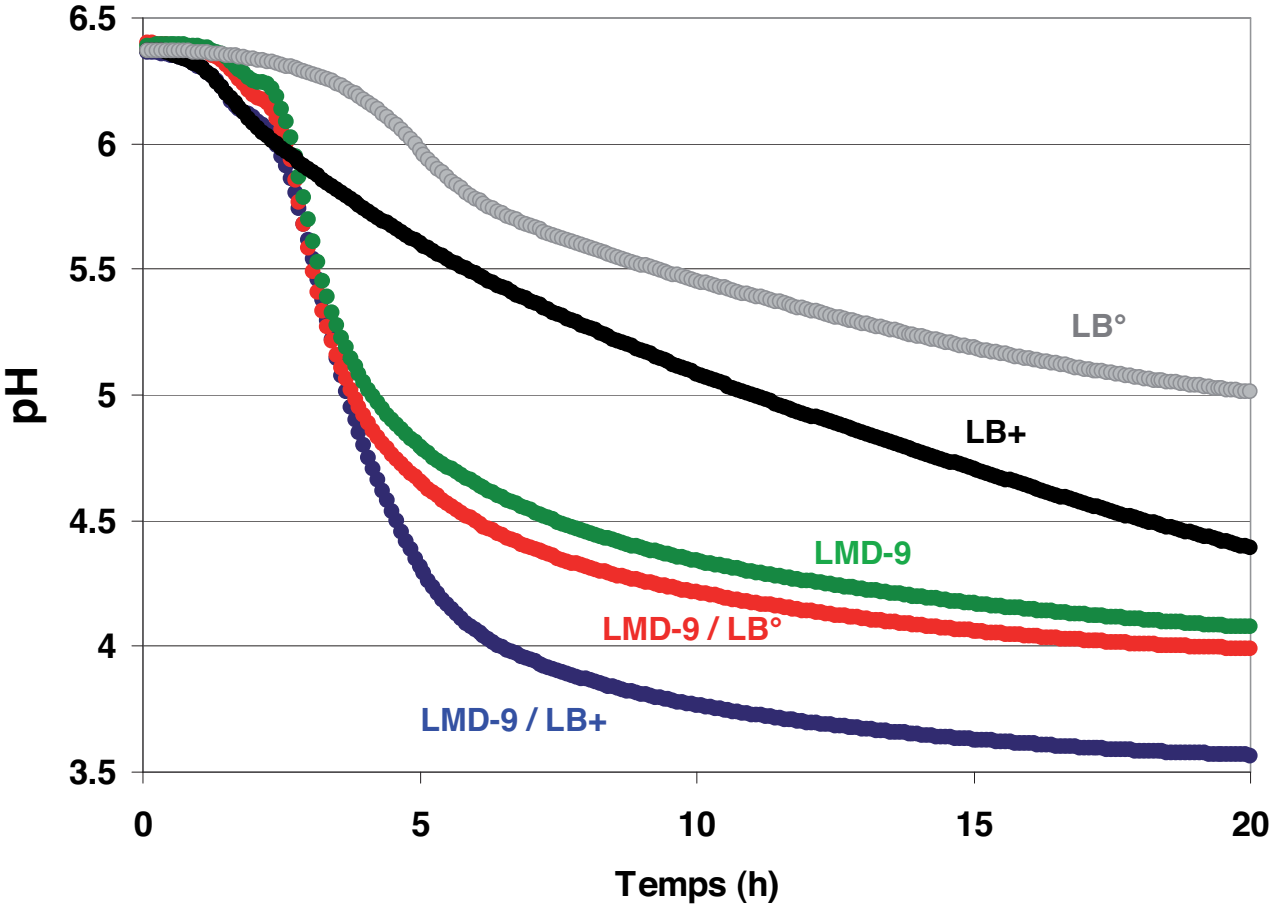


Figure 33: Suivi de l'acidification du lait par *S. thermophilus* LMD-9 seul (courbe verte) ou en co-culture avec *L. bulgaricus* ATCC11842 (LB°, courbe rouge), ou en co-culture avec *L. bulgaricus* DGCC4113 (LB+, courbe bleue). Les monocultures des *L. bulgaricus* ATCC11842 (courbe grise) et DGCC4113 (courbe noire) sont également représentés.

Effet de la présence de L. bulgaricus :

L. bulgaricus est souvent associé à *S. thermophilus* en technologie laitière. Ainsi par exemple la fabrication du yaourt nécessite, de part la législation française, une fermentation effectuée par les deux bactéries lactiques *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*. Leur association n'est pas essentielle mais peut induire des changements dans la vitesse de fermentation, l'acidification finale ou encore la texture du produit fini. Nous avons donc voulu étudier si les mutations portant sur les RR de *S. thermophilus* provoquaient des changements dans les cinétiques d'acidification par rapport à la souche sauvage. Deux lactobacilles ont été utilisés pour permettre de mieux discriminer l'effet de la présence de *L. bulgaricus* sur l'acidification et évaluer cet effet pour les différents mutants des RR: une souche peu stimulante et une stimulant la vitesse d'acidification globale de la co-culture par rapport à la mono-culture LMD-9.

Le comportement individuel des 2 souches de *L. bulgaricus* est très différent. On a ainsi une latence très longue du LB° (~4h) contrairement à celle du LB+ (~1h) qui possède de surcroît un pouvoir d'acidification beaucoup plus fort (Figure 33).

Dans le cas des co-cultures, la vitesse d'acidification est plus élevée et le pH final plus bas qu'en culture pure, aussi bien pour la souche sauvage LMD-9 que pour les mutants Δ*rr* et ce, que ce soit avec la souche stimulante de *Lb. bulgaricus* ou la souche neutre. Ce résultat confirme l'effet bénéfique de la co-culture *S. thermophilus*/ *Lb. bulgaricus* sur l'acidification finale. Par ailleurs, les cinétiques d'acidification des mutants Δ*rr* correspondent à celles de la souche sauvage quelle que soit le type de coculture. Ce résultat indique également, comme lors des cultures pures, que l'absence d'un seul régulateur de réponse est sans effet sur cette acidification.

Conclusion :

Nous n'avons pas observé de phénotypes marqués associés à chacun des mutants Δ*rr* indiquant que l'absence d'un seul régulateur de réponse n'est pas suffisante pour avoir un effet sur la croissance de *S. thermophilus* dans les conditions testées. Cependant, des modulations de l'expression de *rr* de *S. thermophilus* LMD-9 suggèrent une activation des TCS02 et TCS09 en coculture dues à la présence de *L. bulgaricus* (voir article qui suit).

3) Article « Characterization of *Streptococcus thermophilus* two-component systems: *in silico* analysis, functional analysis and expression of response regulator genes in pure or mixed culture with its yogurt partner, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* »

International Journal of Food Microbiology 151 (2011) 171–181

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Characterization of *Streptococcus thermophilus* two-component systems: *In silico* analysis, functional analysis and expression of response regulator genes in pure or mixed culture with its yogurt partner, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Benoît Thevenard [a,b], Niriaina Rasoava [a,b], Pascal Fourcassié [c], Véronique Monnet [a,b], Patrick Boyaval [c], Françoise Rul [a,b,*]

[a] *INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France*
[b] *AgroParisTech, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France*
[c] *Danisco France SAS, BP10, F-86220 Dangé-Saint-Romain, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 May 2011
Received in revised form 15 July 2011
Accepted 22 August 2011
Available online 7 September 2011

Keywords:
Mixed culture
Streptococcus thermophilus
Two-component systems
Yogurt

ABSTRACT

The lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) is widely used in the dairy industry. As a food bacterium, it has to cope with changing environments such as milk, yogurt, as well as the digestive tract, after the product has been ingested. In bacteria, two-component systems (TCS) are one of the most prevalent mechanisms to sense and respond appropriately to a wide range of signals. They are typically composed of a sensor kinase (HK) that detects a stimulus and a response regulator (RR) which acts as a transcriptional regulator.

Our objective was to make an inventory of the TCS present in *S. thermophilus* LMD-9 and investigate the contribution of each TCS to LMD-9 growth in milk. For that purpose, we performed *in silico*, transcriptomic as well as functional analysis.

The LMD-9 genome presented 6 complete TCS with both HK and RR (TCS 2, 4, 5, 6, 7, and 9) and 2 orphan RRs (RR01 and 08) with truncated HK. Our *in silico* analysis revealed that for 5 TCS out of the 8, orthologs with known functions were found in other bacterial species whereas for TCS02, 4 and 6 the function of the orthologs are unidentified. Transcriptomic studies (using quantitative PCR) revealed that all *S. thermophilus* LMD-9 response regulator genes were expressed in milk; they were expressed at different levels and with different profiles during growth. In mixed culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*), the *S. thermophilus* partner in yogurt, the expression of four *S. thermophilus* LMD-9 response regulator increased; two of them, *rr02* and *rr09*, increased by a factor of 6. These results indicate that the presence of *L. bulgaricus* induces regulatory changes in *S. thermophilus*. We also demonstrated that a response regulator (*rr02*) can exert its regulatory function on its target genes even when expressed at very low levels. We showed that RR05—an ortholog of *Bacillus subtilis* YycF or *Staphylococcus aureus* WalR—was essential for the growth of *S. thermophilus*. For the 7 other RRs, the absence of a single response regulator gene was insufficient to notably impact the growth of LMD-9 in milk, with or without supplementation with purines, formate, or stress agents (lactate, H_2O_2).

We demonstrated here that the 8 response regulators of LMD-9 are expressed—and thus potentially active—during growth in milk and suggested that the response regulators have possibly overlapping regulons and/or functions not essential under the conditions tested.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bacteria have to face environmental changes, irrespective of their ecological niche. Their adaptation requires fine-tuning systems to coordinate gene-expression changes necessary for survival. Two-component systems (TCS) are one of the most prevalent mechanisms in bacteria to sense and respond appropriately to a wide range of signals. A TCS consists of a membrane-bound sensor histidine kinase (HK) and a cognate cytoplasmic response regulator (RR), which acts as a transcriptional regulator. The histidine kinase senses environmental signals (pheromones or other physico-chemical signals) and activates the RR *via* transfer of a phosphoryl group to an aspartyl residue. Once activated, the RR activates or represses gene transcription by binding to the target gene(s). TCS are involved in various cellular processes ranging from sporulation, biofilm formation, chemotaxis, competence, stress response, virulence to bacteriocin production

* Corresponding author at: INRA, UMR1319 Micalis, Domaine du Vilvert, F-78352 Jouy-en-Josas, France. Tel.: +33 1 34 65 21 48; fax: +33 1 34 65 21 63.
E-mail address: francoise.rul@jouy.inra.fr (F. Rul).

0168-1605/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.019

(Hoch, 2000; Paterson et al., 2006; Kirby, 2009). However, the nature of the signals they perceive remains largely unknown.

Up to now, most studies have focused on TCS in pathogenic species, particularly streptococci, with special attention on their role in virulence. Among the streptococci, *Streptococcus thermophilus* (*S. thermophilus*) is an atypical species, being a non-pathogenic generally recognized as safe (GRAS) organism consumed by millions of people for centuries, and widely used in the dairy industry (cheese and yogurt manufacture). As a technological lactic acid bacterium (LAB), *S. thermophilus* has to cope with changing environments, with both abiotic and biotic constraints in milk, yogurt and in the digestive tract following ingestion. Depending on the strain, *S. thermophilus* possesses 6 to 8 complete TCS (HK + RR) (Hols et al., 2005) which have not been systematically investigated. Working in *S. thermophilus* Sfi39, Zotta et al. (2009) reported that inactivation of the response regulator gene *rr01* significantly decreases heat tolerance, and to a lesser extent acid-stress tolerance, compared with wild-type. TCS01 of *S. thermophilus* is homologous to the ubiquitous CovRS system which is involved in the regulation of general stress responses and virulence in pathogenic streptococci (Dalton and Scott, 2004; Lamy et al., 2004). We recently demonstrated that both *rr*01 and *rr*05 in *S. thermophilus* LMG18311 were expressed in milk (Herve-Jimenez et al., 2008, 2009). Furthermore, their expression as well as the RR01 and RR05 protein abundance varied during growth in milk irrespective of the presence of the yogurt partner *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) (Herve-Jimenez et al., 2008, 2009). Orthologs of TCS05 of *S. thermophilus* are well characterized in various species [systems YycF/G of *Bacillus subtilis*, VicK/R of *Streptococcus pneumoniae* or *Streptococcus pyogenes*, TCS-C of *Lactococcus lactis* (*L. lactis*), WalK/R of *Staphylococcus aureus*] and are essential for viability since they control cell growth, cell division, and responses to oxidative stress (Dubrac et al., 2007; Fukushima et al., 2008; Winkler and Hoch, 2008). The *blp*St locus of *S. thermophilus* LMD-9 containing one TCS (TCS09) has been previously characterized by Fontaine et al. (Fontaine et al., 2007; Fontaine and Hols, 2008) who also demonstrated that BlpHSt (HK09) constitutes a receptor for a pheromone. This system allows the production of the bacteriocin thermophilin 9 which inhibits the growth of most species closely related to *S. thermophilus*, such as *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *L. lactis*, and some *Listeria*.

To gain a more comprehensive view of the role of all two-component systems in *S. thermophilus*, we investigated the contribution of each TCS of *S. thermophilus* LMD-9 to its growth in milk, in particular when co-cultivated with *L. bulgaricus*. For that purpose we first characterized the TCS present in the genome of *S. thermophilus* by *in silico* analysis. We then determined if the response regulator genes were expressed in milk, what their expression profiles were in milk, with or without the presence of *L. bulgaricus*. We also constructed deletion mutants for the response regulators of *S. thermophilus* and phenotypically characterized them.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids, and media

The bacterial strains and plasmids used are listed in Table 1. *E. coli* TG1 *repA*$^+$ was grown in LB medium with shaking at 37 °C. *S. thermophilus* was grown in 1% (wt/vol) lactose M17 (M17Lac) broth (DIFCO) at 28 °C or 42 °C. When required, erythromycin (250 μg/ml for *E. coli* and 2.5 μg/ml for *S. thermophilus*) or kanamycin (30 μg/mL for *E. coli* and 1000 μg/mL for *S. thermophilus*) were added to the medium. Stock cultures of *S. thermophilus* strains grown in chemically defined medium (CDM) (Letort and Juillard, 2001) were prepared from 8-h cultures at 42 °C inoculated with one isolated M17Lac-agar clone. Stock cultures in CDM were stopped by freezing in liquid nitrogen and stored at −80 °C; they were enumerated on M17Lac agar plate. In all media, overnight precultures were performed by transferring one isolated colony into 10 mL of media.

2.2. Inactivation of response regulators of S. thermophilus LMD-9

The *S. thermophilus* response regulator mutants for *rr01* (locus_tag: STER_0354), *rr02* (STER_0583), *rr04* (STER_0925), *rr06* (STER_1290), and *rr07* (STER_1310) genes were constructed by internal deletion of a large part of the target gene (at least 90%) by double crossing over. For each mutant, two LMD-9 DNA fragments of approximately 1 kb, containing an upstream and downstream region of the gene of interest, were obtained by PCR using the Phusion high fidelity Taq polymerase (Finnzymes) with the LMD-9 DNA as a template. Total DNA of *S. thermophilus* LMD-9 was prepared as described by Pospiech and Neumann (1995). All primers used are listed in Table 2 and shown in Fig. 1. Amplicons were purified with a QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Downstream and upstream fragments were double-digested by specific restriction endonucleases and

Table 1
Bacterial strains and plasmids used in this study.

Bacterial strain or plasmid	Relevant property	Source or reference
Strains		
S. thermophilus		
LMD-9	Wild type	(Makarova et al., 2006)
TIL1187	LMD-9 Δ*rr01*	This study
TIL1188	LMD-9 Δ*rr04*	This study
TIL1189	LMD-9 Δ*rr06*	This study
TIL1190	LMD-9 Δ*rr07*	This study
TIL1191	LMD-9 Δ*rr02*	This study
TIL1353	LMD-9 *rr08*::erm	This study
LF101	LMD-9 Δ*rr09*	(Fontaine et al., 2007; Fontaine and Hols, 2008)
TIL1355	LMD-9 pG$^+$host9::rr05 (pG$^+$RR05)	This study
TIL1356	LMD-9 rr05::aphA3 (pG$^+$RR05)	This study
E. coli		
TG1 *repA*$^+$	TG1 derivative with *repA* gene integrated into the chromosome	
L. bulgaricus		
ATCC1842	Wild type	(van de Guchte et al., 2006)
DGCC4113	Wild type	DGCC
Plasmid		
pG$^+$host9	Thermosensitive plasmid, Ery^r	(Biswas et al., 1993)
pG$^+$RR05	*rr05* gene and its respective promoter and terminator cloned into the pG$^+$host9 plasmid	This study
pJH1	Kana^r	(Trieu-Cuot and Courvalin, 1983)

inserted one after another at suitable sites into the pG$^+$host9 (Maguin et al., 1996) in *E. coli* TG1 *repA*+ by ligation with T4 DNA ligase (New England Biolabs). The recombinant plasmid was used to transform electrocompetent cells of *S. thermophilus* LMD-9 as described by Ibrahim et al. (2007). Transformation, integration of this recombinant plasmid into the chromosome and subsequent excision of the pG$^+$host9 plasmid were performed using the protocol of Garault et al. (2000). Mutant *rr* strains were selected first according to their sensitivity to erythromycin and were further controlled by PCR, Southern blotting, and sequencing on an automated DNA sequencer (ABI Prism 310) using a BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems).

2.3. Insertional inactivation of rr08 gene of S. thermophilus LMD-9

LMD-9 *rr08*::*erm* (TIL 1353) strain was constructed as follows. The erythromycin (*erm*) cassette of the plasmid pG$^+$host9 was PCR-amplified using the Phusion high fidelity DNA polymerase with ermF and ermR primers (Table 2). The 1 kb DNA fragments flanking the *rr08* gene were PCR-amplified using the Phusion DNA polymerase, the LMD-9 DNA as a template, and primers 8–1/8–2 for the upstream fragment and primers 8–3/8–4 for the downstream fragment (Table 2 and Fig. 1). The 3′ end of the upstream generated fragment contained a sequence complementary to the 5′ end of the *erm* cassette whereas the 5′ end of the downstream generated fragment contained a sequence complementary to the 3′ end of the cassette. This allowed joining of these three fragments subsequent to Taq Phusion PCR using primers 8–1 and 8–4. After purification with a QIAquick PCR purification kit, 500 ng of the resulting 3 kb fragment was further used to transform LMD-9 natural competent cells as described by Gardan et al. (2009). Transformants were selected on M17Lac plates with erythromycin and were then checked by PCR using oligonucleotides 8–5 and ermR (Table 2). Finally sequencing of the flanking regions was performed to ensure that no unwanted mutations were introduced.

2.3.1. Conditional inactivation of rr05

2.3.1.1. Construction of pG$^+$RR05-carrying strain (TIL1355). The plasmid carrying the LMD-9 *rr05* gene, its potential promoter and terminator, was constructed by cloning, in pG$^+$host9, a 1053 pb fragment containing the *rr05* gene obtained by a Taq Phusion PCR with primers 5–7 and 5–8 (Table 2, Fig. 1). This fragment was double-digested by *Pst*I and *Not*I and cloned in *Pst*I-*Not*I double-digested pG$^+$host9 in *E. coli* TG1 *repA*+ to form the pG$^+$RR05 plasmid. The sequence of the plasmid was checked before being used to transform electrocompetent cells of *S. thermophilus* LMD-9 (see above). TIL1355 transformants containing the recombinant pG$^+$RR05 plasmid were selected at 30 °C on M17Lac with erythromycin and checked for the presence of plasmid pG$^+$host9 by PCR using p91 and p92 primers (Table 2).

2.3.1.2. Chromosomal insertional inactivation of S. thermophilus LMD-9 rr05 gene in TIL1355. A kanamycin (*kana*) cassette was obtained by PCR amplification using Phusion DNA polymerase, the primers AphA3F and AphA3R (Table 2), and the pJH1 plasmid (Table 1) as a template. At the same time, the 1 kb DNA fragments flanking the *rr05* gene were PCR amplified using Phusion DNA polymerase, the LMD-9 DNA as a template, and primers 5–1 and 5–2 for the upstream fragment and primers 5–3 and 5–4 for the downstream fragment (Table 2 and Fig. 1). The 3′ end of the upstream-generated fragment was complementary to the 5′ end of the *kana* cassette and the 5′ end of the downstream generated fragment was complementary 3′ end. This allowed joining of these three fragments in a subsequent PCR. The resulting 3.8 kb fragment was obtained using the three PCR fragments mixed in equal amounts, the Phusion DNA polymerase, and the 5–1 and 5–4 oligonucleotides.

TIL 1355 cells were grown overnight at 30 °C in CDM with erythromycin. The culture was then diluted in CDM at 0.05 OD_{600} and incubated for 2 h at 30 °C to reach the state of competence at 0.2 OD_{600}. Five-hundred nanograms of the purified 3.8 kb fragment were added to 100 μL of competent cells.

The mix with competent cells was incubated for 4 h at 30 °C before being serially diluted and spread onto M17Lac plates with kanamycin. Transformants (TIL1356) were selected on M17Lac plates with kanamycin and checked by PCR using primers 5–6 and Apha3-2 (Table 2). The sequence was finally verified, including a sequencing of the flanking regions.

2.4. Growth of S. thermophilus strains LMD-9, TIL1355 and TIL1356

Growths of LMD-9, TIL1355, and TIL1356 strains in M17Lac were monitored in triplicate using a Bioscreen C Microbiology Reader (Thermo Fisher Scientific, France) with multi-well disposable microplates. To assess the ability of TIL 1355 and 1356 cells to grow in absence of the *rr05* gene, overnight precultures were performed at 30 °C for all strains from one isolated clone. Precultures were then diluted to 0.05 OD_{600} in fresh pre-warmed M17Lac and incubated for 2½ h at 45 °C, which resulted in progressive depletion of the pG$^+$RR05 plasmid from the carrying cells. An aliquot (10 μL) of each culture was then inoculated in ten-plicate into 300 μL pre-warmed M17Lac wells. The microplates were incubated for 12 h at 45 °C with a mild and discontinuous agitation for 10 s every 12 min before monitoring at OD_{600nm}.

2.5. Acidifying property of S. thermophilus wild-type and response regulator deleted strains (CINAC experiments)

Yogurt model milk (YMM) was obtained by supplementing 100 mL of semi-skimmed UHT milk (Le petit Vendéen, Surgères, France) with 3% of skimmed milk powder (SUP'R TOP, Eurial Poitouraine, France). The solution was then pasteurized for 10 min at 90 °C. YMM frozen bacteria stocks were prepared from overnight cultures grown in 100 mL of YMM at 37 °C inoculated at 1% from an overnight M17Lac precultures. Cells were then re-suspended in one volume of fresh YMM supplemented with 40 mM glycerophosphate (VWR International) before being frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C. YMM culture stocks were then counted on M17Lac for *S. thermophilus* or MRS lactose 2% (wt/vol) acidified to pH 5.2 for *L. bulgaricus*.

YMM was then inoculated with frozen stock cultures of each strain to be tested at a rate of 10^6 CFU/mL with a 1:1 ratio for mixed culture experiments, and then incubated at 42 °C. Mixed cultures with *L. bulgaricus* were performed with strains ATTC11842 or DGCC4113 (Table 1). The pH was continuously monitored using a CINAC apparatus (Ysebaert, Frepillon, France). Milk supplementations were performed by introducing, before the pasteurization, 0.1% $MgCl_2$ (Sigma) or, after pasteurization, by adding a sterile solution of guanine monochloride (150 μM) or sodium formate (150 μM) or H_2O_2 (1 μM).

The acidification speed of *S. thermophilus* cultures was calculated as the slope between pH 6 and pH 5.3 (pH units/min).

2.6. RNA extractions and cDNA synthesis

Frozen culture stocks were prepared in 10% w/v Nilac skim milk (NIZO, Ede, the Netherlands) autoclaved for 15 min at 112 °C and inoculated at 1% from overnight precultures. At a pH of 5.5, cultures were frozen in liquid nitrogen and stored at −80 °C. Culture stocks were counted on M17Lac agar plate for *S. thermophilus* or 2% MRS agar lactose acidified to pH 5.2 for *L. bulgaricus*. Mono-cultures of *S. thermophilus* LMD-9 or cocultures with *L. bulgaricus* ATTC11842

Table 2
Primers used in this study.

	Primer mutant constructions	Sequence (5′–3′)	Restriction enzymes[a]
RR01Gfor	1–1	TAATCTCGAGATCCCTTTCATCTAATGG	XhoI
RR01Grev	1–2	TGAAGCTTATCTTCAACAATCAAAATGC	HindIII
RR01Dfor	1–3	TGAAGCTTCATTCAAACAGTACGAGG	HindIII
RR01Drev	1–4	CTAGACTAGTTTCAAGACTTTCTTCAAGG	SpeI
RR01ctamfor	1–5	TTTTCTCATTCCATTCTACC	
RR01ctavrev	1–6	ACATATCGTTAATCATAATCGTC	
RR02Gfor	2–1	ATAAGTCGACCTAATAATGGCAACAAGTCG	SalI
RR02Grev	2–2	AAGTCTGCAGTCAGAGTCATCACAAATAGC	PstI
RR02Dfor	2–3	GCAACTGCAGTGAAGAACACCTACTCCC	PstI
RR02Drev	2–4	AATAGCGGCCGCCAGTTTCCTAATATAACAGC	NotI
RR02ctamfor	2–5	ACGCTGAATATCATATTGTG	
RR02ctavrev	2–6	TCTTTATTTGGTAGTCTGAG	
RR04Gfor	4–1	TAATCTCGAGGTTTTAACTTGGGATAGC	XhoI
RR04Grev	4–2	CTTGAATTCACATTATGGTTTTGGAGC	EcoRI
RR04Dfor	4–3	TCCGAATTCGGATTGGTTACAAGTGG	EcoRI
RR04Drev	4–4	AATAGCGGCCGCGCCTATGCTTTCTTTCG	NotI
RR04ctamfor	4–5	AGTAAGGAAGAGTGTGAC	
RR04ctavrev	4–6	GGTGTATGCTCTACGG	
Am5F	5–1	CATTTCGTGGGTAACAACTA	
Am5R	5–2	GACATCTAATCTTTTCTGAAGTACATCCGCAACGGTCTTTCATCATCAACAAC	
Av5F	5–3	ATAATCTTACCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGGCGTGGTGTCGGTTATTAC	
Av5R	5–4	AGGAGAATACTTGATGGC	
RR05ctamfor	5–5	AGTGTCTACAAGGACC	
RR05ctavrev	5–6	TCAGAAATAGAAACAATCAACTG	
PromR5F–PstI	5–7	GCAACTGCAGCGAGAGTTGTTAGAGGTGG	PstI
TermR5R-NotI	5–8	AATAGCGGCCGCGAGTAAGGCTAGTTCAAAGC	NotI
RR06Gfor	6–1	GCTAAGCTTATCTTTATGTCCATTTCCTTCC	HindIII
RR06Grev	6–2	CTTGAATTCACATTGACTGGTCTTCGG	EcoRI
RR06Dfor	6–3	TCCGAATTCAAAGAAAAAGACTGGTTGG	EcoRI
RR06Drev	6–4	AATAGCGGCCGCCTCATCTAAAAAGAGCACC	NotI
RR06ctamfor	6–5	GTGGATTCCCTTTCTGTG	
RR06ctavrev	6–6	TGGTTGTTTTTTCCTCCTGA	
RR07Gfor	7–1	CCGACTCGAGTTCCAAAATAGCACGACC	XhoI
RR07Grev	7–2	AATGAATTCTTCTTGACTTGTTGACGG	EcoRI
RR07Dfor	7–3	TCCGAATTCGAAAGGTGTCGGTTACG	EcoRI
RR07Drev	7–4	AATAGCGGCCGCTCAATAGCCAACTTCTGC	NotI
RR07ctamfor	7–5	CAAACGAGCAAGTGAAAC	
RR07ctavrev	7–6	ACCATAACCCTTGCTTTC	
Am8F	8–1	TAACCTCAACTTTTCACTGG	
Am8R	8–2	CTACTGACAGCTTCCAAGGAGCTAAAGAGGTCCCGATCATCTACCAAAATTACAT	
Av8F	8–3	GCAAGTCAGCACGAACACGAACCGTCTTATCTCCCATCATCTGGTTTCACAGG	
Av8R	8–4	CCTCATAGACATCAAGACC	
RR08ctamfor	8–5	CAGTTGTTGTTTTAATTGGG	
RR08ctavrev	8–6	TTCATCGTCTAATCCTTCC	
	p91	GGCGAAAGGGGGATGTGC	
	p92	ACTGACAGCTTCCAAGGA	
	ermF	GGGACCTCTTTAGCTCCTTGG	
	ermR	GGAGATAAGACGGTTCGTGTTCG	
	aphA3F	CCAGCGAACCATTTGAG	
	aphA3R	GTTGCGGATGTACTTCAG	
	aphA3-2	CTGTAAAGGTCCAATTC	

Quantitative RT-PCR

Gene name/oligo name		Sequence (5′–3′)
rr01	01F	GACCCGTGAGGAACTCTTGC
	01R	CCTGGAATGTCGATTTTCCCACG
rr02	02F	TCATGCTTCCTATATTTTAAACCCC
	02R	AGTAGGTGTTCTTCAGTCCC
rr04	04F	ACGCATTTGTACGGCTATGAGG
	04R	TGCCACTTGTAACCAATCCCC
rr05	05F	GGGTTATGAAGTGGTTACGGC
	05R	CAGTTCAGGCAACATCAAGTCC
rr06	06F	AGAGCGTTCCATCAGTGACCT
	06R	AAGGCGACACCTTCAACTAGC
rr07	07F	GGAAATTCGGAAGGTCTCCAAGG
	07R	CACAAAGTCGTCCCCACCC
rr08	08F	GTAGAAGTGGTTGGAGAGGC
	08R	GCTCAGGCATAACAAGGTCC
rr09	09F	ACGCAACTACCACGGATGAG
	09R	GATAGTCTGGAGGTGAACATGG
gyrA	1256F	TCCCAGATGTTCGTGACGG
	1256R	ACGGGCAGATTTTTTATGAGGC
ster_0585	585F	ACTTTGCTATCTGGTCTGGG
	585R	CCCTACGTCTTCCTCCTTAT

Table 2 (*continued*)

Quantitative RT-PCR		
Gene name/oligo name		Sequence (5′–3′)
ster_0586	586F	CAGGGAGATGTTCACTACGG
	586R	AGAGGTGCATACTGTTGTGAC
hk02	HK02F	CTCGTCAACAGCAGCAATATTACC
	HK02R	GTCATGCCGAAGGCTTTGG

[a] Restriction enzyme recognition sequences are underlined.

were inoculated at a rate of 10^6 CFU/mL with a 1:1 ratio for coculture experiments, and were then incubated at 42 °C.

Total RNA was extracted from cultures grown in 250 mL NILAC milk. Cells were collected at the end of lag phase (60 mL; pH 6), exponential phase (30 mL; pH 5.5), and stationary phase of growth (30 mL, pH 4.5). Cells were suspended in 9 volumes of a citrate buffer (100 mM Tris, 70 mM Trisodium citrate, pH 8). After a short homogenization with an Ultra-turrax T25 basic (Ika Werke), cells were harvested by centrifugation (5 min, 4 °C at 8000 *g*), washed with cold extraction buffer (20 mM sodium phosphate, 1 mM EDTA, pH 7), and stored at −80 °C. All bacterial pellets were suspended in 400 µL of buffer containing 10% glucose, 12.5 mM Tris–HCl (pH 7.6), and 60 mM EDTA, and then transferred into tubes containing 500 µl acid phenol (pH 4.5) and 0.6 g of 0.1 mm diameter glass beads (Sigma). Cells were subject to mechanical disruption with a Fastprep (QBIOGENE) apparatus (two 30 s cycles of homogenization at maximum speed with 1 min intervals on ice). After a centrifugation step (13,000 *g* for 10 min at 4 °C), RNA was purified by Trizol/chloroform/isoamyl alcohol, then chloroform/isoamyl alcohol extractions, followed by isopropanol precipitation. RNA samples were suspended in 200 µl TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.6). All RNA samples were obtained from three independent experiments. Total RNA concentrations were determined by measuring A_{260nm}. Ten micrograms of RNA were treated with DNase I (Ambion) to eliminate contaminating DNA. RNA integrity was checked with an Agilent 2100 bioanalyser (Agilent). First-strand cDNA synthesis was prepared from 1 µg of Dnase-treated RNA using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions.

2.7. RT-qPCR

All primers used for RT-qPCR analysis are listed in Table 2. The length of PCR products ranged from 100 to 150 bp. PCR amplification efficiency was determined by running a standard curve with serial dilutions of chromosomal DNA including each pair of primers. Efficiency (E) was calculated using the formula: $E = [10^{(1/-s)} - 1] * 100$, where s is the slope of the regression line obtained for each pair of primers. In all experiments, efficiency was always above 90%. Real-time PCR was carried out with 25 ng reverse-transcribed cDNA, 200 nM of primers using the SYBR Green PCR Master Mix (Applied

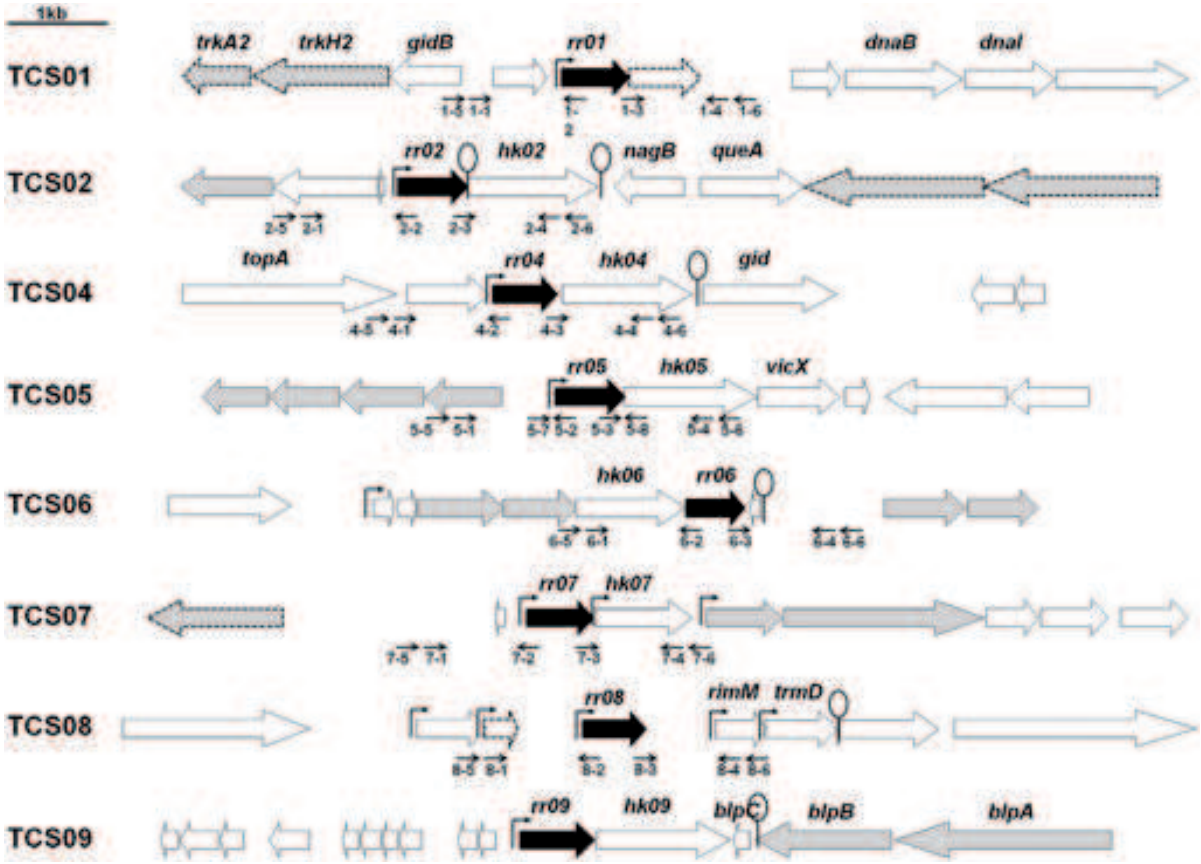


Fig. 1. Schematic diagram of the 8 loci encoding TCS in *S. thermophilus* LMD-9. TCS genes are depicted by black (response regulator) and white (histidine kinase) arrows with the direction of transcription indicated by the orientation of the arrows. Genes encoding other proteins are named when orthologs were found and are represented by patterned arrows as follows: truncated histidine kinase, dashed lines; hypothetical protein, gray shading; ABC transporters, gray; transporters, gray shading with dashed lines. Putative promoters ⚑, terminators ⚲, and primers used to construct and verify Δ*rr* mutants (Table 2) are also represented.

Table 3
Two-component systems (TCS) of *Streptococcus thermophilus* LMD-9.

Name	LMD-9 locus	Size (AA)	Orthologs[a] (locus/AA identity %)	(Putative) functions of orthologs
TCS01	STER_0354 (RR)	229	CovR *S. pyogenes* (spyM18_0328/82%)	• General stress response (Dalton and Scott, 2004; Froehlich et al., 2008; Chong et al., 2008; Biswas and Biswas, 2006; Lee et al., 2004; Gusa et al., 2007 ; Gryllos et al., 2007) • Oxidative stress (Deng et al., 2007) • Virulence (Mitrophanov et al., 2007) • Biofilm formation (Biswas et al., 2007; Chong et al., 2008)
TCS02	STER_0582 (HK)	431	*S. equi* (SEQ_2173/30%)	Unknown
	STER _0583 (RR)	236	*S. equi* (SEQ_2172/41%)	
TCS04	STER _0926 (HK)	431	SpaK *S. mutans* (SMU.660/47%)	Unknown
	STER _0925 (RR)	219	SpaR *S. mutans* (SMU.659/65%)	
TCS05	STER _1115 (HK)	446	PAS/PAC HK *S. agalactiae* (SAK_0846/75%)	• Acid and oxidative stress (Senadheera et al., 2009; Deng et al., 2007)
	STER _1116 (RR)	235	VicR *S. pyogenes* (SAK_0845/85%)	• Cell wall metabolis and biofilm formation (Bisicchia et al., 2007; Dubrac et al., 2008; Fukushima et al., 2008)
TCS06	STER _1291 (HK)	364	*S. mutans* (SMU.1548c/63%)	Unknown
	STER _1290 (RR)	200	*S. mutans* (SMU.1547c/78%)	
TCS07	STER _1309 (HK)	323	*S. pneumoniae* (SP670_1717/56%)	• Bacitracin resistance (Biswas et al., 2008; Bernard et al., 2003; Ohki et al., 2003)
	STER _1310 (RR)	226	*S. pneumoniae* (SP670_1718/84%)	
TCS08	STER _1387 (RR)	214	LiaR *S. mutans* (SMU.487/84%)	• Cell envelope stress (Suntharalingam et al., 2009) • Acid stress (Li et al., 2002) • Oxidative stress (Perry et al., 2008) • Biofilm formation (Li et al., 2002) • Mutacin production (Biswas et al., 2008)
TCS09	STER _1650 (HK)	446	BlpH *S. pneumoniae* (SPD_0469/37%)	• Thermophilin 9 production (Fontaine et al., 2007; Fontaine and Hols, 2008)
	STER _1649 (RR)	245	BlpR *S. pneumoniae* (SPD_0468/33%)	

[a] Blast search in finished genomes of other species than *Streptococcus thermophilus* (IMG, 03-08-2011).

Biosystems) for monitoring, as recommended by the manufacturer. PCR reactions were run on the Mastercycler EP Realplex detector (Eppendorf) under the following thermal-cycling conditions: Taq polymerase activation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 53 °C. SYBR Green PCRs were performed in triplicate, and for each culture condition, 3 independent experiments were performed. The *gyrA* gene (encoding gyrase A) was used to normalize data since it was expressed at a constant level in all samples (Ct~20) and in the same range as *rr* Ct values. Data were recorded as threshold cycles (Ct), expressed as means standard deviations, and computed using the comparative critical threshold $2^{\Delta\Delta CT}$ method described by Livak and Schmittgen (2001). Using the statistical software, Statgraphics Plus version 5 (Manugistics), we performed an analysis of variance on the ΔCt of each studied gene/*gyrA* gene to determine whether the relative expression levels of the gene between two conditions was significantly different ($P<0.05$). A ΔΔCt value corresponds to the difference between two values of ΔCt.

2.8. Bioinformatics

Bacterial genome sequences were retrieved from Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) and Integrated Microbial Genomes (IMG) system (http://img.jgi.doe.gov) and information on bacterial homology was obtained *via* IMG or the NCBI protein and microbial BLAST servers (default settings, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Protein domain architectures were analyzed using Pfam (http://pfam.sanger.ac.uk) and SMART (http://smart.embl-heidelberg.de) whereas TMHMM was used to predict trans-membrane helices (version 2.0; DTU, [http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM]). Multiple-sequence alignments of proteins were generated using CLUSTALW 2.0.12 and second-structure prediction was performed with Predator; both packages are available on http://mobyle.pasteur.fr. Presence of putative promoters, terminators and operons was evaluated using BPROM (http://linux1.softberry.com/berry.phtml) and BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), FINDTERM (http://linux1.softberry.com/berry.phtml), TransTermHP (http://transterm.cbcb.umd.edu), operonDb (http://operondb.cbcb.umd.edu) and Database of prokaryotic Operons (http://csbl1.bmb.uga.edu/OperonDB/DOOR.php). Study of *S. thermophilus* LMD-9 TCS conservation among the *Lactobacillales* order was performed by using the tool "phylogenetic occurrence profile" from IMG.

3. Results

3.1. S. thermophilus LMD-9 possesses 8 response regulators

We performed *in silico* analysis of the two-component systems of *S. thermophilus* LMD-9 in order to know their genetic organization and their sequence homologies with TCS from other species and thus get potential clues about the function they could be involved in or the environment they could response to.

Bioinformatic analysis of the *S. thermophilus* LMD-9 genome identified 6 complete TCS with both HK and RR (TCS 2, 4, 5, 6, 7, and 9) and 2 orphan RRs (RR01 and 08) with truncated HK (Table 3). The latter are shared by the 4 sequenced strains of *S. thermophilus*. TCS03, absent in LMD-9, is probably non-functional in this species since only truncated genes (*hk* and *rr*) exist in the 3 other sequenced *S. thermophilus* strains, CNRZ1066, LMG18311, and NDO3. Of note, 5 out of the 8 LMD-9 TCS loci

contained putative ABC transporters in their immediate vicinity (Fig. 1); the latter could be involved in the regulation via the TCS as it is in the case for detoxification modules in *B. subtilis* composed of ABC transporter and TCS and responsible for the resistance to antimicrobial peptides (Staron et al., 2011). It has indeed been suggested that TCS and ABC transporters have co-evolved as functional units to respond to a physiologic function (Dintner et al., 2011).

Homology search with TCS of *S. thermophilus* LMD-9 was performed on the 69 complete genomes from the *Lactobacillales* (IMG database). For 5 of the 8 loci (TCS 1, 4, 5, 7, and 9), orthologs with known functions were found (Table 3). TCS 1 and 5 were present in all *Lactobacillales*. Homologs for TCS 6, 7, 8, and 9 were found in more than 65% of the *Lactobacillales*. In contrast, TCS02 and 04 were poorly conserved among *Lactobacillales* (present in only 25% of the strains) and TCS02 possibly originated, by horizontal transfer, from another bacterium since no orthologs of TCS02 were found in other streptococci. Moreover, its G + C content (32%) is low compared with the overall *S. thermophilus* genome (39%). In addition, the function of orthologs of TCS02, TCS04 and TCS06 of *S. thermophilus* LMD-9 has not been yet identified.

Blast searches, PFAM and SMART database analyses were performed to classify the response regulators of LMD-9. They all possess the classical sensing input domain with a conserved N-terminal regulatory domain (REC)—which contains the phosphorylation site-, and a variable C-terminal effector or output DNA binding domain. Alignment of these 8 RRs revealed that they share a conserved α-β domain structure, alternating between stranded parallel β-sheets and amphipathic helices (Fig. 2A). They possess 3 groups of residues that have been previously identified as essential for phosphorylation and the subsequent regulatory activity: i) a cluster of conserved hydrophobic residues surrounding the phosphorylation site (Asp57) at the C-terminal end of the third β-sheet, ii) the catalytic residues Asp12-13 and Lys109, and iii) the residues Thr87 and Tyr106 involved in the conformational switch that occurs after phosphorylation (Dyer and Dahlquist, 2006). The exceptions are RR07 which possess another aromatic residue at position 106 (Phe instead of Tyr) and RR05 and RR07 for which Thr87 is replaced by another polar amino acid, Ser. The effector domain of the 8 RRs contains exclusively DNA binding domains (Fig. 2B). According to the classification of Galperin (2006), the 8 RRs can be grouped into structural subfamilies: i) the OmpR family with winged-helix-

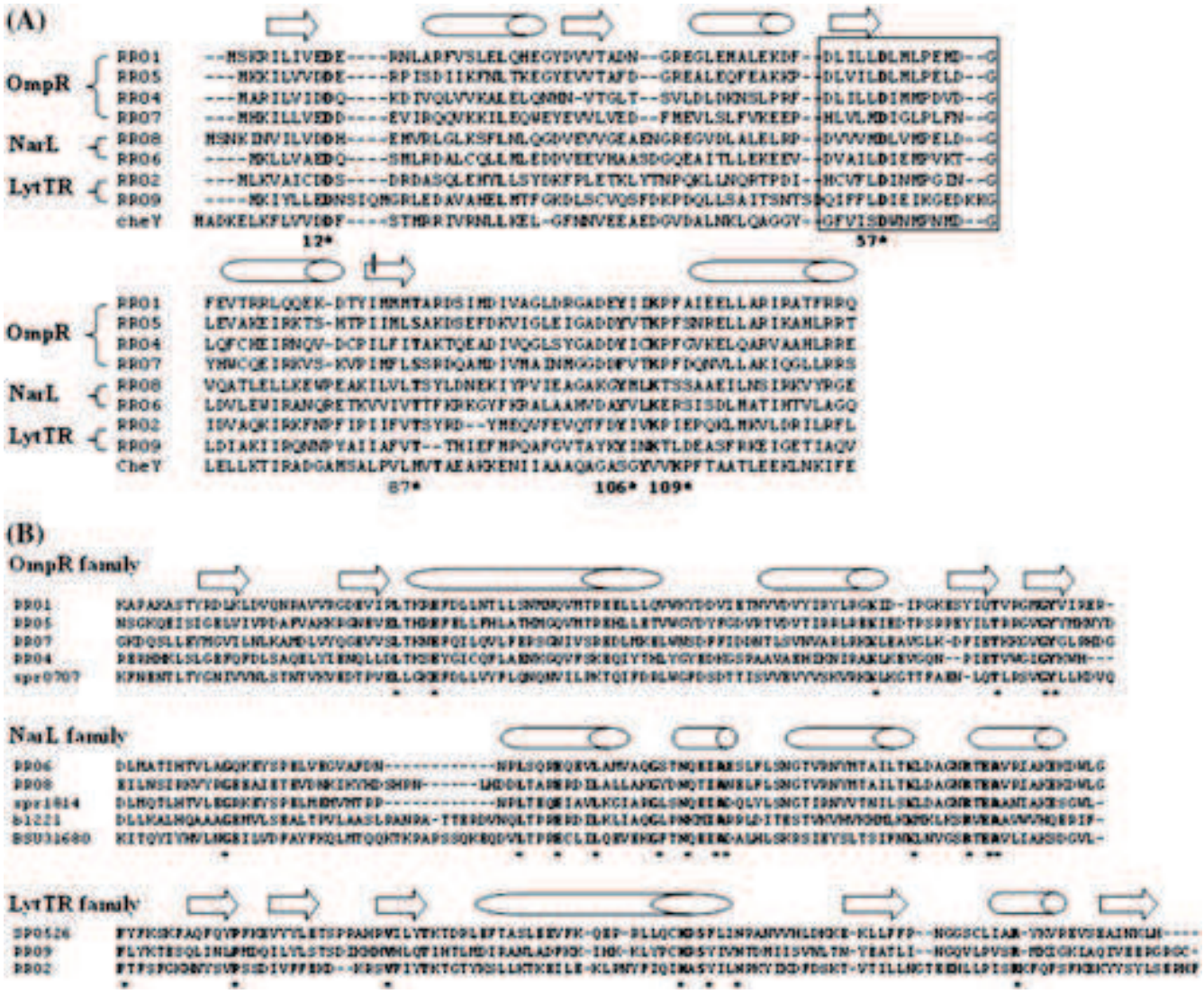


Fig. 2. Sequence alignment of the *S. thermophilus* LMD-9 response regulator input and output domains. Highly conserved amino acids are written in bold and highlighted by asterisks. Secondary structural elements were defined by predictive analysis confronted with known crystal structures of characterized CheY (Dyer and Dahlquist, 2006) (*E. coli*, IMG locus_tag: Z2936), OmpR (Martinez-Hackert and Stock, 1997; *S. pneumoniae*, spr0707), NarL (Ducros et al., 2001; *S. pneumoniae*, spr1814; *E. coli*, b1221; *B. subtilis*, bsu31680) and LytR (Nikolskaya and Galperin, 2002; *S. pneumoniae*, sp0526). They are represented by cylinders for α-helixes and by arrows for β-strands. (A) Input REC domains were aligned together with the well-characterized CheY. Hydrophobic residues surrounding the phosphorylation site are shown in a rectangular box. (B) Ouput domains were aligned according to specific DNA-binding subfamilies: wHTH for OmpR, GerE for NarL, and LytR for LytR.

turn-helix fixed_5638_2(wHTH) DNA-binding domain (RR01, RR04, RR05, RR07), ii) the NarL/FixJ family which possesses the DNA binding domain HTH-LuxR or GerE (RR06, RR08), and iii) the LytTR family (RR02, RR09) with an unusual β-strand structure at the DNA binding domain. By analysis of 179 complete Firmicutesgenomes (IMG database), we observed that the gene order of TCS having a NarL-type RR was inverted compared with the usual 5′RR-HK3′ order, which could have mechanistic or regulatory implications for the TCS functioning. In addition, whereas the LytTR family accounts for only 3.4% of all the known bacterial TCS (1387 LytTR response regulator out of 40,338 total response regulators; http://www.p2cs.org/, 06-29-11), it is better represented in S. thermophilus(2 out 8 LMD-9 TCS).

3.2. The 8 response regulators of S. thermophilus LMD-9 are expressed during growth in milk

All of the 8 LMD-9 response regulator genes were expressed in milk, throughout the acidification, which is directly related to cell growth in these conditions (Fig. 3). Since all pairs of primers had similar amplification efficiencies, we compared the expression between all response regulator genes. Among the latter, rr02 was the most weakly expressed—at all growth phases—followed by rr04 and rr09, rr07 and rr06. Transcripts rr01, rr05, and rr08 were about one thousand-fold more abundant than rr02 (ΔΔCt>10) and ten-to-thirty fold (ΔΔCt ~3–5) more abundant than rr04, rr06, rr07, and rr09. Three different time-course expression profiles were revealed for the LMD-9 response regulator genes during growth in milk (Fig. 3). For rr05 and rr09, the amount of transcripts increased throughout the growth/acidification of milk compared with gyrA transcripts. A second profile, observed in rr01 and the NarL family (rr06 and rr08), was characterized by a sudden drop in expression level during the stationary phase; this suggests that the presence of these response regulators could be linked to the growth phase and/or to the acidification. Finally, rr04, rr07, and rr02 presented a third profile showing a constant expression level which could indicate that these response regulators are necessary for basal functions of the bacterium, whatever the environmental conditions.

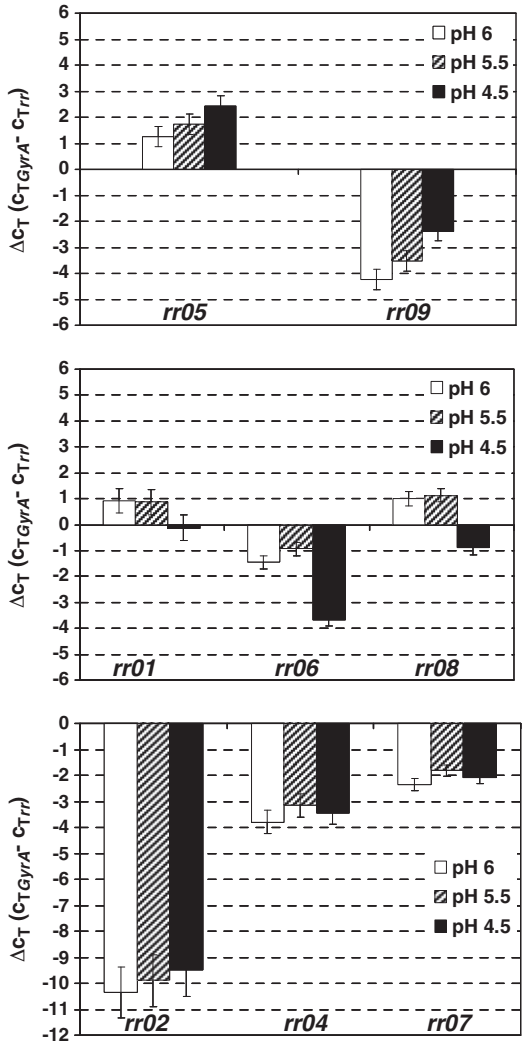


Fig. 3. Changes in abundance of rr transcripts during growth of S. thermophilusLMD-9 in NILAC milk: at the beginning (pH 6), exponential (pH 5.5), and stationary growth phase (pH 4.5). ΔC_T for the eight rr of S. thermophilusLMD-9 were calculated from three independent cDNA samples; results are expressed as mean ± LSD intervals with $P<0.05$ (Fisher test).

3.3. Systematic inactivation of LMD-9 response regulator genes and phenotypic characterization of the Δ

To further investigate the role of the TCS in S. thermophilusLMD-9 physiology and their ability to respond to different environmental conditions, including those encountered in yogurt manufacture, we attempted to delete all of the response regulator genes. We succeeded in deleting 5 response regulator genes (rr01, rr02, rr04, rr06, rr07) by double homologous crossing-over recombination using the thermosensitive-replication pG$^+$host9 plasmid (Table 1). As we failed to obtain Δ through this strategy, we constructed an insertional mutant replacing the rr08 gene with an erythromycin-resistance cassette. Repeated attempts to inactivate the rr05 gene by the two strategies mentioned above failed, suggesting its essentiality. To test this, we constructed a conditional rr05 mutant taking advantage of the thermosensitivity of pG$^+$host9 plasmid that did not replicate at 37 °C (Maguin et al., 1996). A wild-type copy of rr05 carried by pG$^+$host9 was introduced in LMD-9 at a replication-permissive temperature (28 °C) and the chromosomal copy of rr05 was then replaced by an erythromycin resistance cassette. The mutant grew at 28 °C in M17 but a temperature shift to 42 °C resulted in a decrease of cellular density due to loss of the wt rr05 copy carried by pG$^+$host9 (final OD_{600nm} 0.3 versus 1.2 for wt). RR05 is thus critical for growth of S. thermophilusLMD-9 in M17.

Acidification curves in yogurt model milk (YMM) and growth in CDM were performed for the wild-type strain as well as for each viable Δ mutant in the presence of various stressful (lactate, H_2O_2) or stimulating (guanine, formate) agents constituting what we called “abiotic” conditions. S. thermophilushas indeed to face low pH that result from the production of lactate during growth in milk and potentially the presence of H_2O_2 that can be produced by L. bulgaricus,the S. thermophilus partner in yogurt manufacture; on the other hand, both purine and formate are known to stimulate S. thermophilusgrowth in milk (Derzelle et al., 2005). Magnesium was also tested because it stimulates the regulation mediated by some RRs (Gryllos et al., 2003). In CDM as well as in YMM with or without formate (150 μM) or guanine (150 μM), and with or without acidification to pH 5.6, the absence of each of the 7 LMD-9 response regulator genes had no marked effect on acidification. The addition of magnesium (5 mM) or hydrogen peroxide (1 mM) to YMM led to a decrease in acidification, by the same order of magnitude for all strains (decrease of 12.4% ± 6 and of 39% ± 8 in presence of Mg^{2+} and H_2O_2, respectively). Therefore, the absence of a single response regulator gene was not sufficient to markedly affect growth of LMD-9 in YMM, regardless of supplementation.

3.4. LMD-9 response regulator expression and mixed culture with L. bulgaricus ATCC11842

The response regulator transcript abundance of S. thermophilus was established in mixed culture with L. bulgaricusATCC11842 during

exponential phase (pH 5.5) and compared with that of *S. thermophilus* mono-culture at the same pH (Fig. 4); this corresponded to what we called "biotic" conditions. Overall, the expression of LMD-9 response regulator genes was not repressed in mixed culture compared with mono-culture. During the exponential phase (pH 5.5), we observed that *rr02* and *rr09*, both members of the LytTR family, were 5–6 times more abundant in the presence of *L. bulgaricus* than in its absence. We also noticed a two-fold up-regulation of the *rr01* and *rr05* genes which are genetically related (OmpR subfamily members). Finally, expression levels of all the other response regulators (*rr04*, *rr06*, *rr07*, *rr08*) were not statistically different between mono- and mixed cultures.

Milk acidification rate was higher in mixed cultures of *S. thermophilus* wild-type or Δ*rr* mutants with the slow acidifying *L. bulgaricus* strain (ATCC11842) than in the corresponding *S. thermophilus* mono-cultures; this was also the case for mixed cultures with the a high acidifying strain (DGCC4113). *S. thermophilus* populations were also similar in mixed and mono-cultures with either wild-type or Δ*rr* mutants.

As mentioned above, *S. thermophilus* TCS09 has been characterized; it is responsible for the production of the bacteriocin thermophilin 9 (Fontaine et al., 2007). We thus focused on *rr02* to further characterize the response regulator genes which are modulated in the presence of *L. bulgaricus*. To determine if the genes in the close vicinity of *rr02* belong to the RR02 regulon, we performed qPCR analyses on *S. thermophilus* wild-type and Δ*rr02* mutant after growth in milk. The STER_0585 and STER_0586 genes (Fig. 1) were expressed 2.5-fold higher in the wt strain compared with the *rr02* mutant indicating that *rr02* is an activator of transcription of these 2 genes in our experimental conditions.

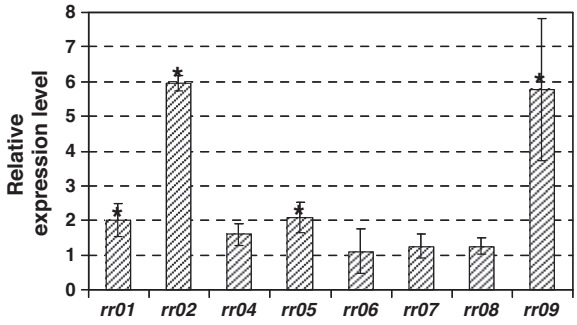


Fig. 4. Relative expression levels of all *rr* transcripts of *S. thermophilus* LMD-9 in mixed culture with *L. bulgaricus* ATCC11842 compared with mono-culture, during the exponential growth phase (pH 5.5) in NILAC milk. Relative expression levels were computed using the comparative critical threshold method ($2^{\Delta\Delta C_T}$), as described by Livak and Schmittgen (2001). Data are expressed as the means from three independent experiments. Asterisks indicate significant differences according to analysis of variance ($P<0.05$).

4. Discussion

S. thermophilus is widely used for the manufacture of yogurt and of an ever growing number of different type-cheeses. During its long adaptation to milk, *S. thermophilus* has lost many genes linked to virulence and sugar utilization, and has kept only the essential set of proteins that are necessary for growth in milk such as those involved in nitrogen metabolism (Bolotin et al., 2004). TCS are the dominant signal-transduction pathways used by bacteria to sense and adapt their metabolism to the environment. There is a strong connection between the total number of TCS genes in any given genome and the genome size (Galperin, 2005; Whitworth and Cock, 2008). Data from completely sequenced prokaryotic genomes indicate that organisms living in stable environments use relatively simple signal-transduction systems whereas organisms surviving in diverse ecological niches typically encode complex sensory systems (Galperin, 2005). With a small genome of about 1850 Mb, *S. thermophilus* LMD-9 is rather limited since it possesses only 14 TCS proteins (8 RR and 6 HK). Other *Streptococcaceae* (GAS or GBS strains) have over 40 TCS proteins and soil symbiotic bacteria have over 100 TCS proteins (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Complete_Genomes/SignalCensus.html). The LMD-9 strain had lost 2 HK compared to *S. thermophilus* strains CNRZ1066 and LMG18311, which both possessed 8 complete TCS. If they are functional, these two RRs could be activated by phosphorylation by HK belonging to other TCS or by serine/threonine kinase as for the TCS CovRS in *S. agalactiae*. In the latter case, the RR is indeed phosphorylated on the Thr65, and not the conserved Asp53 residue (Lin et al., 2009) that is usually targeted by the HK. A serine/threonine kinase is responsible for this activity; *S. thermophilus* LMD-9 possess an orthologue of this protein (STER_1392) and both response regulator RR01 and RR08 possess a Thr65 residue.

In the present study, we investigated the contribution of each putative response regulator to the *S. thermophilus* LMD-9 growth in various conditions. We first determined whether all of the LMD-9 response regulator genes were expressed, what their expression profile was during growth in milk, as well as their relative levels of expression. We observed that the 8 LMD-9 response regulator genes were expressed throughout the growth in milk, the main ecological niche of *S. thermophilus*. On the other hand, the expression of 8 of the response regulator genes was variable suggesting that the culture conditions were not optimal for high expression of all of them. However, *rr02*, the lowest expressed *S. thermophilus* response regulator in milk, regulated the expression of STER_0585 encoding a putative dinucleotide-utilizing enzyme involved in molybdopterin and thiamine biosynthesis family 2, and STER_0586 encoding a putative ABC-type multidrug transport system. Thus, the *rr02* transcript level does not need to be high to modulate target-gene expression, as reported previously for the Spo0A regulator in *B. subtilis* (Fujita et al., 2005). This suggests that, rather than RNA abundance only, the RR protein phosphorylation state is probably of main importance for RR regulatory activity (Stock et al., 2000).

The most highly expressed response regulator genes in all growth phases were *rr01*, *rr05* and *rr08*, which are the most highly conserved RR in *Firmicutes*. Furthermore, whatever the environmental conditions—CDM (data not shown), milk (Herve-Jimenez et al., 2008, 2009), mixed cultures with *L. bulgaricus* (Herve-Jimenez et al., 2008, 2009), rat digestive tract (Rul et al., 2011)—we systematically detected TCS01 and TCS05 of *S. thermophilus* in transcriptomic or proteomic analyses. This suggests that these 2 TCS are probably important for bacterial viability, and perform essential basal functions in all environmental conditions. TCS01 of LMD-9 is homologous to the well-characterized CovR/S system which controls 7–15% of streptococci genes and plays a major role in regulating metabolism, stress response, and virulence (Lamy et al., 2004; Graham et al., 2002). CovR/S system is thus possibly a general regulator, involved in responses to various environmental changes, and this could also be the case for TCS01 of LMD-9. We proved that TCS05 of LMD-9 is required for the growth of *S. thermophilus*, as for most Gram$^+$ bacteria (Winkler and Hoch, 2008), apart from *Streptococcus gordonii* (Liu and Burne, 2009). This TCS, which is well characterized in Streptococci (VicR/K), *S. aureus* (WalR/K), and *B. subtilis* (YycG/F), is involved in bacterial viability by controlling cell-wall architecture and remodeling during cell division (Dubrac et al., 2007; Fukushima et al., 2008).

Homologs of *S. thermophilus* TCS08 are universal among the *Streptococcaceae* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). The homolog of RR08 in *Streptococcus mutans*, LiaSR, has a large regulon (174 genes). It senses cell-envelope stress and is involved in preservation of envelope integrity enabling survival and persistence of *S. mutans*, particularly during biofilm formation (Li et al., 2002; Perry et al., 2008; Suntharalingam et al., 2009). TCS08 of *S. thermophilus* is missing the *hk08* gene, but by analogy to LiaRS, it could also participate in regulating similar functions, although this has not been yet explored.

S. thermophilus is most often associated with other bacteria when used as starter for dairy-product manufacture, especially in yogurt fermentation where it is combined with *L. bulgaricus*. This biotic constraint participates in its environmental challenges and is most important for its adaptation. In milk, the presence of *L. bulgaricus* has thus been associated with modification of nitrogen, purine, iron and long-chain fatty acid metabolisms in *S. thermophilus* (Herve-Jimenez et al., 2009; Sieuwerts et al., 2010) as well as with the upregulation of exopolysaccharide coding genes in both organisms (Sieuwerts et al., 2010). Among the regulators involved in such metabolic changes, RR could be candidates. In that way, the expression and protein abundance of RR01 in *S. thermophilus* LMG18311 varied in mixed culture with *L. bulgaricus* ATCC11842 (Herve-Jimenez et al., 2009); we report here, in *S. thermophilus* LMD-9, that, in addition to *rr01*, *rr02, rr05* and *rr09* were modulated in mixed cultures with *L. bulgaricus* ATCC11842 compared to mono-cultures. This indicates that, for different *S. thermophilus*/*L. bulgaricus* couples, *L. bulgaricus* induces response regulator modulation in *S. thermophilus* (Herve-Jimenez et al., 2009; Sieuwerts et al., 2010).

In the present work, *rr02* and *rr09* genes, both LytTR members, were at least 5-times more expressed in mixed culture than in pure culture. In *S. thermophilus* LMD-9, TCS09 controls the production of the bacteriocin thermophilin 9 (Fontaine et al., 2007; Fontaine and Hols, 2008). We can hypothesize that over-expression of *rr09* in mixed culture could be a non-specific defensive phenomenon due to the presence of another bacterium in the close environment as observed for lactacin B production in *Lactobacillus acidophilus* (Tabasco et al., 2009). Here, even if the bacteriocin thermophilin 9 has no antimicrobial activities against the *L. bulgaricus* strain we used, ATCC11842 (Fontaine et al., 2007; Fontaine and Hols, 2008), the presence of the latter could activate TCS09 leading to the production of bacteriocin.

Concerning RR02, our data and the fact that it has low identity with other TCS (<30%) do not allow much further speculation on its role. However, members of the subfamily LytTR often participate in the regulation of virulence factor and toxin production (Sidote et al., 2008). In this way, the STER_0586 gene regulated by *rr02* is annotated as an ABC-type multidrug transport system (ATPase component), possibly involved in defense mechanisms. Furthermore, a potential small peptide coding gene, STER_0584, is present upstream of the STER_0585 gene; it is shared by the 4 sequenced strains of *S. thermophilus* (V. Juillard, personal communication) and is highly homologous to that of the ortholog locus in *E. faecalis*; it could be the signal sensed by the histidine kinase of the TCS systems in both species.

5. Conclusion

The present study demonstrates that the 8 response regulators present in the genome of *S. thermophilus* LMD-9 are potentially functional as they are all expressed. Their expression occurs in milk, with different levels of expression. In mixed culture with *L. bulgaricus*, the expression of *rr01*, *rr02*, *rr05* and *rr09* increased, suggesting that *S. thermophilus* detects its yogurt partner and sets up regulatory responses to its presence. We also highlight, with *rr02*, that a RR can exert its regulatory function on its target genes even when expressed at very low levels. We showed that RR05—an ortholog of *B. subtilis* YycF or *S. aureus* WalR—is essential for the growth of *S. thermophilus*. For the 7 other RRs, the absence of a single response regulator gene was insufficient to notably impact the growth of LMD-9 in milk, suggesting that the response regulators have overlapping regulons and/or functions not essential under the conditions tested.

Acknowledgments

This research was carried out with financial support from Danisco. The Danisco culture development team, especially Christian Laine, is gratefully acknowledged for technical support with the CINAC system. Stéphane Thomas is thanked for his technical assistance and Elvis Bernard for his advice on cloning. We are grateful to Laetitia Fontaine for the gift of the LF101 strain. We thank Rozenn Gardan for stimulating discussions, and Vincent Juillard and Ivan Mijakovic for fruitful discussion and critical reading of the manuscript.

References

Bernard, R., Joseph, P., Guiseppi, A., Chippaux, M., Denizot, F., 2003. YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiology Letters 228, 93–97.

Bisicchia, P., Noone, D., Lioliou, E., Howell, A., Quigley, S., Jensen, T., Jarmer, H., Devine, K.M., 2007. The essential YycFG two-component system controls cell wall metabolism in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 65, 180–200.

Biswas, S., Biswas, I., 2006. Regulation of the glucosyltransferase (gtfBC) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. Journal of Bacteriology 188, 988–998.

Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S.D., Maguin, E., 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria. Journal of Bacteriology 175, 3628–3635.

Biswas, I., Drake, L., Biswas, S., 2007. Regulation of *gbpC* expression in *Streptococcus mutans*. Journal of Bacteriology 189, 6521–6531.

Biswas, I., Drake, L., Erkina, D., Biswas, S., 2008. Involvement of sensor kinases in the stress tolerance response of *Streptococcus mutans*. Journal of Bacteriology 190, 68–77.

Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., Hols, P., 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. Nature Biotechnology 22, 1554–1558.

Chong, P., Drake, L., Biswas, I., 2008. Modulation of *covR* expression in *Streptococcus mutans* UA159. Journal of Bacteriology 190, 4478–4488.

Dalton, T.L., Scott, J.R., 2004. CovS inactivates CovR and is required for growth under conditions of general stress in *Streptococcus pyogenes*. Journal of Bacteriology 186, 3928–3937.

Deng, D.M., Liu, M.J., ten Cate, J.M., Crielaard, W., 2007. The VicRK system of *Streptococcus mutans* responds to oxidative stress. Journal of Dental Research 86, 606–610.

Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M.-Y., Rul, F., 2005. Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. Applied and Environmental Microbiology 71, 8597–8605.

Dintner, S., Staron, A., Berchtold, E., Petri, T., Mascher, T., Gebhard, S., 2011. Co-evolution of ABC-transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in Firmicutes Bacteria. Journal of Bacteriology. doi:10.1128/JB.05175-11.

Dubrac, S., Boneca, I.G., Poupel, O., 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*. Journal of Bacteriology 189, 8257–8269.

Dubrac, S., Bisicchia, P., Devine, K.M., Msadek, T., 2008. A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. Molecular Microbiology 70, 1307–1322.

Ducros, V.M.A., Lewis, R.J., Verma, C.S., Dodson, E.J., Leonard, G., Turkenburg, J.P., Murshudov, G.N., Wilkinson, A.J., Brannigan, J.A., 2001. Crystal structure of GerE, the ultimate transcriptional regulator of spore formation in *Bacillus subtilis*. Journal of Molecular Biology 306, 759–771.

Dyer, C.M., Dahlquist, F.W., 2006. Switched or not?: The structure of unphosphorylated CheY bound to the N terminus of FliM. Journal of Bacteriology 188, 7354–7363.

Fontaine, L., Hols, P., 2008. The inhibitory spectrum of thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BlpG(St), a thiol-disulfide oxidase. Applied and Environmental Microbiology 74, 1102–1110.

Fontaine, L., Boutry, C., Guedon, E., Guillot, A., Ibrahim, M., Grossiord, B., Hols, P., 2007. Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcusthermophilus*. Journal of Bacteriology 189, 7195–7205.

Froehlich, B.J., Bates, C., Scott, J.R., 2008. *Streptococcus pyogenes* CovR/S mediates growth in iron starvation and in the presence of the human cationic antimicrobial peptide LL-37. Journal of Bacteriology 191, 673–677.

Fujita, M., Gonzalez-Pastor, J.E., Losick, R., 2005. High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology 187, 1357–1368.

Fukushima, T., Szurmant, H., Kim, E.J., Perego, M., Hoch, J.A., 2008. A sensor histidine kinase co-ordinates cell wall architecture with cell division in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 69, 621–632.

Galperin, M.Y., 2005. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. BMC Microbiology 5.

Galperin, M.Y., 2006. structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. Journal of Bacteriology 188, 4169–4182.

Garault, P., Letort, C., Juillard, V., Monnet, V., 2000. Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. Applied and Environmental Microbiology 66, 5128–5133.

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

Graham, M.R., Smoot, L.M., Migliaccio, C.A.L., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F., Federle, M.J., Adams, G.J., Scott, J.R., Musser, J.M., 2002. Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and *in vivo* infection modeling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99, 13855–13860.

Gryllos, I., Lewin, J.C., Wessels, M.R., 2003. The CsrR/CsrS two-component system of group A *Streptococcus* responds to environmental Mg^{2+}. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 4227–4232.

Gryllos, I., Grifantini, R., Colaprico, A., Jiang, S., Deforce, E., Hakansson, A., Telford, J.L., Grandi, G., Wessels, M.R., 2007. Mg(2+) signalling defines the group A streptococcalCsrRS (CovRS) regulon. Molecular Microbiology 65, 671–683.

Gusa, A.A., Froehlich, B.J., Desai, D., Stringer, V., Scott, J.R., 2007. CovR activation of the dipeptide permease promoter (PdppA) in Group A *Streptococcus*. Journal of Bacteriology 189, 1407–1416.

Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F., Maguin, E., 2008. Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. Proteomics 8, 4273–4286.

Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E., Rul, F., 2009. Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. Applied and Environmental Microbiology 75, 2062–2073.

Hoch, J.A., 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. Current Opinion in Microbiology 3, 165–170.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Ehrlich, S.D., Guédon, E., Monnet, V., Renault, P., Kleerebezem, M., 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. FEMS Microbiology Reviews 29, 435–463.

Ibrahim, M., Nicolas, P., Bessieres, P., Bolotin, A., Monnet, V., Gardan, R., 2007. A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci. Microbiology 153, 3631–3644.

Kirby, J.R., 2009. Chemotaxis-like regulatory systems: unique roles in diverse bacteria. Annual Review of Microbiology 63, 45–59.

Lamy, M.C., Zouine, M., Fert, J., Vergassola, M., Couve, E., Pellegrini, E., Glaser, P., Kunst, F., Msadek, T., Trieu-Cuot, P., Poyart, C., 2004. CovS/CovR of group B *Streptococcus*: a two-component global regulatory system involved in virulence. Molecular Microbiology 54, 1250–1268.

Lee, S.F., Delaney, G.D., Elkhateeb, M., 2004. A two-component *covRS* regulatory system regulates expression of fructosyltransferase and a novel extracellular carbohydrate in *Streptococcus mutans*. Infection and Immunity 72, 3968–3973.

Letort, C., Juillard, V., 2001. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. Journal of Applied Microbiology 91, 1023–1029.

Li, Y.H., Lau, P.C., Tang, N., Svensater, G., Ellen, R.P., Cvitkovitch, D.G., 2002. Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. Journal of Bacteriology 184, 6333–6342.

Lin, W.J., Walthers, D., Connelly, J.E., Burnside, K., Jewell, K.A., Kenney, L.J., Rajagopal, L., 2009. Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B Streptococcus response regulator CovR. Molecular Microbiology 71, 1477–1495.

Liu, Y.L., Burne, R.A., 2009. Multiple two-component systems modulate alkali generation in *Streptococcus gordonii* in response to environmental stresses. Journal of Bacteriology 191, 7353–7362.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(−Delta Delta CT) Method. Methods in Enzymology 25, 402–408.

Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, D., Gruss, A., 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other Gram-positive bacteria. Journal of Bacteriology 178, 931–935.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., Mills, D., 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 15611–15616.

Martinez-Hackert, E., Stock, A.M., 1997. Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. Journal of Molecular Biology 269, 301–312.

Mitrophanov, A.Y., Churchward, G., Borodovsky, M., 2007. Control of streptococcus pyogenes virulence: modeling of the CovR/S signal transduction system. Journal of Theorical Biology 246, 113–128.

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

Ohki, R., Giyanto, K., Tateno, W., Masuyama, S., Moriya, K., Kobayashi, Ogasawara, N., 2003. The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. Molecular Microbiology 49, 1135–1144.

Paterson, G.K., Blue, C.E., Mitchell, T.J., 2006. Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of Medical Microbiology 55, 355–363.

Perry, J.A., Levesque, C.M., Suntharaligam, P., Mair, R.W., Bu, M., Cline, R.T., Peterson, S.N., Cvitkovitch, D.G., 2008. Involvement of *Streptococcus mutans* regulator RR11 in oxidative stress response during biofilm growth and in the development of genetic competence. Letters in Applied Microbiology 47 (4), 39–44.

Pospiech, A., Neumann, B., 1995. A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. Trends in Genetics 11, 217–218.

Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegdani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M.-L., Gitton, C., Cherbuy, C., Langella, P., Thomas, M., 2011. Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* of the colon epithelium of gnotobiotic rats. Journal of Biological Chemistry 286, 10288–10296.

Senadheera, D., Krastel, K., Mair, R., Persadmehr, A., Abranches, J., Burne, R.A., Cvitkovitch, D.G., 2009. Inactivation of VicK affects acid production and acid survival of *Streptococcus mutans*. Journal of Bacteriology 191, 6415–6424.

Sidote, D.J., Barbieri, C.M., Wu, T., Stock, A.M., 2008. Structure of the *Staphylococcus aureus* AgrA LytTR domain bound to DNA reveals a beta fold with an unusual mode of binding. Structure 16, 727–735.

Sieuwerts, S., Molenaar, D., van Hijum, S.A.F.T., Beerthuyzen, M., Stevens, M.J.A., Janssen, P.W.M., Ingham, C.J., de Bok, F.A.M., de Vos, W.M., van Hylckama Vlieg, J.E.T., 2010. Mixed culture transcriptome analysis reveals molecular basis of mixed culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Applied and Environmental Microbiology 76, 7775–7784.

Staron, A., Finkeisen, D.E., Mascher, T., 2011. Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of *Bacillus subtilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 55, 515–525.

Stock, A.M., Robeinson, V.L., Goudreau, P.N., 2000. Two-component signal transduction. Annual Review of Biochemistry 69, 183–215.

Suntharalingam, P., Senadheera, M.D., Mair, R.W., Levesque, C.M., Cvitkovitch, D.G., 2009. The LiaFSR system regulates the cell envelope stress response in *Streptococcusmutans*. Journal of Bacteriology 191, 2973–2984.

Tabasco, R., García-Cayuela, T., Peláez, C., Requena, T., 2009. *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. International Journal of Food Microbiology 132, 109–116.

Trieu-Cuot, P., Courvalin, P., 1983. Nucleotide-sequence of the *Streptococcus-faecalis* plasmid gene encoding the 3′5-aminoglycoside phosphotransferase type-Iii. Gene 23, 331–341.

Van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., Robert, C., Oztas, S., Mangenot, S., Couloux, A., Loux, V., Dervyn, R., Bossy, R., Bolotin, A., Batto, J.M., Walunas, T., Gibrat, J.F., Bessieres, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., Maguin, E., 2006. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 9274–9279.

Whitworth, D.E., Cock, P.J.A., 2008. Two-component systems of the myxobacteria: structure, diversity and evolutionary relationships. Microbiology 154, 360–372.

Winkler, M.E., Hoch, J.A., 2008. Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. Journal of Bacteriology 190, 2645–2648.

Zotta, T., Asterinou, K., Rossano, R., Ricciardi, A., Varcamonti, M., Parente, E., 2009. Effect of inactivation of stress response regulators on the growth and survival of *Streptococcus thermophilus* Sfi39. International Journal of Food Microbiology 129, 211–220.

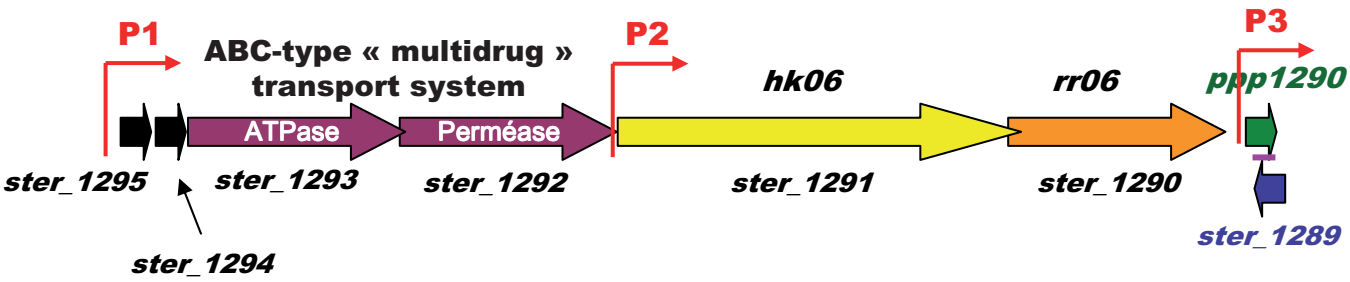


Figure 34: Organisation du locus TCS06 de la souche LMD-9 de *S. thermophilus*

Les trois promoteurs potentiels **P1, P2 et P3** sont représentés sur la figure. Le petit gène potentiel « ppp1290 » ne figure pas dans l'annotation officielle du génome de *S. thermophilus* (la séquence existe chez les 4 souches séquencées de *S. thermophilus*).

CHAPITRE 2 :
Caractérisation du TCS06 de S. thermophilus LMD-9

Introduction

Cette partie rassemble l'ensemble des résultats obtenus répondant à la deuxième problématique de ma thèse, la caractérisation plus approfondie d'un des TCS de *S. thermophilus* LMD-9. Nous avons choisi d'axer nos recherches sur le TCS06, un système n'ayant fait l'objet d'aucune caractérisation fonctionelle aussi bien chez *S. thermophilus* que chez les autres streptocoques possédant des systèmes orthologues. De plus, l'organisation du locus TCS06 (Figure 34) en elle-même paraissait intéressante avec notamment le gène *rr06* se trouvant, non pas en amont de l'histidine kinase correspondante, mais en aval. Le fait d'avoir le RR en aval de l'HK est d'ailleurs une caractéristique de la famille des RR de type NarL. En effet, seules 10 souches sur les 239 séquencées appartenant aux Firmicutes, possèdent un RR de type NarL en amont de l'histidine kinase qui leur est associée et de façon intéressante correspondent toutes à des souches appartenant au genre *Bacillus*. Enfin, certains RR de type NarL sont parfois associés aux mécanismes de régulation de type quorum sensing (McAnulla *et al*., 2007; Upton *et al*., 2001). Aussi, le fait que dans son environnement proche se trouvent un ABC transporteur non caractérisé ainsi que 4 gènes codant potentiellement des petits peptides d'une trentaine d'acides aminés laissait entrevoir un rôle potentiel dans la régulation du système, par exemple en tant que phéromone de l'histidine kinase.

Des approches post-génomiques ont été effectuées dans le but de déterminer le ou les régulons du TCS06. Les résultats présentés ici feront l'objet d'un second article qui est en cours de rédaction.

1) Matériel et méthodes

1.1) Souches bactériennes, plasmides et milieux de culture.

Les souches bactériennes et plasmides sont listés en annexe 1. La croissance de la souche *E. coli* TG1 *repA*$^+$ est réalisée en milieu LB à 37°C avec agitation; celles des souches de *S. thermophilus* sont effectuées à 42°C en milieu chimiquement défini (MCD) (Letort and Juillard, 2001) supplémenté à 10g/L de lactose. Des précultures sur la journée de chacune des souches de *S. thermophilus* sont réalisées en transférant une colonie isolée sur gélose M17Lactose (10g/L) dans 5mL de M17lac permettant, via un ensemencement à 1%, l'obtention de précultures "fraîches" en MCD. Les suivis de croissance des cultures ensemencées à DO 0.05 à partir des précultures "fraîches" ont été réalisés par mesure de la densité optique (DO) à 600nm grâce à un spectrophotomètre Uvikon 931 (Kontron Instruments, UK). Lorsque cela était nécessaire, de l'erythromycine (250μg/ml pour *E. coli* et 2,5μg/ml pour *S. thermophilus*) ou de la kanamycine (30μg/ml pour *E. coli* et 1000μg/ml pour *S. thermophilus*) sont ajoutés au milieu de culture. Pour ce qui est des manipulations de type stress bacitracine, les cultures sont séparées en deux à DO 0.5 et la bacitracine est ajoutée dans un des tubes (800ng/mL). La DO est ensuite suivie et des dénombrements sur gélose M17Lactose ont été réalisés en parallèle.

1.2) Construction de différents mutants du locus TC06 chez la souche LMD-9 de *S. thermophilus*.

En plus du simple mutant Δ*rr06* préalablement construit (voir article 1), trois doubles mutants ont été construits en utilisant le plasmide pG$^+$host9 selon le même principe exposé dans l'article 1 : le mutant TCS06 c'est-à-dire Δ*hk06*Δ*rr06*, le mutant des peptides en amont de TCS06 Δ*ster_1295*Δ*ster_1294* et enfin le mutant des peptides en aval de TCS06 Δ*ster_1289*Δ*ppp1290*. Pour ce faire, deux fragments d'environ 1kb, correspondant respectivement aux séquences en amont et en aval de la région à déléter, ont été amplifiés par PCR en utilisant la Taq polymérase Phusion (Finnzymes) avec l'ADN de la souche LMD-9 pour matrice. Les amplicons ainsi obtenus ont été purifiés avec le kit de purification QIAquick de Qiagen. Ces amplicons amont et aval ont été ensuite digérés par des enzymes de restriction spécifiques, insérés l'un après l'autre par ligation avec la T4

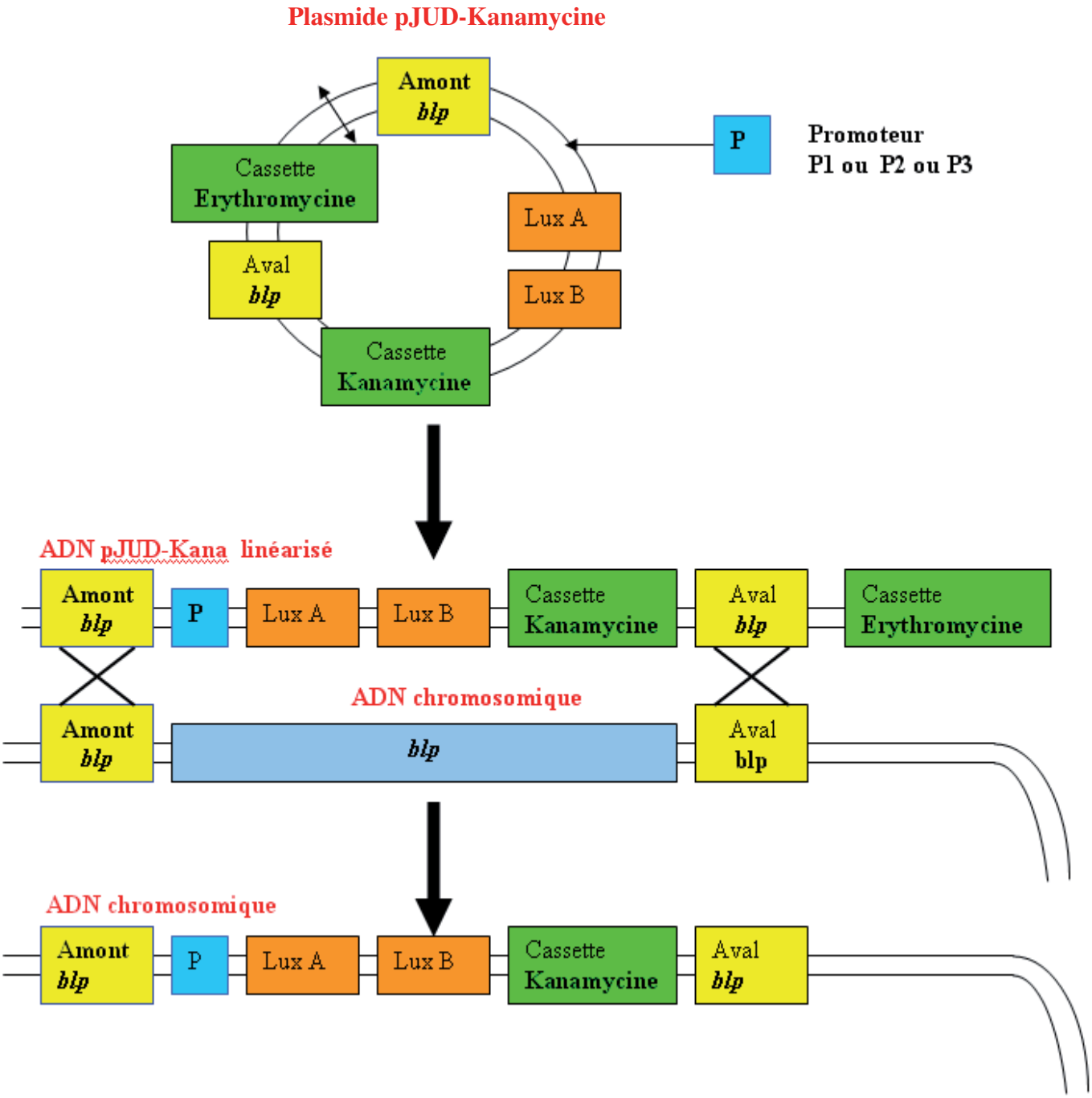


Figure 35: Construction du plasmide pJUD-Kanamycine et intégration du plasmide linéarisé, par double-recombinaison homologue au locus *blp* du chromosome de la souche LMD-9 de *S. thermophilus*.

DNA ligase (New England Biolabs) dans le plasmide pG$^+$host9 puis le mélange de ligation a été utilisé pour transformer *E. coli* TG1 *repA*+. Le plasmide recombinant a été utilisé pour transformer des cellules électrocompétentes de *S. thermophilus* comme décrit par Ibrahim *et al*. (2007). La transformation, l'intégration du plasmide dans le chromosome et enfin l'excision du plasmide pG$^+$host9 ont été réalisés suivant le protocole de Garault *et al*. (2000). Par ailleurs, un autre mutant, ΔABC (correspondant aux gènes *ster_1292* et *1293* codant l'ABC transporteur du locus TCS06) a été construit par insertion d'une cassette de résistance à l'érythromycine suivant le même modèle de construction du mutant Δ*rr08* exposé dans l'article 1. Enfin, tous les mutants obtenus ont été contrôlés par PCR et leur séquence vérifiée sur un séquenceur automatique (ABI Prism 310) en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). L'ensemble des primers utilisés pour la construction des mutants est donné en annexe 1.

1.3) Construction de fusions transcriptionnelles rapportrices à activité luminescente.

Trois fusions transcriptionnelles différentes ont été construites et introduites dans une ou plusieurs souches au locus *blp* impliqué dans la production de la thermophiline 9 mais non essentielle à la croissance de *S. thermophilus*. Les trois gènes étudiés appartiennent au locus TCS06 et sont les suivants : *ster_1295* (fusion P1), *ster_1291* (fusion P2) et *ppp1290* (fusion P3). La stratégie d'obtention des fusions transcriptionnelles est représentée figure 35. L'ensemble des primers définissant les régions promotrices de chacun des 3 gènes étudiés est présenté dans le tableau de l'annexe 2.

Brièvement, les régions promotrices potentielles (environ 300pb) de chacun des 3 gènes ont été amplifiées par PCR puis digérées et clonées (entre les sites SpeI et EcoRI du plasmide pJUD-kana digéré par ces mêmes enzymes) en amont des gènes rapporteurs *luxAB* (provenant de *Photorhabdus luminescens*) présents sur ce dernier. Les plasmides recombinants obtenus sont ensuite linéarisés via NotI et mis en contact avec des cellules compétentes de *S. thermophilus*. Les transformants obtenus pour lesquels un événement de recombinaison homologue a eu lieu grâce aux régions identiques « amont *blp* » et « aval *blp* » sur le chromosome acquièrent ainsi la fusion transcriptionnelle et perdent aussi la résistance à l'érythromycine conférée par le plasmide pJUD. Comme le montre la figure 35, les clones possédant la fusion transcriptionnelle sont donc résistants à la kanamycine et sensibles à l'érythromycine. Ils sont contrôlés par PCR et par séquençage.

1.4) Méthode de mesure de l'activité luciférase.

Cette méthode consiste à mesurer par un luminomètre la quantité de photons, émise par une souche possédant une des fusions transcriptionnelles. Cette mesure rend compte de l'activité du promoteur inséré. A partir d'un clone de chaque souche à tester, 5 mL de M17 lactose 1% ont été ensemencés puis mis à incuber à 42°C sur la journée. Cette pré-culture a servi ensuite à préparer une seconde pré-culture en ensemençant 10mL de MCD à 1%. L'incubation a été effectuée sur la nuit à 42°C en départ différé afin d'obtenir des cellules « fraîches ». Cette pré-culture permet alors d'inoculer 40mL de MCD à DO 0.05, puis différents échantillons d'1mL ont été prélevés au cours de la croissance et jusqu'en fin de phase stationnaire. Après chaque mesure de DO, 5μL de nonyl-aldéhyde 0.01% (molécule révélatrice de photons) sont ajoutés puis les tubes sont placés dans le luminomètre (Luminoskan TL ; Labsystems).

1.5) Electrophorèse monodimensionnelle suivie d'une analyse chromatographique en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (SM) en tandem (LC/MS/MS).

Extraction des protéines. Les bactéries ont été récupérées comme suit. 150 mL de cultures en MCD des souches WT et Δ*rr06* (2 répétitions biologiques pour chaque souche) à DO 1.2 ont été centrifugés pendant 10 minutes à 8000 g à 4°C. Les culots sont lavés deux fois dans du tampon phosphate glacé, 200mM pH 6.4, puis remis en suspension dans 10 mL de tampon phosphate 20mM, 1mM EDTA, pH6.4. Les culots bactériens ont été récupérés par centrifugation pendant 10 minutes à 5000g puis congelés et gardés à -20°C pour une utilisation ultérieure. Après décongélation, les culots ont été remis en suspension (à environ 40 unités de DO) dans un tampon de disruption maintenu à 4°C et contenant 20 mM de tampon phosphate pH 6.4, un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo.), 40 U/mL de catalase (Sigma) et 10 mM de tributylphosphine (Applied Biosystems). Ensuite, ces suspensions cellulaires ont été transférées dans un disrupteur de cellules BASIC Z (Celld, Warwickshire, United Kingdom) et soumises à une pression de 2500 bars. Les lysats obtenus ont été centrifugés pendant 15 minutes à 5000 *g* pour éliminer les cellules non cassées et les gros débris cellulaires. Les surnageants obtenus ont été récupérés et centrifugés à 220000 *g* pendant 30 minutes à 4°C. Les culots translucides obtenus correspondent aux fractions enrichies en protéines associées aux enveloppes.

Ceux–ci ont été remis en suspension dans 300μL de tampon de disruption et ont subi une sonification d'un quart d'heure à 4°C pour mieux les solubiliser. Enfin, la concentration protéique totale de chaque échantillon a été déterminée selon la méthode de Bradford en utilisant le réactif de Coomassie (Pierce, Rockford, IL) et la sérum albumine bovine comme standard. Les différents échantillons de protéines associées aux enveloppes ont été aliquotés et conservés à 20°C.

Electrophorèse monodimensionnelle et analyse LC-MS/MS. Les protéines précédemment préparées (10 µg) ont été séparées et identifiées par électrophorèse monodimensionnelle (SDS-PAGE) suivie d'une analyse chromatographique en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (MS) en tandem (LC/MS/MS) comme précédemment décrit (Gardan *et al*., 2009). En ce qui concerne la quantification relative des protéines, nous avons utilisé les comptages du nombre de peptides différents durant l'identification par spectrométrie de masse et pour chaque protéine, l'aire totale correspondant à l'ensemble des peptides détectés. Pour cela, nous avons gardé uniquement pour chaque souche (WT ou Δ*hk06*Δ*rr06)* les protéines ayant au moins 3 peptides différents permettant l'identification de la protéine dans les deux répétitions. Pour chaque protéine ainsi sélectionnée, nous avons calculé deux ratios : le ratio du nombre de peptides différents détectés et le ratio de l'aire totale entre les deux souches. Les deux ratios allant dans le même sens pour l'ensemble des protéines, nous avons choisi de représenter les résultats d'abondance relative de chaque protéine avec le ratio du nombre de peptides différents détectés entre l'échantillon WT et Δ*hk06*Δ*rr06*.

1.6) Extraction d'ARN et analyses RT-PCR quantitative.

Les ARNs totaux ont été extraits à partir de cultures en MCD des souches WT (LMD-9), Δ*rr06*, Δ*hk06*Δ*rr06* et Δ*rr07* (3 répétitions biologiques). Les cellules ont été récupérées en phase exponentielle (30 mL; DO 1.2). L'extraction d'ARN, la synthèse des cDNAs et les calculs ont été réalisés de la même façon que dans l'article 1 (3 répétitions techniques par échantillon analysé en qPCR). Une analyse de variance (Statgraphics Plus version 5 (Manugistics) a été effectuée sur les ΔCt de chaque gène normalisé par rapport à la gyrase pour déterminer si les niveaux d'expressions relatifs entre deux conditions sont bien statistiquement significatifs ($P< 0.05$). Tous les primers utilisés pour la RT-qPCR sont listés dans l'annexe 2.

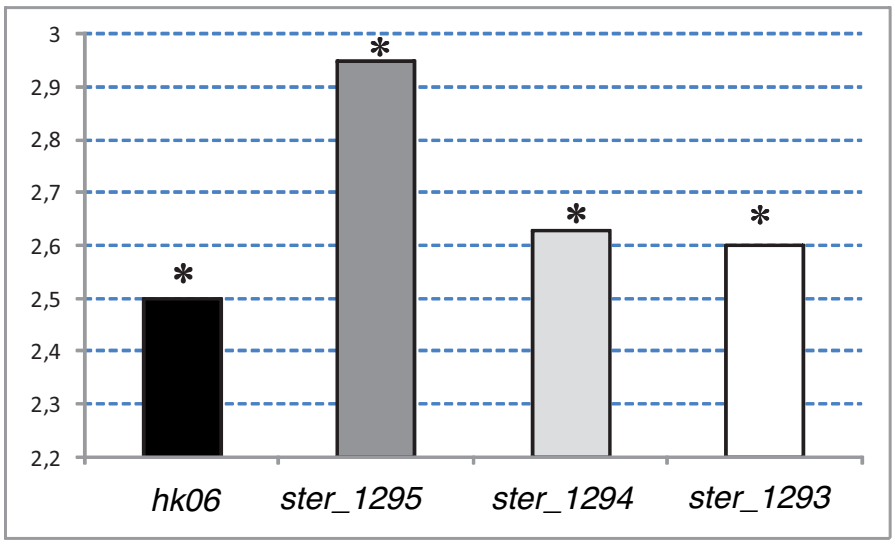


Figure 36: Expression relative des gènes du locus TCS06 entre la souche WT et le mutant Δ*rr06* de *S. thermophilus* LMD-9.
: différence statistiquement significative entre WT et Δ*rr06
(3 répétitions techniques et biologiques)

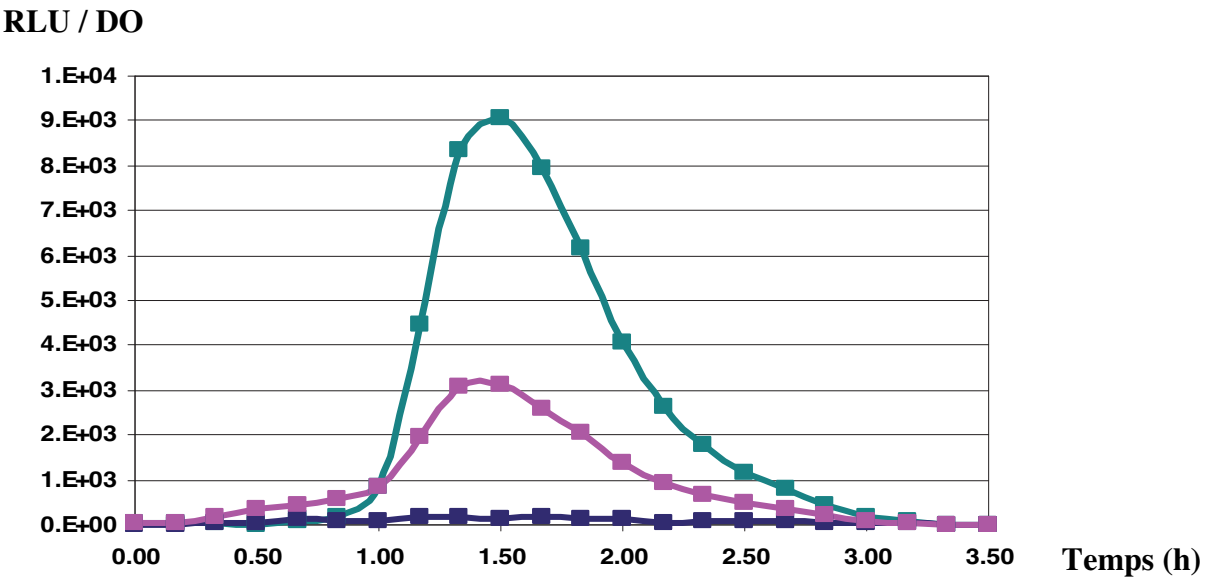


Figure 37: Activités *lux* rapportées à la DO des 3 souches comprenant les fusions transcriptionnelles sous contrôle des promoteurs P1, P2 ou P3 insérées au locus *blp* chez la souche LMD-9 de *S. thermophilus*

P1: Souche contenant la fusion transcriptionelle sous contrôle du promoteur P1

P2: Souche contenant la fusion transcriptionelle sous contrôle du promoteur P2

P3: Souche contenant la fusion transcriptionelle sous contrôle du promoteur P3

RLU= Relative Light Unit

2) Résultats

2.1) Analyse transcriptomique des gènes du locus TCS06

Une première étape a consisté en l'analyse transcriptomique des gènes physiquement proches du TCS06, soit les 8 gènes allant de *ster_1295* à *ster_1289*, dans la mesure où de nombreux TCS contrôlent l'expression des gènes situés dans leur propre locus (les gènes *ster_1286* et *ster_1296* étant considéré extérieur au locus TCS06 car distants respectivement d'environ 1kb de *ster_1289* et *ster_1295*). L'expression de ces 8 gènes par RT-qPCR a été comparée entre le mutant Δ*rr06* et la souche sauvage en milieu MCD. Comme le montre la figure 36, l'expression de tous les gènes en amont du gène *rr06* (*hk06*, *ster_1295, 1294, 1293*) est diminuée d'un facteur compris entre 2.5 et 3 chez le mutant Δ*rr06*. Ce résultat indique que RR06 est un activateur de l'expression de tous ces gènes. Cette induction étant du même ordre de grandeur pour l'ensemble de ces gènes et l'absence de terminateur potentiel suggèrent une organisation opéronique.

En revanche, le gène *ster_1289* situé en aval de *rr06* n'est pas contrôlé par ce dernier puisque l'expression est la même aussi bien dans la souche sauvage que dans le mutant Δ*rr06*. Enfin pour ce qui est de l'expression du petit gène non annoté *ppp1290* en vert sur la figure 34, nous n'avons pu estimer son expression, sa séquence ne permettant pas d'obtenir d'autres oligonucléotides que ceux utilisés en RT-qPCR et qui se sont révélées inefficaces. Toutefois, comme le montre la figure 34, le locus TCS06 possède potentiellement (par analyse *in silico*) plusieurs promoteurs dont le promoteur P3 qui permettrait uniquement d'exprimer ce petit gène *ppp1290*.

Puisque les gènes en amonts de *rr06* sont exprimés, cela signifie que le promoteur P1 au moins est fonctionnel ou que les deux promoteurs P1 et P2 sont fonctionnels. Dès lors, pour s'assurer que *ppp1290* est potentiellement exprimé via P3, une fusion transcriptionnelle rapportrice « *luxAB* » du promoteur P3 a été intégrée dans le génome bactérien de la souche LMD-9 au locus *blp* puisque son interruption n'influe pas la croissance du streptocoque dans les conditions utilisées (les gènes du locus *blp* permettant la production d'une bactériocine, la thermophiline 9). Ainsi, si le promoteur P3 est fonctionnel, on s'attend à mesurer une activité *lux* non négligeable. Comme on le voit sur la figure 37, la souche sauvage possédant la fusion transcriptionnelle avec le promoteur P3

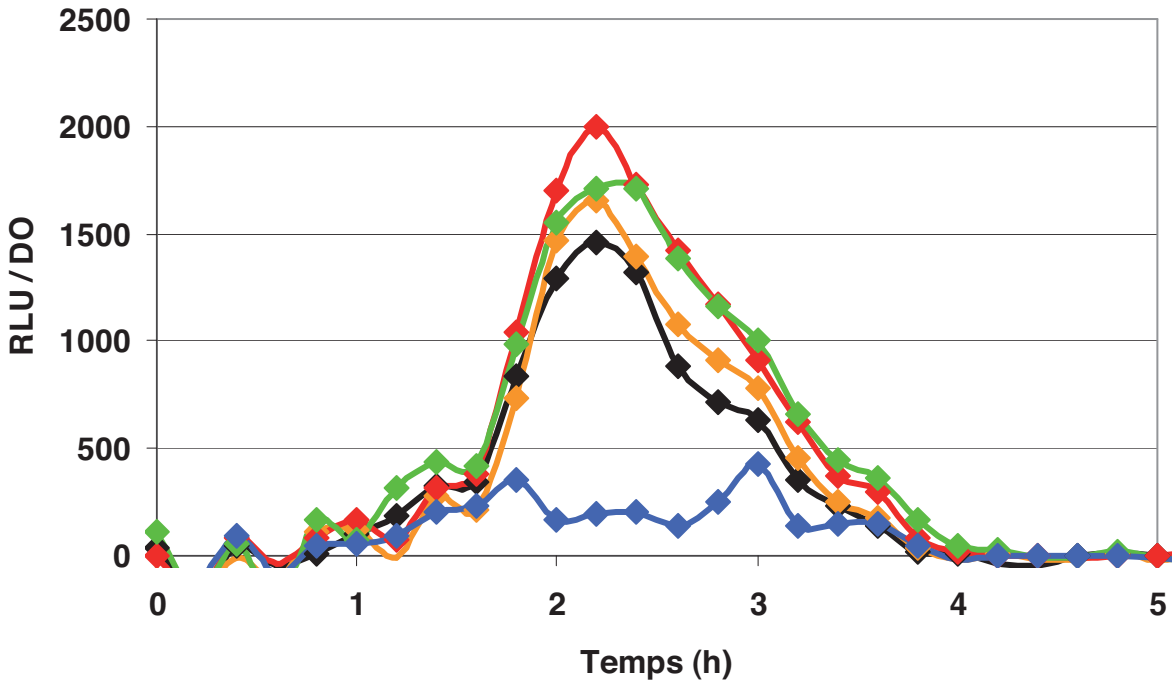


Figure 38: Activités *lux* rapportées à la DO comprenant la fusion transcriptionnelle sous le contrôle du promoteur P2 insérée au locus *blp* chez différentes souches de *S. thermophilus* LMD-9

est celle donnant le plus haut pic d'activité. Le gène *ppp1290* est donc très probablement exprimé. En revanche, le fait que la souche possédant la fusion transcriptionnelle avec le promoteur P1 ne produise aucune activité alors que l'on sait que le gène *ster_1295* est exprimé en milieu MCD (données RT-qPCR), laisse à penser que la taille de la région promotrice P1 choisie lors de la construction du vecteur (272pb) était trop courte.

Par ailleurs, l'activité de chacun des trois promoteurs a été étudiée, aussi bien dans la souche sauvage que dans les souches mutantes du locus TCS06 disponibles c'est-à-dire *Δrr06, Δhk06Δrr06, Δster_1295Δster_1294 et Δster_1289Δppp1290* ceci dans le but de voir si des gènes du locus, autre que *rr06*, jouent un rôle dans l'activité de chacun des promoteurs. Concernant le promoteur P1, étant donné que la fusion transcriptionnelle n'est probablement pas fonctionnelle (cf ci-dessus), nous ne pouvons conclure quant à une implication potentielle des gènes du locus dans son activité. La construction d'une nouvelle fusion rapportrice avec une région plus étendue du promoteur P1 permettrait de s'en assurer.

Pour ce qui de l'étude du promoteur P2 dont l'expression de *rr06* et *hk06* dépendent théoriquement, seule la souche mutante *Δster_1289ppp1290* ne possède plus d'activité *lux* (Figure 38). Cela signifierait que les peptides codés par *ster_1289* et *ppp1290* ou l'un des deux seulement activeraient le promoteur P2 et donc la transcription de *hk06* et *rr06*. Néanmoins, nous n'avons pas confirmé ce résultat en RT-qPCR comparative entre la souche sauvage et le double mutant *Δster_1289Δppp1290* puisque l'expression de *hk06* et *rr06* est la même pour les deux souches.

Enfin concernant l'étude de l'activité du promoteur P3 correspondant au promoteur putatif du petit gène *ppp1290*, l'activité mesurée ne varie pas par rapport à la souche sauvage quelle que soit la souche de mutant utilisée ce qui signifie que la régulation de l'expression de *ppp1290* ne fait pas intervenir les gènes (*ster_1295, 1294, 1293, 1292, hk06* du locus TCS06.

L'ensemble de ces résultats nous permet donc de conclure que l'ensemble du système (peptides amonts, ABC transporteur et TCS06) est activé par RR06.

Finalement, une donnée bibliographique nous permettait de penser que RR06 avait potentiellement d'autres cibles que les gènes situés dans le même locus. En effet, se basant sur le fait que beaucoup de TCS s'autorégulent, une étude proposait un site consensus reconnu par des TCS orthologues à ceux de *B. cereus* conservant tous le même




```
STER_1295 MKIKTSYLVYAVIATVFAGLSMFTDIFEKGNFEAIFSNLGMIIGLSISAYILITMAKSFIDLVINELKN
Stu1329   MKIKTSYLIYAVIATVFAGLSMVTDIFEKGNFEAIFSNLGMIIGLSILAYILITMAKSFIDLVINELKN
str1329   MKIKTSYLIYAVIATVFAGLSMVTDIFEKGNFEAIFSNLGMIIGLSISAYILITMAKSFIDLVINELKN
SMU.1554c MKIKISYIVYVVIATIFAGLSIFTDIFETLHFEAIFSHLGLMFGLLIAASVLIGIAKS----LIKELTD
```

Région promotrice du gène *ster_1295:*

GCTGACCTTGGGTCGGCTTTTTTTACGTCACATGACAAATGTCATATCAT

CBS RR06

GTCATGACATCTGGTGCTAAAAAGAGAATGACCAAAAAGATATACTTTAGTCATAACTTAGAA
ATAATAAAAAACGAAAGAGGTCATCTCATGAAAATCAAAACATCTTACCTTGTCTACGCTGTT
ATCGCAACTGTCTTTGCTGGACTTAGCATGTTTACTGATATCTTTGAAAAAGGCAACTTTGAAG
CTATTTTCTCAAATCTTGGC.....

Figure 39 : « Consensus binding sequence » (CBS) retrouvées chez quelques homologues du locus TCS06 de *S. thermophilus* en amont d'un gène codant pour un petit peptide et positionnement de la CBS potentielle reconnu par RR06

La CBS potentielle de RR06 de *S. thermophilus* est située juste en amont du promoteur potentiel (en rose) du gène *ster_1295 (*codon start en rouge et gène en bleu).

environnement génétique (de Been *et al*., 2008). Les auteurs ont pu ainsi définir cette séquence pour un TCS dont TCS06 de *S. thermophilus* pourrait être un orthologue. Nous avons retrouvé cette séquence dans la région promotrice du gène *ster_1295* et de son orthologue à 70% chez *S. mutans* (Figure 39). La séquence consensus proposée est une séquence parfaitement inversée répétée (ATGACA-N_2-TGTCAT) qui se trouve juste en amont du promoteur potentiel de *ster_1295*. Tout ceci concordant bien avec les résultats d'analyse transcriptomique, nous avons recherché si ce motif ou des séquences faiblement dégénérées existaient dans les régions promotrices d'autres gènes du génome de *S. thermophilus* LMD-9. Nous avons trouvé 3 autres cibles potentielles, les gènes *ster_0399* (transporteur putatif des acides aminés branchés), *ster_0503* (ornithine/acetylornithine aminotransferase) et *ster_1627* (transporteur de type ABC non caractérisé). L'ensemble de ces cibles a donc été testé en RT-qPCR en comparant toujours l'expression entre la souche sauvage et le mutant *Δrr06*. Nous n'avons relevé aucune différence d'expression entre les deux souches ce qui pourrait s'expliquer par des conditions de croissance ne permettant pas à RR06 seul ou associé à un autre co-régulateur de jouer son rôle sur ces cibles. Par ailleurs, un article récent sur CovR chez *S. mutans* (Dmitriev *et al*., 2011) montre que le régulon obtenu (par l'utilisation de puces à ADN) ne s'accordait par avec la précédente séquence consensus ATTARA mis en évidence chez *S. pyogenes* (Churchward *et al*., 2009; Gao *et al*., 2005). Cet exemple illustre bien la limite des séquences consensus entre deux espèces phylogénétiquement proches.

2.2) Etude du régulon du TCS06 : analyse protéomique

La deuxième étape de caractérisation du locus TCS06 était de déterminer plus largement son régulon. Ainsi nous avons réalisé une analyse globale par protéomique comparative entre la souche sauvage et le double mutant *Δhk06Δrr06* par électrophorèse monodimensionnelle couplée à une analyse par LC-MS/MS. Nous avons choisi de comparer la souche sauvage avec le double mutant *Δhk06Δrr06* et non le mutant *Δrr06* estimant augmenter nos chances d'obtenir des phénotypes plus marqués au niveau protéomique. Un autre intérêt résultant de l'utilisation du double mutant est qu'il permet d'éviter un éventuel phénomène de cross-talk qui pourrait avoir lieu entre l'HK06 (toujours présente dans le mutant *Δrr06)* et un RR autre que RR06. Dans ce cas de figure, le régulon déterminé par l'analyse protéomique du mutant *Δrr06* pourrait être biaisé

Locus _tag	Nom du gène	Protéine identifiée	Facteur d'induction
ster_1683		Hypothetical protein	inf
ster_ 0792		Thymidine kinase	inf
ster_0289	*greA*	Transcription elongation factor	inf
ster_0215		Undecaprenyl pyrophosphate phosphatase, Bacitracin resistance protein BacA	inf
ster_0688	*aroD*	3-dehydroquinate dehydratase	inf
ster_1574		Hypothetical protein	inf
ster_0697		Prephenate dehydratase	inf
ster_1041		Uracil DNA glycosylase	inf
ster_1564		Hypothetical protein	inf
ster_0787		Ribosomal protein L31	10
ster_0940	*als*	Thiamine pyrophosphate requiring enzyme (acetolactate synthase, Pyruvate dehydrogenase (cytochrome), glyoxylate carboligase, Phosphonopyruvate decarboxylase)	9.5
ster_1994		Hypothetical protein	9
ster_0656	*rmlC*	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5 - epimerase or related enzyme	7
ster_0765		Hypothetical protein (PFAM beta lactamase?)	7
ster_1048		Hypothetical protein	7
ster_0452		Glycosyltransferase	7
ster_1364		ATPase involved in DNA repair	6.3
ster_1310	*rr07*	DNA binding response regulator, OmpR family (Rec wHTH domains)	6
ster_1370	*galT*	Galactose-1-phosphate uridyltransferase	6
ster_0646		Hypothetical protein	5.5
ster_1402		Predicted transcriptional regulator	5
ster_1096	*sipB*	Signal peptidase I	4.5
ster_1711	*scrB*	β-fructofuranosidase	4.5
ster_0762	*sodA*	Superoxide dismutase	4
ster_0653	*feoA*	Fe2+ transport system protein A	4
ster_0670		Dephospho-CoA kinase	4
ster_1665		UDP-N-acetylmuramyl pentapeptide phosphotransferase/ UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase	4
ster_1581		Uncharacterized homolog of plant Iojap protein	4
ster_1446		Glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis	3.7
ster_1007		ABC-type phosphate transport system, permease component (PhoT family)	3.6
ster_0400		ABC-type branched-chain amino acid transport system, permease component	3.5
ster_1667	*ftsL*	Protein required for the initiation of cell division	3.5
ster_1724		Uncharacterized membrane bound protein conserved in bacteria	3.3
ster_0308	*scpB*	Condensin subunit	3
ster_0852	*rsmC*	16S RNA G1207 methylase	3
ster_1394		tRNA and rRNA cytosine-C5-methylase	3
ster_0113	*dacA1*	D-alanyl-D-alaninelRevlRev carboxypeptidase	3
ster_1228		Predicted SAM dependent methyltransferase	3
ster_1427		Hypothetical protein	3
ster_1404		Hypothetical protein	3
ster_0336		NUDIX family hydrolase	3
ster_0981	*pyrE*	Orotate phosphoribosyltransferase	2.9
ster_1869		Hypothetical protein	2.9
ster_0522	*atpC*	F0F1-type ATP synthase, epsilon subunit	2.9
ster_1857	*thrC*	Threonine synthase	2.9
ster_1569		Predicted S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase	2.7
ster_1779		Thioredoxin domain containing protein	2.7
ster_1747		Inactive homolog of metal-dependent protease, putative molecular chaperone	2.7
ster_0800		ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease component	2.7
ster_1892	*rplF*	Ribosomal protein L6P/L9E	2.6
ster_0288		Predicted periplasmic solute binding protein	2.6
ster_0426		Predicted sugar phosphatase of HAD family	2.4
ster_0623	*folA*	Dihydrofolate reductase	2.3
ster_0526		Thymidylate kinase	2.3
ster_0280	*divIVA*	Cell division initiation protein PFAM	2.3
ster_0116		serine O-acetyltransferase	2
ster_1500	*amyL*	neopullulanase	2
ster_1435		ABC-type polysaccharide/polyol phosphate export system, permease component	2
ster_1008		ABC-type phosphate transport system, permease component (PhoT family)	2
ster_1495		spermidine/putrescine ABC transporter permease protein	2

Tableau 10: Variation d'abondance de 60 protéines identifiées lors de l'analyse LC-MS/MS entre la souche mutante Δ*rr06* et sauvage *S. thermophilus* LMD-9

Inf signifie que la protéine a été détectée uniquement chez la souche Δ*rr06.*

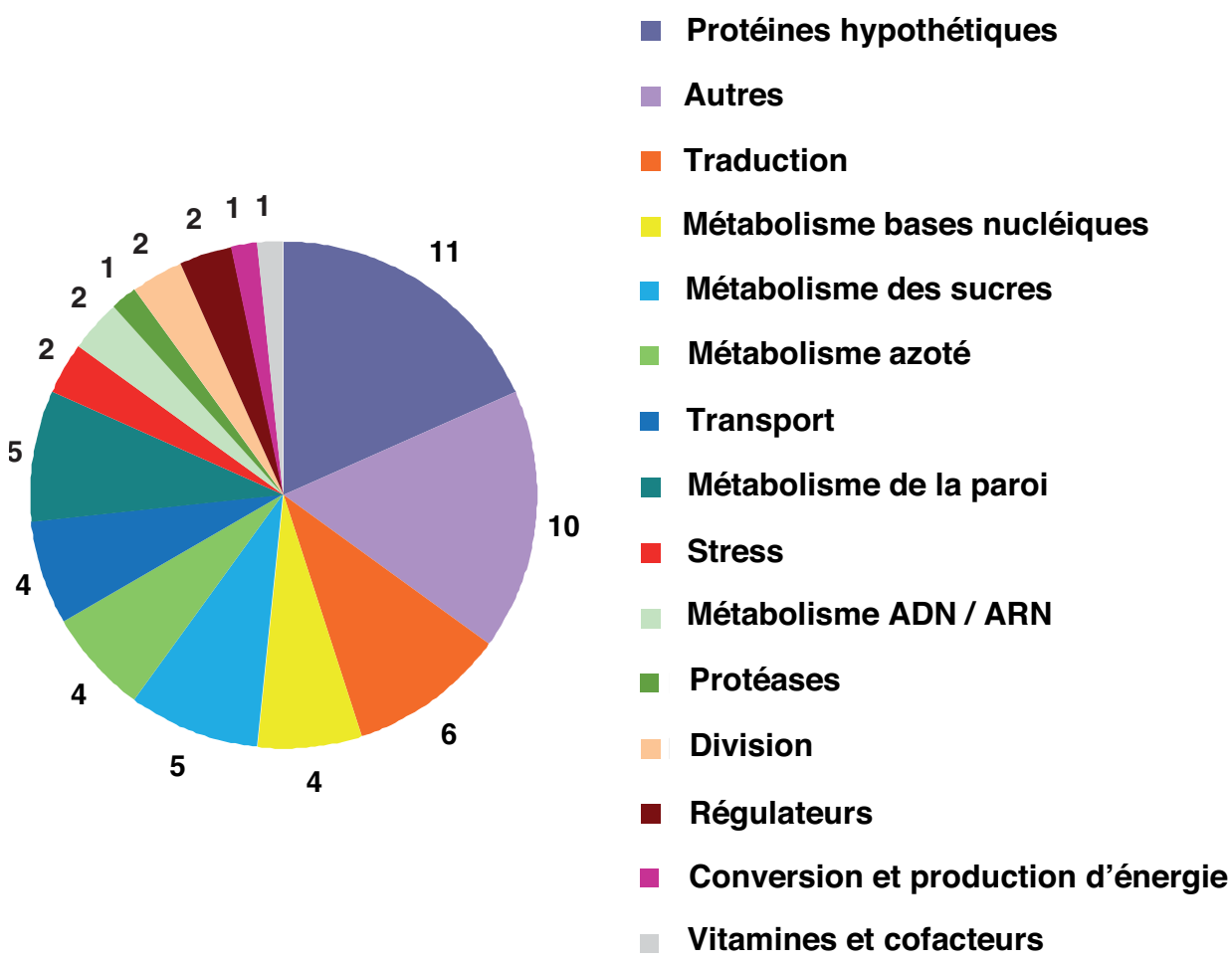


Figure 40: Répartition fonctionnelle des 60 protéines induites dans le double mutant Δ*hk06*Δ*rr06* par rapport à la souche WT LMD-9 de *S. thermophilus*

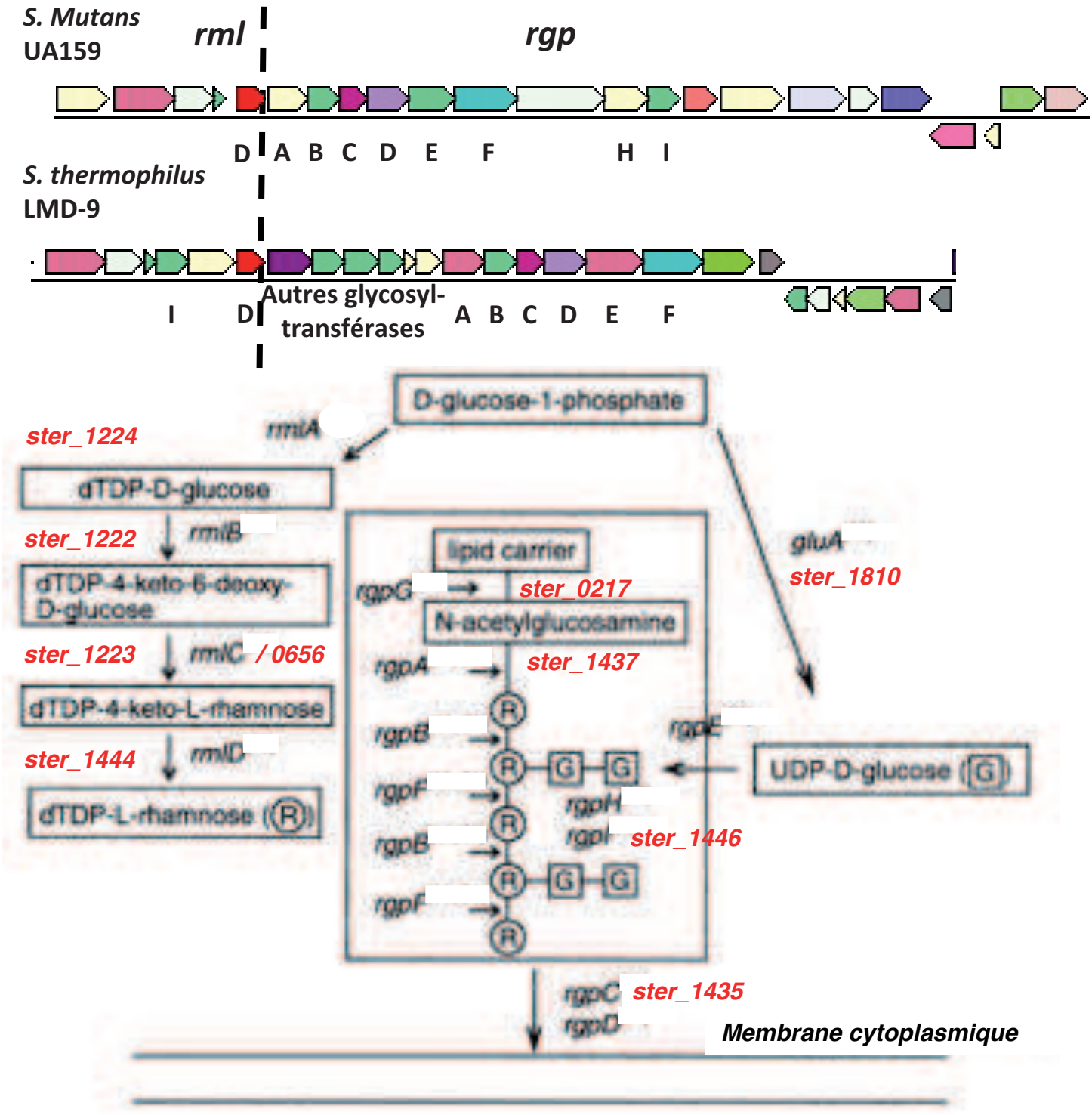


Figure 41: Illustration du locus « RGP » et voies de biosynthèse du rhamnose et du RGP chez *S.mutans* et *S. thermophilus*

D'après Nomura *et al.*, 2005

Les résultats obtenus montrent que 60 protéines sont plus abondantes dans le double mutant par rapport à la souche sauvage ce qui signifie que le TCS06 est avant tout un système répresseur pour ses cibles. Le régulon obtenu est assez conséquent puisque le pool de gènes retenu représente environ 3% du génome (Tableau 10). On note que différentes fonctions métaboliques sont concernées ce qui implique que TCS06 a une activité large, directe ou indirecte. Une bonne partie (environ 30 %) des protéines régulées n'ont pas de fonctions connues ou sont impliquées dans des fonctions physiologiques de base allant de la traduction aux métabolisme des acides nucléiques et de l'azote par exemple (Figure 40).

Néanmoins, il apparaît qu'une dizaine des gène régulés sont impliqués dans la biosynthèse de composés associés à la paroi, notamment des glycosyltransférases (*ster_0452*, *ster_1435*, *ster_1446*) ou d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse du peptidoglycane (*ster_0113: dacA1*-D,D-carboxypeptidase PBP3 ; *ster_0215: BacA*-Undecaprenyl-diphosphatase, *ster_0280: DivIVA*- Cell division initiation protein). Plus précisément, cinq de ces protéines sont potentiellement impliquées dans la voie de production du polysaccharide à rhamnane/glucose (RGP), le gène *ster_0656* participant à la biosynthèse de rhamnose à partir de glucose (*rmlC* like-dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase), les glycosyltransférases *ster_1435*, *ster_1446* (*rgpI)* et les gènes *ster_1370 (galT*- UTP-hexose-1-phosphate uridylyltransferase*)* et *ster_1500* (*amyL*-neopullulanase) qui alimentent la voie par la production de glucose-1-phosphate.

Cette voie présentée en figure 41 a été particulièrement bien caractérisée chez *S. mutans* (Nomura *et al*., 2005). En effet chez cette espèce et depuis plus de 20 ans maintenant, on a rapporté la structure du RGP à un sérotype bien défini. On en compte actuellement 4. Le sérotype *c* est celui qui est le plus retrouvé dans la cavité buccale humaine (70 à 80%) suivi par le sérotype *e* (environ 20%) tandis que les sérotypes *f* et *k* sont les plus rares (moins de 5%) (Nakano *et al*., 2010).

Du point de vue biochimique et génétique, la voie de biosynthèse conduisant à la formation de RGP est connue. Elle implique la voie de production du rhamnose via les gènes *rmlA, rmlB, rmlC et rmlD,* gènes particulièrement conservés chez les streptocoques. De la ramification de résidus glucose sur le rhamnane dépendent les sérotypes. Celle-ci est assurée par les gènes *rgp* allant de A à I chez *S. mutans*. Au final, les sérotypes de *S. mutans* sont corrélés à la variabilité de structure de leur locus *rgp*, variabilité que l'on retrouve également chez d'autres espèces notamment *S. thermophilus*, *S. suis* mais aussi *L. lactis*. Plusieurs études montrent que ces différentes structures de RGP confèrent des

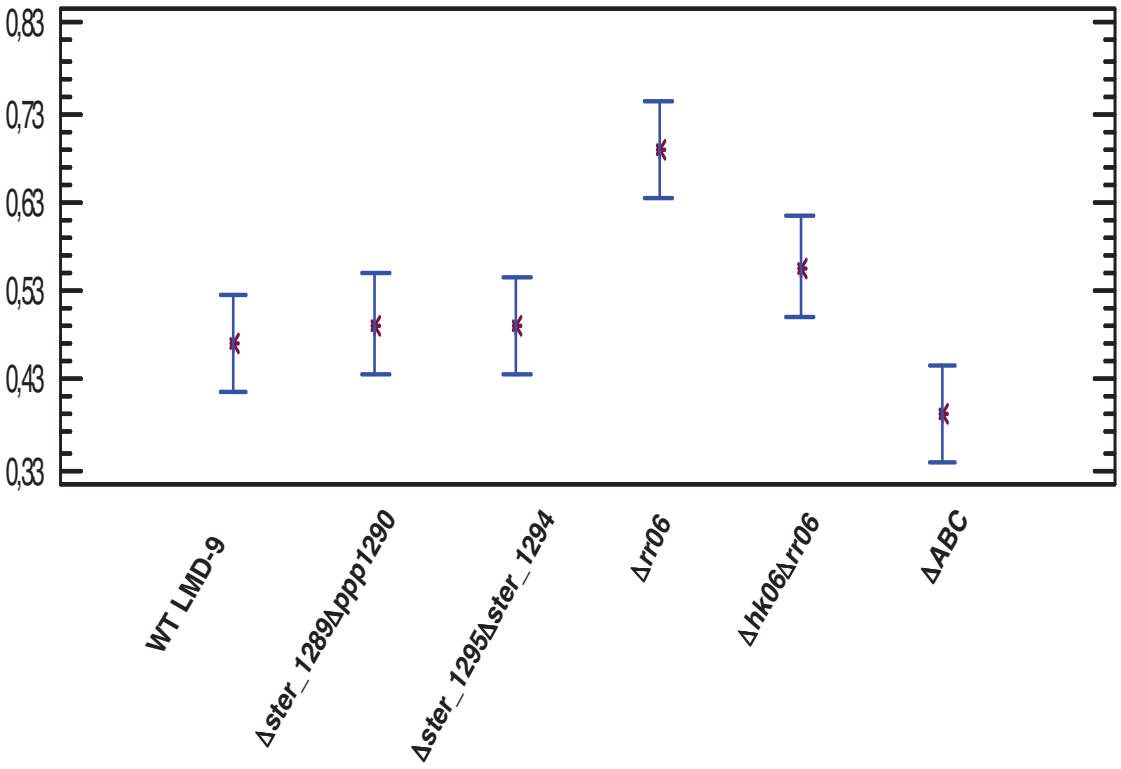


Figure 42: DO résiduelle de la souche WT et des mutants du locus TCS06 1h après un stress bacitracine

DO résiduelle= DO avec stress bacitracine / DO sans stress

propriétés particulières à *S. mutans*. En effet, les données bibliographiques disponibles à ce jour montrent qu'un des moyens qu'utilise *S. mutans* pour résister à la bacitracine est la voie RGP (Tsuda *et al*., 2002). Ainsi, l'inactivation d'une des enzymes de cette voie de biosynthèse chez *S. mutans* conduit à une hypersensibilité à la bacitracine. En conséquence, nous avons voulu voir si le locus TCS06 pouvait être impliqué dans la résistance à la bacitracine.

2.3) Implication du locus TCS06 dans la résistance à la bacitracine

L'ensemble des éléments présentés ci-dessus nous a conduit à comparer l'effet d'un stress bacitracine effectué en phase exponentielle de croissance sur la souche sauvage ainsi que sur les mutants disponibles du locus TCS06. Seul le mutant *Δrr06* est statistiquement moins sensible que la souche sauvage à la bacitracine une heure après le stress, le % résiduel de la DO après le stress étant de 70% et 47%, respectivement (figure 42). Nous avons pu ainsi mettre en évidence une sensibilité moindre à la bacitracine mais uniquement chez le simple mutant *Δrr06* et non sur le double mutant *Δhk06Δrr06* dont on attendait un phénotype plus marqué. Les autres gènes du locus codant pour les peptides « amont » et peptides « aval » ne sont clairement pas impliqués dans la résistance à la bacitracine pas plus que l'ABC transporteur (annoté comme exporteur putatif). La fonction de ces gènes reste donc à déterminer. Enfin, puisque le double mutant *Δhk06Δrr06* n'avait pas de phénotype plus marqué que la souche sauvage suite à un stress bacitracine, nous avons choisi de travailler uniquement sur le mutant *Δrr06* dans les expériences qui vont suivre.

2.4) Confirmation des gènes régulés par RR06 par analyse transcriptomique

Pour confirmer le régulon « bacitracine » de RR06 au niveau transcriptomique, nous avons effectué des prélèvements des cultures de la souche sauvage et de la souche *Δrr06* 1h après l'ajout ou non d'un stress bacitracine. Les ARNs ont été extraits en vue d'une analyse comparative entre les deux échantillons de l'expression d'un pool de gènes théoriques susceptibles de conférer une meilleure résistance à la bacitracine. L'ensemble des résultats présentés dans le tableau 11 montrent que l'expression de *rr06* chute d'un facteur 2.8 chez la souche sauvage suite à l'exposition à un stress bacitracine.

Induction des gènes après un stress bacitracine

Gènes	WT	Δ*rr06*	Δ*rr07*
hk06	**NS**	**x2.4**	X
rr07	**x4**	**x5.5**	X
ster_1308	**x28**	**x40**	**X12.5**
ster_1223	**x2.5**	**x2.9**	**x3.2**
ster_656	**x1.96**	**x2.6**	**NS**
rgpB	**NS**	**x2.3**	X
rgpA	**NS**	**x2.2**	X

Répression des gènes après un stress bacitracine

Gènes	wT	Δ*rr06*	Δ*rr07*
rr06	**x2.8**	X	X
rgpI	**NS**	**x3**	X

Tableau 11: Variation d'expression de gènes 1h après un stress bacitracine chez les souches WT LMD-9, Δ*rr06* et Δ*rr07*

Une analyse de variance a été effectuée à partir de 3 répétitions biologiques ainsi que 3 répétitions techniques pour chacun des trois échantillons (WT, Δ*rr06* et Δ*rr07)* pour vérifier que les niveaux d'expression relative des gènes soient statistiquement significatifs ($P<0.05$). Toutes les valeurs représentées sont statistiquement significatives mises à part celles annotées par **NS**, pour non significatif, et **X** lorsque le gène n'a pas été étudié.

Nous avons aussi observé pour les deux souches (sauvage et *Δrr06*), suite au stress bacitracine, une induction à des niveaux semblables de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du rhamnose tels que *rmlC* et son paralogue *ster_0656*, gène propre à la souche LMD-9 et absent chez toutes les autres espèces de streptocoques séquencées. Deux autres gènes (*rgpA* et *rgpB*) codant pour des enzymes impliqués dans la polymérisation et la ramification du rhamnane sont quant à elles induites au moins d'un facteur 2, mais uniquement dans la souche *Δrr06*. Pareillement, une répression d'un facteur 3 du gène *rgpI* a été relevée uniquement dans la souche *Δrr06*. RR06 module donc au moins 3 gènes impliqués dans la synthèse du polysaccharide RGP.
Par ailleurs, les résultats montrent également qu'un ABC transporteur de type exporteur, *ster_1308* impliqué dans la résistance à la bacitracine (Ouyang *et al*., 2010) chez l'orthologue de *S. mutans* (nommé BceA ou MbrA), est induit 28 fois dans la souche sauvage et 40 fois dans le mutant *Δrr06*. Puisque BceR régule positivement l'expression chez *S. mutans* de l'ABC transporteur BceA, nous avons voulu voir si RR07 (*ster_1310*), homologue à 46% avec BceR, régule l'expression de *ster_1308* en présence de bacitracine. Nous avons observé ici une induction d'un facteur 12.5 de l'expression de *ster_1308* qui reste toutefois plus limitée que celle observée pour la souche sauvage (x28) et mutante *Δrr06* (x40). RR07 est donc un activateur de l'expression de *ster_1308*.

3) Discussion et proposition d'un modèle de régulation

L'ensemble des résultats précédemment cités nous a permis de proposer un modèle de réponse au stress bacitracine impliquant les TCS06 et TCS07 (Figure 43). Les résultats ont montré que l'un des moyens qu'utilise la souche sauvage pour répondre au stress bacitracine est d'augmenter la synthèse du rhamnose (via *rmlC* et son paralogue *ster*_0656) et de diminuer l'expression de *rr06* afin d'augmenter la synthèse de RGP (via entre autres *rgpA* et *rgpB*). Une autre façon de répondre passe par l'augmentation de l'ABC transporteur (*ster_1308/1307)* via RR07, activateur du transporteur. Ainsi, en comparant l'effet du stress bacitracine sur l'expression de chacun de ces gènes entre la souche sauvage et *Δrr06*, on comprend mieux pourquoi le mutant *Δrr06* est plus résistant à la bacitracine que la souche sauvage. On peut proposer deux raisons.

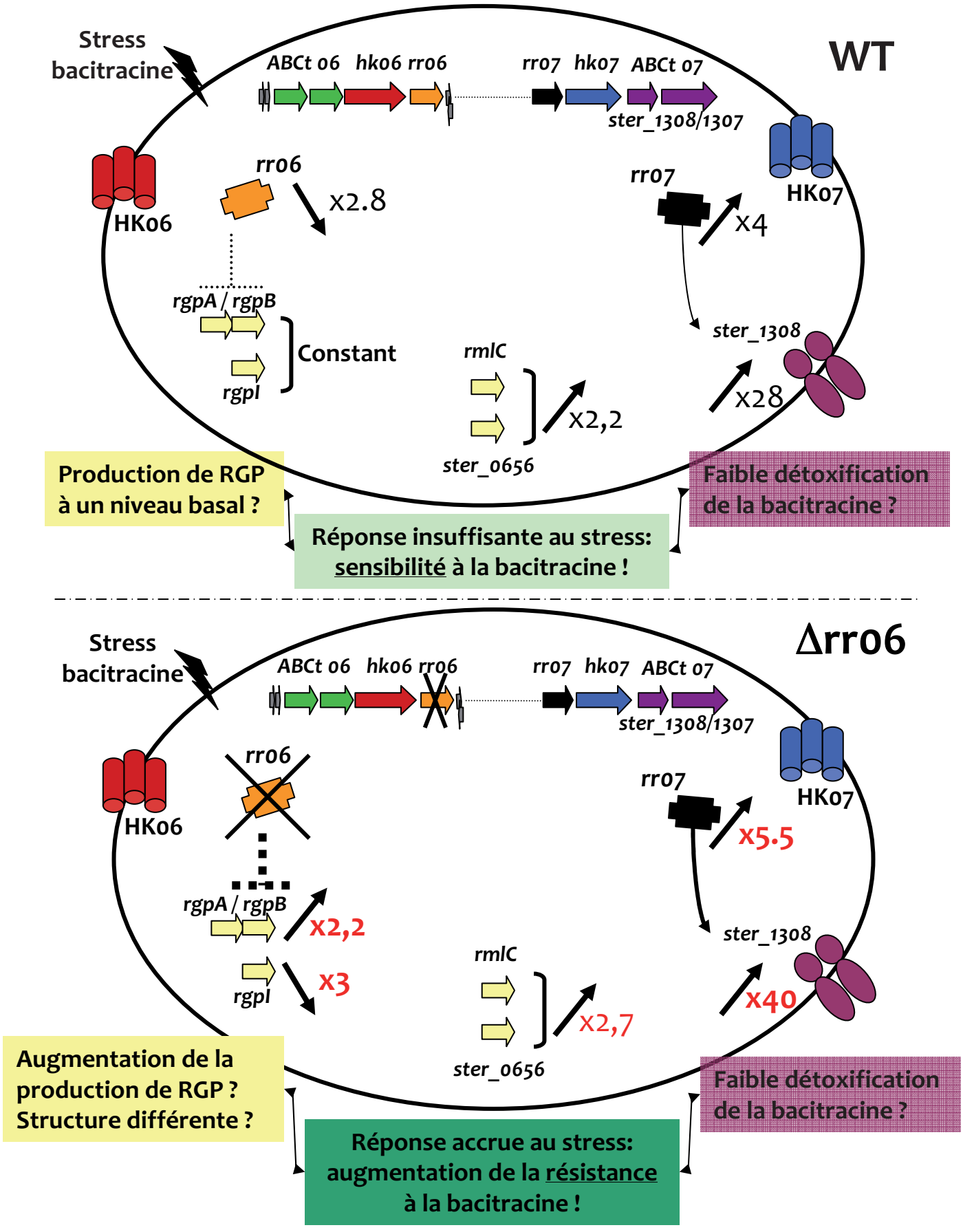


Figure 43: Régulation de la réponse à un stress bacitracine chez *S. thermophilus* LMD-9: Modèle proposé pour les souches WT et *Δrr06*

La première est que par définition, la souche *Δrr06* est totalement dépourvue de RR06. Il y a donc levée de la répression des gènes de synthèse de RGP *rgpA* et *rgpB*. Ce n'est pas le cas de la souche sauvage où la répression de RR06 n'est pas suffisante (du moins 1h après le stress bacitracine) pour induire cette production de RGP (l'expression des gènes *rgpA* et *rgpB* restant la même avec ou sans stress).

Le deuxième élément allant en faveur d'une meilleure résistance du mutant *Δrr06* par rapport à la souche sauvage est qu'il exprime environ 40% fois plus de *rr07* (induction de x5.5 pour *Δrr06* contre 4 seulement pour la souche sauvage) et d'ABC transporteur *ster_1308* (induction de x40 pour *Δrr06* contre 28 seulement pour la souche sauvage).
Rappelons que l'organisation du TCS07 chez *S. thermophilus* LMD-9 rappelle celle du système détoxifiant la bacitracine, BceABRS chez *S. mutans*, impliquant lui aussi un ABC transporteur BceAB associé au TCS BceRS. Nous savons par ailleurs que RR07 et BceR partagent 46% d'identité mais ne partage pas le même cluster fonctionnel (voir la partie analyse *in silico*). Ainsi, le véritable stimulus reconnu par le TCS07 pourrait être une molécule différente de la bacitracine mais analogue à celle-ci dans ses effets. Néanmoins au vu des niveaux d'induction relevés pour *rr07* suite au stress, on peut penser que TCS07 contribuerait à détoxifier en partie la cellule de la bacitracine.

Pour conclure, nous avons observé, quelle que soit la souche (sauvage ou *Δrr06),* l'induction en présence de bacitracine de gènes codant pour d'autres enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse du rhamnose tels que *rmlC* et son paralogue *ster_0656*, gène propre à la souche LMD-9 et absent chez toutes les autres espèces de streptocoques séquencées. Nous avons vu que 3 enzymes impliquées dans la polymérisation (*rgpA* et *rgpB*) et la ramification du rhamnane par des résidus glucose (*rgpI*) sont modulés uniquement dans la souche *Δrr06*. L'ensemble de ces nouveaux résultats montre clairement l'implication du gène *rr06* dans la réponse au stress bacitracine en modulant à la fois l'expression de gènes de synthèse de RGP et d'exportation « aspécifique » de la bacitracine via STER_1308 (BceA like). La voie RGP semble donc particulièrement intéressante et son rôle ne semble pas accessoire dans la physiologie de *S. thermophilus* témoin le fait que nous n'ayons pu obtenir de mutants *rgpA* et *rmlD*, deux gènes de biosynthèse de RGP.

Néanmoins, nous avons pu ainsi mettre en évidence une sensibilité moindre à la bacitracine uniquement chez le simple mutant *Δrr06* et non sur le double mutant *Δhk06Δrr06* dont on attendait un phénotype plus marqué. Ce résultat peut surprendre mais il n'est pas impossible qu'on assiste ici à un phénomène de cross-talk dans le mutant *Δrr06*. HK06 ainsi dépourvue de son partenaire « naturel » RR06 pourrait agir sur RR07 et donc potentiellement augmenter le niveau de phosphorylation de RR07. Ainsi, le pool de RR07 phosphorylé serait un peu plus important dans le mutant *Δrr06* que dans la souche sauvage du fait de l'additivité des activités des histidines kinases HK06 et HK07. Cet excédent, même minime, de la quantité de RR07 phosphorylée dans le mutant *Δrr06* pourrait expliquer l'augmentation conjointe d'environ 40% de la quantité des transcrits *rr07 et ster_1308* par rapport à la souche sauvage.

CHAPITRE 3 :
Discussion et perspectives

L'objectif de ce projet était d'étudier les phénomènes de régulation impliquant des TCS en réponse aux changements environnementaux que rencontre *Streptococcus thermophilus* lors de son utilisation technologique (acidification du milieu, présence concomitante de *Lb. bulgaricus*…). Il avait déjà été montré au laboratoire que des échanges nutritionnels avaient lieu entre *S. thermophilus* et son partenaire bactérien dans le yaourt, *Lb. bulgaricus,* lors de leur co-culture dans le lait (Herve-Jimenez *et al*., 2009). Par ailleurs, la présence de *Lb. bulgaricus* conduisait à des remaniements métaboliques chez *S. thermophilus* ainsi qu'à des modulations d'abondance de protéines régulatrices encore jamais décrits. Ainsi, lors de la co-culture de *S. thermophilus* avec *Lb. bulgaricus*, des évolutions différentes des régulateur de réponse RR01 et RR05 de *S. thermophilus* entre mono- et co-culture avaient été mises en évidence aussi bien au niveau transcriptomique que protéomique. Les TCS constituant une famille importante de systèmes régulateurs chez les procaryotes et au vu de la faible quantité d'études portant sur ceux de *S. thermophilus* (Fontaine *et al*., 2007; Fontaine and Hols, 2008), notre objectif principal était d'évaluer la contribution de chacun des RR dans la physiologie de *S. thermophilus* puis de caractériser plus précisément l'un de des TCS, notamment par l'identification de son régulon. Nous proposons dans cette section de discuter l'ensemble des résultats issus de ce projet au travers de cinq points.

1) Les régulateurs de réponse sont-ils essentiels à la physiologie de *S. thermophilus* LMD-9 ?

Nous avons dans un premier temps montré que les 8 régulateurs de réponse de *S. thermophilus* sont exprimés au cours de sa croissance en lait avec des niveaux et profils d'expression variables. Les résultats de notre article « Characterization of *Streptococcus thermophilus* two-component systems: *in silico* analysis, functional analysis and expression of response regulator genes in pure or mixed culture with its yogurt partner, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*» constituent l'une des rares études à présenter ce type de données pour l'ensemble des RR d'une bactérie, celle concernant *E. coli* en étant une autre (Oshima *et al*., 2002). Par ailleurs et comme montré dans ce premier article,

l'absence d'un seul RR ne conduit pas à des phénotypes marqués sur la croissance de *S. thermophilus* en lait et en milieu chimiquement défini. D'autres études d'inactivation systématiques des RR voire des HK, notamment chez *E. faecalis* (Hancock and Perego, 2004), *S. mutans* (Biswas *et al*., 2008; Levesque *et al*., 2007), ont conduit également à ce type de résultats. Néanmoins, contrairement à ces souches pathogènes possédant deux fois plus de TCS que *S. thermophilus* pour une taille de génome similaire (2Mb), on pouvait imaginer que les 8 TCS de *S. thermophilus* contrôlaient une partie non négligeable du cœur de ses fonctions physiologiques. En réalité et dans nos conditions de culture, seul RR05 est essentiel à la croissance de *S. thermophilus*, comme c'est le cas d'ailleurs de presque tous les streptocoques (Winkler and Hoch, 2008), excepté *S. gordonii* (Liu and Burne, 2009). Chez les streptocoques ainsi que chez *S. aureus* (Dubrac *et al*., 2007; Dubrac *et al*., 2008) et *B. subtilis* (Fukuchi *et al*., 2000; Fukushima *et al*., 2008; Szurmant *et al*., 2007a), ce TCS contrôle en effet l'architecture de la paroi et son remodelage lors du processus de division cellulaire. Partant de ce constat, nous proposons trois hypothèses permettant d'expliquer cette absence de phénotypes marqués des mutants de délétion des RR de *S. thermophilus*.

Une première explication serait que les régulons de chacun des TCS de *S. thermophilus* sont peut-être particulièrement restreints car associés à une fonction précise comme c'est le cas du TCS09 qui contrôle la production d'une bactériocine via un mécanisme de type quorum-sensing. Les études menées sur ce système ont non seulement montré que les gènes régulés par le TCS09 sont ceux situés dans un environnement génétique proche du TCS09 mais aussi que le signal perçu par l'HK09 du système est *a priori* unique, en l'occurrence la phéromone BlpC (Fontaine *et al*., 2007; Fontaine and Hols, 2008). C'est également le cas pour beaucoup d'autres TCS comme par exemple le système BceRS de *S. mutans* (Ouyang *et al*., 2010) qui contrôle l'ABC transporteur BceAB codé par les deux gènes en amont de BceR. On peut donc penser que les conditions environnementales que nous avons testées ne permettent pas d'activer les TCS de *S. thermophilus* ou encore que la ou les fonctions régulée(s) par ces systèmes sont accessoires, ne jouant ni un rôle sur la croissance ni sur l'efficacité de fermentation lactique du streptocoque. Un moyen de vérifier en partie cette hypothèse serait de comparer systématiquement l'expression des gènes de l'environnement génétique des TCS entre la souche sauvage et chacun des mutants *Δrr* et voir s'il existe des différences entre les deux souches. On pourrait essayer d'autres conditions de croissance, peut-être plus

stressantes pour la bactérie. D'un point de vue appliqué, d'autres conditions technologiques pourraient aussi être testées comme l'étude de la post-acidification de laits fermentés ou de yaourt après des séjours à 4°C. Des chocs thermiques mimant les processus technologiques des fromages à pâte pressée cuite sont également à envisager. Le comportement, notamment le temps de reprise de l'acidification des différents mutants suite au stress, est donc intéressant à étudier.

Une deuxième hypothèse concernant l'absence de phénotypes serait que l'absence des TCS soit compensée par d'autres TCS car certaines fonctions ou gènes sont régulés par plusieurs systèmes TCS. Ce cas de figure existe chez certains systèmes comme par exemple avec les systèmes de régulation NarQ/P et NarX/L d'E. *coli* qui ont des gènes cibles communs dans l'opéron nitrate réductase. Pour ce qui est de la régulation d'une fonction commune, on peut citer le cas de la perception de la bacitracine et de la détoxification afférente chez *B. subtilis* qui fait intervenir jusqu'à 4 TCS différents (Bernard *et al*., 2003; Rietkotter *et al*., 2008). Pour étudier cette éventualité, la construction de doubles mutants de couples de RR serait utile sans besoin nécessairement de réaliser toutes les combinaisons. Nous savons en effet que chaque sous famille d'effecteur des RR possède une façon d'interagir avec l'ADN qui lui est caractéristique (séquence consensus de reconnaissance à motifs répétés ou inversés répétés par exemple). On peut donc s'attendre à ce que, si deux RR partagent directement le même régulon, il y ait plus de chance qu'ils appartiennent à la même sous-famille d'effecteur, soit par exemple OmpR ou NarL ou LytTR. Ainsi dans un premier temps, pourraient être construits par exemple les doubles mutants *Δrr06Δrr08* (type NarL) et *Δrr04Δrr07* (type OmpR). Néanmoins, dans le cas de fonctions complexes nécessitant une régulation particulièrement fine comme l'assimilation des différentes sources d'azote (Noriega *et al*., 2010), on peut imaginer la présence dans les régions promotrices des gènes cibles de plusieurs « consensus binding sequence » (CBS) différentes, toutes positionnées dans la région promotrice du ou des gènes cibles des RR associés. On peut également envisager l'existence de CBS hybrides contenant les deux CBS de deux RR différents permettant l'attachement d'hétérodimères de RR, ce qui a déjà été démontré *in vitro* (Rong Gao, 2008)

La troisième alternative conduisant à des mécanismes compensatoires est la possibilité de phénomènes de cross-talk entre TCS du fait de l'inactivation d'un *rr*. On parle de cross-talk lorsqu'il y a interaction entre une HK ou plusieurs HK et un RR non

associé. Nous savons que ce phénomène ne se produit que rarement *in vivo* dans une cellule bactérienne (Laub and Goulian, 2007) et est souvent négligeable du fait de la spécificité du couple HK/RR pour un TCS donné, leur constante d'affinité étant particulièrement forte (Laub and Goulian, 2007).

Toutefois, plusieurs études récentes ont montré l'existence de cross-talk dans le cas des HK orphelines (Saini *et al*., 2004) ou RR orphelins (Sugareva *et al*., 2010; Wang *et al*., 2009). Gardant cela à l'esprit et puisque nous avons délété chacun des *rr* de *S. thermophilus*, il se pourrait très bien que nous ayons ainsi contribué au mécanisme de cross-talk en permettant aux HK rendues orphelines (car dépourvu de leur partenaires naturels) d'accentuer (si l'activité kinase est majoritaire) ou de diminuer l'état global de phosphorylation d'un autre RR. C'est d'ailleurs l'hypothèse proposée pour expliquer pourquoi nous avons obtenu un phénotype marqué par rapport à la résistance à la bacitracine pour le simple mutant *Δrr06* et non pour le double mutant *Δrr06Δhk06*. Ainsi donc, dans le cas où deux RR, RRx et RRy réguleraient les mêmes gènes, la perte de l'activité régulatrice due à l'inactivation de RRx pourrait être compensée par une augmentation de la quantité de RRy phosphorylé en raison d'une double activation par HKy et HKx. Ce type de scénario n'est bien entendu pas possible pour ce qui est des RR orphelins, comme RR01 et RR08 chez la souche LMD-9 de *S. thermophilus* qui sont dépourvus d'histidine kinase associée. Ces deux RR peuvent donc interagir potentiellement avec d'autres HK voire même avec des serine/ thréonine kinase, comme c'est le cas pour CovR chez *S. agalactiae*. En effet la sérine thréonine kinase STK1, module l'activité du RR par phosphorylation, non pas du résidu Asp53, mais du résidu Thr65 (Lin *et al*., 2009). Il est d'ailleurs intéressant de constater qu'il existe une sérine/ thréonine kinase orthologue à celle de *S. agalactiae* chez *S. thermophilus* LMD-9 (*ster_1392*) et qu'un résidu Thr en position 65 existe tant dans la structure primaire de RR01 que dans celle de RR08. Ces deux RR pourraient donc être modulés par phosphorylation via cette sérine/ thréonine kinase.

Pour conclure, il est possible que les conditions dans lesquelles nous avons testé les TCS de *S. thermophilus* ne soient pas celles pour lesquelles ces systèmes sont actifs. Dans ce cas, leur inactivation ne perturbe pas la bactérie. Des régulations croisées entre les systèmes TCS pourraient également exister ce qui expliquerait pourquoi l'inactivation d'un RR ne produit pas des phénotypes. Par ailleurs, nous avions choisi volontairement d'inactiver les RR puisque ce sont eux théoriquement qui sont les effecteurs réels de la

régulation et non les HK. Par ailleurs, la souche LMD-9 ne possède pas les histidine kinases HK01 et HK08. A la question de savoir si l'inactivation des TCS complets (HK et RR) aurait donné des phénotypes plus marqués, on peut s'appuyer sur une étude récente chez *S. mutans* démontrant l'existence d'un phénotype (perte de compétence) pour le simple mutant de l'HK CiaK qui disparaît dans le double mutant CiaK/R (Wu *et al*., 2010). Les auteurs ont d'ailleurs montré que même le mutant CiaR était aussi dépourvu de phénotype, résultat surprenant qu'ils ont pu finalement expliquer par une surproduction de CiaR dans le mutant de l'HK associé CiaK. La construction d'un mutant surproducteur de CiaR qu'ils ont obtenu par la suite leur a permis de confirmer cette hypothèse. L'acteur principal était donc bien le RR mais il fallait qu'il soit surproduit pour qu'on puisse déterminer le régulon au niveau transcriptomique.
Tous ces éléments nous amènent à reconsidérer l'ensemble des facteurs qui déterminent potentiellement l'activité d'un TCS au travers du paragraphe qui suit.

2) Comment un TCS devient-il actif ?

Nous pouvons aborder cette question d'un point de vue séquentiel. En effet, il ne faut pas oublier qu'à l'origine, un signal ou un ensemble de signaux est perçu par l'HK, entraînant son autophosphorylation et parfois même sa dimérisation. Dans un second temps, l'HK opère au transfert du groupement phosphate au RR qui lui est associé. Le RR ainsi activé, qu'il soit sous forme monomérique ou dimérique peut alors jouer son rôle de régulateur en se fixant sur les séquences opératrices de ses gènes cibles. Une réponse physiologique au stimulus est ainsi obtenue.

Pour ce qui est du signal initial perçu par l'HK, peu d'études ont pu déterminer précisément la molécule ou les conditions optimales déclenchant l'activation du TCS. Nous savons par exemple que certains systèmes reconnaissent une seule molécule comme c'est le cas de BceRS reconnaissant spécifiquement la bacitracine quand d'autres, tels LiaFSR ou EnvZ/ OmpR, perçoivent respectivement une perturbation de l'intégrité de la paroi et une variation de la pression osmotique milieu. Nous savons par ailleurs que les signaux perçus par les HK peuvent être des phéromones, notamment de nature peptidique pour ce qui est de *S. thermophilus*, phéromones proches génétiquement de l'HK comme c'est le cas de BlpC (Fontaine *et al*., 2007) mais souvent oubliées à l'annotation du génome du fait de la taille réduite des gènes les codant. Le logiciel dédié BactgeneSHOW (Bryson *et al*., 2006) permet d'identifier les phéromones potentielles chez les bactéries.

L'activation de l'HK dépendant de la concentration en phéromone, il serait judicieux de surproduire les phéromones potentielles et de vérifier l'expression des gènes de l'opéron associé au TCS. En effet, les TCS de type quorum sensing fonctionnent souvent en tant que systèmes autorégulateurs régulant ainsi l'ensemble de l'opéron. Ainsi, l'analyse manuelle des orthologues au locus TCS02 des souches séquencées de *S. thermophilus* et de l'orthologue chez *E. faecalis* V583 révèle la présence chez les streptocoques thermophiles d'un peptide conservé de séquence **MKNIQVRKAVAQTEISWGII** ayant 50% d'identité avec celui de l'entérocoque **MKKINVRKADTVDATAWWIII**. Ce peptide pourrait jouer un rôle modulateur du système en tant que phéromone d'HK02 par exemple.

Par ailleurs, la phosphorylation et la dimérisation, aussi bien des HK que des RR étant d'une importance capitale dans la transmission du signal HK-RR (Casino *et al*., 2010; Gao and Stock, 2009), l'étude de la spécificité de leurs interactions doit être approfondie, les phénomènes préalablement cités de cross-talk et d'hétérodimérisations des RR en dépendant largement. Si par exemple, le RR se déphosphoryle de lui-même plus rapidement qu'une HK non partenaire le phosphoryle, le cross talk n'aura pas lieu. Pour répondre à ces aspects moléculaires, la technique de FRET (Rong Gao, 2008) parait adaptée malgré un investissement certain dans la mise au point.

Notre étude confirme par ailleurs qu'un faible niveau d'expression d'un RR, *rr02* dans notre cas, ne signifie pas pour autant absence de régulation des gènes cibles puisque deux gènes en amonts du RR sont modulés dans ces conditions. On retrouve d'ailleurs ce type de résultat dans le cas du régulateur Spo0A de *B. subtilis* (Fujita *et al*., 2005). Ceci suggère que le niveau de phosphorylation d'un RR est au moins aussi important sinon plus que la quantité de transcrit de celui-ci (Stock *et al*., 2000). D'ailleurs, beaucoup d'études *in vitro*, en particulier de retards sur gel, montrent que la quantité de RR nécessaire pour se fixer sur sa séquence d'ADN cible peut être abaissée d'un facteur 10 lorsque celui-ci est phosphorylé (Ouyang *et al*., 2010).

A contrario, un fort taux d'expression d'un RR peut permettre l'activation d'un TCS (Martin *et al*., 2010; Wu *et al*., 2010). Notre étude montre d'ailleurs d'importantes modulations d'expressions des RR de *S. thermophilus* au cours de la croissance notamment en présence de *L. bulgaricus*. Ainsi, nous pourrions envisager de simuler l'activation d'un RR phosphorylé à l'aide de mutants surproducteurs des RR ce qui pourrait être une bonne alternative pour déterminer leurs régulons aussi bien par des approches post-génomiques.

3) Que sait-on de la taille des régulons des TCS ?

Peu d'informations sont disponibles concernant la taille des régulons. On trouve principalement des études globales de régulons concernant des TCS de souches pathogènes hormis *B. subtilis* et le régulon Spo0A qui est bien décrit et qui contrôle environ 3% du génome de *B. subtilis* (Fujita *et al*., 2005). D'autres travaux effectués sur les streptocoques pathogènes indiquent que les TCS influencent l'expression de 12 à 41 % des gènes (Sitkiewicz and Musser, 2006).

Néanmoins, l'un des problèmes majeur est que les régulateurs à régulon « large » comme Spo0A contrôlent bien souvent d'autres régulateurs ce qui ne permet donc pas d'authentifier à 100% un régulon, ce que reconnaissent ceux qui l'ont étudié (Molle *et al*., 2003). Les régulons obtenus et attribués à un seul TCS sont ainsi biaisés puisque celui-ci influe clairement l'expression d'autres régulateurs et donc par effet boule de neige d'autres gènes non directement sous le contrôle du TCS.

De plus, suivant les études, les seuils choisis permettant de distinguer l'abondance de protéines ou l'expression de gènes entre une souche sauvage et une souche délétée ou mutée pour un RR ne sont pas les mêmes. Certains utilisent le seuil arbitraire d'un rapport minimal d'expression ou d'abondance de 2 ou 3 entre deux conditions quand d'autres utilisent les statistiques pour abaisser ce rapport à 1.5 voire 1.3. Quelle est la signification biologique de tout cela ? En effet, l'activité d'une protéine peut-elle se résumer uniquement à son niveau d'abondance ? Clairement non puisqu'on citait juste précédemment l'exemple de RR dont la phosphorylation diminuait la quantité nécessaire pour se fixer sur ses cibles. Ainsi, la méthodologie d'analyse du régulon d'un TCS influe nécessairement sur la taille du régulon obtenue.

Il ne faut pas oublier également que les régulons mis en évidence le sont dans des conditions de culture bien précises qui ont été choisies pour répondre à une problématique donnée. Ainsi, les études de TCS de souches pathogènes sont souvent associées à des modèles de virulence qui ne permettent pas forcément de mettre en évidence d'autres fonctions physiologiques plus communes. On a vu par exemple qu'il existe des clusters non caractérisés de TCS communs à des souches pathogènes et non pathogènes comme par exemple les orthologues au TCS06 que *S. thermophilus* possède. D'autre part, certains

régulons ne sont pas connus car les études visant à caractériser ces TCS ont été effectuées dans des conditions trop drastiques pour pouvoir obtenir un « régulon réel » potentiellement plus large. L'étude de TCS tels RR09 chez *S. thermophilus* ou les systèmes RelRS ou SptRS précédemment cités (voir partie bibliographique) en sont de bons exemples. Les gènes qu'ils contrôlent sont dans l'environnement proche du TCS mais cela ne signifie pas pour autant que tous les RR régulent les gènes dans l'environnement génétique proche. On a vu par exemple que RitR réprimait entre autres des gènes permettant l'acquisition de fer, gènes qui ne sont nullement présent dans son environnement.

Enfin, il existe également un effet souche, témoin les nombreuses études sur CovR. L'analyse comparative du transcriptome de trois souches sauvages différentes de *S. agalactiae* et de leurs mutants ΔCovR montre une grande variabilité de régulons CovR. Ainsi, dans la souche NEM2603, le régulateur CovR active 13 gènes et inhibe 94 gènes alors que dans la souche NEM515, il en active 12 et en inhibe 57 (Jiang *et al*., 2008). Sur l'ensemble des gènes régulés par CovRS chez les trois souches étudiées (NEM316, 2603 et 515), seuls 39 gènes sont identiques (Jiang *et al*., 2008). La plupart de ces derniers sont soit des gènes de virulence soit des gènes appartenant aux systèmes de transport d'acides aminés, de peptides, de sucres ou de métaux (Jiang *et al*., 2008).

4) Les TCS de *S. thermophilus* perçoivent-ils la présence de *L. bulgaricus* ?

Au cours de notre étude transcriptomique des régulateur de réponse de *S. thermophilus* aussi bien en monoculture qu'en association avec *L. bulgaricus*, nous avons mis en évidence que l'expression des transcrits *rr02* et *rr09* est au moins cinq fois plus forte en coculture qu'en monoculture, deux fois pour ce qui est de *rr01* et *rr05*.

Sachant que le neuvième TCS de *S. thermophilus* contrôle la production d'une bactériocine, la thermophiline 9 (Fontaine *et al*., 2007), nous suggérons que la surexpression de *rr09* en coculture pourrait être une réponse de *S. thermophilus* à la présence d'une autre bactérie dans son environnement. Dans le cas présent, nous savons que la thermophiline 9 n'inhibe pas la croissance de la souche *L. bulgaricus* ATCC11842 que nous avons utilisée (Fontaine and Hols, 2008). Cependant il est tout à fait possible

qu'il s'agisse d'un mécanisme de défense non spécifique comme c'est le cas chez *L. acidophilus*. En effet, une étude chez cette espèce a montré que la production de la bacteriocine lactacine B, sous contrôle également d'un TCS, est induite par des souches génétiquement proches qui ne sont pas sensibles à celle-ci (Tabasco *et al*., 2009). Ainsi par exemple, *S. thermophilus* STY-31 ainsi que 3 souches de *L. bulgaricus* induisent la production de la lactacine B mais seules 2 des souches de *L. bulgaricus* y sont sensibles.

Concernant le TCS02 de *S. thermophilus*, dont le *rr* est surexprimé en présence de *L. bulgaricus*, les données actuelles ne nous permettent pas d'affirmer qu'il contrôle la production d'une bactériocine.

Quoi qu'il en soit et plus généralement, il serait très intéressant d'étudier les modulations d'abondance des transcrits des *rr* de *S. thermophilus* en réponse à la présence d'autres souches et espèces bactériennes afin d'affiner notre compréhension des conditions d'induction des TCS. Par ailleurs, le cas échéant, la modulation de l'expression des RR nécessite-elle la présence d'un partenaire viable ? Dans le cas de la production de la lactacine B, il apparaît clairement que oui puisqu'aucune activité antimicrobienne n'a été détectée en coculture avec des cellules mortes de *S. thermophilus* STY-31 (Tabasco *et al*., 2009). Il serait donc intéressant d'effectuer ce même type d'analyse pour savoir si ces modulations d'expressions des *rr* de *S. thermophilus* requièrent la présence d'espèces et/ou souches viables. Enfin, on peut également s'interroger sur la nature même de l'interaction liant la modulation des RR et la présence du partenaire microbien inducteur. Ce phénomène d'interaction est-il direct ou indirect ? Nécessite-il un contact physique entre le streptocoque et son partenaire ou bien n'est-il que de nature chimique via une molécule signal diffusible ? Ces questions pourront être résolues au laboratoire par l'utilisation d'un fermenteur dont nous disposons et qui permet d'effectuer des co-cultures sans contact entre deux souches.

5) Qu'implique le fait que RR06 module la voie de biosynthèse des RGP ?

Lors de la caractérisation du locus TCS06, pour lequel nous n'avions aucune information fonctionnelle au début de la thèse, nous avons vu, entre autres, qu'une des fonctions régulée par le TCS06 est la voie de production du polysaccharide à rhamnane/glucose (RGP) ainsi que d'autres enzymes impliquées dans la biosynthèse de la paroi de type glycosyltransférases. Les analyses transcriptomiques présentées dans la deuxième partie des résultats démontrent l'implication du gène *rr06* dans la réponse au stress bacitracine. Par ailleurs, nous avons vu que l'expression d'enzymes potentiellement impliqués dans la production et la structure de RGP ainsi que celle d'un exporteur potentiel de la bacitracine (*ster_1308)* est augmenté dans un mutant Δ*rr06*. Nous proposons que RR06 soit impliqué dans la résistance à la bacitracine via la modulation de l'expression de ces gènes. Pour confirmer cela, il serait intéressant d'étudier la production de RGP chez *S. thermophilus* en visualisant au microscope électronique à transmission ce qui pourrait être l'équivalent de la pellicule polysaccharidique mise en évidence récemment chez *L. lactis* MG1363 et composée de glucose, rhamnose, galactose et N-acétylglucosamine (Chapot-Chartier *et al*., 2010). En effet, l'analyse microscopique et biochimique de souches dérivées de *L. lactis* MG1363 présentant une mutation ponctuelle dans le gène *llmg_0226* appartenant au locus *rml-rgp* révèle clairement l'absence d'une telle pellicule. Ainsi, dans un premier temps, une analyse microscopique des souches sauvage et Δ*rr06* pourrait permettre de confirmer la présence d'une telle pellicule chez *S. thermophilus* LMD-9 et éventuellement d'observer chez le mutant Δ*rr06* une épaisseur plus importante en raison d'une probable production plus importante de RGP. Dans un second temps, une analyse biochimique de cette pellicule pourrait également être effectuée pour ces deux souches mais aussi avec d'autres souches de *S. thermophilus* présentant une variabilité de distribution des gènes sur ce locus *rgp* sachant que l'on sait qu'il existe une variabilité naturelle sur ce locus (Pierre Renault, communication personnelle).

Partant de cette diversité des loci *rgp* chez différentes souches de *S. mutans*, des chercheurs ont montré que la structure du RGP joue un rôle dans la résistance aux bactériophages (Shibata *et al*., 2009). Ainsi, le bactériophage M102 s'adsorbe uniquement sur des souches présentant un sérotype *c*. De plus, le fait que ce bactériophage puisse

s'adsorber sur des souches de sérotypes *d, e et f* rendues artificiellement sérotype *c* (par l'incorporation des enzymes RGP adéquates) montre bien qu'il existe une reconnaissance de la structure RGP par les bacteriophages. Une diminution de l'adsorption aux phages bIL170 et ϕ645 a également été démontré chez *L. lactis* IL1403 (Dupont *et al*., 2004) chez des mutants d'insertion au niveau du locus RGP. L'utilisation de souches à structures *rgp* très différentes mais aussi la construction de mutants dans ce locus permettraient potentiellement de sélectionner des souches de *S. thermophilus* moins enclines à être infectées par les bactériophages ou du moins une de leur sous-famille. A ce jour, seul le profil lysogénique de la souche mutante *Δrr06* a été comparé à celui de la souche sauvage. Ces analyses effectuées par une équipe de recherche de DANISCO n'ont pas permis d'établir de différences de lyse après incubation pendant 24h avec les bactériophages testés. Cela n'exclut pas pour autant une propension différente à fixer les phages comme c'est d'ailleurs le cas de l'étude chez *S. mutans* (Shibata *et al*., 2009).

Les RGP des streptocoques peuvent également moduler le système immunitaire de leur hôte. Plusieurs études des RGP chez *S. mutans* montrent qu'ils provoquent la synthèse de cytokines pro-inflammatoires de cellules épithéliales et endothéliales (Engels-Deutsch *et al*., 2003; Vernier *et al*., 1996), notamment en se fixant au récepteur CD14 de cellules monocytaires (Soell *et al*., 1995). Une autre étude a montré qu'ils entraînaient une surexpression des récepteurs Fc des immunoglogulines G (Benabdelmoumene *et al*., 1991) et la production d'oxyde nitrique par les cellules aortiques du rat qui contribue à la vasodilatation des vaisseaux sanguins (Martin *et al*., 1997). L'adhérence à la pulpe dentaire et la propension à former des caries dépendent également de la structure du RGP (Nakano *et al*., 2005; Seki *et al*., 2006). Enfin, le RGP joue un rôle primordial dans la résistance de *S. mutans* à la phagocytose par les polynucléaires neutrophiles humains (Tsuda *et al*., 2000). De façon intéressante, les souches de lactocoques préalablement citées, dépourvues de la pellicule dépendant du locus RGP, sont plus sensibles que la souche sauvage à des macrophages murins (Chapot-Chartier *et al*., 2010). Les auteurs suggèrent que cette pellicule pourrait contribuer à la défense du lactocoque contre le système immunitaire intestinal de l'homme. Ainsi on pourrait également envisager l'utilisation de souches de *S. thermophilus* possédant des RGP de structure très différente ainsi que de mutants *rgp* pour à la fois tester leur capacité d'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin de rats (*in vitro* et/ou *in* vivo) mais aussi leur faculté à induire une réponse immunitaire de l'hôte.

Enfin sur un plan plus appliqué, il serait intéressant d'en explorer l'effet sur la texture des produits laitiers comme le yaourt même si ce sont généralement les exopolysaccharides qui

y contribuent plus largement (Behare *et al*., 2010; De Vuyst *et al*., 2001). Néanmoins, la sécrétion des RGP reste envisageable comme cela a pu être effectué chez *Acetobacter tropicalis* (Deeraksa *et al*., 2006).

Conclusion

Ce travail de thèse a permis d'éclaircir comment chacun des TCS contribue à la physiologie de *S. thermophilus* en mono- ou en coculture avec *L. bulgaricus*. Nous avons pu confirmer l'essentialité de *rr05* (*walR*-like) dans la souche LMD-9 et montrer l'originalité de ses TCS par rapport aux autres streptocoques à la fois d'un point de vue bioinformatique et physiologique, notamment pour les systèmes TCS02 et TCS06. Toutefois, il est bien difficile d'avoir une idée claire des gènes potentiellement régulés par les TCS de *S. thermophilus* LMD-9. Même si les TCS02, 04 et 09 sont les moins conservés parmi les streptocoques, rien ne nous permet d'affirmer qu'ils contrôlent des voies métaboliques uniques à *S. thermophilus*. D'autres études seront nécessaires pour déterminer le régulon de chacun des TCS ce qui nécessitera de trouver les conditions de culture optimales pour activer ces TCS.

L'analyse fonctionnelle des TCS ayant ses limites, notamment du fait des phénomènes de cross-talk potentiellement favorisés dans les mutants de délétions des RR voire des HK, il semble plus judicieux à l'avenir dans le cadre d'études globales post-génomiques de comparer des mutants surproducteurs, de délétion et de mutation ponctuelle (sur l'Asp53 par exemple) du RR que l'on souhaite étudier. Les gènes qui varient uniquement dans toutes les conditions permettront de définir un régulon potentiel plus fiable (Wu *et al*., 2010).

Par ailleurs, lors de l'analyse phylogénétique de l'ensemble des RR des streptocoques et lactocoques, nous avons pu mettre en évidence des clusters spécifiques à des espèces notamment pathogènes qui pourraient, pourquoi pas, conférer des propriétés de virulence exclusives à ces espèces. La caractérisation de ces systèmes semble donc intéressante et permettrait potentiellement la mise au point de nouveaux antibiotiques visant spécifiquement les TCS impliqués dans la virulence d'une ou d'un ensemble d'espèces donné.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aguilar, P.S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulski, L.E., Erazo, A.C., and de Mendoza, D. (2001) Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *EMBO JOURNAL* **20**: 1681-1691.

Anderson, A., H. Nordan, R. Cain, G. Parrish, and D. Duggan. (1956) Studies on a radoresistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural charchteristoics, and resistance to gamma radiation. *Food Technol* **10**: 575-578.

Arena, S., D'Ambrosio, C., Renzone, G., Rullo, R., Ledda, L., Vitale, F., Maglione, G., Varcamonti, M., Ferrara, L., and Scaloni, A. (2006) A study of *Streptococcus thermophilus* proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations. *Proteomics* **6**: 181-192.

Awad, S., Hassan, A.N., and Muthukumarappan, K. (2005) Application of exopolysaccharide-producing cultures in reduced-fat Cheddar cheese: Texture and melting properties. *Journal of Dairy Science* **88**: 4204-4213.

Aziz, R.K., Kansal, R., Aronow, B.J., Taylor, W.L., Rowe, S.L., Kubal, M., Chhatwal, G.S., Walker, M.J., and Kotb, M. (2010) Microevolution of group A streptococci In vivo: Capturing regulatory networks engaged in sociomicrobiology, niche adaptation, and hypervirulence. *Plos One* **5**.

Bader, M.W., Sanowar, S., Daley, M.E., Schneider, A.R., Cho, U.S., Xu, W.Q., Klevit, R.E., Le Moual, H., and Miller, S. (2005) Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* **122**: 461-472.

Baikalov, I., Schroder, I., Kaczor-Grzeskowiak, M., Grzeskowiak, K., Gunsalus, R.P., and Dickerson, R.E. (1996) Structure of the *Escherichia coli* response regulator NarL. *Biochemistry* **35**: 11053-11061.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709-1712.

Behare, P.V., Singh, R., Tomar, S.K., Nagpal, R., Kumar, M., and Mohania, D. (2010) Effect of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological attributes of fat-free lassi. *Journal of Dairy Science* **93**: 2874-2879.

Beier, D., and Gross, R. (2006) Regulation of bacterial virulence by two-component systems. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 143-152.

Bellanger, X., Roberts, A.P., Morel, C., Choulet, F., Pavlovic, G., Mullany, P., Decaris, B., and Guedon, G. (2009) Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* **191**: 2764-2775.

Benabdelmoumene, S., Dumont, S., Petit, C., Poindron, P., Wachsmann, D., and Klein, J.P. (1991) Activation of human monocytes by *Streptococcus mutans* serotype-F polysaccharide - Immunoglobulin-G Fc receptor expression and tumor necrosis factor and interleukin1 Production. *Infection and Immunity* **59**: 3261-3266.

Beranova, J., Mansilla, M.C., de Mendoza, D., Elhottova, D., and Konopasek, I. (2010) Differences in Cold Adaptation of *Bacillus subtilis* under Anaerobic and Aerobic Conditions. *Journal of Bacteriology* **192**: 4164-4171.

Bernard, R., Joseph, P., Guiseppi, A., Chippaux, M., and Denizot, F. (2003) YtsCD and YwoA, two independent systems that confer bacitracin resistance to *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters* **228**: 93-97.

Biller, S.J., Wayne, K.J., Winkler, M.E., and Burkholder, W.F. (2011) The putative hydrolase YycJ (WalJ) affects the coordination of cell division with DNA

replication in *Bacillus subtilis* and may play a conserved role in cell wall metabolism. *Journal of Bacteriology* **193**: 896-908.

Bisicchia, P., Noone, D., Lioliou, E., Howell, A., Quigley, S., Jensen, T., Jarmer, H., and Devine, K.M. (2007) The essential YycFG two-component system controls cell wall metabolism in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **65**: 180-200.

Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S.D., and Maguin, E. (1993) High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* **175**: 3628-3635.

Biswas, I., Drake, L., and Biswas, S. (2007) Regulation of gbpC expression in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* **189**: 6521-6531.

Biswas, I., Drake, L., Erkina, D., and Biswas, S. (2008) Involvement of sensor kinases in the stress tolerance response of *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* **190**: 68-77.

Biswas, S., and Biswas, I. (2006) Regulation of the glucosyltransferase (gtfBC) operon by CovR in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* **188**: 988-998.

Blomqvist, T., Steinmoen, H., and Havarstein, L.S. (2006) Natural genetic transformation: a novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 6751-6756.

Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., and Hols, P. (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nature Biotechnology* **22**: 1554-1558.

Britton, R.A., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Fawcett, P., Monson, R., Losick, R., and Grossman, A.D. (2002) Genome-wide analysis of the stationary-phase sigma factor (sigma-H) regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **184**: 4881-4890.

Bryson, K., Loux, V., Bossy, R., Nicolas, P., Chaillou, S., van de Guchte, M., Penaud, S., Maguin, E., Hoebeke, M., BessiÃ¨res, P., and Gibrat, J.-F. (2006) AGMIAL: implementing an annotation strategy for prokaryote genomes as a distributed system. *Nucleic Acids Research* **34**: 3533-3545.

Buhrke, T., Lenz, O., Porthun, A., and Friedrich, B. (2004) The H-2-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory NiFe hydrogenase and a histidine protein kinase. *Molecular Microbiology* **51**: 1677-1689.

Burrus, V., Roussel, Y., Decaris, B., and Guedon, G. (2000) Characterization of a novel integrative element, ICESt1, in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1749-1753.

Cashin, P., Goldsack, L., Hall, D., and O'Toole, R. (2006) Contrasting signal transduction mechanisms in bacterial and eukaryotic gene transcription. *FEMS Microbiology Letters* **261**: 155-164.

Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2010) The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current Opinion in Structural Biology* **20**: 763-771.

Chapot-Chartier, M.-P., Vinogradov, E., Sadovskaya, I., Andre, G., Mistou, M.-Y., Trieu-Cuot, P., Furlan, S., Bidnenko, E., Courtin, P., Péchoux, C., Hols, P., Dufrene, Y.F., and Kulakauskas, S. (2010) Cell Surface of *Lactococcus lactis* is covered by a protective polysaccharide pellicle. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 10464-10471.

Chastanet, A., and Msadek, T. (2003) clpP of *Streptococcus salivarius* is a novel member of the dually regulated class of stress response genes in gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* **185**: 683-687.

Chaussee, M.S., Ajdic, D., and Ferretti, J.J. (1999) The rgg gene of *Streptococcus pyogenes* NZ131 positively influences extracellular SPE B production. *Infection and Immunity* **67**: 1715-1722.

Chong, P., Drake, L., and Biswas, I. (2008) Modulation of covR expression in *Streptococcus mutans* UA159. *Journal of Bacteriology* **190**: 4478-4488.

Churchward, G., Bates, C., Gusa, A.A., Stringert, V., and Scott, J.R. (2009) Regulation of streptokinase expression by CovR/S in *Streptococcus pyogenes*: CovR acts through a single high-affinity binding site. *Microbiology-Sgm* **155**: 566-575.

Corrieu, G.S., E. ; Picque, D. (1988) Procédé de mise en évidence et de contrôle de l'activite acidifiante d'agents de fermentation dans des bains de fermentation et dispositif pour sa mise en oeuvre. *French Patent* **1118 FR 49741**.

Courtin, P., Monnet, V., and Rul, F. (2002) Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus/ Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. *Microbiology-Sgm* **148**: 3413-3421.

Crittenden, R.G., Martinez, N.R., and Playne, M.J. (2003) Synthesis and utilisation of folate by yoghurt starter cultures and probiotic bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **80**: 217-222.

Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Henard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., Martin, B., Wells, J., and Claverys, J.P. (2004) Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of ciaR mutant cells. *Molecular Microbiology* **51**: 1071-1086.

Dalton, T.L., and Scott, J.R. (2004) CovS inactivates CovR and is required for growth under conditions of general stress in *Streptococcus pyogenes*. *Journal of Bacteriology* **186**: 3928-3937.

Darwin, A.J., Tyson, K.L., Busby, S.J.W., and Stewart, V. (1997) Differential regulation by the homologous response regulators NarL and NarP of *Escherichia coli* K-12 depends on DNA binding site arrangement. *Molecular Microbiology* **25**: 583-595.

Dawid, S., Sebert, M.E., and Weiser, J.N. (2009) Bacteriocin activity of *Streptococcus pneumoniae* is controlled by the serine protease HtrA via posttranscriptional regulation. *Journal of Bacteriology* **191**: 1509-1518.

de Been, M., Bart, M.J., Abee, T., Siezen, R.J., and Francke, C. (2008) The identification of response regulator-specific binding sites reveals new roles of two-component systems in *Bacillus cereus* and closely related low-GC Gram-positives. *Environ Microbiol* **10**: 2796-2809.

De Vuyst, L., De Vin, F., Vaningelgem, F., and Degeest, B. (2001) Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal* **11**: 687-707.

Deeraksa, A., Moonmangmee, S., Toyama, H., Adachi, O., and Matsushita, K. (2006) Conversion of Capsular Polysaccharide, Involved in Pellicle Formation, to Extracellular Polysaccharide by galE Deletion in *Acetobacter tropicalis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70**: 2536-2539.

Delorme, C., Poyart, C., Ehrlich, S.D., and Renault, P. (2007) Extent of horizontal gene transfer in evolution of streptococci of the salivarius group. *Journal of Bacteriology* **189**: 1330-1341.

Deng, D.M., Liu, M.J., ten Cate, J.M., and Crielaard, W. (2007) The VicRK system of Streptococcus mutans responds to oxidative stress. *Journal of Dental Research* **86**: 606-610.

Derzelle, S., Bolotin, A., Mistou, M.Y., and Rul, F. (2005) Proteome analysis of *Streptococcus thermophilus* grown in milk reveals pyruvate formate-lyase as the major upregulated protein. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 8597-8605.

Dintner, S., Staron, A., Berchtold, E., Petri, T., Mascher, T., and Gebhard, S. (2011) Coevolution of ABC transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in Firmicutes bacteria. *Journal of Bacteriology* **193**: 3851-3862.

Dmitriev, A., Mohapatra, S.S., Chong, P., Neely, M., Biswas, S., and Biswas, I. (2011) CovR-controlled global regulation of gene expression in *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE* **6**: e20127.

Doyuk, E., Ormerod, O.J., and Bowler, I. (2002) Native valve endocarditis due to *Streptococcus vestibularis* and *Streptococcus oralis*. *Journal of Infection* **45**: 39-41.

Driessen, F.M., Kingma, F., and Stadhouders, J. (1982) Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon-dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. *Netherlands Milk and Dairy Journal* **36**: 135-144.

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*. *Journal of Bacteriology* **189**: 8257-8269.

Dubrac, S., Bisicchia, P., Devine, K.M., and Msadek, T. (2008) A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway. *Molecular Microbiology* **70**: 1307-1322.

Dubrac, S., and Msadek, T. (2008) Tearing down the wall: Peptidoglycan metabolism and the WalK/WalR (YycG/YycF) essential two-component system. *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets* **631**: 214-228.

Ducros, V.M.A., Lewis, R.J., Verma, C.S., Dodson, E.J., Leonard, G., Turkenburg, J.P., Murshudov, G.N., Wilkinson, A.J., and Brannigan, J.A. (2001) Crystal structure of GerE, the ultimate transcriptional regulator of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* **306**: 759-771.

Dupont, K., Janzen, T., Vogensen, F.K., Josephsen, J., and Stuer-Lauridsen, B. (2004) Identification of *Lactococcus lactis* genes required for bacteriophage adsorption. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5825-5832.

Dyer, C.M., and Dahlquist, F.W. (2006) Switched or Not?: The structure of Unphosphorylated CheY Bound to the N Terminus of FliM. *Journal of Bacteriology* **188**: 7354-7363.

Eldholm, V., Gutt, B., Johnsborg, O., Bruckner, R., Maurer, P., Hakenbeck, R., Mascher, T., and Havarstein, L.S. (2010) The pneumococcal cell envelope stress-sensing system LiaFSR is activated by murein hydrolases and lipid II-interacting antibiotics. *Journal of Bacteriology* **192**: 1761-1773.

Engels-Deutsch, M., Pini, A., Yamashita, Y., Shibata, Y., Haikel, Y., Scholler-Guinard, M., and Klein, J.P. (2003) Insertional inactivation of *pac* and *rmlB* genes reduces the release of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-8 induced by *Streptococcus mutans* in monocytic, dental pulp, and periodontal ligament cells. *Infection and Immunity* **71**: 5169-5177.

Engleberg, N.C., Heath, A., Miller, A., Rivera, C., and DiRita, V.J. (2001) Spontaneous mutations in the CsrRS two-component regulatory system of *Streptococcus*

pyogenes result in enhanced virulence in a murine model of skin and soft tissue infection. *Journal of Infectious Diseases* **183**: 1043-1054.

Eran, Y., Getter, Y., Baruch, M., Belotserkovsky, I., Padalon, G., Mishalian, I., Podbielski, A., Kreikemeyer, B., and Hanski, E. (2007) Transcriptional regulation of the sil locus by the SilCR signalling peptide and its implications on group A streptococcus virulence. *Molecular Microbiology* **63**: 1209-1222.

Errington, J. (2003) Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* **1**: 117-126.

Fabret, C., and Hoch, J. (1998) A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *Journal of bacteriology* **180**: 6375 - 6383.

Facklam, R. (2002) What happened to the streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews* **15**: 613-+.

Federle, M.J., McIver, K.S., and Scott, J.R. (1999) A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A *streptococcus*. *Journal of Bacteriology* **181**: 3649-3657.

Fernandez-Espla, M.D., Garault, P., Monnet, V., and Rul, F. (2000) *Streptococcus thermophilus* cell wall-anchored proteinase: Release, purification, and biochemical and genetic characterization. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4772-+.

Fiedler, U., and Weiss, V. (1995) A common switch in activation of the response regulators Ntrc and Phob - Phosphorylation induces dimerization of the receiver modules. *Embo Journal* **14**: 3696-3705.

Flashner, Y., Weiss, D.S., Keener, J., and Kustu, S. (1995) Constitutive forms of the enhancer-binding protein Ntrc - Evidence that essential oligomerization determinants lie in the central activation domain. *Journal of Molecular Biology* **249**: 700-713.

Fontaine, L., Boutry, C., Guedon, E., Guillot, A., Ibrahim, M., Grossiord, B., and Hols, P. (2007) Quorum-sensing regulation of the production of Blp bacteriocins in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* **189**: 7195-7205.

Fontaine, L., and Hols, P. (2008) The inhibitory spectrum of thermophilin 9 from *Streptococcus thermophilus* LMD-9 depends on the production of multiple peptides and the activity of BlpG(St), a thiol-disulfide oxidase. *Appl Environ Microbiol* **74**: 1102-1110.

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

Foucaud, C., and Poolman, B. (1992) Lactose transport-system of *Streptococcus-Thermophilus* - Functional reconstitution of the protein and characterization of the kinetic mechanism of transport. *Journal of Biological Chemistry* **267**: 22087-22094.

Froehlich, B.J., Bates, C., and Scott, J.R. (2008) *Streptococcus pyogenes* CovR/S mediates growth in iron starvation and in the presence of the human cationic antimicrobial peptide LL-37. *Journal of Bacteriology*: JB.01256-01208.

Fujita, M., Gonzalez-Pastor, J.E., and Losick, R. (2005) High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **187**: 1357-1368.

Fukuchi, K., Kasahara, Y., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S., and Ogasawara, N. (2000) The essential two-component regulatory system encoded by yycF and yycG modulates expression of the ftsAZ operon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology-Uk* **146**: 1573-1583.

Fukushima, T., Szurmant, H., Kim, E.J., Perego, M., and Hoch, J.A. (2008) A sensor histidine kinase co-ordinates cell wall architecture with cell division in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **69**: 621-632.

Galperin, M.Y. (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol*. **5**.

Galperin, M.Y. (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *Journal of Bacteriology* **188**: 4169-4182.

Gao, J., Gusa, A.A., Scott, J.R., and Churchward, G. (2005) Binding of the global response regulator protein CovR to the sag promoter of *Streptococcus pyogenes* reveals a new mode of CovR-DNA interaction. *J Biol Chem* **280**: 38948-38956.

Gao, R., and Stock, A.M. (2009) Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review of Microbiology* **63**: 133-154.

Garault, P., Letort, C., Juillard, V., and Monnet, V. (2000) Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5128-5133.

Garault, P., Le Bars, D., Besset, C., and Monnet, V. (2002) Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 32-39.

Garcia Vescovi, E., Sciara, M.I., and Castelli, M.E. (1996) Two component systems in the spatial program of bacteria. *Current Opinion in Microbiology***13**: 210-218.

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

Gibson, T.J. (1984) Studies on Epstein-Barr virus genome. *Ph.D.Thesis, University of Cambridge, U.K*.

Goh, E.B., Bledsoe, P.J., Chen, L.L., Gyaneshwar, P., Stewart, V., and Igo, M.M. (2005) Hierarchical control of anaerobic gene expression in *Escherichia coli* K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system. *Journal of Bacteriology* **187**: 4890-4899.

Graham, M.R., Smoot, L.M., Migliaccio, C.A.L., Virtaneva, K., Sturdevant, D.E., Porcella, S.F., Federle, M.J., Adams, G.J., Scott, J.R., and Musser, J.M. (2002) Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: Global expression profiling and in vivo infection modeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 13855-13860.

Groisman, E.A., Parralopez, C., Salcedo, M., Lipps, C.J., and Heffron, F. (1992) Resistance to Host Antimicrobial Peptides Is Necessary for *Salmonella* Virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 11939-11943.

Groisman, E.A. (2001) The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *Journal of Bacteriology* **183**: 1835-1842.

Gryllos, I., Levin, J.C., and Wessels, M.R. (2003) The CsrR/CsrS two-component system of group A *Streptococcus* responds to environmental Mg2+. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 4227-4232.

Gryllos, I., Grifantini, R., Colaprico, A., Jiang, S., Deforce, E., Hakansson, A., Telford, J.L., Grandi, G., and Wessels, M.R. (2007) Mg(2+) signalling defines the group A streptococcal CsrRS (CovRS) regulon. *Molecular Microbiology* **65**: 671-683.

Guedon, G., Bourgoin, F., Burrus, V., Pluvinet, A., and Decaris, B. (2000) Implication of horizontal transfers in genetic polymorphism of lactic acid bacteria. *Sciences Des Aliments* **20**: 85-95.

Guenzi, E., Gasc, A., Sicard, M., and Hakenbeck, R. (1994) A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **12**: 505 - 515.

Gusa, A.A., Froehlich, B.J., Desai, D., Stringer, V., and Scott, J.R. (2007) CovR activation of the dipeptide permease promoter (PdppA) in Group A *Streptococcus*. *Journal of Bacteriology* **189**: 1407-1416.

Halfmann, A., Kovacs, M., Hakenbeck, R., and Bruckner, R. (2007) Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. *Molecular Microbiology* **66**: 110-126.

Hancock, L.E., and Perego, M. (2004) Systematic inactivation and phenotypic characterization of two-component signal transduction systems of *Enterococcus faecalis* V583. *Journal of Bacteriology* **186**: 7951-7958.

He, X., Wu, C., Yarbrough, D., Sim, L., Niu, G., Merritt, J., Shi, W., and Qi, F. (2008) The cia operon of *Streptococcus mutans* encodes a unique component required for calcium-mediated autoregulation. *Molecular Microbiology* **70**: 112–126.

Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Gautier, C., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Rul, F., and Maguin, E. (2008) Physiology of *Streptococcus thermophilus* during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism. *Proteomics* **8**: 4273-4286.

Herve-Jimenez, L., Guillouard, I., Guedon, E., Boudebbouze, S., Hols, P., Monnet, V., Maguin, E., and Rul, F. (2009) Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*: Involvement of nitrogen, purine, and iron Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 2062-2073.

Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion Microbiol* **3**: 165-170.

Hoch, J.A., and Varughese, K.I. (2001) Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *Journal of Bacteriology* **183**: 4941-4949.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Ehrlich, S.D., Guedon, E., Monnet, W., Renault, P., and Kleerebezem, M. (2005) New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 435-463.

Horvath, P., Romero, D.A., Coute-Monvoisin, A.C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C., and Barrangou, R. (2008) Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology* **190**: 1401-1412.

Howell, A., Dubrac, S., Andersen, K.K., Noone, D., Fert, J., Msadek, T., and Devine, K. (2003) Genes controlled by the essential YycG/YycF two-component system of *Bacillus subtilis* revealed through a novel hybrid regulator approach. *Molecular Microbiology* **49**: 1639-1655.

Hutkins, R., Morris, H.A., and McKay, L.L. (1985) Galactokinase Activity in *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 777-780.

Ibrahim, M., Nicolas, P., Bessieres, P., Bolotin, A., Monnet, V., and Gardan, R. (2007) A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci. *Microbiology* **153**: 3631-3644.

Ibrahim, Y.M., Kerr, A.R., McCluskey, J., and Mitchell, T.J. (2004) Role of HtrA in the virulence and competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity* **72**: 3584-3591.

Idigoras, P., Valiente, A., Iglesias, L., Trieu-Cuot, P., and Poyart, C. (2001) Meningitis due to *Streptococcus salivarius*. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 3017-3017.

Ireton, K., Rudner, D.Z., Siranosian, K.J., and Grossman, A.D. (1993) Integration of Multiple Developmental Signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A Transcription Factor. *Genes & Development* **7**: 283-294.

Ishikawa, S., Core, L., and Perego, M. (2002) Biochemical characterization of aspartyl phosphate phosphatase interaction with a phosphorylated response regulator and its inhibition by a pentapeptide. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 20483-20489.

Ji, G.Y., Beavis, R.C., and Novick, R.P. (1995) Cell density control of staphylococcal virulence mediated by an octapeptide pheromone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 12055-12059.

Ji, G.Y., Beavis, R., and Novick, R.P. (1997) Bacterial interference caused by autoinducing peptide variants. *Science* **276**: 2027-2030.

Jiang, M., Shao, W.L., Perego, M., and Hoch, J.A. (2000) Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **38**: 535-542.

Jiang, S.M., Ishmael, N., Hotopp, J.D., Puliti, M., Tissi, L., Kumar, N., Cieslewicz, M.J., Tettelin, H., and Wesselsl, M.R. (2008) Variation in the group B *Streptococcus* CsrRS regulon and effects on pathogenicity. *Journal of Bacteriology* **190**: 1956-1965.

Johnsborg, O., and Havarstein, L.S. (2009) Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Reviews* **33**: 627-642.

Juillard, V., Desmazeaud, M.J., and Spinnler, H.E. (1988) Demonstration of Urease Activity in *Streptococcus thermophilus*. *Canadian Journal of Microbiology* **34**: 818-822.

Kawamura, Y., Hou, X.-G., Sultana, F., Miura, H., and Ezaki, T. (1995) Determination of 16 S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int J Syst Bacteriol* **45**: 406 - 408.

Khorchid, A., and Ikura, M. (2006) Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **38**: 307-312.

Kim, D.-j., and Forst, S. (2001) Genomic analysis of the histidine kinase family in bacteria and archaea. *Microbiology* **147**: 1197-1212.

Kim, S., Hirakawa, H., Muta, S., and Kuhara, S. (2010) Identification and classification of a two-component system based on domain structures in bacteria and differences in domain structure between Gram-Positive and Gram-Negative bacteria. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **74**: 716-720.

Kirby, J.R. (2009) Chemotaxis-like regulatory systems: Unique roles in diverse bacteria. *Annual Review of Microbiology* **63**: 45-59.

Kizy, A.E., and Neely, M.N. (2009) First *Streptococcus pyogenes* signature-tagged mutagenesis screen identifies novel virulence determinants. *Infection and Immunity* **77**: 1854-1865.

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

Kleerebezem, M., Bongers, R., Rutten, G., Vos, W.M.d., and Kuipers, O.P. (2004) Autoregulation of subtilin biosynthesis in *Bacillus subtilis*: the role of the spa-box in subtilin-responsive promoters. *Peptides* **25**: 1415-1424.

Klenk, M., Koczan, D., Guthke, R., Nakata, M., Thiesen, H.J., Podbielski, A., and Kreikemeyer, B. (2005) Global epithelial cell transcriptional responses reveal *Streptococcus pyogenes* Fas regulator activity association with bacterial aggressiveness. *Cellular Microbiology* **7**: 1237-1250.

Kox, L.F.F., Wosten, M., and Groisman, E.A. (2000) A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *Embo Journal* **19**: 1861-1872.

Kreikemeyer, B., Boyle, M., Buttaro, B., Heinemann, M., and Podbielski, A. (2001) Group A streptococcal growth phase-associated virulence factor regulation by a novel operon (Fas) with homologies to two-component-type regulators requires a small RNA molecule. *Molecular Microbiology* **39**: 392 - 406.

Kwon, D.H., and Lu, C.D. (2006) Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**: 1615-1622.

Lamy, M.C., Zouine, M., Fert, J., Vergassola, M., Couve, E., Pellegrini, E., Glaser, P., Kunst, F., Msadek, T., Trieu-Cuot, P., and Poyart, C. (2004) CovS/CovR of group B *streptococcus*: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Molecular Microbiology* **54**: 1250-1268.

Laub, M.T., and Goulian, M. (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual Review of Genetics* **41**: 121-145.

Leday, T.V., Gold, K.M., Kinkel, T.L., Roberts, S.A., Scott, J.R., and McIver, K.S. (2008) TrxR, a new CovR-repressed response regulator that activates the Mga virulence regulon in group A *streptococcus*. *Infection and Immunity* **76**: 4659-4668.

Lee, A.I., Delgado, A., and Gunsalus, R.P. (1999) Signal-dependent phosphorylation of the membrane-bound NarX two-component sensor-transmitter protein of *Escherichia coli*: Nitrate elicits a superior anion ligand response compared to nitrite. *Journal of Bacteriology* **181**: 5309-5316.

Lee, S.F., Delaney, G.D., and Elkhateeb, M. (2004) A two-component covRS regulatory system regulates expression of fructosyltransferase and a novel extracellular carbohydrate in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **72**: 3968-3973.

Lemos, J.A., Lin, V.K., Nascimento, M.M., Abranches, J., and Burne, R.A. (2007) Three gene products govern (p)ppGpp production by *Streptococcus mutans*. *Molecular Microbiology* **65**: 1568-1581.

Lemos, J.A., and Burne, R.A. (2008) A model of efficiency: stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiology* **154**: 3247-3255.

Lenz, O., and Friedrich, B. (1998) A novel multicomponent regulatory system mediates H-2 sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 12474-12479.

Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Schwartz, E., and Friedrich, B. (2002) The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **4**: 255-262.

Letort, C., and Juillard, V. (2001) Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology* **91**: 1023-1029.

Letort, C., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V., and Juillard, V. (2002) Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3162-3165.

Levesque, C.M., Mair, R.W., Perry, J.A., Lau, P.C., Li, Y.H., and Cvitkovitch, D.G. (2007) Systemic inactivation and phenotypic characterization of two-component systems in expression of *Streptococcus mutans* virulence properties. *Lett Appl Microbiol* **45**: 398-404.

Levin, J.C., and Wessels, M.R. (1998) Identification of csrR/csrS, a genetic locus that regulates hyaluronic acid capsule synthesis in group A *Streptococcus*. *Molecular Microbiology* **30**: 209-219.

Li, Y.H., Lau, P.C., Tang, N., Svensater, G., Ellen, R.P., and Cvitkovitch, D.G. (2002) Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* **184**: 6333-6342.

Liarzi, O., Barak, R., Bronner, V., Dines, M., Sagi, Y., Shainskaya, A., and Eisenbach, M. (2010) Acetylation represses the binding of CheY to its target proteins. *Molecular Microbiology* **76**: 932-943.

Lin, W.-J., Walthers, D., Connelly, J.E., Burnside, K., Jewell, K.A., Kenney, L.J., and Rajagopal, L. (2009) Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B *Streptococcus* response regulator CovR. *Molecular Microbiology* **71**: 1477-1495.

Liu, M.J., Siezen, R.J., and Nauta, A. (2009) In Silico prediction of horizontal gene transfer events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* reveals prtocooperation in yogurt manufacturing. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 4120-4129.

Liu, Y., and Burne, R. (2009) Multiple two-component systems of *Streptococcus mutans* regulate agmatine deiminase gene expression and stress tolerance. *Journal of Bacteriology* **191**: 7363 - 7366.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta CT) Method. *Methods* **25**: 402-408.

Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, S., and Gruss, A. (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* **178**: 931-935.

Majdalani, N., and Gottesman, S. (2005) The Rcs phosphorelay: A complex signal transduction system. *Annual Review of Microbiology* **59**: 379-405.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchine, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., and Mills, D. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 15611-15616.

Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I., Tatusov, R.L., Minton, K.W., Koonin, E.V., and Daly, M.J. (2001) Genome of the extremely radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans* viewed from the perspective of comparative genomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**: 44-+.

Mansilla, M.C., Cybulski, L.E., Albanesi, D., and de Mendoza, D. (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *Journal of Bacteriology* **186**: 6681-6688.

Mansilla, M.C., and de Mendoza, D. (2005) The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. *Archives of Microbiology* **183**: 229-235.

Marijuán, P.C., Navarro, J., and del Moral, R. (2010) On prokaryotic intelligence: Strategies for sensing the environment. *Biosystems* **99**: 94-103.

Martin, B., Granadel, C., Campo, N., Henard, V., Prudhomme, M., and Claverys, J.P. (2010) Expression and maintenance of ComD-ComE, the two-component signal-transduction system that controls competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **75**: 1513-1528.

Martin, V., Kleschyov, A.L., Klein, J.P., and Beretz, A. (1997) Induction of nitric oxide production by polyosides from the cell walls of *Streptococcus mutans* OMZ 175, a gram-positive bacterium, in the rat aorta. *Infection and Immunity* **65**: 2074-2079.

Martinez-Hackert, E., and Stock, A. (1997) Structural relationships in the OmpR family of winged-helix transcription factors. *J Mol Biol* **269**: 301 - 312.

Martirani, L., Raniello, R., Naclerio, G., Ricca, E., and De Felice, M. (2001) Identification of the DNA-binding protein, HrcA, of *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiology Letters* **198**: 177-182.

Mascher, T., Zahner, D., Merai, M., Balmelle, N., de Saizieu, A.B., and Hakenbeck, R. (2003) The *Streptococcus pneumoniae* cia regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *Journal of Bacteriology* **185**: 60-70.

Mascher, T. (2006) Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **264**: 133-144.

Mascher, T., Heintz, M., Zahner, D., Merai, M., and Hakenbeck, R. (2006a) The CiaRH system of *Streptococcus pneumoniae* prevents lysis during stress induced by treatment with cell wall inhibitors and mutations in pbp2x involved in beta-lactam resistance. *Journal of Bacteriology* **188**: 1959 - 1978.

Mascher, T., Helmann, J.D., and Unden, G. (2006b) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 910-+.

Matsumoto-Nakano, M., Fujita, K., and Ooshima, T. (2007) Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* **22**: 30-35.

McAnulla, C., Edwards, A., Sanchez-Contreras, M., Sawers, R.G., and Downie, J.A. (2007) Quorum-sensing-regulated transcriptional initiation of plasmid transfer and replication genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Microbiology* **153**: 2074-2082.

McAuliffe, O., Ross, R.P., and Hill, C. (2001) Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 285-308.

Michaylova, M., Minkova, S., Kimura, K., Sasaki, T., and Isawa, K. (2007) Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. *FEMS Microbiology Letters* **269**: 160-169.

Miller, S.I., Pulkkinen, W.S., Selsted, M.E., and Mekalanos, J.J. (1990) Characterization of Defensin resistance phenotypes associated with mutations in the Phop-virulence regulon of *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity* **58**: 3706-3710.

Mitrophanov, A.Y., Churchward, G., and Borodovsky, M. (2007) Control of *Streptococcus pyogenes* virulence: Modeling of the CovR/S signal transduction system. *Journal of Theoretical Biology* **246**: 113-128.

Mitrophanov, A.Y., and Groisman, E.A. (2008) Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes & Development* **22**: 2601-2611.

Molle, V., Fujita, M., Jensen, S.T., Eichenberger, P., Gonzalez-Pastor, J.E., Liu, J.S., and Losick, R. (2003) The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **50**: 1683-1701.

Monnet, C., Pernoud, S., Sepulchre, A., Fremaux, C., and Corrieu, G. (2004) Selection and properties of *Streptococcus thermophilus* mutants deficient in urease. *Journal of Dairy Science* **87**: 1634-1640.

Mora, D., Maguin, E., Masiero, M., Parini, C., Ricci, G., Manachini, P.L., and Daffonchio, D. (2004) Characterization of urease genes cluster of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 209-219.

Morfeldt, E., Taylor, D., Vongabain, A., and Arvidson, S. (1995) Activation of apha-toxin translation in *Staphylococcus aureus* by the trans-encoded antisense Rna, RnaIII. *Embo Journal* **14**: 4569-4577.

Morfeldt, E., Tegmark, K., and Arvidson, S. (1996) Transcriptional control of the agr-dependent virulence gene regulator, RNAIII, in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology* **21**: 1227-1237.

Moschioni, M., Pansegrau, W., and Barocchi, M.l.A. (2010) Adhesion determinants of the *Streptococcus* species. *Microbial Biotechnology* **3**: 370-388.

Murphy, J.N., and Saltikov, C.W. (2009) The ArsR repressor mediates arsenite-dependent regulation of arsenate respiration and detoxification operons of *Shewanella* sp Strain ANA-3. *Journal of Bacteriology* **191**: 6722-6731.

Musser, J.M., and DeLeo, F.R. (2005) Toward a genome wide systems biology analysis of host-pathogen interactions in group A *Streptococcus*. *The American Journal of Pathology* **167**: 1461-1472.

Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S., and Ooshima, T. (2005) Role of glucose side chains with serotype-specific polysaccharide in the cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Caries Research* **39**: 262-268.

Nakano, K., Nomura, R., Matsumoto, M., and Ooshima, T. (2010) Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases - From molecular mechanisms to clinical cases: Cell-surface structures of novel serotype k *Streptococcus mutans* strains and their correlation to virulence. *Journal of Pharmacological Sciences* **113**: 120-125.

Navarre, W.W., Halsey, T.A., Walthers, D., Frye, J., McClelland, M., Potter, J.L., Kenney, L.J., Gunn, J.S., Fang, F.C., and Libby, S.J. (2005) Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Molecular Microbiology* **56**: 492-508.

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

Nomura, R., Nakano, K., and Ooshima, T. (2005) Molecular analysis of the genes involved in the biosynthesis of serotype specific polysaccharide in the novel serotype k strains of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology* **20**: 303-309.

Noriega, C.E., Lin, H.Y., Chen, L.L., Williams, S.B., and Stewart, V. (2010) Asymmetric cross-regulation between the nitrate-responsive NarX-NarL and NarQ-NarP two-component regulatory systems from *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology* **75**: 394-412.

Novick, R.P., Ross, H.F., Projan, S.J., Kornblum, J., Kreiswirth, B., and Moghazeh, S. (1993) Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *Embo Journal* **12**: 3967-3975.

Novick, R.P., Projan, S.J., Kornblum, J., Ross, H.F., Ji, G., Kreiswirth, B., Vandenesch, F., and Moghazeh, S. (1995) The Agr P2 Operon - An autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Molecular & General Genetics* **248**: 446-458.

Novick, R.P., and Geisinger, E. (2008) Quorum Sensing in *staphylococci*. *Annual Review of Genetics* **42**: 541-564.

O'Connell-Motherway, M., van Sinderen, D., Morel-Deville, F., Fitzgerald, G.F., Ehrlich, S.D., and Morel, P. (2000) Six putative two-component regulatory systems isolated from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Microbiology* **146 (Pt 4)**: 935-947.

Ohki, R., Giyanto, Tateno, K., Masuyama, W., Moriya, S., Kobayashi, K., and Ogasawara, N. (2003) The BceRS two-component regulatory system induces expression of the bacitracin transporter, BceAB, in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **49**: 1135-1144.

Ohlsen, K.L., Grimsley, J.K., and Hoch, J.A. (1994) Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 1756-1760.

Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B.L., Mori, H., and Mizuno, T. (2002) Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology* **46**: 281-291.

Ouyang, J., Tian, X.-L., Versey, J., Wishart, A., and Li, Y.-H. (2010) The BceABRS four-component system regulates bacitracin-induced cell envelope stress response in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob. Agents Chemother.*: AAC.01802-01809.

Paterson, G.K., Blue, C.E., and Mitchell, T.J. (2006) Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol* **55**: 355-363.

Patton, G.C., and van der Donk, W.A. (2005) New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current Opinion in Microbiology* **8**: 543-551.

Pavlovic, G., Burrus, V., Gintz, B., Decaris, B., and Guedon, G. (2004) Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICESt1-related elements from *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology-Sgm* **150**: 759-774.

Perego, M. (1997) A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 8612-8617.

Perego, M. (2001) A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **42**: 133-143.

Perrin, C., Guimont, C., Bracquart, P., and Gaillard, J.L. (1999) Expression of a new cold shock protein of 21.5 kDa and of the major cold shock protein by *Streptococcus thermophilus* after cold shock. *Current Microbiology* **39**: 342-347.

Perry, J.A., Levesque, C.M., Suntharaligam, P., Mair, R.W., Bu, M., Cline, R.T., Peterson, S.N., and Cvitkovitch, D.G. (2008) Involvement of *Streptococcus mutans* regulator RR11 in oxidative stress response during biofilm growth and in the development of genetic competence. *Lett Appl Microbiol* **47**: 439-444.

Piggot, P.J., and Hilbert, D.W. (2004) Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology* **7**: 579-586.

Ponting, C.P., and Aravind, L. (1997) PAS: a multifunctional domain family comes to light. *Current Biology* **7**: R674-R677.

Pospiech, A., and Neumann, B.r. (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from Gram-positive bacteria. *Trends in Genetics* **11**: 217-218.

Potrykus, K., and Cashel, M. (2008) (p)ppGpp: Still Magical? *Annual Review of Microbiology* **62**: 35-51.

Purcell, E.B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D.C., Fiebig, A., and Crosson, S. (2007) A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18241-18246.

Purcell, E.B., and Crosson, S. (2008) Photoregulation in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology Cell Regulation* **11**: 168-178.

Qi, F.X., Chen, P., and Caufield, P.W. (1999) Functional analyses of the promoters in the lantibiotic mutacin II biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 652-658.

Qi, F.X., Merritt, J., Lux, R., and Shi, W.Y. (2004) Inactivation of the ciaH gene in *Streptococcus mutans* diminishes mutacin production and competence development, alters sucrose-dependent biofilm formation, and reduces stress tolerance. *Infection and Immunity* **72**: 4895-4899.

Rabin, R.S., and Stewart, V. (1993) Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology* **175**: 3259-3268.

Ratnayake-Lecamwasam, M., Serror, P., Wong, K.W., and Sonenshein, A.L. (2001) *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes & Development* **15**: 1093-1103.

Rawlinson, E.L.A., Nes, I.F., and Skaugen, M. (2002) LasX, a transcriptional regulator of the lactocin S biosynthetic genes in *Lactobacillus sakei* L45, acts both as an activator and a repressor. *Biochimie* **84**: 559-567.

Rhee, S., Martin, R.G., Rosner, J.L., and Davies, D.R. (1998) A novel DNA-binding motif in MarA: The first structure for an AraC family transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 10413-10418.

Rietkotter, E., Hoyer, D., and Mascher, T. (2008) Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **68**: 768-785.

Risoen, P.A., Brurberg, M.B., Eijsink, V.G.H., and Nes, I.F. (2000) Functional analysis of promoters involved in quorum sensing-based regulation of bacteriocin production in *Lactobacillus*. *Molecular Microbiology* **37**: 619-628.

Rizzotti, L., La Gioia, F., Dellaglio, F., and Torriani, S. (2009) Characterization of Tetracycline-Resistant *Streptococcus thermophilus* Isolates from Italian Soft Cheeses. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 4224-4229.

Rong Gao, Y.T., Ann M. Stock. (2008) System-level mapping of *Escherichia coli* response regulator dimerization with FRET hybrids. *Molecular Microbiology* **69**: 1358-1372.

Rowland, S.L., Burkholder, W.F., Cunningham, K.A., Maciejewski, M.W., Grossman, A.D., and King, G.F. (2004) Structure and mechanism of action of Sda, an inhibitor of the histidine kinases that regulate initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Cell* **13**: 689-701.

Rul, F., and Monnet, V. (1997) Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied Microbiology* **82**: 695-704.

Rul, F., Ben-Yahia, L., Chegdani, F., Wrzosek, L., Thomas, S., Noordine, M.-L., Gitton, C., Cherbuy, C., Langella, P., and Thomas, M. (2011) Impact of the metabolic activity of *Streptococcus thermophilus* on the colon epithelium of gnotobiotic rats. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 10288-10296.

Saini, D.K., Malhotra, V., and Tyagi, J.S. (2004) Cross talk between DevS sensor kinase homologue, Rv2027c, and DevR response regulator of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Letters* **565**: 75-80.

Salim, K.Y., de Azavedo, J.C., Bast, D.J., and Cvitkovitch, D.G. (2008) Regulation of sagA, siaA and scpC by SilCR, a putative signaling peptide of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiology Letters* **289**: 119-125.

Sanders, J.W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J.R., Venema, G., and Kok, J. (1998) A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Molecular Microbiology* **27**: 299-310.

Santi, I., Grifantini, R., Jiang, S.M., Brettoni, C., Grandi, G., Wessels, M.R., and Soriani, M. (2009) CsrRS regulates group B *Streptococcus* virulence gene expression in response to environmental pH: A new perspective on vaccine development. *Journal of Bacteriology* **191**: 5387-5397.

Saravia-Otten, P., Muller, H.P., and Arvidson, S. (1997) Transcription of *Staphylococcus aureus* fibronectin binding protein genes is negatively regulated by agr and an agr-independent mechanism. *Journal of Bacteriology* **179**: 5259-5263.

Sebert, M., Patel, K., Plotnick, M., and Weiser, J. (2005) Pneumococcal HtrA protease mediates inhibition of competence by the CiaRH two-component signaling system. *Journal of Bacteriology* **187**: 3969 - 3979.

Seki, M., Yamashita, Y., Shibata, Y., Torigoe, H., Tsuda, H., and Maeno, M. (2006) Effect of mixed *mutans* streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiology and Immunology* **21**: 47-52.

Senadheera, D., Krastel, K., Mair, R., Persadmehr, A., Abranches, J., Burne, R.A., and Cvitkovitch, D.G. (2009) Inactivation of VicK affects acid production and acid survival of *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* **191**: 6415-6424.

Shelburne, S.A., Sumby, P., Sitkiewicz, I., Granville, C., DeLeo, F.R., and Musser, J.M. (2005) Central role of a bacterial two-component gene regulatory system of previously unknown function in pathogen persistence in human saliva. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 16037-16042.

Shi, Y.X., Cromie, M.J., Hsu, F.F., Turk, J., and Groisman, E.A. (2004) PhoP-regulated *Salmonella* resistance to the antimicrobial peptides magainin 2 and polymyxin B. *Molecular Microbiology* **53**: 229-241.

Shibata, Y., Yamashita, Y., and van der Ploeg, J.R. (2009) The serotype-specific glucose side chain of rhamnose-glucose polysaccharides is essential for adsorption of bacteriophage M102 to *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters* **294**: 68-73.

Sidote, D.J., Barbieri, C.M., Wu, T., and Stock, A.M. (2008) Structure of the *Staphylococcus aureus* AgrA LytTR domain bound to DNA reveals a beta fold with an unusual mode of binding. *Structure* **16**: 727-735.

Sieuwerts, S., Molenaar, D., van Hijum, S., Beerthuyzen, M., Stevens, M.J.A., Janssen, P.W.M., Ingham, C.J., de Bok, F.A.M., de Vos, W.M., and Vlieg, J. (2010) Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 7775-7784.

Sitkiewicz, I., and Musser, J.M. (2006) Expression microarray and mouse virulence analysis of four conserved two-component gene regulatory systems in group A *Streptococcus*. *Infect Immun* **74**: 1339-1351.

Skaugen, M., Andersen, E.L., Christie, V.H., and Nes, I.F. (2002) Identification, characterization, and expression of a second, bicistronic, operon involved in the production of lactocin S in *Lactobacillus sakei* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 720-727.

Soell, M., Lett, E., Holveck, F., Scholler, M., Wachsmann, D., and Klein, J.P. (1995) Activation of human monocytes by streptococcal rhamnose glucose polymers is mediated by CD14 antigen, and mannan-binding protein inhibits Tnf-alpha release. *Journal of Immunology* **154**: 851-860.

Spiro, S., and Guest, J.R. (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **75**: 399-428.

Staron, A., Finkeisen, D.E., and Mascher, T. (2011) Peptide antibiotic sensing and detoxification modules of *Bacillus subtilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 515-525.

Stephenson, K., and Hoch, J.A. (2001) PAS- A domain of phosphorelay sensor kinase A: A catalytic ATP-binding domain involved in the initiation of development in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 15251-15256.

Stephenson, S., Mueller, C., Jiang, M., and Perego, M. (2003) Molecular analysis of Phr peptide processing in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **185**: 4861-4871.

Stipp, R.N., Goncalves, R.B., Hofling, J.F., Smith, D.J., and Mattos-Graner, R.O. (2008) Transcriptional analysis of gtfB, gtfC, and gbpB and their putative response regulators in several isolates of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* **23**: 466-473.

Stock, A.M., Robinson, V.L., and Goudreau, P.N. (2000) Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* **69**: 183-215.

Sugareva, V., Arlt, R., Fiedler, T., Riani, C., Podbielski, A., and Kreikemeyer, B. (2010) Serotype- and strain- dependent contribution of the sensor kinase CovS of the CovRS two-component system to *Streptococcus pyogenes* pathogenesis. *BMC Microbiology* **10**: 34.

Sulavik, M.C., Tardif, G., and Clewell, D.B. (1992) Identification of a gene, Rgg, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of *Streptococcus gordonii* Challis. *Journal of Bacteriology* **174**: 3577-3586.

Sulavik, M.C., and Clewell, D.B. (1996) Rgg is a positive transcriptional regulator of the *Streptococcus gordonii gtfG* gene. *Journal of Bacteriology* **178**: 5826-5830.

Sumby, P., Whitney, A.R., Graviss, E.A., Deleo, F.R., and Musser, J.M. (2006) Genome-wide analysis of group A streptococci reveals a mutation that modulates global phenotype and disease specificity. *Plos Pathogens* **2**: 41-49.

Sun, Z., Chen, X., Wang, J., Zhao, W., Shao, Y., Wu, L., Zhou, Z., Sun, T., Wang, L., Meng, H., Zhang, H., and Chen, W. (2011) Complete Genome Sequence of *Streptococcus thermophilus* Strain ND03. *Journal of Bacteriology* **193**: 793-794.

Suntharalingam, P., Senadheera, M.D., Mair, R.W., Levesque, C.M., and Cvitkovitch, D.G. (2009) The LiaFSR System Regulates the Cell Envelope Stress Response in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* **191**: 2973-2984.

Szurmant, H., Fukushima, T., and Hoch, J.A. (2007a) The essential YycFG two-component system of *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* **422**: 396-417.

Szurmant, H., Mohan, M.A., Imus, P.M., and Hoch, J.A. (2007b) YycH and YycI interact to regulate the essential YycFG two-component system in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **189**: 3280-3289.

Tabasco, R., Garcia-Cayuela, T., Pelaez, C., and Requena, T. (2009) *Lactobacillus acidophilus* La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **132**: 109-116.

Thoendel, M., and Horswill, A.R. (2009) Identification of *Staphylococcus aureus* AgrD residues required for autoinducing peptide biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **284**: 21828-21838.

Thomas, S., Besset, C., Courtin, P., and Rul, F. (2010) The role of aminopeptidase PepS in the growth of *Streptococcus thermophilus* is not restricted to nitrogen nutrition. *Journal of Applied Microbiology* **108**: 148-157.

Throup, J.P., Koretke, K.K., Bryant, A.P., Ingraham, K.A., Chalker, A.F., Ge, Y., Marra, A., Wallis, N.G., Brown, J.R., Holmes, D.J., Rosenberg, M., and Burnham, M.K. (2000) A genomic analysis of two-component signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **35**: 566-576.

Trevino, J., Perez, N., Ramirez-Pena, E., Liu, Z., Shelburne, S.A., Musser, J.M., and Sumby, P. (2009) CovS simultaneously activates and inhibits the CovR-mediated repression of distinct subsets of group A *Streptococcus* virulence factor-encoding genes. *Infection and Immunity* **77**: 3141-3149.

Trieu-Cuot, P., and Courvalin, P. (1983) Nucleotide-Sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'5'-Aminoglycoside phosphotransferase type III. *Gene* **23**: 331-341.

Tsuda, H., Yamashita, Y., Toyoshima, K., Yamaguchi, N., Oho, T., Nakano, Y., Nagata, K., and Koga, T. (2000) Role of serotype-specific polysaccharide in the resistance of *Streptococcus mutans* to phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity* **68**: 644-650.

Tsuda, H., Yamashita, Y., Shibata, Y., Nakano, Y., and Koga, T. (2002) Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 3756-3764.

Tyson, K.L., Cole, J.A., and Busby, S.J.W. (1994) Nitrite and nitrate regulation at the promoters of 2 *Escherichia coli* operons encoding nitrite reductase - Identification of common target heptamers for both NarP-dependent and NarL-dependent regulation. *Molecular Microbiology* **13**: 1045-1055.

Ulijasz, A.T., Andes, D.R., Glasner, J.D., and Weisblum, B. (2004) Regulation of iron transport in *Streptococcus pneumoniae* by RitR, an orphan response regulator. *Journal of Bacteriology* **186**: 8123-8136.

Ulijasz, A.T., Falk, S.P., and Weisblum, B. (2009) Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser/Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci. *Molecular Microbiology* **71**: 382-390.

Upton, M., Tagg, J.R., Wescombe, P., and Jenkinson, H.F. (2001) Intra- and interspecies signaling between *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus pyogenes* mediated by SalA and SalA1 lantibiotic peptides. *Journal of Bacteriology* **183**: 3931-3938.

Van de Guchte, M., Penaud, S., Grimaldi, C., Barbe, V., Bryson, K., Nicolas, P., Robert, C., Oztas, S., Mangenot, S., Couloux, A., Loux, V., Dervyn, R., Bossy, R., Bolotin, A., Batto, J.M., Walunas, T., Gibrat, J.F., Bessieres, P., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., and Maguin, E. (2006) The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 9274-9279.

Vandenesch, F. (1997) Régulation de l'expression des exoprotéines de *Staphylococcus aureus*. *Médecine et Maladies Infectieuses- Staphylococcus Aureus et sa Pathologie* **27**: 150-158.

Vernier, A., Diab, M., Soell, M., HaanArchipoff, G., Beretz, A., Wachsmann, D., and Klein, J.P. (1996) Cytokine production by human epithelial and endothelial cells following exposure to oral viridans streptococci involves lectin interactions between bacteria and cell surface receptors. *Infection and Immunity* **64**: 3016-3022.

Voyich, J.M., Sturdevant, D.E., Braughton, K.R., Kobayashi, S.D., Lei, B.F., Virtaneva, K., Dorward, D.W., Musser, J.M., and DeLeo, F.R. (2003) Genome-wide protective response used by group A *Streptococcus* to evade destruction by human polymorphonuclear leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 1996-2001.

Wadhams, G.H., and Armitage, J.P. (2004) Making sense of it all: Bacterial chemotaxis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**: 1024-1037.

Wang, L., Xu, G., Chen, H., Zhao, Y., Xu, N., Tian, B., and Hua, Y. (2008) DrRRA: a novel response regulator essential for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans*. *Molecular Microbiology* **67**: 1211-1222.

Wang, W., Shu, D., Chen, L., Jiang, W., and Lu, Y. (2009) Cross-talk between an orphan response regulator and a noncognate histidine kinase in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiology Letters* **294**: 150-156.

Watts, K.J., Taylor, B.L., and Johnson, M.S. (2011) PAS/poly-HAMP signalling in Aer-2, a soluble haem-based sensor. *Molecular Microbiology* **79**: 686-699.

Whitworth, D.E., and Cock, P.J.A. (2008) Two-component systems of the myxobacteria: structure, diversity and evolutionary relationships. *Microbiology-Sgm* **154**: 360-372.

Williams, S.B., and Stewart, V. (1997) Nitrate- and nitrite-sensing protein NarX of *Escherichia coli* K-12: Mutational analysis of the amino-terminal tail and first transmembrane segment. *Journal of Bacteriology* **179**: 721-729.

Winkler, M.E., and Hoch, J.A. (2008) Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* **190**: 2645-2648.

Wright, J.D., and Holland, K.T. (2003) The effect of cell density and specific growth rate on accessory gene regulator and toxic shock syndrome toxin-1 gene expression in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* **218**: 377-383.

Wu, C., Ayala, E., Downey, J., Merritt, J., Goodman, S., and Qi, F. (2010) Regulation of ciaXRH operon expression and identification of the CiaR regulon in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* **192**: 4669 - 4679.

Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1997) Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in Biochemical Sciences* **22**: 172-176.

Xie, L.L., and van der Donk, W.A. (2004) Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology* **8**: 498-507.

Zafar, N. (2003) Effect of an orphan response regulator on *Streptococcus mutans* sucrose-dependent adherence and cariogenesis. *Infection and Immunity* **71**: 4351-4360.

Zeng, L., Wen, Z.Z.T., and Burne, R.A. (2006) A novel signal transduction system and feedback loop regulate fructan hydrolase gene expression in *Streptococcus mutans*. *Molecular Microbiology* **62**: 187-200.

Zeng, L., and Burne, R.A. (2008) Multiple sugar: phosphotransferase system permeases participate in catabolite modification of gene expression in *Streptococcus mutans*. *Molecular Microbiology* **70**: 197-208.

Zhang, Y., Lei, Y., Khammanivong, A., and Herzberg, M.C. (2004) Identification of a novel two-component system in *Streptococcus gordonii* V288 involved in biofilm formation. *Infect. Immun.* **72**: 3489-3494.

Zhang, Y., Whiteley, M., Kreth, J., Lei, Y., Khammanivong, A., Evavold, J.N., Fan, J., and Herzberg, M.C. (2009) The two-component system BfrAB regulates expression of ABC transporters in *Streptococcus gordonii* and *Streptococcus sanguinis*. *Microbiology* **155**: 165-173.

Zotta, T., Asterinou, K., Rossano, R., Ricciardi, A., Varcamonti, M., and Parente, E. (2009) Effect of inactivation of stress response regulators on the growth and survival of *Streptococcus thermophilus* Sfi39. *International Journal of Food Microbiology* **129**: 211-220.

Annexe 1: Souches bactériennes et plasmides utilisés

Souche bactérienne ou plasmide	Propriétés	Source ou référence
Souches		
S. thermophilus		
LMD-9	wild-type	(Makarova *et al*., 2006)
Δ*rr06*	LMD-9 Δ*rr06*	(Thevenard *et al*., en reviewing)
Δ*hk06*Δ*rr06*	LMD-9Δ*hk06*Δ*rr06*	cette étude
Δ*ster_1289*Δ*ppp1290*	LMD-9Δ*ster_1289*Δ*ppp1290*	cette étude
Δ*ster_1294*Δ*ster_1295*	LMD-9Δ*ster_1289*Δ*ppp1290*	cette étude
Δ*ABCt*	LMD-9 *ster_1292,1293* ::erm	cette étude
LMD-9 (P1)	*blp*::P*ster_1295-luxAB*	cette étude
LMD-9 (P2)	*blp*::P*ster_1291-luxAB*	cette étude
LMD-9 (P3)	*blp*::P*ppp1290-luxAB*	cette étude
Δ*rr06* (P1)	*blp*::P*ster_1295-luxAB*	cette étude
Δ*rr06* (P2)	*blp*::P*ster_1291-luxAB*	cette étude
Δ*rr06* (P3)	*blp*::P*ppp1290-luxAB*	cette étude
Δ*hk06*Δ*rr06* (P1)	*blp*::P*ster_1295-luxAB*	cette étude
Δ*hk06*Δ*rr06* (P2)	*blp*::P*ster_1291-luxAB*	cette étude
Δ*hk06*Δ*rr06* (P3)	*blp*::P*ppp1290-luxAB*	cette étude
Δ*ster_1289*Δ*ppp1290* (P1)	*blp*::P*ster_1295-luxAB*	cette étude
Δ*ster_1289*Δ*ppp1290* (P2)	*blp*::P*ster_1291-luxAB*	cette étude
Δ*ster_1289*Δ*ppp1290* (P3)	*blp*::P*ppp1290-luxAB*	cette étude
Δ*ster_1294*Δ*ster_1295* (P1)	*blp*::P*ster_1295-luxAB*	cette étude
Δ*ster_1294*Δ*ster_1295* (P2)	*blp*::P*ster_1291-luxAB*	cette étude
Δ*ster_1294*Δ*ster_1295* (P3)	*blp*::P*ppp1290-luxAB*	cette étude
E. coli		
TG1RepA$^+$	dérivé de TG1 avec le gene *repA* intégré dans le chromosome	(Gibson, 1984)
Plasmide		
pG$^+$host9	Thermosensitive plasmid, Ery^r	(Biswas *et al*., 1993)
pJUD *blp* ::*luxAB* ::*aphA3* (pJUD-kana)	Plasmide à origine de réplication thermosensible. Permet la construction d'une fusion transcriptionelle entre un promoteur d'intérêt et les gènes luxAB de *Photorhabdus luminescens*.	non publié

Annexe 2: Oligonucléotides utilisés pour la construction des mutants, des fusions transcriptionnelles et pour la RT-PCR quantitative

	Primers	Séquence (5'-3')
	Construction des mutants	
ΔRR06	*Fragment amont*	
	RR06Gfor	GCTAAGCTTATCTTTATGTCCATTTCCTTCC
	RR06Grev	CTTGAATTCACATTGACTGGTCTTCGG
	Fragment aval	
	RR06Dfor	TCCGAATTCAAAGAAAAAGACTGGTTGG
	RR06Drev	AATAGCGGCCGCCTCATCTAAAAAGAGCACC
ΔRR07	*Fragment amont*	
	RR07Gfor	CCGACTCGAGTTCCAAAATAGCACGACC
	RR07Grev	AATGAATTCTTCTTGACTTGTTGACGG
	Fragment aval	
	RR07Dfor	TCCGAATTCGAAAGGTGTCGGTTACG
	RR07Drev	AATAGCGGCCGCTCAATAGCCAACTTCTGC
ΔHK06ΔRR06	*Fragment amont*	
	HK06Gfor	GAACTCGAGTCAAGGGAAACTTATTAGGG
	HK06Grev	CTTGAATTCGGAAGACTAGGAAAATCAGAC
	Fragment aval	
	RR06Dfor	TCCGAATTCAAAGAAAAAGACTGGTTGG
	RR06Drev	AATAGCGGCCGCCTCATCTAAAAAGAGCACC
Δster_1289Δppp1290	*Fragment amont*	
	2PEPGfor	TAATCTCGAGCGAGCGACTCTTTGACC
	2PEPGrev	CTTGAATTCAATTTACCTACTTCTCCTCA
	Fragment aval	
	2PEPDfor	TCCGAATTCGCTTTATATCCTACATTCTGAG
	2PEPDrev	AATAGCGGCCGCCTATTCCCCTGTCTATCC
Δster_1295Δster_1294	*Fragment amont*	
	AM1295F	GAACTCGAGCTTTTAGCAAGAAGTGGTG
	AM1295R	CTTGAATTCATGAGATGACCTCTTTCG
	Fragmentaval	
	AV1294F	TCCGAATTCTATGGGTGTCTCAGTTGC
	AV1294R	AATAGCGGCCGCTAGGCTATCTAAAAGTGTC
	Construction des fusions transcriptionnelles	
Fusion P1	Prom95F-SpeI	CTAGACTAGTTCATTGGAAAGAGAATTGCC
	Prom95R-EcoR1	CTCGAATTCTTGATTTTCATGAGATGACCTC
Fusion P2	PromHKF-SpeI	CTAGACTAGTTGAACTTTATGGTTGCTATCC
	PromHKR-EcoRI	CTCGAATTCGTTCTAAACATGGTCACTTTCT
Fusion P3	Promp1290F-SpeI	CTAGACTAGTAACAAAGGTTGTTATAGTAA
	Promp1290R-EcoR1	CTCGAATTCAATTTAATCATAATGATAGAAAATT

Géne	RT-PCR quantitative	
STER_1295		
	951	TACCTTGTCTACGCTGTTATCG
	952	GCCAATAATCATGCCAAGATTTGAG
STER_1294		
	941	ATGAAACTATTGAAACTACTGAGCATC
	942	ACTGAGACACCCATAACACTG
STER_1293		
	931	CCTTTGTTCTCTGTCTTATTGGCA
	932	TGATGATTTCCCAAAAGCGTTGG
STER_1292		
	921	GCTATCGTCGGAAATATCG
	922	ACTCGGAAATGTGCTGAACC
HK06		
	911	CTGTCCGCTGAAAATGAACGC
	912	TACTGCTCCTTGTCCATCTG
RR06		
	06F	AGAGCGTTCCATCAGTGACCT
	06R	AAGGCGACACCTTCAACTAGC
STER_1289		
	891	TATTTTTAAGTGAAACTTCCTTGG
	892	GCGGTATATGGCACTG
gyrA		
	1256F	TCCCAGATGTTCGTGACGG
	1256R	ACGGGCAGATTTTTTATGAGGC
RR07		
	07F	GGAAATTCGGAAGGTCTCCAAGG
	07R	CACAAAGTCGTCCCCACCC
STER_1308		
	1308F	GATAAACCAACAGCAGGGCG
	1308R	TTTCACGACGGAAACTGGAAGC
STER_1299		
	1299F	GAAAAGAACTGGTATCACGCTC
	1299R	ATCTCCGTTCTACTAACTCAGA
STER_0656		
	656F	TGACAGACGAGAGAGGAACC
	656R	TGTAACCCTCTTACAGCACC
STER_1437		
	1437F	TAATCTTGGGTCGCTTTGTTCC
	1437R	CAAAATAGGGATTGCCTTCATGG
STER_1436		
	1436F	ATGTTCTGGGGGCTCGTACC
	1436R	GGAACTGACAGGCAGATCC
STER_1446		
	1446F	TGTCGGGACTCGTCGTGC
	1446R	GCCCCATCTACCAATTCCG
STER_1433		
	1433F	TTCCTTTTGGCGAGTTTGGC
	1433R	TAGAGTGTGGTATAATTCCCC
STER_1223		
	1223F	TCTTGGAGCATGGGTTGACC
	1223R	CGTTAGCAACACCACGAGGAAC
STER_0399		
	399F	CGGAGTTGATGGGTATTAGTG
	399R	AGACCAATGAGGACACCG
STER_0503		
	503F	ATTTTTCATCTGGTATCGGGGT
	503R	TAATAAAGGTTTGGCTGGTGC
STER_1627		
	1627F	GATTGCCATCGTGCGTGA
	1627R	TACTGGATTGACCCCTGC

RESUME

S. thermophilus est une bactérie lactique largement utilisé dans l'industrie laitière et, comme toute bactérie, doit s'adapter à des environnements variés tels que le lait, le yaourt et même le tractus digestif, après que le produit ait été ingéré. Les systèmes à deux composants (TCS) constituent un des mécanismes essentiels qu'utilisent les bactéries pour percevoir et s'adapter à des changements environnementaux. D'un point de vue structural, les TCS sont constitués de deux composants: un « senseur » ou protéine histidine kinase (HK) qui s'auto-phosphoryle en réponse à un stimulus puis transfère son groupement phosphate au « response regulator » (RR), le deuxième composant. Celui-ci se comporte alors le plus souvent comme un régulateur transcriptionnel permettant une réponse physiologique adaptée.

Afin de mieux comprendre ces phénomènes de régulation impliqués dans la réponse aux changements environnementaux, nous avons étudié la contribution de chacun des 8 TCS de *Streptococcus thermophilus* LMD-9 à son adaptation dans le lait.

Ainsi, des études transcriptionnelles effectuées sur des cultures en lait montrent que tous les RR sont exprimés, à des niveaux et profils d'expression différents. Nous avons noté en coculture avec *Lactobacillus bulgaricus*, le partenaire de *Streptococcus thermophilus* dans le yaourt, une induction de l'expression de 4 RR qui atteint, pour *rr02* et *rr09*, un facteur 6. Nous avons construit par ailleurs des mutants négatifs pour 7 des 8 RR de *S. thermophilus* et montré l'essentialité de RR05, un orthologue de YycF chez *B. subtilis* ou de or de WalR chez *S. aureus*. Pour les 7 autres mutants RR, l'absence d'un seul gène *rr* n'impacte pas suffisamment la croissance du streptocoque en lait.

Enfin, la détermination du régulon du TCS06 par des études post-génomiques a permis de montrer que ce système est impliqué dans la résistance à la bacitracine en modulant entre autres la voie de biosynthèse du polysaccharide à rhamnose (RGP).

ABSTRACT

The lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* is widely used in the dairy industry and, as a food bacterium, has to cope with changing environments such as milk, yogurt as well as the digestive tract, after the product has been ingested. Two-component systems (TCS), typically composed of a sensor kinase (HK) that detects a stimulus and of a response regulator (RR) which acts as a transcriptional regulator, are among the most prevalent means for bacteria to adapt to changing environments via fine-tune gene expression.

To get a more comprehensive view of the role of all two-component systems in *S. thermophilus* physiology, we have investigated the contribution of each *S. thermophilus* LMD-9 TCS to its fitness and adaptation to milk.

Transcriptomic studies (RT-qPCR) and construction of negative mutants of the *rr* genes were performed for LMD-9 *S. thermophilus* strain.

We have shown that all LMD-9 response regulators were expressed in milk, at different levels and with different profiles of expression during growth. In mixed culture with *Lactobacillus bulgaricus*, the *S. thermophilus* partner in yoghurt, the expression of four LMD-9 *rr* increased; for two of them, *rr02* and *rr09*, the increase reached a factor 6. These results indicate that *Lb. bulgaricus* induces regulatory changes in *S. thermophilus* and that *S. thermophilus* is able to adapt to these changes by probable fine tuning regulations. We constructed negative mutants for 7 out of 8 LMD-9 RRs and we showed that RR05 -an ortholog of *B. subtilis* YycF or *S. aureus* WalR- was essential for the optimum growth of *S. thermophilus*. For the 7 other RR, the absence of a single *rr* gene was not sufficient to notably impact the growth of LMD-9 in milk. The determination of the TCS06 regulon by post-genomics shows that TCS06 is involved in bacitracin resistance through the modulation of the rhamnose polysaccharide pathway.