UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

UMR1282 – Infectiologie et Santé Publique
Equipe Bactéries et Risque Materno-Foetal

THÈSE présentée par :

Anne-Emmanuelle ROUX

soutenue le : **25 novembre 2022**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Tours**

Discipline/ Spécialité : Biologie / Microbiologie

Rôle de la répression catabolique dans la physiologie et l'adaptation à l'hôte de *Streptococcus agalactiae*

THÈSE dirigée par :

Pr MEREGHETTI Laurent	PU-PH, Université de Tours
Dr CAMIADE Emilie	MCU, Université de Tours

RAPPORTEURS :

Pr GIARD Jean-Christophe	PU, Université de Caen Normandie
Dr MILOHANIC Eliane	CR, INRAE Jouy-en-Josas

PRESIDENT DE JURY :

Dr GERMON Pierre	DR, INRAE Val de Loire

JURY:

Dr CAMIADE Emilie	MCU, Université de Tours
Dr GERMON Pierre	DR, INRAE Val de Loire
Pr GIARD Jean-Christophe	PU, Université de Caen Normandie
Pr MEREGHETTI Laurent	PU-PH, Université de Tours
Dr MILOHANIC Eliane	CR, INRAE Jouy-en-Josas
Dr TAZI Asmaa	MCU-PH, Institut Cochin

MEMBRE INVITE :

Dr HERVE Virginie	MCU, Université de Tours

REMERCIEMENTS

Madame Eliane Milohanic et Monsieur Jean-Christophe Giard,

soyez vivement remerciés d'avoir accepté d'évaluer ce travail en tant que rapporteurs de thèses.

Madame Asmaa Tazi et Monsieur Pierre Germon,

je vous suis reconnaissante pour l'évaluation de cette thèse en tant qu'examinateurs.

Madame Virginie Hervé,

je vous remercie beaucoup pour votre participation à ce jury de thèse en tant qu'invité.

Laurent Mereghetti,

je vous remercie vivement d'avoir été mon directeur de thèse et de m'avoir accueillie au sein de l'équipe BRMF. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée.

Emilie Camiade,

je te remercie du fond du cœur pour le co-encadrement de ma thèse. Je suis profondément reconnaissante de tout ce que tu m'as appris autant sur le plan scientifique qu'humainement parlant. J'ai beaucoup apprécié ton soutien, ta patience, ton écoute, ton humour, ta bienveillance, ton enthousiasme, ta grande implication dans ma thèse ainsi que ta disponibilité malgré ton emploi du temps chargé et aussi… les cookies !! J'ai eu beaucoup de chance de travailler à tes côtés !

Mesdames Isabelle Martin-Verstraete, Véronique Monnet et Isabelle Virlogeux-Payant,

je vous remercie vivement pour l'intérêt que vous avez porté à mon sujet de thèse et pour vos précieux conseils donnés lors des mes comités de suivi de thèse.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des stagiaires qui ont largement contribué à ce travail : ceux qui ont travaillé sur le sujet avant mon arrivée, notamment Sylvie Robert et tous ceux qui m'ont aidé pendant ma thèse : Lisa Scillia, Maël Le Bris, Lisa Sachet, Romane Laffez. Un merci tout particulier à Mathilde Bastat pour ta bonne humeur et ta grande implication dans le sujet.

Je suis reconnaissante à tous les membres de l'INRAE et de l'université qui, d'une manière ou d'une autre, m'ont aidé pendant cette thèse. Je remercie particulièrement Anne di Tommaso pour son aide lors de la surexpression de protéines, Aude Remot et Emilie Doz-Deblauwe pour leurs conseils sur les expériences sur les macrophages et Lydie Nadal-Desbarats pour l'analyse RMN.

Sébastien Holbert merci beaucoup pour tout l'intérêt que tu as porté à mon sujet de thèse et ton aide précieuse lors des expériences en macrophages. Merci à l'ensemble de l'équipe SPVB pour votre accueil chaleureux lors de ces expériences.

Je suis profondément reconnaissante à l'ensemble des membres de l'équipe BRMF, pour la bonne ambiance au laboratoire. Merci Eric pour ton enthousiasme et d'avoir répondu à mes questions avec bienveillance. Aurélia et Philippe Gilot je vous remercie pour vos précieux conseils et votre bonne humeur. Merci Vanessa pour ton aide dans les manipulations et les bons moments passés ensemble. Merci Daniel pour tes blagues et pour ton attention à ce qu'il ne manque rien au laboratoire. Merci à Coralie et Adeline, « mes colocs de bureau » et à Frédérique pour votre aide et votre soutien. Merci à Brice et tous les anciens stagiaires pour les bons moments passés ensemble Merci Morgane pour les bons fous rires. Un merci tout particulier aux anciennes thésardes du laboratoire pour tous les moments que nous avons passés ensemble. Adélaïde, je te remercie beaucoup de m'avoir si bien accueillie quand je suis arrivée au laboratoire et d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions. Merci Sarah pour les belles discussions que nous avons partagées. Merci à Nancy, ma chère Choukette, pour ton aide, tes encouragements, les chants, les danses et les bons délires.

J'éprouve une immense gratitude envers tous les amis qui m'ont soutenue pendant cette thèse. Je souhaiterais remercier tout particulièrement Anne, Philou, Cécile et Pierrick, Mathilde et Lucien, Armel, Perrine et Antoine, Marie, Ségo, Urska-Ana, Arthur, Céline, Etienne, Charlotte et ma coloc Sara. Les moments partagés ensemble ont été si précieux pour moi. Je remercie aussi chaleureusement Brigitte et Bruno.

Je voudrais remercier du fond du cœur tous les membres de ma famille qui m'ont encouragée pendant la thèse et en particulier Mamie, Camille, Jean-François et Flo. Pia, Cyprien et Raphaël merci pour votre soutien fraternel, pour votre humour et tout simplement pour ce que vous êtes.

Enfin je voudrais dédier cette thèse à mes chers parents. Vous avez toujours été présents, merci du fond du cœur pour votre soutien et tout ce que vous avez si généreusement fait pour moi. Merci de m'avoir partagé votre goût du travail et votre passion pour vos domaines respectifs. Papa merci de m'avoir fait profiter de tes bons petits plats et de tes fous rires, la recette du bonheur de Winnie. Maman merci pour tout l'intérêt que tu as porté à mon travail, de m'avoir si bien comprise pendant cette thèse, pour ton écoute fidèle et attentive.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE 1

REVUE DE LA LITTERATURE 5

A. Caractéristiques générales de *Streptococcus agalactiae* 7

1. Le genre *Streptococcus* 7

a) Généralités 7

b) Pathogènes opportunistes majeurs chez l'Homme 7

2. *Streptococcus agalactiae* 8

a) Culture 8

b) Diversité génétique 8

c) Epidémiologie de *S. agalactiae* 9

(1) Infection chez l'animal 9

(2) Infections chez l'Homme 10

(a) Infections chez l'adulte hors grossesse 10

(b) Infections chez la femme enceinte 10

(c) Infections chez le nouveau-né 10

(d) Antibioprophylaxie et vaccin 12

3. Les facteurs de virulence et d'adaptation chez *S. agalactiae* 14

a) Les facteurs de virulence et d'échappement 14

b) Régulateurs impliqués dans la virulence chez *S. agalactiae* 19

c) Biofilm 20

B. La réponse au stress 23

1. Réponse au stress thermique 24

2. La réponse SOS 24

3. Réponse aux stress oxydatif et acide de *S. agalactiae* 25

4. Protéines universelles de stress 28

5. Perception et signalisation du stress 31

C. La répression catabolique chez les Firmicutes 33

1. Mécanisme global de la répression catabolique 33

a) Schéma global 33

b) Les systèmes des phosphotransférases 34

2. HPr 35

3. Interaction entre CcpA et HPr 38

4. CcpA (catabolite control protein A) 39

a) Mécanisme d'action de CcpA 39
b) Régulon de CcpA chez les Firmicutes 41
(1) Rôle de CcpA dans la physiologie 41
(2) Rôle de CcpA dans la pathogénicité 42
(3) Rôle de CcpA dans la réponse au stress 44
OBJECTIFS 45
TRAVAUX EXPERIMENTAUX 51
A. Quel est le rôle d'HPr chez *S. agalactiae* ? 51
1. Matériel et méthodes 52
a) Souches bactériennes et conditions de croissance 52
b) Purification de l'ADN chromosomique et plasmidique, PCR et séquençage de l'ADN 53
c) Stratégie de construction du mutant A909Δ*ptsH* 53
d) Construction des vecteurs recombinants pG1+host^{ts}-HPr$^{His15Ala/Asp}$ et pG1+host^{ts}-HPr$^{Ser46Ala/Asp}$ 54
e) Surexpression de *ptsH* dans le plasmide pNZ123-*tetR*-P$_{xyl}$*tetO* 54
f) Construction d'un complément chromosomique ectopique inductible de *ptsH* et induction 55
g) Extraction des ARN totaux et RT-qPCR 56
h) Recherche des protéines à domaine PRD chez *S. agalactiae* 56
2. Résultats 60
a) Recherche des protéines à domaine PRD chez *S. agalactiae* 60
b) *ptsH*, un gène essentiel ? 60
c) Identification de conditions favorables à l'obtention du mutant A909Δ*ptsH* 60
d) Essai de construction d'un mutant de A909 ayant un gène *ptsH* inductible à l'anhydrotétracylcine 61
B. Existe-t-il une interaction entre les protéines CcpA et HPr ? 64
1. Matériels et méthodes 64
a) Double hybride 64
2. Résultats 67
a) Caractérisation *in silico* des séquences protéiques de HPr et CcpA de *S. agalactiae* 67
b) Recherche d'une interaction par double hybride 69
C. Quel est le rôle du régulateur CcpA chez *S. agalactiae* ? 70
1. Quel est le rôle du régulateur CcpA dans la physiologie et la réponse au stress chez *S. agalactiae* ? 70
2. Travaux complémentaires 117
a) Objectifs 117

b) Matériel et méthodes 118
(1) Analyse RMN 118
(2) Biofilm 118
(3) Recherche de motifs DEAD dans le génome de *S. agalactiae* 119
(4) Construction du mutant A909Δ*SAK_0902* 119
(5) Croissance en milieu liquide 120
(6) Antibiogramme 120
(7) Recherche du site *cre2* dans le génome de *S. agalactiae* A909 120
c) Résultats 120
(1) Rôle de CcpA dans le métabolisme des acides aminés 120
(2) Rôle de CcpA dans la formation de biofilm 121
(3) Etude du rôle de SAK_0902, une hélicase à ARN à motif DEAD putative activée par CcpA 123
(a) Recherche des motifs caractéristiques des hélicases à ARN à motif DEAD dans SAK_0902 123
(b) Rôles de CcpA et SAK_0902 dans l'adaptation au stress thermique 125
(c) Rôles de CcpA et SAK_0902 dans l'adaptation au stress en éthanol 125
(d) Rôle de SAK_0902 dans la formation de biofilm 126
(e) Rôle de SAK_0902 dans la résistance aux antibiotiques ciblant la synthèse d'ARN et la synthèse protéique 127
(4) Recherche d'un site *cre2* dans le génome de *S. agalactiae* 127
DISCUSSION / PERSPECTIVES 133
CONCLUSION 143
BIBLIOGRAPHIE 147
ANNEXES 171
A. Travaux supplémentaires valorisés par une publication 173
B. Communications affichées en congrès 187
C. Communications orales en congrès 190
D. Formations suivies pendant la thèse 190
D. Participation à l'organisation d'événements scientifiques 190
E. Charges d'enseignements 190

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Facteurs de virulence et d'échappement au système immunitaire de *S. agalactiae*. .16
Tableau 2. Amorces utilisées pour l'étude d'HPr. 57
Tableau 3. Souches et plasmides utilisés pour l'étude d'HPr 59
Tableau 4. Protéines à domaine PRD chez *S. agalactiae*. 60
Tableau 5. Facteur de surexpression du gène *ptsH* en fonction de la concentration d'anhydrotétracycline par rapport à la condition sans anhydrotétracycline. 63
Tableau 6. Oligonucléotides utilisés pour l'étude de l'interaction entre CcpA et HPr. 65
Tableau 7. Souches et plasmides utilisés pour l'étude de l'interaction entre CcpA et HPr. 66
Tableau 8. Identité et similarité des séquences protéiques de HPr et CcpA de *S. agalactiae* A909 avec celles d'autres Firmicutes. 67
Tableau 9. Amorces utilisées pour la délétion du gène *SAK_0902.* 119
Tableau 10. Souche et plasmide utilisés dans cette étude pour l'étude du rôle de *SAK_0902*. ..120
Tableau 11. Protéines de *S. agalactiae* possédant un motif DEAD. 124
Tableau 12. Antibiogrammes en milieu solide de *S. agalactiae* A909WT et du mutant A909Δ*SAK_0902.* 127
Tableau 13. Gènes régulés par CcpA et possédant un site cre2. 129

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Caractéristiques morphologiques et structurales de *S. agalactiae*. 8
Figure 2. Vue d'ensemble de la colonisation par *S. agalactiae* pendant la grossesse et des principales répercussions. 11
Figure 3. Distribution relative de la présence de *S. agalactiae* par région. 13
Figure 4. Incidence des infections invasives néonatales précoces et tardives à streptocoque du groupe B en France métropolitaine de 1996 à 2018. 13
Figure 5. Protéines de surface de *S. agalactiae* permettant l'interaction avec les cellules de l'hôte. 14
Figure 6. Mécanismes utilisés par *S. agalactiae* pour échapper au système immunitaire. 15
Figure 7. Formation du biofilm. 21
Figure 8. Impact du sérotype et du glucose sur la formation de biofilm. 22
Figure 9. Représentation schématique du processus d'induction SOS chez *E. coli*. 25
Figure 10. Les réponses au stress acide chez *S. agalactiae*. 27
Figure 11. Structures des différentes protéines USP chez les bactéries. 28
Figure 12. Structure des protéines de type UspA. 30
Figure 13. Rôles fonctionnels des Usp d'*E. coli*. 31
Figure 14. Phénomène de diauxie. 33
Figure 15. Représentation schématique de l'entrée et de la phosphorylation du glucose via un transporteur PTS. 35
Figure 16. Régulation des régulateurs transcriptionnels contenant des PRD : cas de l'antiterminateur LicT de *Bacillus subtilis*. 36
Figure 17. La répression catabolique chez *Bacillus subtilis*. 37
Figure 18. Structure du complexe ternaire CcpA-P-Ser-HPr-*cre*. 39
Figure 19. Alignement des séquences *cre* chez *Bacillus subtilis* et *Streptococcus suis*. 40
Figure 20. Analyse du transcriptome de CcpA chez *Streptococcus pyogenes*. 42
Figure 21. Interaction entre la répression catabolique médiée par CcpA et l'expression des gènes de virulence chez *Streptococcus pyogenes*. 43
Figure 22. Essentialité des gènes de la souche A909 de *S. agalactiae*. 48
Figure 23. Région chromosomique contenant l'opéron *ptsH-ptsI* dans la souche A909 51
Figure 24. Rôle d'HPr en fonction de sa phophorylation chez les bactéries à Gram positif. 52
Figure 25. Régions amont et aval du gène *ptsH* amplifiées pour sa délétion. 54
Figure 26. Carte du plasmide pG+host1^{ts}. 54
Figure 27. Carte du plasmide pNZ123 *tetR-P*$_{xyl}$*tetO-ptsH*. 55
Figure 28. Insertion du gène *ptsH* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotétracycline dans la région intergénique entre *SAK_0222* et *rpoB* du chromosome de A909. 56
Figure 29. Croissance des souches A909WT et A909Δ*ptsI* en MCD supplémenté avec 20 mM de glucose. 61
Figure 30. Croissance de *S. agalactiae* A909 possédant le gène *ptsH* en ectopique sous le contrôle du promoteur inductible *P*$_{xyl}$*tetO* en présence de différentes concentrations d'anhydrotétracycline. 62
Figure 31. Alignements des séquences protéiques de CcpA et HPr et annotation des acides aminés impliqués dans leur interaction. 68

Figure 32. Test d'interaction entre les différentes versions d'HPr et CcpA par double hybride bactérien. 69
Figure 33. Rôle de CcpA dans le métabolisme des acides aminés chez *S. agalactiae*. 121
Figure 34. Rôles de CcpA, SAK_1689 et SAK_1741 dans la formation de biofilm. 122
Figure 35. Recherche des motifs conservés de la famille DEAD-box dans SAK_0902 et SAK_0361. 124
Figure 36. Rôle de CcpA et SAK_0902 dans la croissance de *S. agalactiae* en stress thermique. 125
Figure 37. Rôle de CcpA et SAK_0902 dans la croissance de *S. agalactiae* en stress éthanol. 126
Figure 38. Rôle de SAK_0902 dans la formation de biofilm. 127
Figure 39. Modèle de régulation de l'expression du gène *SAK_1689* en stress oxydatif. 140

LISTE DES ACRONYMES

AA ou aa : acide aminé

ADI : arginine déiminase

ADNc : ADN complémentaire

ADNe : ADN extracellulaire

Ala : alanine

AMP : adénosine monophosphate

ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé

ATP : adénosine triphosphate

BCCT : « Betaine/Carnitine/Choline Transporter »

BHI **:** milieu **«** brain heart infusion »

CC : complexe clonal

CcpA : catabolite control protein A

CNGOF : Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français

cre : *cis*-acting catabolite responsive element

dAMP : désoxyadénosine monophosphate

DBTBS : Database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis*

EI : enzyme I

EII : enzyme II

EOD ou EOGBS: « Early-Onset Disease » ou syndrome précoce

EPS : Substances Polymériques Extracellulaires

FBP : fructose 1,6 bis-phosphate

HPr : histidine-containing protein

His : histidine

IPTG : Isopropyl β-D-thiogalactopyranoside

LB : « Lysogeny broth »

LOD ou LOGBS : « Late-Onset Disease » ou syndrome tardif

Motif DEAD : Motif Aspartate-Glutamate-Alanine-Aspartate

MCD : Milieu Chimiquement Défini

MLST : « Multilocus Sequence Typing »

NRAMP : protéines macrophages associées à la résistance naturelle ou transporteurs d'ions métalliques

Pb : paire de base

PCR : « Polymerase Chain Reaction »

PEP : Phosphoenolpyruvate

Pi : Phosphate inorganique

PNN : Polynucléaires neutrophiles

ppGpp: guanosine 3',5'-bis(diphosphate)

pppGpp: guanosine 3'-diphosphate,5'-triphosphate

PRD :« PTS Regulatory Domain »

PTS : «Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphoTransferase System » ou système des phosphotransférases

nt : nucléotide

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RT-qPCR : « reverse transcriptase quantitative » PCR

Ser : sérine

SGB : Streptocoque du groupe B

SNC : Système Nerveux Central

ST : Sequence Type

TH : milieu Todd Hewitt

Usp : « Universal stress protein »

V : Voltage

WT : « wild-type » ou sauvage

X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-galactopyranoside

INTRODUCTION GENERALE

Ce travail s'inscrit dans l'une des thématiques développées par l'équipe Bactéries et Risque Materno-Fœtal qui se concentre sur la compréhension des mécanismes d'adaptation de *Streptococcus agalactiae* à ses différents hôtes et niches biologiques.

Nous nous sommes centrés dans cette étude sur les rôles de HPr et CcpA, deux acteurs de la répression catabolique, dans la physiologie et l'adaptation à l'hôte de *S. agalactiae*.

Ce mémoire de thèse débute par une revue de la littérature concernant les caractéristiques générales de *S. agalactiae*, la réponse au stress chez les bactéries et la répression catabolique chez les Firmicutes.

Nous présenterons ensuite le travail expérimental dont l'objectif était de comprendre comment la répression catabolique participait à l'adaptation de *S. agalactiae* aux conditions physico-chimiques rencontrées dans son environnement. Dans une première partie nous avons cherché à muter le gène *ptsH* codant la protéine HPr afin d'étudier le rôle de cette protéine. Dans une deuxième partie, nous avons cherché à identifier s'il y avait une intéraction entre HPr et CcpA. Enfin dans une dernière partie ayant fait l'objet d'une publication, nous avons déterminé le régulon de CcpA. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux gènes régulés par CcpA et impliqués dans la réponse au stress.

Enfin, en annexes nous présentons un travail mené en parallèle ayant porté sur la synthèse et la détermination de l'efficacité antibactérienne d'analogues de la cytosporone E contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

REVUE DE LA LITTERATURE

A. Caractéristiques générales de *Streptococcus agalactiae*

1. Le genre *Streptococcus*

a) Généralités

Les bactéries appartenant au genre *Streptococcus* se présentent sous forme de cocci à Gram positif de formes sphériques ou ovoïdes d'un diamètre inférieur à 2 µm et formant des diplocoques ou des chaînettes de longueur variable (Figure 1A). Elles sont immobiles et asporulées. Les streptocoques sont catalase et oxydase négatifs (Freney and Riegel, 2019). Les streptocoques sont retrouvés à l'état de commensal ou de pathogène opportuniste chez l'Homme et les animaux.

Le genre *Streptococcus* appartient au phylum des *Firmicutes*, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Streptococcaceae*. Dans cette famille on trouve aussi les genres *: Lactococcus, Lactovum* et plus récemment *Floricoccus* d'après la classification de référence des procaryotes disponible sur le site http://www.bacterio.net/streptococcus.html. Plus d'une centaine d'espèces ont été répertoriées au sein du genre *Streptococcus*. En se basant sur le séquençage de l'ARNr 16S, ce genre a été divisé en 6 groupes : Anginosus, Bovis, Mitis, Mutans, Salivarius et Pyogène dont *S. agalactiae* fait partie (Nobbs et al., 2009; Gao et al., 2014).

b) Pathogènes opportunistes majeurs chez l'Homme

Le genre *Streptococcus* comprend notamment trois pathogènes opportunistes majeurs chez l'Homme que sont : (i) *Streptococcus pyogenes* (ou Streptocoque du groupe A), un pathogène strictement humain qui colonise le pharynx. Cette bactérie est la cause de nombreuses infections bénignes telles que des angines ou de l'impétigo mais peut également être responsable d'infections invasives graves telles que des bactériémies, fasciites nécrosantes ou syndrome de choc toxique (Carapetis et al., 2005; Lemos et al., 2011) ; (ii) *Streptococcus agalactiae* (ou Streptocoque du groupe B, SGB) qui colonise le vagin et peut être transmis de la mère au nouveau-né pouvant ainsi provoquer des infections néonatales plus ou moins graves (pneumonies, bactériémies ou encore méningites) (Nagao, 2015) ; et (iii) *Streptococcus pneumoniae* (ou pneumocoque), qui colonise le rhinopharynx et provoque des infections respiratoires aiguës, des otites moyennes, des bactériémies et des méningites (Lemos et al., 2011) chez les enfants et les personnes âgées.

Parmi les streptocoques pathogènes opportunistes pour l'Homme, on retrouve aussi *Streptococcus mutans,* un streptocoque oral pouvant provoquer des caries (Lemos et al., 2011) et *Streptococcus gallolyticus*, responsable de bactériémies et d'endocardites chez les personnes âgées ou immunodéprimées. Bien que moins virulente que les trois espèces citées plus haut, une association a été faite entre les infections à *S. gallolyticus* et le cancer du côlon (Aymeric and Dramsi, 2018).

2. *Streptococcus agalactiae*

a) Culture

S. agalactiae est une espèce chimiohétérotrophe, mésophile et anaérobie aérotolérante. Elle est facilement cultivable en laboratoire en milieux de culture riches commercialisés, tels que le milieu Todd Hewitt (TH), ou cœur cervelle (Brain Heart Infusion, BHI). Après une période d'incubation de 24 heures à 37°C sur gélose additionnée de sang de cheval ou de mouton, *S. agalactiae* se présente sous forme de colonies de tailles moyennes, de couleur blanchâtre, rondes, bombées, lisses et entourées d'un halo transparent caractéristique d'une hémolyse β (hémolyse totale) (Figure 1B). *S. agalactiae* peut aussi être cultivée en milieu sélectif sur gélose Granada. Les colonies apparaissent alors orange après 48h en anaérobie (Figure 1C).

Comme tous les autres *Streptococcaceae,* son métabolisme énergétique principal est la fermentation qui conduit à la production de lactate, conduisant à l'acidification du milieu dans lequel il est cultivé.

S. agalactiae appartient au groupe B de la classification de Lancefield basée sur la nature antigénique de composants glucidiques de la paroi (le polyoside C dans le cas de *S. agalactiae*) (Lancefield, 1933).

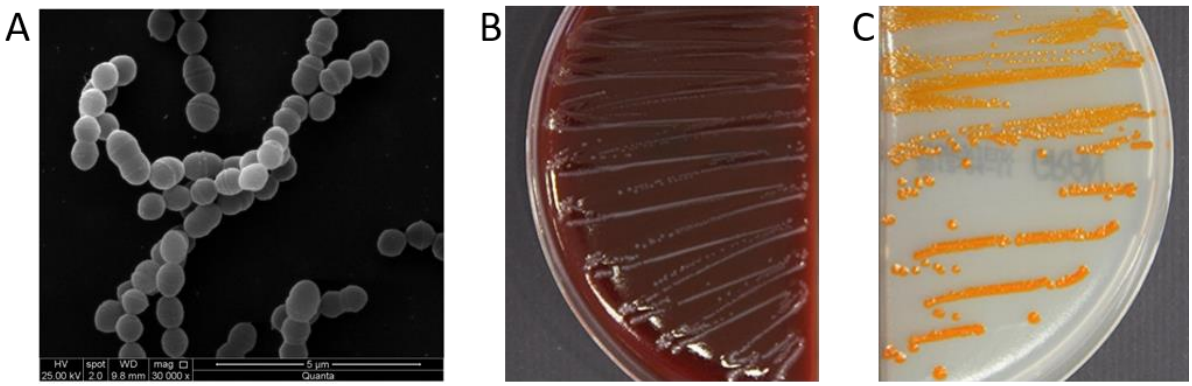


Figure 1. Caractéristiques morphologiques et structurales de *S. agalactiae*.
A) Micrographie électronique à balayage de *S. agalactiae* d'après (Nagao, 2015), B) Colonies de *S. agalactiae* sur gélose TSS, C) Colonies de *S. agalactiae* sur gélose Granada (photo de L. Mereghetti, université de Tours)

b) Diversité génétique

Afin de discriminer les souches au sein d'une espèce, des techniques de typages ont été développées. *S. agalactiae* possède notamment une capsule composée de la répétition d'unités polysaccharidiques. Les enzymes permettant sa synthèse sont codées par l'opéron *cps*. La capsule permet de différencier dix sérotypes : Ia, Ib, II à IX. La détermination du sérotype se fait à l'aide d'un antisérum ou en amplifiant les régions variables de l'opéron *cps* (Poyart et al., 2007; Imperi et al.,

2010). Actuellement la technique du Multi Locus Sequence Typing (MLST) est celle de référence utilisée pour typer les souches. Elle se base sur le séquençage de fragments nucléotidiques d'environ 500 pb de sept gènes de ménage : *adhP*, *pheS*, *atr*, *glnA*, *sdhA*, *glcK* et *tkt*. Un numéro d'allèle à chacun de ces gènes est donné en fonction des séquences obtenues. La combinaison des sept numéros d'allèles permet d'attribuer un « Sequence Type » (ST) (Jones et al., 2003). Plusieurs ST sont regroupés en Complexes Clonaux (CC) lorsqu'ils partagent au moins six allèles communs. Le nombre d'un CC particulier est désigné d'après son ST ancêtre ou le ST prédominant dans ce clone (Luan et al., 2005; Shabayek and Spellerberg, 2018). Les complexes diffèrent par leur tropisme ainsi que leur capacité à coloniser et à provoquer des infections invasives. Au sein d'un même complexe clonal, les souches appartiennent à un sérotype majoritaire : CC1 (sérotype V), CC17 (sérotype III), CC19 (sérotype III) et CC23 (sérotype Ia). Cependant, il existe une hétérogénéité de sérotypes au sein d'un même CC (Da Cunha et al., 2015). En clinique humaine, cinq complexes clonaux sont majoritaires : CC1, CC10, CC17 et CC19 et CC23 (Jones et al., 2003; Da Cunha et al., 2015; Rodgus et al., 2022). Le CC17, qualifié d'«hypervirulent», est responsable de la vaste majorité des méningites néonatales provoquées par *S. agalactiae* et de près de 70 % des syndromes tardifs néonatals dans les pays industrialisés (Jones et al., 2003; Tazi et al., 2010; Freney and Riegel, 2019; Creti et al., 2021). Chez les isolats de bovins le CC67 est majoritaire (Da Cunha et al., 2015), tandis que chez le poisson ce sont les CC7 et CC552 qui prédominent (Evans et al., 2008; Delannoy et al., 2013).

c) Epidémiologie de *S. agalactiae*

(1) Infection chez l'animal

S. agalactiae a initialement été isolée de lésions mammaires chez les bovins (Nocard and Mollereau, 1887). Cette bactérie cause des mammites qui entraînent une forte diminution de la production de lait (Keefe, 1997) d'où elle tire son nom « *agalactiae »* (absence de lait). Dans les pays qui ont mis en place des mesures pour prévenir, diagnostiquer et traiter ces infections, la prévalence a très fortement diminuée. En revanche dans les pays où les industries laitières sont émergentes, la prévalence peut encore être assez élevée (Keefe, 2012).

Elle a ensuite été isolée plus occasionnellement chez un large spectre d'hôtes (Elliott et al., 1990; Vandamme et al., 1997; Yildirim et al., 2002; Evans et al., 2008; Fischer et al., 2013). Elle est aujourd'hui la cause d'infections invasives chez le poisson d'élevage qui sont responsables d'une importante morbi-mortalité (Mian et al., 2009; Wang et al., 2013) ce qui provoque d'importantes pertes économiques.

Bien que certaines études suggèrent que *S. agalactiae* soit passée de l'animal à l'Homme à un certain moment de l'évolution, avec certains clones qui ont évolué et acquis un tropisme spécifique à l'Homme, la question du pouvoir de cette bactérie à passer encore aujourd'hui de l'animal à l'Homme est débattue (Oliveira et al., 2006; Sørensen et al., 2010; Da Cunha et al., 2015; Botelho et al., 2018).

(2) Infections chez l'Homme

Chez l'Homme, *S. agalactiae* colonise la flore gastro-intestinale, les voies génitales et plus rarement la flore oro-pharyngée et la peau (van der Mee-Marquet et al., 2008). Le portage rectovaginal chez la femme enceinte est compris entre 11 et 35 % selon les études (Russell et al., 2017). Cette colonisation peut être intermittente ou chronique (Hansen et al., 2004).

(a) Infections chez l'adulte hors grossesse

Les infections à *S. agalactiae* chez l'adulte hors grossesse sont apparues dans les années 2000 et ne cessent d'augmenter, en touchant particulièrement les personnes âgées (Slotved and Hoffmann, 2020; Graux et al., 2021; Vuillemin et al., 2021; Trollfors et al., 2022), ainsi que les personnes présentant certains facteurs de risque tels que du diabète, une maladie cardiaque, un cancer ou une déficience neurologique (Farley, 2001; Phares et al., 2008; Nagao, 2015). Cependant, des infections sévères ont pu être observées chez des patients ne présentant aucun facteur de risque (Trollfors et al., 2022). Les syndromes cliniques sont très variés. Les plus courants, par ordre d'incidence, sont des bactériémies, l'infection des tissus mous, des pneumonies, des ostéomyélites et de l'arthrite (Phares et al., 2008). Les méningites chez l'adulte sont beaucoup plus rares mais associées à un fort taux de mortalité (Farley, 2001).

(b) Infections chez la femme enceinte

Chez la femme enceinte, la colonisation vaginale peut conduire à des chorioamniotites et à des endométrites (Phares et al., 2008) qui conduisent, dans 60 % des cas, à la mort du fœtus (Freney and Riegel, 2019). *S. agalactiae* a ainsi été responsable de la mort de 46 200 fœtus *in utero* dans le monde en 2020 et pourrait être la cause d'un nombre considérable de naissances prématurées (Gonçalves et al., 2022). Par ailleurs, les infections invasives à *S. agalactiae* ont une issue fatale dans 0,20 % des cas de la femme enceinte ou en *post-partum* (Krohn et al., 1999; Hall et al., 2017) (Figure 2).

(c) Infections chez le nouveau-né

Tout d'abord isolé de prélèvements vaginaux dans les années 1930 (Lancefield and Hare, 1935), *S. agalactiae* est devenu progressivement la principale cause des infections néonatales dans les

années 1970 dans les pays industrialisés (Franciosi et al., 1973; Freney and Riegel, 2019). Les infections néonatales se présentent sous la forme de deux types de syndrome : le syndrome précoce (EOD pour early-onset disease) et le syndrome tardif (LOD pour late-onset disease). Ainsi pour l'année 2020, dans le monde, on estime qu'il y a eu 91 900 morts et 37 100 survivants avec un trouble du développement neurologique suite à une infection invasive à *S. agalactiae* (Gonçalves et al., 2022) (Figure 2).

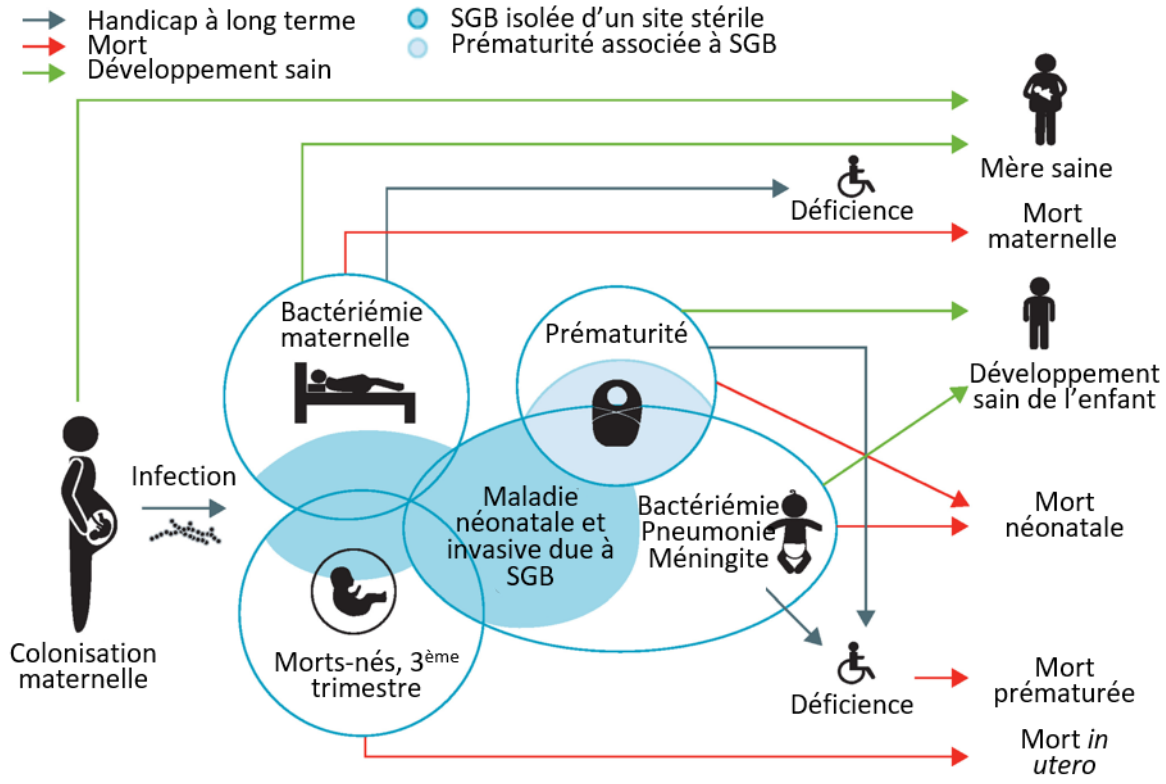


Figure 2. Vue d'ensemble de la colonisation par *S. agalactiae* pendant la grossesse et des principales répercussions.
Pendant la grossesse, *S. agalactiae* peut provoquer la mort *in utero*, être associé à la prématurité et entraîner une infection maternelle ou, plus rarement, le décès. Certains nouveau-nés de mères colonisées par *S. agalactiae* développent une maladie invasive au cours de la première semaine de vie. Les nourrissons peuvent également développer une maladie due à *S. agalactiae* entre le 7e et le 89e jour après leur naissance. Le risque de décès est élevé et dépend d'un accès adéquat aux soins. Parmi les enfants qui survivent à l'épisode aigu, certains se verront diagnostiquer un trouble du développement neurologique. SGB = streptocoque du groupe B. D'après (Gonçalves et al., 2022).

(i) Le syndrome précoce

Le syndrome précoce a lieu entre 0 et 6 jours de vie mais principalement dans les premières heures qui suivent la naissance (Nagao, 2015; Freney and Riegel, 2019). Il est dû à une transmission verticale de la mère à l'enfant soit par contamination du liquide amniotique, avec ou sans rupture des membranes avant l'accouchement, soit par l'inhalation de sécrétions vaginales maternelles lors de l'accouchement par voie basse (Verani and Schrag, 2010). La bactérie peut ainsi atteindre le système

respiratoire. Dans 80 % des cas, le syndrome se manifeste d'abord par une détresse respiratoire qui peut rapidement évoluer vers une pneumonie, une bactériémie (78 % des cas) après translocation de la barrière pulmonaire et une méningite (16 % des cas) si la bactérie franchit la barrière hémato-encéphalique (Nagao, 2015; Russell et al., 2017). Le nombre de cas de syndromes précoces est estimé à 231 800 pour l'année 2020 (Gonçalves et al., 2022).

(ii) Le syndrome tardif

Le syndrome tardif a lieu entre le septième et le 89ème jour mais le plus souvent entre la 4ème et la 8ème semaine (Poyart et al., 2008). Il donne lieu à une bactériémie (65 % des cas) qui évolue fréquemment vers une méningite (27 % des cas) (Madrid et al., 2017; Freney and Riegel, 2019). Plusieurs moyens de transmission sont évoqués : l'allaitement, les soins de santé et l'environnement (Bingen et al., 1992; Morinis et al., 2011; Filleron et al., 2014; Le Doare et al., 2016; Tazi et al., 2019). Cependant la voie de transmission et les sites colonisés lors du syndrome tardif ne sont pas bien déterminés. Il semble néanmoins que *S. agalactiae* soit transmis par la mère lors de soins ou de l'allaitement (Tazi et al., 2019) et que la bactérie colonise le tractus gastro-intestinal. La bactérie peut alors opérer une translocation intestinale favorisée par les hormones périnatales et atteindre la circulation sanguine (Tazi et al., 2010; Hays et al., 2019). Une fois dans le sang, la bactérie peut traverser la barrière hémato-encéphalique et provoquer des méningites (Tazi et al., 2010). On reporte 162 200 cas de syndromes tardifs dans le monde en 2020 (Gonçalves et al., 2022).

(d) Antibioprophylaxie et vaccin

Les antibiothérapies prophylactiques, suite à un diagnostic systématique chez la femme enceinte en fin de grossesse entre la 34ème et la 38ème semaine d'aménorrhée, ont permis de faire chuter très fortement l'incidence des syndromes précoces chez les enfants nés de mères colonisées par *S. agalactiae* (Six et al., 2014). Elles reposent sur l'administration de pénicilline ou d'ampicilline en intraveineuse en *per partum* pour les femmes colonisées par *S. agalactiae* (Raabe and Shane, 2019). Dans les pays ne disposant pas de mesures d'antibioprophylaxie, environ 1,1 % des nourrissons nés de mères colonisées par *S. agalactiae* développent un syndrome précoce alors que dans les pays où une antibioprophylaxie *per-partum* est recommandée, le risque diminue à 0,03 % (Russell et al., 2017) (Figure 3). En revanche, ces mesures n'ont pas permis de faire diminuer les syndromes tardifs (Figure 4). Bien que les mesures prophylactiques soient efficaces contre les syndromes précoces, elles présentent des limites, notamment l'augmentation de la résistance aux antimicrobiens et l'infection tardive à *S. agalactiae* après un dépistage prénatal négatif. En ce qui concerne l'apparition des multi-résistances, une étude réalisée en France entre 2007 et 2019 sur des souches néonatales

invasives reportées au Centre National de Référence français a notamment mis en évidence l'émergence d'une sous-lignée de CC17 possédant les gènes de résistance *tet*(O) (tétracycline), *erm*(B) (érythromycine) et *aphA-3* (kanamycine) (Plainvert et al., 2020). Les limites de l'antibioprophylaxie justifient donc le développement de vaccins à base de sous-unités protéiques et de vaccins conjugués à base de polysaccharides capsulaires qui est aujourd'hui appuyé par l'Organisation mondiale de la santé (Nagao, 2015; Song et al., 2018; World Health Organization and London School of Hygiene and Tropical Medicine, 2021). Des études menées sur des souches isolées d'adultes infectées ou de femmes enceintes colonisées constatent aussi le développement de résistances et même de multirésistances chez *S. agalactiae* (Mudzana et al., 2021; Tulyaprawat et al., 2021; Vuillemin et al., 2021; Rodgus et al., 2022). Il est donc nécessaire de surveiller en continu l'épidémiologie de *S. agalactiae*.

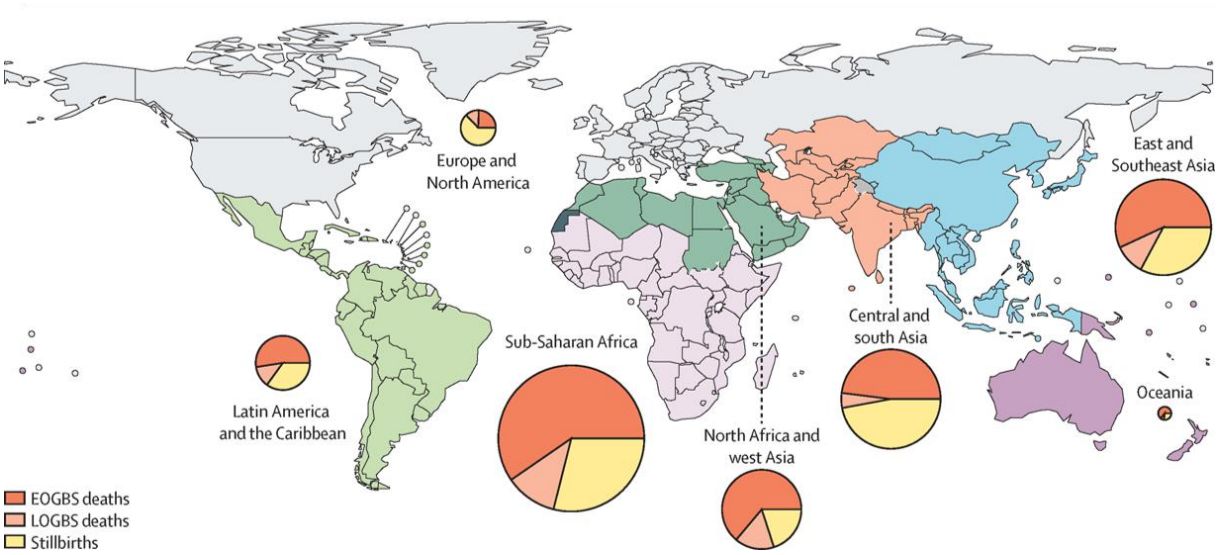


Figure 3. Distribution relative de la présence de *S. agalactiae* par région.
Décès à la suite d'un syndrome précoce (EOGBS : early-onset iGBS), d'un syndrome tardif (LOGBS : late-onset iGBS) et mort-nés (stillbirths). Les surfaces des diagrammes circulaires sont proportionnelles aux chiffres spécifiques à chaque région. Les diagrammes circulaires présentent les proportions de cas qui touchent les nouveaux-nés dans les différentes régions. D'après (Gonçalves et al., 2022).

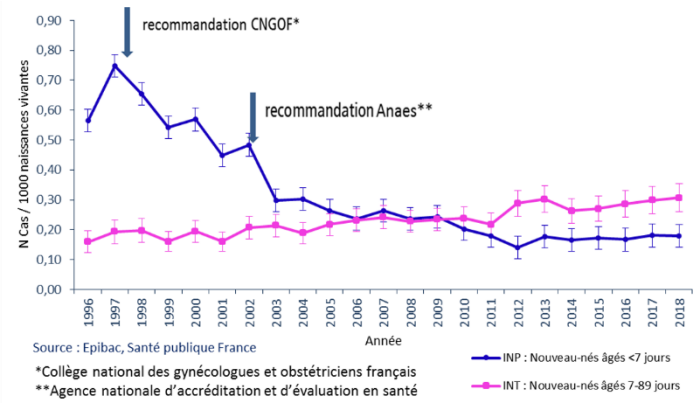


Figure 4. Incidence des infections invasives néonatales précoces et tardives à streptocoque du groupe B en France métropolitaine de 1996 à 2018.
Des flèches pointent les dates d'émission des recommandations du CNGOF et de l'ANAES, concernant la mise en place du dépistage systématique et de l'antibioprophylaxie *per-partum* (Source : Santé publique France, réseau Epibac).

3. Les facteurs de virulence et d'adaptation chez *S. agalactiae*

a) Les facteurs de virulence et d'échappement

Les infections à *S. agalactiae* nécessitent tout d'abord l'adhérence de la bactérie à différents tissus dont les épithéliums (vaginal, pulmonaire, digestif et la barrière placentaire). La bactérie possède ainsi de nombreuses adhésines qui vont pouvoir se fixer soit à des protéines de la matrice extracellulaire qui elles-mêmes vont faire le pont avec les cellules de l'hôte, soit directement aux cellules de l'hôte via des récepteurs cellulaires dont certains restent à déterminer (Figure 5, Tableau 1) (Shabayek and Spellerberg, 2018; Freney and Riegel, 2019).

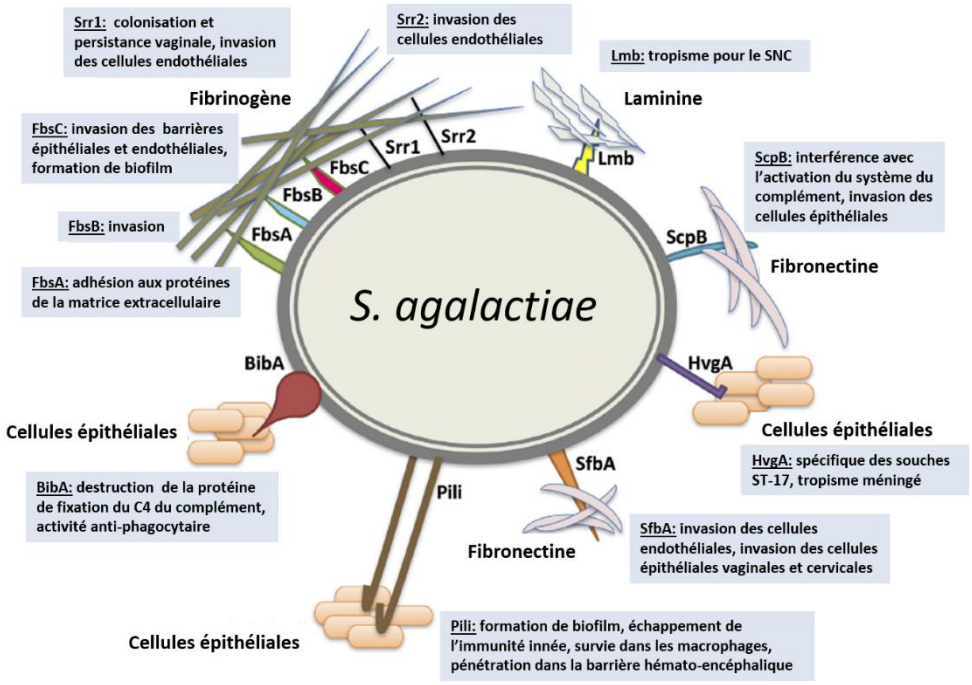


Figure 5. Protéines de surface de *S. agalactiae* permettant l'interaction avec les cellules de l'hôte.
La colonisation, la persistance, la translocation et l'invasion des barrières de l'hôte dépend de la capacité de *S. agalactiae* à adhérer aux cellules de l'hôte et aux protéines de la matrice extracellulaire, une étape importante du franchissement des barrières cellulaires. Les protéines Fbs et Srr adhèrent au fibrinogène ; ScpB et SfbA adhèrent à la fibronectine et Lmb à la laminine. BibA et HvgA permettent la fixation aux cellules épithéliales. Les pili, essentiels à l'adhésion et à la formation de biofilm, sont impliqués dans la virulence en permettant la traversée des barrières et en inhibant l'action du système immunitaire. SNC: système nerveux central. D'après (Shabayek and Spellerberg, 2018).

Suite à la colonisation, la bactérie peut ensuite franchir les barrières cellulaires puis envahir les tissus (Whidbey et al., 2013). La β-hémolysine, en induisant l'expression des facteurs de l'inflammation (IL-6, IL-8, IL-1β, CXCL1 et CCL20), participe au franchissement de la barrière épithéliale (Whidbey et al., 2013). *S. agalactiae* possède aussi de nombreux facteurs d'échappement au système immunitaire de l'hôte (Figure 6, Tableau 1) (Korir et al., 2017).

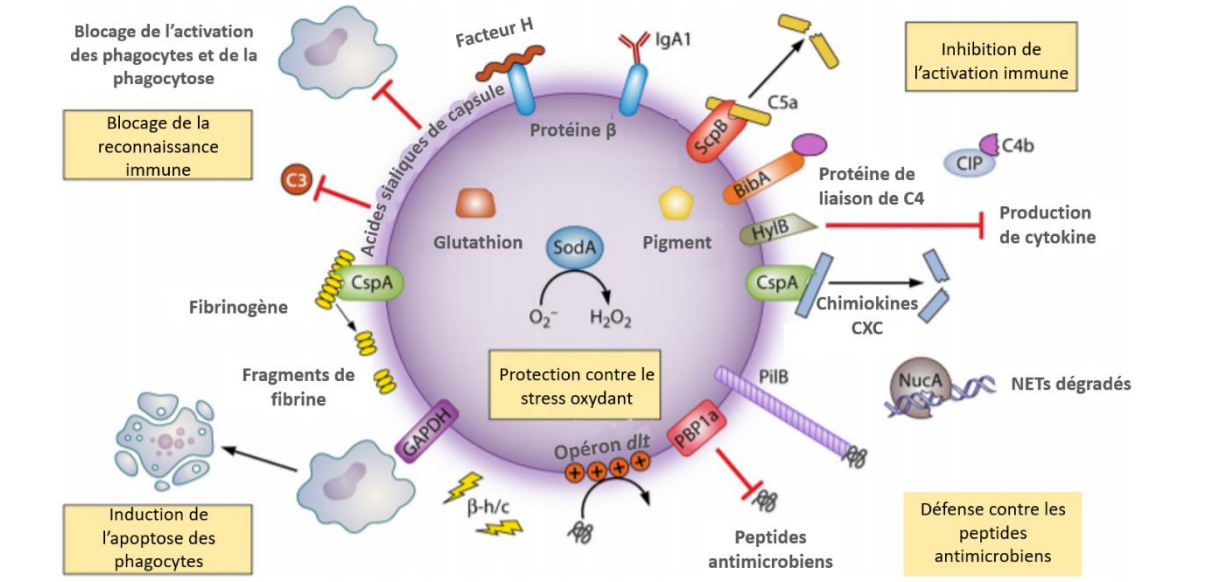


Figure 6. Mécanismes utilisés par *S. agalactiae* pour échapper au système immunitaire.
S. agalactiae exprime de nombreux facteurs qui l'aident à échapper au système immunitaire et à augmenter sa survie dans l'hôte. La capsule d'acide sialique et les fragments de fibrine clivés par CspA qui recouvrent la surface aident *S. agalactiae* à se présenter comme "soi" au système immunitaire. La capsule bloque également le dépôt de C3 et la reconnaissance par les phagocytes. L'acide sialique présent dans la capsule, la β -protéine, ScpB et BibA inhibent le système du complément en liant ou en clivant les composants du complément. La β-protéine de *S. agalactiae* se lie également à la région Fc des IgA1 pour inhiber l'activation immunitaire. HylB et CspA inhibent ou clivent les cytokines, tandis que PilB, PBP1a, et les protéines codées par l'opéron *dlt* aident à résister aux peptides antimicrobiens. NucA dégrade la matrice ADN des pièges extracellulaires des neutrophiles. Le glutathion, le pigment caroténoïde et SodA contribuent tous à la défense contre les espèces réactives de l'oxygène, et la β-hémolysine/cytolysine (β-h/c) et GAPDH contribuent à induire l'apoptose dans les phagocytes. D'après (Korir et al., 2017).

Tableau 1. Facteurs de virulence et d'échappement au système immunitaire de *S. agalactiae*.

Facteurs de pathogénicité	**Déterminants génétiques**	**Cibles chez l'hôte**	**Fonctions**	**Régulation** (+ : activé par, - inhibé par)	**Références**
Capsule	*cpsA-S* *neuA-D*	Phagocytes C3b du complément	Inhibition de la reconnaissance immune. Inhibition de l'opsonophagocytose	+ RogB - CovR/S	(Wessels et al., 1989; Marques et al., 1992; Carlin et al., 2007; Song et al., 2018)
β-hémolysine / pigment	Opéron *cyl*	Phagocytes Cellules non phagocytaires	Cytotoxicité Invasion cellulaire Activation de la réponse inflammatoire Résistance au stress oxydatif	- CovR/S + Stk1 + RovS	(Spellerberg et al., 1999a, 2000; Ring et al., 2002; Liu et al., 2004; Rajagopal et al., 2006; Rosa-Fraile et al., 2006; Samen et al., 2006; Whidbey et al., 2013, 2015; Armistead et al., 2021; Mazzuoli et al., 2021)
CspA	*cspA*	Fibrinogène Chimiokines	Inhibition de l'opsonophagocytose	+ MtaR	(Harris et al., 2003; Bryan and Shelver, 2009)
ScpB C5a peptidase	*scpB*	C5a du complément Fibronectine	Inhibition du recrutement des PNN Invasion des cellules épithéliales	- RgfA/C - CovR/S	(Beckmann et al., 2002; Cheng et al., 2002; Spellerberg et al., 2002; Mazzuoli et al., 2021)
BibA	*bibA*	Protéine de fixation du C4 du complément Cellules épithéliales	Activité anti-phagocytaire Survie dans le sang	- CovR/S	(Santi et al., 2007; Di Palo et al., 2013)
HvgA (ST17)	*hvgA*	Cellules épithéliales et endothéliales	Translocation à travers les barrières intestinales et	- CovR/S	(Tazi et al., 2010; Mazzuoli et al., 2021)

			hémato-encéphaliques		
SfbA	*sfbA*	Fibronectine	Invasion des cellules épithéliales vaginales et cervicales et des cellules endothéliales micro-vasculaires et cérébrales	/	(Mu et al., 2014)
HylB	*hylB*	Acide hyaluronique	Invasion des tissus Réduction de la réponse inflammatoire Survie dans les macrophages	/	(Lin et al., 1994; Wang et al., 2014; Kolar et al., 2015)
Protéine β	*bac*	Facteur H Fragment Fc de l'immunoglobuline A	Inhibition de l'activité immune	/	(Areschoug et al., 2002)
FbsA, B, C	*fbsA, B, C*	Fibrinogène	Invasion des barrières endothéliales et épithéliales Formation de biofilm	+ RogB (*fbsA*) - RovS (*fbsA*) + RgfA/C (*fbsA*) - RgfA/C (*fbsB*) - CovR/S (*fbsA, fbsB, fbsC)*	(Schubert et al., 2002; Gutekunst et al., 2004; Samen et al., 2006; Safadi et al., 2011; Buscetta et al., 2014; Mazzuoli et al., 2021)
Lmb	*lmb*	Laminine	Invasion du SNC	- AdcR	(Spellerberg et al., 1999b; Tenenbaum et al., 2007; Moulin et al., 2016)
Srr1 Srr2 (ST17)	*srr1, srr2*	Fibrinogène Cellules épithéliales Kératine Intégrines α5β1 et αvβ3 (Srr2)	Invasion des cellules endothéliales et épithéliales	+ Rga - CovR/S (*srr2*) - CodY (*srr2*)	(Seifert et al., 2006; van Sorge et al., 2009; Samen et al., 2011; Nagao, 2015; Six et al., 2015; Deshayes de Cambronne et al., 2021; Mazzuoli et

					al., 2021; Pellegrini et al., 2022)
Acide lipotéichoïque	*Opéron dlt*	Peptides cationiques Cellules épithéliales	Résistance aux peptides cationiques Adhérence aux cellules épithéliales	+ DltR/S	(Nealon and Mattingly, 1984; Poyart et al., 2001a, 2003; Saar-Dover et al., 2012)
Pili	Locus *PI-1* Locus *PI-2a/2b*	Peptides antimicrobiens Macrophages Cellules épithéliales et endothéliales	Formation de biofilm Invasion de la barrière hémato-encéphalique Résistance aux peptides antimicrobiens Survie dans les macrophages	+ RogB - CovR/S + Rga	(Dramsi et al., 2006, 2012; Rosini et al., 2006; Maisey et al., 2008; Konto-Ghiorghi et al., 2009; Papasergi et al., 2010; Samen et al., 2011; Shabayek and Spellerberg, 2018; Périchon et al., 2019)
SodA	*sodA*	Réactifs oxygénés	Résistance au stress oxydatif	+ RovS	(Poyart et al., 2001b; Samen et al., 2006)
Facteur CAMP	*cfb*	Membranes cellulaires Fragment Fc immunoglobuline	Cytotoxicité Perturbation de l'action des anticorps	+ CovR/S - Stk1	(Christie et al., 1944; Lang and Palmer, 2003; Rajagopal et al., 2006)
GAPDH	*gapC*	Plasminogène Fibrinogène	Induction de l'apoptose des phagocytes Immunomodulation	/	(Seifert et al., 2003; Oliveira et al., 2012; Korir et al., 2017)
PBP1a	*ponA*	/	Résistance aux peptides antimicrobiens dans les phagocytes	/	(Hamilton et al., 2006)
BspC	*bspC*	Cellules vaginales, ectocervicales, et endocervicales	Colonisation vaginale	/	(Manzer et al., 2022)

b) Régulateurs impliqués dans la virulence chez *S. agalactiae*

La pathogénie de *S. agalactiae* nécessite l'action coordonnée d'un ensemble de facteurs de virulence (Tableau 1) ainsi que des facteurs lui permettant de s'adapter aux conditions de stress dans l'environnement. Les régulateurs transcriptionnels ainsi que les systèmes à deux composants permettent notamment de coordonner l'expression des gènes face à des changements environnementaux (Shabayek and Spellerberg, 2017). Glaser et al. ont identifié de nombreux gènes codant des régulateurs transcriptionnels représentant 5 % des gènes prédits (Glaser et al., 2002). Récemment, une étude a permis de montrer que le régulateur CodY régulait 13 % du génome (Pellegrini et al., 2022). Il est impliqué dans la régulation du transport et du métabolisme des acides aminés mais aussi dans la virulence en contrôlant notamment l'expression de protéines de surface telles que le facteur de virulence Srr2 (Pellegrini et al., 2022). Une autre étude a montré que le régulateur MrvR régulait 16.8 % des gènes en début de phase exponentielle de croissance. Il est associé à plusieurs traits de virulence notamment la survie en liquide amniotique et la formation de biofilm. Chez des modèles murins il est associé à une prématurité des nouveaux-nés suite à une colonisation de souris enceintes et à la mortalité dans un modèle de septicémie (Dammann et al., 2021).

Les systèmes à deux composants, eux, comprennent deux protéines, une protéine histidine kinase qui s'autophosphoryle suite à stimulus environnemental et qui transfère ensuite son groupement phosphate à la protéine régulatrice de réponse (Stock et al., 2000). Ils contribuent à l'adaptation, à la virulence et à la survie en détectant les fluctuations environnementales et en fournissant une réponse appropriée (Cotter and Hill, 2003; Shabayek and Spellerberg, 2017). Dans le génome de *S. agalactiae*, Glaser et al. ont identifié un nombre particulièrement important de systèmes à deux composants : 20 histidine kinases ayant le rôle de senseur et 21 régulateurs de réponse, c'est plus que chez d'autres streptocoques (14 chez *S. pneumoniae* et 13 chez *S. pyogenes*). Le système CovR/S (ou CrsR/S) a été particulièrement étudié et régule des gènes codant des protéines de l'enveloppe cellulaire, du métabolisme ou impliquées dans la virulence (Lamy et al., 2004; Jiang et al., 2005, 2008; Mazzuoli et al., 2021). Il est notamment fortement impliqué dans la réponse au stress acide et dans la survie en macrophage (Santi et al., 2009; Cumley et al., 2012; Shabayek and Spellerberg, 2017).

Un autre système à deux composants présent chez *S. agalactiae* est le système CiaR/H. Chez les streptocoques, ce système a été démontré comme impliqué dans la résistance aux β-lactames, les processus lytiques, la formation de biofilm, la production de bactériocines, la

compétence naturelle, la virulence et la résistance au système immunitaire (Dagkessamanskaia et al., 2004; Sebert et al., 2005; Quach et al., 2009; Li et al., 2011; Jabbour and Lartigue, 2021). Ce régulateur agit notamment en régulant l'expression de quatre ARN régulateurs qui vont eux-mêmes réguler leurs cibles tel que Srn024 qui régule de manière post-transcriptionnelle la pullulanase, impliquée dans la formation de biofilm (Jabbour et al., 2022).

Les ARN régulateurs sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires et permettent aux bactéries de s'adapter à leur environnement. Ce sont des ARN comprenant 50 à 500 nucléotides. Tous les ARNs sont classés en plusieurs groupes en fonction de leur localisation dans le génome et de leurs modes d'action (Jabbour and Lartigue, 2021). Chez plusieurs streptocoques comme *S. pyogenes* ou *S. pneumoniae*, plusieurs ARNnc ont été démontrés comme impliqués dans la virulence (Patenge et al., 2013). Chez *S. agalactiae* 120 ARNnc ont été identifiés (Rosinski-Chupin et al., 2015). Parmi ceux-ci l'un d'entre eux (*s1160*), aussi appellé *srn073* chez les autres souches de *S. agalactiae*, est très fortement surexprimé en colonisation vaginale dans la souche COH1 appartenant au ST17 (Keogh et al., 2021).

c) Biofilm

La colonisation dépend de la capacité des bactéries à adhérer aux cellules de l'hôte. La formation de biofilm permet ainsi à *S. agalactiae* d'adhérer aux épithéliums et de coloniser un environnement hostile tel que le vagin. Les biofilms constituent une étape primaire de la pathogenèse pour près de 80 % des infections bactériennes (Beitelshees et al., 2018). Un biofilm bactérien est ainsi une communauté structurée de bactéries dans une matrice extracellulaire autoproduite, adhérant à une surface inerte ou à un tissu biologique (Hardy et al., 2017).

La formation de biofilm peut être divisée en trois grandes étapes : l'étape d'attachement, une étape de maturation et quand les conditions sont hostiles, une étape de dispersion (Figure 7) (Monroe, 2007).

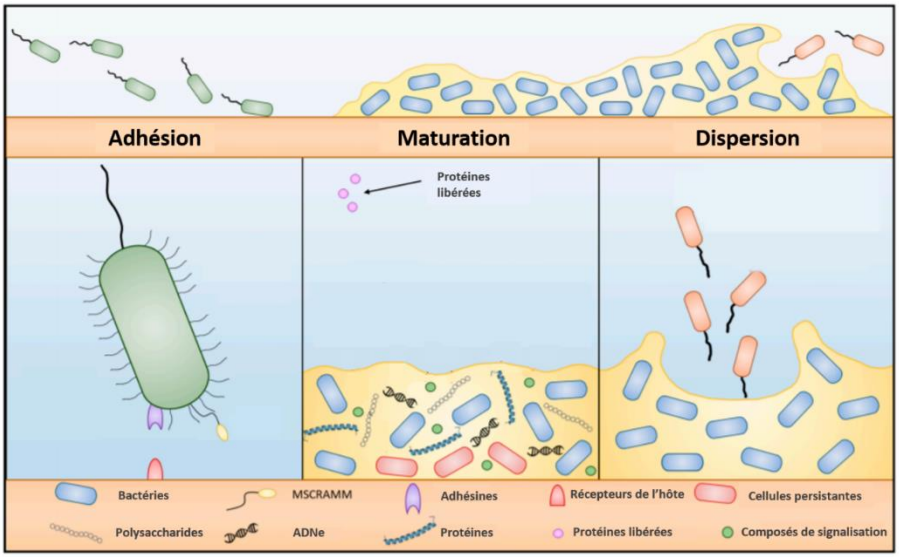


Figure 7. Formation du biofilm.
Représentation schématique des trois grandes étapes de la formation de biofilm : l'adhésion, la maturation et la dispersion. MSCRAMMs : microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, ADNe : ADN extracellulaire. D'après (Beitelshees et al., 2018).

La première étape d'attachement est tout d'abord réversible. Puis, l'attachement devient semi-irréversible et fait intervenir des protéines d'ancrage de la surface bactérienne tels que les pili (Tableau 1) (Beitelshees et al., 2018). Trois types de pili nommés PI-1, PI-2a et PI-2b ont été reportés chez *S. agalactiae*. Ces trois types appartiennent à deux îlots de pili (PI), PI-2a et PI-2b étant des variantes de PI-2. Toutes les souches de *S. agalactiae* caractérisées hébergent au moins un type de pilus ou une combinaison de deux îlots (Shabayek and Spellerberg, 2018). Le pilus PI-2a est plus particulièrement impliqué dans la formation de biofilm (Konto-Ghiorghi et al., 2009; Rinaudo et al., 2010). Bien que ne possédant pas cet îlot, il été montré que le clone ST-17 était un fort formateur de biofilm (D'Urzo et al., 2014) (Figure 8). Cela pourrait être dû à des protéines spécifiques de ce ST, comme HvgA ou Srr2, impliquées dans l'attachement aux surfaces, aux cellules de l'hôte ou à la matrice extra-cellulaire (Seifert et al., 2006; Tazi et al., 2010).

Après l'obtention d'un attachement semi-irréversible, la maturation du biofilm est initiée avec la production d'une matrice externe composée de substances polymériques extracellulaires (EPS) telles que des polysaccharides, de l'ADN extracellulaire (ADNe), des lipides et des protéines. On peut trouver dans le biofilm un gradient de nutriments, d'oxygène et de pH. Selon leur place dans le biofilm, les bactéries diffèrent donc dans leur métabolisme en fonction des contraintes de leur micro-environnement (Hardy et al., 2017).

Les conditions environnementales jouent sur la formation de biofilm. Chez certaines bactéries, dont *S. agalactiae*, la concentration en glucose influence la formation de biofilm (Rinaudo et al., 2010; D'Urzo et al., 2014; Park et al., 2021; Dong et al., 2022).(Figure 8).

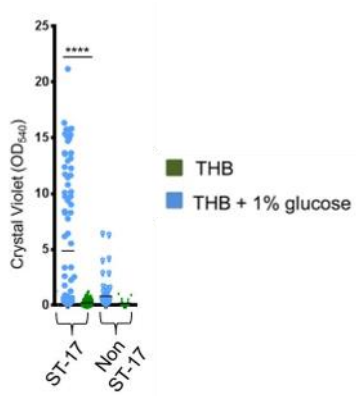


Figure 8. Impact du sérotype et du glucose sur la formation de biofilm.
Les souches de sérotype III ont été divisées en deux groupes ST17 et non ST17 et les expériences de biofilm ont été réalisées en milieu Todd-Hewitt supplémenté ou non en glucose (1 %). D'après (D'Urzo et al., 2014).

Pendant ou après la maturation du biofilm, des stimuli environnementaux tels que la disponibilité des nutriments, l'apport en oxygène, l'oxyde nitrique, le pH et certains produits chimiques (Li et al., 2013; Kim and Lee, 2016) peuvent induire la libération des bactéries de la matrice du biofilm, qui peuvent alors disséminer vers de nouveaux sites anatomiques (Beitelshees et al., 2018). Les mécanismes de quorum sensing sont impliqués dans la croissance et la dispersion du biofilm (Beitelshees et al., 2018). Chez *S. agalactiae*, la dispersion du biofilm *in vitro* est modifiée en fonction du milieu de culture utilisé ce qui pourrait être dû à la différence de production de matrice extracellulaire entre ces différentes conditions (Silvestre et al., 2020).

B. La réponse au stress

Un stress est défini dans la littérature comme la transition d'une condition à une autre qui entraine des altérations du génome, du transcriptome, du protéome et / ou du métabolome conduisant à une diminution de la croissance et de la survie (Booth, 2002). Diverses conditions physico-chimiques peuvent soumettre les bactéries à un stress : un pH acide, des températures basses ou hautes, des variations de l'osmolarité, un environnement oxydatif ou la privation de nutriments (Lemos et al., 2011).

S. agalactiae est particulièrement confronté aux stress acide et oxydatif. Comme les autres bactéries lactiques, son principal produit de fermentation est l'acide lactique. De plus, les voies métaboliques de *S. agalactiae* peuvent conduire à la production de ROS en présence d'oxygène (Papadimitriou et al., 2016). Chez l'hôte, *S. agalactiae* est capable de coloniser le vagin alors que les lactobacilles, qui font partie de la flore vaginale, produisent du peroxyde d'hydrogène ainsi que des acides organiques qui acidifient le vagin (Boris and Barbés, 2000). Par ailleurs, il a été démontré que *S. agalactiae* était capable de survivre pendant une période de temps prolongée (Valenti-Weigand et al., 1996; Cornacchione et al., 1998; Cumley et al., 2012; Korir et al., 2016) dans le phagolysosome mature, un organite hautement microbicide reposant notamment sur un pH acide et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le pH acide endommage la paroi et la membrane cellulaire. De plus, l'acidification du cytosol est génotoxique et entraine une dénaturation des protéines. Le mécanisme global est affecté, ce qui conduit à l'épuisement de l'énergie et à la mort cellulaire. Le stress oxydatif entraine des dommages aux macromolécules telles que les protéines, l'ADN ou les lipides (Papadimitriou et al., 2016).

Les bactéries peuvent aussi être confrontées à une hausse de la température quand l'hôte présente de la fièvre pour combattre les pathogènes. Bien que résidant dans des environnements riches en nutriments, les bactéries lactiques peuvent être soumises à une privation de nutriments qui sera l'effet secondaire d'un autre stress tel qu'un pH acide qui peut perturber l'action des transporteurs et donc l'entrée des nutriments. En revanche, les stress dus au froid, aux chocs osmotiques ou à un stress alcalin ne sont pas reconnus comme des stress très fréquemment rencontrés par les bactéries lactiques commensales ou pathogènes (Papadimitriou et al., 2016).

1. Réponse au stress thermique

S. agalactiae est dotée de facteurs lui permettant de faire face à un stress thermique qui favorise, lui aussi, l'oxydation des protéines. C'est le cas notamment d'une protéine de choc thermique, la sérine protéase ClpP, une protéine chaperonne qui lui permet de réguler sa croissance à haute température en prévenant l'oxydation de la protéine DnaK elle-même impliquée dans la modulation du régulon de la réponse au stress de chaleur. ClpP est aussi impliquée dans la réponse à un stress osmotique ou un stress oxydatif (Nair et al., 2003). Chez d'autres bactéries lactiques, CtsR (Class three stress gene Repressor) agit comme un thermosenseur qui régule l'expression des gènes codant des protéines de choc thermique. Chez *S. agalactiae*, CstR a été identifiée (Glaser et al., 2002) et il existe une boîte de fixation putative de CtsR dans le promoteur du gène *clpP* (GGTCAAcAAAGGTCAAA), laissant supposer qu'elle régule son expression (Nair et al., 2003).

2. La réponse SOS

La réponse SOS intervient lorsque des stress induisent des dommages à l'ADN. Ce mécanisme a tout d'abord été mis en évidence chez *E. coli* (Witkin, 1976). Chez cette bactérie, la protéine LexA réprime des gènes impliqués dans la réponse SOS en se fixant à leur site opérateur et en empêchant la fixation de l'ARN polymérase. La protéine RecA, quant à elle, agit comme un senseur du système SOS. Lors d'un dommage à l'ADN, la présence d'ADN simple brin va entrainer la fixation de RecA à l'ADN et son activation. Cela engendre un autoclivage de LexA et de facto un arrêt de la répression par LexA (Erill et al., 2007; Maslowska et al., 2019). La réponse SOS va induire l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la protection et la stabilisation de la fourche de réplication (tels que *recA* et *ssb*), dans le traitement des lésions par excision de nucléotides ou mécanisme de recombinaison (tels que *uvrA*, *uvrB*, *ydjQ*, *uvrD*, *recN* et *ruvAB*), l'induction d'ADN polymérases capables de synthétiser l'ADN par translésion (*polB*, *dinB* et *umuDC*) et enfin des gènes codant des protéines qui vont inhiber la septation (*sulA*) (Erill et al., 2007) (Figure 9).

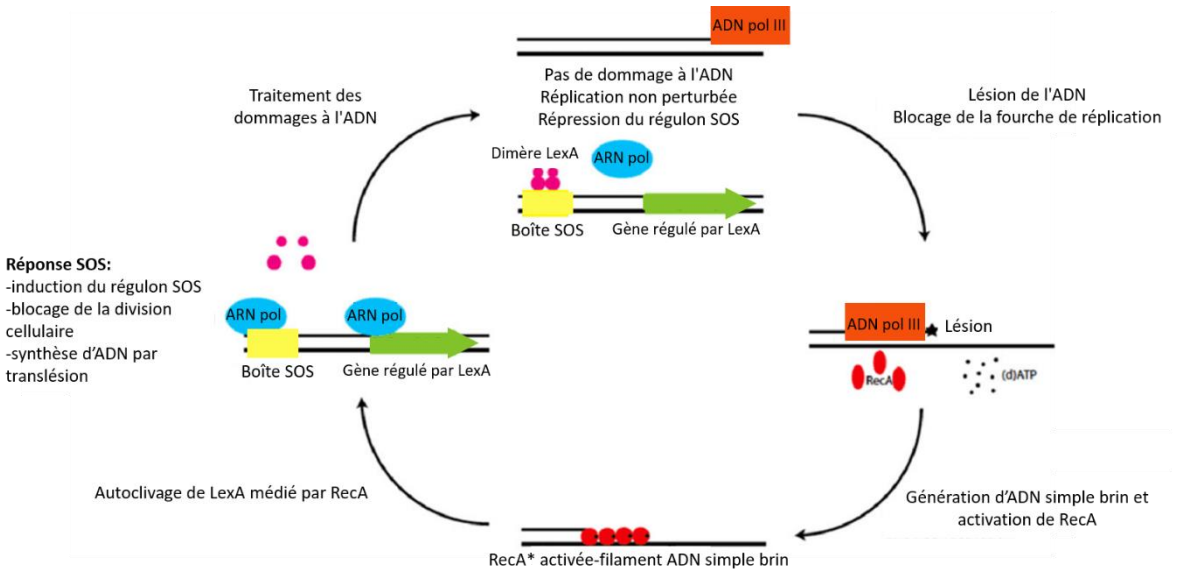


Figure 9. Représentation schématique du processus d'induction SOS chez *E. coli*.
Pendant la croissance normale, le répresseur LexA se lie à la séquence opérateur dans la région promotrice des gènes SOS, empêchant leur expression. Lors d'un dommage à l'ADN, l'ADN simple brin s'accumule lorsque la fourche de réplication se bloque pendant la réplication de l'ADN contenant des lésions. RecA se lie à l'ADN simple brin et, en présence de (d)ATP, se transforme en une forme activée (filament nucléoprotéique RecA*). RecA* stimule l'autoclivage de LexA, conduisant à la dérépression des gènes SOS. Après la réparation du dommage, l'élimination du signal inducteur permet à LexA de se réaccumuler et de réprimer les gènes SOS. D'après (Maslowska et al., 2019).

Chez les streptocoques, LexA est absente et il a été considéré que la réponse SOS classique, définie par une augmentation des mutations après une exposition aux UV (Gasc et al., 1980), n'existait pas. Cependant chez *Streptococcus uberis*, une cassette permettant la réponse SOS a été identifiée. Cette cassette comprend un régulateur HdiR LexA-like codé par le gène *hdiR,* le gène *umuC* (codant une ADN polymérase) et deux gènes non caractérisés, et permet une réponse aux dommages de l'ADN. Ainsi, en cas de lésion, l'autoclivage de la protéine HdiR a lieu et le régulateur cesse de réprimer son propre opéron (Varhimo et al., 2007). Les gènes *hdiR* et *umuC* sont retrouvés chez plusieurs souches de streptocoques et notamment chez *S. agalactiae* 2603V/R mais on ne la retrouve pas dans la souche A909 utilisée dans notre étude.

3. Réponse aux stress oxydatif et acide de *S. agalactiae*

Que ce soit dû au métabolisme, à la colonisation dans le vagin ou à la phagocytose par les cellules immunitaires, les conditions de pH acide et de stress oxydatif sont souvent retrouvées simultanément dans l'environnement de *S. agalactiae*. Dans les parties suivantes nous allons donc développer les facteurs nécessaires à la résistance aux stress acide et oxydatif.

Le stress oxydatif se produit lorsque la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) l'emporte sur la capacité de la bactérie à éliminer la menace. Le stress oxydatif peut entraîner

des dommages aux acides nucléiques, aux acides aminés, aux cofacteurs des protéines (Fasnacht and Polacek, 2021) et aux lipides (Cabiscol et al., 2000). Notamment, la réaction de Fenton, dans laquelle les ions fer ou cuivre réduisent le peroxyde d'hydrogène en un radical réactif, entraîne des dommages à l'ADN (Imlay et al., 1988), la peroxydation de lipides ou l'oxydation de protéines (Halliwell and Gutteridge, 1990).

Bien que dépourvu de catalase ou de cytochrome C oxydase, *S. agalactiae* a le pouvoir de résister à des niveaux élevés de ROS (Poyart et al., 2001b). Les stratégies de *S. agalactiae* pour contrer le stress oxydatif reposent sur différents mécanismes (Lemos et al., 2011). SodA, tout d'abord, d'importance majeure dans la résistance au stress oxydatif, convertit les anions superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) en oxygène moléculaire (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). C'est une métalloenzyme ayant pour cofacteur le manganèse (Poyart et al., 2001b). Elle produit aussi un taux élevé d'une molécule antioxydante, le glutathion, qui a un rôle dans la virulence bactérienne (Janowiak and Griffith, 2005; Walker et al., 2019).

La β-hémolysine / pigment, facteur de virulence important pour l'invasion (Tableau 1) permet une résistance au stress oxydatif (Armistead et al., 2021). Une NADH peroxydase (Npx) (Korir et al., 2018) et une NADH oxydase (Nox-2) produisant de l'H_20 (Yamamoto et al., 2006) ont aussi été mises en évidence comme impliquées dans la résistance aux ROS. Par ailleurs, Lechardeur et al., ont montré que la «2-Cys Peroxiredoxin Alkyl Hydroperoxide Reductase C», codée par le gène *ahpC*, protégeait l'hème de l'oxydation (Lechardeur et al., 2010) chez *S. agalactiae*. De plus, comme mentionné par Lemos et al. (Lemos et al., 2011), le génome séquencé de *S. agalactiae* (Glaser et al., 2002) code plusieurs autres enzymes putatives impliquées dans la réponse au stress oxydatif, comme une thiol peroxydase (Tpx), une thiorédoxine / thiorédoxine réductase (TrxAB) et une glutathion réductase (Gor), dont les rôles dans la protection contre le stress oxydatif ont été démontré chez d'autres bactéries (Linn and Imlay, 1987; Horsburgh et al., 2001; La Carbona et al., 2007; Ballal and Manna, 2010) mais restent à investiguer chez *S. agalactiae*. *S. agalactiae* synthétise également les protéines LrgA/LrgB pour lesquelles un rôle dans la résistance au stress oxydatif a été démontré chez *S. mutans* (Ahn et al., 2012; Rice et al., 2017).

Pour faire face à un pH faible, *S. agalactiae* dispose de nombreux moyens de défense qui sont décrits dans la revue de Shabayek et al. (Shabayek and Spellerberg, 2017) tels que les pompes à protons, le système arginine déiminase (ADI), les protéines chaperonnes et les protéases (Lemos et al., 2011; Shabayek and Spellerberg, 2017) (Figure 10). L'enzyme F1F0-ATPase,

composée de plusieurs sous-unités, peut transporter des protons vers le milieu extracellulaire en utilisant de l'ATP permettant ainsi d'alcaliniser le milieu intracellulaire. Le système Arginine déiminase est composé de trois enzymes : une arginine déiminase, l'ornithine carbamoyltransférase et une carbamate kinase. L'arginine est importée dans le milieu intracellulaire en échange d'une excrétion de l'ornithine dans le milieu extracellulaire grâce à un antiporteur puis elle fait l'objet d'une cascade de réactions aboutissant à la formation d'ammoniaque, générant un microenvironnement alcalin. Les enzymes de l'ADI et le transporteur sont codés par les gènes *arc*. Les protéines chaperonnes et les protéases telles que DnaK, GroES et Clp permettent la protection et la réparation de macromolécules. L'homéostasie des ions métalliques et l'osmorégulation, qui consiste en l'accumulation d'osmoprotecteurs tels que la glycine bétaïne, participent aussi à la résistance au stress acide. De plus, le transporteur NRAMP, permettant l'import d'ions Mn^{2+}/ Fe^{2+}, est nécessaire pour la survie en stress acide mais aussi oxydatif (Shabayek et al., 2016). Les mécanismes de réponse de tolérance aux acides mis en évidence chez des streptocoques oraux et *S. pneumoniae* ou de résistance aux acides mis en évidence chez d'autres genres bactériens n'ont pas été décrits chez *S. agalactiae* (Shabayek and Spellerberg, 2017).

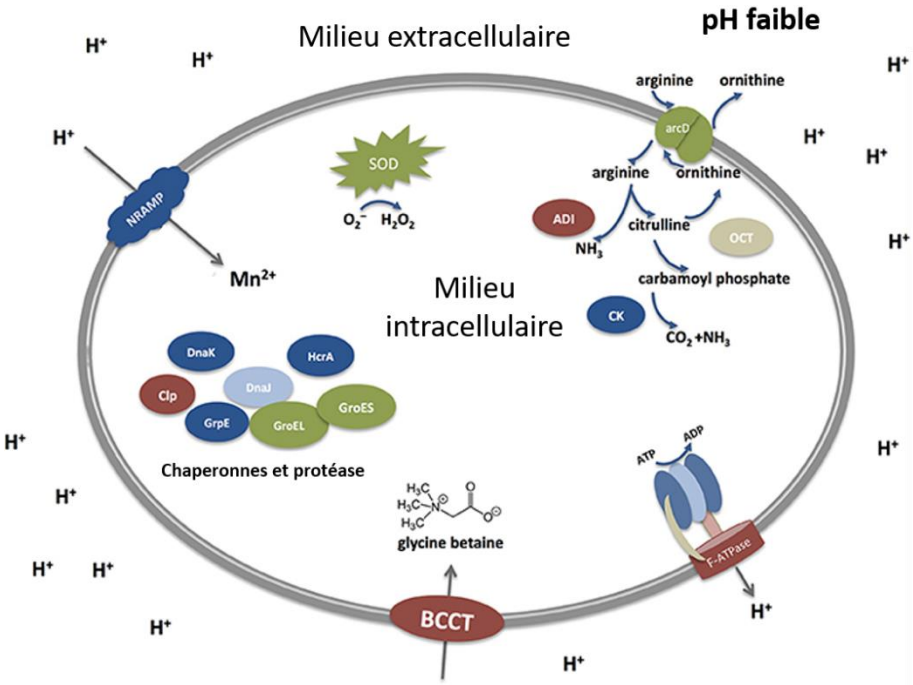


Figure 10. Les réponses au stress acide chez *S. agalactiae*.
S. agalactiae possède différents mécanismes de défense pour faire face à la diminution du pH. Ils comprennent le système Arginine déiminase (ADI), un transporteur F-ATPase, un transporteur de la famille BCCT, des chaperonnes et protéases et un transporteur de type NRAMP. D'après (Shabayek and Spellerberg, 2017).

4. Protéines universelles de stress

Les « Universal stress protein » (Usp) ou protéines universelles de stress sont des protéines ubiquitaires que l'on retrouve chez les bactéries, les archées, les champignons, les protozoaires et les plantes. Chez les bactéries, elles permettent de faire face à de nombreuses conditions de stress tels que la privation de nutriments, le stress oxydatif, une hausse de température ou un pH acide (Kvint et al., 2003; O'Connor and McClean, 2017). Elles possèdent soit un seul domaine d'une taille d'environ 140 à 160 acides aminés donnant lieu à une protéine d'environ 15 kDa soit plusieurs domaines. Les protéines Usp forment en général des dimères. Lorsqu'elles possèdent plusieurs domaines, elles peuvent posséder un domaine USP supplémentaire et/ou un autre domaine présentant d'autres fonctions comme une kinase ou une perméase d'acides aminés (Kvint et al., 2003; O'Connor and McClean, 2017; Chi et al., 2019) (Figure 11).

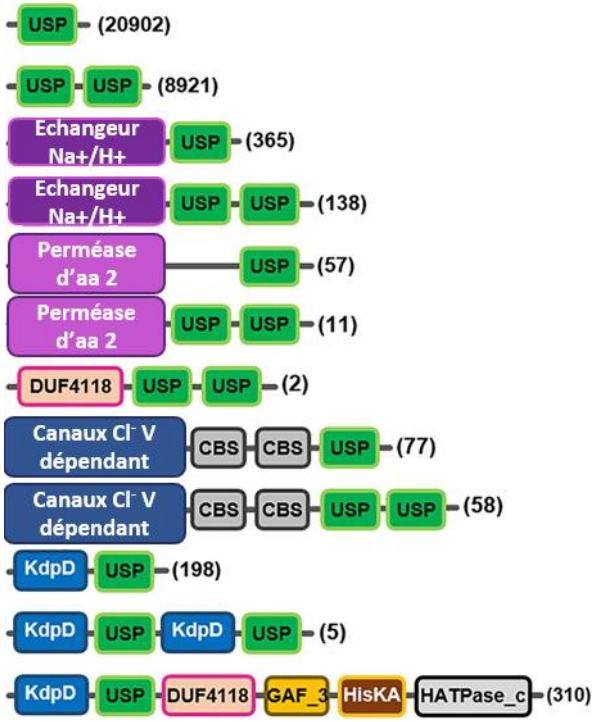


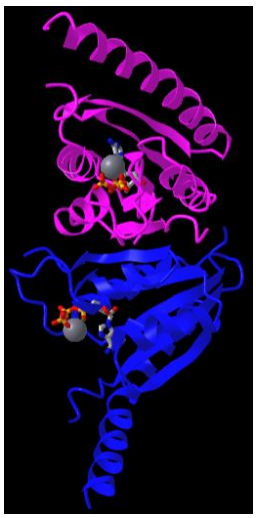
Figure 11. Structures des différentes protéines USP chez les bactéries.
Structures moléculaires des diverses Usp bactériennes contenant uniquement un domaine USP ou des domaines USP fusionnés avec d'autres motifs catalytiques, obtenues à partir de la base de données Pfam (https://pfam.xfam.org/family/Usp). Le nombre d'Usp ayant le même type de structure moléculaire est indiqué entre parenthèses sur le côté droit de la figure. Chaque type de domaine et de motif est représenté par des cases de couleur différente. aa pour acide aminé et V pour voltage. D'après (Chi et al., 2019).

Les organismes possédant des Usp possèdent plusieurs copies de gènes *usp*. Chez *E. coli*, l'organisme chez lequel ces protéines ont été les plus étudiées, il y a six gènes *usp* : *uspA*, *uspC*, *uspD*, *uspE*, *uspF* et *uspG*. La plupart de ces gènes sont exprimés de manière monocistronique

(Kvint et al., 2003). Les protéines codées par ces gènes ont été regroupées en classes : la classe I (UspA, C et D), classe II (UspF et G), classe III (UspE domaine 1) et classe IV (UspE domaine 2) selon les similarités de séquence dans le domaine USP (Gustavsson et al., 2002). Nachin et al. ont montré chez *E. coli* que des Usp d'une même classe, telles que UspA et UspC, pouvaient former des homodimères mais aussi des hétérodimères (Nachin et al., 2008). Le domaine USP, de numéro d'accession Pfam PF00582, forme une structure de sous-domaines α/β. La première résolution de structure de protéine Usp a été réalisée sur la protéine MJ0577 isolée de *Methanocaldococcus jannaschii* (Zarembinski et al., 1998) (Figure 12) et montrait que cette protéine liait l'ATP. La structure protéique de l'UspA de *Haemophilus influenzae* a ensuite été caractérisée et a été montré que cette protéine ne liait pas l'ATP (Sousa and McKay, 2001). Les auteurs ont donc suggéré de séparer les Usp en deux catégories : les Usp appartenant au premier groupe contenant un motif de liaison à l'ATP dans leur région C-terminale [G-2X-G-9X-(S/T)] et constituées de cinq brins β et de quatre structures en hélice α et un second groupe dépourvu de résidus de liaison à l'ATP et incapable de lier ou d'utiliser l'ATP (Sousa et McKay, 2001) (Figure 12). Chez certaines Usp, d'autres nucléotides comme l'AMP ou le désoxyadénosine monophosphate (dAMP) ont été retrouvés à la place de l'ATP dans les différentes structures sur « Protein Data Bank » (PDB) (Tkaczuk et al., 2013; Vollmer and Bark, 2018).

L'UspA de *E. coli* possède 68 % d'identité avec celle de *H. influenzae.* Bien que dépourvue du motif [G-2X-G-9X-(S/T)] de liaison à l'ATP présent chez *H. influenzae*, elle a pourtant été décrite comme une Sérine / Thréonine phosphoprotéine. De plus, les auteurs constatent qu'elle possède une séquence L/VXGXGXXGQVL/IXXXIKK située entre les acides aminés 83 et 101 qui a une homologie avec le domaine putatif de liaison nucléotidique des récepteurs tyrosine kinases eucaryotes (Freestone et al., 1997).

A



B

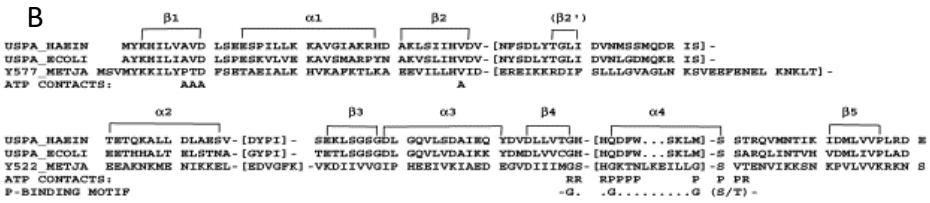


Figure 12. Structure des protéines de type UspA.
(A). Structure 3D de la protéine MJ0577 de *M. jannaschi* (Y577_METJA ; Q57997) sur NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?Dopt=s&uid=10389) d'après (Zarembinski et al., 1998). Les structures secondaires des monomères A et B sont représentées en rubans bleu et rose, les ions manganèse en boules grises et la molécule d'ATP en bâtonnets colorés (rouge pour les atomes d'oxygène, orange pour le phosphate et bleu pour l'azote).
(B) Alignement des séquences d'acides aminés de UspA de *H. influenzae* (USPA_HAEIN ; P44880), *E. coli* (USPA_ECOLI ; P28242), et *M. jannaschi* (Y577_METJA ; Q57997) basé sur les structures des UspA de *H. influenzae* et de MJ0577. La structure secondaire de la sous-unité A de UspA est représentée au-dessus de la séquence ; le court brin β antiparallèle est étiqueté β2' pour rester cohérent avec la convention de MJ0577. Les régions qui entrent en contact avec l'adénosine (A), le ribose (R), ou le triphosphate (P) de MJ0577 sont représentées, ainsi que les résidus qui semblent faire partie d'une séquence consensus dans la boucle de liaison ribose plus triphosphate (Sousa and McKay, 2001).

Les protéines Usp sont surexprimées à la suite de divers stress et agissent via différents mécanismes. Plusieurs études ont montré leurs rôles dans l'adaptation des bactéries pathogènes à leur hôte. Ainsi l'une des Usp de *Mycobacterium tuberculosis* est impliquée dans la phase de latence de la tuberculose. Par ailleurs, il a également été montré que certaines Usp étaient impliquées dans la survie *in vivo* de *Acinetobacter baumannii*, *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enterica* serovar Typhimirium et dans la formation de biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* et *Porphyromonas gingivalis* (O'Connor and McClean, 2017). Chez *Staphylococcus aureus*, une protéine Usp confère des propriétés d'adhésion à la fibronectine et au fibrinogène (O'Connor and McClean, 2017). Certaines Usp permettent aussi une protection de l'ADN (Kvint et al., 2003). Le rôle de ces protéines est ainsi très variable. Chez *E. coli*, les protéines UspC et UspE sont impliquées dans la mobilité alors que UspF et UspG sont impliquées dans l'adhésion. Ces deux paires de protéines ont donc des effets opposés. UspD est impliquée dans le contrôle du fer intracellulaire et UspA et UspD sont impliquées dans la défense contre le stress oxydatif (Nachin et al., 2005) (Figure 13). La

manière dont les protéines Usp agissent pour intervenir dans ces différents mécanismes n'est pas claire. Des études suggèrent que les Usp sont elles-mêmes des régulateurs globaux ou bien des échafaudages qui soutiennent les transporteurs ou les pompes et canaux membranaires, ainsi que la formation de biofilms (Vollmer and Bark, 2018).

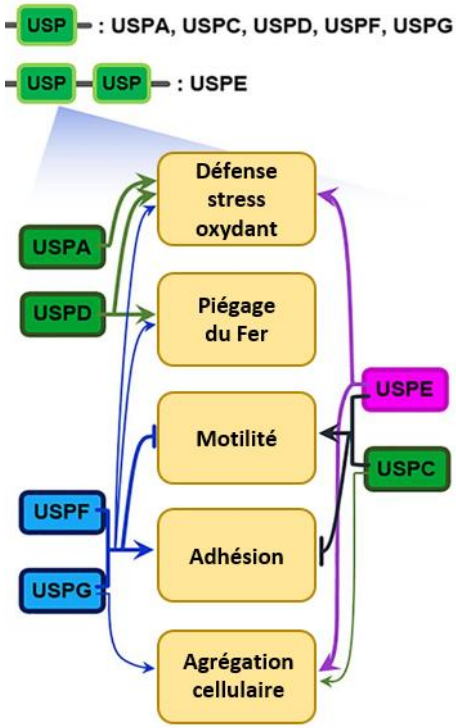


Figure 13. Rôles fonctionnels des Usp d'*E. coli*.
Rôles fonctionnels des six différentes Usp d'*E. coli* : UspA, UspC, UspD, UspE, UspF et UspG. Les flèches épaisses et fines indiquent respectivement les rôles majeurs et mineurs des Usp spécifiques. Les flèches en forme de T représentent l'inhibition des réponses physiologiques. Les Usp reliées entre elles (flèches noires) partagent des rôles physiologiques communs. D'après (Chi et al., 2019).

5. Perception et signalisation du stress

Pour percevoir les signaux dans leur environnement et orchestrer la réponse au stress, les bactéries possèdent de nombreux senseurs.

Certains nucléotides peuvent jouer un rôle essentiel lors de la perception d'un stress. C'est le cas notamment des molécules de (p)ppGpp (guanosine 3',5'-bis(diphosphate) et guanosine 3'-diphosphate,5'-triphosphate) dont l'accumulation va déclencher la réponse stringente (Irving et al., 2021) entraînant ainsi des modifications transcriptionnelles à large échelle. Certains nucléotides cycliques peuvent aussi jouer le rôle de seconds messagers. Chez les streptococoques, le c-di-AMP semble moduler la réponse au stress (Papadimitriou et al., 2016; Li et al., 2019, 1). Chez *S. agalactiae*, le c-di-AMP est nécessaire à l'homéostasie osmotique (Devaux et al., 2018).

Les facteurs sigma peuvent jouer un rôle essentiel dans la réponse bactérienne au stress. Chez *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Bacillus subtilis* et de nombreuses bactéries à Gram positif, le facteur σ^B joue un rôle important dans la réponse au stress. Cependant, les bactéries lactiques sont dépourvues de ce facteur (Papadimitriou et al., 2016). Chez *S. agalactiae* il existe trois facteurs sigma putatifs : le facteur majeur σ^A, ComX et le facteur sigma de type ECF (Glaser et al., 2002). A notre connaissance, il n'existe pas à ce jour d'étude phénotypique chez *S. agalactiae* qui démontre le rôle de ces facteurs sigma dans la réponse au stress. Chez *Lactococcus lactis*, ComX améliore la tolérance à l'acidité (Yuan et al., 2021).

Les bactéries possèdent aussi des systèmes à un ou deux composants, déjà évoqués plus haut dans la partie concernant la virulence, qui jouent un rôle majeur dans la perception et la transmission du signal. Chez *S. agalactiae*, certains systèmes à un composant, des régulateurs transcriptionnels, sont surexprimés en pH acide (Santi et al., 2009) tels que *adcR* impliqué dans l'homéostasie du zinc (Moulin et al., 2016) ou *rbsR*, le répresseur de l'opéron ribose. Comme évoqué plus haut, certains systèmes à deux composants tels que CovR/S et CiaR/H participent à la résistance à divers stress. En outre, d'autres molécules, comme les acides nucléiques et les lipides, peuvent également jouer le rôle de capteurs. Certaines d'entre elles, principalement les molécules d'ARN, peuvent déclencher une réponse par elles-mêmes, tandis que d'autres transfèrent des signaux à des partenaires protéiques qui les relaient ou déclenchent la réponse (Papadimitriou et al., 2016). Chez *S. agalactiae*, 10 ARNs régulateurs putatifs sont exprimés en réponse au stress acide et deux riboswitchs perçoivent une modification de pH (Rosinski-Chupin et al., 2015).

C. La répression catabolique chez les Firmicutes

1. Mécanisme global de la répression catabolique

La répression catabolique est un mécanisme de régulation présent chez les bactéries, mais aussi chez les levures et les champignons, qui permet de percevoir la présence des sucres de l'environnement et d'adapter leur métabolisme (Galinier, 2018). Ce mécanisme d'adaptation est impliqué dans des processus cellulaires variés et fait intervenir plusieurs protéines.

a) Schéma global

La répression catabolique est un mécanisme de régulation global qui permet aux bactéries de s'adapter aux changements environnementaux. Il correspond à l'effet inhibiteur d'un sucre, dans un environnement donné, sur l'expression ou l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme d'autres sucres. Il permet ainsi d'utiliser préférentiellement les sucres rapidement métabolisables dans un milieu (Görke and Stülke, 2008). Comme tout d'abord démontré par Monod en 1942, cela se traduit chez *Escherichia coli* par l'apparition d'une courbe de croissance biphasique, aussi appelée « diauxie », lorsque la bactérie est mise en présence d'un sucre « préférentiel », le glucose, et d'un sucre « secondaire », le lactose (Monod, 1942). Une première phase de croissance exponentielle est observée, durant laquelle le sucre préférentiel est utilisé par la bactérie tandis que les enzymes nécessaires à l'utilisation du sucre secondaire sont inhibées. Ce phénomène est appelé la « répression catabolique ». On observe ensuite une phase de latence pendant laquelle la bactérie va synthétiser les enzymes nécessaires à l'utilisation du sucre secondaire, suivie d'une seconde phase de croissance exponentielle grâce à l'utilisation du sucre secondaire (Galinier, 2018) (Figure 14).

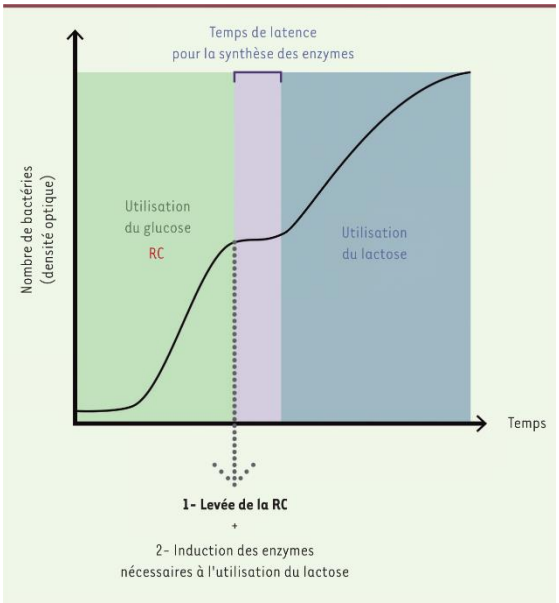


Figure 14. Phénomène de diauxie.
Lorsque des bactéries, telles que *E. coli*, sont cultivées sur milieu contenant deux sucres comme le glucose et le lactose, elles utilisent en priorité le glucose. Celui-ci est métabolisé par des enzymes synthétisées de façon constitutive alors que la synthèse des enzymes nécessaires à l'utilisation du lactose est réprimée (phénomène de répression catabolique ou RC). Quand le glucose est épuisé, la RC est abolie ; les bactéries peuvent induire spécifiquement la synthèse des enzymes impliquées dans la dégradation du sucre présent, le lactose, qui joue le rôle d'inducteur (Galinier, 2018).

La répression catabolique est un phénomène complexe, elle comprend un mécanisme de régulation global mais elle fait aussi intervenir des régulateurs spécifiques de certains opérons intervenant dans des mécanismes d'exclusion de l'inducteur ou des régulateurs contenant des domaines de régulation via les PTS (« PTS regulation domain » ou PRD) (Görke and Stülke, 2008). Les mécanismes de répression catabolique ont été très largement étudiés chez *E. coli* et *B. subtilis* qui ont servi comme modèles d'étude chez les *Enterobacteriaceae* et les Firmicutes respectivement (Görke and Stülke, 2008). En effet, chez *E. coli*, l'un des acteurs majeurs de la répression catabolique est l'EIIA^{Glc} impliquée dans le transport du glucose tandis que chez *B. subtilis* c'est HPr (histidine-containing protein) qui joue ce rôle (Deutscher et al., 2006). Cependant, dans les deux modèles d'étude, les composants du système des phosphotransférases (PTS) qui permettent l'entrée et la phosphorylation concomitante des sucres jouent un rôle majeur dans la répression catabolique (Deutscher et al., 2006).

b) Les systèmes des phosphotransférases

Les trois composants majeurs des PTS sont : l'enzyme I (EI) codée par le gène *ptsI*, la protéine HPr codée par le gène *ptsH* et l'enzyme II formée de complexes multi-protéiques. L'enzyme I et HPr sont des protéines solubles et communes à tous les PTS. En revanche, les enzymes II sont spécifiques d'un type de substrat donné. Le complexe EII possède deux protéines solubles EIIA et EIIB et une ou deux protéines transmembranaires (EIIC et parfois EIID) (Deutscher et al., 2006; Galinier, 2018)

L'enzyme I s'autophosphoryle en présence d'un donneur de phosphate : le phosphoénolpyruvate (PEP), produit de la glycolyse et riche en énergie (Weigel et al., 1982). Le transfert des sucres via les PTS est réalisé grâce à un phosphotransfert du PEP vers l'EI, de EI à HPr, de HPr à EIIA puis de EIIA à EIIB et enfin vers le sucre dont la translocation est réalisée par EIIC et, dans certains cas, EIID (Figure 15). Les PTS ont été classés en quatre (super)familles sur la base de la phylogénie des EII : (i) la superfamille du glucose-fructose-lactose, composée de la famille du glucose, de la famille du fructose-mannitol et de la famille du lactose ; (ii) la superfamille de l'ascorbate-galactitol, composée de la famille de l'ascorbate et la famille du galactitol ; (iii) la famille du mannose et (iv) la famille des dihydroxyacétones (Deutscher et al., 2006).

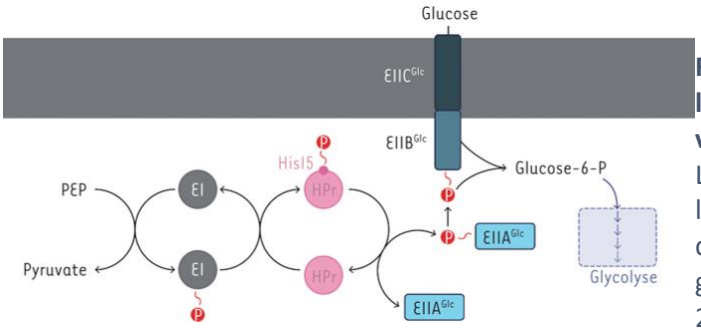


Figure 15. Représentation schématique de l'entrée et de la phosphorylation du glucose via un transporteur PTS.
Les composants du PTS : enzyme I (EI), HPr et l'enzyme II spécifique du glucose (EII) composées de trois sous-unités. P : groupement phosphate. D'après (Galinier, 2018).

Chez *S. agalactiae*, le séquençage du génome de la souche NEM316 a permis d'identifier 17 EII putatives permettant le transport des sucres : cellobiose, β-glucoside, tréhalose, mannose, lactose, fructose, mannitol, *N*-acétylgalactosamine et glucose (Glaser et al., 2002). Par ailleurs, d'autres transporteurs ont pu être identifiés : 4 transporteurs de type ABC, 3 glycérol-perméases et une glycérol-phosphate perméase (Glaser et al., 2002). Chez la souche A909 de *S. agalactiae*, dans la banque de données KEGG (https://www.kegg.jp/kegg/), on trouve une quarantaine de gènes appartenant potentiellement à des composants des transporteurs PTS.

2. HPr

Cette protéine d'environ 9 à 10 kDa a été mise en évidence chez de nombreuses bactéries (Postma et al., 1993). Lors des phosphotransferts, HPr est phosphorylée au niveau du noyau imidazole de l'histidine 15. La région autour de cette histidine est particulièrement bien conservée chez la plupart des bactéries entériques et les Firmicutes (Weigel et al., 1982; Powers and Roseman, 1984; Deutscher et al., 1986).

P-His-HPr, tout comme P-EIIA et P-EIIB, peut également intervenir dans la répression catabolique en phosphorylant des régulateurs possédant des domaines PRD. Ces régulateurs sont des anti-terminateurs ou activateurs transcriptionnels qui régulent un petit nombre de gènes ou d'opérons codant généralement des PTS (Galinier, 2018). Au niveau de leur structure, ils ont en commun un domaine effecteur en N-terminal qui se lie à l'ARN (pour les anti-terminateurs) ou à l'ADN (pour les activateurs) et deux domaines de régulation appelés PRD1 et PRD2 qui possèdent des histidines conservées pouvant être phosphorylées (van Tilbeurgh and Declerck, 2001). L'état de phosphorylation des domaines PRD1 et PRD2 conditionne l'activation ou l'inhibition de ces régulateurs (Deutscher et al., 2006).

Par exemple, la protéine LicT est un antiterminateur transcriptionnel impliqué dans le métabolisme des β-glucosides chez *B. subtilis*. Elle régule l'expression de l'opéron *bgl*. P-EIIB^{Bgl}, inhibe l'activité de LicT en phosphorylant le domaine PRD1 alors que P-His-HPr stimule la

fixation de LicT à l'ARN en phosphorylant le domaine PRD2. En absence de glucose (ou d'un sucre répresseur) et en présence de β-glucosides, les histidines du PRD1 ne sont pas phosphorylées alors que celles du PRD2 le sont. LicT se fixe sur l'ARN au niveau de la région RAT (antiterminateur ribonucléique) et empêche la formation d'un terminateur ; il y a donc transcription de la totalité de l'opéron *bgl* (Galinier, 2018) (Figure 16).

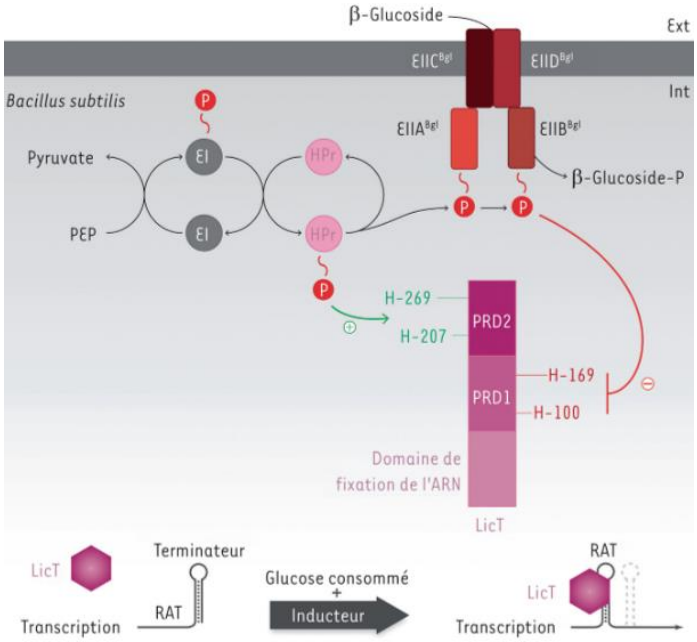


Figure 16. Régulation des régulateurs transcriptionnels contenant des PRD : cas de l'antiterminateur LicT de *Bacillus subtilis*.
D'après (Galinier, 2018).

D'autres rôles de P-His-HPr ont pu être démontrés comme un rôle dans le quorum sensing chez *E. coli* (Ha et al., 2018) ou dans la résistance à des peptides antimicrobiens chez *B. subtilis* (Garcia De Gonzalo et al., 2015).

Chez la plupart des bactéries à Gram positif à faible pourcentage en G+C, HPr peut être phosphorylé sur la Sérine 46 par une HPr kinase/phosphorylase ATP dépendante (HPrK/P) (Deutscher et al., 2006). Le fructose 1,6 bis-phosphate (FBP), produit de la glycolyse, induit l'activité kinase de l'HPrK/P tandis que le phosphate inorganique (Pi) induit l'activité phosphorylase. En présence d'un sucre rapidement métabolisable, le FBP augmente alors que le Pi diminue, induisant ainsi l'activité kinase de HPrK/P. Cela entraîne une augmentation de la forme séryl-phosphorylée d'HPr (P-Ser-HPr) (Deutscher et al., 1985, 2006) (Figure 17).

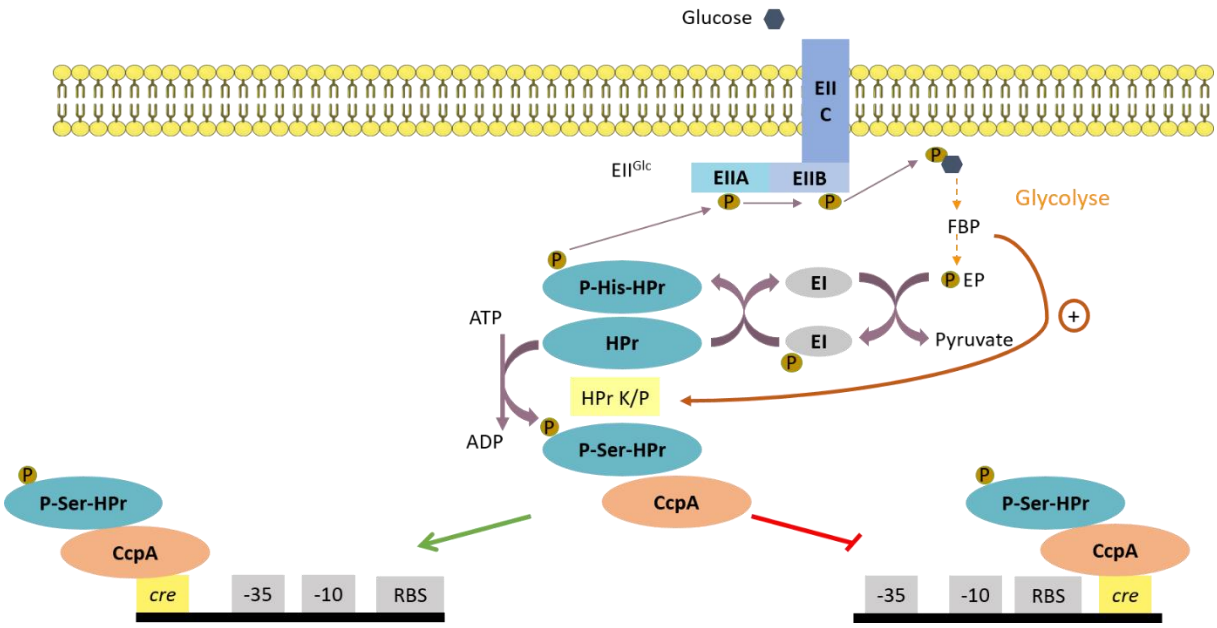


Figure 17. La répression catabolique chez *Bacillus subtilis*.
L'entrée du glucose par le PTS est couplée à sa phosphorylation. Le glucose-6-Phosphate (G6P) peut entrer dans la glycolyse. Cela conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire de fructose 1,6 bis-phosphate (FBP). Ce métabolite stimule l'activité kinase de l'HPr (histidine-containing protein) kinase/phosphorylase (HPrK/P) et donc la phosphorylation ATP-dépendante d'HPr au niveau du résidu Serine 46. Le complexe P-Ser-HPr/CcpA se lie aux séquences *cre* (*cis*-acting catabolite responsive element) pour activer ou inhiber l'expression des gènes. + : activation de l'HPrK/P, vert activation de la transcription, rouge : inhibition de la transcription. Schéma adapté de (Deutscher et al., 2006; Galinier, 2018).

La phosphorylation d'HPr au niveau de l'Histidine 15 défavorise la phosphorylation de la Sérine 46 et vice versa. Les concentrations des différentes formes d'HPr (HPr, P-His-HPr, P-Ser-HPr et HPr doublement phosphorylée) sont dépendantes de deux enzymes : l'HPrK/P et l'EI dont les activités sont impactées par la présence de sucres rapidement métabolisables (Deutscher et al., 2006). Selon les espèces bactériennes, ces deux phosphorylations ne sont pas toujours compatibles *in vivo* (Galinier, 2018). Par son état de phosphorylation, HPr permet donc de centraliser différents signaux (Deutscher et al., 2006).

P-Ser-HPr ne joue pas un rôle dans les phosphotransferts du PTS mais joue un rôle de régulateur de la répression catabolique (Galinier, 2018). Ainsi, sous sa forme séryl-phosphorylée, HPr peut se lier à CcpA (catabolite control protein A) conduisant à leur fixation à des sites opérateurs (Schumacher et al., 2004).

Chez les Firmicutes, P-Ser-HPr peut aussi jouer un rôle dans « l'exclusion de l'inducteur ». La protéine peut ainsi inhiber des transporteurs de sucres non PTS, le plus souvent des ABC transporteurs (ATP-binding cassette transporters). Cela bloque l'induction de la transcription des gènes cataboliques correspondants (Galinier, 2018). Par exemple, il a notamment été

proposé que P-Ser-HPr interagissait directement avec l'ABC transporteur du maltose chez *Lactococcus casei* inhibant ainsi le transport de ce sucre (Monedero et al., 2007).

Certaines études ont cherché à déterminer si P-Ser-HPr participait à un mécanisme appelé « expulsion de l'inducteur ». Ce mécanisme correspond à l'expulsion de dérivés de sucres non rapidement métabolisables en dehors de la bactérie quand la bactérie se trouve dans un environnement contenant des sucres préférentiels. Par exemple, les streptocoques et les lactocoques sont capables d'importer des molécules non rapidement métabolisables comme le TMG (Thiométhyl-β -galactoside) ou le 2DG (2-désoxy-D-glucose) qui restent sous forme phosphorylée dans le cytoplasme (Deutscher et al., 2006). En présence d'un sucre rapidement métabolisable, ces composés sont déphosphorylés avant d'être expulsés. Chez *L. lactis*, P-Ser-HPr augmente l'expulsion du TMG (Ye et al., 1994). Cependant, chez un mutant *ptsH1* (incapable de produire P-Ser-HPr), le 2DG est expulsé aussi bien que chez la souche sauvage en présence de glucose ou de mannose tandis que l'expulsion du TMG est légèrement ralentie (Monedero et al., 2001). Il semblerait donc que P-Ser-HPr joue seulement un rôle indirect dans l'expulsion du TMG (Deutscher et al., 2006).

Tous les rôles d'HPr évoqués précédemment montrent l'importance de cette protéine. Chez plusieurs bactéries, elle est impliquée dans le métabolisme du carbone mais aussi dans la virulence (Deutscher et al., 2005; Pätzold et al., 2021).

Certains bacilles et certaines clostridies possèdent une protéine homologue d'HPr, appelée Crh (catabolite repression HPr) (Galinier et al., 1997). Cette protéine ne possède pas d'Histidine 15 mais possède une région conservée au niveau de la Sérine 46 et peut être phosphorylée par l'HPrK/P. Elle est aussi impliquée dans la répression catabolique mais son rôle est beaucoup moins important puisque sa seule délétion n'abolit pas la répression catabolique chez *B. subtilis* (Galinier et al., 1997).

3. Interaction entre CcpA et HPr

Chez les *Bacilli*, l'affinité de CcpA pour P-Ser-HPr est 50 fois plus élevée que pour HPr (Jones et al., 1997). La liaison de deux molécules de P-Ser-HPr à un dimère de CcpA va induire une rotation des sous-domaines N-terminal et C-terminal du domaine de dimérisation/fixation du corépresseur de CcpA conduisant à la liaison de CcpA à ses sites opérateurs appelés sites « *cre* » (*cis*-acting catabolite responsive element) (Schumacher et al., 2004) (Figure 18).

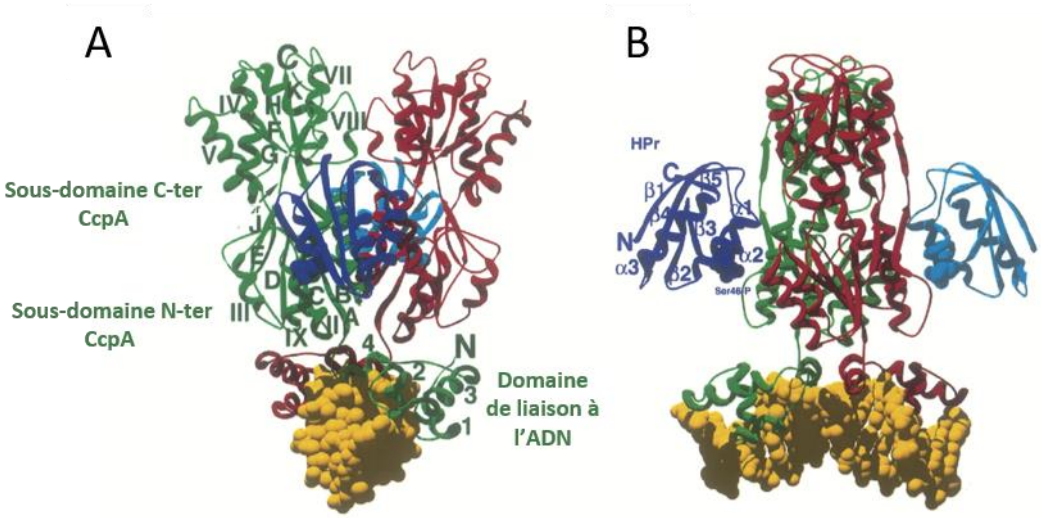


Figure 18. Structure du complexe ternaire CcpA-P-Ser-HPr-*cre*.
(A) Diagramme en ruban du complexe CcpA-(P-Ser-HPr)-*cre*. Les sous-unités CcpA sont colorées en rouge et vert, P-Ser-HPr en bleu et cyan, et l'ADN en jaune. (B) Vue de la figure 18 (A) tournée de 90°. Le résidu Ser46-P est marqué. D'après (Schumacher et al., 2004).

Schumacher et al. ont montré que l'ajout de glucose-6-phosphate ou FBP, augmente la liaison de CcpA-(P-Ser-HPr) à l'ADN en favorisant les interactions croisées entre P-Ser-HPr fixée à une sous-unité de CcpA et l'autre sous-unité de CcpA (Schumacher et al., 2011). Cependant, quand P-Ser-HPr est présente à une concentration élevée dans la cellule, elle semble suffisante pour induire la répression catabolique alors que les intermédiaires glycolytiques ne semblent pas essentiels (Jones et al., 1997; Deutscher et al., 2006).

Cependant, la fixation de CcpA aux sites *cre* ne nécessite pas toujours la présence du co-effecteur P-Ser-HPr chez tous les Firmicutes. Par exemple, chez *Clostridioides difficile* la présence d'HPr n'est pas nécessaire pour la fixation aux sites *cre* (Antunes et al., 2012). Chez *S. pyogenes*, DebRoy et al. ont démontré que HPr était nécessaire à CcpA pour réguler certains gènes mais pas tous (DebRoy et al., 2020).

4. CcpA (catabolite control protein A)

a) Mécanisme d'action de CcpA

CcpA, protéine d'environ 37 kDa, est un régulateur transcriptionnel pléiotrope appartenant à la famille des répresseurs LacI/GalR (Weickert and Adhya, 1992) qui joue sur la régulation de nombreuses enzymes (Deutscher et al., 1994, 2006; Grundy et al., 1994; Miwa et al., 1994). CcpA se fixe à des séquences *cre* pour exercer la répression catabolique ou l'activation catabolique. Les éléments *cre* agissent en *cis*. Ces séquences sont des palindromes imparfaits avec une séquence fortement dégénérée : WTGNNARCGNWWWCAW (W pour A ou T, R pour A ou G et N pour n'importe quel nucléotide) chez *B. subtilis* (Weickert and Chambliss, 1990; Miwa et al., 2000; Schumacher et al., 2011) (Figure 19). Chez *Streptococcus suis*, deux sites

consensus *cre* ont été identifiés : WWGAAARCGYTTTCWW et un nouveau site *cre2* TTTTYHWDHHWWTTTY (Y pour C ou T) (Willenborg et al., 2014) (Figure 19).

La séquence *cre* « TGAAARCGYTWWCA » proposée par DBTBS (Makita et al., 2004) pour *B. subtilis* a été utilisée pour l'étude de Marciniak et al.. Ils ont montré que les bases G_3, C_8 et G_9 étaient très conservées (numéros attribués selon la Figure 19) (Weickert and Chambliss, 1990; Miwa et al., 2000; Schumacher et al., 2011; Marciniak et al., 2012). De plus, les séquences *cre* pour lesquelles CcpA a une forte affinité ont aussi un G_7, C_{10}, C_{14} et A_{15} plus conservés et une séquence plus palindromique (Figure 19) (Marciniak et al., 2012).

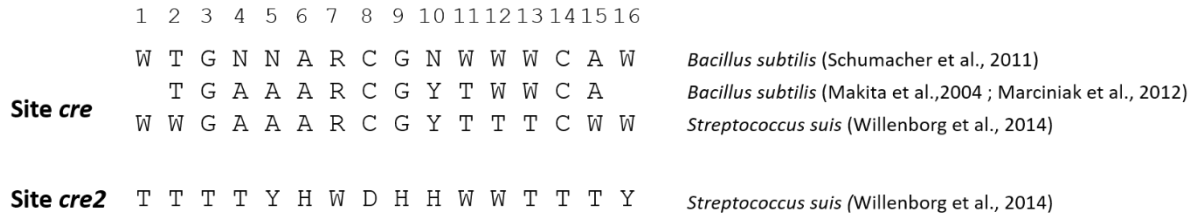


Figure 19. Alignement des séquences *cre* chez *Bacillus subtilis* et *Streptococcus suis*.
Les séquences *cre* de plusieurs études ont été alignées (Makita et al., 2004; Schumacher et al., 2011; Marciniak et al., 2012; Willenborg et al., 2014).

La force de la régulation par CcpA dépend donc de la nature de certaines bases situées à des positions spécifiques de la séquence *cre*, de la nature palindromique des séquences, de la position de la séquence *cre* par rapport au +1 de transcription (Marciniak et al., 2012) ainsi que des séquences à proximité de la séquence *cre* (Turinsky et al., 1998; Zalieckas et al., 1998b).

Il peut y avoir plusieurs sites *cre* par unité de transcription, parfois un seul est fonctionnel, parfois plusieurs le sont (Gösseringer et al., 1997; Miwa et al., 1997; Turinsky et al., 1998; Burne et al., 1999).

Quand CcpA agit comme un répresseur, les séquences *cre* se situent plutôt dans la région promotrice et la région 5' d'unité de transcription (Figure 17). CcpA peut agir de différentes manières : 1) par un mécanisme de blocage de l'élongation (« roadblock ») (Jacob et al., 1991; Zalieckas et al., 1998a, 1998b; Inácio et al., 2003; Choi and Saier, 2005), 2) en empêchant la fixation de l'ARN polymérase au promoteur (Grundy et al., 1994; Krüger and Hecker, 1995) ou 3) en interagissant avec la sous-unité σ de l'ARN polymérase déjà fixée au promoteur (Kim et al., 2005; Marciniak et al., 2012).

Lorsque CcpA agit comme un activateur, la séquence *cre* se situe plutôt en amont du promoteur, en amont de la boîte -35. Cependant, chez *B. subtilis* des analyses informatiques ont montré la présence de sites *cre* dans la plupart des opérons soumis à la répression

catabolique via CcpA mais peu de sites *cre* ont été trouvés dans les gènes soumis à l'activation catabolique via CcpA (Moreno et al., 2001). Cela montre que le mécanisme de régulation proposé pour la répression catabolique n'est pas suffisant pour expliquer l'activation catabolique (Blencke et al., 2003; Lorca et al., 2005; Marciniak et al., 2012).

Par ailleurs, il a été montré que CcpA pouvait aussi réprimer des gènes par un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle. En effet, chez *Streptococcus oligofermentans,* CcpA régule l'opéron *comCDE*, qui est impliqué dans la compétence, en se fixant à l'ARNt^{Arg} dont le gène se situe en amont de l'opéron ComCDE. Cela empêche la formation d'un ARN polycistronique ARNt^{Arg}-*comCDE* et permet une régulation fine de la quantité de ComE (Wang et al., 2019). En plus du schéma habituel classique de régulation de CcpA, il existe donc des mécanismes de régulation par CcpA qui restent à élucider.

b) Régulon de CcpA chez les Firmicutes

(1) Rôle de CcpA dans la physiologie

Chez *B. subtilis*, CcpA régule un large ensemble de gènes : des transporteurs ainsi que des gènes impliqués dans les métabolismes du carbone, de l'azote et du phosphate mais aussi des gènes impliqués dans le cycle de Krebs, dans la production de métabolites secondaires et la synthèse d'enzymes extracellulaires (Fujita, 2009). Lorca et al. ont montré que CcpA pouvait réguler aussi des gènes impliqués dans la réponse au stress (Lorca et al., 2005). Ainsi, environ 10 % des gènes de *B. subtilis* sont régulés par CcpA (Moreno et al., 2001), ce qui montre que c'est un régulateur majeur.

Par la suite, le régulon de CcpA a été étudié chez certaines espèces de streptocoques. Chez *S. pyogenes*, la protéine CcpA régule entre 20 et 30 % du génome selon les études (Shelburne et al., 2008; DebRoy et al., 2020). Chez *S. suis*, elle régule environ 10 % du génome (Willenborg et al., 2014) alors que chez *S. mutans* elle ne régule que 48 gènes sur 1960 dans les conditions testées (Zeng et al., 2013).

Chez *S. pyogenes*, CcpA régule des gènes impliqués dans le transport, dans le métabolisme des glucides et des acides aminés, dans la réponse au stress, dans la transcription mais aussi des gènes codant des protéines impliquées dans la virulence (Figure 20) (Shelburne et al., 2008).

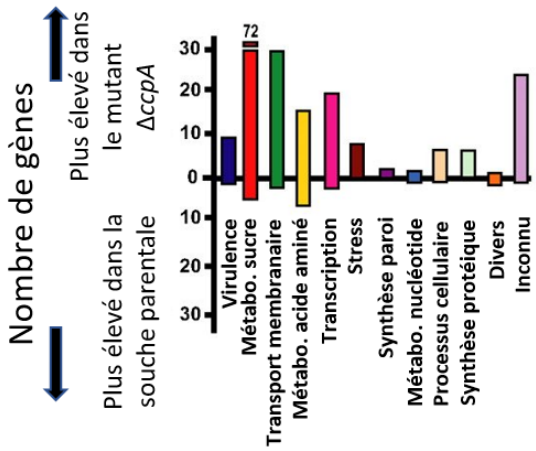


Figure 20. Analyse du transcriptome de CcpA chez *Streptococcus pyogenes*.
Les souches MGAS5005 WT et Δ*ccpA* ont été cultivées en début et en fin de phase de croissance exponentielle en milieu Todd–Hewitt supplémenté avec un extrait de levure (THY). Les gènes dont les niveaux de transcription étaient modifiés ont été regroupés par catégorie fonctionnelle. Les valeurs au-dessus de l'axe des abscisses indiquent des niveaux de transcription de gènes plus élevés dans la souche Δ*ccpA* et les valeurs au-dessous indiquent des niveaux de transcription de gènes plus élevés dans la souche de type sauvage MGAS5005. Métabo. : métabolisme. D'après (Shelburne et al., 2008).

(2) Rôle de CcpA dans la pathogénicité

Chez les bactéries à Gram positif, des études ont montré le rôle de CcpA dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la virulence. Ainsi chez divers pathogènes l'implication de CcpA a été démontrée dans plusieurs phénomènes : la production de la capsule (Shelburne et al., 2008), la colonisation (Shelburne et al., 2008; Watson et al., 2013), la formation de biofilm (Seidl et al., 2008; Zheng et al., 2012), la lyse des globules rouges (Kinkel and McIver, 2008; Shelburne et al., 2008), la signalisation inter-espèce (Johnson et al., 2009), la production de toxines (Antunes et al., 2012; Dufresne et al., 2022) et la sporulation (Antunes et al., 2012). Chez les streptocoques, plusieurs études ont mis en évidence le rôle de CcpA dans la pathogénicité. Chez *S. pyogenes*, en présence de glucose, CcpA réprime *sagA* dont l'opéron permet la production de streptolysine S et active *hasA* dont l'opéron permet la synthèse de la capsule. Par ailleurs, CcpA active l'expression des gènes *speB* (codant une cysteine protéase), *mac* (codant une enzyme dégradant les immunoglobulines) et *spd3* (codant une DNase) dans la salive humaine (Shelburne et al., 2008). De plus, CcpA active l'expression de Mga (Almengor et al., 2007), régulateur majeur de *S. pyogenes*. Il régule 10 % des gènes et est impliqué dans l'absorption et le métabolisme des sucres, ainsi que dans la virulence en jouant un rôle dans l'adhérence, l'internalisation dans les cellules de l'hôte et l'évasion du système immunitaire (Hondorp and McIver, 2007) (Figure 21). De plus, il a été montré que CcpA était nécessaire à la colonisation de l'oropharynx et à la virulence chez des souris (Shelburne et al., 2008).

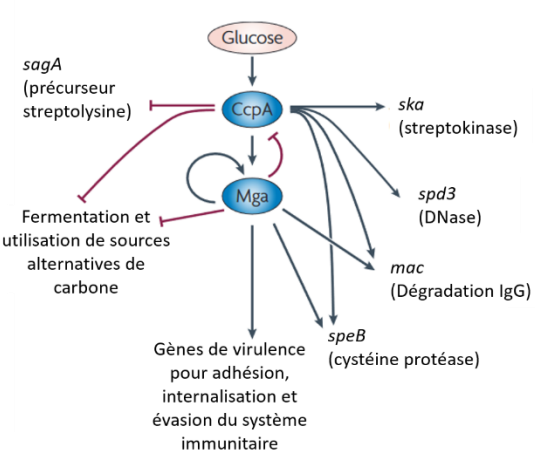


Figure 21. Interaction entre la répression catabolique médiée par CcpA et l'expression des gènes de virulence chez *Streptococcus pyogenes*.
En plus des gènes impliqués dans l'utilisation des sucres, CcpA contrôle directement l'expression de plusieurs gènes ayant des fonctions importantes dans la virulence de *S. pyogenes*. De plus, CcpA active l'expression de *mga*, qui code le régulateur principal de la virulence. En outre, Mga active sa propre expression et réprime l'expression de CcpA. Le régulon CcpA-Mga permet aux cellules de *S. pyogenes* d'activer des fonctions de virulence lorsque de nouveaux tissus riches en glucose de l'hôte sont colonisés. D'après (Görke and Stülke, 2008).

Chez *S. pneumoniae*, Iyer et al. ont montré que CcpA était nécessaire pour la colonisation du nasopharynx, la survie et la multiplication dans le poumon (Iyer et al., 2005). *Chez S. mutans*, les fonctions liées à la virulence, telles que l'expression du gène de la fructanase, la formation d'acide et la tolérance à l'acide sont régulés par CcpA. Par conséquent, la capacité de *S. mutans* à provoquer des caries est régi en grande partie par CcpA (Görke and Stülke, 2008).

Chez *S. suis*, un pathogène zoonotique qui provoque des infections chez le porc et l'Homme, CcpA régule plusieurs gènes impliqués dans la virulence (Willenborg et al., 2011).

Plusieurs études ont également mis en évidence un lien entre CcpA et sensibilité aux antibiotiques. CcpA est impliqué dans la résistance aux bêta-lactamines chez *S. aureus* et *Streptococcus gordonii* (Seidl et al., 2006; Bizzini et al., 2007; Reed et al., 2018). Chez *S. aureus* la délétion du gène *ccpA* conduit aussi à une augmentation de la sensibilité à la teicoplanine chez une souche résistante à la téicoplanine (Seidl et al., 2006) et aux aminoglycosides (kanamycine et néomycine), au chloramphénicol et à la fosfomycine chez la souche clinique (SA564). Chez *Bacillus thuringiensis*, en présence de glucose, CcpA réprime l'expression du gène *rppA* impliqué dans la résistance à la virginiamycine M1 et la lincomycine (Cai et al., 2003).

(3) Rôle de CcpA dans la réponse au stress

Bien que plusieurs études transcriptomiques et protéomiques aient montré que CcpA régulait des gènes impliqués dans la réponse au stress chez diverses bactéries (Lorca et al., 2005; Antunes et al., 2012; Zhang et al., 2020), très peu d'études phénotypiques ont été réalisées pour montrer l'implication de CcpA dans la résistance au stress. Deux études chez des espèces de *Lactobacillus* ont montré que la délétion de CcpA modifiait la résistance à plusieurs stress tels que le stress thermique, oxydatif, froid et la privation de nutriments (Zotta et al., 2012; Li et al., 2016).

OBJECTIFS

Streptococcus agalactiae est une cause majeure de morbidité et de mortalité chez les nouveau-nés dans le monde entier. Le décryptage de ses mécanismes d'adaptation est essentiel pour comprendre comment cette bactérie parvient à coloniser son hôte. Parmi les différents mécanismes d'adaptation possibles, nous nous sommes particulièrement intéressés à la capacité de *S. agalactiae* à prendre en charge des sucres rapidement métabolisables, et donc au mécanisme de la répression catabolique.

Quelques études ont pu mettre en évidence certains aspects nous amenant à penser que la répression catabolique était importante dans l'adaptation de *S. agalactiae* à son environnement.

Deux études réalisées chez *S. agalactiae* A909 ont permis de mettre en évidence un opéron *fru₂* présent chez divers complexes clonaux de *S. agalactiae* (Patron et al., 2015) et soumis à la répression catabolique (Patron et al., 2016). Cet opéron code, entre autres, l'enzyme II Fru_2 d'un PTS ($EIIB^{Fru2}$, $EIIA^{Fru2}$ et $EIIC^{Fru2}$) permettant le transport de D-allose dans la bactérie. Ce transporteur, en permettant l'import de ce sucre rare, permet donc à *S. agalactiae* de s'adapter aux nutriments présents son environnement. La transcription de *fru₂* est ainsi induite en présence de D-allose, mais aussi de D-ribose, en liquide amniotique ou en liquide cérébrospinal et est régulée par l'intervention du PTS^{Fru2}, Fru_2R (phosphorylé grâce à la protéine HPr) et CcpA (Patron et al., 2016). Cette étude a donc permis de montrer l'importance des protéines de la répression catabolique dans la régulation d'un transporteur qui permet à *S. agalactiae* de s'adapter aux sucres présents dans son environnement, notamment lors d'une infection.

Une autre étude a porté sur l'impact de l'ajout de glucose dans un milieu riche sur un temps court et a montré que 640 gènes (soit environ un tiers du génome) étaient différentiellement exprimés entre ces deux conditions dans la souche 2603V/R de *S. agalactiae*. La plupart de ces gènes étaient impliqués dans le métabolisme énergétique et le transport. Certains étaient aussi impliqués dans la réponse au stress et l'interaction hôte-pathogène. Les auteurs ont montré que de nombreux régulateurs différentiellement exprimés en glucose possédaient un site *cre* putatif dans leur région promotrice suggérant que le régulateur transcriptionnel CcpA pourrait jouer un rôle important chez *S. agalactiae* dans la régulation des gènes en présence de glucose (Di Palo et al., 2013).

Enfin, une étude réalisée par Hooven et al. avec la souche A909 de *S. agalactiae* a permis d'identifier par séquençage d'une banque de mutants de transposons (Tn-seq) obtenue en

bouillon trypticase soja, que les gènes *ptsI* codant l'Enzyme I, *ptsH* codant la protéine HPr et *ccpA* étaient des gènes essentiels chez *S. agalactiae*, de par l'absence de transposon dans leurs séquences (Hooven et al., 2016) (Figure 22) démontrant ainsi l'importance des gènes impliqués dans la répression catabolique dans la physiologie de *S. agalactiae*.

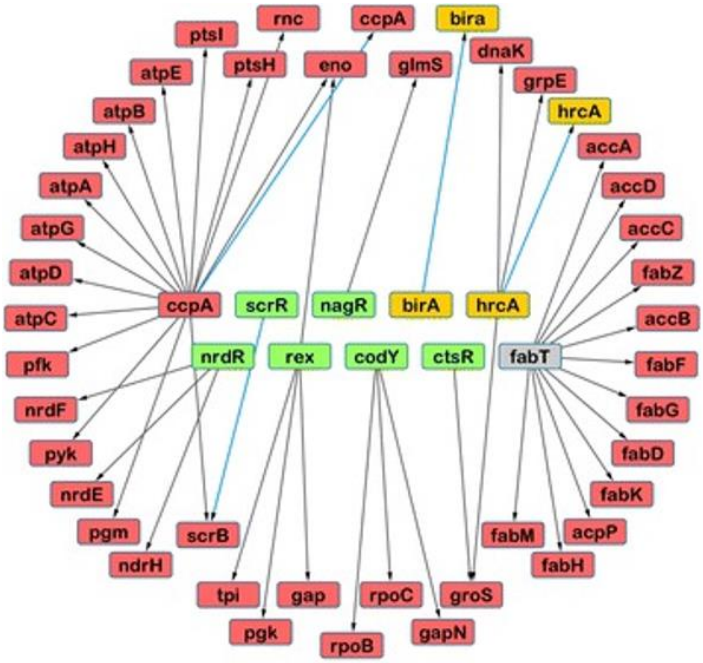


Figure 22. Essentialité des gènes de la souche A909 de *S. agalactiae*.
Les gènes essentiels et critiques régulés par des facteurs de transcription sont représentés. L'ensemble central est constitué de régulateurs transcriptionnels dont on prédit qu'ils affectent la transcription des gènes de l'anneau extérieur. Les gènes sont codés par couleur (vert = non essentiel, jaune = critique, rouge = essentiel, gris = indéfini). La signalisation autorégulatrice des facteurs de transcription est indiquée par une flèche bleue. D'après (Hooven et al., 2016).

Ce travail de thèse s'est focalisé sur le rôle de HPr et CcpA, deux acteurs majeurs de la répression catabolique, dans la physiologie et l'adaptation au stress que *S. agalactiae* rencontre lors de la colonisation vaginale. Dans un premier temps nous avons cherché à obtenir un mutant délété ou substitué du gène *ptsH* codant la protéine HPr dans la souche A909 afin d'étudier le rôle de cette protéine, tant sur le versant de la répression catabolique, que sur le versant de sa capacité à réguler des protéines via phosphorylation. Nous nous sommes ensuite demandé, comme c'est le cas chez les bactéries à Gram positif, s'il y avait une interaction directe entre HPr et CcpA, afin de déterminer si CcpA, chez *S. agalactiae*, a besoin de HPr pour être active. Enfin, dans une troisième partie nous avons déterminé les gènes régulés par CcpA et avons confirmé le site de fixation de la protéine à l'ADN. Puis nous avons déterminé l'importance CcpA dans la réponse à divers stress habituellement rencontrés par *S. agalactiae* dans son environnement, ainsi que son importance dans la formation de biofilm. Nous nous sommes ensuite demandé, parmi les protéines régulées par CcpA, si certaines

étaient responsable des phénotypes observés pour le mutant de CcpA. Nous avons ainsi travaillé sur l'importance de deux protéines de type Usp et une hélicase à ARN à motif DEAD dans la réponse de *S. agalactiae* au stress.

TRAVAUX EXPERIMENTAUX

A. Quel est le rôle d'HPr chez *S. agalactiae* ?

Contrairement à *B. subtilis* (Deutscher et al., 1994), il a été démontré chez plusieurs streptocoques tels que *S. pyogenes* ou *S. pneumoniae*, qu'HPr ou P-Ser-HPr étaient essentielles (Fleming et al., 2015; Le Breton et al., 2015; DebRoy et al., 2020). Chez *S. agalactiae*, *ptsH* est décrit comme un gène essentiel en milieu riche (Hooven et al., 2016). Il est en opéron avec le gène *ptsI* situé en aval, qui lui aussi a été décrit comme essentiel dans les conditions de Hooven et al (Figure 22-23) (Hooven et al., 2016). Cependant, le mutant A909Δ*ptsI* a pu être obtenu au laboratoire en milieu TH et présente un fort retard de croissance, nous conduisant ainsi à dire que, dans nos conditions, *ptsI* n'est pas essentiel à *S. agalactiae* mais est d'une importance « critique » pour sa croissance. Ces résultats nous ont donc amené à nous demander si le gène *ptsH* était bien essentiel à la croissance de *S. agalactiae* dans nos conditions de cultures. Si tel était le cas, la délétion du gène *ptsH* dans les conditions habituellement réalisées au laboratoire ne serait pas possible.



Figure 23. Région chromosomique contenant l'opéron *ptsH-ptsI* dans la souche A909.
nrdH : gène codant une glutaredoxine-like, *ptsH* : gène codant HPr, *ptsI* : gène codant EI et *gapN* : gène codant une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dépendante du NADP.

Comme développés dans l'introduction de ce travail, les rôles de la protéine HPr sont multiples : rôle dans l'activité des PTS, dans la régulation de régulateurs à domaines PRD, dans la régulation globale de la transcription en agissant comme co-répresseur de CcpA et rôle dans l'exclusion d'inducteur (Figure 24) (Paragraphe I.C.2). Elle est impliquée dans le métabolisme carboné mais aussi dans d'autres types de mécanismes tels que la virulence, la résistance aux peptides antimicrobiens mais aussi le quorum sensing (Deutscher et al., 2005; Garcia De Gonzalo et al., 2015; Ha et al., 2018; Pätzold et al., 2021).

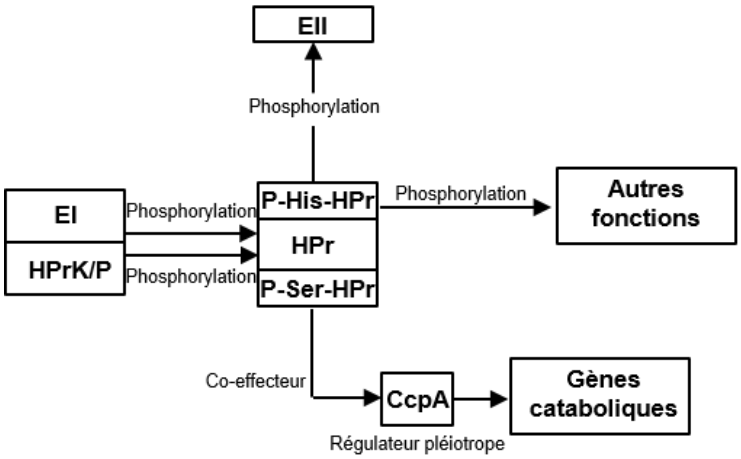


Figure 24. Rôle d'HPr en fonction de sa phophorylation chez les bactéries à Gram positif.
La protéine HPr peut être phosphorylée par EI au niveau de l'Histidine 15 puis phosphoryler EII ou assurer d'autres fonctions via la phosphorylation d'autres protéines. Elle peut également être phosphorylée sur la Sérine 46 et jouer le rôle de co-effecteur de CcpA pour assurer la régulation catabolique.

Il est donc intéressant de déterminer l'ensemble des gènes régulés par HPr ainsi que l'ensemble des protéines qui pourraient être régulées par phosphorylation par HPr, potentiellement des protéines à domaine PRD, pour évaluer l'importance de cette protéine dans la physiologie de *S. agalactiae*. Il est donc prévu des études de transcriptomique avec le mutant A909Δ*ptsH*, s'il est possible de l'obtenir, pour identifier l'ensemble du régulon transcriptionnel d'HPr et des études de phosphoprotéomique avec la souche A909Δ*ptsH*, ainsi que des mutants de substitution $HPr^{His15Ala}$ et $HPr^{Ser46Ala}$ pour évaluer l'impact des phosphorylations d'HPr au niveau de l'Histidine 15 ou de la Sérine 46 sur la phosphorylation d'autres protéines chez *S. agalactiae* (Figure 24).

1. Matériel et méthodes

a) Souches bactériennes et conditions de croissance

La souche de référence A909 de type sauvage (WT) de *S. agalactiae* a été utilisée dans cette étude. C'est un isolat clinique de ST7, CC7, sérotype IA provenant d'un cas de bactériémie néonatale (Tettelin et al., 2005). Les souches d'*E. coli* ont été cultivées dans un milieu liquide « Lysogeny Broth » (LB) (MP ; Cat. n° 3002022) à 37°C avec agitation, ou sur boîte de Pétri contenant du LB-agar. Si nécessaire elles ont été cultivées avec de l'érythromycine (150 µg/mL) ou avec du chloramphénicol (20 µg/mL). Les souches de *S. agalactiae* ont été cultivées en bouillon Todd Hewitt (TH) (BD ; Cat. n° 249240) à 37°C sans agitation ou sur boîte de Pétri TH-agar. Si nécessaire elles ont été cultivées avec de l'érythromycine (10 µg/mL) ou avec du chloramphénicol (5 µg/mL).

Pour l'étude de la croissance du mutant A909Δ*ptsI*, les souches A909WT et A909Δ*ptsI* ont été cultivées en microplaque à partir d'une DO=0,01 dans un milieu chimiquement défini (MCD) (Moulin et al., 2016) stérilisé par filtration et complété par les sucres correspondants : glucose (10, 20 ou 30 mM), ribose (10, 20 ou 30 mM), xylose (30 mM) + glucose (15 mM), allose (15 mM) + glucose (15 mM) ou en milieu TH avec de l'extrait de levure à 5, 10, 20 ou 30 g/L ou en milieu BHI additionné en glucose (30mM).

b) Purification de l'ADN chromosomique et plasmidique, PCR et séquençage de l'ADN

L'ADN chromosomique de *S. agalactiae* cultivé statiquement pendant une nuit dans un bouillon TH a été purifié par la méthode phénol/chloroforme (Sambrook and Russell, 2006). Les plasmides d'*E. coli* ont été purifiés avec le kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant.

Les PCR ont été réalisées dans un thermocycleur SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific) en utilisant la Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (Biolabs). Les amplicons ont été purifiés avec le kit PCR NucleoSpin (Macherey-Nagel), selon les instructions du fabricant. Après PCR à l'aide du mix BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), les produits ont été purifiés avec le kit NucleoSEQ (Macherey-Nagel) avant d'être chargés et séquencés par l'analyseur génétique ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

c) Stratégie de construction du mutant A909Δ*ptsH*

Les essais de construction de plasmide ont été réalisés avec le vecteur navette thermosensible pG+host1^{ts} selon une procédure décrite auparavant (Biswas et al., 1993). Brièvement les régions amont et aval du gène à déléter (régions d'environ 400 pb) (Figure 25) sont amplifiées puis hybridées en un fragment par PCR « overlap ». Ce fragment est ensuite cloné par restriction enzymatique puis ligature dans le plasmide pG+host1^{ts} (Figure 26) contenant une origine de réplication thermosensible chez les bactéries à Gram positif (*oriR* pWVO1), une origine de réplication chez les bactéries à Gram négatif (*oriR* pUC) et un gène de résistance à l'érythromycine (*erm*). Le plasmide recombinant est électroporé dans *E. coli* Xl1Blue. Puis le plasmide est extrait, séquencé et électroporé dans *S. agalactiae* A909. Les transformants sont étalés sur gélose trypticase-soja avec 5 % de sang de mouton supplémenté avec 10 µg/mL d'érythromycine à 30°C. Les transformants sont ensuite cultivés à 38°C en milieu liquide Todd-Hewitt (TH) avec 10 µg/mL d'érythromycine pour permettre l'intégration du plasmide dans le chromosome par recombinaison. En effet, l'origine de réplication étant thermosensible le

plasmide ne peut pas se répliquer à 38°C. Les intégrants sont ensuite cultivés à 30°C en TH liquide pour promouvoir l'excision du plasmide en l'absence de pression de sélection. Les clones sensibles à l'érythromycine sont séquencés pour vérifier la délétion du gène.

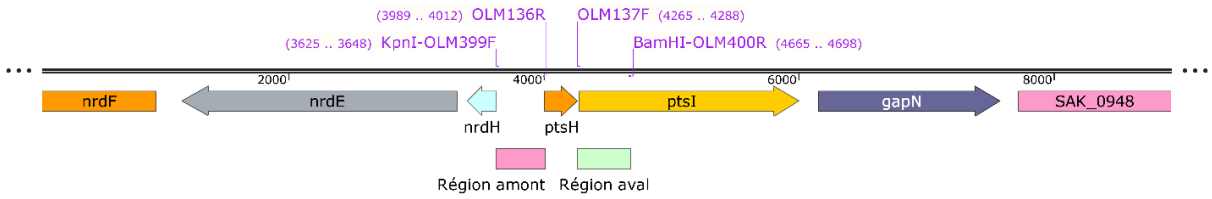


Figure 25. Régions amont et aval du gène *ptsH* amplifiées pour sa délétion.
Les amorces OLM399F et OLM136R ont servi à l'amplification de la région en amont et les amorces OLM137F et OLM400R à l'amplification de la région en aval de *ptsH*.

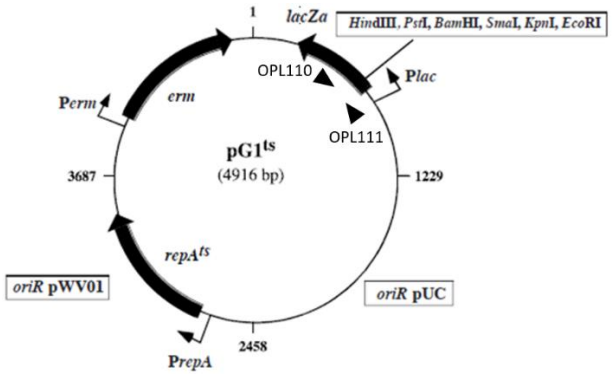


Figure 26. Carte du plasmide pG+host1^{ts}.
Le site de clonage possède les sites de restriction des enzymes HindIII, PstI, BamHI, SmaI, KpnI et EcoRI. Les amorces OPL110 et OPL111 positionnées de part et d'autre du site de clonage, permettent l'amplification des inserts. Il possède une origine de réplication thermosensible chez les bactéries à Gram positif (*oriR* pWVO1), une origine de réplication chez les bactéries à Gram négatif (*oriR* pUC) et un gène de résistance à l'érythromycine (*erm*).

d) Construction des vecteurs recombinants pG1+host^{ts}-HPr$^{His15Ala/Asp}$ et pG1+host ^{ts}-HPr$^{Ser46Ala/Asp}$

Pour construire les vecteurs recombinants pG1+host^{ts}-HPr^{His15Ala}, pG1+host^{ts}-HPr^{His15Asp}, pG1+host^{ts}-HPr^{Ser46Ala} et pG1+host^{ts}-HPr^{Ser46Asp} les régions en amont et en aval des mutations à réaliser sur *ptsH* ont été amplifiées avec deux couples d'oligonucléotides dépendants de la mutation à réaliser (Tableau 2). Les deux fragments ont ensuite été fusionnés par PCR « overlap » avec les oligonucléotides OLM250F et OLM253R. Puis les étapes réalisées sont similaires à celles permettant l'obtention du plasmide recombinant pG+host1^{ts}-Δ*ptsH*.

e) Surexpression de *ptsH* dans le plasmide pNZ123-*tetR*-P$_{xyl}$*tetO*

Le fragment contenant le gène *ptsH* est amplifié grâce aux amorces OLM424F et OLM423R par PCR et il est ensuite cloné par restriction enzymatique avec les enzymes EcoRI et HindIII puis ligature dans le plasmide pNZ123-*tetR*-P$_{xyl}$*tetO* contenant une origine de réplication pSH71 et une cassette de résistance au chloramphénicol (*cat*) (Figure 27). Le plasmide recombinant

pNZ123-*tetR*-P_{xyl}*tetO*-*ptsH* est électroporé dans *E. coli* DH5α. Puis le plasmide est purifié, séquencé et électroporé dans *S. agalactiae* A909. Les transformants sont étalés sur gélose au sang de mouton (5%) supplémenté avec 5 µg/mL de chloramphénicol. L'expression de *ptsH* a été induite par anhydrotétracycline à 60 ou 300 ng/mL.

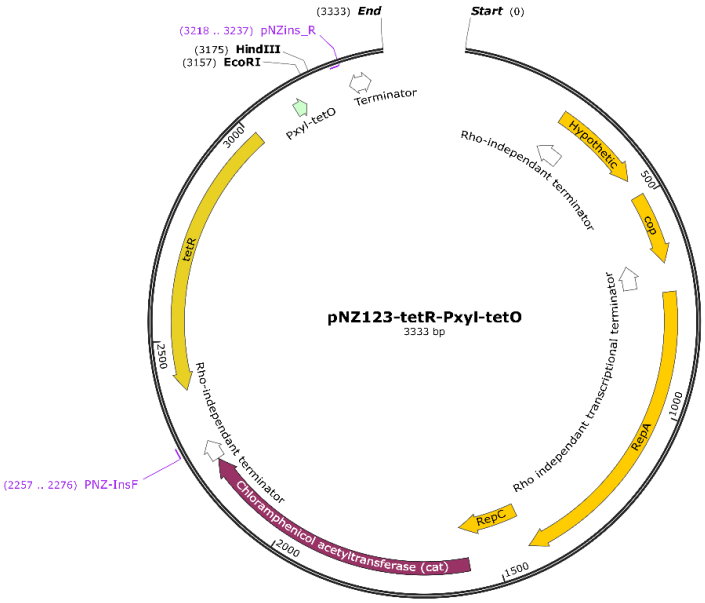


Figure 27. Carte du plasmide pNZ123 *tetR*-P_{xyl}*tetO*-*ptsH*.
Il possède un gène de résistance au chloramphénicol (*cat*). Les gènes *tetR* ainsi que les séquences P_{xyl}*tetO* ont été insérées en amont des sites de restriction *Eco*RI et *Hind*III.

f) Construction d'un complément chromosomique ectopique inductible de *ptsH* et induction

La région contenant le gène *ptsH* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotétracycline a été intégrée dans une région intergénique de la souche A909 entre les gènes *SAK_0222* et *rpoB*. Pour cela elle a d'abord été amplifiée à partir du plasmide pNZ123-*tetR*-P_{xyl}*tetO*-*ptsH* grâce aux oligonucléotides OLM544F et OLM545R (Tableau 2 ; Figure 28). Les régions amont et aval de la région intergénique ont été fusionnées en amont et en aval de l'insert par « overlap » avec les oligonucléotides listés dans le Tableau 2 (Figure 28). Le fragment a ensuite été inséré dans le vecteur pG+host1^{ts} par restriction enzymatique suivie d'une ligature. Puis le protocole décrit dans le paragraphe A.1.c. « Stratégie de construction du mutant A909Δ*ptsH* » a été réalisé.

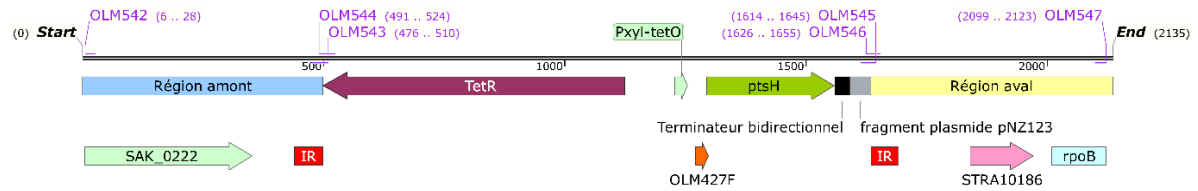


Figure 28. Insertion du gène *ptsH* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotétracycline dans la région intergénique entre *SAK_0222* et *rpoB* du chromosome de A909.
IR : région intergénique

Une fois la souche A909IR$_{SAK_0222\text{-}rpoB}$::*tetR-P$_{xyl}$tetO-ptsH* obtenue, des cultures ont été réalisées à partir d'une DO$_{600}$ initiale de 0,05 dans 100mL de TH liquide sans ou avec 0, 300, 500, 1000 ou 1500ng/mL d'anhydrotétracycline. A mi-phase exponentielle de croissance, 10 mL de culture ont été prélevées pour réaliser les extractions d'ARN.

g) Extraction des ARN totaux et RT-qPCR

Les culots bactériens ont été remis en suspension dans un tampon (glucose 10 %, Tris 12,5 mM pH 7,6 et EDTA 10 mM), lysés mécaniquement sous agitation forte à l'aide de billes de verre (FastPrep), et les ARN totaux ont été extraits en utilisant une méthode de purification à base de phénol/TRIzol (Lamy et al., 2004). Les ARN totaux ont ensuite été traités avec la DNase (Turbo DNA-free DNase ; Ambion) selon les instructions du fabricant.

Le kit de synthèse d'ADNc iScript (Bio-Rad) a été utilisé conformément aux instructions du fabricant pour synthétiser l'ADNc. Les amorces ont été conçues avec le logiciel web Primer3 (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) (Untergasser et al., 2012) afin d'obtenir un Tm de ≈60°C et d'amplifier des amplicons de ≈100 pb (Tableau 2). Les PCRq ont été réalisées avec 50 ng d'ADNc, 0,33 µM d'amorces spécifiques aux gènes et 1X LightCycler 480 SYBR green I Master (Roche). L'amplification, la détection et l'analyse par PCR ont été effectuées comme décrit par Moulin et al. (Moulin et al., 2016). Le changement du niveau de transcription a été calculé en utilisant la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak, 2008). Pour chaque paire d'oligonucléotides, l'efficacité, supérieure à 1,8, a été vérifiée avec un standard d'ADNg de *S. agalactiae* A909WT.

h) Recherche des protéines à domaine PRD chez *S. agalactiae*

Nous avons recherché *in silico* l'ensemble des protéines ayant un domaine PRD identifié chez *S. agalactiae* sur la plateforme Microscope (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope) grâce à la fonction « InterPro Scan ».

Tableau 2. Amorces utilisées pour l'étude d'HPr.

[a]Les sites de restriction sont soulignés.
Le terminateur de transcription bidirectionnel apparaît en vert.

Nom	**Séquence[a]**
Amorces utilisées pour la délétion du gène *ptsI*	
OAH207F	TGGCATGGATCCATGACAGAAATGCTTAAAGGAATCGC
OAH208R	TGGTCTCGAGTCCAACATCACGGATATCTGCTGCACG
OAH209F	TGGTCTCGGACTGAGAATAATAAAAAAGTAGGG
OAH210R	GAAATTGAATTCGCTAAAACAGTAGCAATTTCTTC
Amorces utilisées pour la délétion du gène *ptsH*	
OLM399F	AATAGCGGTACCGTTGTCCTCCTAATTTTTTTCATG
OLM136R	CATTTTCTTATGCAGCCATATTATGGTTCTCCTTTTG
OLM137F	CATAATATGGCTGCATAAGAAAATGACAGAAATGCT
OLM400R	GTGCTAGGATCCGTTTGGCAACATCACGGATATC
Amorces utilisées pour les mutants de substitution de HPr	
Amorces externes	
OLM250F	TTTCTTGGTACCCAGCGCCGTGCTGGTCAAGAAA
OLM253R	TTTCTGGGATCCCTTGTTTTGCACGAATAGTCTC
HPr^{His15Asp}	
OLM494R	GCTGGACGTGCGTCAATACCTGTTTC
OLM495F	GAAACAGGTATTGACGCACGTCCAGC
HPr^{Ser46Asp}	
OLM496R	CATAACACCCATGATATCTTTAAGGTTTAC
OLM497F	GTAAACCTTAAAGATATCATGGGTGTTATG
HPr^{His15Ala}	
OLM251R	GCTGGACGTGCGGCAATACCTGTTTC
OLM252F	GAAACAGGTATTGCCGCACGTCCAGC
HPr^{Ser46Ala}	
OLM254R	CATAACACCCATGATTGCTTTAAGGTTTAC
OLM255F	GTAAACCTTAAAGCAATCATGGGTGTTATG
Amorces plasmide pG+host1^{ts}	
OPL110F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
OPL111R	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA
Amorces plasmide pNZ123	
pNZinsF	AATGTCACTAACCTGCCCCG
pNZinsR	CATTGAACATGCTGAAGAGC
Amorces utilisées pour la surexpression du gène *ptsH*	
OLM424F	ATTTACGAATTCCAAAAGGAGAACCATAATATG
OLM423R	CAACACCAAGCTTAAAAACTTTGAGCAAATTGCTCAAAGTTTTTTT ATGCCAATCCTTCTTTTGTC
Amorces utilisées pour l'expression de *ptsH* en ectopique	
OLM542F	GTGGATCTGCAGGACATGATAATAATGCCTC

OLM543R	TGGGTCTTAAGATGATTTTTAAACATAGCATACTG
OLM544F	AAAAATCATCTTAAGACCCACTTTCACATTTAAG
OLM545R	AGCATAACACCATCTCATTGAGAAGATTGCCG
OLM546F	CAATGAGATGGTGTTATGCTAAAACTCAAG
OLM547R	CAAGAAGGATCCGGAATGAATCAGTTTGAATTTCAAT
Amorces utilisées pour les qRT-PCR	
ptsH (*SAK_0945*)	
OLM500F	GGTCAAGGTGCTGATGTTACTATTT
OLM501R	CAATCCTTCTTTTGTCATTGTTTCTT
recA (SAK_2032)	
OLM319F	ATTCAGGCGCAGTTGATTTAGTT
OLM320R	TCAATCTCAGCACGAGGAACA

Tableau 3. Souches et plasmides utilisés pour l'étude d'HPr

Souches de *E. coli*		
XL1-blue	*endA1 gyrA96* (Nal^R) *thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 hsdR17*($r^-_k m^+_k$) *F'* [::Tn10 (Tet^R) *proAB*$^+$ $lacI^q$ ZΔM15]	Stratagene
DH5α	F^- Φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17(r_k^-, m_k^+) *pho*A *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1 λ^-	Invitrogen
Souches de *S. agalactiae*		
A909	Isolé d'un nouveau-né ayant une bactériémie en 1934	(Tettelin et al., 2005)
A909Δ*ptsI*	Mutant de délétion *ptsI* (*SAK_0946*) isogénique de A909	(Patron et al., 2016)
A909IR$_{SAK_0222\text{-}rpoB}$::*tetR*-P_{xyl}*tetO-ptsH*	Insertion de *ptsH* sous le contrôle du promoteur P_{xyl}*tetO* dans une région intergénique de A909	Cette étude
Plasmides		
pG+host1^{ts}	Plasmide navette thermosensible, Ery^R	(Biswas et al., 1993)
pG+host1^{ts}-Δ*ptsH*	Plasmide pG+host1^{ts} contenant l'insert permettant la délétion de *ptsH* entre les sites de restriction KpnI et BamHI	Cette étude
pG+host1^{ts} (*tetR*-P_{xyl}*tetO-ptsH* ectopique)	Plasmide pG+host1^{ts} contenant l'insert permettant l'insertion ectopique de *ptsH*	Cette étude
pNZ123- *tetR*-P_{xyl}*tetO*	Plasmide d'expression inductible à l'anhydrotétracycline, Cm^R	Cette étude
pNZ123- *tetR*-P_{xyl}*tetO-ptsH*	Plasmide d'expression contenant le gène *ptsH* entre les sites de restriction HindIII et EcoRI sous le contrôle du promoteur inductible à l'anhydrotétracycline	Cette étude

2. Résultats

a) Recherche des protéines à domaine PRD chez *S. agalactiae*

Nous avons recherché *in silico* l'ensemble des protéines ayant un domaine PRD déterminé chez *S. agalactiae* pour identifier les potentielles cibles de phosphorylation de la protéine HPr. Nous avons identifié sept protéines à domaine PRD (Tableau 4) composées de quatre régulateurs transcriptionnels et trois antiterminateurs de transcription.

Tableau 4. Protéines à domaine PRD chez *S. agalactiae*.
Les protéines à domaine PRD ont été recherchées sur la plateforme Microscope (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope).

Numéro de gène	Taille de la protéine putative (aa)	Position des domaines PRD (PFAM)	Fonction putative de la protéine codée
SAK_0259	678	298-385 ; 535-676	Régulateur de transcription, famille BlgG
SAK_0523	686	104-162 ; 392-468	Antiterminateur de transcription de l'opéron galactitol
SAK_0914	283	76-163 ; 177-272	Antiterminateur de transcription LicT
SAK_1389	503	170-385	Régulateur de transcription RofA-like
SAK_1494	503	175-379	Régulateur de transcription RofA
SAK_1762	629	298-384	Fru_2R, activateur transcriptionnel
SAK_1821	535	184-274 ; 297-385	Antiterminateur transcriptionnel, famille BlgG

b) *ptsH*, un gène essentiel ?

Dans le but d'étudier le régulon d'HPr, nous avons cherché à obtenir un mutant isogénique de A909 délété du gène *ptsH* (A909Δ*ptsH*) par double recombinaison homologue. Les différents essais ont été infructueux ce qui suggère que *ptsH* est un gène essentiel dans nos conditions. Nous avons tenté de construire un vecteur pG+host1^{ts}(Δ*ptsH*) avec des régions amont et aval de plus grandes tailles contenant notamment le gène *nrdH* et le début du gène *nrdE* (Figure 25) mais cela n'était pas viable dans *E. coli*. De plus, des essais de substitution du gène *ptsH* par les gènes mutés HPr$^{His15Ala/Asp}$ et HPr$^{Ser46Ala/Asp}$ ont également été tentés par recombinaison avec le plasmide pG+host1^{ts} sans plus de succès.

c) Identification de conditions favorables à l'obtention du mutant A909Δ*ptsH*

Pour trouver une condition de croissance favorable à l'obtention d'un mutant délété du gène *ptsH* nous avons tenté de trouver une condition de culture dans laquelle le mutant A909Δ*ptsI*, qui présente un fort retard de croissance en milieu chimiquement défini (MCD) supplémenté en glucose (Figure 29), cultiverait aussi bien que la souche sauvage. En effet, les gènes *ptsH* et *ptsI* appartiennent au même opéron. De plus, ils sont probablement impliqués dans des

mécanismes communs comme chez les autres bactéries. Chez *S. pyogenes*, un test Biolog permettant de tester la capacité d'une souche bactérienne à métaboliser diverses sources de carbone a mis en évidence que le mutant Δ*ptsI* était capable de métaboliser 19 sources de carbone tels que des sucres non-PTS, des nucléosides et autres composés organiques sur les 45 que la souche sauvage était capable d'utiliser (Gera et al., 2014). Nous avons donc essayé différentes sources carbonées pour la croissance du mutant A909Δ*ptsI* (décrites dans la section Matériel et Méthodes) dont plusieurs sucres : allose, ribose, xylose pouvant être métabolisés chez le mutant Δ*ptsI* de *S. pyogenes*. Cependant, aucune des conditions testées n'a permis de montrer une restauration de la croissance du mutant A909Δ*ptsI* par rapport à celle de la souche A909WT, confirmant le rôle fondamental de la protéine EI dans l'entrée et le métabolisme des sucres de *S. agalactiae.*

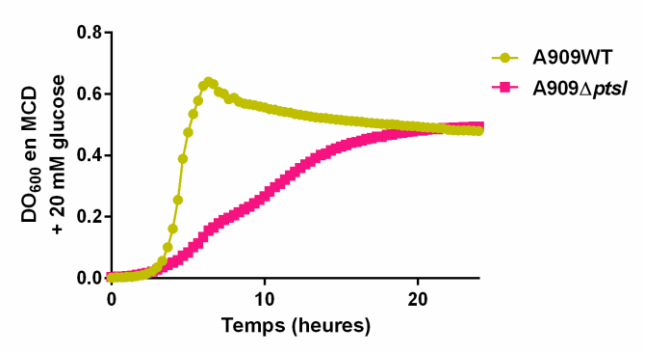


Figure 29. Croissance des souches A909WT et A909Δ*ptsI* en MCD supplémenté avec 20 mM de glucose.
Ce graphique est représentatif des croissances obtenues pour chaque condition de croissance.

d) Essai de construction d'un mutant de A909 ayant un gène *ptsH* inductible à l'anhydrotétracylcine

Pour confirmer l'essentialité du gène *ptsH*, nous avons cherché à obtenir un mutant conditionnel, délété du gène chromosomique mais présentant des copies plasmidiques de *ptsH* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotétracycline. On aurait pu ainsi montrer une absence de croissance en absence d'anhydrotétracycline. Le but était de pouvoir exprimer, sous le contrôle du promoteur inductible, *ptsH* WT mais aussi par la suite *ptsH* substitué ($HPr^{His15Asp}$, $HPr^{His15Ala}$, $HPr^{Ser46Asp}$, $HPr^{Ser46Ala}$) afin d'étudier l'impact global des phosphorylations sur les sites de l'Histidine 15 et de la Sérine 46 d'HPr via transcriptomique et phosphoprotéomique. Nous avons co-transformé la souche A909 avec les plasmides pG+host1^{ts}(Δ*ptsH*) (pour déléter le gène *ptsH*) et pNZ123-*tetR*-P_{xyl}*tetO*-*ptsH* (pour apporter la copie de *ptsH* plasmidique) puis tenté de déléter *ptsH*. Nous n'avons pas réussi à obtenir le mutant de cette manière ni en co-transformant les souches A909 avec les plasmides

pG+host1^{ts}-Δ*ptsH* et pNZ123-*tetR*-P$_{xyl}$*tetO-ptsH* en même temps ni en transformant la souche A909-pG+host1^{ts}-Δ*ptsH*, c'est-à-dire après intégration sur le chromosome de pG+host1^{ts}-Δ*ptsH*, avec le plasmide pNZ123-*tetR*-P$_{xyl}$*tetO-ptsH*. Nous avons émis l'hypothèse que cela était dû au fait que les deux plasmides ne pouvaient être présents de manière stable dans la bactérie en même temps.

Pour éviter d'avoir en même temps les deux plasmides dans la bactérie, nous avons par la suite intégré *ptsH* sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'anhydrotétracycline dans une région intergénique de A909 par l'intermédiaire du plasmide pG+host1^{ts}. En effet, le transcriptome de *S. agalactiae* nous avait permis de définir une région intergénique, entre *SAK_0222* et *rpoB*, dans laquelle aucune transcription n'était détectée.

Après obtention du complément ectopique de *ptsH* (A909IR$_{SAK_0222\text{-}rpoB}$::*tetR*-P$_{xyl}$*tetO-ptsH*), *nous* avons réalisé des CMI de l'anhydrotétracycline sur les souches A909WT et A909IR$_{SAK_0222\text{-}rpoB}$::*tetR*-P$_{xyl}$*tetO-ptsH.* Pour les deux souches la CMI se situait entre 3 et 4 µg/mL. Nous avons ensuite déterminé par qRT-PCR que 300ng/mL d'anhydrotétracycline était nécessaire à la surexpression de *ptsH* sans que ça n'altère la croissance exponentielle de la bactérie (Figure 30 et Tableau 5).

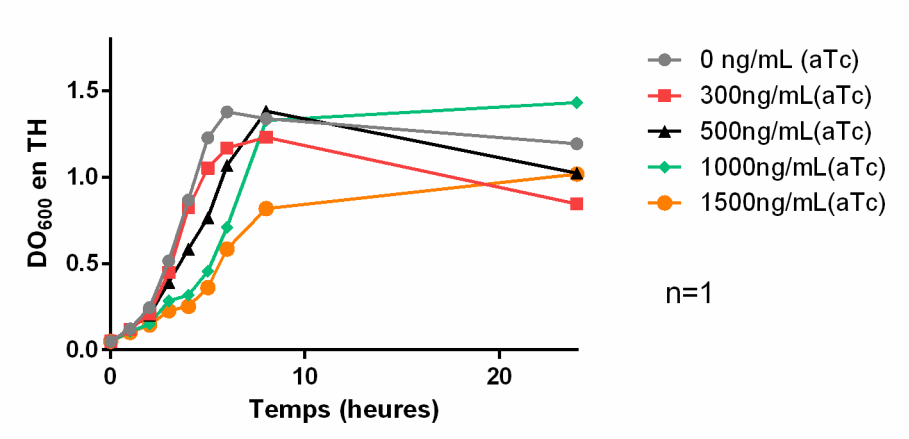


Figure 30. Croissance de *S. agalactiae* A909 possédant le gène *ptsH* en ectopique sous le contrôle du promoteur inductible *P$_{xyl}$tetO* en présence de différentes concentrations d'anhydrotétracycline.
La souche A909IR$_{SAK_0222\text{-}rpoB}$::*tetR-P$_{xyl}$tetO-ptsH* a été cultivée en milieu TH liquide sans ou avec 0, 300, 500, 1000 ou 1500ng/mL d'anhydrotétracycline.

Tableau 5. Facteur de surexpression du gène *ptsH* en fonction de la concentration d'anhydrotétracycline par rapport à la condition sans anhydrotétracycline.
Des qRT-PCR ont été ont été réalisées sur des extraits d'ARN de la souche A909IR$_{SAK_0222\text{-}rpoB}$::*tetR*-P_{xyl}*tetO*-*ptsH* de *S. agalactiae* cultivées jusqu'à la phase mi-exponentielle. La quantité des transcrits de chaque gène a été normalisée par rapport aux niveaux de transcription du gène de ménage *recA*. Les facteurs de surexpression sont exprimés par rapport à la condition sans anhydrotétracycline.

Concentration d'anhydrotétracycline (ng/mL)	Facteur d'expression
300	3.04
500	2.79
1000	3.98

Les différents essais qui ont été réalisés ensuite pour déléter *ptsH in situ* après intégration de *ptsH* en ectopique n'ont pas abouti. Il semblerait donc que ce soient plus les recombinaisons homologues dans la région chromosomique du gène *ptsH* qui posent un problème pour obtenir le mutant A909Δ*ptsH* plutôt que l'absence du gène elle-même.

B. Existe-t-il une interaction entre les protéines CcpA et HPr ?

Plusieurs acides aminés de CcpA et HPr se trouvant dans des régions conservées chez les bactéries à Gram positif ont été démontrés comme ayant un rôle dans l'interaction de ces deux protéines. Parmi eux, on note l'Asp296 de CcpA de *Bacillus megaterium* qui interagit avec l'His15 et l'Ala16 de P-Ser-HPr (Schumacher et al., 2004; Deutscher et al., 2006; Homeyer et al., 2007); la Tyr295, l'Ala299, la Val300 et la Leu304 de CcpA qui sont impliqués dans des interactions avec l'Ile47, la Met48 et la Met51 de P-Ser-HPr (Schumacher et al., 2004; Homeyer et al., 2007) et l'Arg303 et la Lys307 qui interagissent avec le groupement phosphate de la Ser46 d'HPr (Schumacher et al., 2004; Deutscher et al., 2006; Homeyer et al., 2007). P-Ser-HPr est au contact de deux sous-unités de CcpA, son Arg17 joue un rôle important en liant l'Asp84 d'une sous-unité et l'Asp69 et l'Asp99 de l'autre sous-unité de CcpA. Parmi les streptocoques, il a notamment été démontré que la Val301 de CcpA (qui correspond à la Val300 chez *B. megaterium*) de *S. pyogenes* jouait un rôle dans l'interaction avec P-Ser-HPr puisque sa substitution par une alanine empêche l'interaction de P-Ser-HPr avec CcpA. Nous avons tout d'abord réalisé un alignement des séquences protéiques de CcpA et HPr afin de voir si les acides aminés nécessaires à l'interaction étaient bien présents chez *S agalactiae.* Nous avons ensuite cherché à déterminer s'il y avait une interaction entre CcpA et HPr en réalisant une expérience de double hybride chez *E. coli*.

1. Matériels et méthodes

a) Double hybride

Deux vecteurs sont cotransformés dans la souche DHMI afin de permettre (i) l'expression d'HPr (codée par le gène *ptsH*) fusionnée à une sous-unité de l'adénylate cyclase et (ii) l'expression de CcpA fusionnée à l'autre sous-unité de l'adénylate cyclase. Nous avons co-transformé DHMI avec les vecteurs contenant soit les gènes fusionnés en C-ter de l'adénylate cyclase : pUT18c-*ptsH* (avec les différents allèles permettant l'absence ou le mime de la phosphorylation) et pKT25-*ccpA,* soit avec les gènes fusionnés en N-ter des sous-unités de l'adénylate cyclase avec les plasmides pUT18-*ccpA* et pKTN25-*ptsH*.

Pour construire les vecteurs, les inserts des gènes *ptsH* et *ccpA* ont été amplifiés grâce aux amorces détaillées dans le tableau 6 puis clonés dans *E. coli* Xl1 blue. Pour synthétiser les inserts des plasmides, les allèles WT des gènes *ptsH* et *ccpA* ont été amplifiés par PCR à partir de l'ADN génomique de A909 tandis que l'ADN des plasmides pG1+host^{ts}-HPr^{Ser46Ala} et pG1+host ^{ts}-HPr^{Ser46Asp} ont servi de matrice pour amplifier les allèles mutés de *ptsH*.

Après co-transformation des plasmides dans *E. coli* DHMI (Tableau 7), 2 µL de culture des clones en phase stationnaire sont étalés sur LB contenant 40 µg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-galactopyranoside (X-Gal), de l'isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (0.5 mM), de la kanamycine (50 µg/mL) et de l'ampicilline (100 µg/mL). Le X-Gal est un substrat chromogénique qui apparait bleu s'il y a interaction entre HPr et CcpA puisque cela permettra le rapprochement des deux sous-unités de l'adénylate cyclase, permettant ainsi la dégradation du substrat. La lecture des boîtes se fait après 24h à 37°C.

Tableau 6. Oligonucléotides utilisés pour l'étude de l'interaction entre CcpA et HPr.

[a]Les sites de restriction sont soulignés.

Nom	**Séquence[a]**	**Gène**
Amorces utilisées pour le clonage de *ptsH* dans pKTN25		
OLM551F	GAACCACTGCAGGGCTTCAAAAGATTTCCACATTG	*ptsH (SAK_0945)*
OLM552R	AGTTTGGATCCGCCAATCCTTCTTTTGTCATTG	*ptsH (SAK_0945)*
Amorces utilisées pour le clonage de *ccpA* dans put18		
OLM553F	TAAATCTGCAGGAATACAGATGATACGATTACGAT	*ccpA (SAK_0833)*
OLM554R	TACTCGGATCCTCATTATTTGTTGTGCCACGTTTAAC	*ccpA (SAK_0833)*
Amorces utilisées pour le clonage de *ccpA* dans pKT25		
OLM498F	ATCCCTGCAGGG AATACAGATGATACGATTACG	*ccpA (SAK_0833)*
OLM499R	ATCGGGATCCTCATTATTTGTTGTGCCACGTTT	*ccpA (SAK_0833)*
Amorces utilisées pour le clonage de *ptsH* dans put18c		
OLM365F	ATGCCTGCAGGGCTTCAAAAGATTTCCACATTGTT	*ptsH (SAK_0945)*
OLM366R	ATGCGAATTCTTATGCCAATCCTTCTTTTGTCA	*ptsH (SAK_0945)*

Tableau 7. Souches et plasmides utilisés pour l'étude de l'interaction entre CcpA et HPr.

Souches *E. coli*		
XL1-blue	*endA1 gyrA96* (Nal^R) *thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 hsdR17*($r^-_k m^+_k$) *F'* [::Tn10 (Tet^R) *proAB*$^+$ lacI^q ZΔM15]	Stratagene
DHM1	F-, *cya-854*, *recA1, endA1, gyrA96 (Nal r), thi1*, *hsdR17, spoT1, rfbD1, glnV44(AS)*	(Olson et al., 2018)
Plasmides		
pUT18c	Vecteur pour l'expression d'un polypeptide fusionné dans le cadre à l'extrémité C-terminale du fragment T18 de l'adénylate cyclase ; ColE1 ori, AmpR	(Karimova et al., 2000)
pKT25	Vecteur pour l'expression d'un polypeptide fusionné dans le cadre à l'extrémité C-terminale du fragment T25 de l'adénylate cyclase ; p15 ori, KanR	(Karimova et al., 2000)
pUT18	Vecteur pour l'expression d'un polypeptide fusionné dans le cadre à l'extrémité N-terminale du fragment T18 de l'adénylate cyclase ; ColE1 ori, AmpR	(Karimova et al., 2000)
pKTN25	Vecteur pour l'expression d'un polypeptide fusionné dans le cadre à l'extrémité C-terminale du fragment T25 de l'adénylate cyclase ; p15 ori, KanR	(Karimova et al., 2000)
pUT18C::*fru$_2$EIIB*	pUT18c exprimant EIIB^{Fru2} fusionné au fragment T18 de l'adénylate cyclase	(Patron et al., 2016)
pKT25::*fru$_2$EIIA*	pKT25 exprimant EIIA^{Fru2} fusionné au fragment T25 de l'adénylate cyclase	(Patron et al., 2016)
pUT18-*ccpA*	pUT18 exprimant CcpA fusionné au fragment T18 de l'adénylate cyclase	Cette étude
pKT25-*ccpA*	pKT25 exprimant CcpA fusionné au fragment T25 de l'adénylate cyclase	Cette étude
pUT18c-*ptsH*	pUT18c exprimant HPr fusionné au fragment T18 de l'adénylate cyclase	Cette étude
pKTN25-*ptsH*	pKT25 exprimant HPr fusionné au fragment T25 de l'adénylate cyclase	Cette étude
pUT18c-HPr^{S46D}	pUT18c exprimant HPr^{S46D} fusionné au fragment T18 de l'adénylate cyclase	Cette étude
pUT18c-HPr^{S46A}	pUT18c exprimant HPr^{S46A} fusionné au fragment T18 de l'adénylate cyclase	Cette étude
pKTN25-HPr^{S46D}	pKT25 exprimant HPr^{S46D} fusionné au fragment T25 de l'adénylate cyclase	Cette étude
pKTN25-HPr^{S46A}	pKT25 exprimant HPr^{S46A} fusionné au fragment T25 de l'adénylate cyclase	Cette étude

2. Résultats

a) Caractérisation *in silico* des séquences protéiques de HPr et CcpA de *S. agalactiae*

L'alignement des séquences protéiques de HPr et CcpA de *S. agalactiae* avec celles d'autres Firmicutes, notamment *B. megaterium* et *S. pyogenes* pour lesquelles une interaction entre les deux protéines a été démontrée, a montré que ces protéines étaient très proches de celles d'autres Firmicutes avec des pourcentages de similarité compris entre 69-100 % et 60-96 % respectivement (Tableau 8). L'alignement des séquences protéiques de CcpA et HPr a permis de montrer qu'hormis l'Asp69 et la Leu304 qui ne sont pas présents chez toutes les bactéries pour lesquelles on a fait l'alignement, tous les acides aminés qui interviennent dans l'interaction de P-Ser-HPr et CcpA chez *B. megaterium* sont présents chez *S. agalactiae* (Figure 31). Cette première analyse permet donc de nous conforter dans le fait que les deux protéines codées par les gènes *SAK_0833* et *SAK_0945* semblent bien être CcpA et HPr respectivement. De plus, la présence des acides aminés connus pour permettre leur interaction nous laisse penser qu'elles interagissent chez *S. agalactiae.*

Tableau 8. Identité et similarité des séquences protéiques de HPr et CcpA de *S. agalactiae* A909 avec celles d'autres Firmicutes.

	% identité	**% similarité**
	CcpA	
Enterococcus faecalis ATCC19433	68	83
B. subtilis 168	52.	71
C. difficile 630	36	60
L. lactis AI06	57	74
S. pneumoniae R6	77	89
S. mutans UA159	89	94
B. megaterium DSM 319	51	72
S. pyogenes emm1	93	96
	HPr	
Enterococcus faecalis ATCC19433	78	88
B. subtilis 168	66.	83
C. difficile 630	46	69
L. lactis AI06	91	96
S. pneumoniae R6	94	97
S. mutans UA159	98	98
B. megaterium DSM 319	69	83
S. pyogenes emm1	99	100

Les séquences protéiques ont été trouvées sur la plateforme Microscope (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope) (Vallenet et al., 2020) puis les pourcentages d'identité et de similarité ont été obtenus sur Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

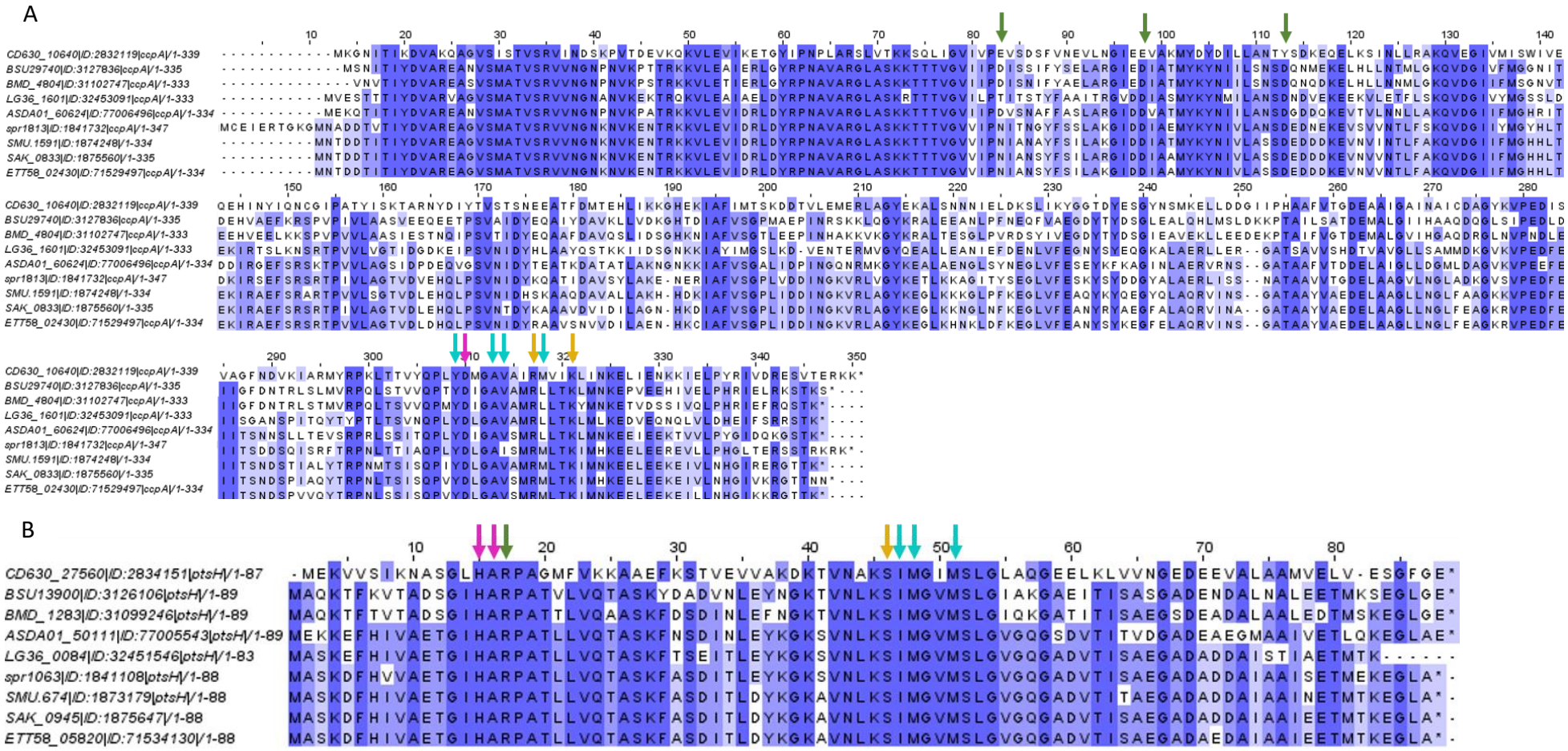


Figure 31. Alignements des séquences protéiques de CcpA et HPr et annotation des acides aminés impliqués dans leur interaction.
Alignement des séquences protéiques de A) CcpA et B) HPr. Les flèches d'une même couleur représentent les acides aminés de CcpA qui interagissent avec les acides aminés d'HPr. Les séquences de *C. difficile* 630 (CD630), *B. subtilis* 168 (BSU), *B. megaterium* DSM 319 (BMD), *L. lactis* AI06 (LG36), *Enterococcus faecalis* ATCC19433 (ASDA01), *S. pneumoniae* R6 (spr1063), *S. mutans* UA159 (SMU), *S. agalactiae* A909 (SAK) et *S. pyogenes* emm1 (ETT58) ont été alignées. Les séquences protéiques ont été trouvées sur la plateforme Microscope (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope) (Vallenet et al., 2020) puis alignées grâce au logiciel Jalview (Waterhouse et al., 2009).

b) Recherche d'une interaction par double hybride

Nous avons ensuite cherché à confirmer l'interaction entre CcpA et HPr en réalisant une expérience de double hybride chez *E. coli*.

Nous avons cloné 3 allèles différents de *ptsH* : le gène *ptsH* WT, ou bien *ptsH* substitué afin d'obtenir $HPr^{Ser46Asp}$ et $HPr^{Ser46Ala}$. Le but est de mimer ou d'empêcher la phosphorylation sur la Sérine 46 grâce à la substitution par l'Aspartate ou l'Alanine respectivement. En effet il a été montré chez *B. subtilis* que l'interaction entre CcpA et HPr a lieu quand la Sérine 46 est phosphorylée. Les gènes *ptsH* et *ccpA* ont d'abord été clonés dans les plasmides pUT18c et pKT25 respectivement en C-ter des sous-unités d'adénylate cyclase. Les résultats présentés dans la Figure 32 montrent que mis à part le contrôle positif, tous les clones sont blancs, démontrant qu'aucune interaction n'est visible entre CcpA et HPr. Nous avons reproduit l'expérience en fusionnant les gènes *ptsH* et *ccpA* en N-ter des sous-unités de l'adénylate cyclase et aucune interaction n'a été démontrée entre HPr et CcpA de cette manière.

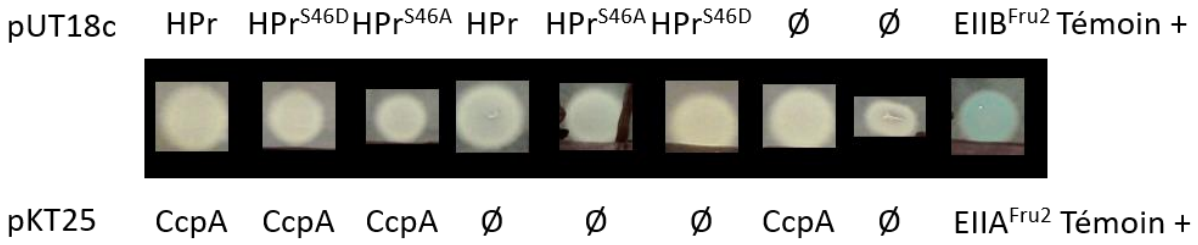


Figure 32. Test d'interaction entre les différentes versions d'HPr et CcpA par double hybride bactérien.
Les différents allèles de *ptsH* ont été clonés dans le plasmide pUT18c et le gène *ccpA* dans pKT25. La souche *E. coli* DHMI a été co-transformée par ces deux plasmides. 2 µL de culture liquide de ces souches en phase stationnaire ont été déposés sur LB agar+ X-Gal+ IPTG+ kanamycine + ampicilline. La boîte a été observée après 24 heures à 37°C. S : sérine, D : aspartate, A : alanine.

C. Quel est le rôle du régulateur CcpA chez *S. agalactiae* ?

1. Quel est le rôle du régulateur CcpA dans la physiologie et la réponse au stress chez *S. agalactiae* ?

CcpA est un régulateur pléiotrope dont le rôle dans le métabolisme carboné, mais aussi dans d'autres mécanismes tels que la virulence, a été démontré chez plusieurs espèces bactériennes. Cette étude a eu pour but de déterminer le rôle de ce régulateur dans la physiologie et la réponse au stress chez *S. agalactiae*, une bactérie qui fait face à divers stress dans son environnement.

Lors de mon arrivée au laboratoire, le transcriptome (ainsi que la confirmation des résultats de RNAseq par qRT-PCR) visant à comparer les souches A909WT et A909Δ*ccpA* en MCD avec 0,25 % de glucose en mi-phase exponentielle de croissance avait été réalisé (en collaboration avec Isabelle Rosinski-Chupin de l'Institut Pasteur). Il avait ainsi permis de mettre en évidence que 13,5 % du génome (i.e. 274 gènes) de *S. agalactiae* était régulé par CcpA dans ces conditions. L'analyse du transcriptome a permis de mettre en évidence que CcpA était impliqué dans la régulation de gènes codant des enzymes intervenant dans divers mécanismes mais principalement dans le métabolisme carboné dont les transporteurs de sucres de type PTS, mais également certaines voies de fermentation. Une analyse métabolomique (réalisée en collaboration avec Lydie Nadal-Desbarats du Département d'Analyse Chimique et Métabolomique de l'Université de Tours) visant à rechercher les produits de fermentation a permis de confirmer les résultats du transcriptome, montrant ainsi que CcpA est impliqué dans la synthèse d'acétate, de formate et de fumarate.

A mon arrivée au laboratoire, après avoir finalisé l'analyse du RNAseq, j'ai réalisé une analyse bioinformatique afin de rechercher les sites *cre* de fixation de CcpA à l'ADN, dont la séquence consensus putative était disponible sur le site RegPrecise (https://regprecise.lbl.gov/), dans le génome de la souche A909 de *S. agalactiae*. Des expériences de retard sur gel ont permis de confirmer expérimentalement le site *cre* prédit, montrant ainsi que parmi les 274 gènes régulés par CcpA dans le transcriptome, 82 en possèdent au moins un.

S. agalactiae étant souvent confrontée à des stress acide et oxydatif à cause de son métabolisme ou de son environnement, nous nous sommes intéressés aux gènes régulés par CcpA et codant des protéines potentiellement impliquées dans la réponse au stress. Nous avons ainsi pu mettre en évidence dans le RNA-seq que 16 gènes étaient différentiellement

exprimés dans le mutant de CcpA. Parmi eux, le gène *SAK_1689*, codant une protéine Usp putative, est très fortement inhibé par CcpA via la présence d'un site *cre* dans sa région promotrice. Après avoir confirmé la régulation de 3 des gènes par fusion transcriptionnelle, j'ai réalisé des tests de survie en stress acide, oxydatif et en macrophages avec le mutant A909Δ*ccpA*. Cela a permis de mettre en évidence la grande importance de CcpA dans la résistance à ces stress.

SAK_1689 présente une protéine analogue dont le gène, *SAK_1741*, est non régulé par CcpA dans notre transcriptome et ne possède pas de site *cre*. Des expériences de RT-qPCR ont permis de mettre en évidence que l'expression de *SAK_1689* était fortement induite en stress oxydatif et que celle de *SAK_1741* était induite en condition de stress acide. Cependant, les mutants n'exprimant pas ces protéines n'ont pas montré de survie altérée en stress oxydatif ou en stress acide. En revanche, le double mutant A909Δ*ccpA*Δ*SAK_1689* a présenté une meilleure survie en stress oxydatif que le simple mutant A909Δ*ccpA* suggérant que CcpA protège *S. agalactiae* d'une surexpression délétère du gène *SAK_1689* en condition de stress oxydatif.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Microbiology Spectrum

RESEARCH ARTICLE

The Role of Regulator Catabolite Control Protein A (CcpA) in *Streptococcus agalactiae* Physiology and Stress Response

Anne-Emmanuelle Roux,[a] Sylvie Robert,[a] Mathilde Bastat,[a] Isabelle Rosinski-Chupin,[b] Vanessa Rong,[a] Sébastien Holbert,[a] Laurent Mereghetti,[a,c] Emilie Camiade[a]

[a]ISP, Université de Tours, INRAE, Tours, France
[b]Unité Écologie et Évolution de la Résistance aux Antibiotiques, CNRS UMR3525, Institut Pasteur, Paris, France
[c]CHRU Tours, Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Tours, France

ABSTRACT *Streptococcus agalactiae* is a leading cause of infections in neonates. This opportunistic pathogen colonizes the vagina, where it has to cope with acidic pH and hydrogen peroxide produced by lactobacilli. Thus, in the host, this bacterium possesses numerous adaptation mechanisms in which the pleiotropic regulators play a major role. The transcriptional regulator CcpA (catabolite control protein A) has previously been shown to be the major regulator involved in carbon catabolite repression in Gram-positive bacteria but is also involved in other functions. By transcriptomic analysis, we characterized the CcpA-dependent gene regulation in *S. agalactiae*. Approximately 13.5% of the genome of *S. agalactiae* depends on CcpA for regulation and comprises genes involved in sugar uptake and fermentation, confirming the role of CcpA in carbon metabolism. We confirmed by electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) that the DNA binding site called *cis*-acting catabolite responsive element (*cre*) determined for other streptococci was effective in *S. agalactiae*. We also showed that CcpA is of capital importance for survival under acidic and oxidative stresses and is implicated in macrophage survival by regulating several genes putatively or already described as involved in stress response. Among them, we focused our study on *SAK_1689*, which codes a putative UspA protein. We demonstrated that *SAK_1689*, highly downregulated by CcpA, is overexpressed under oxidative stress conditions, this overexpression being harmful for the bacterium in a Δ*ccpA* mutant.

IMPORTANCE *Streptococcus agalactiae* is a major cause of disease burden leading to morbidity and mortality in neonates worldwide. Deciphering its adaptation mechanisms is essential to understand how this bacterium manages to colonize its host. Here, we determined the regulon of the pleiotropic regulator CcpA in *S. agalactiae*. Our findings reveal that CcpA is not only involved in carbon catabolite repression, but is also important for acidic and oxidative stress resistance and survival in macrophages.

KEYWORDS carbon catabolite repression (CCR), CcpA, stress, adaptation, *Streptococcus agalactiae*, Usp proteins, acid resistance, catabolite repression, group B *Streptococcus*, oxidative stress, stress adaptation, stress response

The commensal acterium *Streptococcus agalactiae*, also referred as group B *Streptococcus*, is a Gram-positive bacterium with a broad spectrum of hosts. First discovered as an agent of bovine mastitis (1), it is now known to be a cause of infections in different animals and especially in the farm fish leading to economic losses (2–4). This bacterium is also a leading cause of neonatal infections and an emerging pathogen in elderly and immunocompromised adults (5–7). *S. agalactiae*, a commensal of the gastrointestinal and genitourinary tracts, is found in pregnant women worldwide (11 to 35%) (8). During delivery, it can be transmitted from the mother to the child by aspiration of vaginal and/or amniotic fluids, leading to pneumonia and eventually bacteremia and meningitis if it manages to reach the blood (5). This bacterium is responsible each year for approximately 91,000 neonatal deaths

Editor John M. Atack, Griffith University
Copyright © 2022 Roux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.
Address correspondence to Emilie Camiade, emilie.camiade@univ-tours.fr.
The authors declare no conflict of interest.
Received 7 June 2022
Accepted 21 September 2022

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

and 37,000 survivors with neurodevelopmental impairment worldwide. Moreover, *in utero* infections are responsible for 46,000 stillbirths and could be responsible for some 518,000 preterm births each year (9).

In the host, *S. agalactiae* has to adapt to variations in physicochemical conditions. As an example, when *S. agalactiae* colonizes the vagina, it is confronted with oxidative stress and acidic pH (pH $<$ 4.5). Indeed, lactobacilli, which are part of the vaginal flora, produce hydrogen peroxide and organic acids that lower the vaginal pH (10). Bacteria also undergo oxidative stress because of their own metabolism. Stress resistance mechanisms are also useful in resisting the innate immune system, particularly phagocytosis by macrophages and neutrophils. After being phagocytosed, pathogens are incorporated into a phagosome which matures in a highly microbicidal organelle thanks to acidic pH, production of reactive oxygen species (ROS), reactive nitrogen species (RNS), and antimicrobial peptides (11). It has been shown that *S. agalactiae* is able to survive in the mature phagolysosome for an extended period of time (12–15). Thus, to cope with low pH, *S. agalactiae* possesses numerous defense mechanisms (16, 17) that are regulated by two-component systems and transcriptional regulators (16, 18, 19). The oxidative stress response also contributes to acid adaptation (16) and occurs when ROS production prevails over the bacterium's ability to remove the threat (20). Oxidative stress can result in damage to nucleic acids, amino acids, cofactors of proteins, and lipids, and it is counteracted thanks to various mechanisms (17, 20–27).

The variety of hosts and sites that this bacterium can colonize demonstrates its ability to adapt and, especially, its capacity to acquire nutrients such as sugars from its environment. *S. agalactiae* possesses a high number of sugar transporters; in particular, phosphotransferase systems (PTS) that play an important role in carbon catabolite repression (CCR) attest to this adaptability (28). The inflow of sugars into the cell and their catabolism are regulated by CCR. This mechanism avoids the waste of energy by prioritizing the use of sugars that are rapidly metabolizable. In *Bacillus subtilis*, CCR occurs when the presence of a rapidly metabolizable sugar in the medium leads to the formation of a complex of two proteins, the coeffector phosphoprotein HPr-Ser-46-P and CcpA, a pleiotropic transcriptional regulator of the LacI/GalR family (29, 30). In *Firmicutes*, CcpA binds to a *cis*-acting catabolite responsive element (*cre*) DNA sequence enabling the regulation of approximatively 10 to 20% of the genome (31–34). In *B. subtilis*, these sequences are imperfect palindromes with the consensus sequence WTGNNARCGNWWWCAW (35–38). CcpA is thought to act as a repressor when *cre* sites are located upstream of the promoter region and as an activator when *cre* sites are located downstream. However, in *B. subtilis*, *in silico* analyses have shown the presence of *cre* sites in most operons subject to CCR via CcpA, but a few *cre* sites have been found in the genes submitted to catabolic activation via CcpA (31, 39). The CcpA regulon has been studied in a few species of streptococci, highlighting its major role in carbohydrate metabolism (33, 40–42). In group A *Streptococcus* it regulates between 20 and 30% of the genome depending on the study (40, 41). In *Streptococcus suis* it regulates approximately 10% of the genome (33), whereas in *Streptococcus mutans* it regulates only 48 genes out of 1,960 (42). Other than carbon metabolism, CcpA has also been implicated in the regulation of other functions, such as virulence or stress response (33, 40, 41, 43). In *S. agalactiae*, the role of CcpA has not yet been described but a study has described *ccpA* as an essential gene (44).

In this study, we determined the regulon of CcpA in *S. agalactiae* by transcriptomic analysis. We then performed *in silico* analysis to identify putative *cre* sites in the *S. agalactiae* genome and experimentally confirmed the *cre* consensus sequence predicted *in silico* by electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). Among the CcpA regulated genes, up to 12 genes were potentially involved in the stress response. We showed that CcpA contributed to *S. agalactiae* survival under acidic and oxidative conditions and for surviving inside macrophages. The role of two putative universal stress proteins (UspA), SAK_1689, whose encoding gene is strongly regulated by CcpA in the transcriptome, and SAK_1741, was assessed under stress conditions.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

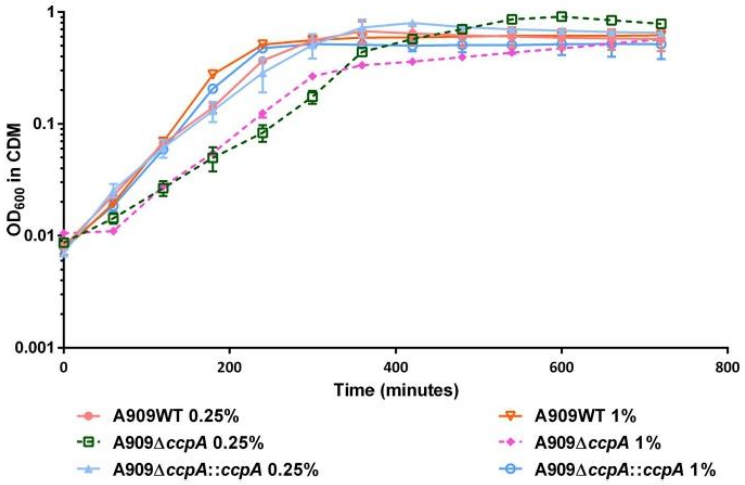


FIG 1 Growth of *S. agalactiae* strains in chemically defined medium. Growth of A909WT, A909Δ*ccpA*, and A909Δ*ccpA*::*ccpA* in CDM medium supplemented with 0.25% or 1% glucose in a 96-well microplate. The curves are means ± standard deviation (SD) over at least two independent biological replicates with three technical replicates for each.

RESULTS

An eighth of the *S. agalactiae* genome is regulated by CcpA. In order to identify the CcpA regulon and to determine the global impact of glucose on gene expression, we performed transcriptome analysis of the strains A909WT and A909Δ*ccpA* in the mid-exponential phase of growth in a chemically defined medium (CDM) supplemented with glucose. The mutant strain A909Δ*ccpA* exhibited a growth delay which was reversed in the complemented A909Δ*ccpA*::*ccpA* strain (Fig. 1). Hence, we determined that the wild-type and A909Δ*ccpA*::*ccpA* strains reached the mid-exponential phase at an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.45, and the mutant strain A909Δ*ccpA* reached an OD_{600} of 0.3. To determine the appropriate glucose concentrations for the transcriptome, we first performed growth curves with glucose concentrations ranging from 0.1 to 5%. As shown in Fig. S1 in the supplemental material, the A909WT and Δ*ccpA* strains showed major growth defects with 0.1% and 5% glucose. In addition, the stationary phase of the Δ*ccpA* mutant with 2% glucose in the medium had a significantly decreased OD. Thus, for RNA sequencing (RNA-seq) experiments, we decided to supplement the chemically defined medium with 0.25% or 1% glucose, which were both the extreme concentrations without any phenotypic variation in both strains' growth.

Transcriptome analysis revealed no overall effect of glucose concentration between the two tested conditions. Only 7 genes belonging to five transcriptional units were differentially regulated by increasing the glucose concentration from 0.25% to 1% in the A909WT strain: *SAK_0087* and *SAK_1651* coding two alcohol dehydrogenases, *SAK_0170* and *SAK_0171* belonging to a ribose operon, *SAK_0528* and *SAK_0529* belonging to a galactitol PTS operon, and *SAK_0257* coding a trehalose PTS. In order to demonstrate a glucose effect in *S. agalactiae*, the A909WT strain was cultured in chemically defined medium supplemented with different carbon sources (glucose, fructose, galactose, saccharose, and ribose) alone or together. At the mid-exponential phase of growth, RNAs were extracted and reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) was performed on four genes (*ccpA*, *rbsR*, *pyk*, and *ptsG*) known to be regulated by glucose in other Gram-positive bacteria. Overall, there was no transcriptional difference between all tested conditions, making it impossible to show a glucose effect on the gene regulation of *S. agalactiae* (Fig. S2) under our conditions. Despite the apparent lack of glucose effect, 274 and 192 genes were differentially regulated by CcpA under 0.25% and 1% glucose, respectively, when comparing the

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 20 October 2022 by 37.167.81.249.

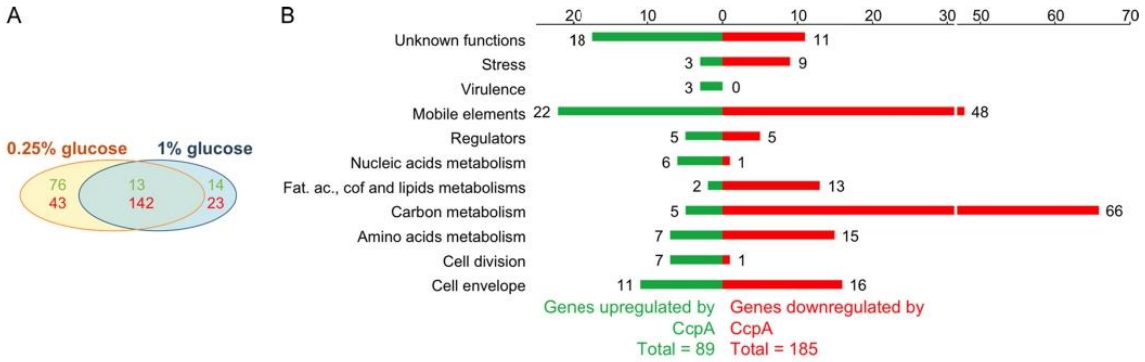


FIG 2 Transcriptome analysis of differentially expressed genes between *S. agalactiae* A909WT and A909Δ*ccpA* growing in CDM with glucose in the mid-exponential phase. (A) Number of genes differentially expressed in *S. agalactiae* A909Δ*ccpA* compared to the WT in CDM with 0.25% or 1% glucose. Green, genes upregulated by CcpA; red, genes downregulated by CcpA; black, not regulated by CcpA. (B) Transcriptome analysis of functional classes of differentially expressed genes between A909WT and A909Δ*ccpA* growing in CDM with 0.25% glucose. Pathway predictions and gene annotations were conducted with the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG Pathway) (https://www.kegg.jp/kegg/) (92) and the MicroScope platform (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope) (90), as explained in Materials and Methods. Experiments were performed over three independent biological replicates. Individual genes from each category are listed in Table S3. Fat. ac, fatty acids; cof, cofactors.

A909Δ*ccpA* mutant and the parental strain (Fig. 2). To simplify the transcriptional analysis, only the results obtained for the 0.25% glucose condition will be presented. The transcriptome analysis revealed that 274 genes, i.e., approximately 150 transcriptional units, among the 2,028 *S. agalactiae* A909 genes studied, were differentially transcribed, corresponding to 13.5% of the genome. Genes downregulated by CcpA (i.e., upregulated in the A909Δ*ccpA* mutant) outnumbered the upregulated genes (i.e., downregulated genes in the A909Δ*ccpA* mutant) by a factor of two to one. Genes differentially transcribed were mostly genes involved in carbon metabolism (Fig. 2, Table S3). To confirm the data obtained by RNA-seq, RT-qPCRs were performed on 14 genes of different cell functions, whether regulated or not, with RNA prepared from strains A909WT, A909Δ*ccpA*, and A909Δ*ccpA*::*ccpA* under the same conditions as for RNA-seq but with completely independent samples. RT-qPCR results confirmed the RNA-seq data for the tested genes. Furthermore, the level of expression was complemented in strain A909Δ*ccpA*::*ccpA* (Fig. 3).

The major part of the *S. agalactiae* CcpA regulon is directly regulated through *cre* sites. We next searched for the presence of the *cre* motif predicted by RegPrecise, by screening the genome with Virtual Footprint and RegPrecise. With Virtual Footprint, we identified 490 potential *cre* sites corresponding to 418 genes that harbored at least one putative *cre* site. Among these 418 genes, 82 were significantly regulated in the transcriptome analysis, 18 were upregulated by CcpA, and 64 were downregulated by CcpA. Among the 89 genes upregulated by CcpA, as determined by RNA-seq analysis, only 10 had a *cre* site located in a position considered to be activating, i.e., upstream of the −35 box of their transcriptional unit (*SAK_0419*, *SAK_0575-0576*, *SAK_0685*, *SAK_0902*, *SAK_0950*, *SAK_1233-1234*, *SAK_1394*, and *SAK_1640*). Instead, upregulation of most genes by CcpA probably occurs indirectly.

To confirm the predicted *in silico cre* site, EMSAs were performed using *S. agalactiae* CcpA and DNA fragments spanning the region containing the putative *cre* site of three genes regulated by CcpA (*rbsR*, *typA*, and *SAK_0257* encoding the trehalose phosphotransferase system) under the transcriptome conditions. Proteins encoded by *rbsR* and *SAK_0257* are both involved in carbon metabolism. The gene *typA* codes for a translational regulator involved in the expression of virulence and pathogenicity factors under carbon starvation in *Escherichia coli* (45) and cold shock response in *B. subtilis* (46). Regions belonging to the *SAK_0473* and *SAK_1068* genes without *cre* sites served as negative controls. The addition of CcpA induced a shift in mobility of the three probes containing a *cre* site from 50 ng of CcpA for the three genes (Fig. 4).

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 20 October 2022 by 37.167.81.249.

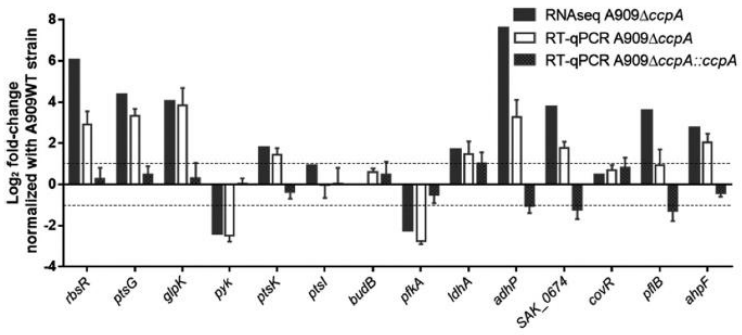


FIG 3 Validation of RNA-seq by RT-qPCR. The transcript levels of 14 genes of the A909WT, A909Δ*ccpA*, and A909Δ*ccpA*::*ccpA* strains were detected by RT-qPCR. The number of transcripts of each gene was normalized against transcript levels of 2 housekeeping genes (*gyrB* and *rpoB*). Gene expression is presented as the $\log_2$ fold change of the A909Δ*ccpA* mutant or A909Δ*ccpA*::*ccpA* normalized to the A909WT transcript levels. The data are means ± SD of three independent biological replicates with three technical replicates for each. The dotted lines represent a $\log_2$ fold change of −1 and 1. The 14 selected genes are *rbsR* (*SAK_0171*), *ptsG* (*SAK_1920*), *glpK* (*SAK_0345*), *pyk* (*SAK_1037*), *ptsK* (*SAK_0862*), *ptsI* (*SAK_0946*), *budB* (*SAK_1279*), *pfkA* (*SAK_1036*), *ldhA* (*SAK_0821*), *adhP* (*SAK_0087*), *SAK_0674*, *covR* (*SAK_1639*), *pflB* (*SAK_1735*), and *ahpF* (*SAK_1854*).

CcpA is largely involved in carbohydrate metabolism. Among the genes coding the 17 putative PTS predicted in *S. agalactiae* (KEGG organisms: https://www.genome.jp/kegg/catalog/org_list.html), 7 were inhibited by CcpA through direct interaction with a *cre* site. CcpA inhibited genes coding PTS of rapidly metabolizable sugars such as *ptsG*, coding the enzyme EIIABC of the glucose PTS system, and genes coding PTS of known secondary sugars such as the *SAK_0528-SAK_0530* genes, encoding a potential galactitol PTS transporter carried by the insertion sequence IS*1381*. Three operons encoding ABC transporters involved in carbon metabolism were downregulated by CcpA: *SAK_0532-0539*, *SAK_0166-SAK_0171*, and *SAK_1475-SAK_1477* coding the transporters of *N*-acetylglucosamine, ribose, and cyclodextrin, respectively, for which a *cre* site was present.

Several genes involved in glycolysis and gluconeogenesis were regulated by CcpA, as already demonstrated in other *Firmicutes* (32, 40, 47). CcpA upregulated *pfkA*, which codes the PfkA protein, a key enzyme of glycolysis, catalyzing the conversion of fructose-6-phosphate to fructose-1,6-biphosphate. Conversely, the gene coding the enzyme catalyzing the opposite reaction, fructose-1,6-biphosphatase, Fbp, was downregulated by CcpA and harbored a *cre* site. Likewise, the *pyk* gene was upregulated by CcpA, whereas the *ppdK* gene was downregulated by CcpA (Fig. 5, Table S3).

S. agalactiae being a bacterium involving a fermentative metabolism of sugars, such as

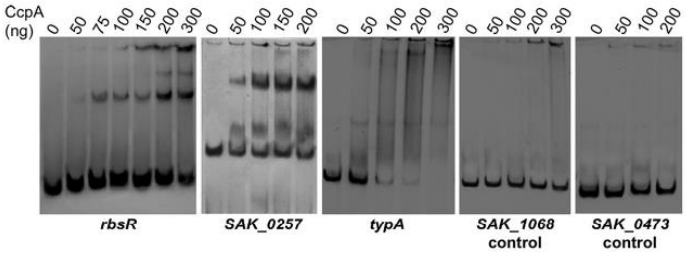


FIG 4 Binding of CcpA to different targets with *cre* sites. EMSAs of DNA fragments containing the *cre* sites of *rbsR* (*SAK_0171*), *SAK_0257*, and *typA* (*SAK_0575*) genes and containing no *cre* site to serve as negative control (*SAK_1068* and *SAK_0473*) were performed. The digoxigenin-labeled DNA fragments were incubated with increasing concentrations of purified CcpA-His6 as described in Materials and Methods.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 20 October 2022 by 37.167.81.249.

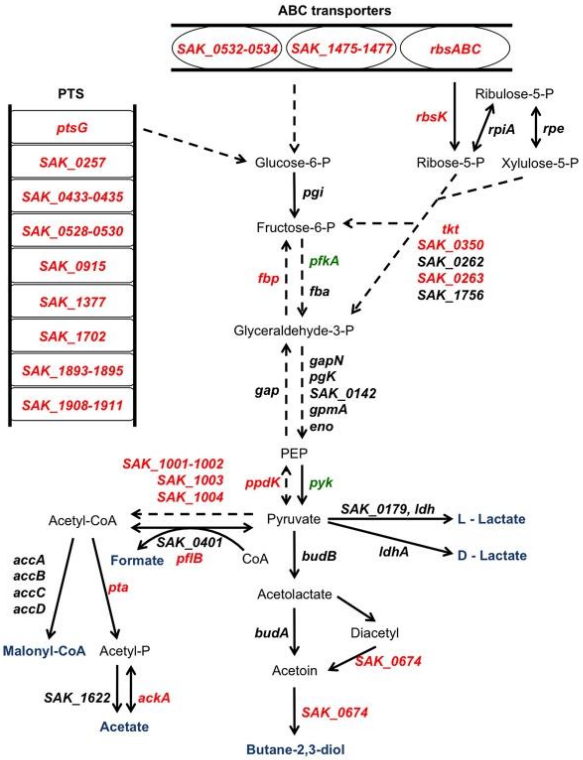


FIG 5 Schematic model of the regulon of CcpA in carbohydrate utilization, central carbon metabolism, and fermentation of *S. agalactiae*. Schematic overview of the role of CcpA in regulating carbohydrate utilization, central carbon metabolism and fermentation in *S. agalactiae* as derived from gene expression in the RNA-seq. Green, gene upregulated by CcpA; red, gene downregulated by CcpA; black, unregulated by CcpA. Solid arrows represent direct reactions, and dashed arrows represent reactions for which there are intermediate reactions. Pathway predictions and gene annotations were conducted with the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG Pathway) (https://www.kegg.jp/kegg/) (92) and the MicroScope platform (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope) (90) as explained in Materials and Methods. *ptsG* (*SAK_1920*), PTS system, glucose-specific IIABC component; *SAK_0257*, PTS system, trehalose-specific IIABC component; *SAK_0398-0400*, lactose/cellobiose PTS, IIA, IIB, and IIC subunits; mannose/fructose/sorbose PTS, IID, IIC, IIB, and IIA subunits; *SAK_0433-0435*, PTS system, IID component, mannose/fructose/sorbose family; *SAK_0528-0530*, galactitol PTS, IIA, IIC, and IIB subunits; *SAK_0915*, PTS system, β-glucoside-specific IIABC component; *SAK_1377*, PTS system, fructose-specific IIABC component; *SAK_1702*, PTS system, sucrose-specific IIABC component; *SAK_1893-1895*, PTS system, glucose-specific IIABC component; *SAK_1908-1911*, mannose/fructose/sorbose PTS, IID, IIC, IIB, and IIA subunits, *SAK_0532-0534*, sugar ABC transporter; *SAK_1475-1477*, cyclodextrin ABC transporter; *rbsABC* (*SAK_0166-0168*), ribose ABC transporter; *rbsK* (*SAK_0170*), ribokinase; *rpiA* (*SAK_1270*), ribose 5-phosphate isomerase A; *rpe* (*SAK_1798*), ribulose-phosphate 3-epimerase; *tkt* (*SAK_0350*), transketolase; *SAK_0262,0263*, putative transketolase, N- and C-terminal subunits; *SAK_1756*, transketolase; *pgi* (*SAK_0475*), glucose-6-phosphate isomerase; *fbp* (*SAK_0666*), fructose-1,6-biphosphatase; *pfkA* (*SAK_1036*), 6-phosphofructokinase; *fbA* (*SAK_0178*), fructose-1,6- biphosphate aldolase; *gapN* (*SAK_0947*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; gap (*SAK_1790*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *pgk* (*SAK_1788*), phosphoglycerate kinase; *SAK_0142*, phosphoglycerate mutase; *gpmA* (*SAK_0889*), phosphoglyceromutase; *eno* (*SAK_0713*), phosphopyruvate hydratase; *pyk* (*SAK_1037*), pyruvate kinase; *ppdK* (*SAK_1682*), pyruvate phosphate dikinase; *SAK_0179*, L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase; *ldh* (*SAK_1054*), L-lactate dehydrogenase; *ldhA* (*SAK_0821*), D-lactate deshydrogenase; *budB* (*SAK_1279*), acetolactate synthase; *budA* (*SAK_1278*), alpha-acetolactate decarboxylase; *SAK_0674*, acetoin reductase; *pta* (*SAK_1177*), phosphotransacetylase; *SAK_1622*, acylphosphatase; *ackA* (*SAK_0234*), acetate kinase; *SAK_1001-1002*, *SAK_1003*, *SAK_1004* acetoin dehydrogenase; *SAK_0401*, formate acetyltransferase 2; *pflB* (*SAK_1735*), formate acetyltransferase 1; *accA*, *accBCD* (*SAK_0424*, *SAK_0426-0428*) acetyl-CoA carboxylase.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

glucose, we were interested in the role of CcpA in the fermentation process. Thereby, five main glucose fermentation pathways are identified in *S. agalactiae*; three of them were partially or totally regulated by CcpA. The main mode of *S. agalactiae* fermentation involves the action of lactate dehydrogenases, which transform the pyruvate produced by glycolysis into lactate. Three genes encoding lactate dehydrogenases (*ldh*, *SAK_0179*, and *ldhA*) have been identified in *S. agalactiae*, but none of them was differentially expressed in the A909Δ*ccpA* strain under the test conditions. Thus, although most of the pyruvate is converted to lactic acid in *S. agalactiae*, CcpA was not involved in the regulation of lactate dehydrogenases under our conditions. The second identified fermentation pathway results in the formation of butane-2,3-diol. Among the different enzymes involved in this fermentation pathway, only acetoin reductase, encoded by the gene *SAK_0674*, was significantly inhibited by CcpA in the presence of glucose. This gene has a *cre* site. The third fermentation pathway is characterized by the production of acetate from pyruvate derived from glycolysis via the acetyl phosphate intermediate. Phosphotransacetylase and acetate kinase, respectively, encoded by the *pta* and *ackA* genes that possess *cre* sites, were downregulated by CcpA. Finally, glucose fermentation in *S. agalactiae* can also lead to the production of formate. The transcriptomic analysis revealed that the genes *SAK_1001-1002*, *SAK_1003*, and *SAK_1004*, encoding the enzymes involved in the formation of formate from pyruvate, were downregulated by CcpA with the gene *SAK_1001* presenting a *cre* site (Fig. 5).

To confirm the impact of CcpA regulation on several fermentation processes, we analyzed by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy the end products of fermentation in the culture supernatants of strain A909WT, the *ccpA* mutant and its complemented strain grown in chemically defined medium supplemented with 0.25% glucose. We could not detect butane-2,3-diol or malonyl-CoA with these assays. For technical reasons, lactate and threonine were measured together. There were no significant differences in the lactate plus threonine concentration between the three strains. Conversely, there was an overproduction of acetate (fold change of 4.14 compared to strain A909WT) and formate (fold change of 1.87 compared to strain A909WT) by the *ccpA* mutant (Fig. S3). These results were in agreement with our transcriptome data since CcpA does not regulate lactate dehydrogenases but represses genes involved in acetate and formate production.

CcpA also largely regulates the expression of mobile genetic elements. Genes belonging to three mobile genetic elements were regulated by CcpA: the LambdaSa03 prophage found in *S. agalactiae* strains A909, H36B, and 515, the LambdaSa04 prophage found in *S. agalactiae* strains A909 and CJB111 (48), and the genetic mobile element containing the insertion sequence IS*1381*. In particular, a large part of the genes of the LambdaSa03 and LambdaSa04 prophages, mostly with unknown function, were significantly upregulated (22 out of 49 genes) or downregulated (37 out of 48 genes), respectively. Out of 20 genes from a mobile genetic element containing the IS*1381*, 11 were downregulated by CcpA and code proteins involved in carbon metabolism.

CcpA influences the stress response. Interestingly, a total of 12 genes belonging to 9 transcriptional units and putatively involved in the stress response were regulated by CcpA (Table S3). Among them, eight had a *cre* site in their regulatory region. In addition, four other genes involved in stress responses (*lytR*, *ciaR*, and *ahpC-F*) and regulated by CcpA were located elsewhere in the transcriptome because of their other physiological functions. For instance, *cidA-B* (*SAK_1233-1234*) was upregulated; *lrgA-B* (*SAK_0250-0251*) and *lytR* (*SAK_0247-0249* operon), which code a two-component system transcriptional regulator known to regulate *lrgA-B*, were downregulated by CcpA thanks to the presence of a *cre* site in the regulatory region of each operon. These genes have already been shown to affect stress responses and pathogenicity in *S. mutans* (27, 49–51). We confirmed the regulation by CcpA for three of the genes presenting a *cre* site thanks to transcriptional fusions: *SAK_0348*, an NADH peroxidase previously reported to play a role in oxidative stress (52); *SAK_0902*, coding a putative DEAD box ATP-dependent RNA helicase, which, by sequence analogy (60% identity) with *Listeria monocytogenes* Lmo0866, could play a role in ethanol stress resistance (53); and *SAK_1689*, coding a putative UspA protein whose regulation in stress is discussed below (Fig. 6).

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

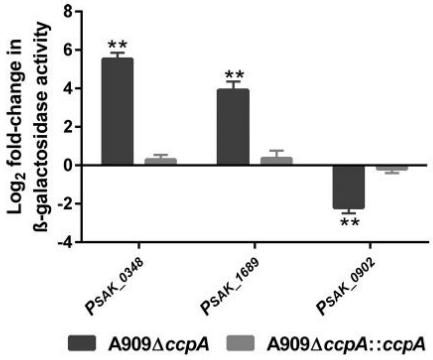


FIG 6 CcpA regulates genes putatively involved in the stress response. A909 WT, its isogenic mutant A909Δ*ccpA*, and the strain complemented *in situ*, A909Δ*ccpA*::*ccpA*, were transformed with pTCV-*lacZ* containing the promoter regions of *SAK_0348*, *SAK_1689*, and *SAK_0902* upstream the *lacZ* gene (P_{SAK_0348}, P_{SAK_1689}, and P_{SAK_0902}, respectively). A909 cells were grown in CDM supplemented with 0.25% glucose until they reached the mid-exponential phase. β-Galactosidase assays were performed as described in Materials and Methods. Promoter activity of the strains is expressed as the $\log_2$ fold change relative to the WT strain. The values shown are presented as the means ± SD over four independent biological experiments. The asterisks indicate *P* values obtained using one-sample *t* test. **, $P < 0.01$.

CcpA is involved in acid and oxidative stress responses. After the growth of strains A909WT, A909Δ*ccpA*, and A909Δ*ccpA*::*ccpA* in Todd Hewitt (TH) broth (Fig. 7), until mid-expential phase, we performed survival experiments in TH medium containing 20 mM H_2O_2 or in acidic TH (pH = 4) to assess the role of CcpA in stress conditions. We observed that the percent survival of strain A909Δ*ccpA* was impaired 270- and 152-fold under these two conditions, respectively, compared to the wild-type strain (Fig. 8A and B). These results indicate that CcpA plays an essential role in *S. agalactiae* in conferring protection against oxidative and acidic stresses (Fig. 8).

SAK_1689 codes a putative UspA protein and is overexpressed under oxidative stress. To explain the susceptibility of the A909Δ*ccpA* mutant strain, we searched for its direct targets putatively involved in stress responses and regulated in our transcriptomic analysis. Our transcriptome analysis indicates that *SAK_1689* was downregulated by CcpA with a $\log_2$ fold change of 4.91 (Table S3). To the best of our knowledge, the function of the resulting protein has not yet been characterized in *S. agalactiae*. This gene presents a *cre* site which spans the −35 box. It codes a putative universal stress protein A (UspA) with 52% sequence identity and 70% sequence similarity with Lmo1580 of *Listeria monocytogenes* EGDe (Fig. S4). The latter is involved in acidic and oxidative stresses and survival in macrophages (54). The role of UspA proteins remains unclear, but they might play a role in DNA protection or in posttranslational polypeptide modifications in *E. coli* (55, 56). One study has already demonstrated that the putative UspA protein coded by *SAK_1689* is overexpressed under nutrient stress (extended stationary phase) in *S. agalactiae* (57).

The expression of *SAK_1689* in acidic TH (pH 4) or TH containing 2.5 mM hydrogen peroxide (=MIC) was evaluated by RT-qPCR. No overexpression was observed in acidic pH (Fig. 9A), though we showed an overexpression of the gene under oxidative conditions ($\log_2$ fold change of 1.91) in the wild-type strain (Fig. 9B). To determine whether CcpA was involved in the regulation of *SAK_1689* under oxidative conditions, we performed RT-qPCR with strain A909Δ*ccpA* in TH containing 2.5 mM hydrogen peroxide. The gene was upregulated under oxidative conditions with a $\log_2$ fold change of 3.96 (Fig. 9B). The expression of *SAK_1689* in the A909Δ*ccpA* strain compared to the A909WT strain under oxidative conditions was significantly higher ($\log_2$ fold change of 5.19). Thus, *SAK_1689* was significantly more transcribed in the Δ*ccpA* mutant than in the wild-type (WT) strain under oxidative conditions. Therefore, we hypothesize that

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

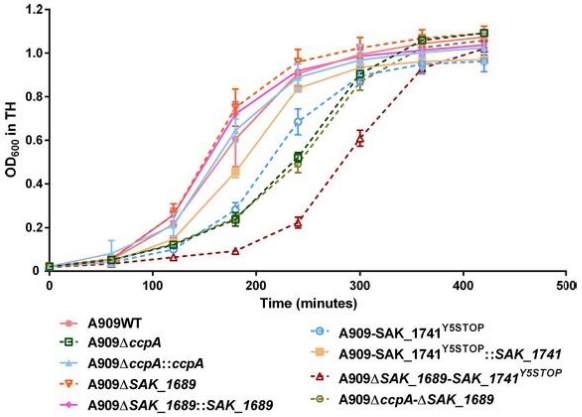


FIG 7 Growth of *S. agalactiae* strains in TH medium. Growth of A909WT, A909Δ*ccpA*, A909Δ*ccpA*::*ccpA*, A909Δ*SAK_1689*, A909Δ*SAK_1689*::*SAK_1689*, A909-SAK_1741^{Y5STOP}, A909-SAK_1741^{Y5STOP}::*SAK_1741*, A909Δ*SAK_1689*-SAK_1741^{Y5STOP}, and A909Δ*ccpA* Δ*SAK_1689* in TH medium in a 96-well microplate. The curves are means ± SD over three independent biological replicates with three technical replicates for each.

an unknown activator upregulates *SAK_1689* under oxidative conditions and that CcpA limits this overexpression.

SAK_1689 and SAK_1741 Usp proteins are not essential for stress resistance in *S. agalactiae*. Since *SAK_1689* is overexpressed under oxidative stress, a deletion mutant and its complemented strain were first constructed. After growth in the TH medium (Fig. 7), survival experiments under oxidative stress were performed as for the mutant A909Δ*ccpA* to determine the role of *SAK_1689*. Under oxidative stress, we observed a lower survival rate of the A909Δ*SAK_1689* mutant that was not statistically significant (*P* value of 0.057) (Fig. 8A). However, the survival experiments under acidic conditions did not show any impaired survival rate for the A909Δ*SAK_1689* mutant (Fig. 8B). To explain the absence of these significant phenotypes with the A909Δ*SAK_1689* strain, we hypothesized that there might be functional redundancy between SAK_1689 and other protein(s) under stress con-

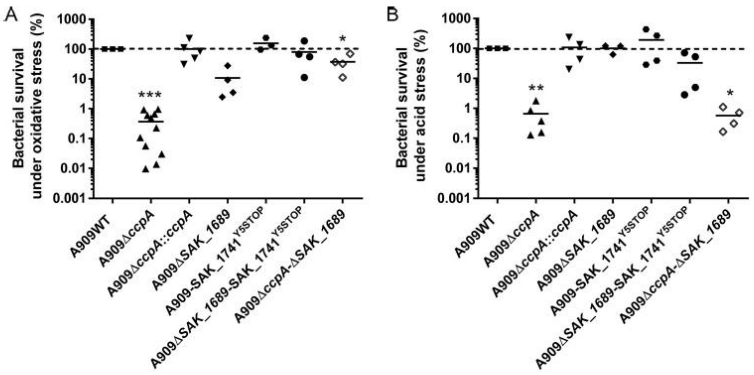


FIG 8 Role of CcpA and SAK_1689 in stress survival. (A) Sensitivity of *S. agalactiae* to H_2O_2. Strains were treated with 20 mM H_2O_2 for 30 min. (B) Sensitivity of *S. agalactiae* to acidic pH (pH 4) after 24 h as described in Materials and Methods. All strains were grown until the mid-exponential phase and then exposed to stresses. Viability was determined by plating onto TH agar. The data are presented as the percent survival relative to a theorical value of 100% for the A909WT strain. Experiments were performed at least three times; each point represents an independent biological experiment. The asterisks indicate *P* values obtained using a Wilcoxon test, comparing the WT strain CFU to those of the other tested strains. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

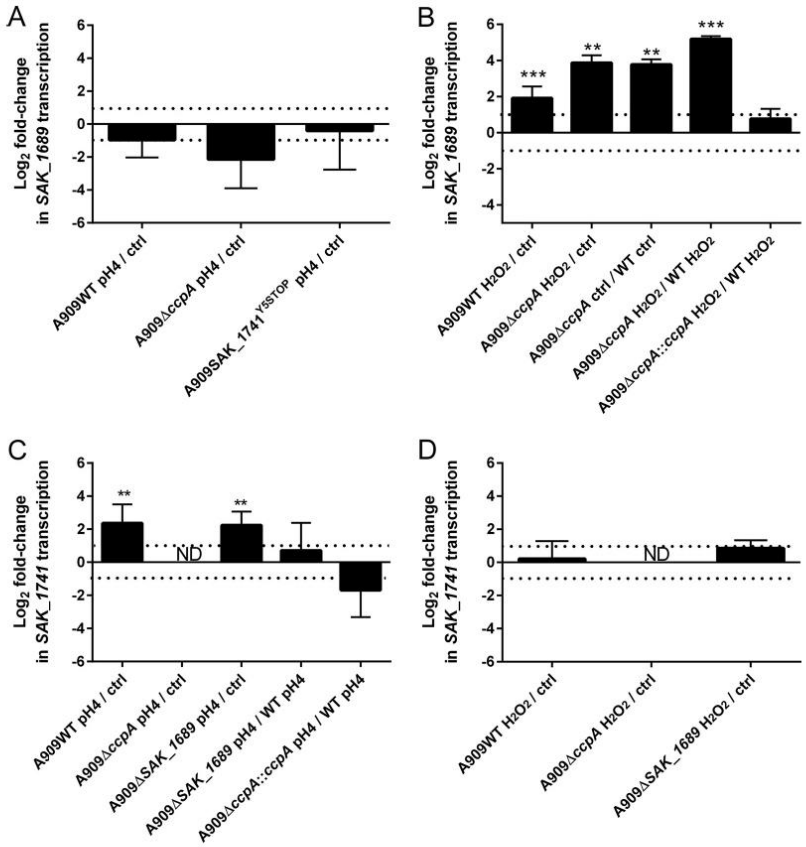


FIG 9 Transcription of *SAK_1689* and *SAK_1741* under stress conditions. qRT-PCRs were performed on RNA extracts of *S. agalactiae* strains grown to the mid-exponential phase. The number of transcripts of each gene was normalized against *recA* transcript levels. Gene expression is presented as the $\log_2$ fold change in *SAK_1689* and *SAK_1741* transcript levels. Ctrl stands for control condition, i.e., for each strain, the condition without stress in TH at pH 7. ND means expression not detected (>30 threshold cycle [C_T]). The dotted lines represent a $\log_2$ fold change of −1 and 1. (A and C) Transcription of *SAK_1689* (A) and *SAK_1741* (C) under acidic conditions was measured after 20 min of stress in TH at pH 4. (B and D) Transcription of *SAK_1689* (B) and *SAK_1741* (D) under oxidative conditions was measured in TH after 20 min of stress in 2.5 mM H_2O_2 (MIC). Results are presented as the means ± SD over at least three independent biological replicates with three technical replicates for each. *P* values were obtained using a one-sample *t* test to compare the $\log_2$ fold change to a hypothetical value of 0 (no difference). **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

ditions. Usp-containing organisms are, indeed, usually equipped with several *usp* genes. Interestingly, *in silico* analysis of the *S. agalactiae* genome permits the detection of a paralog of *SAK_1689*, *SAK_1741*, encoding a protein that has 67% sequence identity with SAK_1689 (Fig. S4). The *SAK_1741* gene is not significantly regulated by CcpA, nor does it have *cre* site. Thus, we hypothesized that there might be functional redundancy between SAK_1689 and SAK_1741 under stress conditions. An RT-qPCR experiment that analyzed *SAK_1741* expression in A909WT, A909Δ*ccpA*, and A909Δ*SAK_1689* strains showed that this gene was weakly expressed in all the strains, particularly in A909Δ*ccpA*. No difference in *SAK_1741* gene expression was found, except under acidic stress conditions, where the transcription of *SAK_1741* was higher in the WT and A909Δ*SAK_1689* strains ($\log_2$ fold change of 2.37 and 2.24, respectively) (Fig. 9C and D). We therefore generated the A909-SAK_1741^{YSSTOP} substitution mutant and the A909Δ*SAK_1689*-SAK_1741^{YSSTOP} double mutant to evaluate their

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

survival under stress conditions and to determine whether these two Usp proteins were (i) involved in stress responses and (ii) functionally redundant even if the expression of *SAK_1741* was not differentially affected under stress conditions in the Δ*SAK_1689* mutant. The growth of the three strains was first determined in TH medium and highlighted a growth delay for A909-SAK_1741^{Y5STOP} and A909Δ*SAK_1689* SAK_1741^{Y5STOP} strains (Fig. 7). However, like for the A909Δ*SAK_1689* mutant, the survival under oxidative or acidic conditions of the A909-SAK_1741^{Y5STOP} mutant and the double A909Δ*SAK_1689* SAK_1741^{Y5STOP} mutant was not significantly impacted (Fig. 8A and B), demonstrating that the phenotype observed for A909Δ*SAK_1689* under stress was not due to a compensatory effect.

Overproduction of SAK_1689 in the A909Δ*ccpA* mutant under oxidative conditions is harmful. We hypothesized that CcpA represses *SAK_1689* under the oxidative stress conditions and prevents the overproduction of SAK_1689 that could be harmful to the bacteria. Indeed, in *E. coli*, Nyström et al. (55) showed that overproduction of UspA results in a significant reduction in cell growth rate in minimal medium, along with alterations in global protein synthesis and modifications of the pI of some proteins. Thus, the double deletion mutant A909Δ*ccpA* Δ*SAK_1689* was constructed, and after growth in TH medium (Fig. 7), survival experiments under oxidative stress were performed as mentioned before. We observed that the percentage of survival was 2.7-fold lower than that of the wild-type strain but 109.6-fold higher than that of the A909Δ*ccpA* strain, thus confirming our hypothesis (Fig. 8A). We can therefore conclude that the impacted survival of the A909Δ*ccpA* mutant under oxidative stress is primarily due to the overexpression of *SAK_1689*. Conversely, as expected, under acid conditions, where the gene *SAK_1689* is not overexpressed, we observed similar survival rates between the A909Δ*ccpA*Δ*SAK_1689* and A909Δ*ccpA* mutants (Fig. 8B). Thus, the impacted survival of the A909Δ*ccpA* mutant under acidic stress is due not to SAK_1689 but probably to other genes regulated by CcpA.

Importance of the *ccpA* gene for survival in macrophages. We also tested the ability of strains A909WT, A909Δ*ccpA*, A909Δ*ccpA*::*ccpA*, and *A909ΔSAK_1689* to survive inside RAW264.7 macrophage cell lines in order to determine the role of CcpA and SAK_1689 in bacterial survival inside the macrophages. The percentage of survival of the A909Δ*ccpA* mutant after 24 h was 2.7-fold lower than that of the A909WT strain, with a *P* value of 0.01. The controls performed showed that gentamicin treatment killed extracellular bacteria and that RAW 264.7 cells were not killed during the experiment (Fig. S5). The survival of the A909Δ*SAK_1689* mutant was weakly but not significantly impaired (fold change of 1.88) (Fig. 10). Thus, CcpA plays an important role for survival in macrophages, probably due to the regulation of some genes encoding proteins involved in this phenomenon.

DISCUSSION

A better understanding of the mechanisms involved in the physiology of *S. agalactiae* is essential to understand how this bacterium adjusts to changes in its environment. The variability of the sites colonized by *S. agalactiae* attests to its great capacity for adaptation: the ability to acquire nutrients and but also to cope with physicochemical variations such as an acidic pH or oxidative stress in the vagina.

In this study, we deleted the *ccpA* gene in strain A909 to create a *ccpA* mutant which displayed a growth delay. However, Hooven et al., showed that *ccpA* was an essential gene using a transposon insertion sequencing (Tn-seq) system (44). We used TH medium instead of tryptic soy medium to grow the mutant strain, which could be the reason for the discrepancy in results. Furthermore, because of the *en masse* selection of mutants in the Tn-seq system, mutants with low fitness may disappear (58). We showed here that CcpA is a pleiotropic regulator of *S. agalactiae* since it regulates 13.5% of the genome. This is consistent with what has been shown before for other *Firmicutes* (31–34). Moreover, as for other Gram-positive bacteria, CcpA acts primarily as a repressor and mainly regulates genes involved in carbon metabolism (31–34, 59) by binding to a *cre* site whose sequence has been validated in our study. In addition to the role of CcpA in carbon metabolism, studies have highlighted the involvement of CcpA in many other functions in other bacteria: in

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

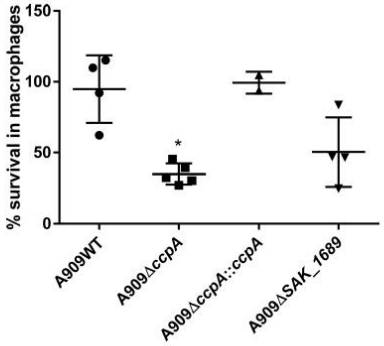


FIG 10 Importance of CcpA for survival in macrophages. Survival of *S. agalactiae* strains inside RAW 264.7 macrophages was evaluated after 24 h of infection. The number of intracellular bacteria was normalized to the number of bacteria in the well after the antibiotic treatment as described in Materials and Methods. Strains were grown until the mid-exponential phase, and then RAW 264.7 macrophages were infected. Viability was determined by plating on TH agar. Assays were performed over four technical replicates and repeated over at least two independent biological replicates. Each dot represents the mean of technical replicates for one biological experiment. The asterisks indicate *P* values obtained using ANOVA and then Wilcoxon tests. *, $P < 0.05$.

amino acid metabolism (60–64), phosphorus metabolism (65), stress response (32, 65), sporulation (32), colonization (66), biofilm formation (67), and virulence (32, 40, 68, 69). In this study, transcriptome analysis showed that CcpA regulates several genes involved or putatively involved in the stress response. Among the targets of CcpA, we noticed the *SAK_0348* (or *npx*) gene highly downregulated by CcpA, which presents a *cre* site and has been previously shown to be important in an *in vitro* model of multiple phagosomal biochemical/oxidant stressors or in macrophages (52). Further, CcpA downregulates two peroxidases: a thiol peroxidase (Tpx) without a *cre* site and an alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF), whose role was described by Lechardeur et al. (26) and that presents a *cre* site. Moreover, as for *S. mutans*, the genes *lrgA-B* and *lytR* downregulated by CcpA and *cidA-B* upregulated by CcpA could play a role in oxidative stress resistance in *S. agalactiae* (27, 49–51). This led us to subject strain A909Δ*ccpA* to different types of stresses encountered in the host, such as acidic and oxidative stresses and survival in macrophages. As the survival of the mutant A909Δ*ccpA* was highly impacted under these conditions, we concluded that CcpA was crucial in stress resistance. Although several transcriptome studies have shown that CcpA regulates genes involved in the stress response (32, 65), very few phenotypic studies have been performed to show the involvement of CcpA in stress resistance. Two studies in *Lactobacillus* species showed that, contrary to what we observed, deletion of CcpA affected resistance under several stresses but improved resistance to oxidative stress (70, 71).

Endogenous metabolism can produce H_2O_2, depending on the substrate used as an energy source (72, 73). In *Streptococcus pyogenes*, Kietzman et al. showed that hydrogen peroxide production by lactate oxidase LctO was both glucose- and growth phase-regulated through CcpA (74). Like other streptococci, *S. agalactiae* presumably releases hydrogen peroxide (75). In conclusion, if CcpA is involved in the metabolism and production of hydrogen peroxide, we showed here that it is also involved in the resistance to oxidative stress.

Furthermore, we highlighted here an overexpression of *SAK_1689* under oxidative stress conditions and high repression of *SAK_1689* by CcpA. In *L. monocytogenes*, it has been suggested that σ^B is the activator of the gene under different stress conditions (54). However, this transcription factor does not exist in *S. agalactiae* (28). Thus, the activator of *SAK_1689* remains to be determined.

In this study, we showed that CcpA is involved in acidic and oxidative stress resistance and protects *S. agalactiae* from the deleterious effects of overproduction of the

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

SAK_1689 protein under oxidative stress. To our knowledge, this is the first study which highlights the broad involvement of CcpA in the regulation of mobile genetic elements. Thus, we demonstrated that CcpA is a pleiotropic regulator which is involved in stress resistance in *Streptococcus agalactiae*.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The reference wild-type (WT) *S. agalactiae* strain used in this study was strain A909, a sequence type 7 (ST7), clonal complex 7 (CC7), serotype IA clinical isolate from a human case of bacteremia. All strains used in this study are listed in Table S1. *Escherichia coli* strains were grown in Lysogeny broth (LB) medium (MP; catalog [cat.] no. 3002022) at 37°C with agitation or on an LB agar plate. *S. agalactiae* strains were routinely grown in Todd Hewitt (TH) broth (BD; cat. no. 249240) at 37°C without agitation or on TH-agar plates. When necessary, strains were grown in filter-sterilized chemically defined medium (CDM) (76) supplemented with corresponding carbohydrates: glucose or other sugars.

Chromosomal and plasmid DNA purification. Chromosomal DNA of *S. agalactiae* statically cultured overnight in TH broth was purified by the phenol-chloroform method (77). *E. coli* plasmids were purified with a NucleoSpin plasmid kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

PCR and DNA sequencing. PCRs were performed with a SimpliAmp thermal cycler (Thermo Fisher Scientific) using Platinum SuperFi high-fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific). The resulting PCR fragments were purified with a NucleoSpin gel and PCR cleanup kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions.

PCR products purified with the NucleoSEQ kit (Macherey-Nagel) were sequenced on both strands using the BigDye Terminator (version 3.1) cycle sequencing kit from Applied Biosystems and the ABI Prism 310 genetic analyzer.

Construction of mutants and complemented strains. *S. agalactiae* strain A909WT (78) was used for this study. Its isogenic mutants A909Δ*ccpA*, A909Δ*SAK_1689*, and the double mutant A909Δ*ccpA* Δ*SAK_1689* were obtained by allelic exchange thanks to the temperature-sensitive shuttle plasmid pG+host1^{ts} (79). Briefly, upstream and downstream regions of the genes to be deleted were amplified with primers 65F-66R and 67F-68R for A909Δ*ccpA* and primers 602F-601R and 600F-599R for A909Δ*SAK_1689*. A recombination cassette, consisting of a fusion between these two regions, was obtained using splicing-by-overlap-extension PCR and cloned into the EcoRI/BamHI restriction sites of the temperature-sensitive shuttle plasmid. Then, the recombinant plasmid was electroporated into an *E. coli* XL1-Blue strain, plated onto LB agar plates supplemented with 150 μg/mL erythromycin, and incubated overnight at 37°C. The transformants were used for amplification, purification, sequencing, and then electroporation in *S. agalactiae* strain A909. The transformants were plated on Trypticase soy agar plates with 5% sheep blood supplemented with 10 μg/mL erythromycin at 30°C. Then a liquid culture of the transformant in TH medium with 10 μg/mL erythromycin at 38°C favored a first crossing over. Successive subcultures in TH liquid medium without antibiotics and at 30°C then promoted the second recombination event. Erythromycin-sensitive clones for which a deletion was observed after PCR amplification were sequenced. For the A909Δ*ccpA* and A909Δ*SAK_1689* mutants, each deletion mutation is an in-frame, markerless deletion of 984 bp and 432 bp, respectively. To obtain the A909Δ*ccpA* Δ*SAK_1689* mutant, a deletion of the *SAK_1689* gene was performed as explained above in the A909Δ*ccpA* strain. To complement these mutants, the entire coding sequence of the genes was amplified by PCR with primers 65F and 68R for A909Δ*SAK_1689* and primers 602F and 599R for A909Δ*SAK_1689* and inserted into pG+host1^{ts}, as described above. After allelic exchange, the *in situ* complementation was confirmed by PCR and sequencing.

For the A909-SAK_1741^{Y5STOP} and A909Δ*SAK_1689* SAK_1741^{Y5STOP} mutants, we substituted the 5th codon encoding a tyrosine with a STOP codon. The upstream region of the gene was amplified with one portion of the gene with the primers 593F and 616R, and the downstream region of the gene was amplified with the other portion of the gene with the primers 617F and 618R. The overlap primers 616R and 617F contained the STOP codon instead of the tyrosine to make the substitution. The steps to obtain the mutant were then the same as for a deletion mutant. To complement these mutants, the entire native coding sequence of the *SAK_1741* gene was amplified by PCR with the 593F and 618R primers and inserted into pG+host1^{ts} as described above. After allelic exchange, the *in situ* complementation of *SAK_1741* was confirmed by sequencing.

***β*-galactosidase transcriptional fusion assays.** The promoter regions of *SAK_0348*, *SAK_0902*, and *SAK_1689* were cloned in a pTCV-*lacZ* (80) vector to construct transcriptional fusions between the *E. coli lacZ* reporter gene and upstream regions of the genes as described by Patron et al. (81). Briefly, promoter regions were amplified with the primers listed in Table S2. The DNA fragments and pTCV-*lacZ* vector were then purified and digested by EcoRI and BamHI before cloning. For β-galactosidase assays, bacteria were harvested in the mid-exponential phase (10 mL of culture for the A909WT and A909Δ*ccpA*::*ccpA* strains and 20 mL for the A909Δ*ccpA* mutant). Pelleted bacteria were suspended in 500 μL of Z-buffer for the WT and A909Δ*ccpA*::*ccpA* strains and 350 μL for A909Δ*ccpA* and lysed mechanically with glass beads in a FastPrep-24 instrument, and cell debris was eliminated by centrifugation (5 min; 8,000 × *g*) (82). Supernatants were used for assays. The absorbance at 595 nm (A_{595}) and the absorbance after addition of *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside at 420 nm (A_{420}) were measured as described by Patron et al. (81). Protein concentration ($C_{mg/mL}$) was deduced from A_{595}. β-Galactosidase activity was calculated in arbitrary units per milligram of protein using the following formula: $(1{,}000 \times V1 \times A_{420})/(V2 \times t \times C_{mg/mL})$, with V1 being the volume of the sample that was added to the reaction mixture for β-galactosidase in milliliters, V2 being the volume of the sample that was added to the reaction mixture in milliliters, and *t* being the reaction time in minutes. The experiments were performed over four independent biological replicates.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

Acidic and oxidative stress. For survival experiments under acidic stress, bacterial strains were grown in TH to the mid-exponential phase, and then 10 mL of the culture was pelleted and resuspended in 10 mL of TH adjusted to pH 4 with HCl. At time point zero ($t = 0$) and after 24 h, samples were taken from each culture, serially diluted with physiological saline (milli-Q water plus 0.85% NaCl), and plated on TH agar plates. Assays were performed over at least three independent biological replicates.

For survival experiments under oxidative stress, bacterial strains were grown in TH broth to the mid-exponential phase and 20 mM H_2O_2 was added. At time point zero ($t = 0$) and after 30 min, samples were taken from each culture, serially diluted with physiological saline (milli-Q water plus 0.85% NaCl), and plated on TH agar plates. Assays were performed over at least three independent biological replicates.

For transcriptional study of *SAK_1689* and *SAK_1741* under stress conditions, overnight cultures were subcultured (OD_{600}, 0.05) in TH liquid medium. At the mid-exponential phase, bacterial pellets were resuspended in TH at pH 4, or 2.5 mM H_2O_2 (=MIC) was added in the culture. After 20 min at 37°C, cells were harvested by centrifugation at 7,000 × *g* for 10 min, and total RNAs were extracted for RT-qPCR with the primers listed in Table S2. The expression levels of the tested genes were normalized with the *recA* gene. Each assay was performed at least in technical duplicate and repeated with at least three biological independent RNA samples.

Survival in macrophages. Survival experiments in RAW 264.7 macrophages (ATCC TIB-71) were performed in 24-well plates. Cells were dispensed to 24-well plates at 4.10^5 cells/well 24 h before the assay. Bacterial strains were grown in TH until they reached the mid-exponential phase. Cultures were washed in RAW medium (Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM; Gibco] supplemented with 10% Fetal Bovine Serum [Sigma-Aldrich], 2 mM L-glutamine [Gibco], and 1 mM Na pyruvate [Gibco]) and adjusted to the desired inoculum in RAW medium, and CFU counts were verified by plating serial dilutions onto TH agar plates. Macrophages were infected with *S. agalactiae* strains at a multiplicity of infection of ~15 in RAW medium at 37°C with 5% CO_2 for 1 h to allow bacterial phagocytosis. Cells were washed twice in RAW medium and then incubated in RAW medium-gentamicin (500 μg/mL) (Gibco) for 2 h. Gentamicin (50 μg/mL) was added in the RAW medium until the *T*24 h. Time zero (*T*0) of the assay was determined as the time after incubation with antibiotic. Infected macrophages at *T*0 and *T*24 h were washed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and then lysed with 1 mL ice-cold Milli-Q water for 30 min. CFU counts were determined by plating serial dilutions onto TH agar plates. Assays were performed over four technical replicates and repeated over at least two independent biological replicates.

RNA extraction. Bacterial pellets were resuspended in a buffer (glucose, 10%; Tris, 12.5 mM, pH 7.6; and EDTA, 10 mM) and lysed mechanically with glass beads in a FastPrep-24 instrument, and total RNAs were extracted using a phenol/TRIzol-based purification method (83). Total RNAs were then treated with DNase (Turbo DNA-free DNase; Ambion) according to the manufacturer's instructions and then tested by PCR with *gyrB* primers to check for DNA contamination (Table S2).

Reverse transcription and RT-qPCR. The iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) was used according to the manufacturer's instructions to synthesize cDNA. Primers were designed with Primer3 software (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) (84) in order to achieve a melting temperature (T_m) of ≈60°C and to amplify ≈100-bp amplicons (Table S2). qPCRs were performed with 50 ng of cDNA, 0.33 μM gene-specific primers, and 1× LightCycler 480 SYBR green I master mix (Roche). PCR amplification, detection, and analysis were performed as described by Moulin et al. (76). The fold change in transcript level was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (85). For each oligonucleotide pair, the efficiency was checked with a genomic DNA (gDNA) standard of *S. agalactiae* A909WT and superior to 1.8.

Strand-specific RNA-seq library preparation. RNA integrity was verified with the Agilent Bioanalyzer 2100. mRNA enrichment using the MICROBExpress kit (Ambion) and preparation of strand-specific RNA-seq libraries using the Illumina primer ligation method were performed as previously described (86) on three independent biological experiments. Multiplexed libraries (6 samples per lane) were sequenced on the HiSeq 2000 platform (Illumina) with a read length of 50 nt.

Data analysis. The *S. agalactiae* A909 genome sequence (NC_007432.1) was used as a reference sequence to map trimmed reads using Bowtie (version 0.12.7) (87) as previously described (86). RNA-seq data were analyzed using Rsamtools (version 1.13.35), GenomicRanges (version 1.13.39), and GenomicFeatures (version 1.12.3) in R (version 3.0.1) as previously described (86). For differential expression analyses, normalization, and statistical analyses were performed using EdgeR software (version 3.2.4) (88); *P* values were adjusted for multiple testing using the false-discovery rate controlling procedure (89).

Annotation of unknown function coding genes of the *S. agalactiae* A909 genome sequence (NC_007432.1) was completed using the MicroScope platform (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope) (90) and the Pfam (version 35.0) database (https://pfam.xfam.org/) (91). *S. agalactiae* A909 resulting proteins were mapped onto a set of metabolic pathways for *S. agalactiae* available at the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG Pathway) (https://www.kegg.jp/kegg/) (92) in order to group genes into functional classes.

Validation of RNA-seq by RT-qPCR. To confirm the data obtained in the RNA-seq, RT-qPCRs were performed on *rbsR* (*SAK_0171*), *ptsG* (*SAK_1920*), *glpK* (*SAK_0345*), *pyk* (*SAK_1037*), *ptsK* (*SAK_0862*), *ptsI* (*SAK_0946*), *budB* (*SAK_1279*), *pfkA* (*SAK_1036*), *ldhA* (*SAK_0821*), *adhP* (*SAK_0087*), *SAK_0674*, *covR* (*SAK_1639*), *pflB* (*SAK_1735*), and *ahpF* (*SAK_1854*) genes with the primers listed in Table S2, using RNA extracted under the same conditions as for the RNA-seq. The numbers of transcripts of each gene were normalized against transcript levels of two housekeeping genes (*gyrB* and *rpoB*). Three independent biological replicates with three technical replicates for each were performed.

Bioinformatic analysis of *cre* sites. For the prediction of CcpA binding sites on the *S. agalactiae* genome, the positional weight matrix (PWM)-based model of the streptococcal *cre* site proposed by RegPrecise (https://regprecise.lbl.gov/) was used. The motif WWGWAARCGNTTWCWW (W for A or T, R

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

for A or G, N for any base) in the leader regions from position −500 to +500 bp relative to the translational start site, allowing no more than 2 mismatches, was searched in the entire genome of *S. agalactiae* A909 using the Virtual Footprint web server.

Electrophoretic mobility shift assay. Regions overlapping the defined *cre* site of *rbsR* (*SAK_0171*), *SAK_0257*, and *typA* (*SAK_0575*) genes were amplified by PCR using the primers listed in Table S2. The probes containing *SAK_1068* and *SAK_0473* coding regions were used as negative controls. The amplified DNA fragments were end-labeled with digoxigenin-11-ddUTP (81) according to the instructions of the manufacturer of the Dig Gel Shift kit, 2nd generation (Roche). DNA fragments and increasing amounts of purified CcpA-His_6 (93) were incubated at 20°C and 250 rpm for 15 min. The resulting DNA-protein complexes were loaded onto a 7% nondenaturing polyacrylamide gel in Tris-glycine buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8, 190 mM glycine, 1 mM EDTA). After a run of 1 h at 130 V, the gel was transferred by capillarity to a positively charged nylon membrane (Amersham). The latter was incubated with anti-digoxigenin-conjugated antibodies conjugated with alkaline phosphatase. Chemiluminescent DNA fragments were revealed with a PXi 4 CCD camera (Ozyme). Image acquisition was performed with Genesys software.

^{1}H-NMR spectroscopy analysis. Overnight cultures of strains A909WT, A909Δ*ccpA*, and A909Δ*ccpA*::*ccpA* were subcultured (OD_{600}, 0.05) in CDM supplemented with 0.25% glucose. After 24 h, cultures were centrifuged at 7,000 × *g* for 10 min. The culture supernatants were collected and filtered. Then, 150 μL of culture supernatants was added with 50 μL of 0.2 M potassium phosphate buffer in 99% deuterium oxide (D_2O) at pH 7.4. Samples were spiked with 10 μL of 3-trimethylsilylpropionic acid (3.2 mM in D_2O) as an internal reference (Ref), and then samples were transferred to conventional 3-mm NMR tubes. ^{1}H-NMR spectra were obtained with an AVANCE III HD 600 spectrometer equipped with a TCI cryoprobe (Bruker). Standard water-suppressed ^{1}H-NMR spectra were acquired at 298 K using a "noesypr1d" pulse sequence with a relaxation delay of 20 s and 64 scans. Spectra were processed using Topspin software (Bruker). ^{1}H-NMR spectra were automatically reduced to ASCII files using the AMIX software package (Analysis of Mixture, version 3.8, Bruker). Spectral intensities were scaled to the internal reference intensity, and then concentrations were calculated using the equation

$$\text{Concentration of compound} = \frac{\text{Intensity of compound} \cdot \text{Concentration of Ref} \cdot \text{nbr H Ref}}{\text{Intensity of Ref} \cdot \text{nbr H compound}}$$

$$\text{Concentration Ref} = 10\,\mu\text{L} \cdot 3.2\,\text{mM}/210\,\mu\text{L} = 152\,\mu\text{M}$$

$$\text{Nbr H Ref} = 9$$

Nbr H Ref, number of hydrogen of the internal reference; nbr H compound, number of hydrogen of the compound. The experiments were performed over three independent biological replicates with three technical replicates for each.

Statistical analyses. Analyses were performed using the one-sample *t* test, analysis of variance (ANOVA) test, unpaired *t* test, or nonparametric Wilcoxon test. A probability value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Data availability. RNA-seq data are available in the ArrayExpress database (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under accession number E-MTAB-11639.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 1.4 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Claudia Carvalho-Schneider for her help with the confirmation of RNA-seq by RT-qPCR, Aurélia Hiron, Philippe Gilot, and Isabelle Virlogeux-Payant for their helpful discussions, Revathi Govind for the proofreading of the paper, and Lydie Nadal-Desbarats, from "PST-Analyse des Systèmes Biologiques, département d'Analyse Chimique et Métabolomique" of the university of Tours, for NMR analysis.

A.-E.R. holds a doctoral fellowship from the University of Tours (France).

REFERENCES

1. Keefe GP. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. Can Vet J 38:429–437.
2. Evans JJ, Klesius PH, Pasnik DJ, Bohnsack JF. 2009. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Emerg Infect Dis 15:774–776. https://doi.org/10.3201/eid1505.080222.
3. Mian GF, Godoy DT, Leal CAG, Yuhara TY, Costa GM, Figueiredo HCP. 2009. Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. Vet Microbiol 136:180–183. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.016.
4. Elliott JA, Facklam RR, Richter CB. 1990. Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, Type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish. J Clin Microbiol 28:628–630. https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.628-630.1990.
5. Nagao PE. 2015. *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci), p 1751–1767. *In* Tang Y-W, Sails A (ed), Molecular medical microbiology. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
6. Francois Watkins LK, McGee L, Schrag SJ, Beall B, Jain JH, Pondo T, Farley MM, Harrison LH, Zansky SM, Baumbach J, Lynfield R, Snippes Vagnone P,

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

Miller LA, Schaffner W, Thomas AR, Watt JP, Petit S, Langley GE. 2019. Epidemiology of invasive group B streptococcal infections among nonpregnant adults in the United States, 2008–2016. JAMA Intern Med 179:479–488. https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2018.7269.
7. Phoompoung P, Pirogard N, Leelaporn A, Angkasekwinai N. 2021. Incidence of invasive Group B *Streptococcus* (iGBS) infections and the factors associated with iGBS mortality in adults during 2013–2017: a retrospective study at Thailand's largest national tertiary referral center. Ann Med 53:715–721. https://doi.org/10.1080/07853890.2021.1930138.
8. Russell NJ, Seale AC, O'Driscoll M, O'Sullivan C, Bianchi-Jassir F, Gonzalez-Guarin J, Lawn JE, Baker CJ, Bartlett L, Cutland C, Gravett MG, Heath PT, Le Doare K, Madhi SA, Rubens CE, Schrag S, Sobanjo-ter Meulen A, Vekemans J, Saha SK, Ip M, for the GBS Maternal Colonization Investigator Group. 2017. Maternal colonization with group B *Streptococcus* and serotype distribution worldwide: systematic review and meta-analyses. Clin Infect Dis 65:S100–S111. https://doi.org/10.1093/cid/cix658.
9. Gonçalves BP, Procter SR, Paul P, Chandna J, Lewin A, Seedat F, Koukounari A, Dangor Z, Leahy S, Santhanam S, John HB, Bramugy J, Bardají A, Abubakar A, Nasambu C, Libster R, Yanotti CS, Horváth-Puhó E, Sørensen HT, van de Beek D, Bijlsma MW, Gardner WM, Kassebaum N, Trotter C, Bassat Q, Madhi SA, Lambach P, Jit M, Lawn JE, Søgaard KK, Kassel MN, van Snoek L, de Gier B, van der Ende A, Hahné SJM, Harden LM, Ghoor A, Mbatha S, Lowick S, Laughton B, Jaye T, Lala SG, Sithole P, Msayi J, Kumalo N, Msibi TN, Arumugam A, Murugesan N, Rajendraprasad N, Priya M, CHAMPS team, et al. 2022. Group B streptococcus infection during pregnancy and infancy: estimates of regional and global burden. Lancet Global Health 10:e807–e819. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(22)00093-6.
10. Boris S, Barbés C. 2000. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. Microbes Infect 2:543–546. https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00313-0.
11. Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nat Rev Microbiol 7:355–366. https://doi.org/10.1038/nrmicro2128.
12. Valenti-Weigand P, Benkel P, Rohde M, Chhatwal GS. 1996. Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. Infect Immun 64:2467–2473. https://doi.org/10.1128/iai.64.7.2467-2473.1996.
13. Cornacchione P, Scaringi L, Fettucciari K, Rosati E, Sabatini R, Orefici G, von Hunolstein C, Modesti A, Modica A, Minelli F, Marconi P. 1998. Group B streptococci persist inside macrophages. Immunology 93:86–95. https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1998.00402.x.
14. Cumley NJ, Smith LM, Anthony M, May RC. 2012. The CovS/CovR acid response regulator is required for intracellular survival of group B *Streptococcus* in macrophages. Infect Immun 80:1650–1661. https://doi.org/10.1128/IAI.05443-11.
15. Korir ML, Laut C, Rogers LM, Plemmons JA, Aronoff DM, Manning SD. 2017. Differing mechanisms of surviving phagosomal stress among group B *Streptococcus* strains of varying genotypes. Virulence 8:924–937. https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1252016.
16. Shabayek S, Spellerberg B. 2017. Acid stress response mechanisms of group B streptococci. Front Cell Infect Microbiol 7:395. https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00395.
17. Lemos JA, Tsakalidou E, Papadimitriou K. 2011. Stress responses of streptococci, p 251–303. *In* Tsakalidou E, Papadimitriou K (ed), Stress responses of lactic acid bacteria. Springer US, Boston, MA.
18. Santi I, Grifantini R, Jiang S-M, Brettoni C, Grandi G, Wessels MR, Soriani M. 2009. CsrRS regulates group B *Streptococcus* virulence gene expression in response to environmental pH: a new perspective on vaccine development. J Bacteriol 191:5387–5397. https://doi.org/10.1128/JB.00370-09.
19. Quach D, van Sorge NM, Kristian SA, Bryan JD, Shelver DW, Doran KS. 2009. The CiaR response regulator in group B *Streptococcus* promotes intracellular survival and resistance to innate immune defenses. J Bacteriol 191:2023–2032. https://doi.org/10.1128/JB.01216-08.
20. Fasnacht M, Polacek N. 2021. Oxidative stress in bacteria and the central dogma of molecular biology. Front Mol Biosci 8:671037. https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671037.
21. Imlay JA, Chin SM, Linn S. 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. Science 240:640–642. https://doi.org/10.1126/science.2834821.
22. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int Microbiol 3:3–8.
23. Poyart C, Pellegrini E, Gaillot O, Boumaila C, Baptista M, Trieu-Cuot P. 2001. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. Infect Immun 69:5098–5106. https://doi.org/10.1128/IAI.69.8.5098-5106.2001.
24. Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, Nizet V. 2004. Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. Proc Natl Acad Sci U S A 101:14491–14496. https://doi.org/10.1073/pnas.0406143101.
25. Yamamoto Y, Pargade V, Lamberet G, Gaudu P, Thomas F, Texereau J, Gruss A, Trieu-Cuot P, Poyart C. 2006. The group B *Streptococcus* NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. Mol Microbiol 62:772–785. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05406.x.
26. Lechardeur D, Fernandez A, Robert B, Gaudu P, Trieu-Cuot P, Lamberet G, Gruss A. 2010. The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase C binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae*. J Biol Chem 285:16032–16041. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.024505.
27. Ahn S-J, Qu M-D, Roberts E, Burne RA, Rice KC. 2012. Identification of the *Streptococcus mutans* LytST two-component regulon reveals its contribution to oxidative stress tolerance. BMC Microbiol 12:187. https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-187.
28. Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, Msadek T, Zouine M, Couvé E, Lalioui L, Poyart C, Trieu-Cuot P, Kunst F. 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. Mol Microbiol 45:1499–1513. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03126.x.
29. Weickert MJ, Adhya S. 1992. A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. J Biol Chem 267:15869–15874. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49615-4.
30. Deutscher J, Francke C, Postma PW. 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 70:939–1031. https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-06.
31. Moreno MS, Schneider BL, Maile RR, Weyler W, Saier MH, Jr. 2001. Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. Mol Microbiol 39:1366–1381. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02328.x.
32. Antunes A, Camiade E, Monot M, Courtois E, Barbut F, Sernova NV, Rodionov DA, Martin-Verstraete I, Dupuy B. 2012. Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*. Nucleic Acids Res 40:10701–10718. https://doi.org/10.1093/nar/gks864.
33. Willenborg J, de Greeff A, Jarek M, Valentin-Weigand P, Goethe R. 2014. The CcpA regulon of *Streptococcus suis* reveals novel insights into the regulation of the streptococcal central carbon metabolism by binding of CcpA to two distinct binding motifs. Mol Microbiol 92:61–83. https://doi.org/10.1111/mmi.12537.
34. DebRoy S, Saldaña M, Travisany D, Montano A, Galloway-Peña J, Horstmann N, Yao H, González M, Maass A, Latorre M, Shelburne SA. 2016. A multi-serotype approach clarifies the Catabolite control protein A regulon in the major human pathogen group A *Streptococcus*. Sci Rep 6:32442. https://doi.org/10.1038/srep32442.
35. Fujita Y. 2009. Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. Biosci Biotechnol Biochem 73:245–259. https://doi.org/10.1271/bbb.80479.
36. Miwa Y, Nakata A, Ogiwara A, Yamamoto M, Fujita Y. 2000. Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. Nucleic Acids Res 28:1206–1210. https://doi.org/10.1093/nar/28.5.1206.
37. Schumacher MA, Sprehe M, Bartholomae M, Hillen W, Brennan RG. 2011. Structures of carbon catabolite protein A–(HPr-Ser46-P) bound to diverse catabolite response element sites reveal the basis for high-affinity binding to degenerate DNA operators. Nucleic Acids Res 39:2931–2942. https://doi.org/10.1093/nar/gkq1177.
38. Weickert MJ, Chambliss GH. 1990. Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A 87:6238–6242. https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6238.
39. Marciniak BC, Pabijaniak M, de Jong A, Dűhring R, Seidel G, Hillen W, Kuipers OP. 2012. High- and low-affinity cre boxes for CcpA binding in *Bacillus subtilis* revealed by genome-wide analysis. BMC Genomics 13:401. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-401.
40. Shelburne SA, III, Keith D, Horstmann N, Sumby P, Davenport MT, Graviss EA, Brennan RG, Musser JM. 2008. A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A *Streptococcus*. Proc Natl Acad Sci U S A 105:1698–1703. https://doi.org/10.1073/pnas.0711767105.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

41. DebRoy S, Aliaga-Tobar V, Galvez G, Arora S, Liang X, Horstmann N, Maracaja-Coutinho V, Latorre M, Hook M, Flores AR, Shelburne SA. 2020. Genome-wide analysis of *in vivo* CcpA binding with and without its key co-factor HPr in the major human pathogen group A *Streptococcus*. Mol Microbiol 115:1207–1228. https://doi.org/10.1111/mmi.14667.
42. Zeng L, Choi SC, Danko CG, Siepel A, Stanhope MJ, Burne RA. 2013. Gene regulation by CcpA and catabolite repression explored by RNA-seq in *Streptococcus mutans*. PLoS One 8:e60465. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060465.
43. Kim H-M, Waters A, Turner ME, Rice KC, Ahn S-J. 2019. Regulation of *cid* and *lrg* expression by CcpA in *Streptococcus mutans*. Microbiology (Reading) 165:113–123. https://doi.org/10.1099/mic.0.000744.
44. Hooven TA, Catomeris AJ, Akabas LH, Randis TM, Maskell DJ, Peters SE, Ott S, Santana-Cruz I, Tallon LJ, Tettelin H, Ratner AJ. 2016. The essential genome of *Streptococcus agalactiae*. BMC Genomics 17:406. https://doi.org/10.1186/s12864-016-2741-z.
45. Fan H, Hahm J, Diggs S, Perry JJP, Blaha G. 2015. Structural and functional analysis of BipA, a regulator of virulence in enteropathogenic *Escherichia coli*. J Biol Chem 290:20856–20864. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.659136.
46. Beckering CL, Steil L, Weber MHW, Völker U, Marahiel MA. 2002. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 184:6395–6402. https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6395-6402.2002.
47. Blencke H-M, Homuth G, Ludwig H, Mäder U, Hecker M, Stülke J. 2003. Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. Metab Eng 5:133–149. https://doi.org/10.1016/s1096-7176(03)00009-0.
48. Domelier A-S, van der Mee-Marquet N, Sizaret P-Y, Héry-Arnaud G, Lartigue M-F, Mereghetti L, Quentin R. 2009. Molecular characterization and lytic activities of *Streptococcus agalactiae* bacteriophages and determination of lysogenic-strain features. J Bacteriol 191:4776–4785. https://doi.org/10.1128/JB.00426-09.
49. Rice KC, Turner ME, Carney OV, Gu T, Ahn S-J. 2017. Modification of the *Streptococcus mutans* transcriptome by LrgAB and environmental stressors. Microb Genom 3:e000104. https://doi.org/10.1099/mgen.0.000104.
50. Ahn S-J, Rice KC. 2016. Understanding the *Streptococcus mutans* Cid/Lrg System through CidB Function. Appl Environ Microbiol 82:6189–6203. https://doi.org/10.1128/AEM.01499-16.
51. Castillo Pedraza MC, Rosalen PL, de Castilho ARF, Freires IDA, de Sales Leite L, Faustoferri RC, Quivey RG, Klein MI. 2019. Inactivation of *Streptococcus mutans* genes *lytST* and *dltAD* impairs its pathogenicity *in vivo*. J Oral Microbiol 11:1607505. https://doi.org/10.1080/20002297.2019.1607505.
52. Korir ML, Flaherty RA, Rogers LM, Gaddy JA, Aronoff DM, Manning SD. 2018. Investigation of the role that NADH peroxidase plays in oxidative stress survival in Group B *Streptococcus*. Front Microbiol 9:2786. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02786.
53. Markkula A, Lindström M, Johansson P, Björkroth J, Korkeala H. 2012. Roles of four putative DEAD-box RNA helicase genes in growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e under heat, pH, osmotic, ethanol, and oxidative stress conditions. Appl Environ Microbiol 78:6875–6882. https://doi.org/10.1128/AEM.01526-12.
54. Seifart Gomes C, Izar B, Pazan F, Mohamed W, Mraheil MA, Mukherjee K, Billion A, Aharonowitz Y, Chakraborty T, Hain T. 2011. Universal stress proteins are important for oxidative and acid stress resistance and growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e *in vitro* and *in vivo*. PLoS One 6:e24965. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024965.
55. Nyström T, Neidhardt FC. 1996. Effects of overproducing the universal stress protein, UspA, in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 178:927–930. https://doi.org/10.1128/jb.178.3.927-930.1996.
56. Kvint K, Nachin L, Diez A, Nyström T. 2003. The bacterial universal stress protein: function and regulation. Curr Opin Microbiol 6:140–145. https://doi.org/10.1016/s1369-5274(03)00025-0.
57. Yang Q, Porter AJ, Zhang M, Harrington DJ, Black GW, Sutcliffe IC. 2012. The impact of pH and nutrient stress on the growth and survival of *Streptococcus agalactiae*. Antonie Van Leeuwenhoek 102:277–287. https://doi.org/10.1007/s10482-012-9736-9.
58. Valentino MD, Foulston L, Sadaka A, Kos VN, Villet RA, Santa Maria J, Lazinski DW, Camilli A, Walker S, Hooper DC, Gilmore MS. 2014. Genes contributing to *Staphylococcus aureus* fitness in abscess- and infection-related ecologies. mBio 5:e01729-14. https://doi.org/10.1128/mBio.01729-14.
59. Carvalho SM, Kloosterman TG, Kuipers OP, Neves AR. 2011. CcpA ensures optimal metabolic fitness of *Streptococcus pneumoniae*. PLoS One 6:e26707. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026707.
60. Belitsky BR, Kim H-J, Sonenshein AL. 2004. CcpA-dependent regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase gene expression. J Bacteriol 186:3392–3398. https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3392-3398.2004.
61. Dong Y, Chen Y-YM, Burne RA. 2004. Control of expression of the arginine deiminase operon of *Streptococcus gordonii* by CcpA and Flp. J Bacteriol 186:2511–2514. https://doi.org/10.1128/JB.186.8.2511-2514.2004.
62. Griswold A, Chen Y-YM, Snyder JA, Burne RA. 2004. Characterization of the arginine deiminase operon of *Streptococcus rattus* FA-1. Appl Environ Microbiol 70:1321–1327. https://doi.org/10.1128/AEM.70.3.1321-1327.2004.
63. Shivers RP, Sonenshein AL. 2005. *Bacillus subtilis ilvB* operon: an intersection of global regulons. Mol Microbiol 56:1549–1559. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04634.x.
64. Tojo S, Satomura T, Morisaki K, Deutscher J, Hirooka K, Fujita Y. 2005. Elaborate transcription regulation of the *Bacillus subtilis ilv-leu* operon involved in the biosynthesis of branched-chain amino acids through global regulators of CcpA, CodY and TnrA. Mol Microbiol 56:1560–1573. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04635.x.
65. Lorca GL, Chung YJ, Barabote RD, Weyler W, Schilling CH, Saier MH, Jr. 2005. Catabolite repression and activation in *Bacillus subtilis*: dependency on CcpA, HPr, and HprK. J Bacteriol 187:7826–7839. https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7826-7839.2005.
66. Iyer R, Baliga NS, Camilli A. 2005. Catabolite control protein A (CcpA) contributes to virulence and regulation of sugar metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. J Bacteriol 187:8340–8349. https://doi.org/10.1128/JB.187.24.8340-8349.2005.
67. Varga JJ, Therit B, Melville SB. 2008. Type IV pili and the CcpA protein are needed for maximal biofilm formation by the gram-positive anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. Infect Immun 76:4944–4951. https://doi.org/10.1128/IAI.00692-08.
68. Chiang C, Bongiorni C, Perego M. 2011. Glucose-dependent activation of *Bacillus anthracis* toxin gene expression and virulence requires the carbon catabolite protein CcpA. J Bacteriol 193:52–62. https://doi.org/10.1128/JB.01656-09.
69. Méndez MB, Goñi A, Ramirez W, Grau RR. 2012. Sugar inhibits the production of the toxins that trigger clostridial gas gangrene. Microb Pathog 52:85–91. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.10.008.
70. Zotta T, Ricciardi A, Guidone A, Sacco M, Muscariello L, Mazzeo MF, Cacace G, Parente E. 2012. Inactivation of *ccpA* and aeration affect growth, metabolite production and stress tolerance in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. Int J Food Microbiol 155:51–59. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.017.
71. Li C, Sun JW, Zhang GF, Liu LB. 2016. Effect of the absence of the CcpA gene on growth, metabolic production, and stress tolerance in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J Dairy Sci 99:104–111. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10321.
72. Whittenbury RY. 1964. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. J Gen Microbiol 35:13–26. https://doi.org/10.1099/00221287-35-1-13.
73. Koditschek LK, Umbreit WW. 1969. α-Glycerophosphate oxidase in *Streptococcus faecium* F 24. J Bacteriol 98:1063–1068. https://doi.org/10.1128/jb.98.3.1063-1068.1969.
74. Kietzman CC, Caparon MG. 2010. CcpA and LacD.1 affect temporal regulation of *Streptococcus pyogenes* virulence genes. Infect Immun 78:241–252. https://doi.org/10.1128/IAI.00746-09.
75. Wilson CB, Weaver WM. 1985. Comparative susceptibility of group B streptococci and *Staphylococcus aureus* to killing by oxygen metabolites. J Infect Dis 152:323–329. https://doi.org/10.1093/infdis/152.2.323.
76. Moulin P, Patron K, Cano C, Zorgani MA, Camiade E, Borezée-Durant E, Rosenau A, Mereghetti L, Hiron A. 2016. The Adc/Lmb system mediates zinc acquisition in *Streptococcus agalactiae* and contributes to bacterial growth and survival. J Bacteriol 198:3265–3277. https://doi.org/10.1128/JB.00614-16.
77. Sambrook J, Russell DW. 2006. Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. Cold Spring Harb Protoc 2006:4455. https://doi.org/10.1101/pdb.prot4455.
78. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJB, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

genome". Proc Natl Acad Sci U S A 102:13950–13955. https://doi.org/10.1073/pnas.0506758102.
79. Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E. 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. J Bacteriol 175:3628–3635. https://doi.org/10.1128/jb.175.11.3628-3635.1993.
80. Poyart C, Trieu-Cuot P. 1997. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Lett 156:193–198. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb12726.x.
81. Patron K, Gilot P, Rong V, Hiron A, Mereghetti L, Camiade E. 2017. Inductors and regulatory properties of the genomic island-associated *fru2* metabolic operon of *Streptococcus agalactiae*. Mol Microbiol 103:678–697. https://doi.org/10.1111/mmi.13581.
82. Miller JH. 1972. Assay of β-galactosidase, p 352–355. *In* Miller JH (ed), Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, NY.
83. 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. Mol Microbiol 54:1250–1268. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04365.x.
84. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3: new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Res 40:e115. https://doi.org/10.1093/nar/gks596.
85. Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nat Protoc 3:1101–1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73.
86. Rosinski-Chupin I, Sauvage E, Sismeiro O, Villain A, Da Cunha V, Caliot M-E, Dillies M-A, Trieu-Cuot P, Bouloc P, Lartigue M-F, Glaser P. 2015. Single nucleotide resolution RNA-seq uncovers new regulatory mechanisms in the opportunistic pathogen *Streptococcus agalactiae*. BMC Genomics 16:419. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1583-4.
87. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol 10:R25. https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25.
88. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616.
89. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. J R Stat Soc Series B Stat Methodol 57:289–300. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
90. Vallenet D, Calteau A, Dubois M, Amours P, Bazin A, Beuvin M, Burlot L, Bussell X, Fouteau S, Gautreau G, Lajus A, Langlois J, Planel R, Roche D, Rollin J, Rouy Z, Sabatet V, Médigue C. 2020. MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. Nucleic Acids Res 48:D579–D589. https://doi.org/10.1093/nar/gkz926.
91. Mistry J, Chuguransky S, Williams L, Qureshi M, Salazar GA, Sonnhammer ELL, Tosatto SCE, Paladin L, Raj S, Richardson LJ, Finn RD, Bateman A. 2021. Pfam: the protein families database in 2021. Nucleic Acids Res 49:D412–D419. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa913.
92. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M. 2022. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. Protein Sci 31:47–53. https://doi.org/10.1002/pro.4172.
93. Moulin P, Rong V, Ribeiro E Silva A, Pederick VG, Camiade E, Mereghetti L, McDevitt CA, Hiron A. 2019. Defining the role of the *Streptococcus agalactiae* Sht-Family Proteins in zinc acquisition and complement evasion. J Bacteriol 201:e00757-18. https://doi.org/10.1128/JB.00757-18.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 14 November 2022 by 193.52.208.9.

SUPPLEMENTAL DATA

MATERIALS AND METHODS

RT-qPCR according the sugar contents in the medium

To measure transcripts expression of *ccpA* (*SAK_0833*), *rbsR* (*SAK_0171*), *ptsG* (*SAK_1920*) and *pyk* (*SAK_1037)* genes according to the different sugar contents in the medium, A909WT strain was subcultured ($ODA_{bs=600nm}$ = 0.001) in TH or in CDM supplemented with different sugars (0.25% glucose, 1% glucose, 2% glucose, 1% fructose, 1% saccharose, 1% ribose, 1% galactose or four sugars together: 0.5% ribose + 0.5% arabinose + 0.5% fructose + 0.5% saccharose (4SS)) until mid-exponential phase. Then total RNA was extracted as explained in the "Materials and Methods" section and RT-qPCR were performed with the primers listed in the Table S2. The amount of transcripts of three independent biological replicates with two technical replicates of each gene was normalized against transcript levels of the *recA* housekeeping gene.

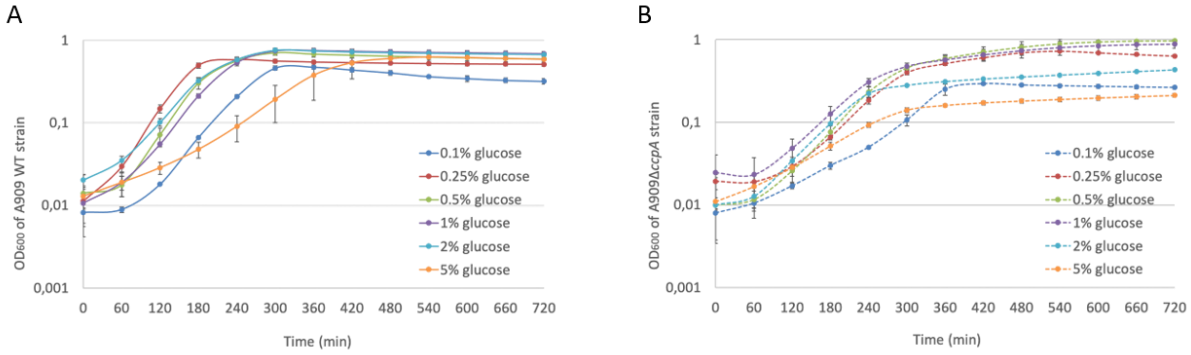


Figure S1. **Growth curves of *S. agalactiae* with increased glucose concentrations**. (A) Growth of A909WT and (B) A909Δ*ccpA* strains in CDM medium supplemented with 0.1, 0.25%, 0.5%, 1%, 2% or 5% glucose in 96-well microplates. The curves are means ± SD over at least two independent biological replicates with three technical replicates for each.

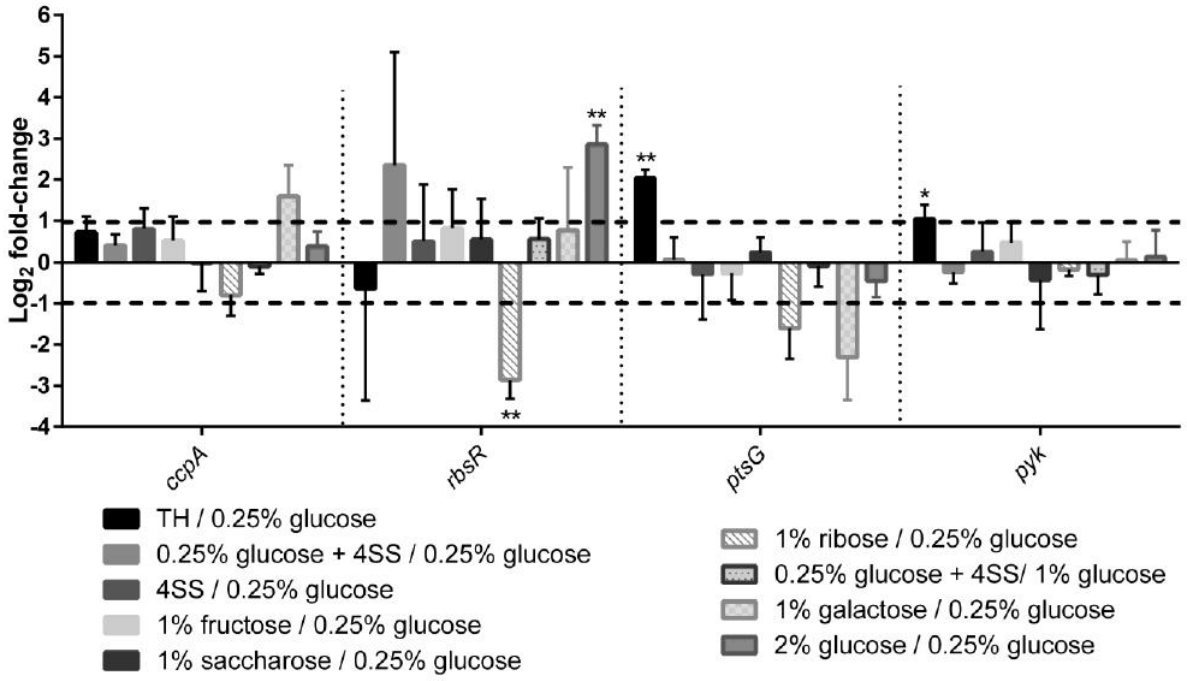


Figure S2. **Gene expression according to the different sugar contents in the medium.** The transcript levels of *ccpA* (*SAK_0833*), *rbsR* (*SAK_0171*), *ptsG* (*SAK_1920*), *pyk* (*SAK_1037)* genes of the A909WT strain were detected by RT-qPCR after growth in media with different sugar contents in order to highlight the "glucose effect". The strain was grown in TH medium or in CDM supplemented with different sugars (0.25% glucose, 1% glucose, 2% glucose, 1% fructose, 1% saccharose, 1% ribose, 1% galactose or four sugars together: 0.5% ribose + 0.5% arabinose + 0.5% fructose + 0.5% saccharose (4SS)). The amount of transcripts of each gene was normalized against transcript levels of the *recA* housekeeping gene. Gene expression is presented as the Log_2 fold-change in gene expression between two different conditions. The data are means ± SD of three independent biological replicates with two technical replicates for each. The dotted lines represent a Log_2 fold-change of -1 and 1. The asterisks indicate *P* values obtained using one-sample *t*-test. **, P*<0.05 and ***, P*<0.01.

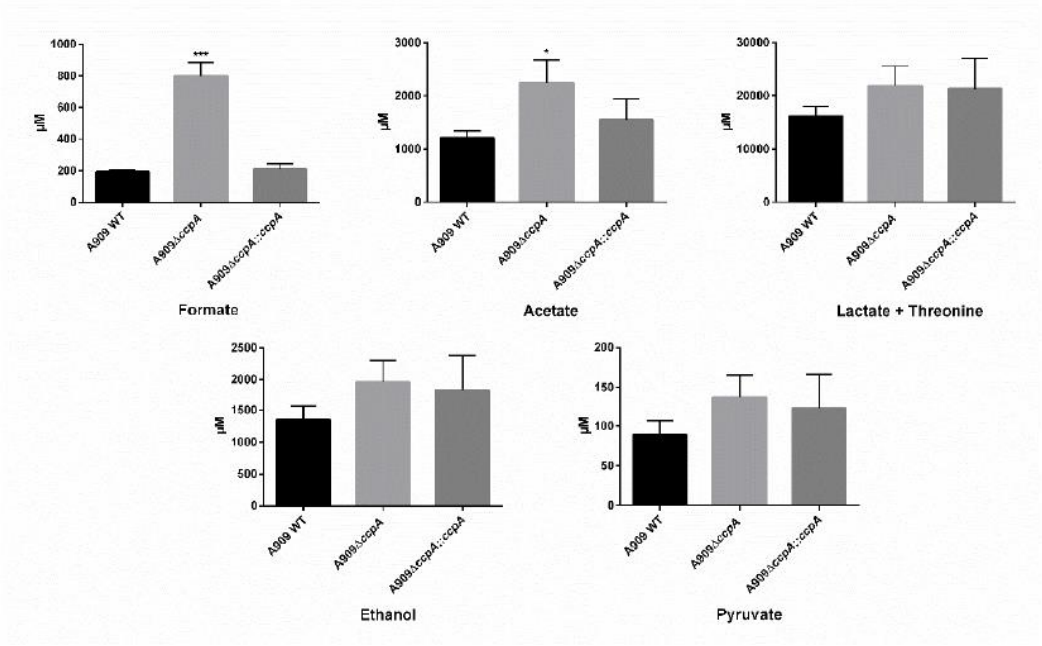


Figure S3. **Fermentation end products of the strains A909WT, A909Δ*ccpA* and A909Δ*ccpA*::*ccpA* in CDM with glucose.** NMR spectroscopy analysis of the metabolic end products from strains A909WT, A909Δ*ccpA* and A909Δ*ccpA*::*ccpA* after 24 h of growth in CDM supplemented with 0.25% glucose was performed. The data are means + SD over three independent biological experiments performed with three technical replicates for each. The asterisks indicate *P* values obtained using ANOVA and then unpaired *t*-test to compare the value of strains A909Δ*ccpA* and A909Δ*ccpA*::*ccpA* to the strain A909WT. **, P*<0.05 and ****, P*<0.001.

A



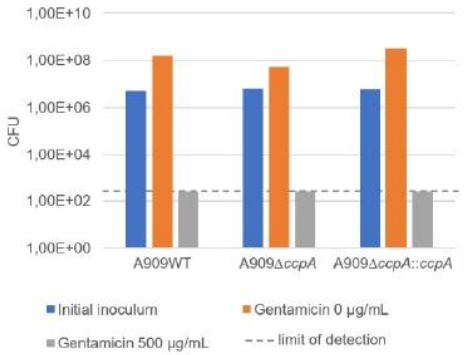
(*): identity, (:): strongly similar, (.): weakly similar

B

	Lmo1580	Lmo0515	Lmo2673	SAK_1689	SAK_1741
Lmo1580		**45%** 69%	**45%** 68%	**52%** 70%	**49%** 68%
Lmo0515	**45%** 69%		**42%** 59%	**44%** 63%	**40%** 61%
Lmo2673	**45%** 68%	**42%** 59%		**37%** 57%	**30%** 51%
SAK_1689	**52%** 70%	**44%** 63%	**37%** 57%		**67%** 81%
SAK_1741	**49%** 68%	**40%** 61%	**30%** 51%	**67%** 81%	

Figure S4. **Comparaison of the proteins Lmo1580, Lmo0515, Lmo2673 of *Listeria mocytogenes* EGD-e and SAK_1689 and SAK_1741 of *S. agalactiae* A909.** (A) Protein alignment of SAK_1689, SAK_1741 and Lmo1580 was performed with Clustal Omega websoftware (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) (B) Determination of percent identity (in bold) and similarity of Lmo1580, Lmo0515, Lmo2673, SAK_1689 and SAK_1741 proteins. Percentage of identity and similarity were performed with BLASTP® websoftware (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins).

A



B

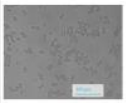
	T0 plate		T24 plate	
	Before infection	After infection and Gentamicin (500 µg/mL) during 2h	Before infection	Gentamicin (500 µg/mL) during 2h and gentamicin (50 µg/mL) during 24h
RAW 264.7 Pictures (InCellis instrument)				
Confluency (%)	33	60	33	91
Cell count (n/well)	$3.6x10^5$	$6.5x10^5$	$3.6x10^5$	$9.9x10^5$

Figure S5. **Experimental controls for bacterial survival in macrophages.** (A) counts of *S. agalactiae* tested strains (CFU) after 1h of growth in RAW medium + 2h in absence (orange) or in presence (grey) of gentamicin 500µg/mL in 96-well plate without macrophage, with a limit of detection at 260 CFU. (B) Analysis of macrophages RAW 264.7 at key times of survival experiments (before infection, after antibiotic treatment and after 24h of infection) by controlling their morphology (Pictures with InCellis Instrument), confluency and concentration (cells/well).

Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study		
***E. coli* strains**		
XL1-blue	*endA1 gyrA96* (Nal^R) *thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 hsdR17*($r^-_k m^+_k$) *F'* [::Tn10 (Tet^R) *proAB*$^+$ $lacI^q$ ZΔM15]	Stratagene
BL21 codon + (DE3)-RIL	F- *dcm ompT hsdS* (r_B- m_B-) *gal* [*malB*$^+$]$_{K-12}$(λ^S)	Stratagene
***S. agalactiae* strains**		
A909	Isolated from a septic human neonate in 1934	(1)
A909Δ*ccpA*	Isogenic *ccpA* (*SAK_0833*) deletion mutant of A909	This study
A909Δ*ccpA::ccpA*	*ccpA* (*SAK_0833*) *in situ* chromosomal complementation of A909Δ*ccpA*	This study
A909Δ*SAK_1689*	Isogenic *SAK_1689* deletion mutant of A909	This study
A909*SAK_1689*::*SAK_1689*	*SAK_1689 in situ* chromosomal complementation of A909Δ*SAK_1689*	This study
A909-SAK_1741^{Y5STOP}	Isogenic substitution mutant of A909 coding a STOP codon at position 5 of *SAK_1741* in place of a tyrosine	This study
A909-SAK_1741^{Y5STOP}::*SAK_1741*	*SAK_1741 in situ* chromosomal complementation of A909-SAK_1741^{Y5STOP}	This study
A909Δ*SAK_1689*-SAK_1741^{Y5STOP}	Isogenic double *SAK_1689* deletion and *SAK_1741* substitution mutant of A909	This study
A909Δ*ccpA*-Δ*SAK_1689*	Isogenic double *ccpA* deletion and *SAK_1689* deletion mutant of A909	This study
Plasmids		
pET28a	Vector for expression of His-Tagged proteins, Kan^R	EMD Biosciences
pET28a:: *ccpA*	pET28a containing the *ccpA* gene of *S. agalactiae* A909 in the BamHI/EcoRI restriction sites	(2)

pG+host1^{ts}	Replication-thermosensitive shuttle plasmid, Ery^{R}	(3)
pTCV-*lacZ*	Promoter probe plasmid carrying a *lacZ* gene devoided of a promoter and carrying the *ermB* gene (Ery^{R})	(4)
pTCV-P$_{SAK_0348}$*::lacZ*	pTCV-*lacZ* containing the promoting region of *S. agalactiae* A909 *SAK_0348* gene in the EcoRI/BamHI restriction sites upstream of the *lacZ* gene	This study
pTCV-P$_{cshA}$*::lacZ*	pTCV-*lacZ* containing the promoting region of *S. agalactiae* A909 *cshA* (*SAK_0902)* gene in the EcoRI/BamHI restriction sites upstream of the *lacZ* gene	This study
pTCV-P$_{SAK_1689}$*::lacZ*	pTCV-*lacZ* containing the promoting region of *S. agalactiae* A909 *SAK_1689* gene in the EcoRI/BamHI restriction sites site upstream of the *lacZ* gene	This study

Table S2. Primers used in this study			
Name	**Sequence[a]**	**Location[b]**	**Gene**
Primers used for deletion and for complementation (*)			
65F (*)	GAACAGGAATTCCAGCAAATTCTCCAGCGACT	nt -657	*ccpA (SAK_0833)*
66R	CATACTCTAACACTACGTATCATCTGTATTCATATTG	nt -4	*ccpA (SAK_0833)*
67F	AATACAGATGATACGTAGTGTTAGAGTATGTTATTTG	nt +1003	*ccpA (SAK_0833)*
68R (*)	TTCATCGGATCCCAAATCATCGTCTGCCCAACC	nt +1680	*ccpA (SAK_0833)*
602F (*)	TGAAGGATCCCCTTTCGAATCAGAGTAACC	nt -484	*SAK_1689*
601R	TTTACATTGTTTGTGACATAAGCCTGTCC	nt -10	*SAK_1689*
600F	TATGTCACAAACAATGTAAATTTAAATACGCTC	nt +445	*SAK_1689*
599R (*)	ATGAGAATTCGGAAGCTGGTTTCAGGTCA	nt +920	*SAK_1689*
593F (*)	GATCCGAATTCCCTATGCTTCCGTGTTAGGT	nt -534	*SAK_1741*
616R	GAATACGTTATTATTTTTGTGTCATAGCTTAATTC	nt +25	*SAK_1741*
617F	GAATTAAGCTATGACACAAAAATAATAACGTATTC	nt -10	*SAK_1741*
618R (*)	TAGTGGATCCGGTTTTCTTACTATCACGAACG	nt +447	*SAK_1741*
Primers used for verification of the mutants by sequencing			
1F	GCCAGTCAAAACCATAGTGTCG	nt -791	*ccpA (SAK_0833)*
4R	CAATGTCATTGTACATGAGATAATC	nt +1749	*ccpA (SAK_0833)*
565F	CCAGCAAGGCTAACACAAG	nt -682	*SAK_1689*
566R	GATGATGGTATCTCTAAGGC	nt +1077	*SAK_1689*
597F	AATTGCGATTGTAGTGTTGGG	nt -699	*SAK_1741*
598R	ACCAGCTTGAACAAGTTTACC	nt +1170	*SAK_1741*
Primers used for transcriptional fusion and for electrophoretic mobility shift assays			
585F	CTATGGAATTCGAGATTTTTGATGCTGAGACC	nt -87	*SAK_0348*
586R	CTTGGATCCCTACATACCAGCAAAAGAAGCTCC	nt +40	*SAK_0348*
591F	TTGCGGAATTCCTATGAACCCTCCTTCTTTAT	nt -225	*cshA (SAK_0902)*
592R	TCTGGATCCTTACAAATGTTTCTCTTTTCTAAAAG	nt -20	*cshA (SAK_0902)*
583F	CCTAGAATTCCTTTTACTGCGGTTTATCAAGC	nt -216	*SAK_1689*

584R	CATAGGATCCTTACATAAGCCTGTCCTCCTCTAA	nt -18	*SAK_1689*
324F	GGTTTTTCTCCTTTGATC	nt -181	*rbsR (SAK_0171)*
323R	AAAAACTCCTTTCTTTTATTGT	nt -22	*rbsR (SAK_0171)*
448F	GAGGGTGACTGATCTACTCA	nt -231	*SAK_0257*
449R	CCCCAATTGCCTCTAACAAG	nt +30	*SAK_0257*
482F	GCTGCTGTTGTTGCTGTTAAA	nt -192	*SAK_0473*
483R	CGACTTCCCGCATCTATTA	nt +98	*SAK_0473*
436F	ATTACTGGACGGGTAGAGTT	nt -257	*typA (SAK_0575)*
437R	TCAACGTGGGCAATGATCG	nt +35	*typA (SAK_0575)*
490F	AGGGACTCATTTTAGACTTATC	nt +476	*SAK_1068*
491R	AAGTCATTTCTGCCGAACTAG	nt +704	*SAK_1068*
Primers used for RT-qPCR			
200F	GCGGACTATGCGGTTAAGGT	nt +376	*adhP (SAK _0087)*
201R	ACCACCTGCACCATACACTG	nt +500	*adhP (SAK _0087)*
93F	GACCACCATCCAGACATTGA	nt +676	*rbsR (SAK _0171)*
94R	TTCGCTTCCCTCGATTAAGA	nt +747	*rbsR (SAK _0171)*
19F	TATTGAAAAAGACATTCATAAAAATCCA	nt +660	*rpoB (SAK _0223)*
20R	CAAAGAAACGTGCAACTAAAAGACTAC	nt +770	*rpoB (SAK _0223)*
147F	CAAGTGACGATGAGGTTTATGTG	nt +1016	*glpK (SAK _0345)*
148R	CCCACGAGTTAATCCAAATACTG	nt + 1094	*glpK (SAK _0345)*
208F	GCCCCAACAACTCCTCTTGA	nt +262	*SAK _0674*
209R	ATGTTTCTGAGCTGCTTGGC	nt +347	*SAK _0674*
21F	GCTCACATCAGAACTTTACTTTTAACTC	nt + 1519	*gyrB (SAK _0708)*
22R	TTTAATCTCACTTCCTACTTTGACACC	nt +1615	*gyrB (SAK _0708)*
194F	GTGCCAAGTTACTCACCGGA	nt +289	*ldhA (SAK _0821)*
195R	TCCTCGAATTGGCAAGGTCC	nt +401	*ldhA (SAK _0821)*
9F	AGCGGCAGGTTTGTTAAATG	nt +424	*ccpA* (*SAK_0833)*
10R	ATTGGCGAGTCATTGCTTGT	nt +820	*ccpA* (*SAK_0833)*
113F	CGGTTAAAGATTCATCGCAAG	nt +656	*ptsK (SAK _0862)*

114R	GCCATTCCCGAGTCTATCAA	nt +722	*ptsK (SAK _0862)*
81F	CAGTTCTTGAGGGTATGAATGGTAA	nt +962	*ptsI (SAK _0946)*
82R	TCTCTTTTGGAAGATCAAAGTAAGG	nt +1034	*ptsI (SAK _0946)*
202F	TTGGTCAGGTATCGCTGCAG	nt +534	*pfkA (SAK _1036)*
203R	GCTATCGTCTCCTGCTGCTT	nt +704	*pfkA (SAK _1036)*
196F	ATTCCGTCCAGATGCAGACA	nt +1254	*pyk (SAK _1037)*
197R	TGCTACACGTTCTGCAACCT	nt +1379	*pyk (SAK _1037)*
206F	TCGTGTAGGCCTCTTCCGTA	nt +765	*budB (SAK _1279)*
207R	ATCAGTTCTCGCTCGGGTTG	nt +938	*budB (SAK _1279)*
224F	AAATACGATGTGGCAGCAGAGA	nt +556	*covR (SAK _1639)*
225R	CCATTCCGCGAACAGTTTGAAT	nt +646	*covR (SAK _1639)*
567F	TCTTAATACCTTTGAACGTTTCCTTATCG	nt +348	*SAK_1689*
568R	TTACATTGTTTTATTAGGGTCACGTACAAT	nt +424	*SAK_1689*
212F	ACCTGATCCAGCTGTTCACG	nt +387	*pflB (SAK _1735)*
213R	GTAACAGTGTGTGCATGGCG	nt +481	*pflB (SAK _1735)*
569F	ATTACTGAAATCGGAAATCCTAAGACTCTT	nt +259	*SAK_1741*
570R	GAATGACGTAAAATGTATTCTGAAGTTGAG	nt +377	*SAK_1741*
222F	AAGGCCCTAAATTGATGGCTCA	nt +782	*ahpF (SAK _1854)*
223R	CCAGGAACGTTGATATTTCGCC	nt +953	*ahpF (SAK _1854)*
91F	TAGCAGCAGCCCAAGTTACA	nt +1697	*ptsG (SAK _1920)*
92R	CAGTTGGTTCCACAGCAAAA	nt +1824	*ptsG (SAK _1920)*
319F	ATTCAGGCGCAGTTGATTTAGTT	nt +323	*recA (SAK _2032)*
320R	TCAATCTCAGCACGAGGAACA	nt +369	*recA (SAK _2032)*

a. Tails containing a restriction site are underlined

b. Nucleotide (nt) position with respect to the first coding nucleotide of the gene of interest

Table S3. Genes regulated by CcpA in mid-exponential phase in a chemically defined medium supplemented with 0.25 % glucose

Gene number	**Gene name**	**Putative function of encoded protein**	**Log2 Fold Change (Δ*ccpA*/WT)**	***P*-value**	**Position of the *cre* site from START codon**	***cre* sequence** *: Virtual Footprint only **: RegPrecise only
Cell enveloppe						
SAK_0252	-	peptide/opine/nickel uptake ABC transporter substrate-binding protein	1,68	6,25E-04		
SAK_0253	-	peptide/opine/nickel uptake ABC transporter permease	2,51	8,04E-05		
SAK_0254	-	peptide/opine/nickel uptake ABC transporter permease	2,55	1,80E-05		
SAK_0255	-	peptide/opine/nickel uptake ABC transporter ATP-binding protein	2,05	2,69E-04	Pos=+62	TTGAAATGGTTTTAAA**
SAK_0256	-	peptide/opine/nickel uptake ABC transporter ATP-binding protein	2,07	2,93E-05		
SAK_0299	-	major facilitator family transporter	-1,87	5,72E-04	Pos=+203	AAGAAAAATTTTACTA*
SAK_0362	-	polar amino acid ABC transporter amino acid-binding protein	-1,41	3,03E-02		
SAK_0685	*adcA*	zinc ABC transporter, zinc-binding protein AdcA	-1,72	2,65E-03	Pos=-95	ATGCAAGCGTTTTTAT*
SAK_0698	-	ABC transporter, permease protein	-2,81	4,62E-02	Pos=+127	TATAAAGCCTTTTCTA*
SAK_0771	-	cell wall surface anchor family protein, truncation	3,84	1,54E-05		
SAK_0781	-	pseudo-sortase	1,39	2,27E-02		
SAK_0787	-	ABC transporter, ATP-binding protein	4,08	2,13E-16	Pos=-115	AAGAAAACGTTTGCAT
SAK_0788	-	hypothetical protein	4,49	4,52E-16	Pos=-230	AAGAAAGAGTTTTCAT*

SAK_0789	-	hypothetical protein	4,10	1,07E-12		
SAK_0840	-	peptidase propeptide/YPEB domain-containing protein	-1,46	6,76E-03		
SAK_0890	-	penicillin-binding protein 2b	-1,15	3,40E-02		
SAK_0900	-	amino acid ABC transporter, permease protein, putative	1,93	5,72E-03		
SAK_0901	-	ABC transporter, substrate-binding protein	1,94	3,37E-03		
SAK_0958	-	hypothetical protein	2,97	2,88E-02		
SAK_1027	-	cation transporter HAD ATPase	2,07	2,81E-04	Pos=-16	TCTAAAACGTTTTCAT*
SAK_1125	-	Type VII secretion accessory protein	-2,33	2,20E-02	Pos=-341	TACAAAACGTTTAGAA*
SAK_1128	-	Type VII effector, ESAT6 like protein	1,31	3,64E-02		
SAK_1394	-	RND family efflux transporter MFP subunit	-1,90	3,49E-04	Pos=-229	ATGAAAAATTTTTCTA*
					Pos=-116	TAGAAAGAACTTACAA*
SAK_1504	-	amidase family protein	1,36	1,27E-02	Pos=-20	ATGTAAACGTATACTT*
SAK_1517	-	ABC transporter, ATP binding protein	-1,23	2,26E-02	Pos=-15	TATAAAAGGTTTACTT*
SAK_1626	-	amidase	-2,63	7,47E-03		
SAK_1897	-	streptococcal histidine triad family protein	-4,36	3,37E-02		
Cell division						
SAK_0013	*tilS*	tRNA(Ile)-lysidine synthetase	-1,49	2,89E-02		
SAK_0408	*yfiA*	ribosomal subunit interface protein	3,46	1,70E-07	Pos=-36	TAGAAAGCGTTAACAA
					Pos=-60	ATGAAAGCGGTTATAA**
SAK_0575	*typA*	GTP-binding protein TypA	-1,68	3,89E-04	Pos=-96	ATGAAAACATTTACAC
SAK_0576	-	hypothetical protein	-1,49	9,81E-03		

SAK_1290	-	tRNA (adenine(22)-N(1))-methyltransferase	-2,01	4,14E-03	Pos=+29	ATCAAAACGATTACAA*
SAK_1589	-	DNA replication intiation control protein YabA	-1,41	1,30E-02		
SAK_1707	*efp*	elongation factor P	-1,27	3,51E-02		
SAK_1773	-	DNA polymerase III subunit epsilon	-3,77	1,17E-03		
Amino acids metabolism						
SAK_0088	*thrC*	threonine synthase	2,83	1,82E-08		
SAK_0176	*argG*	argininosuccinate synthase	2,92	9,19E-03		
SAK_0768	*aphA*	acid phosphatase/phosphotransferase	2,66	2,70E-06	Pos=-80	ATGATATCGCTTTCAT
SAK_1132	*carB*	carbamoyl phosphate synthase large subunit	-4,03	2,32E-03		
SAK_1133	*carA*	carbamoyl phosphate synthase small subunit	-5,31	3,08E-05		
SAK_1134	*pyrB*	aspartate carbamoyltransferase catalytic subunit	-5,12	9,00E-04		
SAK_1135	*pyrC*	dihydroorotase	-2,09	1,49E-02		
SAK_1136	*pyrE*	orotate phosphoribosyltransferase	-3,82	7,26E-04		
SAK_1137	*pyrF*	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	-4,51	4,30E-04		
SAK_1211	-	aldehyde dehydrogenase family protein	4,63	2,30E-08	Pos=-53	TTGTAATCGATTTCAT
SAK_1431	*pflA*	pyruvate formate-lyase-activating enzyme	1,79	7,40E-03	Pos=-25	ATAAAAACGGTTACAA
					Pos=-47	ATGAAAATGATATAAT**
SAK_1502	*pepS*	aminopeptidase PepS	1,83	2,96E-03		
SAK_1685	-	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	2,05	1,08E-03		
SAK_1691	-	asparaginase family protein	1,59	1,82E-02		
SAK_2060	-	peptidase propeptide/YPEB domain-containing protein	-2,03	4,60E-02		

SAK_2064	*arcC*	carbamate kinase	2,81	1,82E-03		
SAK_2065	*argF*	ornithine carbamoyltransferase	2,66	1,26E-03	Pos=-36	TAGATAGCGCTTTCAA*
SAK_2121	*arcA*	arginine deiminase	3,67	8,14E-03	Pos=-177	TAGAAATCGCTTTCAT
					Pos=-324	TACAAATCGCTTTCTA*
SAK_2122	-	acetyltransferase	4,68	9,58E-06		
SAK_2123	*argF*	ornithine carbamoyltransferase	6,83	7,56E-12		
SAK_2124	-	arginine/ornithine antiporter	5,53	4,06E-08		
SAK_2125	*arcC*	carbamate kinase	6,04	3,65E-07		
Carbon and energy metabolism						
SAK_0086	-	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	3,76	5,18E-03	Pos=-146	ATTAAAGCGCTTTCAA
SAK_0087	-	alcohol dehydrogenase	7,61	9,55E-27	Pos=-49	ATGTAAACGATTACAA
SAK_0166	*rbsB*	ribose ABC transporter, ribose-binding protein	3,89	1,97E-07		
SAK_0167	*rbsC*	ribose ABC transporter, permease protein	3,49	5,45E-06		
SAK_0168	*rbsA*	ribose ABC transporter, ATP-binding protein	3,06	8,71E-05		
SAK_0169	*rbsD*	D-ribose pyranase	3,63	2,40E-02		
SAK_0170	*rbsK*	ribokinase	4,79	5,71E-10		
SAK_0171	*rbsR*	ribose operon repressor	6,05	2,48E-12	Pos=-60	TAGTAAGCGATTACAA
SAK_0234	*ackA*	acetate kinase	2,21	1,05E-04	Pos=-468	ATTACATCGCTTTCTT**
SAK_0257	-	PTS system, trehalose-specific IIBCA component	6,64	4,44E-22	Pos=-93	ATGTAATCGTTTACAA
SAK_0258	-	alpha amylase family protein	4,82	4,22E-14		
SAK_0261	*ulaA*	ascorbate-specific PTS system enzyme IIC	2,03	5,58E-03		

SAK_0263	-	transketolase, C-terminal subunit, putative	1,25	2,68E-02		
SAK_0345	*glpK*	glycerol kinase	4,04	1,58E-14	Pos=-31	AAGAAAACGCTTACTT
SAK_0346	*glpO*	glycerol-3-phosphate oxidase	4,94	4,32E-16		
SAK_0347	*glpF*	glycerol uptake facilitator protein	5,53	8,93E-15		
SAK_0350	*tkt*	transketolase	1,37	3,35E-02		
SAK_0433	-	PTS system mannose/fructose/sorbose family IIDsubunit	2,62	7,26E-04		
SAK_0434	-	PTS system lactose/cellobiose family IIC subunit	2,66	1,47E-03		
SAK_0435	-	PTS system mannose/fructose/sorbose family IIA subunit	1,96	1,64E-03	Pos=-130	CTGAAAACGTTTTAAA
					Pos=-248	TAGAAATCGTTTTTTA*
SAK_0661	-	Cof-like hydrolase (sugar phosphatase)	-1,55	1,57E-02		
SAK_0666	*fbp*	fructose-1,6-bisphosphatase	1,43	1,88E-02	Pos=-62	TAGAATGCGCTTTCAT
SAK_0674	-	acetoin reductase	3,77	4,37E-09	Pos=-131	TTGACACCGTTTTCAT
SAK_0826	*eda*	2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase	1,82	2,99E-02	Pos=-29	AAGATAACGGTTACAT
SAK_0827	*uxaC*	glucuronate isomerase	2,37	3,90E-05		
SAK_0828	*uxuA*	mannonate dehydratase	3,19	2,92E-08		
SAK_0829	-	D-mannonate oxidoreductase	2,90	3,57E-08		
SAK_0831	-	glycosy hydrolase family protein	1,49	2,29E-03		
SAK_0862	*hprK*	HPr kinase/phosphorylase	1,79	1,97E-04	Pos=-68	TACTAAACACTTTCAT*
SAK_0915	*bglF*	PTS system, beta-glucoside-specific IIABC component	2,10	1,70E-04		
SAK_0919	-	GntP family permease	1,49	3,90E-02		
SAK_0975	*pulA*	pullulanase, type I	1,60	2,84E-02		
SAK_0976	*glgB*	glycogen branching enzyme	4,03	6,36E-10		

SAK_0977	*glgC*	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	4,25	5,91E-09		
SAK_0978	*glgD*	glucose-1-phosphate adenylyltransferase, GlgD subunit	4,78	2,09E-10		
SAK_0979	*glgA*	glycogen synthase	4,70	2,36E-11		
SAK_1001	-	acetoin dehydrogenase, TPP-dependent, E1 component, alpha subunit, putative	1,59	1,58E-02	Pos=-81	AAGAAAGCGGTTCAAA
					Pos=-295	ATGAAAACAATATCAA*
SAK_1002	-	acetoin dehydrogenase, TPP-dependent, E1 component, beta subunit, putative	1,63	7,66E-03		
SAK_1003	-	branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	1,34	2,11E-02		
SAK_1004	-	acetoin dehydrogenase, TPP-dependent, E3 component, dihydrolipoamide dehydrogenase, putative	1,48	2,98E-02		
SAK_1036	*pfkA*	6-phosphofructokinase	-2,23	7,07E-05		
SAK_1037	*pyk*	pyruvate kinase	-2,36	1,54E-05		
SAK_1155	-	phosphoglucomutase/phosphomannomutase family protein	2,11	5,11E-04	Pos=-35	ATGAAAGCGTTTATAA
SAK_1177	*pta*	phosphotransacetylase	1,54	5,80E-03	Pos=-39	TTGACAGCGTTATCAT*
SAK_1377	-	PTS system, fructose-specific IIABC component	1,87	5,58E-03		
SAK_1457	-	glycosyl transferase, group 2 family protein	-1,23	2,71E-02		
SAK_1475	-	carbohydrate ABC transporter periplasmic-binding protein	1,86	2,89E-02	Pos=-58	TTGCAAACGGTTGCAT
SAK_1476	-	cyclodextrin ABC transporter, permease protein	2,96	1,84E-05		
SAK_1477	-	cyclodextrin ABC transporter, permease protein	3,36	1,02E-06		
SAK_1651	-	alcohol dehydrogenase, zinc-containing	7,53	2,07E-22	Pos=-66	TTGTAACCGCTTTCTT
SAK_1682	*ppdK*	pyruvate phosphate dikinase	1,44	1,26E-02		
SAK_1683	*ppsR*	bifunctional ADP-dependent kinase-Pi-dependent pyrophosphorylase / positive regulator of gluconeogenesis	-1,55	2,67E-02		
SAK_1693	-	aldo/keto reductase family oxidoreductase	1,67	3,05E-03	Pos=-82	TAGTAAGCCTTTTCAT

SAK_1702	-	PTS system, sucrose-specific IIABC component	3,12	3,58E-07	Pos=-37	AATGAAACGCTTTCAA
					Pos=-146	TAGTAAACGTTTTCTC
SAK_1735	*pflB*	formate acetyltransferase 1	3,58	9,19E-06	Pos=-60	AAGTAAACGTTTTCGC
SAK_1756	*tkt*	transketolase	2,07	1,32E-03		
SAK_1757	-	putative translaldolase	1,91	1,51E-02		
SAK_1759	-	PTS system, fructose-specific, IIC component	1,63	2,27E-02		
SAK_1823	-	carbohydrate kinase	5,60	1,34E-08		
SAK_1824	-	hypothetical protein	5,67	8,79E-23		
SAK_1825	-	PTS system, IIC component, putative	6,29	1,28E-21	Pos=-20	ATGTAAGCGCTTAATA*
SAK_1893	-	PTS system, IIC component, putative	3,03	2,11E-08		
SAK_1894	-	PTS system, IIB component, putative	2,86	4,17E-03		
SAK_1895	-	PTS system, IIA component, putative	2,85	5,69E-03	Pos=-20	ATGTAACCGCTTAACT*
SAK_1908	-	PTS system mannose/fructose/sorbose family IIDsubunit	5,43	5,33E-17		
SAK_1909	-	PTS system mannose/fructose/sorbose family IIC subunit	5,27	1,12E-10		
SAK_1910	-	PTS system mannose/fructose/sorbose family IIB subunit	4,69	2,48E-12	Pos=-85	TTGTAACCGTTATCAA*
SAK_1911	-	PTS system mannose/fructose/sorbose family IIA subunit	2,91	5,07E-04	Pos=-108	TTTAAACCGCTTTCAT
					Pos=-65	TAGTAAAGGTTATCTT*
SAK_1919	-	Maltose 6'-phosphate phosphatase	4,31	4,09E-19		
SAK_1920	*ptsG*	PTS system, glucose-specific IIABC component, putative	4,36	1,66E-10	Pos=-92	AAGTAAGGGTTTACAA
SAK_2018	-	Cof-like hydrolase family protein	1,96	9,62E-06	Pos=-20	AAGTAAGCGCGTACAA*

Fatty acids, cofactors and lipids metabolism						
SAK_0419	*acpP*	acyl carrier protein	-1,51	3,64E-02	Pos=-140	AACAAACCGTTCTCAT*
SAK_0863	*lgt*	prolipoprotein diacylglyceryl transferase	2,14	2,74E-05		
SAK_0864	-	General stress protein	1,28	2,13E-02		
SAK_0877	-	HAD-superfamily hydrolase, subfamily IA, variant 1 family protein	-1,35	2,45E-02		
SAK_1166	-	ApbE family protein	2,03	4,66E-02	Pos=-36	TAGAAAACGGTATCAT
SAK_1167	-	NADPH-dependent FMN reductase domain-containing protein	2,47	1,44E-03		
SAK_1168	-	NADPH-dependent FMN reductase domain-containing protein	3,71	4,81E-08		
SAK_1169	-	formate/nitrite transporter family protein	1,81	2,68E-03	Pos=+42	TATAAAGCGCTTCCTT*
SAK_1435	-	PAP2 family protein	1,53	4,52E-02	Pos=+17	TAGTAAACTTATTCAA*
SAK_1436	*ribU*	Riboflavin transporter RibU	1,64	3,64E-02	Pos=-390	TTGAAAAAGTTTATAA*
SAK_1736	-	FMN-binding protein	3,69	3,88E-12	Pos=+160	TTGAGATCATTTTCAA*
SAK_1826	*gyaR*	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase family protein	1,14	3,79E-02		
SAK_1827	-	hypothetical protein	2,87	3,16E-06	Pos=-171	ATGTAAACGCTTGCTT*
SAK_1853	*ahpC*	alkyl hydroperoxide reductase, subunit C	2,68	1,72E-06	Pos=-77	ATGTAAACGTTTTTAT
SAK_1854	*ahpF*	NADH dehydrogenase	2,75	2,87E-05		
Nucleic acids metabolism						
SAK_0481	*rnpA*	ribonuclease P	-1,28	4,21E-02		
SAK_0950	*udk*	uridine kinase	-1,62	1,44E-02	Pos=-88	TTTAGAGCGTTTTCAA
					Pos=-219	AAATAAACTTTTTCAA*
SAK_1172	*guaC*	guanosine 5'-monophosphate oxidoreductase	-1,53	5,44E-03		

SAK_1180	*relP*	(p)ppGpp synthase	-1,24	1,50E-02		
SAK_0932	*prsA*	foldase protein PrsA	-2,13	3.37E-03		
SAK_1901	*cpdB*	bifunctional 2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase/3'-nucleotidase precursor protein	1,97	1,12E-04	Pos=-77	GATTAAACGTTTTCAA
SAK_1979	-	MagZ family protein	-1,70	1,15E-02		
Regulators						
Two component system						
SAK_0249	*lytR/lytT*	DNA-binding response regulator	1,49	1,54E-02		
SAK_1080	*ciaR*	DNA-binding response regulator CiaR	-1,27	1,99E-02		
SAK_2066	-	sensor histidine kinase, putative	5,59	2,16E-08	Pos=-52	TAGATAGCGCTTTCAA
SAK_2067	-	response regulator	5,25	1,93E-06	Pos=+58	TTGAAATCTTCTTCAA*
Transcriptional regulators						
SAK_0075	-	RpiR family phosphosugar-binding transcriptional regulator	4,04	4,11E-13	Pos=-38	TGTTAAGCGCTTTCTT
SAK_0331	-	ECF subfamily RNA polymerase sigma factor	-2,51	3,98E-02		
SAK_0833	*ccpA*	catabolite control protein A	-3,16	7,22E-10	Pos=-74	TTGAAAGTGTTTCCAA
SAK_1034	-	GntR family transcriptional regulator	-1,59	6,55E-03		
SAK_1667	-	MerR family transcriptional regulator	-2,03	1,60E-02		
SAK_2012	-	GntR family transcriptional regulator	1,90	1,13E-02	Pos=-73	AAGAAAACGTTTTATT**
					Pos=-92	TTGTAAACGCTTTTAT
Mobile elements						
Prophage LambdaSa03						
SAK_0616	-	hypothetical protein	-2,04	2,40E-02		

SAK_0617	-	prophage LambdaSa03, helicase, putative	-2,21	7,40E-03		
SAK_0619	-	bacteriophage resistance protein	-2,17	1,67E-02	Pos=+187	TTGAAGTCGTTTAAAA*
SAK_0620	-	hypothetical protein	-2,63	2,83E-02		
SAK_0621	-	hypothetical protein	-2,72	4,10E-02		
SAK_0624	-	hypothetical protein	-3,82	1,65E-02		
SAK_0625	-	hypothetical protein	-2,62	1,81E-02		
SAK_0626	-	hypothetical protein	-2,64	4,16E-02		
SAK_0631	-	hypothetical protein	-2,74	3,37E-03		
SAK_0635	-	prophage LambdaSa03, terminase, large subunit, putative	-1,60	1,96E-02		
SAK_0636	-	hypothetical protein	-3,00	5,18E-03		
SAK_0637	-	prophage LambdaSa03, structural protein, putative	-2,85	4,01E-04		
SAK_0638	-	hypothetical protein	-2,36	2,01E-02		
SAK_0639	-	hypothetical protein	-2,35	1,44E-02		
SAK_0640	-	hypothetical protein	-2,78	7,32E-03		
SAK_0644	-	hypothetical protein	-2,52	2,01E-02		
SAK_0645	-	prophage LambdaSa03, pblA protein, internal deletion	-2,04	1,02E-02	Pos=+250	TTGAAAAGGGTTTCTA*
SAK_0646	-	prophage LambdaSa03, tail component, putative	-2,08	8,62E-03		
SAK_0647	-	prophage LambdaSa03, minor structural protein, putative	-2,00	1,37E-02		
SAK_0648	-	prophage LambdaSa03, minor structural protein, putative	-1,83	6,14E-03		
SAK_0649	-	hypothetical protein	-3,65	3,37E-03		
SAK_0652	-	prophage LambdaSa03, holin	-3,40	3,15E-02		

prophage LambdaSa04						
SAK_0723	-	hypothetical protein	2,78	2,45E-07	Pos=-44	TTGTAAACGCTTTTAA*
SAK_0724	-	hypothetical protein	5,84	5,68E-17	Pos=+10	TTGAAAAAGTTGACAT*
SAK_0725	-	prophage LambdaSa04, DNA polymerase	5,03	6,88E-14	Pos=-195	TTGAAACAATTTTCTT*
					Pos=+94	TTGAAATCCTTCTCTT*
SAK_0726	-	hypothetical protein	5,65	1,80E-11		
SAK_0727	-	hypothetical protein	5,21	6,90E-11		
SAK_0728	-	hypothetical protein	5,63	8,72E-13		
SAK_0729	-	hypothetical protein	5,22	1,30E-15		
SAK_0730	-	prophage LambdaSa04, DNA primase	4,94	1,27E-20		
SAK_0731	-	hypothetical protein	4,70	5,18E-03		
SAK_0732	-	hypothetical protein	4,01	3,39E-05		
SAK_0733	-	prophage LambdaSa04, SNF2 family helicase	5,50	8,46E-20		
SAK_0734	-	hypothetical protein	4,94	6,26E-13		
SAK_0736	*metK*	S-adenosylmethionine synthetase	5,14	6,42E-13		
SAK_0737	-	prophage LambdaSa04, HNH endonuclease family protein	4,78	2,29E-12		
SAK_0738	-	prophage LambdaSa04, DNA methylase	4,84	6,94E-13		
SAK_0739	-	prophage LambdaSa04, methyltransferase C-5	4,93	6,88E-14		
SAK_0740	-	hypothetical protein	3,50	3,52E-05		
SAK_0741	-	prophage LambdaSa04, P27 family terminase small subunit	3,31	5,46E-04		
SAK_0742	-	prophage LambdaSa04, terminase, large subunit	5,30	2,52E-12		
SAK_0746	-	prophage LambdaSa04, HK97 family portal protein	4,24	5,98E-16		

SAK_0747	-	prophage LambdaSa04, ClpP endopeptidase	4,35	1,30E-10		
SAK_0748	-	prophage LambdaSa04, HK97 family major capsid protein	4,80	5,83E-13		
SAK_0749	-	hypothetical protein	5,73	2,90E-09		
SAK_0750	-	prophage LambdaSa04, head-tail adaptor, putative	5,52	1,17E-11		
SAK_0751	-	hypothetical protein	4,37	7,32E-12		
SAK_0752	-	hypothetical protein	4,82	4,75E-07		
SAK_0753	-	prophage LambdaSa04, phi13 family major tail protein	4,75	7,00E-12		
SAK_0754	-	hypothetical protein	4,62	2,14E-07		
SAK_0755	-	hypothetical protein	4,38	8,13E-08		
SAK_0756	-	prophage LambdaSa04, TP901 family tail tape measure protein	5,20	1,25E-17		
SAK_0757	-	prophage LambdaSa04, tail protein, putative	4,57	1,22E-08		
SAK_0758	-	prophage LambdaSa04, minor structural protein	4,75	9,51E-15		
SAK_0759	-	prophage LambdaSa04, minor structural protein, putative	5,20	2,53E-12		
SAK_0760	-	prophage LambdaSa04, holin	3,83	4,49E-05		
SAK_0761	-	prophage LambdaSa04, mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase family protein	3,70	6,23E-05		
SAK_0762	-	prophage LambdaSa04 LysM domain-containing protein	4,61	1,73E-07		
SAK_0764	-	prophage LambdaSa04, site-specific recombinase resolvase family protein	1,85	4,10E-02		
IS1381						
SAK_0523	-	PTS system IIA domain-containing protein	3,27	2,32E-09	Pos=-75	TAGAAAACGTTTTCTT*
SAK_0528	-	PTS system, galactitol-specific IIA component, putative	3,37	4,75E-04	Pos=-44	ATGGAATCGATTTCAT*

SAK_0529	-	PTS system, galactitol-specific IIC component	2,76	3,31E-03		
SAK_0531	-	AraC family transcriptional regulator	2,19	3,59E-04	Pos=-28	AAGTAAACGCTTTAAT*
					Pos=-147	ATGTAAGCGCATACAT*
SAK_0532	-	sugar ABC transporter, sugar-binding protein, putative	3,93	2,60E-05	Pos=-196	AAGTAAACGCTTTAAT*
					Pos=-411	AAGAAACCGCTCACAA*
					Pos=-77	ATGTAAGCGCATACAT*
SAK_0533	-	sugar ABC transporter, permease protein, putative	4,15	3,30E-05		
SAK_0534	-	ABC transporter, permease protein	3,33	1,02E-04		
SAK_0535	-	alpha-galactosidase, putative	4,09	4,13E-10		
SAK_0537	*galT*	galactose-1-phosphate uridylyltransferase	3,84	5,45E-06		
SAK_0538	*galE*	UDP-glucose 4-epimerase	2,53	3,65E-03		
SAK_0539	-	aldose 1-epimerase, interruption-N	2,41	9,19E-03		
Virulence						
SAK_1891	-	sialidase	-2,17	6,35E-03		
SAK_1892	-	sialidase N-Ter	-3,77	7,66E-04		
SAK_1991	*cspA*	cell surface serine endopeptidase CspA	-1,75	1,22E-02		
Stress						
SAK_0089	-	MATE efflux family protein	2,24	7,67E-06		
SAK_0250	*lrgA*	LrgA/CidA family protein	1,32	2,01E-02	Pos=-72	AATAAAACGTTTTCAT
SAK_0251	*lrgB*	LrgB/CidB family protein	2,24	1,08E-03		

SAK_0348	-	pyridine nucleotide-disulfide oxidoreductase	4,03	1,48E-14	Pos=-46	TTGTTACCGTTTTCAA
SAK_0349	-	hypothetical protein	3,90	5,75E-15		
SAK_0902	*cshA*	DEAD-box ATP dependent RNA helicase	-1,57	2,81E-02	Pos=-142	ATGAAAGCGTGTTATT
SAK_1110	*cstA*	carbon starvation protein CstA	3,79	6,46E-09	Pos=-50	ATGAAAACGCTTAATA
SAK_1217	*tpx*	thiol peroxidase	1,80	1,57E-02		
SAK_1233	*cidA*	LrgA/CidA family protein	-2,75	3,18E-04	Pos=-66	ATGTAAACGTTTCATA
SAK_1234	*cidB*	LrgB/CidB family protein	-2,73	8,95E-06		
SAK_1352	-	Glutathione S-transferase domain protein	1,93	4,14E-03	Pos=-9	TTGTCATCGTATACTT*
SAK_1689	*uspA*	hypothetical protein	4,91	1,50E-08	Pos=-144	ATGAAAGCGTTTTATG*
Unknown functions						
SAK_0012	-	hypothetical protein	-2,20	1,29E-04		
SAK_0273	-	hypothetical protein	-1,14	4,61E-02		
SAK_0432	-	hypothetical protein	1,14	4,11E-02		
SAK_0442	-	hypothetical protein	-1,30	2,88E-02		
SAK_0507	-	hypothetical protein	-3,28	2,25E-02	Pos=-327	AAGAAATTGCTGACAT
SAK_0546	-	hypothetical protein	-1,36	1,81E-02		
SAK_0705	-	hypothetical protein	-2,14	7,69E-03		
SAK_0769	-	hypothetical protein	2,82	8,58E-08	Pos=+194	TTGAAGTCCCTTTCTT
SAK_0802	-	hypothetical protein	-3,82	2,12E-03	Pos=-90	TTAAAATCGTTTTCAG
SAK_0805	-	hypothetical protein	-2,50	1,53E-02		
SAK_0923	-	hypothetical protein	1,78	2,87E-02		

SAK_0957	-	hypothetical protein	2,32	3,60E-03	Pos=-47	ATGACAAGGCTTACAT
SAK_1109	-	hypothetical protein	-1,33	1,41E-02		
SAK_1130	-	hypothetical protein	-2,59	1,86E-02		
SAK_1131	-	hypothetical protein	-3,04	4,75E-02		
SAK_1340	-	hypothetical protein	1,74	2,03E-02		
SAK_1367	-	hypothetical protein	1,37	3,93E-02		
SAK_1530	-	hypothetical protein	1,30	1,91E-02		
SAK_1640	-	hypothetical protein	-1,41	4,33E-02	Pos=-95	ATGTAGTCGTTAACAA*
SAK_1806	-	hypothetical protein	-2,45	1,37E-02		
SAK_1807	-	hypothetical protein	-2,35	4,22E-03	Pos=-211	ATAAAGACGCTTTCAA*
SAK_1842	-	hypothetical protein	-2,83	1,26E-02		
SAK_1913	-	hypothetical protein	1,30	3,53E-02		
SAK_1940	-	hypothetical protein	-1,58	1,12E-02		
SAK_1952	-	hypothetical protein	3,42	3,64E-03		
SAK_1953	-	hypothetical protein	2,44	1,57E-02	Pos=-490	AAGAAAGCGTTATCTT*
SAK_2063	-	hypothetical protein	3,41	2,37E-08		
SAK_2077	-	hypothetical protein	-1,70	2,27E-02		
SAK_2113	-	hypothetical protein	-1,74	0,028243		

Pathway predictions and gene annotations were conducted with the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG Pathway) (https://www.kegg.jp/kegg/) (5) and the MicroScope platform (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope) (6), as explained in the Materials and methods section. Experiments were performed over three independent biological replicates.

REFERENCES

1. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, DeBoy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Ros IM y, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJB, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome." PNAS 102:13950–13955.

2. Moulin P, Rong V, Ribeiro E Silva A, Pederick VG, Camiade E, Mereghetti L, McDevitt CA, Hiron A. 2019. Defining the role of the *Streptococcus agalactiae* Sht-family proteins in zinc acquisition and complement evasion. J Bacteriol 201:e00757-18.

3. Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E. 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. J Bacteriol 175:3628–3635.

4. Poyart C, Trieu-Cuot P. 1997. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in gram-positive bacteria. FEMS Microbiol Lett 156:193–198.

5. Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M. 2022. KEGG mapping tools for uncovering hidden features in biological data. Protein Science 31:47–53.

6. Vallenet D, Calteau A, Dubois M, Amours P, Bazin A, Beuvin M, Burlot L, Bussell X, Fouteau S, Gautreau G, Lajus A, Langlois J, Planel R, Roche D, Rollin J, Rouy Z, Sabatet V, Médigue C. 2020. MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. Nucleic Acids Research 48:D579–D589.

2. Travaux complémentaires

a) Objectifs

Chez plusieurs Firmicutes, CcpA régule le métabolisme des acides aminés. Chez *C. difficile*, CcpA régule notamment la voie de Stickland (Antunes et al., 2012). Chez *Lysinibacillus sphaericus*, il a été démontré que le métabolome, et notamment la quantité d'acides aminés, était impacté dans le mutant Δ*ccpA* (Li et al., 2012). Comme démontré dans notre publication, l'analyse transcriptomique a montré que peu de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés étaient régulés par CcpA. Nous avons donc cherché à corroborer ce résultat en recherchant la présence de certains acides aminés, ou de produits de leur métabolisme, dans les surnageants de culture des souches A909WT et A909Δ*ccpA*. Le but était surtout de voir si la quantité d'acides aminés dans le milieu diminuait. En effet, nous nous intéréssions davantage à l'import et au catabolisme des acides aminés par la bactérie plutôt qu'à l'anabolisme puisque *S. agalactiae* est auxotrophe pour la majorité des acides aminés.

Par ailleurs, comme CcpA joue un rôle important dans la résistance aux stress acide et oxydatif, il pourrait jouer un rôle dans la colonisation vaginale. Etant donné que les biofilms peuvent jouer un rôle dans la colonisation, nous sommes intéressés au rôle que pourrait jouer CcpA dans la formation de biofilm. De plus, comme certaines protéines Usp ont été démontrées comme ayant un rôle dans la formation de biofilm de certaines bactéries, nous nous sommes demandé si les protéines SAK_1689 et SAK_1741 pourraient aussi jouer un rôle dans la formation de biofilm chez *S. agalactiae*.

Nous avons démontré, dans la publication, que CcpA activait la transcription du gène *SAK_0902* codant une ARN hélicase putative dépendante de l'ATP à motif DEAD via un site *cre*. Ces hélicases à ARN permettent le déroulement des structures secondaires de l'ARN lors de la synthèse protéique, de la dégradation de l'ARNm via le dégradosome mais aussi lors de la biogenèse du ribosome (Redder and Linder, 2012; Français et al., 2019). Nous avons dans un premier temps recherché la présence des motifs caractéristiques des hélicases à ARN à motif DEAD. De plus, l'importance de ces protéines dans la réponse à divers stress a été démontrée bien que certains mécanismes d'action restent à déterminer. SAK_0902 de *S. agalactiae* partage notamment 55 % d'identité avec celle de *Bacillus cereus* dont le rôle a été démontré dans l'adaptation aux stress thermique, oxydatif et acide (Pandiani et al., 2011) et 60 % d'identité avec Lmo0866 de *L. monocytogenes* impliquée dans la résistance à l'éthanol (Markkula et al., 2012). De plus, certaines hélicases à ARN à motif DEAD sont impliquées dans

la formation de biofilm (Hausmann et al., 2021). Nous nous sommes donc demandé quelle pourrait être l'importance de cette protéine dans l'adaptation de *S. agalactiae* à son environnement et avons réalisé des croissances en présence d'éthanol, à diverses températures, des expériences de biofilm et des antibiogrammes avec le mutant A909Δ*SAK_0902*.

Enfin, dans la publication nous avons mis en évidence que CcpA régulait 274 gènes dont 82 possédaient un site *cre*. Il existe donc une centaine de gènes régulés directement par CcpA par un site *cre* puisque de nombreux gènes sont en opéron. Certains gènes sont aussi certainement régulés de manière indirecte par CcpA et notamment grâce à des régulateurs transcriptionnels puisque CcpA en régule au moins 8. Enfin, CcpA exerce aussi probablement sa régulation via d'autres sites de fixation à l'ADN. Il a notamment été démontré que CcpA de *S. agalactiae* était capable de se fixer à un autre type de site *cre* appelé *cre2* chez *S. suis* (Willenborg et al., 2014). La présence des sites *cre2* a donc été recherchée par analyse bioinformatique dans le génome de *S. agalactiae* afin d'établir quels gènes pourraient être régulés par CcpA via un site *cre2*.

b) Matériel et méthodes

(1) Analyse RMN

L'analyse RMN sur les surnageants de culture des souches A909WT, Δ*ccpA* et Δ*ccpA*::*ccpA* a été réalisée selon le protocole décrit dans la publication.

(2) Biofilm

La formation de biofilm a été mesurée selon le protocole décrit par Jabbour et al. (Jabbour et al., 2022). Ainsi, 200 µL de culture de nuit ont été ensemencés à une DO_{600} de 0,05 dans du TH liquide à pH neutre ou pH5 avec 1 % de glucose dans des microplaques de polystyrène à 96 puits (Costar, Washington, DC, USA) pendant 48 heures. La microplaque a été lavée deux fois avec de l'eau. Le biofilm a été coloré pendant 15 min avec du cristal violet à 0,2 % (Merck, Darmstadt, Allemagne) (110 µL par puits) et lavé quatre fois avec de l'eau. Après séchage à l'air, le biofilm a été dissous pendant 1h à température ambiante avec de l'éthanol/acétone (80:20 [vol/vol]). La solution a été transférée dans une nouvelle plaque, et la DO_{600} a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (BioTek Instruments). L'indice de formation du biofilm a été calculé comme le rapport entre la DO_{600} après traitement au cristal violet et la DO_{600} avant traitement.

(3) Recherche de motifs DEAD dans le génome de *S. agalactiae*

La recherche de motifs DEAD (Asparte-Glutamate-Alanine-Aspartate) sur les protéines présentes chez *S. agalactiae* A909 a été réalisée grâce à la fonction BlastP de la plateforme MicroScope (https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/search/blast.php?).

(4) Construction du mutant A909Δ*SAK_0902*

Le mutant A909Δ*SAK_0902* a été construit de la même manière que les mutants A909Δ*ccpA* et A909Δ*SAK_1689* comme expliqué dans la partie A.2.b) et dans la publication. Brièvement, les régions amont et aval du gène *SAK_0902* ont été amplifiées par PCR à l'aide des amorces OLM631F-OLM632R et OLM633F-OLM634R puis hybridées en un fragment par PCR « overlap » (Tableau 9). Ce fragment a ensuite été inséré, après restriction enzymatique par les enzymes EcoRI et BamHI puis ligature dans le plasmide pG+host1^{ts} avant d'être cloné dans *E. coli* XL1-blue. Le plasmide est ensuite extrait, séquencé et électroporé dans *S. agalactiae* A909. Après délétion du gène par recombinaison homologue, le mutant a été vérifié par séquençage de la région délétée (Tableau 10).

Tableau 9. Amorces utilisées pour la délétion du gène *SAK_0902*.

[a]Les sites de restriction sont soulignés.
[b]Position du nucléotide (nt) par rapport au premier nucléotide codant du gène d'intérêt.

Nom	**Séquence[a]**	**Localisation[b]**
Amorces utilisées pour la délétion du gène *SAK_0902*		
OLM631F	AAAAGGAATTCGCTATCGAAGATATTATTACTAAC	nt -552
OLM632R	TATTTATCCTGTAAATTTCAAATGTTTCTCTTT	nt+11
OLM633F	AATTTACAGGATAAATAAGAGGATTATGAAAAAG	nt +1587
OLM634R	TACTTGGATCCCCTCCTCTTGTTGTTCATCAAG	nt + 2120
Amorces utilisées pour la vérification de la délétion du gène *SAK_0902*		
OLM635F	CTTATCACCTTAAAGAATACGTC	nt -588
OLM636R	CTATTAAAGATGGCTCGACAG	nt +2158

Tableau 10. Souche et plasmide utilisés dans cette étude pour l'étude du rôle de *SAK_0902*.

Souche *S. agalactiae*	
A909Δ*SAK_0902*	Mutant de délétion *SAK_0902* (*cshA*) isogénique de A909
Plasmide	
pG+host1^{ts}-Δ*SAK_0902*	Plasmide pG+host1^{ts} contenant l'insert permettant la délétion de *SAK_0902* entre les sites de restriction EcoRI et BamHI

(5) Croissance en milieu liquide

Les souches A909WT, A909Δ*ccpA*, A909Δ*ccpA*::*ccpA* et A909Δ*SAK_0902* ont été cultivées dans 200 µL de TH liquide à 35°C, 37°C ou 40°C en absence ou en présence d'éthanol 5 % et sans agitation. Les cultures ont été ensemencées à partir d'une DO_{600}=0,05 dans des microplaques de 96 puits (FALCON, USA) à partir d'une culture de nuit et les croissances ont été suivies par la prise de DO_{600} toutes les 20min par un spectrophotomètre Eon (BioTek Instruments, USA).

(6) Antibiogramme

Les souches A909WT et A909Δ*SAK_0902* ont été ensemencées à partir d'une culture en phase stationnaire, diluée à 0,5 McFarland, sur boîte TH agar. Des disques d'antibiotiques de tétracycline (30 µg), érythromycine (15 µg), clindamycine (2 µg), gentamicine (500µg) et rifampicine (5 µg) ont été déposés. Le diamètre d'inhibition a été mesuré après 24 heures de croissance à 37°C.

(7) Recherche du site *cre2* dans le génome de *S. agalactiae* A909

Pour la recherche de sites *cre2*, le motif consensus publié chez *S. suis*, TTTTYHWDHHWWTTTY (Y pour C ou T ; H pour A, C ou T; W pour A ou T; D) (Willenborg et al., 2014), a été recherché sur le génome de *S. agalactiae* A909 grâce à la fonction BlastN de la plateforme MicroScope (https://mage.genoscope.cns.fr/microscope/search/blast.php?).

c) Résultats

(1) Rôle de CcpA dans le métabolisme des acides aminés

Nous avons mesuré la concentration des acides aminés dans les surnageants de culture des souches A909WT, A909Δ*ccpA* et A909Δ*ccpA*::*ccpA* afin d'évaluer le rôle de CcpA dans le métabolisme des acides aminés. Nous n'avons observé aucune différence significative de concentrations des acides aminés mesurables par RMN (tryptophane, tyrosine, alanine, valine, leucine, isoleucine et phénylalanine) entre les souches ni par rapport au milieu. Cette

expérience ne nous a donc pas permis de mettre en évidence un import d'acides aminés du milieu vers la bactérie (Figure 33). En revanche, nous avons pu observer que du fumarate, un métabolite du cycle de l'urée produit lors du clivage de l'arginosuccinate en arginine (et fumarate) était presque six fois plus produit dans la souche mutante A909Δ*ccpA* que dans la souche A909WT. Dans notre étude transcriptomique, nous avons mis en évidence que le gène (*argG*) codant l'arginossucinate synthase permettant la synthèse d'arginossucinate était significativement réprimé par CcpA. En revanche, le gène *argH* codant l'arginossucinate lyase intervenant ensuite pour la synthèse du fumarate n'était pas significativement régulé. Chez d'autres bactéries ce métabolite peut intervenir dans le cycle Krebs mais les enzymes y intervenant sont absentes chez *S. agalactiae* (Glaser et al., 2002). Le furamate pourrait donc être un déchet métabolique.

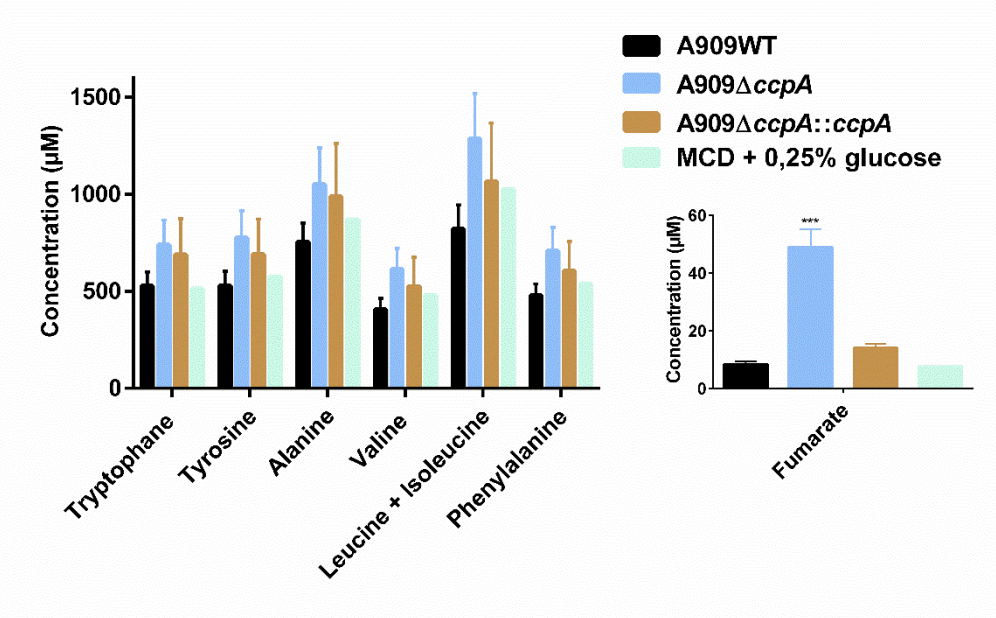


Figure 33. Rôle de CcpA dans le métabolisme des acides aminés chez *S. agalactiae*.
Une analyse par spectroscopie RMN des acides aminés présents dans les surnageants des cultures des souches A909WT, A909Δ*ccpA* et A909Δ*ccpA*::*ccpA* après 24 h de croissance dans du MCD complété par 0,25 % de glucose a été réalisée. Les données sont des moyennes + écart-type sur trois expériences biologiques indépendantes réalisées avec trois réplicats techniques pour chacune. Les astérisques indiquent les valeurs P obtenues en réalisant un test ANOVA puis un test de Student pour échantillons indépendants. ***, *P*<0,001.

(2) Rôle de CcpA dans la formation de biofilm

Bien que la souche A909 *S. agalactiae* fasse partie des faibles formateurs de biofilm en milieu riche (D'Urzo et al., 2014), elle a été isolée d'une septicémie chez un nouveau né et a, de ce fait, réussi à coloniser cet hôte et a donc potentiellement formé un biofilm. Nous avons donc trouvé intéressant d'étudier la formation de biofilm de différents mutants de A909 que nous avions construit pour étudier l'impact global de CcpA sur ce mécanisme mais aussi pour

déterminer quel pourrait être le rôle des protéines Usp codées par les gènes *SAK_1689* et *SAK_1741*. Nous avons réalisé les expériences en pH neutre et en pH acide puisque le pH acide a été démontré comme favorisant la formation de biofilm (D'Urzo et al., 2014). Contrairement au mutant A909Δ*SAK_1689*, nous avons pu observer en TH neutre une formation de biofilm significativement atténuée chez les mutants A9090Δ*ccpA*, A909Δ*ccpA*Δ*SAK_1689,* A909-SAK_1741^{Y5STOP} et A909-SAK_1741^{Y5STOP}Δ*SAK_1689* et qui était restaurée dans les souches complémentées A909Δ*ccpA*::*ccpA* et A909-SAK_1741^{Y5STOP}::*SAK_1741*. Ces expériences permettent de montrer que CcpA et SAK_1741 aident à la formation de biofilm (Figure 34A). En TH acide nous avons pu observer une augmentation très importante (supérieure à un facteur 10) de la formation de biofilm pour toutes les souches par rapport à la condition en TH neutre. Les mutants A909Δ*ccpA*, A909Δ*ccpA*Δ*SAK_1689,* A909-SAK_1741^{Y5STOP} et A909-SAK_1741^{Y5STOP}Δ*SAK_1689* avaient aussi une formation de biofilm significativement atténuée par rapport à la souche A909WT. En revanche, bien que les souches complémentées A909Δ*ccpA*::*ccpA* et A909-SAK_1741^{Y5STOP}::*SAK_1741* ne présentent pas de différence statistique par rapport à la souche WT pour la formation de biofilm, nous n'avons pas observé de différence statistique entre les compléments et leurs mutants respectifs (Figure 34B). Il nous semblerait donc important de réitérer l'expérience pour vérifier ces résultats.

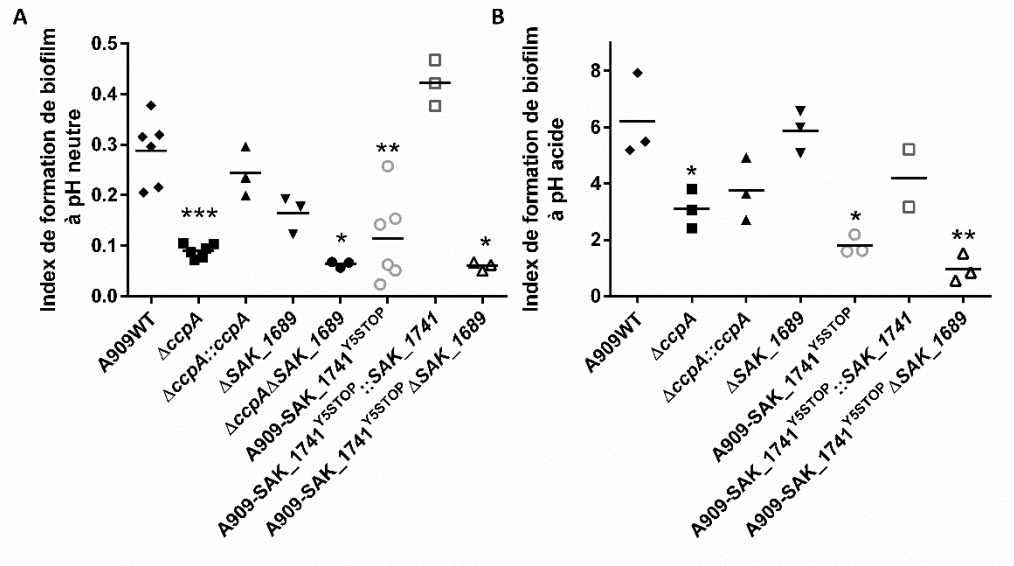


Figure 34. Rôles de CcpA, SAK_1689 et SAK_1741 dans la formation de biofilm.
Le biofilm a été réalisé dans du TH supplémenté en glucose 1 % à pH neutre (A) et à pH5 (B). L'index de formation de biofilm a été déterminé pour les souches A909WT, A909Δ*ccpA*, A909Δ*ccpA*::*ccpA*, A909Δ*SAK_1689*, A909Δ*ccpA*Δ*SAK_1689*, A909-SAK_1741^{Y5STOP}, A909-SAK_1741^{Y5STOP}::*SAK_1741* et A909-SAK_1741^{Y5STOP}Δ*SAK_1689*. Chaque point représente une expérience biologique, moyenne d'un quadruplicat technique. Les astérisques indiquent les valeurs *P* obtenues par un test de Student pour échantillons indépendants en comparant les souches mutantes et complémentées à la souche A909WT, *, *P*<0,05, **, *P*<0,01 et ***, *P*<0,001.

(3) Etude du rôle de SAK_0902, une hélicase à ARN à motif DEAD putative activée par CcpA

(a) Recherche des motifs caractéristiques des hélicases à ARN à motif DEAD dans SAK_0902

Les protéines de la famille DEAD-box sont des hélicases caractérisées par la présence de neuf motifs conservés qui sont impliqués dans les activités ATPase et hélicase et dans leur régulation ainsi que dans la liaison à l'ARN. Les motifs Q, Ia, Ib, IV, V et VI sont importants pour la liaison à l'ARN. D'autres ont également un rôle dans l'activité ATPase comme les motifs Q, I, II, III et VI (Cordin et al., 2006). Nous avons mis en évidence la présence de ces motifs conservés dans la séquence protéique de SAK_0902, annotée CshA sur les banques de données (Figure 35). De plus, nous avons recherché la présence d'analogues de cette protéine en recherchant le motif « DEAD » sur le protéome de *S. agalactiae* A909. En plus de SAK_0902, nous avons trouvé 11 autres protéines possédant ce motif (Tableau 11). Parmi elles, nous avons cherché s'il y avait d'autres hélicases putatives à ARN. Nous avons ainsi mis en évidence une protéine analogue à SAK_0902, annotée comme une « DEAD-box ATP-dependent RNA helicase » sur la plateforme Microscope (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope). Elle est codée par le gène *SAK_0361* (*cshB*), présente 37 % d'identité et 58 % de similarité avec SAK_0902 et possède aussi les neufs motifs caractéristiques de la famille DEAD-box (Figure 35B). Le gène *SAK_0361* n'est pas régulé par CcpA dans notre transcriptome et ne possède pas de site *cre*.



Figure 35. Recherche des motifs conservés de la famille DEAD-box dans SAK_0902 et SAK_0361.
A) Motifs conservés dans la famille DEAD-box et les familles DExD/H-box apparentées. Les symboles utilisés sont les suivants : **o** : S,T; **l** : I, L, V; **x** : tout résidu; **a** : F, W, Y; **c** : D, E, H, K, R; **h** : A, F, G, I, L, M, P, V, W, Y; **+** : H, K, R; **u** : A, G. D'après (Cordin et al., 2006). B) Les séquences des protéines *SAK_0902* et *SAK_0361* ont été alignées et les motifs conservés caractéristiques ont été encadrés en couleur.

Tableau 11. Protéines de *S. agalactiae* possédant un motif DEAD.
Le motif DEAD a été recherché grâce à la fonction BlasP de la plateforme Microscope (https://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope).

Numéro de gène	Nom de gène	Fonction putative
SAK_0337	/	Inconnue
SAK_0361	*cshB*	ARN hélicase ATP dépendante à motif DEAD
SAK_0455	*infB*	Facteur d'initiation de la traduction IF-2
SAK_0587	*ileS*	isoleucyl-ARNt synthétase
SAK_0902	*cshA*	ARN hélicase ATP dépendante
SAK_1456		Protéine de la famille des glycosyltransférases, groupe 2
SAK_1482	*secA*	Sous-unité SecA2 de la translocase
SAK_1572		Inconnue
SAK_1696	*alrA*	D-alanine racemase
SAK_1888	*lacC*	Tagatose-6-phosphate kinase
SAK_2033	*cinA*	Régulateur inductible de compétence/dommage
SAK_2114	*recF*	Stabilisation du complexe filamentaire RecA-ADN, fixation de l'ADN simple brin et de l'ADN double brin, fixation de l'ATP

(b) Rôles de CcpA et SAK_0902 dans l'adaptation au stress thermique

Certaines hélicases à ARN à motif DEAD ayant un rôle dans l'adaptation au stress thermique, nous avons réalisé des croissances à 35°C, 37°C et 40°C pour évaluer l'impact de CcpA et SAK_0902 dans l'adaptation au stress thermique. Nous avons choisi les températures de 35°C et 40°C puisque ce sont des températures qui peuvent être retrouvées chez l'Homme lors d'une infection à *S. agalactiae*. Nous n'avons pas mis en évidence de différence de croissance entre les conditions à 35°C et 37°C pour les différentes souches testées. En revanche, nous avons pu voir que la phase plateau était diminuée pour toutes les souches à 40°C et ce, plus fortement pour la souche A909Δ*ccpA* mais pas pour la souche A909Δ*SAK_0902*. De plus, la vitesse de croissance est fortement altérée pour le mutant A909Δ*ccpA* (Figure 36). CcpA semble donc jouer un rôle dans l'adaptation au stress thermique contrairement à SAK_0902.

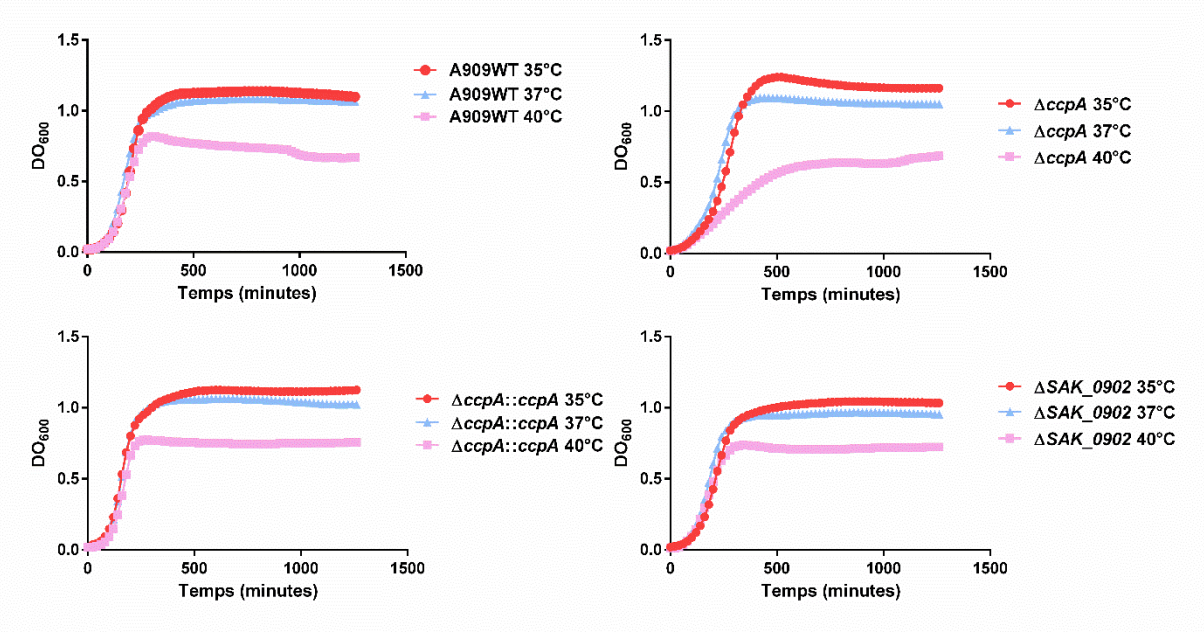


Figure 36. Rôle de CcpA et SAK_0902 dans la croissance de *S. agalactiae* en stress thermique.
Les souches ont été cultivées en milieu TH à 35°C, 37°C et 40°C pendant 21h dans une plaque 96 puits. La courbe de croissance à 37°C représente la moyenne de trois expériences biologiques indépendantes pour lesquelles chaque expérience indépendante a été réalisée en triplicat technique. Les courbes de croissance à 35°C et 40°C représentent les moyennes des triplicats techniques réalisés sur une expérience indépendante.

(c) Rôles de CcpA et SAK_0902 dans l'adaptation au stress en éthanol

L'hélicase à ARN à motif DEAD de *L. monocytogenes* (Lmo0866), avec laquelle SAK_0902 a 60 % d'identité de séquence, étant impliquée dans la tolérance au stress éthanol, nous nous sommes demandés si tel était le cas chez *S. agalactiae*. Nous avons d'abord pu mettre en

évidence que 5 % d'éthanol permettait d'altérer de la croissance de la souche A909WT sans pour autant l'inhiber totalement. Nous avons ensuite réalisé des croissances en présence d'éthanol et observé une vitesse de croissance et une DO_{600} à la phase plateau diminuée pour toutes les souches avec 5 % d'éthanol mais pas de différence entre les souches sauf pour le mutant A909Δ*ccpA* qui est beaucoup plus fortement impacté (Figure 37). Il semble donc que CcpA participe à la tolérance au stress éthanol.

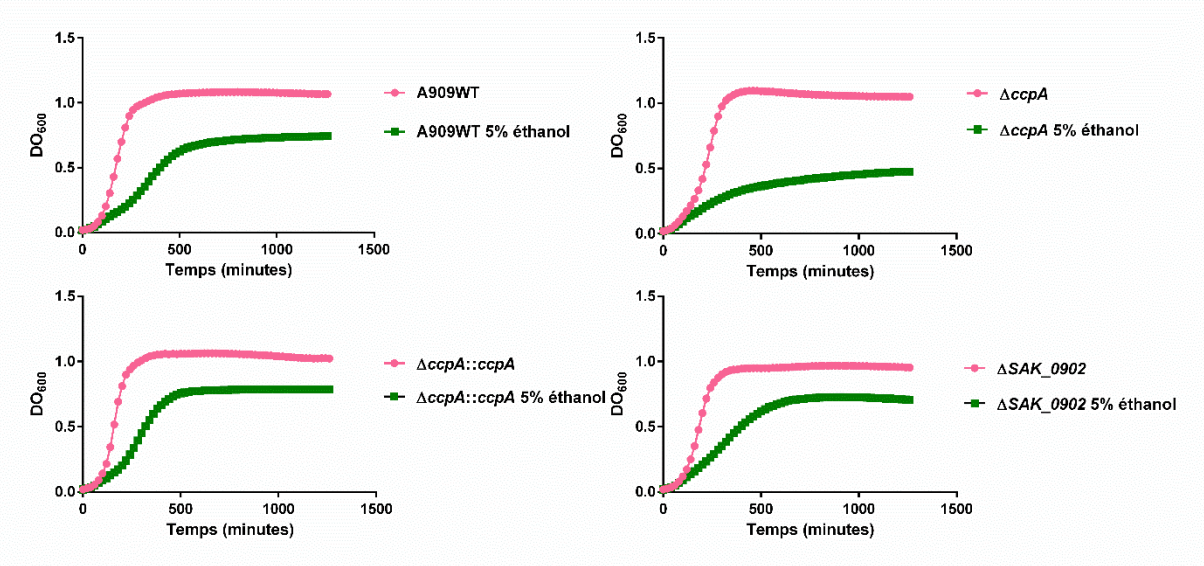


Figure 37. Rôle de CcpA et SAK_0902 dans la croissance de *S. agalactiae* en stress éthanol.
Les souches ont été cultivées en milieu TH ou en TH additionné de 5 % d'éthanol à 37°C pendant 21h dans une plaque 96 puits. Les courbes de croissance représentent la moyenne de trois expériences indépendantes biologiques pour lesquelles chaque expérience a été réalisée en triplicat technique.

(d) Rôle de SAK_0902 dans la formation de biofilm

On a observé que CcpA semblait avoir un rôle dans la formation de biofilm. Or, CcpA active l'expression de *SAK_0902*, on peut donc se demander si la capacité amoindrie du mutant A909Δ*ccpA* à former du biofilm dépend de SAK_0902. On a donc mesuré la formation de biofilm chez le mutant A909Δ*SAK_0902* pour évaluer le rôle de la protéine SAK_0902 dans ce phénomène. La formation de biofilm est légèrement supérieure chez le mutant par rapport à la souche sauvage mais cela n'est pas significatif (Figure 38). Cette protéine ne semble donc pas jouer de rôle dans la formation de biofilm et on peut en conclure que la diminution de la formation de biofilm chez A909Δ*ccpA* ne dépend pas de SAK_0902 en milieu riche à pH neutre.

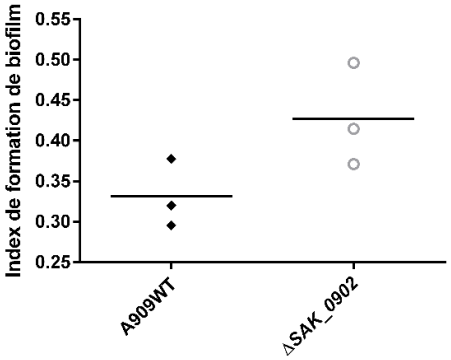


Figure 38. Rôle de SAK_0902 dans la formation de biofilm.
Le biofilm a été produit dans du TH à neutre avec 1 % de glucose par les souches A909WT et A909Δ*SAK_0902*. Chaque point représente une expérience biologique, moyenne d'un quadruplicat technique. Un test de Student pour échantillons indépendants a été réalisé.

(e) Rôle de SAK_0902 dans la résistance aux antibiotiques ciblant la synthèse d'ARN et la synthèse protéique

Les hélicases à ARN à motif DEAD étant impliquées dans la synthèse protéique, la dégradation des ARN et la formation du ribosome, on peut supposer que SAK_0902 pourrait modifier la résistance à certains antibiotiques affectant la synthèse protéique, le ribosome ou la synthèse d'ARN. Les antibiogrammes réalisés avec la souche A909WT et A909Δ*SAK_0902* n'ont pas montré de différences importantes de sensibilité entre les deux souches (Tableau 12). On ne confirme donc pas l'implication de SAK_0902 dans la synthèse des ARN ou des protéines.

Tableau 12. Antibiogrammes en milieu solide de *S. agalactiae* A909WT et du mutant A909Δ*SAK_0902*.

		A909WT	A909Δ*SAK_0902*
Antibiotiques	Mécanismes ciblés	Diamètres d'inhibition (mm)	
Tétracycline	Synthèse protéique (ribosome)	24	24
Erythromycine	Synthèse protéique (ribosome)	24	28
Clindamycine	Synthèse protéique (ribosome)	22	24
Gentamicine	Synthèse protéique (ribosome)	18	20
Rifampicine	Transcription (ARN polymérase)	22	24

(4) Recherche d'un site *cre2* dans le génome de *S. agalactiae*

Dans le but de compléter l'analyse de la publication sur l'identification des gènes directement régulés par CcpA, nous avons recherché, parmi les gènes régulés par CcpA, ceux qui possédaient un site de fixation identifié chez *S. suis* appellé *cre2*. Le site *cre2*,

TTTTYHWDHHWWTTTY, a été retrouvé 188 fois dans le génome. Parmi les gènes régulés par CcpA en présence de 0,25 % de glucose (cf publication), on trouve 26 gènes, dont 19 gènes réprimés par CcpA et 7 gènes activés par CcpA, correspondant à 14 unités de transcription qui pourraient potentiellement être régulées par CcpA grâce à un ou plusieurs sites *cre2*. Sur les 14 unités de transcription possédant un ou plusieurs sites *cre2*, 9 d'entre elles ont aussi au moins un site *cre* (Tableau 13). Pour ces 9 dernières, nous avons recherché si les sites se situaient en position considérée comme activatrice, i.e. avant la région promotrice ou inhibitrice, i.e c'est-à-dire dans le promoteur ou au début de la séquence codante. Pour cela nous avons utilisé les boîtes -35 et -10 déterminées chez la souche NEM316 dans la publication de Rosinski-Chupin et al (Rosinski-Chupin et al., 2015). Ainsi, parmi les 9 gènes possédant un site *cre* et un site *cre2*, nous avons pu observer que 2 gènes possédaient un site *cre* et un site *cre2* en positions inhibitrices (*SAK_0698* et *SAK_0787*), 5 gènes possédaient un site *cre* en position inhibitrice et un site *cre2* en position activatrice (*SAK_0408*, *SAK_0087*, *SAK_0826*, *SAK_1475* et *SAK_1895*), un gène possédait un site *cre* en position activatrice et un site *cre2* en position inhibitrice (*SAK_2012*) et un gène avait les sites *cre* et *cre2* en position activatrice (*SAK_1233*). Par ailleurs, parmi les gènes régulés par CcpA et possédant un site *cre2*, il n'y a qu'un gène, *SAK_0787*, qui possède un site *cre2* dans sa séquence codante. Cela semble différent de *S. suis* puisque presque 58 % des sites *cre2* liés par CcpA se situent dans la séquence codante des gènes (Willenborg et al., 2011).

Tableau 13. Gènes régulés par CcpA et possédant un site cre2.

Les gènes régulés par CcpA en milieu chimiquement défini supplémenté avec 0,25 % de glucose et possédant un site *cre2* ont été listés. Les gènes régulés par CcpA appartenant au même opéron que les gènes régulés par CcpA et possédant un site *cre2* apparaissent à la suite dans le tableau.

Numéro de gène	**Nom de gène**	**Fonction putative de la protéine codée**	**Log_2 facteur d'expression (Δ*ccpA*/WT)**	**Valeur*P***	**Position du site *cre* par rapport au codon START**	**Séquence *cre*** *: Virtual Footprint seulement **: RegPrecise seulement	**Position du site *cre2* par rapport au codon START**	**Séquence *cre2***
Enveloppe cellulaire								
SAK_0698	-	Transporteur ABC, protéine perméase	-2,81	4,62E-02	Pos=+127	TATAAAGCCTTTTCTA*	Pos=-97	TTTTTAAAACTATTTC
SAK_0787	-	Transporteur ABC, protéine de liaison à l'ATP	4,08	2,13E-16	Pos=-115	AAGAAAACGTTTGCAT	Pos=+31	TTTTTATAAAATTTTT
SAK_0788	-	Protéine hypothétique	4,49	4,52E-16	Pos=-230	AAGAAAGAGTTTTCAT*		
SAK_0789	-	Protéine hypothétique	4,1	1,07E-12				
SAK_1128	-	Effecteur de type VII, protéine semblable à ESAT6	1,31	3,64E-02			Pos=-105	TTTTTTATACTTTTTT
SAK_1626	-	Amidase	-2,63	7,47E-03			Pos=-55	TTTTTAAGTATTTTTT
Division cellulaire								
SAK_0408	*yfiA*	Protéine d'interface de la sous-unité ribosomale	3,46	1,70E-07	Pos=-36 Pos=-60	TAGAAAGCGTTAACAA ATGAAAGCGGTTATAA**	Pos=-121	TTTTTATACCTTTTTC
Métabolisme du carbone et de l'énergie								
SAK_0087	-	Alcool déshydrogénase	7,61	9,55E-27	Pos=-49	ATGTAAACGATTACAA	Pos=-109	TTTTCAAAAAATTTTC

SAK_0826	*eda*	2-déhydro-3-déoxyphosphogluconate aldolase/4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase	1,82	2,99E-02	Pos=-29	AAGATAACGGTTACAT	Pos=-81	TTTTTTAGTATTTTTC
SAK_0827	*uxaC*	Glucuronate isomérase	2,37	3,90E-05				
SAK_0828	*uxuA*	Mannonate déshydratase	3,19	2,92E-08				
SAK_0829	-	D-mannonate oxydoréductase	2,9	3,57E-08				
SAK_0831	-	Protéine de la famille des glycosyl hydrolases	1,49	2,29E-03				
SAK_0919	-	Perméase de la famille GntP	1,49	3,90E-02			Pos=-241	TTTTTTAGCTAATTTT
SAK_1475	-	Protéine de liaison périplasmique du transporteur ABC de sucre	1,86	2,89E-02	Pos=-58	TTGCAAACGGTTGCAT	Pos=-95	TTTTTCTTATTTTTTT
SAK_1476	-	Cyclodextrine ABC transporteur, protéine perméase	2,96	1,84E-05				
SAK_1477	-	Cyclodextrine ABC transporteur, protéine perméase	3,36	1,02E-06				
SAK_1895	-	Système PTS, composant IIA, putatif	2,85	5,69E-03	Pos=-20	ATGTAACCGCTTAACT*	Pos=-128 Pos=-255	TTTTTTATTTATTTTT TTTTCTATTATTTTTT

							Pos=-256	TTTTTCTATTATTTTT
SAK_1894	-	Système PTS, composant IIB, putatif	2,86	4,17E-03				
SAK_1893	-	Système PTS, composant IIC, putatif	3,03	2,11E-08				
Métabolisme des acides nucléiques								
SAK_1172	*guaC*	Guanosine 5'-monophosphate oxidoréductase	-1,53	5,44E-03			Pos=-119	AAAATTGACTAAAAAA
Régulateurs								
SAK_2012	-	Régulateur transcriptionnel de la famille GntR	1,9	1,13E-02	Pos=-73 Pos=-92	AAGAAAACGTTTTATT** TTGTAAACGCTTTTAT	Pos=-46	TTTTTCTAATTTTTTC
Virulence								
SAK_1892	-	Sialidase N-Ter	-3,77	7,66E-04			Pos=-77	TTTTCAATATATTTTT
SAK_1891	-	Sialidase	-2,17	6,35E-03				
Stress								
SAK_1233	*cidA*	Protéine de la famille LrgA/CidA	-2,75	3,18E-04	Pos=-66	ATGTAAACGTTTCATA	Pos=-118	TTTTTAATTTATTTTT
SAK_1234	*cidB*	Protéine de la famille LrgA/CidA	-2,73	8,95E-06				

DISCUSSION / PERSPECTIVES

S. agalactiae étant une bactérie capable de s'adapter à divers environnements, nous nous sommes demandé quels étaient les facteurs permettant cette adaptation. Ce travail de thèse s'est focalisé sur le rôle de HPr et CcpA, deux acteurs de la répression catabolique, dans la physiologie et l'adaptation au stress de *S. agalactiae*.

Dans un premier temps, nous avons déterminé que sept protéines possédaient un domaine PRD et pourraient donc être régulées par HPr. Nous avons ensuite cherché à obtenir un mutant délété du gène *ptsH* codant la protéine HPr dans la souche A909 afin d'étudier le rôle de cette protéine. Les différents essais pour construire un mutant de délétion du gène *ptsH* ont été infructueux laissant penser que le gène *ptsH* était essentiel. Cependant, même en surexprimant le gène *ptsH* sous un promoteur inductible sur un site ectopique chromosomique, nous n'avons pas pu déléter le gène *in situ*. Il semblerait donc que ce soit plutôt la difficulté à réaliser des recombinaisons homologues dans cette région chromosomique qui soit à l'origine de l'impossibilité à construire un mutant de délétion. Le gène *ptsH* est entouré en amont par les gènes *nrdH* et *nrdE* et en aval par les gènes *ptsI* (avec lequel il est en opéron) et *gapN*. Les deux premiers sont impliqués dans le métabolisme des nucléotides et les deux suivants dans le métabolisme carboné. Ces quatre gènes ont été décrits par Hooven et al comme des gènes essentiels (Hooven et al., 2016). Il a été possible de déléter le gène *ptsI* dans nos conditions mais seulement en laissant les 135 premiers acides aminés de EI (la privant ainsi de son domaine kinase) pour avoir une boite amont dans le plasmide pG+host1^{ts} qui ne contenait pas *ptsH*. Il semblerait donc que la région autour du gène *ptsH*, et particulièrement la région en amont de *ptsI*, soit très importante à *S. agalactiae* ce qui rend difficile une recombinaison homologue à cet endroit. Pour inactiver l'expression du gène *ptsH* et ainsi pouvoir étudier le régulon d'HPr, il serait intéressant d'avoir recours à d'autres méthodes. Il pourrait être envisagé d'utiliser un ARN interférent pour bloquer la traduction de l'ARN messager de *ptsH*. Cette méthode a déjà été utilisée chez d'autres bactéries et notamment chez *S. aureus* (Good and Stach, 2011; Thompson and Brown, 2021). On pourrait aussi utiliser la méthode CRISPRi pour inhiber la transcription de *ptsH*. Cette méthode a été mise au point chez *S. agalactiae* (Dammann et al., 2021). Elle repose sur la mutation du gène *cas9* sur le chromosome pour empêcher son activité catalytique, puis la transformation de la souche par un plasmide codant notamment un ARNsg (pour « single guide ») ciblant le gène à inhiber et permettant d'empêcher sa transcription. Pour évaluer le rôle des phosphorylations au niveau de l'Histidine 15 et de la Sérine 46, on pourrait introduire les différentes versions du gène *ptsH* (phosphomimétique ou empêchant la phosphorylation)

en ectopique sous le contrôle du promoteur inductible à l'anhydrotétracycline et utiliser le système CRISPRi pour inhiber l'expression du gène *ptsH* WT en utilisant un ARNsg ciblant le promoteur de *ptsH*. Cela permettrait ensuite de réaliser des études transcriptomiques et phosphoprotéomiques.

Dans une deuxième partie de ce travail, nous avons cherché à déterminer s'il y avait une intéraction entre les protéines HPr et CcpA. Nous avons mis en évidence que les acides aminés décrits comme importants dans l'interaction entre CcpA et HPr chez d'autres bactéries étaient bien présents et que les séquences de ces deux protéines étaient conservées par rapport aux autres Firmicutes. Cependant, les expériences de double hybride n'ont pas permis de mettre en évidence d'intéraction entre ces deux protéines. On peut émettre l'hypothèse qu'il s'agit de faux négatifs. En effet, l'obtention de faux négatifs et de faux positifs est un phénomène qui a déjà été mis en évidence dans les systèmes de double hybride chez la levure (Huang and Bader, 2009). Pour étudier la potentielle interaction entre CcpA et HPr, on pourrait réaliser des expériences de résonnance plasmonique de surface (SPR) comme cela a été réalisé chez *S. pyogenes* (DebRoy et al., 2020). Ainsi CcpA serait immobilisée, on injecterait en flux la protéine HPr et l'indice de réfraction serait mesuré. Cette technique aurait pour avantage d'éviter de fusionner la protéine HPr qui est petite à une sous-unité protéique et ainsi de favoriser l'intéraction avec CcpA. De plus, le fait de réaliser cette expérience *in vitro* permettrait de s'affranchir d'éventuelles difficultés d'expression ou d'interaction *in vivo* dans une bactérie à Gram négatif. Pour mettre en évidence le rôle de la phosphorylation au niveau de la Sérine 46 et mettre en évidence une intéraction entre P-Ser-HPr et CcpA de manière indirecte, on pourrait empêcher la phosphorylation de HPr au niveau de la Sérine 46 et réaliser une étude transcriptomique. Pour empêcher la phosphorylation d'HPr au niveau de la Sérine 46, on pourrait déléter le gène *ptsK* (*SAK_0862*) codant l'enzyme HPr kinase/phosphorylase qui permet la phosphorylation au niveau de la Sérine 46 (Reizer et al., 1998). Cependant, les premiers essais réalisés au laboratoire pour déléter ce gène n'ont pas abouti. Chez *S. pyogenes*, comme il n'était pas non plus possible de déléter l'HPr K/P, les auteurs ont décidé de muter la Valine 301 de CcpA qui correspond à la Valine 300 chez *B. megaterium* (connue pour être impliquée dans l'intéraction avec HPr) et ils ont évalué l'impact de cette mutation sur le transcriptome. Ils ont ainsi montré que certains gènes régulés par CcpA dépendaient d'HPr et d'autres ne nécessitaient pas HPr. On pourrait donc envisager de muter CcpA de *S. agalactiae* au niveau de ce même acide aminé puis de réaliser des études trancriptomiques. En plus d'une potentielle interaction entre P-Ser-HPr et CcpA, il pourrait exister d'autres

mécanismes de régulation de CcpA, que ce soit au niveau de sa transcription, sa traduction, ou bien sa capacité à se fixer à une séquence consensus via modifications post-traductionnelles. Concernant le dernier point, il a été exemple été démontré chez *S. aureus* que la protéine Stk1, une sérine/thréonine kinase affectant différentes voies telles que métabolisme de la paroi cellulaire, la sensibilité aux antibiotiques et la régulation de la virulence, était capable de phosphoryler les thréonines 18 et 33 de CcpA. La phosphorylation de ces acides aminés entraine une répulsion électrostatique avec l'ADN empêchant ainsi la fixation de CcpA à l'ADN (Leiba et al., 2012). En revanche, une étude réalisée par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse chez *S. agalactiae* afin d'identifier les Sérine / Thréonine phosphopeptides phosphorylés par Stk1 n'a pas montré que CcpA était un susbtrat de Stk1 (Silvestroni et al., 2009).

Enfin, dans la troisième partie de ce travail, nous avons déterminé le rôle de CcpA dans l'adaptation et la physiologie de *S. agalactiae*. Nous avons pu obtenir un mutant A909Δ*ccpA* qui présentait un retard de croissance montrant par là que ce gène n'était pas essentiel dans nos conditions de culture mais jouait un rôle important dans la physiologie de la bactérie. Les données de transcriptome ont appuyé ce résultat puisqu'elles ont montré que CcpA régulait 13,5 % du génome. De manière attendue, CcpA régule majoritairement des gènes impliqués dans le métabolisme carboné et notamment de nombreux transporteurs de sucres. Nous avons ensuite confirmé le site *cre* permettant la fixation de CcpA à l'ADN par retard sur gel. Les analyses bioinformatiques ont ensuite montré qu'une partie des gènes étaient régulés de manière directe par un site *cre*. Nous avons aussi cherché la présence du site *cre2* identifié chez *S. suis* et qui pourrait expliquer la régulation de certains gènes par CcpA, sans pour autant qu'il n'y ait de site *cre* dans leurs régions régulatrices. Sur les 188 gènes qui ont un site *cre2*, 26 étaient régulés dans notre transcriptome réalisé en mi-phase exponentielle de croissance. Les gènes possédant un site *cre2* mais non régulés par CcpA dans cette condition pourraient l'être en phase stationnaire. En effet, chez *S. suis* il a été montré que davantage de sites *cre2* étaient fixés par CcpA en phase stationnaire plutôt qu'en phase exponentielle contrairement à ce qui est observé pour le site *cre*. Parmi les gènes possédant un site *cre2*, 10 étaient régulés en phase exponentielle et 16 étaient régulés en phase stationnaire (Willenborg et al., 2014). On pourrait ainsi réitérer l'analyse des transcrits par RNAseq dans les mêmes conditions mais en phase stationnaire pour identifier si davantage de gènes possédant un site *cre2* sont des cibles de CcpA dans cette phase de croissance. Concernant les gènes différentiellement exprimés dans le mutant A909Δ*ccpA* mais ne possédant pas de site *cre*, on peut supposer que

certains sont régulés par des régulateurs eux-mêmes, directement ou non, régulés par CcpA. On note notamment que le gène *SAK_2012* qui code le régulateur MrvR est réprimé de manière directe par CcpA. Il possède deux sites *cre* et un site *cre2*. Une récente étude a montré que ce régulateur contrôle 16,8 % des gènes en début de phase exponentielle de croissance dans la souche CNCTC 10/84 (serotype V) de *S. agalactiae* et est impliqué dans plusieurs aspects de la virulence (Dammann et al., 2021).

Une étude par RMN des métabolites impliqués dans les métabolismes du carbone et des acides aminés a montré une plus forte production de formate, d'acétate et de fumarate par la souche A909Δ*ccpA*. Cela était cohérent avec le transcriptome puisque les enzymes impliquées dans la production de formate, d'acétate et dans le précurseur du fumarate, l'arginosuccinate sont réprimées par CcpA. La forte production d'acétate et de fumarate dans la souche A909Δ*ccpA* montre l'intérêt d'intégrer le rôle de CcpA dans une approche plus globale et notamment d'évaluer l'impact de ce régulateur sur le microbiote. En effet, de nombreuses études ont montré le rôle des acides gras à chaine courte (synthétisés par le microbiote intestinal), dont l'acétate est le plus abondant, dans le maintien de la santé de l'Homme (González Hernández et al., 2019). Concernant le fumarate, il a été montré qu'il favorisait l'absorption de lactate par la bactérie ruminale prédominante, *Selenomonas ruminantium* (Martin, 1998). Par ailleurs, le fumarate est un metabolite qui intervient dans la production des acides gras à chaînes courtes par le microbiote intestinal. L'importance de ces molécules produites par le microbiote est capitale pour l'hôte puisqu'ils sont une source d'énergie et participeraient à la régulation neuro-immunoendocrine (den Besten et al., 2013; Silva et al., 2020). CcpA, en modulant la production de métabolites tels que le fumarate, pourrait donc moduler l'interaction de *S. agalactiae* avec le microbiote environnant.

L'analyse RMN quantitative de certains acides aminés présents dans le milieu n'a pas montré de différence significative dans les milieux de culture des souches A909WT et A909Δ*ccpA*. *S. agalactiae* est auxotrophe vis à vis de nombreux acides aminés. Chez la souche NEM316, seules les voies de biosynthèse pour l'alanine, la sérine, la glycine, la glutamine, l'aspartate, l'asparagine et la théonine sont présentes (Glaser et al., 2002). Ainsi, en mesurant les acides aminés du milieu, on s'intéressait aussi bien aux acides aminés qui pourraient être produits qu'aux aminés acidés qui seraient importés. Cependant, les acides aminés sont probablement en quantité excédentaire par rapport aux besoins de la bactérie et c'est potentiellement la raison pour laquelle on ne met pas en évidence de différence dans le milieu. Pour aller plus

loin dans l'analyse, il pourrait être intéressant de reproduire cette analyse RMN avec les contenus intracellulaires des bactéries. C'est ce qui a été réalisé chez *Lysinibacillus sphaericus* pour étudier le métabolome de CcpA (Li et al., 2012).

Notre étude transcriptomique sur CcpA a permis de montrer que CcpA régulait une quinzaine de gènes putativement ou déjà démontrés comme impliqués dans la réponse au stress. Certains d'entre eux sont directement régulés par CcpA comme par exemple *SAK_0348*, *SAK_1689* et *SAK_0902* dont la régulation par CcpA a été confirmée par fusion transcriptionnelle.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés au gène *SAK_1689* très fortement réprimé par CcpA et possédant un site *cre*. Ce gène, codant une protéine Usp putative, est surexprimé en condition de stress oxydatif mais pas en stress acide. Nous avons montré que *SAK_1689* était plus fortement induit en stress oxydatif dans la souche A909Δ*ccpA* que dans la souche A909WT et que le double mutant A909Δ*ccpA*Δ*SAK_1689* présentait une meilleure survie que la souche A909Δ*ccpA* montrant ainsi que CcpA s'opposait à une sur-production délétère de SAK_1689 en condition de stress oxydatif. Des études réalisées *in vitro* chez *E. coli* et *M. tuberculosis* ont montré que la surexpression de protéines Usp impactait négativement la croissance de ces bactéries (Nyström and Neidhardt, 1996; Drumm et al., 2009), et était, chez *E. coli*, à l'origine d'une modification du profil d'expression protéique et d'une modification du point isoélectrique de plusieurs protéines (Nyström and Neidhardt, 1996). Pour poursuivre l'étude de la régulation de ce gène, il serait intéressant d'identifier l'activateur de ce gène en condition de stress. On pourrait réaliser une banque de transposons dans la souche A909Δ*ccpA* (qui surexprime *SAK_1689*) dans laquelle on aurait introduit un plasmide possédant le gène *lacZ* sous le contrôle du promoteur de *SAK_1689* et ainsi mettre en évidence le(s) gène(s) impliqués dans sa régulation (Figure 39).

Nous avons mis en évidence une autre protéine Usp codée par le gène *SAK_1741* chez *S. agalactiae* présentant 67 % d'identité avec SAK_1689. Le gène *SAK_1741*, en opéron avec *SAK_1742*, ne possède pas de site *cre* ou *cre2* et n'est pas régulé par CcpA dans notre transcriptome. Cependant, nous avons montré que ce gène, très peu exprimé à pH neutre, était surexprimé dans la souche sauvage en condition de stress acide mais pas dans la souche Δ*ccpA*. Il semblerait donc que CcpA active, de manière directe ou non, un activateur (encore inconnu) de ce gène en condition de stress acide. En condition de biofilm, nous avons pu observer que le mutant A909Δ*ccpA* formait moins de biofilm tout comme le mutant A909-

SAK_1741^{Y5STOP}. Il serait intéressant d'évaluer si la capacité amoindrie du mutant A909Δ*ccpA* à former du biofilm est dépendante du gène *SAK_1741*. Ainsi on pourrait commencer par mesurer l'expression de ce gène en condition de biofilm chez la souche sauvage pour voir si son expression est induite. Une autre possibilié serait d'exprimer le gène *SAK_1741* de manière constitutive dans la souche mutante A909Δ*ccpA* et d'observer si cela restaure (au moins partiellement) sa capacité à former du biofilm.

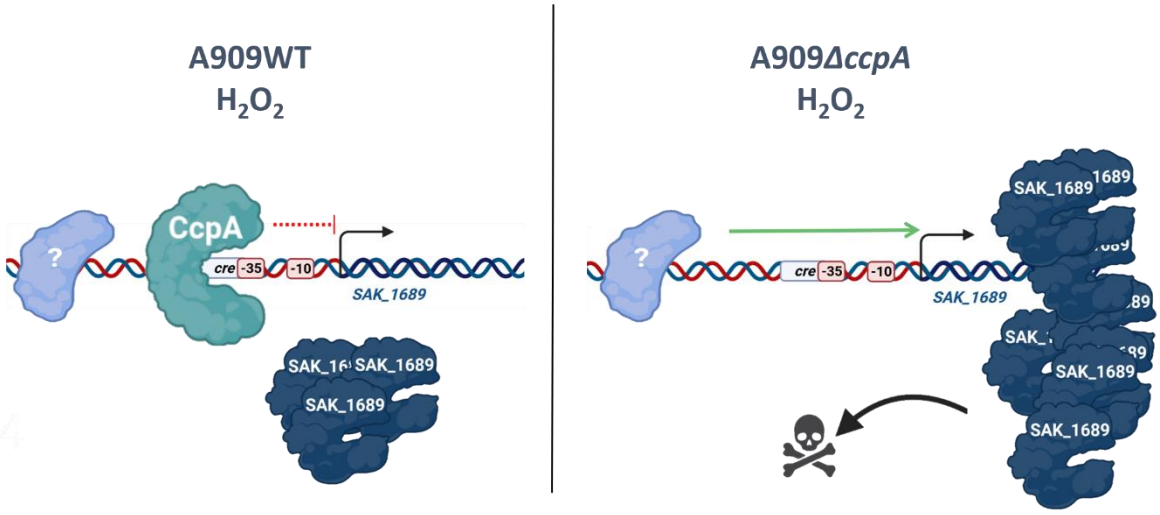


Figure 39. Modèle de régulation de l'expression du gène *SAK_1689* en stress oxydatif.
CcpA réprime l'expression de *SAK_1689* via un site *cre*. En stress oxydatif, un activateur inconnu permet l'expression du gène *SAK_1689* tandis que CcpA empêche une surexpression trop importante du gène qui serait délétère pour la bactérie. En rouge : inhibition transcriptionnelle et en vert : activation transcriptionnelle. Schéma réalisé sur le site Biorender (https://biorender.com/).

Nous avons mis en évidence que CcpA favorisait la résistance à divers stress rencontrés lors de la colonisation et / ou l'infection. A ce jour nous n'avons pas encore trouvé de cibles de CcpA qui pourraient expliquer ces phénotypes. CcpA régulant une part importante du génome, on peut cependant supposer que la sensibilité aux stress observée pour le mutant de délétion de *ccpA* a une cause multifactorielle. Aussi, il serait intéressant de faire de nouvelles études transcriptomiques avec les souches A909WT et A909Δ*ccpA* en condition de stress pour identifier, dans ces conditions, l'ensemble des gènes régulés par CcpA. Par exemple, la protéine ClpP impliquée dans la résistance au stress thermique et oxydatif possède un site *cre* en amont de son promoteur et n'est pas régulée dans notre transcriptome mais pourrait être activée par CcpA en condition de stress.

Parmi les gènes régulés par CcpA et potentiellement impliqués dans la réponse au stress, nous nous sommes aussi intéressés au gène *SAK_0902* codant une putative ARN hélicase ATP dépendante à motif DEAD annotée CshA. Après avoir montré que cette protéine possédait

bien tous les motifs caractéristiques d'une ARN hélicase ATP dépendante à motif DEAD, nous avons évalué la résistance du mutant A909Δ*SAK_0902* aux stress éthanol, de température et antibiotique. Ces expériences n'ont pas mis en évidence un phénotype de résistance au stress associé à la protéine SAK_0902. Cependant, le génome de *S. agalactiae* présente un gène, *SAK_0361*, codant une protéine présentant 37 % d'identité et 58 % de similarité avec SAK_0902 et non régulé par CcpA dans le transcriptome. Il pourrait exister une redondance fonctionnelle entre SAK_0902 et SAK_0361. Il serait donc intéressant de reproduire les expériences de stress avec un double mutant A909Δ*SAK_0902*Δ*SAK_0361*. Chez *S. aureus*, la protéine CshA favorise la dégradation de l'ARNm de *agrBDCA*, un opéron impliqué dans le quorum sensing (Redder and Linder, 2012). Chez *S. agalactiae* il existe un système putatif de quorum sensing appelé *rgf*BDAC dont les gènes codent des protéines présentant des identités de séquence avec celles de *S. aureus* (Spellerberg et al., 2002). Il pourrait donc être intéressant de bloquer la transcription de *S. agalactiae* par la rifampicine chez les souches A909WT et A909Δ*SAK_0902* et ensuite de réaliser l'analyse de la stabilité des transcrits par PCR quantitative ou Northern blot pour identifer si SAK_0902 est impliquée dans la dégradation de l'ARNm de ces gènes comme cela a été proposé pour *S. aureus* (Redder and Linder, 2012). Comme le quorum sensing est impliqué dans la dispersion de biofilm, il pourrait être aussi intéressant d'évaluer la dispersion du biofilm en cuve à flux continu chez le mutant A909Δ*SAK_0902*.

CcpA permettant la résistance au stress acide, oxydant, dans les macrophages et dans la croissance à 40°C, qui sont des conditions retrouvées dans l'hôte, nous pourrions poursuivre cette étude en déterminant le rôle de cette protéine dans la virulence et la colonisation. Nous pourrions notamment tester la capacité du mutant A909Δ*ccpA* à coloniser le vagin en utilisant un modèle murin pour lequel un protocole de colonisation vaginale a déjà été établi chez *S. agalactiae* (Patras and Doran, 2016). Si un rôle de CcpA était mis en évidence dans la colonisation et / ou la virulence, cela pourrait faire de CcpA une cible thérapeutique potentielle comme cela a été démontré chez *S. aureus* (Huang et al., 2020). Cependant, comme la séquence protéique de CcpA chez *S. agalactiae* est proche de celle d'autres Firmicutes, on peut supposer qu'il serait difficile de ne cibler que la protéine de *S. agalactiae* et donc pourrait perturber le microbiote environnant chez l'hôte. Par exemple, la molécule bis(4-hydroxy-3-méthylphényl) sulphide bloquant l'activité de CcpA de *S. aureus* empêche aussi l'expression de gènes activés par CcpA chez *B. subtilis* (Huang et al., 2020).

CONCLUSION

S. agalactiae est une cause majeure d'infections chez le nouveau-né. De plus, les infections dues à ce pathogène opportuniste sont en constante augmentation chez l'adulte. Cette étude s'inscrit dans l'une des thématiques de recherche de l'équipe Bactéries et Risque Materno-Fœtal portant sur l'implication du métabolisme carboné dans l'adaptation de *S. agalactiae* à ses différentes niches écologiques. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux rôles de CcpA et HPr, deux acteurs de la répression catabolique, dans la physiologie et l'adaptation de *S. agalactiae*.

Nous n'avons pas obtenu de mutant de délétion de *ptsH* probablement à cause de l'importance des gènes entourant *ptsH* chez *S. agalactiae*. De plus, bien que les protéines CcpA et HPr soient conservées par rapport aux autres Firmicutes et possèdent des acides aminés considérés comme importants dans l'interaction entre ces deux protéines, nous n'avons pas mis en évidence d'interaction entre ces protéines, potentiellement à cause des limites de la technique de double hybride utilisée. Enfin, nous avons étudié le rôle de CcpA, un régulateur majeur impliqué dans la répression catabolique. Nous avons mis en évidence que cette protéine contrôlait 13,5 % des gènes en mi-phase exponentielle de croissance, dont 1/3 grâce à sa fixation à un site *cre* sur l'ADN. Nous avons montré que CcpA régulait majoritairement des gènes impliqués dans le métabolisme du carbone mais qu'elle régulait aussi des gènes impliqués dans la réponse au stress. Nous avons mis en évidence que la protéine CcpA était essentielle dans la résistance à divers stress retrouvés lors de la colonisation et l'infection de l'hôte. CcpA régulant de nombreux gènes, la résistance qu'elle confère à divers stress est probablement mutltifactorielle. Nous nous sommes intéressés aux rôles de plusieurs protéines encore non étudiées, régulées par CcpA et potentiellement impliquées dans la réponse au stress. Nous n'avons pas mis en évidence de rôle dans les stress de SAK_0902, une hélicase à ARN à motif DEAD, activée par CcpA via un site *cre*. En revanche, nous avons montré que CcpA protégeait *S. agalactiae* d'une surexpression délétère de SAK_1689, une protéine universelle de stress, en condition de stress oxydatif en réprimant son expression via un site *cre*. Par ailleurs nous avons montré que SAK_1741, une protéine analogue à SAK_1689 était surexprimée, en condition de stress acide et qu'elle favorisait la formation de biofilm.

BIBLIOGRAPHIE

Ahn, S.-J., Qu, M.-D., Roberts, E., Burne, R. A., and Rice, K. C. (2012). Identification of the *Streptococcus mutans* LytST two-component regulon reveals its contribution to oxidative stress tolerance. *BMC Microbiol* 12, 187. doi: 10.1186/1471-2180-12-187.

Almengor, A. C., Kinkel, T. L., Day, S. J., and McIver, K. S. (2007). The catabolite control protein CcpA binds to Pmga and influences expression of the virulence regulator Mga in the Group A streptococcus. *J Bacteriol* 189, 8405–8416. doi: 10.1128/JB.01038-07.

Antunes, A., Camiade, E., Monot, M., Courtois, E., Barbut, F., Sernova, N. V., et al. (2012). Global transcriptional control by glucose and carbon regulator CcpA in *Clostridium difficile*. *Nucleic Acids Research* 40, 10701–10718. doi: 10.1093/nar/gks864.

Areschoug, T., Stålhammar-Carlemalm, M., Karlsson, I., and Lindahl, G. (2002). Streptococcal β Protein Has Separate Binding Sites for Human Factor H and IgA-Fc. *Journal of Biological Chemistry* 277, 12642–12648. doi: 10.1074/jbc.M112072200.

Armistead, B., Quach, P., Snyder, J. M., Santana-Ufret, V., Furuta, A., Brokaw, A., et al. (2021). Hemolytic Membrane Vesicles of Group B *Streptococcus* Promote Infection. *J Infect Dis* 223, 1488–1496. doi: 10.1093/infdis/jiaa548.

Aymeric, L., and Dramsi, S. (2018). *Streptococcus gallolyticus* : Un pathogène opportuniste associé au cancer du côlon. *Med Sci (Paris)* 34, 784–787. doi: 10.1051/medsci/2018197.

Ballal, A., and Manna, A. C. (2010). Control of thioredoxin reductase gene (*trxB*) transcription by SarA in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 192, 336–345. doi: 10.1128/JB.01202-09.

Beckmann, C., Waggoner, J. D., Harris, T. O., Tamura, G. S., and Rubens, C. E. (2002). Identification of Novel Adhesins from Group B Streptococci by Use of Phage Display Reveals that C5a Peptidase Mediates Fibronectin Binding. *Infect Immun* 70, 2869–2876. doi: 10.1128/IAI.70.6.2869-2876.2002.

Beitelshees, M., Hill, A., Jones, C. H., and Pfeifer, B. A. (2018). Phenotypic Variation during Biofilm Formation: Implications for Anti-Biofilm Therapeutic Design. *Materials (Basel)* 11, 1086. doi: 10.3390/ma11071086.

Bingen, E., Denamur, E., Lambert-Zechovsky, N., Aujard, Y., Brahimi, N., Geslin, P., et al. (1992). Analysis of DNA restriction fragment length polymorphism extends the evidence for breast milk transmission in *Streptococcus agalactiae* late-onset neonatal infection. *J Infect Dis* 165, 569–573. doi: 10.1093/infdis/165.3.569.

Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S. D., and Maguin, E. (1993). High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 175, 3628–3635.

Bizzini, A., Entenza, J. M., and Moreillon, P. (2007). Loss of penicillin tolerance by inactivating the carbon catabolite repression determinant CcpA in *Streptococcus gordonii*. *J Antimicrob Chemother* 59, 607–615. doi: 10.1093/jac/dkm021.

Blencke, H.-M., Homuth, G., Ludwig, H., Mäder, U., Hecker, M., and Stülke, J. (2003). Transcriptional profiling of gene expression in response to glucose in *Bacillus subtilis*: regulation of the central metabolic pathways. *Metabolic Engineering* 5, 133–149. doi: 10.1016/S1096-7176(03)00009-0.

Booth, I. R. (2002). Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Int J*

Food Microbiol 78, 19–30. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00239-8.

Boris, S., and Barbés, C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection* 2, 543–546. doi: 10.1016/S1286-4579(00)00313-0.

Botelho, A. C. N., Ferreira, A. F. M., Fracalanzza, S. E. L., Teixeira, L. M., and Pinto, T. C. A. (2018). A Perspective on the Potential Zoonotic Role of *Streptococcus agalactiae*: Searching for a Missing Link in Alternative Transmission Routes. *Frontiers in Microbiology* 9. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00608 [Accessed August 29, 2022].

Bryan, J. D., and Shelver, D. W. (2009). *Streptococcus agalactiae* CspA Is a Serine Protease That Inactivates Chemokines. *Journal of Bacteriology* 191, 1847–1854. doi: 10.1128/JB.01124-08.

Burne, R. A., Wen, Z. T., Chen, Y.-Y. M., and Penders, J. E. C. (1999). Regulation of Expression of the Fructan Hydrolase Gene of *Streptococcus mutans* GS-5 by Induction and Carbon Catabolite Repression. *J Bacteriol* 181, 2863–2871.

Buscetta, M., Papasergi, S., Firon, A., Pietrocola, G., Biondo, C., Mancuso, G., et al. (2014). FbsC, a Novel Fibrinogen-binding Protein, Promotes *Streptococcus agalactiae*-Host Cell Interactions. *Journal of Biological Chemistry* 289, 21003–21015. doi: 10.1074/jbc.M114.553073.

Cabiscol, E., Tamarit, J., and Ros, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3, 3–8.

Cai, M., Williams, D. C., Wang, G., Lee, B. R., Peterkofsky, A., and Clore, G. M. (2003). Solution Structure of the Phosphoryl Transfer Complex between the Signal-transducing Protein IIAGlucose and the Cytoplasmic Domain of the Glucose Transporter IICBGlucose of the *Escherichia coli* Glucose Phosphotransferase System. *J. Biol. Chem.* 278, 25191–25206. doi: 10.1074/jbc.M302677200.

Carapetis, J. R., Steer, A. C., Mulholland, E. K., and Weber, M. (2005). The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet Infectious Diseases* 5, 685–694. doi: 10.1016/S1473-3099(05)70267-X.

Carlin, A. F., Lewis, A. L., Varki, A., and Nizet, V. (2007). Group B Streptococcal Capsular Sialic Acids Interact with Siglecs (Immunoglobulin-Like Lectins) on Human Leukocytes. *J Bacteriol* 189, 1231–1237. doi: 10.1128/JB.01155-06.

Cheng, Q., Stafslien, D., Purushothaman, S. S., and Cleary, P. (2002). The Group B Streptococcal C5a Peptidase Is Both a Specific Protease and an Invasin. *Infect Immun* 70, 2408–2413. doi: 10.1128/IAI.70.5.2408-2413.2002.

Chi, Y. H., Koo, S. S., Oh, H. T., Lee, E. S., Park, J. H., Phan, K. A. T., et al. (2019). The Physiological Functions of Universal Stress Proteins and Their Molecular Mechanism to Protect Plants From Environmental Stresses. *Front. Plant Sci.* 10, 750. doi: 10.3389/fpls.2019.00750.

Choi, S.-K., and Saier, M. H. (2005). Regulation of sigL expression by the catabolite control protein CcpA involves a roadblock mechanism in *Bacillus subtilis*: potential connection between carbon and nitrogen metabolism. *J. Bacteriol.* 187, 6856–6861. doi: 10.1128/JB.187.19.6856-6861.2005.

Christie, K., Atkins, N., and Munch-Petersen, E. (1944). A note on a lytic phenomenon shown by Group B streptococci. *Aust J Exp*

Biol Med 22, 197–200. doi: 10.1038/icb.1944.26.

Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N. K., and Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* 367, 17–37. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.019.

Cornacchione, Scaringi, Fettucciari, Rosati, Sabatini, Orefici, et al. (1998). Group B streptococci persist inside macrophages. *Immunology* 93, 86–95. doi: 10.1046/j.1365-2567.1998.00402.x.

Cotter, P. D., and Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 429–453, table of contents. doi: 10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003.

Creti, R., Imperi, M., Berardi, A., Lindh, E., Alfarone, G., Pataracchia, M., et al. (2021). Invasive Group B Streptococcal Disease in Neonates and Infants, Italy, Years 2015-2019. *Microorganisms* 9, 2579. doi: 10.3390/microorganisms9122579.

Cumley, N. J., Smith, L. M., Anthony, M., and May, R. C. (2012). The CovS/CovR acid response regulator is required for intracellular survival of group B *Streptococcus* in macrophages. *Infect Immun* 80, 1650–1661. doi: 10.1128/IAI.05443-11.

Da Cunha, V., Davies, M. R., Douarre, P.-E., Rosinski-Chupin, I., Margarit, I., Spinali, S., et al. (2015). Corrigendum: *Streptococcus agalactiae* clones infecting humans were selected and fixed through the extensive use of tetracycline. *Nat Commun* 6, 6108. doi: 10.1038/ncomms7108.

Dagkessamanskaia, A., Moscoso, M., Hénard, V., Guiral, S., Overweg, K., Reuter, M., et al. (2004). Interconnection of competence, stress and CiaR regulons in *Streptococcus pneumoniae*: competence triggers stationary phase autolysis of ciaR mutant cells. *Mol Microbiol* 51, 1071–1086. doi: 10.1111/j.1365-2958.2003.03892.x.

Dammann, A. N., Chamby, A. B., Catomeris, A. J., Davidson, K. M., Tettelin, H., Pijkeren, J.-P. van, et al. (2021). Genome-Wide fitness analysis of *group B Streptococcus* in human amniotic fluid reveals a transcription factor that controls multiple virulence traits. *PLOS Pathogens* 17, e1009116. doi: 10.1371/journal.ppat.1009116.

DebRoy, S., Aliaga-Tobar, V., Galvez, G., Arora, S., Liang, X., Horstmann, N., et al. (2020). Genome-wide analysis of in vivo CcpA binding with and without its key co-factor HPr in the major human pathogen group A *Streptococcus*. *Mol Microbiol*, mmi.14667. doi: 10.1111/mmi.14667.

Delannoy, C. M. J., Crumlish, M., Fontaine, M. C., Pollock, J., Foster, G., Dagleish, M. P., et al. (2013). Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC Microbiol* 13, 41. doi: 10.1186/1471-2180-13-41.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., and Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 54, 2325–2340. doi: 10.1194/jlr.R036012.

Deshayes de Cambronne, R., Fouet, A., Picart, A., Bourrel, A.-S., Anjou, C., Bouvier, G., et al. (2021). CC17 group B *Streptococcus* exploits integrins for neonatal meningitis development. *Journal of Clinical Investigation* 131, e136737. doi: 10.1172/JCI136737.

Deutscher, J., Francke, C., and Postma, P. W. (2006). How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, 939–1031. doi: 10.1128/MMBR.00024-06.

Deutscher, J., Herro, R., Bourand, A., Mijakovic, I., and Poncet, S. (2005). P-Ser-HPr—a link between carbon metabolism and the virulence of some pathogenic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1754, 118–125. doi: 10.1016/j.bbapap.2005.07.029.

Deutscher, J., Kessler, U., and Hengstenberg, W. (1985). Streptococcal phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system: purification and characterization of a phosphoprotein phosphatase which hydrolyzes the phosphoryl bond in seryl-phosphorylated histidine-containing protein. *J Bacteriol* 163, 1203–1209. doi: 10.1128/JB.163.3.1203-1209.1985.

Deutscher, J., Pevec, B., Beyreuther, K., Kiltz, H. H., and Hengstenberg, W. (1986). Streptococcal phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system: amino acid sequence and site of ATP-dependent phosphorylation of HPr. *Biochemistry* 25, 6543–6551. doi: 10.1021/bi00369a031.

Deutscher, J., Reizer, J., Fischer, C., Galinier, A., Saier, M. H., and Steinmetz, M. (1994). Loss of protein kinase-catalyzed phosphorylation of HPr, a phosphocarrier protein of the phosphotransferase system, by mutation of the *ptsH* gene confers catabolite repression resistance to several catabolic genes of Bacillus subtilis. *J Bacteriol* 176, 3336–3344.

Devaux, L., Sleiman, D., Mazzuoli, M.-V., Gominet, M., Lanotte, P., Trieu-Cuot, P., et al. (2018). Cyclic di-AMP regulation of osmotic homeostasis is essential in Group B Streptococcus. *PLoS Genet* 14, e1007342. doi: 10.1371/journal.pgen.1007342.

Di Palo, B., Rippa, V., Santi, I., Brettoni, C., Muzzi, A., Metruccio, M. M. E., et al. (2013). Adaptive response of Group B streptococcus to high glucose conditions: new insights on the CovRS regulation network. *PLoS One* 8, e61294. doi: 10.1371/journal.pone.0061294.

Dong, M., Yang, X., Liu, L., Zhou, Z., Deng, L., Zhong, Z., et al. (2022). Role of Hfq in glucose utilization, biofilm formation and quorum sensing system in *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Lett* 44, 845–855. doi: 10.1007/s10529-022-03262-x.

Dramsi, S., Caliot, E., Bonne, I., Guadagnini, S., Prévost, M.-C., Kojadinovic, M., et al. (2006). Assembly and role of pili in group B streptococci. *Mol Microbiol* 60, 1401–1413. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05190.x.

Dramsi, S., Dubrac, S., Konto-Ghiorghi, Y., Da Cunha, V., Couvé, E., Glaser, P., et al. (2012). Rga, a RofA-like regulator, is the major transcriptional activator of the PI-2a pilus in *Streptococcus agalactiae*. *Microb Drug Resist* 18, 286–297. doi: 10.1089/mdr.2012.0005.

Drumm, J. E., Mi, K., Bilder, P., Sun, M., Lim, J., Bielefeldt-Ohmann, H., et al. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* Universal Stress Protein Rv2623 Regulates Bacillary Growth by ATP-Binding: Requirement for Establishing Chronic Persistent Infection. *PLOS Pathogens* 5, e1000460. doi: 10.1371/journal.ppat.1000460.

Dufresne, K., Podskalniy, V. A., Herfst, C. A., Lovell, G. F. M., Lee, I. S., DeJong, E. N., et al. (2022). Glucose Mediates Niche-Specific Repression of *Staphylococcus aureus* Toxic Shock Syndrome Toxin-1 through the Activity of CcpA in the Vaginal Environment. *Journal of Bacteriology* 0, e00269-22. doi: 10.1128/jb.00269-22.

D'Urzo, N., Martinelli, M., Pezzicoli, A., De Cesare, V., Pinto, V., Margarit, I., et al. (2014). Acidic pH Strongly Enhances *In Vitro* Biofilm Formation by a Subset of Hypervirulent ST-17 *Streptococcus agalactiae* Strains. *Appl Environ Microbiol* 80, 2176–2185. doi: 10.1128/AEM.03627-13.

Elliott, J. A., Facklam, R. R., and Richter, C. B. (1990). Whole-Cell Protein Patterns of Nonhemolytic Group B, Type Ib, Streptococci Isolated from Humans, Mice, Cattle, Frogs, and Fish. *J Clin Microbiol* 28, 628–630.

Erill, I., Campoy, S., and Barbé, J. (2007). Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* 31, 637–656. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00082.x.

Evans, J. J., Bohnsack, J. F., Klesius, P. H., Whiting, A. A., Garcia, J. C., Shoemaker, C. A., et al. (2008). Phylogenetic relationships among Streptococcus agalactiae isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. *Journal of Medical Microbiology* 57, 1369–1376. doi: 10.1099/jmm.0.47815-0.

Farley, M. M. (2001). Group B Streptococcal Disease in Nonpregnant Adults. *CLIN INFECT DIS* 33, 556–561. doi: 10.1086/322696.

Fasnacht, M., and Polacek, N. (2021). Oxidative Stress in Bacteria and the Central Dogma of Molecular Biology. *Frontiers in Molecular Biosciences* 8. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2021.671037 [Accessed March 24, 2022].

Filleron, A., Lombard, F., Jacquot, A., Jumas-Bilak, E., Rodière, M., Cambonie, G., et al. (2014). Group B streptococci in milk and late neonatal infections: an analysis of cases in the literature. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 99, F41-47. doi: 10.1136/archdischild-2013-304362.

Fischer, A., Liljander, A., Kaspar, H., Muriuki, C., Fuxelius, H.-H., Bongcam-Rudloff, E., et al. (2013). Camel *Streptococcus agalactiae* populations are associated with specific disease complexes and acquired the tetracycline resistance gene tetM via a Tn916-like element. *Vet Res* 44, 86. doi: 10.1186/1297-9716-44-86.

Fleming, E., Lazinski, D. W., and Camilli, A. (2015). Carbon catabolite repression by seryl phosphorylated HPr is essential to *Streptococcus pneumoniae* in carbohydrate-rich environments. *Mol Microbiol* 97, 360–380. doi: 10.1111/mmi.13033.

Français, M., Carlin, F., Broussolle, V., and Nguyen-Thé, C. (2019). *Bacillus cereus cshA* Is Expressed during the Lag Phase of Growth and Serves as a Potential Marker of Early Adaptation to Low Temperature and pH. *Appl Environ Microbiol* 85, e00486-19. doi: 10.1128/AEM.00486-19.

Franciosi, R. A., Knostman, J. D., and Zimmerman, R. A. (1973). Group B streptococcal neonatal and infant infections. *The Journal of Pediatrics* 82, 707–718. doi: 10.1016/S0022-3476(73)80604-3.

Freestone, P., Nyström, T., Trinei, M., and Norris, V. (1997). The universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stasis. *J Mol Biol* 274, 318–324. doi: 10.1006/jmbi.1997.1397.

Freney, J., and Riegel, P. (2019). *Précis de bactériologie clinique*. 3e éd. Paris: Éditions Eska.

Fujita, Y. (2009). Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 245–259. doi: 10.1271/bbb.80479.

Galinier, A. (2018). La répression catabolique ou comment les bactéries choisissent leurs sucres préférés. *Med Sci (Paris)* 34, 531–539. doi: 10.1051/medsci/20183406012.

Galinier, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.-C., Jaquinod, M., Stülke, J., Deutscher, J., et al. (1997). The *Bacillus subtilis crh* gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences 94, 8439–8444. doi: 10.1073/pnas.94.16.8439.

Gao, X.-Y., Zhi, X.-Y., Li, H.-W., Klenk, H.-P., and Li, W.-J. (2014). Comparative Genomics of the Bacterial Genus *Streptococcus* Illuminates Evolutionary Implications of Species Groups. *PLOS ONE* 9, e101229. doi: 10.1371/journal.pone.0101229.

Garcia De Gonzalo, C. V., Denham, E. L., Mars, R. A. T., Stülke, J., van der Donk, W. A., and van Dijl, J. M. (2015). The Phosphoenolpyruvate:Sugar Phosphotransferase System Is Involved in Sensitivity to the Glucosylated Bacteriocin Sublancin. *Antimicrob Agents Chemother* 59, 6844–6854. doi: 10.1128/AAC.01519-15.

Gasc, A. M., Sicard, N., Claverys, J. P., and Sicard, A. M. (1980). Lack of SOS repair in *Streptococcus pneumoniae*. *Mutat Res* 70, 157–165. doi: 10.1016/0027-5107(80)90155-4.

Gera, K., Le, T., Jamin, R., Eichenbaum, Z., and McIver, K. S. (2014). The Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System in Group A *Streptococcus* Acts To Reduce Streptolysin S Activity and Lesion Severity during Soft Tissue Infection. *Infect Immun* 82, 1192–1204. doi: 10.1128/IAI.01271-13.

Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., et al. (2002). Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular Microbiology* 45, 1499–1513. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03126.x.

Gonçalves, B. P., Procter, S. R., Paul, P., Chandna, J., Lewin, A., Seedat, F., et al. (2022). Group B streptococcus infection during pregnancy and infancy: estimates of regional and global burden. *The Lancet Global Health* 10, e807–e819. doi: 10.1016/S2214-109X(22)00093-6.

González Hernández, M. A., Canfora, E. E., Jocken, J. W. E., and Blaak, E. E. (2019). The Short-Chain Fatty Acid Acetate in Body Weight Control and Insulin Sensitivity. *Nutrients* 11, 1943. doi: 10.3390/nu11081943.

Good, L., and Stach, J. E. M. (2011). Synthetic RNA Silencing in Bacteria – Antimicrobial Discovery and Resistance Breaking. *Front Microbiol* 2, 185. doi: 10.3389/fmicb.2011.00185.

Görke, B., and Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6, 613–624. doi: 10.1038/nrmicro1932.

Gösseringer, R., Küster, E., Galinier, A., Deutscher, J., and Hillen, W. (1997). Cooperative and non-cooperative DNA binding modes of catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium* result from sensing two different signals11Edited by T. Richmond. *Journal of Molecular Biology* 266, 665–676. doi: 10.1006/jmbi.1996.0820.

Graux, E., Hites, M., Martiny, D., Maillart, E., Delforge, M., Melin, P., et al. (2021). Invasive group B *Streptococcus* among non-pregnant adults in Brussels-Capital Region, 2005–2019. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 40, 515–523. doi: 10.1007/s10096-020-04041-0.

Grundy, F. J., Turinsky, A. J., and Henkin, T. M. (1994). Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA. *J Bacteriol* 176, 4527–4533.

Gustavsson, N., Diez, . A., and Nyström, T. (2002). The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage. *Molecular Microbiology* 43, 107–117. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.02720.x.

Gutekunst, H., Eikmanns, B. J., and Reinscheid, D. J. (2004). The Novel Fibrinogen-Binding Protein FbsB Promotes *Streptococcus agalactiae* Invasion into Epithelial Cells. *Infect Immun* 72, 3495–3504. doi: 10.1128/IAI.72.6.3495-3504.2004.

Ha, J.-H., Hauk, P., Cho, K., Eo, Y., Ma, X., Stephens, K., et al. (2018). Evidence of link between quorum sensing and sugar metabolism in *Escherichia coli* revealed via cocrystal structures of LsrK and HPr. *Science Advances* 4, eaar7063. doi: 10.1126/sciadv.aar7063.

Hall, J., Adams, N. H., Bartlett, L., Seale, A. C., Lamagni, T., Bianchi-Jassir, F., et al. (2017). Maternal Disease with Group B *Streptococcus* and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clinical Infectious Diseases* 65, S112–S124. doi: 10.1093/cid/cix660.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186, 1–85. doi: 10.1016/0076-6879(90)86093-b.

Hamilton, A., Popham, D. L., Carl, D. J., Lauth, X., Nizet, V., and Jones, A. L. (2006). Penicillin-Binding Protein 1a Promotes Resistance of Group B *Streptococcus* to Antimicrobial Peptides. *Infect Immun* 74, 6179–6187. doi: 10.1128/IAI.00895-06.

Hansen, S. M., Uldbjerg, N., Kilian, M., and Sørensen, U. B. S. (2004). Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J Clin Microbiol* 42, 83–89. doi: 10.1128/JCM.42.1.83-89.2004.

Hardy, L., Cerca, N., Jespers, V., Vaneechoutte, M., and Crucitti, T. (2017). Bacterial biofilms in the vagina. *Res Microbiol* 168, 865–874. doi: 10.1016/j.resmic.2017.02.001.

Harris, T. O., Shelver, D. W., Bohnsack, J. F., and Rubens, C. E. (2003). A novel streptococcal surface protease promotes virulence, resistance to opsonophagocytosis, and cleavage of human fibrinogen. *J Clin Invest* 111, 61–70. doi: 10.1172/JCI16270.

Hausmann, S., Gonzalez, D., Geiser, J., and Valentini, M. (2021). The DEAD-box RNA helicase RhlE2 is a global regulator of *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle and pathogenesis. *Nucleic Acids Research* 49, 6925–6940. doi: 10.1093/nar/gkab503.

Hays, C., Touak, G., Bouaboud, A., Fouet, A., Guignot, J., Poyart, C., et al. (2019). Perinatal hormones favor CC17 group B *Streptococcus* intestinal translocation through M cells and hypervirulence in neonates. *eLife* 8, e48772. doi: 10.7554/eLife.48772.

Homeyer, N., Essigke, T., Meiselbach, H., Ullmann, G. M., and Sticht, H. (2007). Effect of HPr phosphorylation on structure, dynamics, and interactions in the course of transcriptional control. *J Mol Model* 13, 431–444. doi: 10.1007/s00894-006-0162-7.

Hondorp, E. R., and McIver, K. S. (2007). The Mga virulence regulon: infection where the grass is greener. *Molecular Microbiology* 66, 1056–1065. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.06006.x.

Hooven, T. A., Catomeris, A. J., Akabas, L. H., Randis, T. M., Maskell, D. J., Peters, S. E., et al. (2016). The essential genome of *Streptococcus agalactiae*. *BMC Genomics* 17, 406. doi: 10.1186/s12864-016-2741-z.

Horsburgh, M. J., Clements, M. O., Crossley, H., Ingham, E., and Foster, S. J. (2001). PerR Controls Oxidative Stress Resistance and Iron Storage Proteins and Is Required for Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* 69, 3744–3754. doi: 10.1128/IAI.69.6.3744-3754.2001.

Huang, H., and Bader, J. S. (2009). Precision and recall estimates for two-hybrid screens. *Bioinformatics* 25, 372–378. doi: 10.1093/bioinformatics/btn640.

Huang, Q., Zhang, Z., Li, H., Guo, Y., Liao, X., Li, H., et al. (2020). Identification of a Novel Inhibitor of Catabolite Control Protein A from *Staphylococcus aureus*. *ACS Infect. Dis.* 6, 347–354. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00465.

Imlay, J. A., Chin, S. M., and Linn, S. (1988). Toxic DNA Damage by Hydrogen Peroxide Through the Fenton Reaction *in Vivo* and *in Vitro*. *Science* 240, 640–642. doi: 10.1126/science.2834821.

Imperi, M., Pataracchia, M., Alfarone, G., Baldassarri, L., Orefici, G., and Creti, R. (2010). A multiplex PCR assay for the direct identification of the capsular type (Ia to IX) of *Streptococcus agalactiae*. *J Microbiol Methods* 80, 212–214. doi: 10.1016/j.mimet.2009.11.010.

Inácio, J. M., Costa, C., and de Sá-Nogueira, I. (2003). Distinct molecular mechanisms involved in carbon catabolite repression of the arabinose regulon in *Bacillus subtilis*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 2345–2355. doi: 10.1099/mic.0.26326-0.

Irving, S. E., Choudhury, N. R., and Corrigan, R. M. (2021). The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 19, 256–271. doi: 10.1038/s41579-020-00470-y.

Iyer, R., Baliga, N. S., and Camilli, A. (2005). Catabolite control protein A (CcpA) contributes to virulence and regulation of sugar metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 187, 8340–8349. doi: 10.1128/JB.187.24.8340-8349.2005.

Jabbour, N., and Lartigue, M.-F. (2021). An Inventory of CiaR-Dependent Small Regulatory RNAs in Streptococci. *Front Microbiol* 12, 669396. doi: 10.3389/fmicb.2021.669396.

Jabbour, N., Morello, E., Camiade, E., and Lartigue, M.-F. (2022). Biofilm Formation in *Streptococcus agalactiae* Is Inhibited by a Small Regulatory RNA Regulated by the Two-Component System CiaRH. *Microbiol Spectr*, e0063522. doi: 10.1128/spectrum.00635-22.

Jacob, S., Allmansberger, R., Gärtner, D., and Hillen, W. (1991). Catabolite repression of the operon for xylose utilization from *Bacillus subtilis* W23 is mediated at the level of transcription and depends on a cis site in the xylA reading frame. *Molec. Gen. Genet.* 229, 189–196. doi: 10.1007/BF00272155.

Janowiak, B. E., and Griffith, O. W. (2005). Glutathione synthesis in *Streptococcus agalactiae*: one protein accounts for gamma-glutamylcysteine synthetase and glutathione synthetase activities. *J Biol Chem* 280, 11829–11839. doi: 10.1074/jbc.M414326200.

Jiang, S.-M., Cieslewicz, M. J., Kasper, D. L., and Wessels, M. R. (2005). Regulation of virulence by a two-component system in group B *streptococcus*. *J Bacteriol* 187, 1105–1113. doi: 10.1128/JB.187.3.1105-1113.2005.

Jiang, S.-M., Ishmael, N., Dunning Hotopp, J., Puliti, M., Tissi, L., Kumar, N., et al. (2008). Variation in the group B Streptococcus CsrRS regulon and effects on pathogenicity. *J Bacteriol* 190, 1956–1965. doi: 10.1128/JB.01677-07.

Johnson, B. P., Jensen, B. J., Ransom, E. M., Heinemann, K. A., Vannatta, K. M., Egland, K. A., et al. (2009). Interspecies Signaling between *Veillonella atypica* and *Streptococcus gordonii* Requires the Transcription Factor CcpA. *Journal of Bacteriology* 191, 5563–5565. doi: 10.1128/JB.01226-08.

Jones, B. E., Dossonnet, V., Küster, E., Hillen, W., Deutscher, J., and Klevit, R. E. (1997). Binding of the Catabolite Repressor Protein CcpA to Its DNA Target Is Regulated by Phosphorylation of its Corepressor HPr. *J. Biol. Chem.* 272, 26530–26535. doi: 10.1074/jbc.272.42.26530.

Jones, N., Bohnsack, J. F., Takahashi, S., Oliver, K. A., Chan, M.-S., Kunst, F., et al. (2003). Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J Clin Microbiol* 41, 2530–2536. doi: 10.1128/JCM.41.6.2530-2536.2003.

Karimova, G., Ullmann, A., and Ladant, D. (2000). "[5] A bacterial two-hybrid system that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*," in *Methods in Enzymology* (Elsevier), 59–73. doi: 10.1016/S0076-6879(00)28390-0.

Keefe, G. (2012). Update on Control of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* for Management of Mastitis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 28, 203–216. doi: 10.1016/j.cvfa.2012.03.010.

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

Keogh, R. A., Spencer, B. L., Sorensen, H. M., Zapf, R. L., Briaud, P., Bonsall, A. E., et al. (2021). Global Annotation, Expression Analysis, and Stability of Candidate sRNAs in Group B *Streptococcus*. *mBio* 12, e02803-21. doi: 10.1128/mBio.02803-21.

Kim, J.-H., Yang, Y.-K., and Chambliss, G. H. (2005). Evidence that *Bacillus* catabolite control protein CcpA interacts with RNA polymerase to inhibit transcription. *Mol. Microbiol.* 56, 155–162. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04496.x.

Kim, S.-K., and Lee, J.-H. (2016). Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol.* 54, 71–85. doi: 10.1007/s12275-016-5528-7.

Kinkel, T. L., and McIver, K. S. (2008). CcpA-Mediated Repression of Streptolysin S Expression and Virulence in the Group A Streptococcus. *Infect Immun* 76, 3451–3463. doi: 10.1128/IAI.00343-08.

Kolar, S. L., Kyme, P., Tseng, C. W., Soliman, A., Kaplan, A., Liang, J., et al. (2015). Group B *Streptococcus* Evades Host Immunity by Degrading Hyaluronan. *Cell Host & Microbe* 18, 694–704. doi: 10.1016/j.chom.2015.11.001.

Konto-Ghiorghi, Y., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., et al. (2009). Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog* 5, e1000422. doi: 10.1371/journal.ppat.1000422.

Korir, M. L., Flaherty, R. A., Rogers, L. M., Gaddy, J. A., Aronoff, D. M., and Manning, S. D. (2018). Investigation of the Role That NADH Peroxidase Plays in Oxidative Stress Survival in Group B *Streptococcus*. *Frontiers in Microbiology* 9, 2786. doi: 10.3389/fmicb.2018.02786.

Korir, M. L., Laut, C., Rogers, L. M., Plemmons, J. A., Aronoff, D. M., and Manning, S. D. (2016). Differing mechanisms of surviving phagosomal stress among group B *Streptococcus* strains of varying genotypes. *Virulence* 8, 924–937. doi: 10.1080/21505594.2016.1252016.

Korir, M. L., Manning, S. D., and Davies, H. D. (2017). Intrinsic Maturational Neonatal Immune Deficiencies and Susceptibility to Group B *Streptococcus* Infection. *Clin Microbiol Rev* 30, 973–989. doi: 10.1128/CMR.00019-17.

Krohn, M. A., Hillier, S. L., and Baker, C. J. (1999). Maternal Peripartum Complications

Associated with Vaginal Group B Streptococci Colonization. *The Journal of Infectious Diseases* 179, 1410–1415. doi: 10.1086/314756.

Krüger, S., and Hecker, M. (1995). Regulation of the putative bglPH operon for aryl-beta-glucoside utilization in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177, 5590–5597. doi: 10.1128/jb.177.19.5590-5597.1995.

Kvint, K., Nachin, L., Diez, A., and Nyström, T. (2003). The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Current Opinion in Microbiology* 6, 140–145. doi: 10.1016/S1369-5274(03)00025-0.

La Carbona, S., Sauvageot, N., Giard, J.-C., Benachour, A., Posteraro, B., Auffray, Y., et al. (2007). Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology* 66, 1148–1163. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05987.x.

Lamy, M.-C., Zouine, M., Fert, J., Vergassola, M., Couve, E., Pellegrini, E., et al. (2004). CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Molecular Microbiology* 54, 1250–1268. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04365.x.

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

Lancefield, R. C., and Hare, R. (1935). The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic streptococci from parturient women. *J Exp Med* 61, 335–349.

Lang, S., and Palmer, M. (2003). Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP Factor as a Pore-forming Toxin. *Journal of Biological Chemistry* 278, 38167–38173. doi: 10.1074/jbc.M303544200.

Le Breton, Y., Belew, A. T., Valdes, K. M., Islam, E., Curry, P., Tettelin, H., et al. (2015). Essential Genes in the Core Genome of the Human Pathogen *Streptococcus pyogenes*. *Scientific Reports* 5, 9838. doi: 10.1038/srep09838.

Le Doare, K., Jarju, S., Darboe, S., Warburton, F., Gorringe, A., Heath, P. T., et al. (2016). Risk factors for Group B *Streptococcus* colonisation and disease in Gambian women and their infants. *J Infect* 72, 283–294. doi: 10.1016/j.jinf.2015.12.014.

Lechardeur, D., Fernandez, A., Robert, B., Gaudu, P., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., et al. (2010). The 2-Cys Peroxiredoxin Alkyl Hydroperoxide Reductase C Binds Heme and Participates in Its Intracellular Availability in *Streptococcus agalactiae*. *J Biol Chem* 285, 16032–16041. doi: 10.1074/jbc.M109.024505.

Leiba, J., Hartmann, T., Cluzel, M.-E., Cohen-Gonsaud, M., Delolme, F., Bischoff, M., et al. (2012). A novel mode of regulation of the *Staphylococcus aureus* catabolite control protein A (CcpA) mediated by Stk1 protein phosphorylation. *J Biol Chem* 287, 43607–43619. doi: 10.1074/jbc.M112.418913.

Lemos, J. A., Tsakalidou, E., and Papadimitriou, K. (2011). “Stress Responses of Streptococci,” in *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*, eds. E. Tsakalidou and K. Papadimitriou (Boston, MA: Springer US), 251–303. doi: 10.1007/978-0-387-92771-8_12.

Li, C., Sun, J. W., Zhang, G. F., and Liu, L. B. (2016). Effect of the absence of the CcpA gene on growth, metabolic production, and stress tolerance in *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Dairy Science* 99, 104–111. doi: 10.3168/jds.2015-10321.

Li, J., Huang, C., Zheng, D., Wang, Y., and Yuan, Z. (2012). CcpA-mediated enhancement of sugar and amino acid metabolism in *Lysinibacillus sphaericus* by NMR-based metabolomics. *J Proteome Res* 11, 4654–4661. doi: 10.1021/pr300469v.

Li, J., Tan, C., Zhou, Y., Fu, S., Hu, L., Hu, J., et al. (2011). The two-component regulatory system CiaRH contributes to the virulence of *Streptococcus suis* 2. *Veterinary Microbiology* 148, 99–104. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.08.005.

Li, Y., Heine, S., Entian, M., Sauer, K., and Frankenberg-Dinkel, N. (2013). NO-induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase. *J Bacteriol* 195, 3531–3542. doi: 10.1128/JB.01156-12.

Li, Z., Zhang, X., Cheng, L., Xu, X., Zhou, X., Wu, H., et al. (2019). Signal Transduction of Streptococci by Cyclic Dinucleotide Second Messengers. *Current Issues in Molecular Biology*, 87–122. doi: 10.21775/cimb.032.087.

Lin, B., Hollingshead, S. K., Coligan, J. E., Egan, M. L., Baker, J. R., and Pritchard, D. G. (1994). Cloning and expression of the gene for group B streptococcal hyaluronate lyase. *J Biol Chem* 269, 30113–30116.

Linn, S., and Imlay, J. A. (1987). Toxicity, mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Cell Sci Suppl* 6, 289–301. doi: 10.1242/jcs.1984.supplement_6.19.

Liu, G. Y., Doran, K. S., Lawrence, T., Turkson, N., Puliti, M., Tissi, L., et al. (2004). Sword and shield: Linked group B streptococcal β-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 14491–14496. doi: 10.1073/pnas.0406143101.

Lorca, G. L., Chung, Y. J., Barabote, R. D., Weyler, W., Schilling, C. H., and Saier, M. H. (2005). Catabolite Repression and Activation in *Bacillus subtilis*: Dependency on CcpA, HPr, and HprK. *Journal of Bacteriology* 187, 7826–7839. doi: 10.1128/JB.187.22.7826-7839.2005.

Luan, S.-L., Granlund, M., Sellin, M., Lagergård, T., Spratt, B. G., and Norgren, M. (2005). Multilocus Sequence Typing of Swedish Invasive Group B *Streptococcus* Isolates Indicates a Neonatally Associated Genetic Lineage and Capsule Switching. *J Clin Microbiol* 43, 3727–3733. doi: 10.1128/JCM.43.8.3727-3733.2005.

Madrid, L., Seale, A. C., Kohli-Lynch, M., Edmond, K. M., Lawn, J. E., Heath, P. T., et al. (2017). Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis* 65, S160–S172. doi: 10.1093/cid/cix656.

Maisey, H. C., Quach, D., Hensler, M. E., Liu, G. Y., Gallo, R. L., Nizet, V., et al. (2008). A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *FASEB j.* 22, 1715–1724. doi: 10.1096/fj.07-093963.

Makita, Y., Nakao, M., Ogasawara, N., and Nakai, K. (2004). DBTBS: database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* and its contribution to comparative genomics. *Nucleic Acids Res* 32, D75–D77. doi: 10.1093/nar/gkh074.

Manzer, H. S., Nguyen, D. T., Park, J. Y., Park, N., Seo, K. S., Thornton, J. A., et al. (2022). The Group B Streptococcal Adhesin BspC Interacts with Host Cytokeratin 19 To Promote Colonization of the Female Reproductive Tract. *mBio* 0, e01781-22. doi: 10.1128/mbio.01781-22.

Marciniak, B. C., Pabijaniak, M., de Jong, A., Dűhring, R., Seidel, G., Hillen, W., et al.

(2012). High- and low-affinity cre boxes for CcpA binding in *Bacillus subtilis* revealed by genome-wide analysis. *BMC Genomics* 13, 401. doi: 10.1186/1471-2164-13-401.

Markkula, A., Lindström, M., Johansson, P., Björkroth, J., and Korkeala, H. (2012). Roles of four putative DEAD-box RNA helicase genes in growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e under heat, pH, osmotic, ethanol, and oxidative stress conditions. *Appl Environ Microbiol* 78, 6875–6882. doi: 10.1128/AEM.01526-12.

Marques, M. B., Kasper, D. L., Pangburn, M. K., and Wessels, M. R. (1992). Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infect Immun* 60, 3986–3993. doi: 10.1128/iai.60.10.3986-3993.1992.

Martin, S. A. (1998). Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *J Anim Sci* 76, 3123–3132. doi: 10.2527/1998.76123123x.

Maslowska, K. H., Makiela-Dzbenska, K., and Fijalkowska, I. J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 60, 368–384. doi: 10.1002/em.22267.

Mazzuoli, M.-V., Daunesse, M., Varet, H., Rosinski-Chupin, I., Legendre, R., Sismeiro, O., et al. (2021). The CovR regulatory network drives the evolution of Group B *Streptococcus* virulence. *bioRxiv*, 2021.01.25.428120. doi: 10.1101/2021.01.25.428120.

Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. A. G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M., and Figueiredo, H. C. P. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Veterinary Microbiology* 136, 180–183. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.016.

Miwa, Y., Nagura, K., Eguchi, S., Fukuda, H., Deutscher, J., and Fujita, Y. (1997). Catabolite repression of the *Bacillus subtilis gnt* operon exerted by two catabolite-responsive elements. *Mol. Microbiol.* 23, 1203–1213. doi: 10.1046/j.1365-2958.1997.2921662.x.

Miwa, Y., Nakata, A., Ogiwara, A., Yamamoto, M., and Fujita, Y. (2000). Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 28, 1206–1210. doi: 10.1093/nar/28.5.1206.

Miwa, Y., Saikawa, M., and Fujita, Y. (1994). Possible function and some properties of the CcpA protein of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140, 2567–2575. doi: 10.1099/00221287-140-10-2567.

Monedero, V., Kuipers, O. P., Jamet, E., and Deutscher, J. (2001). Regulatory functions of serine-46-phosphorylated HPr in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 183, 3391–3398. doi: 10.1128/JB.183.11.3391-3398.2001.

Monedero, V., Mazé, A., Boël, G., Zúñiga, M., Beaufils, S., Hartke, A., et al. (2007). The phosphotransferase system of Lactobacillus casei: regulation of carbon metabolism and connection to cold shock response. *J Mol Microbiol Biotechnol* 12, 20–32. doi: 10.1159/000096456.

Monod, J. (1942). Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.

Monroe, D. (2007). Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol* 5, e307. doi: 10.1371/journal.pbio.0050307.

Moreno, M. S., Schneider, B. L., Maile, R. R., Weyler, W., and Saier, M. H. (2001). Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Molecular Microbiology* 39, 1366–1381. doi: 10.1111/j.1365-2958.2001.02328.x.

Morinis, J., Shah, J., Murthy, P., and Fulford, M. (2011). Horizontal transmission of group B

streptococcus in a neonatal intensive care unit. *Paediatr Child Health* 16, e48-50. doi: 10.1093/pch/16.6.e48.

Moulin, P., Patron, K., Cano, C., Zorgani, M. A., Camiade, E., Borezée-Durant, E., et al. (2016). The Adc/Lmb System Mediates Zinc Acquisition in *Streptococcus agalactiae* and Contributes to Bacterial Growth and Survival. *Journal of Bacteriology* 198, 3265–3277. doi: 10.1128/JB.00614-16.

Mu, R., Kim, B. J., Paco, C., Del Rosario, Y., Courtney, H. S., and Doran, K. S. (2014). Identification of a Group B Streptococcal Fibronectin Binding Protein, SfbA, That Contributes to Invasion of Brain Endothelium and Development of Meningitis. *Infect Immun* 82, 2276–2286. doi: 10.1128/IAI.01559-13.

Mudzana, R., Mavenyengwa, R. T., and Gudza-Mugabe, M. (2021). Analysis of virulence factors and antibiotic resistance genes in group B streptococcus from clinical samples. *BMC Infect Dis* 21, 125. doi: 10.1186/s12879-021-05820-6.

Nachin, L., Brive, L., Persson, K.-C., Svensson, P., and Nyström, T. (2008). Heterodimer Formation within Universal Stress Protein Classes Revealed By an *In Silico* and Experimental Approach. *Journal of Molecular Biology* 380, 340–350. doi: 10.1016/j.jmb.2008.04.074.

Nachin, L., Nannmark, U., and Nyström, T. (2005). Differential roles of the universal stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J Bacteriol* 187, 6265–6272. doi: 10.1128/JB.187.18.6265-6272.2005.

Nagao, P. E. (2015). "Streptococcus agalactiae (Group B Streptococci)," in *Molecular Medical Microbiology* (Elsevier), 1751–1767. doi: 10.1016/B978-0-12-397169-2.00099-8.

Nair, S., Poyart, C., Beretti, J.-L., Veiga-Fernandes, H., Berche, P., and Trieu-Cuot, P. (2003). Role of the *Streptococcus agalactiae* ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest. *Microbiology (Reading)* 149, 407–417. doi: 10.1099/mic.0.25783-0.

Nealon, T. J., and Mattingly, S. J. (1984). Role of cellular lipoteichoic acids in mediating adherence of serotype III strains of group B streptococci to human embryonic, fetal, and adult epithelial cells. *Infect Immun* 43, 523–530. doi: 10.1128/iai.43.2.523-530.1984.

Nobbs, A. H., Lamont, R. J., and Jenkinson, H. F. (2009). *Streptococcus* adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev* 73, 407–450, Table of Contents. doi: 10.1128/MMBR.00014-09.

Nocard, M., and Mollereau, R. (1887). Sur une mammite contagieuse des vaches laitieres. *Ann. Inst. Pasteur* 1, 109–126.

Nyström, T., and Neidhardt, F. C. (1996). Effects of overproducing the universal stress protein, UspA, in Escherichia coli K-12. *J Bacteriol* 178, 927–930.

O'Connor, A., and McClean, S. (2017). The Role of Universal Stress Proteins in Bacterial Infections. *CMC* 24, 3970–3979. doi: 10.2174/0929867324666170124145543.

Oliveira, I. C. M., de Mattos, M. C., Pinto, T. A., Ferreira-Carvalho, B. T., Benchetrit, L. C., Whiting, A. A., et al. (2006). Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and a human group B streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern. *Clinical Microbiology and Infection* 12, 887–893. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01508.x.

Oliveira, L., Madureira, P., Andrade, E. B., Bouaboud, A., Morello, E., Ferreira, P., et al. (2012). Group B *Streptococcus* GAPDH Is

Released upon Cell Lysis, Associates with Bacterial Surface, and Induces Apoptosis in Murine Macrophages. *PLOS ONE* 7, e29963. doi: 10.1371/journal.pone.0029963.

Olson, M. G., Goldammer, M., Gauliard, E., Ladant, D., and Ouellette, S. P. (2018). A Bacterial Adenylate Cyclase-Based Two-Hybrid System Compatible with Gateway® Cloning. *Methods Mol Biol* 1794, 75–96. doi: 10.1007/978-1-4939-7871-7_6.

Pandiani, F., Chamot, S., Brillard, J., Carlin, F., Nguyen-the, C., and Broussolle, V. (2011). Role of the five RNA helicases in the adaptive response of *Bacillus cereus* ATCC 14579 cells to temperature, pH, and oxidative stresses. *Appl Environ Microbiol* 77, 5604–5609. doi: 10.1128/AEM.02974-10.

Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., et al. (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 837–890. doi: 10.1128/MMBR.00076-15.

Papasergi, S., Brega, S., Mistou, M.-Y., Firon, A., Oxaran, V., Dover, R., et al. (2010). The GBS PI-2a pilus is required for virulence in mice neonates. *PLoS ONE* 6, e18747. doi: 10.1371/journal.pone.0018747.

Park, S., Dingemans, J., Gowett, M., and Sauer, K. (2021). Glucose-6-Phosphate Acts as an Extracellular Signal of SagS To Modulate *Pseudomonas aeruginosa* c-di-GMP Levels, Attachment, and Biofilm Formation. *mSphere* 6, e01231-20. doi: 10.1128/mSphere.01231-20.

Patenge, N., Fiedler, T., and Kreikemeyer, B. (2013). Common regulators of virulence in streptococci. *Curr Top Microbiol Immunol* 368, 111–153. doi: 10.1007/82_2012_295.

Patras, K. A., and Doran, K. S. (2016). A Murine Model of Group B *Streptococcus* Vaginal Colonization. *JoVE*, 54708. doi: 10.3791/54708.

Patron, K., Gilot, P., Camiade, E., and Mereghetti, L. (2015). An homolog of the Frz Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphoTransferase System of extraintestinal pathogenic Escherichia coli is encoded on a genomic island in specific lineages of *Streptococcus agalactiae*. *Infection, Genetics and Evolution* 32, 44–50. doi: 10.1016/j.meegid.2015.02.019.

Patron, K., Gilot, P., Rong, V., Hiron, A., Mereghetti, L., and Camiade, E. (2016). Inductors and regulatory properties of the genomic island-associated fru_2 metabolic operon of *Streptococcus agalactiae*. *Molecular Microbiology* 103, 678–697. doi: 10.1111/mmi.13581.

Pätzold, L., Brausch, A.-C., Bielefeld, E.-L., Zimmer, L., Somerville, G. A., Bischoff, M., et al. (2021). Impact of the Histidine-Containing Phosphocarrier Protein HPr on Carbon Metabolism and Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms* 9, 466. doi: 10.3390/microorganisms9030466.

Pellegrini, A., Lentini, G., Famà, A., Bonacorsi, A., Scoffone, V. C., Buroni, S., et al. (2022). CodY Is a Global Transcriptional Regulator Required for Virulence in Group B *Streptococcus*. *Frontiers in Microbiology* 13. Available at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.881549 [Accessed July 11, 2022].

Périchon, B., Guignot, J., Szili, N., Gao, C., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., et al. (2019). Insights into *Streptococcus agalactiae* PI-2b pilus biosynthesis and role in adherence to host cells. *Microbes Infect* 21, 99–103. doi: 10.1016/j.micinf.2018.10.004.

Phares, C. R., Lynfield, R., Farley, M. M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L. H., Petit, S., et al. (2008). Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States,

1999-2005. *JAMA* 299, 2056–2065. doi: 10.1001/jama.299.17.2056.

Plainvert, C., Hays, C., Touak, G., Joubrel-Guyot, C., Dmytruk, N., Frigo, A., et al. (2020). Multidrug-Resistant Hypervirulent Group B *Streptococcus* in Neonatal Invasive Infections, France, 2007–2019. *Emerg Infect Dis* 26, 2721–2724. doi: 10.3201/eid2611.201669.

Postma, P. W., Lengeler, J. W., and Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 543–594.

Powers, D. A., and Roseman, S. (1984). The primary structure of *Salmonella typhimurium* HPr, a phosphocarrier protein of the phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.* 259, 15212–15214.

Poyart, C., Lamy, M. C., Boumaila, C., Fiedler, F., and Trieu-Cuot, P. (2001a). Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in *Streptococcus agalactiae* involves a novel two-component regulatory system. *J Bacteriol* 183, 6324–6334. doi: 10.1128/JB.183.21.6324-6334.2001.

Poyart, C., Pellegrini, E., Gaillot, O., Boumaila, C., Baptista, M., and Trieu-Cuot, P. (2001b). Contribution of Mn-Cofactored Superoxide Dismutase (SodA) to the Virulence of Streptococcus agalactiae. *Infect Immun* 69, 5098–5106. doi: 10.1128/IAI.69.8.5098-5106.2001.

Poyart, C., Pellegrini, E., Marceau, M., Baptista, M., Jaubert, F., Lamy, M.-C., et al. (2003). Attenuated virulence of Streptococcus agalactiae deficient in D-alanyl-lipoteichoic acid is due to an increased susceptibility to defensins and phagocytic cells. *Mol Microbiol* 49, 1615–1625. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03655.x.

Poyart, C., Réglier-Poupet, H., Tazi, A., Billoët, A., Dmytruk, N., Bidet, P., et al. (2008). Invasive group B streptococcal infections in infants, France. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1647–9. doi: 10.3201/eid1410.080185.

Poyart, C., Tazi, A., Réglier-Poupet, H., Billoët, A., Tavares, N., Raymond, J., et al. (2007). Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1985–1988. doi: 10.1128/JCM.00159-07.

Quach, D., van Sorge, N. M., Kristian, S. A., Bryan, J. D., Shelver, D. W., and Doran, K. S. (2009). The CiaR response regulator in group B *Streptococcus* promotes intracellular survival and resistance to innate immune defenses. *J Bacteriol* 191, 2023–2032. doi: 10.1128/JB.01216-08.

Raabe, V. N., and Shane, A. L. (2019). Group B *Streptococcus* (*Streptococcus agalactiae*). *Microbiol Spectr* 7, 10.1128/microbiolspec.GPP3-0007–2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0007-2018.

Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A., and Rubens, C. E. (2006). Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* 62, 941–957. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05431.x.

Redder, P., and Linder, P. (2012). “Chapter Seventeen - DEAD-Box RNA Helicases in Gram-Positive RNA Decay,” in *Methods in Enzymology* RNA helicases., ed. E. Jankowsky (Academic Press), 369–383. doi: 10.1016/B978-0-12-396546-2.00017-6.

Reed, J. M., Olson, S., Brees, D. F., Griffin, C. E., Grove, R. A., Davis, P. J., et al. (2018). Coordinated regulation of transcription by CcpA and the *Staphylococcus aureus* two-component system HptRS. *PLoS One* 13,

e0207161. doi: 10.1371/journal.pone.0207161.

Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stülke, J., et al. (1998). A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Molecular Microbiology* 27, 1157–1169. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00747.x.

Rice, K. C., Turner, M. E., Carney, O. V., Gu, T., and Ahn, S.-J. (2017). Modification of the Streptococcus mutans transcriptome by LrgAB and environmental stressors. *Microb Genom* 3, e000104. doi: 10.1099/mgen.0.000104.

Rinaudo, C. D., Rosini, R., Galeotti, C. L., Berti, F., Necchi, F., Reguzzi, V., et al. (2010). Specific involvement of pilus type 2a in biofilm formation in group B *Streptococcus*. *PLoS One* 5, e9216. doi: 10.1371/journal.pone.0009216.

Ring, A., Depnering, C., Pohl, J., Nizet, V., Shenep, J. L., and Stremmel, W. (2002). Synergistic Action of Nitric Oxide Release from Murine Macrophages Caused by Group B Streptococcal Cell Wall and β-Hemolysin/Cytolysin. *J INFECT DIS* 186, 1518–1521. doi: 10.1086/344895.

Rodgus, J., Prakapaite, R., Mitsidis, P., Grigaleviciute, R., Planciuniene, R., Kavaliauskas, P., et al. (2022). Molecular Epidemiology of Group B Streptococci in Lithuania Identifies Multi-Drug Resistant Clones and Sporadic ST1 Serotypes Ia and Ib. *Pathogens* 11, 1060. doi: 10.3390/pathogens11091060.

Rosa-Fraile, M., Rodríguez-Granger, J., Haidour-Benamin, A., Cuerva, J. M., and Sampedro, A. (2006). Granadaene: Proposed Structure of the Group B *Streptococcus* Polyenic Pigment. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6367–6370. doi: 10.1128/AEM.00756-06.

Rosini, R., Rinaudo, C. D., Soriani, M., Lauer, P., Mora, M., Maione, D., et al. (2006). Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*: New pilus-like structures in *S. agalactiae*. *Molecular Microbiology* 61, 126–141. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05225.x.

Rosinski-Chupin, I., Sauvage, E., Sismeiro, O., Villain, A., Da Cunha, V., Caliot, M.-E., et al. (2015). Single nucleotide resolution RNA-seq uncovers new regulatory mechanisms in the opportunistic pathogen *Streptococcus agalactiae*. *BMC Genomics* 16, 419. doi: 10.1186/s12864-015-1583-4.

Russell, N. J., Seale, A. C., O'Driscoll, M., O'Sullivan, C., Bianchi-Jassir, F., Gonzalez-Guarin, J., et al. (2017). Maternal Colonization With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clinical Infectious Diseases* 65, S100–S111. doi: 10.1093/cid/cix658.

Saar-Dover, R., Bitler, A., Nezer, R., Shmuel-Galia, L., Firon, A., Shimoni, E., et al. (2012). D-Alanylation of Lipoteichoic Acids Confers Resistance to Cationic Peptides in Group B *Streptococcus* by Increasing the Cell Wall Density. *PLoS Pathog* 8, e1002891. doi: 10.1371/journal.ppat.1002891.

Safadi, R. A., Mereghetti, L., Salloum, M., Lartigue, M.-F., Virlogeux-Payant, I., Quentin, R., et al. (2011). Two-Component System RgfA/C Activates the *fbsB* Gene Encoding Major Fibrinogen-Binding Protein in Highly Virulent CC17 Clone Group B *Streptococcus*. *PLoS ONE* 6, e14658. doi: 10.1371/journal.pone.0014658.

Sambrook, J., and Russell, D. W. (2006). Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc* 2006, pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455.

Samen, U., Heinz, B., Boisvert, H., Eikmanns, B. J., Reinscheid, D. J., and Borges, F. (2011). Rga is a regulator of adherence and pilus formation in *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology (Reading)* 157, 2319–2327. doi: 10.1099/mic.0.044933-0.

Samen, U. M., Eikmanns, B. J., and Reinscheid, D. J. (2006). The transcriptional regulator RovS controls the attachment of Streptococcus agalactiae to human epithelial cells and the expression of virulence genes. *Infect Immun* 74, 5625–5635. doi: 10.1128/IAI.00667-06.

Santi, I., Grifantini, R., Jiang, S.-M., Brettoni, C., Grandi, G., Wessels, M. R., et al. (2009). CsrRS Regulates Group B *Streptococcus* Virulence Gene Expression in Response to Environmental pH: a New Perspective on Vaccine Development. *J Bacteriol* 191, 5387–5397. doi: 10.1128/JB.00370-09.

Santi, I., Scarselli, M., Mariani, M., Pezzicoli, A., Masignani, V., Taddei, A., et al. (2007). BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. *Mol Microbiol* 63. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05555.x.

Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc* 3, 1101–1108. doi: 10.1038/nprot.2008.73.

Schubert, A., Zakikhany, K., Schreiner, M., Frank, R., Spellerberg, B., Eikmanns, B. J., et al. (2002). A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites: A fibrinogen receptor with repetitive binding sites. *Molecular Microbiology* 46, 557–569. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03177.x.

Schumacher, M. A., Allen, G. S., Diel, M., Seidel, G., Hillen, W., and Brennan, R. G. (2004). Structural Basis for Allosteric Control of the Transcription Regulator CcpA by the Phosphoprotein HPr-Ser46-P. *Cell* 118, 731–741. doi: 10.1016/j.cell.2004.08.027.

Schumacher, M. A., Sprehe, M., Bartholomae, M., Hillen, W., and Brennan, R. G. (2011). Structures of carbon catabolite protein A–(HPr-Ser46-P) bound to diverse catabolite response element sites reveal the basis for high-affinity binding to degenerate DNA operators. *Nucleic Acids Res* 39, 2931–2942. doi: 10.1093/nar/gkq1177.

Sebert, M. E., Patel, K. P., Plotnick, M., and Weiser, J. N. (2005). Pneumococcal HtrA protease mediates inhibition of competence by the CiaRH two-component signaling system. *J Bacteriol* 187, 3969–3979. doi: 10.1128/JB.187.12.3969-3979.2005.

Seidl, K., Goerke, C., Wolz, C., Mack, D., Berger-Bächi, B., and Bischoff, M. (2008). *Staphylococcus aureus* CcpA affects biofilm formation. *Infect Immun* 76, 2044–2050. doi: 10.1128/IAI.00035-08.

Seidl, K., Stucki, M., Ruegg, M., Goerke, C., Wolz, C., Harris, L., et al. (2006). Staphylococcus aureus CcpA Affects Virulence Determinant Production and Antibiotic Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1183–1194. doi: 10.1128/AAC.50.4.1183-1194.2006.

Seifert, K. N., Adderson, E. E., Whiting, A. A., Bohnsack, J. F., Crowley, P. J., and Brady, L. J. 2006 (2006). A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (ε) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology* 152, 1029–1040. doi: 10.1099/mic.0.28516-0.

Seifert, K. N., McArthur, W. P., Bleiweis, A. S., and Brady, L. J. (2003). Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions. *Can J Microbiol* 49, 350–356. doi: 10.1139/w03-042.

Shabayek, S., Bauer, R., Mauerer, S., Mizaikoff, B., and Spellerberg, B. (2016). A streptococcal NRAMP homologue is crucial for the survival of *Streptococcus agalactiae* under low pH conditions. *Molecular Microbiology* 100, 589–606. doi: 10.1111/mmi.13335.

Shabayek, S., and Spellerberg, B. (2017). Acid Stress Response Mechanisms of Group B Streptococci. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. doi: 10.3389/fcimb.2017.00395.

Shabayek, S., and Spellerberg, B. (2018). Group B Streptococcal Colonization, Molecular Characteristics, and Epidemiology. *Front Microbiol* 9, 437. doi: 10.3389/fmicb.2018.00437.

Shelburne, S. A., Keith, D., Horstmann, N., Sumby, P., Davenport, M. T., Graviss, E. A., et al. (2008). A direct link between carbohydrate utilization and virulence in the major human pathogen group A *Streptococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 1698–1703. doi: 10.1073/pnas.0711767105.

Silva, Y. P., Bernardi, A., and Frozza, R. L. (2020). The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology* 11. DOI: 10.3389/fendo.2020.00025.

Silvestre, I., Borrego, M. J., and Jordão, L. (2020). Biofilm formation by ST17 and ST19 strains of *Streptococcus agalactiae*. *Research in Microbiology* 171, 311–318. doi: 10.1016/j.resmic.2020.08.001.

Silvestroni, A., Jewell, K. A., Lin, W.-J., Connelly, J. E., Ivancic, M. M., Tao, W. A., et al. (2009). Identification of serine/threonine kinase substrates in the human pathogen group B streptococcus. *J Proteome Res* 8, 2563–2574. doi: 10.1021/pr900069n.

Six, A., Bellais, S., Bouaboud, A., Fouet, A., Gabriel, C., Tazi, A., et al. (2015). Srr2, a multifaceted adhesin expressed by ST-17 hypervirulent Group B *Streptococcus* involved in binding to both fibrinogen and plasminogen. *Molecular Microbiology* 97, 1209–1222. doi: 10.1111/mmi.13097.

Six, A., Joubrel, C., Tazi, A., and Poyart, C. (2014). Infections materno-fœtales à *Streptococcus agalactiae*. *La Presse Médicale* 43, 706–714. doi: 10.1016/j.lpm.2014.04.008.

Slotved, H.-C., and Hoffmann, S. (2020). The Epidemiology of Invasive Group B *Streptococcus* in Denmark From 2005 to 2018. *Front. Public Health* 8, 40. doi: 10.3389/fpubh.2020.00040.

Song, J. Y., Lim, J. H., Lim, S., Yong, Z., and Seo, H. S. (2018). Progress toward a group B streptococcal vaccine. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 14, 2669–2681. doi: 10.1080/21645515.2018.1493326.

Sørensen, U. B. S., Poulsen, K., Ghezzo, C., Margarit, I., and Kilian, M. (2010). Emergence and Global Dissemination of Host-Specific *Streptococcus agalactiae* Clones. *mBio* 1, e00178-10. doi: 10.1128/mBio.00178-10.

Sousa, M. C., and McKay, D. B. (2001). Structure of the Universal Stress Protein of *Haemophilus influenzae*. *Structure* 9, 1135–1141. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00680-3.

Spellerberg, B., Martin, S., Brandt, C., and Lütticken, R. (2000). The *cyl* genes of Streptococcus agalactiae are involved in the production of pigment. *FEMS Microbiol Lett* 188, 125–128. doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09182.x.

Spellerberg, B., Pohl, B., Haase, G., Martin, S., Weber-Heynemann, J., and Lütticken, R. (1999a). Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of *Streptococcus agalactiae* by ISS1 transposition. *J Bacteriol* 181, 3212–3219. doi: 10.1128/JB.181.10.3212-3219.1999.

Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-Heynemann, J., and Lütticken, R. (2002). *rgf* encodes a novel two-component signal transduction system of Streptococcus agalactiae. *Infect Immun* 70, 2434–2440. doi: 10.1128/IAI.70.5.2434-2440.2002.

Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-Heynemann, J., Schnitzler, N., Lütticken, R., et al. (1999b). Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect Immun* 67, 871–878. doi: 10.1128/IAI.67.2.871-878.1999.

Stock, A. M., Robinson, V. L., and Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* 69, 183–215. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183.

Tazi, A., Disson, O., Bellais, S., Bouaboud, A., Dmytruk, N., Dramsi, S., et al. (2010). The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J Exp Med* 207, 2313–2322. doi: 10.1084/jem.20092594.

Tazi, A., Plainvert, C., Anselem, O., Ballon, M., Marcou, V., Seco, A., et al. (2019). Risk Factors for Infant Colonization by Hypervirulent CC17 Group B *Streptococcus*: Toward the Understanding of Late-onset Disease. *Clin Infect Dis* 69, 1740–1748. doi: 10.1093/cid/ciz033.

Tenenbaum, T., Spellerberg, B., Adam, R., Vogel, M., Kim, K., and Schroten, H. (2007). Streptococcus agalactiae invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes and Infection* 9, 714–720. doi: 10.1016/j.micinf.2007.02.015.

Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., et al. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome." *PNAS* 102, 13950–13955. doi: 10.1073/pnas.0506758102.

Thompson, T. A., and Brown, P. D. (2021). Small interfering RNAs targeting *agrA* and *sarA* attenuate pathogenesis of Staphylococcus aureus in Caenorhabditis elegans. *J Infect Dev Ctries* 15, 1868–1875. doi: 10.3855/jidc.13664.

Tkaczuk, K. L., A. Shumilin, I., Chruszcz, M., Evdokimova, E., Savchenko, A., and Minor, W. (2013). Structural and functional insight into the universal stress protein family. *Evolutionary Applications* 6, 434–449. doi: 10.1111/eva.12057.

Trollfors, B., Melin, F., Gudjonsdottir, M. J., Rupröder, R., Sandin, M., Dahl, M., et al. (2022). Group B streptococcus - a pathogen not restricted to neonates. *IJID Reg* 4, 171–175. doi: 10.1016/j.ijregi.2022.08.002.

Tulyaprawat, O., Pharkjaksu, S., Shrestha, R. K., and Ngamskulrungroj, P. (2021). Emergence of Multi-Drug Resistance and Its Association With Uncommon Serotypes of *Streptococcus agalactiae* Isolated From Non-neonatal Patients in Thailand. *Front Microbiol* 12, 719353. doi: 10.3389/fmicb.2021.719353.

Turinsky, A. J., Grundy, F. J., Kim, J. H., Chambliss, G. H., and Henkin, T. M. (1998). Transcriptional activation of the *Bacillus subtilis ackA* gene requires sequences upstream of the promoter. *J. Bacteriol.* 180, 5961–5967.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., et al. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40, e115. doi: 10.1093/nar/gks596.

Valenti-Weigand, P., Benkel, P., Rohde, M., and Chhatwal, G. S. (1996). Entry and intracellular survival of group B streptococci

in J774 macrophages. *Infect Immun* 64, 2467–2473.

Vallenet, D., Calteau, A., Dubois, M., Amours, P., Bazin, A., Beuvin, M., et al. (2020). MicroScope: an integrated platform for the annotation and exploration of microbial gene functions through genomic, pangenomic and metabolic comparative analysis. *Nucleic Acids Research* 48, D579–D589. doi: 10.1093/nar/gkz926.

van der Mee-Marquet, N., Fourny, L., Arnault, L., Domelier, A.-S., Salloum, M., Lartigue, M.-F., et al. (2008). Molecular Characterization of Human-Colonizing *Streptococcus agalactiae* Strains Isolated from Throat, Skin, Anal Margin, and Genital Body Sites. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 2906–2911. doi: 10.1128/JCM.00421-08.

van Sorge, N. M., Quach, D., Gurney, M. A., Sullam, P. M., Nizet, V., and Doran, K. S. (2009). The Group B Streptococcal Serine-Rich Repeat 1 Glycoprotein Mediates Penetration of the Blood-Brain Barrier. *J INFECT DIS* 199, 1479–1487. doi: 10.1086/598217.

van Tilbeurgh, H., and Declerck, N. (2001). Structural insights into the regulation of bacterial signalling proteins containing PRDs. *Current Opinion in Structural Biology* 11, 685–693. doi: 10.1016/S0959-440X(01)00267-6.

Vandamme, P., Devriese, L. A., Pot, B., Kersters, K., and Melin', P. (1997). Streptococcus dificile Is a Nonhemolytic Group B, Type Ib *Streptococcus*. 5.

Varhimo, E., Savijoki, K., Jalava, J., Kuipers, O. P., and Varmanen, P. (2007). Identification of a novel streptococcal gene cassette mediating SOS mutagenesis in *Streptococcus uberis*. *J Bacteriol* 189, 5210–5222. doi: 10.1128/JB.00473-07.

Verani, J. R., and Schrag, S. J. (2010). Group B Streptococcal Disease in Infants: Progress in Prevention and Continued Challenges. *Clinics in Perinatology* 37, 375–392. doi: 10.1016/j.clp.2010.02.002.

Vollmer, A. C., and Bark, S. J. (2018). "Chapter One - Twenty-Five Years of Investigating the Universal Stress Protein: Function, Structure, and Applications," in *Advances in Applied Microbiology*, eds. S. Sariaslani and G. M. Gadd (Academic Press), 1–36. doi: 10.1016/bs.aambs.2017.10.001.

Vuillemin, X., Hays, C., Plainvert, C., Dmytruk, N., Louis, M., Touak, G., et al. (2021). Invasive group B *Streptococcus* infections in non-pregnant adults: a retrospective study, France, 2007-2019. *Clin Microbiol Infect* 27, 129.e1-129.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2020.09.037.

Walker, E. A., Port, G. C., Caparon, M. G., and Janowiak, B. E. (2019). Glutathione Synthesis Contributes to Virulence of *Streptococcus agalactiae* in a Murine Model of Sepsis. *J Bacteriol* 201, e00367-19. doi: 10.1128/JB.00367-19.

Wang, K.-Y., Chen, D.-F., Huang, L.-Y., Lian, H., Wang, J., Xiao, D., et al. (2013). Isolation and characterization of *Streptococcus agalactiae* from Nile Tilapia *Oreochromis niloticus* in China. *African Journal of Microbiology Research* 7, 317–323. doi: 10.5897/AJMR12.1207.

Wang, X., Cai, J., Shang, N., Zhu, L., Shao, N., Dong, X., et al. (2019). The carbon catabolite repressor CcpA mediates optimal competence development in *Streptococcus oligofermentans* through post-transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* 112, 552–568. doi: 10.1111/mmi.14274.

Wang, Z., Guo, C., Xu, Y., Liu, G., Lu, C., and Liu, Y. (2014). Two Novel Functions of Hyaluronidase from *Streptococcus agalactiae* Are Enhanced Intracellular Survival and Inhibition of Proinflammatory Cytokine

Expression. *Infect Immun* 82, 2615–2625. doi: 10.1128/IAI.00022-14.

Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., and Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189–1191. doi: 10.1093/bioinformatics/btp033.

Watson, M. E., Nielsen, H. V., Hultgren, S. J., and Caparon, M. G. (2013). Murine Vaginal Colonization Model for Investigating Asymptomatic Mucosal Carriage of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* 81, 1606–1617. doi: 10.1128/IAI.00021-13.

Weickert, M. J., and Adhya, S. (1992). A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J. Biol. Chem.* 267, 15869–15874.

Weickert, M. J., and Chambliss, G. H. (1990). Site-directed mutagenesis of a catabolite repression operator sequence in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6238–6242.

Weigel, N., Kukuruzinska, M. A., Nakazawa, A., Waygood, E. B., and Roseman, S. (1982). Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Phosphoryl transfer reactions catalyzed by enzyme I of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 257, 14477–14491.

Wessels, M. R., Rubens, C. E., Benedí, V. J., and Kasper, D. L. (1989). Definition of a bacterial virulence factor: sialylation of the group B streptococcal capsule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 8983–8987. doi: 10.1073/pnas.86.22.8983.

Whidbey, C., Harrell, M. I., Burnside, K., Ngo, L., Becraft, A. K., Iyer, L. M., et al. (2013). A hemolytic pigment of Group B *Streptococcus* allows bacterial penetration of human placenta. *Journal of Experimental Medicine* 210, 1265–1281. doi: 10.1084/jem.20122753.

Whidbey, C., Vornhagen, J., Gendrin, C., Boldenow, E., Samson, J. M., Doering, K., et al. (2015). A streptococcal lipid toxin induces membrane permeabilization and pyroptosis leading to fetal injury. *EMBO Mol Med* 7, 488–505. doi: 10.15252/emmm.201404883.

Willenborg, J., de Greeff, A., Jarek, M., Valentin-Weigand, P., and Goethe, R. (2014). The CcpA regulon of *Streptococcus suis* reveals novel insights into the regulation of the streptococcal central carbon metabolism by binding of CcpA to two distinct binding motifs. *Molecular Microbiology* 92, 61–83. doi: 10.1111/mmi.12537.

Willenborg, J., Fulde, M., de Greeff, A., Rohde, M., Smith, H. E., Valentin-Weigand, P., et al. (2011). Role of glucose and CcpA in capsule expression and virulence of *Streptococcus suis*. *Microbiology (Reading)* 157, 1823–1833. doi: 10.1099/mic.0.046417-0.

Witkin, E. M. (1976). Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* 40, 869–907.

World Health Organization and London School of Hygiene and Tropical Medicine (2021). *Group B streptococcus vaccine: full value of vaccine assessment*. Geneva: World Health Organization Available at: https://apps.who.int/iris/handle/10665/347595 [Accessed March 25, 2022].

Yamamoto, Y., Pargade, V., Lamberet, G., Gaudu, P., Thomas, F., Texereau, J., et al. (2006). The Group B *Streptococcus* NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. *Mol. Microbiol.* 62, 772–785. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05406.x.

Ye, J. J., Reizer, J., Cui, X., and Saier, M. H. (1994). Inhibition of the phosphoenolpyruvate:lactose phosphotransferase system and activation of a cytoplasmic sugar-phosphate phosphatase in Lactococcus lactis by ATP-dependent metabolite-activated phosphorylation of serine 46 in the phosphocarrier protein HPr. *J Biol Chem* 269, 11837–11844.

Yildirim, A. O., Lämmler, C., and Weiss, R. (2002). Identification and characterization of Streptococcus agalactiae isolated from horses. *Vet Microbiol* 85, 31–35. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00481-3.

Yuan, L., Wu, H., Wang, B., Jia, C., Liang, D., Caiyin, Q.-G.-L., et al. (2021). ComX improves acid tolerance by regulating the expression of late competence proteins in *Lactococcus lactis* F44. *Journal of Dairy Science* 104, 9556–9569. doi: 10.3168/jds.2021-20184.

Zalieckas, J. M., Wray, L. V., Ferson, A. E., and Fisher, S. H. (1998a). Transcription-repair coupling factor is involved in carbon catabolite repression of the *Bacillus subtilis* hut and gnt operons. *Mol. Microbiol.* 27, 1031–1038. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00751.x.

Zalieckas, J. M., Wray, L. V., and Fisher, S. H. (1998b). Expression of the *Bacillus subtilis acsA* gene: position and sequence context affect *cre*-mediated carbon catabolite repression. *J. Bacteriol.* 180, 6649–6654.

Zarembinski, T. I., Hung, L. W., Mueller-Dieckmann, H. J., Kim, K. K., Yokota, H., Kim, R., et al. (1998). Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15189–15193. doi: 10.1073/pnas.95.26.15189.

Zeng, L., Choi, S. C., Danko, C. G., Siepel, A., Stanhope, M. J., and Burne, R. A. (2013). Gene Regulation by CcpA and Catabolite Repression Explored by RNA-Seq in Streptococcus mutans. *PLOS ONE* 8, e60465. doi: 10.1371/journal.pone.0060465.

Zhang, G., Liu, L., and Li, C. (2020). Effects of ccpA gene deficiency in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* under aerobic conditions as assessed by proteomic analysis. *Microb Cell Fact* 19, 9. doi: 10.1186/s12934-020-1278-7.

Zheng, L., Chen, Z., Itzek, A., Herzberg, M. C., and Kreth, J. (2012). CcpA regulates biofilm formation and competence in *Streptococcus gordonii*. *Mol Oral Microbiol* 27, 83–94. doi: 10.1111/j.2041-1014.2011.00633.x.

Zotta, T., Ricciardi, A., Guidone, A., Sacco, M., Muscariello, L., Mazzeo, M. F., et al. (2012). Inactivation of *ccpA* and aeration affect growth, metabolite production and stress tolerance in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *International Journal of Food Microbiology* 155, 51–59. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.017.

ANNEXES

A. Travaux supplémentaires valorisés par une publication

Synthesis, antibacterial and cytotoxic evaluation of cytosporone E and analogs. (2022). Ibraheem W., Chaar C., Camiade E., Hervé V., Fouquenet D., Roux A.-E., Si-Tahar M. Ahmed E., Thibonnet J., Thiery E., Petrignet J. *Journal of Molecular Structure*. doi: 10.1016/j.molstruc.2021.132135.

Les infections nosocomiales sont aujourd'hui considérées comme un problème de santé public majeur. Parmi les pathogènes à l'origine de ces infections, *E. coli* (26 %), *S. aureus* (13,8 %) et *Pseudomonas aeruginosa* (6,3 %) représentent une grande partie des cas. Ils sont considérés comme menaces « critiques » parmi la liste des agents pathogènes connus et pour lesquels le développement de nouveaux antibiotiques est primordial. C'est dans ce contexte que l'étude s'est intéressée aux phtalides naturels, des lactones bicycliques possédant pour certaines des propriétés antibactériennes. L'étude présentée ici a consisté à la synthèse et la pharmacomodulation de la cytosporone E, phtalide isolé à partir d'un champignon endophyte, qui possède des activités antibactériennes afin d'améliorer ses propriétés antibiotiques. Ces travaux ont permis d'identifier un analogue chloré relativement cytotoxique et inactif contre les bactéries à Gram négatif mais qui possède d'excellentes activités contre des souches de *S. aureus* résistantes à la méticilline (SARM). Ma collaboration à ce travail à consisté à déterminer les concentrations minimales inhibitrices et bactéricides de certains analogues de la cytosporone E.

Journal of Molecular Structure 1252 (2022) 132135

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Molecular Structure

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

Synthesis, antibacterial and cytotoxic evaluation of cytosporone E and analogs

Walaa Ibraheem[a,e], Capucine Chaar[a], Emilie Camiade[b], Virginie Hervé[c,d], Delphine Fouquenet[c,d], Anne-Emmanuelle Roux[b], Mustapha Si-Tahar[c,d], Elhadi Ahmed[e], Jérôme Thibonnet[a], Emilie Thiery[a], Julien Petrignet[a,*]

[a] Laboratoire Synthèse et Isolement de Molécules Bioactives (SIMBA, EA 7502), Université de Tours, Faculté de Pharmacie, Parc de Grandmont, 31 Avenue Monge, Tours 37200, France
[b] Infectiologie et Santé Publique (ISP), Université de Tours, INRAE, Tours F-37000, France
[c] INSERM, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), UMR 1100, Tours, France
[d] Faculté de Médecine de Tours, Université de Tours, France
[e] University of Gezira, Faculty of Pharmacy, Wad Madini, Sudan

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 September 2021
Revised 3 December 2021
Accepted 7 December 2021
Available online 10 December 2021

Keywords:
Natural phthalide
Pharmacomodulations
Antibacterial activity
Cytotoxicity

ABSTRACT

The history of antibacterial discovery has revealed that natural products, especially secondary metabolites, represent privileged chemical matters for the antibacterial discovery. Among these metabolites, several natural phthalides exhibit interesting antibacterial activities, such as cytosporone E isolated from endophyte ascomycetes *Diaporthe* and *Cytospora* sp. We describe herein the synthesis and the pharmacomulations on the positions 3, 4 and 6 of cytosporone E, then the *in vitro* antibacterial evaluation of these compounds against *Staphylococcus aureus* including resistant strains, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The evaluation of the cytotoxicity of the most active compounds against human bronchial epithelial cells was performed in order to check their safety.

© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

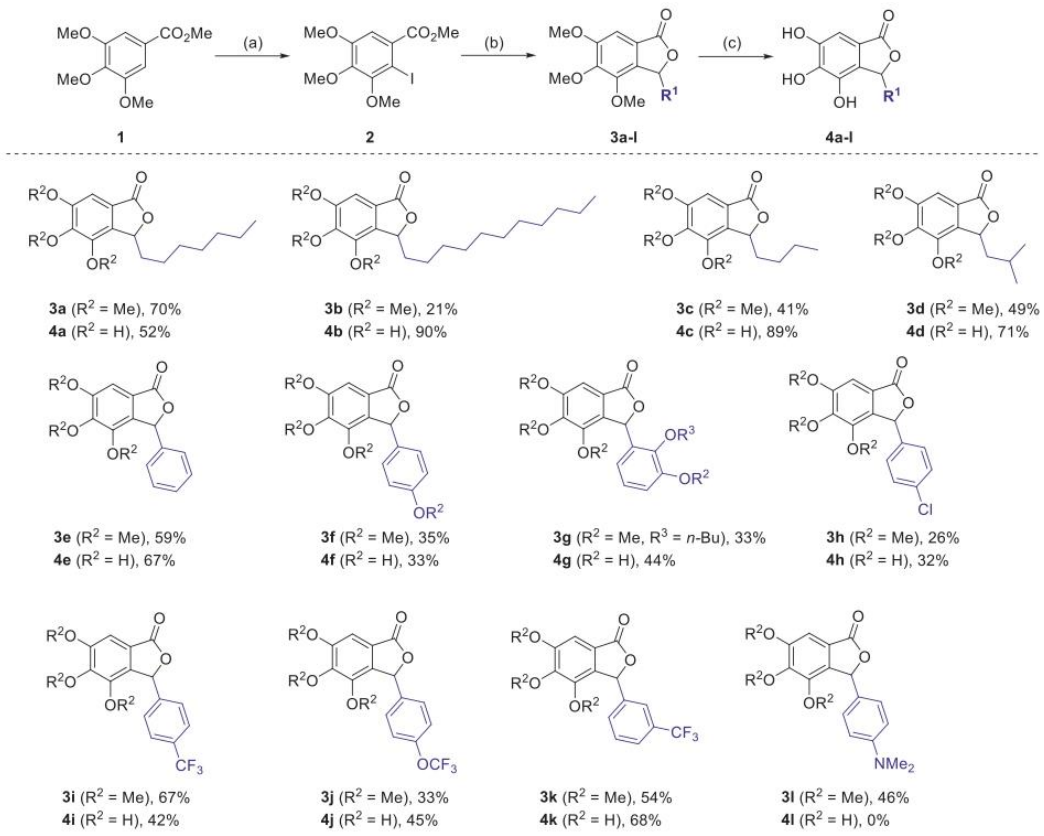
The discovery and the improvement of antibiotics has led to make considerably decrease the mortality rate by bacterial infections. However, the over-use of these drugs has resulted in a selection pressure on the bacteria, which have gradually mutated and thus led to the appearance of new generations of multi-resistant bacteria against all families of known antibiotics [1,2a,b]. In spite of the alert launched by the World Health Organization (WHO) and public authorities, the overuse of antibiotics is still topical and multi-resistant bacteria are becoming a worldwide public health problem which keep increasing the next decades if nothing is done [3]. Thus, Gram-positive *Staphylococcus aureus* and Gram-negative *Pseudomonas aeruginosa* are two representative pathogens of the multi-antibiotic resistance, which are very often the cause of nosocomial infections. They appeared as respectively high and critical threats according a recent report published by the WHO [3].

The research of new families of antibiotics, for which the structure can be inspired by natural compounds, is a strategy of interest to solve the problem of multidrug resistant bacteria (MDR) [4a–d]. In the last decade, our group developed synthetic pathways for the preparation of natural lactones such as phthalides, an important class of small oxygenated heterocycles which are widely represented in the area of natural compounds [5a,b,6]. Of the known natural phthalides reported in the literature, some of them exhibit interesting antibacterial activities, such as corollosporine [7], spirolaxine [8] or cytosporone E [9]. It is noteworthy the preparation of analogs of paecilocin A [10], corollosporine [11a,b]and spirolaxine [12a–c] was performed in order to improve their antibacterial activities (Fig. 1).

The cytosporone E was reported to exhibit antibacterial activities against Gram-positive, Gram-negative and drug-resistant strains with a reasonable cytotoxicity according to the cell line [13a–d]. To the best of our knowledge, the preparation of new analogs of this natural compound was never performed in order to improve its antibacterial activities. Considering the natural reported analogs of cytosporone E, the substituent on the position 3 has a strong influence on the biological activities since the introduction of hydroxyl group or the shortening of the heptyl chain to a methyl were deleterious for the antibacterial activity [13d,14]. We can then assume that certain modifications of the heptyl chain could conversely increase the antibacterial properties. In addition, previous works suggested the hydroxyl on the position 5 is es-

* Corresponding author.
E-mail address: julien.petrignet@univ-tours.fr (J. Petrignet).

https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.132135
0022-2860/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.



Scheme 1. Synthesis of the cytosporone E and analogs. (a) I_2, CF_3COOAg, $CHCl_3$, rt., 24h, 63%; (b) *i*PrMgCl.LiCl, THF −78°C, 30 min then R^1CHO −78°C to rt, overnight, 18-69%; (c) BBr_3 (1M in CH_2Cl_2, 6 to 10 equiv.), CH_2Cl_2, −20°C to rt, overnight. 15-90%.

sential for the antibacterial activity since 5-dehydroxycytosporone E did not showed any antimicrobial activity [9,15]. One can then wonder what would be the impact on the antibacterial properties of the replacement of both hydroxyls on positions 4 and 6 (Fig. 2). Besides, it was reported that the absolute configuration of C-3 has no impact on the antibacterial properties of cytosporone E since each enantiomer and the racemic mixture exhibited the same antibacterial activities [16].

Herein, we report in this paper a short and flexible synthesis of racemic cytosporone E and various analogs pharmacomodulated on the positions 3, 4 and 6, then the *in vitro* antibacterial evaluation of these new compounds against representative bacteria (including resistant strains) and the evaluation of the cytotoxicity of the most active compounds.

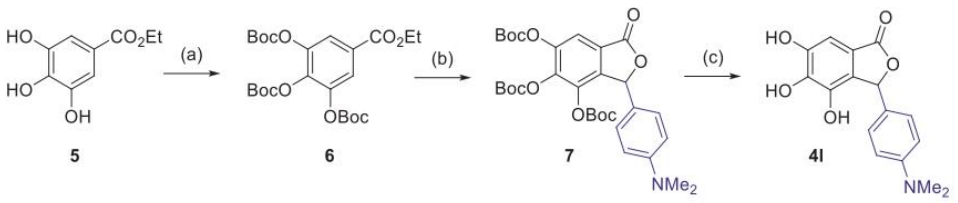
2. Results and discussion

2.1. Synthesis

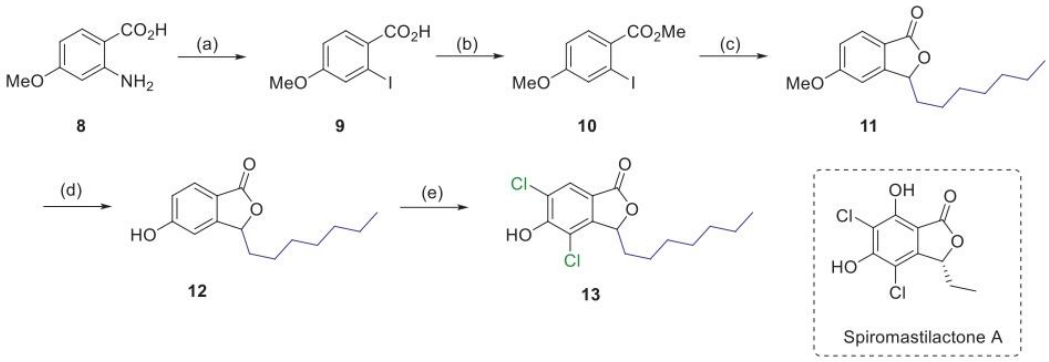
The literature abounds with numerous approaches for the preparation of phthalides, which are summarized in two recent reviews [5]. Noteworthy, the synthesis of C_3-functionnalized phthalides based on an iodine-magnesium exchange on *ortho*-iodobenzoate derivatives promoted by *i*PrMgCl.LiCl, followed by a condensation on an aldehyde, was reported as a straightforward and efficient strategy [10,17]. We considered including this methodology as a key step for the preparation of cytosporone E and its analogues (Scheme 1). Therefore, the *ortho*-iodobenzoate **2** was synthesised from **1** in presence of iodine and a stoichiometric amount of silver trifluoroacetate with 63% yield [18], A solution of *i*PrMgCl.LiCl in THF was prepared according to the reported procedure [17b], and used for the magnesium-iodine exchange after titration with standard method. The substrate scope could be extended to aliphatic and various aromatic aldehydes, with average to good overall yields in phthalides **3a-l**. The total demethylation was finally performed with an excess of boron tribromide (BBr_3) in DCM between −20 °C and room temperature to afford the trihydroxylated derivatives **4a-k** with modest to good yields ranged from 15 to 90 % (Scheme 1).

Because of its strong Lewis-acid nature, the boron tribromide mediated demethylation step was not compatible with *p*-dimethylaminophenyl group **3l** (formation of an amino-boron complex). An alternative synthetic pathway for the preparation of **3l** was performed (Scheme 2), based the *ortho*-metalation of activated aromatic ester with TMPMgCl.LiCl [19]. Thus, the hydroxyl functions of ethyl gallate **5** were protected by *t*-butylbenzyloxycarbonyl (Boc), which also plays the role of directing group. The ortho-metallation of **6** was performed with a commercial solution of TMPMgCl.LiCl at −40 °C in THF, and was followed by the addition of *p*-dimethylaminobenzaldehyde. The phthalide **7** was obtained with an average yield of 52%, and the Boc-deprotection (TFA, 20 °C, 15 min.) afforded the expected analogue **4l**.

We then performed the pharmacomodulation of the C-4 and C-6 hydroxyl substituents of the cytosporone E. The replacement of these hydroxyl by two hydrogen was achieved by the synthesis of the compound **12** (Scheme 3). The latter was prepared



Scheme 2. Synthesis of the analog 4l. (a) Boc_2O, Et_3N, DMAP, CH_2Cl_2, 0°C to rt, overnight, 97%; (b) TMPMgCl.LiCl, THF, −20°C, 3h then 4-dimethylaminobenzaldehyde, −40°C, 3h, 52%; (c) CF_3COOH, rt, 15 min, 81%.



Scheme 3. Synthesis of the analogs 12-13 (a) $NaNO_2$, H_2SO_4, 0°C, 20 min. then KI, rt, 2h, 53%; (b) MeI, DBU, acetonitrile, rt, 1h, 60%; (c) *i*PrMgCl.LiCl, THF −78°C, 30 min then octanal, −78°C to rt, overnight, 65%; (d) BBr_3 (1M in CH_2Cl_2, 3 equiv.), CH_2Cl_2, −20°C to rt, overnight. 56%; (e) SO_2Cl_2, iPr_2NH, toluene, 1h, 50°C, 43%.

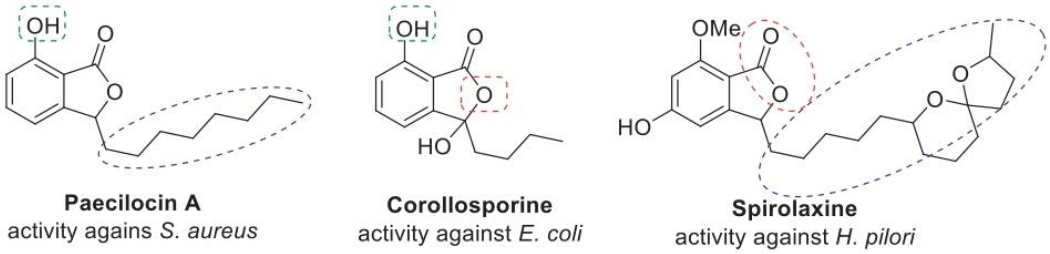


Fig. 1. Natural antibacterial phthalides with their reported pharmacomodulations.

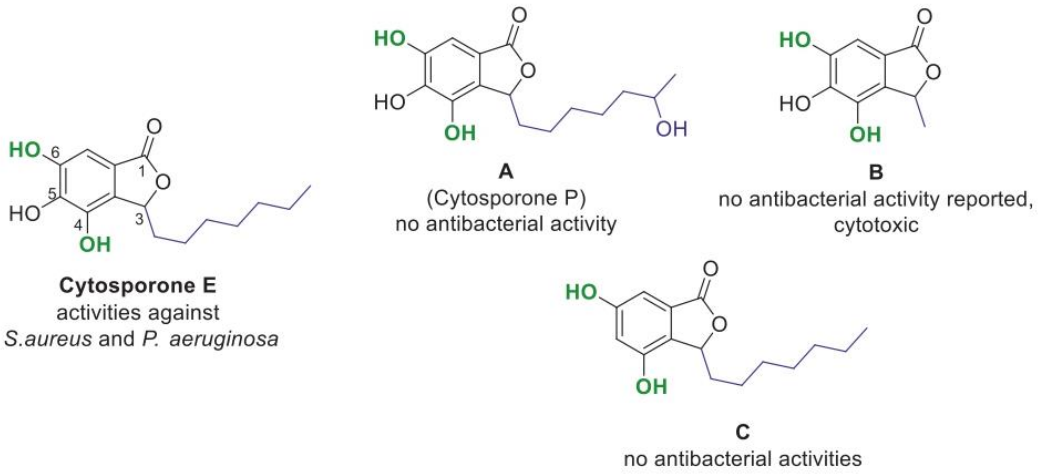
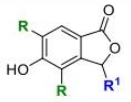


Fig. 2. Structure and biological activities of cytosporone E and some natural analogs

Table 1
Antibacterial activity of compounds 3a, 4a-l, 12 and 13 against *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* by broth microdilution



Entry	Compound	MIC in μg.mL^{-1} (μM)[a]				
		R	R^1	*S. aureus* ATCC29213	*E. coli* ATCC25922	*P. aeruginosa* PAO1
1	3a	OMe	*n*-heptyl	>200	>200	NT[b]
2	4a	OH	*n*-heptyl	6.25 (22)	>200	50 (176) [c]
3	4b	OH	*n*-undecyl	100 (298)	>200	>200
4	4c	OH	*n*-butyl	100 (420)	>200	>200
5	4d	OH	*sec*-butyl	100 (420)	>200	>200
6	4e	OH	C_6H_5	100 (388)	>200	>200
7	4f	OH	4-HOC_6H_4	>200	>200	>200
8	4g	OH	2,3-HOC_6H_3	>200	>200	>200
9	4h	OH	4-ClC_6H_4	100 (342)	>200	>200
10	4i	OH	4-$CF_3C_6H_4$	12.5 (38)	>200	>200
11	4j	OH	4-$OCF_3C_6H_4$	12.5(37)	>200	>200
12	4k	OH	3-$CF_3C_6H_4$	25 (76)	>200	>200
13	4l	OH	4-$NMe_2C_6H_4$	>200	>200	>200
14	12	H	*n*-heptyl	50 (202)	>200	>200
15	13	Cl	*n*-heptyl	12.5 (79)	>200	>200
16	Penicillin G	-	-	2 (12)	NT[b]	NT[b]
17	Imipenem	-	-	NT[b]	NT[b]	8 (26)

[a] Assay experiments were performed in triplicates at three independent times. [b] NT means not tested. [b] MBC = 100 μg.mL^{-1}

in a four step sequence starting from commercial 2-amino-4-methoxybenzoic acid **8** which transformed into the corresponding iodobenzoic acid **9** *via* a Sandmeyer reaction. The acid was then esterified into the corresponding methyl ester **10**, and the phthalide **11** was obtained using the iodine-magnesium exchange strategy with *i*PrMgCl.LiCl and octanal as electrophile. Finally, the demethylation of **11** was performed with an excess of BBr_3 to afford **12**. At this stage, **12** was easily transformed in presence of SO_2Cl_2 in toluene into the corresponding dichlorinated compound **13**, an analogue of spiromastilactone A, a recently discovered natural marine phthalide which exhibit a strong antiviral activity and a weak cytotoxicity [20].

2.2. Antibacterial activities

The antibacterial activities of **3a, 4a-l** against Gram-positive *Staphylococcus aureus* (methicillin sensitive strain) and two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) were evaluated *via* broth microdilution method in accordance with the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute [21]. Imipenem and penicillin G were used as positive controls for this antibacterial assays. The Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) of these compounds are reported in Table 1.

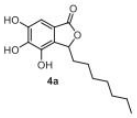
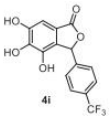
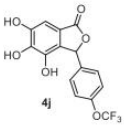
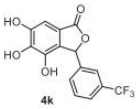
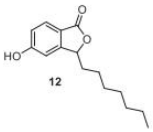
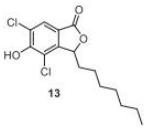
Although the importance of the trihydroxybenzene motif for the antibacterial activity was already assumed [13a], it was confirmed herein as trimethylated cytosporone E **3a** did not show any antibacterial activity against the three strains (Entry 1). The synthetic cytosporone E **4a** showed a good antibacterial activity against *S. aureus* with a MIC of 6.25 μg.mL^{-1} (22 μM) but no activity against *E. coli* below 200 μg.mL^{-1} (Entry 2). These MIC values were consistent with those previously reported in the literature for the cytosporone E produced from the endophytic fungi. Interestingly, **4a** exhibited a moderate antibacterial activity against *P. aeruginosa*, with a bactericidal mode of action, as the minimal bactericidal concentration (MBC) was found to be at 100 μg.mL^{-1} (MBC/MIC < 4). It is noteworthy the extracted cytosporone E from the fungi did not exhibit activity below 150 μg.mL^{-1} against *P. aeruginosa* according to the literature data [13b].

The nature of the substituent on the position 3 (R^1) was found to be essential for the antibacterial activity. While none of the analogs **4b-l** showed antibacterial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* at concentrations below 200 μg.mL^{-1}, pharmacomodulations of the heptyl chain of **4a** had positive or negative effect on the antibacterial activity against *S. aureus* according to the nature of the substituent. Indeed, the elongation (**4b**), the shortening (**4c**) or the ramification (**4d**) of the alkyl chain were deleterious as the MIC value decreased to 100 μg.mL^{-1} (Entries 3–5). The replacement of the heptyl chain by a benzene ring (**4e**) had also a negative effect on the antibacterial activity, such as *para*-substituted phenyl group with hydroxy (**4f**), chlorine (**4h**) or dimethylamino (**4l**) (Entries 6–9, 13). Interestingly, a good antibacterial activity (MIC = 12.5 μg.mL^{-1}) was obtained with 4-trifluoromethyl (**4i**) and 4-trifluoromethoxy phenyl (**4j**) (Entries 10 and 11). We noticed that the position of the trifluoromethyl substituent on the aromatic ring (**4k**) had a slight effect on the antibacterial activity (Entry 12). The hydrogenated and chlorinated analogs **12** and **13** did not exhibit any activity against the Gram-negative strains. Besides, they were found to exhibit respectively a moderate and a good activity against *S. aureus* (Entries 14 and 15).

The antibacterial activities of compounds **4a, 4i-k, 12** and **13** toward methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA ATCC 29213) were then compared to two methicillin-resistant strains of *S. aureus* (MRSA NCTC 12493 and ATCC BAA-1026). The MIC and MBC of this assay are reported in the Table 2.

We observed that **4a** exhibited the same antibacterial activities toward MSSA and MRSA strains with a MIC = 6.25 μg.mL^{-1} and MBC = 12.5 μg.mL^{-1}, such ratio (MBC/MIC = 2) suggested a bactericidal effect (Entry 1). Trifluoromethylated compounds **4i-k** showed similar antibacterial profiles, with no significant difference of activity between the sensitive and the resistant strains (Entries 2-4). **4i** and **4k** were found to be 2 times more active on against MRSA than MSSA. However, we were surprised to observe than **12** and **13** were strongly more active against MRSA strains compared to the sensitive one. Indeed, **12** was eight times less active than **4a** on the MSSA strain, but exhibited the same MIC and MBC values than **4i-k** toward the resistant strains (Entry 5). The chlorinated compound **13** showed a MIC of 12.5 μg.mL^{-1} toward

Table 2
Minimum Inhibitory and Bactericidal Concentrations (in μg.mL^{-1}) of compounds 4a, 4i-k, 12 and 13 against MSSA and MRSA strains

Entry	Compound	MSSA ATCC29213		MRSA NCTC12493		MRSA BAA-1026	
		MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	 4a	6.25	12.5	6.25	12.5	6.25	12.5
2	 4i	12.5	50	6.25	25	6.25	25
3	 4j	12.5	25	12.5	25	12.5	25
4	 4k	25	25	12.5	25	12.5	25
5	 12	50	100	12.5	25	12.5	25
6	 13	12.5	>100	1.25	25	1.25	25
7	Penicilin G	2	n.d.	>64	n.d.	>64	n.d.

MSSA and was ten times more active on both MRSA strains. The MBC values suggested that **13** was bacteriostatic, unlike the others analogs tested. These MIC values were compared to those obtained with penicillin G, for which the MRSA strains are resistant (MIC > 64 μg.mL^{-1}, Entry 7).

2.3. Cytotoxicity

The cytotoxicity of compounds which exhibited the best antibacterial activities against MRSA (**4a, 4i–k, 12** and **13**) was evaluated against Beas-2B cells. This human bronchial epithelial cell-line is known to be very sensitive toward exogenous compounds. Starting from a mother solution of each compound diluted in DMSO at 3 mg.mL^{-1}, dilutions to 25, 12.5, 6.25, 3.1 μg.mL^{-1} (and 1.5 μg.mL^{-1} for compound **13**) were made using FK12 medium without FCS. The cells were incubated during 48h in the presence of different concentration of each compound and the cell viability was evaluated by MTS assays. The IC_{50} are reported in the Table 3 and was compared to their MIC against MRSA expressed in μM. While **4j, 4k** and **12** have IC_{50} values close to their MIC value, compounds **4a, 4i** and **13** have an interesting biological profile since their IC_{50} value is three to four times higher than their MIC against MRSA.

The cytotoxicity of **4a** and **4i** were then compared to each other at range of concentrations between 25 and 3.1 μg.mL^{-1} (Fig. 3A). It is noteworthy the cells alone were considered the maximum with 100% cell viability, but due to the sensibility of the cells to the solvent, the control was performed with DMSO at 1/30th. It has been confirmed that **4a** was not cytotoxic at its MIC value, since more than 80% of cell viability was observed at concentrations below 6.25 μg/mL. **4i** showed a similar profile since more than 80% cell viability was observed at concentrations below 6.25 μg/mL, with a decrease in the cell-toxicity at 25 μg/mL (66% of cell viability against 29% for **4a**).

We finally evaluated the cytotoxicity of **13**, the most promising product under two different conditions (Fig. 3B). The first condition consisted to use, as previously, a solution of **13** in DMSO at 3 mg/mL to perform the dilution range (see experimental section). In such conditions, an ambiguity subsisted on the toxicity at it MIC against MRSA (1.25 μg.mL^{-1}) since 74% of cell viability was

Table 3
Summary of cytotoxicity against Beas-2B cells and activity against methicillin-resistant *S. aureus* of compounds 4a, 4i-k, 12 and 13

Compound	IC_{50} Beas-2B cells (μM)	MIC against MRSA (μM)
4a	66.4	22.3
4i	87.1	19.2
4j	41.5	36.5
4k	31.3	38.3
12	58.4	50.4
13	15.9	3.9

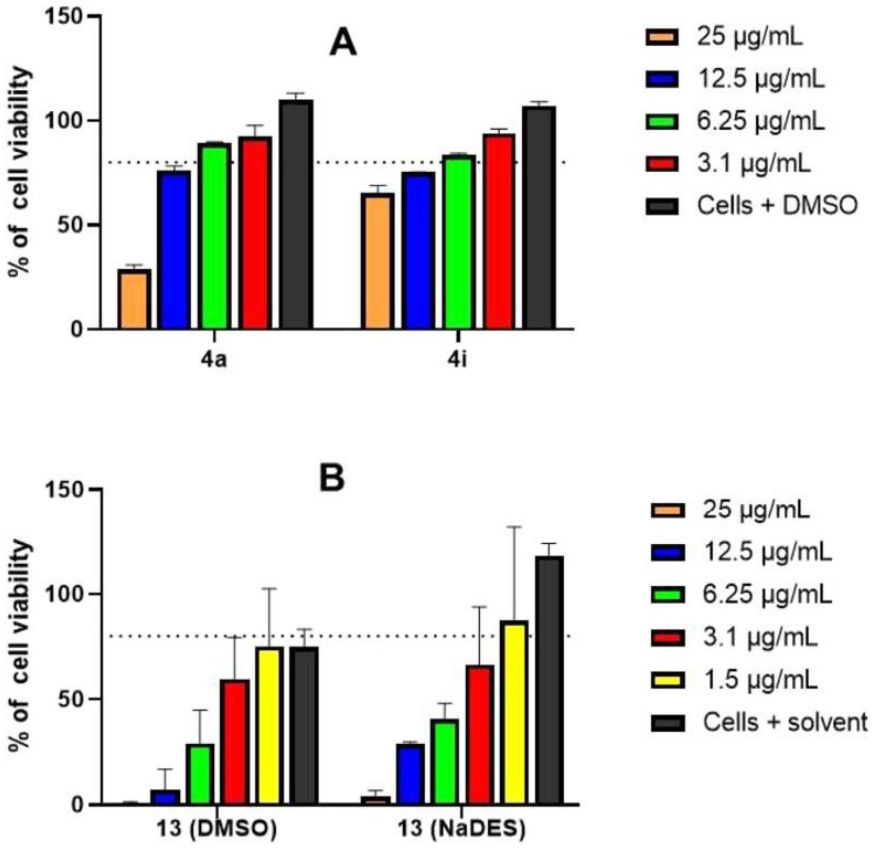


Fig. 3. Evaluation of phthalides cytotoxicity on Beas-2B cells by MTS at different concentrations. A: Compounds 4a and 4i ($n = 2$). B: compound 13 dissolved in DMSO ($n = 2$) and in NaDES glycerol-choline chloride ($n = 3$).

observed. In this assay, DMSO alone exhibited slight cytotoxicity since 74% of cell viability was observed. In the second condition, the DMSO was replaced by the NADES (NAtural Deep Eutectic Solvent) glycerol/choline chloride to prepare the mother solution of **13** at 3 mg.mL^{-1}. The dilution range was then performed in the same way, and we were pleased to observe more than 80% cell viability at 1.25 µg.mL^{-1} of **13** and no cytotoxic effect of the solvent alone, thus suggesting that 13 is not cytotoxic to its MIC against MRSA.

3. Conclusions

To conclude, we have developed a synthetic pathway for the preparation of racemic cytosporone E **4a** and various analogs (**4b-l, 12** and **13**) of this natural phthalide pharmacomodulated on positions 3, 4 and 6. All compounds were screened for their antibacterial activities against *S. aureus, E. coli* and *P. aeruginosa* using broth microdilution. This study revealed that these analogs did not show any antibacterial activity against the Gram-negative strains. However, several compounds showed significant antibacterial activity against methicillin-sensitive *S. aureus*, and were found to be 2 to 10 times more active on the methicillin-resistant of *S. aureus* compared to the sensitive strain. Among the most active derivatives, **4a, 4i** and **13** were evaluated for their cytotoxicity against human bronchial epithelial cells at different concentrations and found not toxic at their MIC value. Therefore, these new compounds constitute an interesting line of work in the fight against the antimicrobial resistance.

4. Experimental section

4.1. Chemistry

4.1.1. General chemical methods

All reactions were carried out under argon atmosphere. TLC spots were examined under UV light. The aldehydes were distilled before using. Silica gel (Geduran Si 60, 40–63 µm by Merck) was used for column chromatography. Acetonitrile, dichloromethane and chloroform (stabilized with amylene) were distilled from calcium hydride, tetrahydrofuran and diethyl ether were distilled from sodium/benzophenone. Other chemicals were obtained from commercial sources and were used without further purification.

NMR spectra were obtained at 300 MHz for ^{1}H, 75 MHz for ^{13}C, 282 MHz for ^{19}F with BRUKER AVANCE 300 spectrometer. Chemical shifts are given in parts per million (δ) relative to the residual peak of chloroform (7.26 ppm), dimethylsulfoxide (2.50 ppm), acetone (2.05) or methanol (3.31 ppm). Electrospray ionization mass spectrometry experiments (HRMS) were obtained on a hybrid tandem quadrupole/time-off light (Q-TOF) instrument, equipped with a pneumatically assisted electrospray (Z-spray) ion source (Micromass, Manshester, U.K.) operated in positive mode. The melting points were recorded on a "Stuart^{TM} melting point apparatus SMP3.

*4.1.2. Methyl 2-iodo-3,4,5-trimethoxybenzoate (**2**) [22]*

A dry and argon-flushed round bottom flask was charged with a solution of methyl 3,4,5-trimethoxybenzoate **1** (5.0 g, 22.1 mmol, 1 equiv.) and silver trifluoroacetate (5.1 g, 23.0 mmol, 1.04 equiv.) in dry chloroform (60 mL). Iodine (5.8 g, 23.0 mmol, 1.04 equiv.) was added in small portions over a period of 30 min and the dark pink solution was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was filtered over a pad of Celite®, the filtrate was diluted with CH_2Cl_2 (50 mL) and was washed with a 5% aqueous solution of $Na_2S_2O_3$ (100 mL). The aqueous phase was washed with dichloromethane (3 × 50 mL). The combined organic phases were washed with brine (100 mL), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed under reduce pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using CH_2Cl_2 as eluent to afford the iodinated ester **2** (4.39 g, yield = 63%) as a white solid.

^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.17 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 166.9, 153.9, 153.4, 144.9, 131.0, 110.4, 83.9, 61.1, 60.8, 56.3, 52.5. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{11}H_{14}IO_5$: 352.9886; found. 352.9875.

4.1.3. Preparation of iPrMgCl•LiCl solution [17b]

A dry and argon-flushed Schlenk tube was charged with anhydrous lithium chloride (2.1 g, 50 mmol, 1 equiv.) and magnesium turnings (1.3 g, 55 mmol, 1.1 equiv.). The solids were stirred under vaccum for 4 h at 150 °C. After cooling, dry THF (25 mL) was added followed by a solution of *iso*propyl chloride (4.6 mL, 50 mmol, 1 equiv.) in THF (25 mL). This suspension was stirred overnight at room temperature, and the resulting light grey solution was titrated according to Paquette method [23].

*4.1.4. Typical procedure for the preparation of compounds **3a-l***

A dry and argon-flushed flask equipped with a magnetic stirrer and a septum was charged with a solution of **2** (1 equiv.) in dry THF (10 mL) and was cooled at −78 °C. A solution of *i*PrMgCl•LiCl (1.3 equiv.) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 30 min at −78 °C. The corresponding aldehyde (1.3 equiv.)was added and the reaction mixture was slowly warm to room temperature and stirred overnight. The reaction mixture was hydrolysed with water (20 mL) and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel.

*4.1.4.1. 3-Heptyl-4,5,6-trimethoxyisobenzofuran-1(3H)-one (**3a**).* Following the above procedure using **2** (350 mg, 1.0 mmol, 1 equiv.), *i*PrMgCl•LiCl (1.73 mL, 0.75 M solution in THF, 1.3 mmol, 1.3 equiv), octanal (203 µL, 1.3 mmol, 1.3 equiv.) and THF (10 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (85:15) as eluent was performed to get the desired compound **3a** (225 mg, yield = 70%) as a white solid. Mp = 57–60 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.10 (*s*, 1 H), 5.44 (dd, *J* = 7.9 Hz, 3.0 Hz, 1 H), 3.96 (*s*, 3 H), 3.93 (*s*, 3 H), 3.90 (*s*, 3 H), 2.20–2.12 (*m*, 1 H), 1.74–1.65 (*m*, 1 H), 1.45–1.19 (*m*, 10 H), 0.85 (*t*, *J* = 6.0 Hz, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.6, 155.5, 147.6, 146.8, 135.4, 121.4, 102.5, 80.2, 61.2, 60.7, 56.4, 33.4, 31.7, 29.2, 29.0, 24.7, 22.6, 14.0.

*4.1.4.2. 4,5,6-Trimethoxy-3-undecylisobenzofuran-1(3H)-one (**3b**).* Following the above procedure using **2** (800 mg, 2.27 mmol, 1 equiv.), *i*PrMgCl•LiCl (2.95 mL, 1 M solution in THF, 2.95 mmol, 1.3 equiv.), dodecanal (654 µL, 2.95 mmol, 1.3 equiv.) and THF (20 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (85:15) as eluent was performed to get the desired compound **3b** (180 mg, yield = 21%) as a white solid. Mp = 58–61 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.11 (*s*, 1 H), 5.46 (dd, *J* = 7.9 Hz, 3.0 Hz, 1 H), 3.96 (*s*, 3 H), 3.93 (*s*, 3 H), 3.91 (*s*, 3 H), 2.27–2.07 (*m*, 1 H), 1.80–1.56 (*m*, 1 H), 1.36–1.14 (*m*, 18 H), 0.87 (*t*, *J* = 6.0 Hz, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.6, 155.5, 147.6, 146.8, 135.4, 121.4, 102.6, 80.2, 61.1, 60.8, 56.4, 33.4, 31.9, 29.59, 29.58, 29.51, 29.4, 29.3, 24.7, 22.7, 14.1. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{22}H_{34}O_5$: 379.24790; found: 397.24753.

*4.1.4.3. 3-Butyl-4,5,6-trimethoxy-isobenzofuran-1)3H)-one (**3c**).* Following the above procedure using **2** (400 mg, 1.14 mmol), *i*PrMgCl•LiCl (3.3 mL, 0.45 M solution in THF, 1.48 mmol, 1.3 equiv.), pentanal (157 µL, 1.48 mmol, 1.3 equiv.) and THF (10 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (70:30) as eluent was performed to get the desired compound **3c** (130 mg, yield = 41%) as a white solid. Mp = 75–78 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.10 (*s*, 1 H), 5.45 (dd, *J* = 7.9 Hz, 3.0 Hz, 1 H), 3.96 (*s*, 3 H), 3.92 (*s*, 3 H), 3.90 (*s*, 3 H), 2.26–2.10 (*m*, 1 H), 1.78–1.57 (*m*, 1 H), 1.45–1.25 (*m*, 4 H), 0.88 (*t*, *J* = 6.0 Hz, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.6, 155.5, 147.6, 146.8, 135.4, 121.4, 102.5, 80.1, 61.1, 60.7, 56.3, 33.1, 26.7, 22.3, 13.8. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{15}H_{20}O_5$: 281.13835; found: 281.13790.

*4.1.4.4. 3-Isobutyl-4,5,6-trimethoxy-isobenzofuran-1(3H)-one (**3d**).* Following the above procedure using **2** (800 mg, 2.28 mmol, 1 equiv.), *i*PrMgCl•LiCl (6.6 mL, 0.45 M solution in THF, 2.97 mmol, 1.3 equiv.), *iso*butyraldehyde (314 µL, 2.96 mmol, 1.3 equiv.) and THF (20 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (70:30) as eluent was performed to get the desired compound **3d** (310 mg, yield = 49%) as a white solid. Mp = 55-58 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.11 (*s*, 1 H), 5.48 (dd, *J* = 10.1 Hz, 1.7 Hz, 1 H), 3.97 (*s*, 3 H), 3.93 (*s*, 3 H), 3.91 (*s*, 3 H), 2.02–1.90 (*m*, 2 H), 1.56–1.48 (*m*, 1H), 1.06 (*d*, *J* = 6.0 Hz, 3 H), 0.96 (*d*, *J* = 6.0 Hz, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.4, 155.4, 147.5, 146.8, 135.9, 121.1, 102.4, 78.7, 61.0, 60.7, 56.3, 42.9, 25.1, 23.5, 21.6. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{15}H_{20}O_5$: 281.13835; found: 281.13792.

*4.1.4.5. 4,5,6-Trimethoxy-3-phenylisobenzofuran-1(3H)-one (**3e**).* Following the above procedure using **2** (400 mg, 1.14 mmol, 1 equiv.), *i*PrMgCl•LiCl (1.48 mL, 1.0 M solution in THF, 1.48 mmol, 1.3 equiv.), benzaldehyde (150 µL, 1.48 mmol, 1.3 equiv.) and THF (10 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (90:10) as eluent was performed to get the desired compound **3e** (200 mg, yield = 59%) as a white solid. Mp = 98–101 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.39–7.32 (*m*, 3 H), 7.29-7.24 (*m*, 2 H), 7.21 (*s*, 1 H), 6.35 (*s*, 1 H), 3.94 (*s*, 3 H), 3.91 (*s*, 3 H), 3.45 (*s*, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.4, 155.9, 147.9, 147.5, 136.3, 135.7, 129.2, 128.6 (2C), 127.4 (2C), 120.8, 102.6, 81.2, 61.0, 60.3, 56.4. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{17}H_{16}O_5$: 301.10705; found: 301.10664.

*4.1.4.6. 4,5,6-Trimethoxy-3-(4-methoxyphenyl)isobenzofuran-1(3H)-one (**3f**).* Following the above procedure using **2** (400 mg, 1.14 mmol, 1 equiv.), *i*PrMgCl•LiCl (2.96 mL, 0.5 M solution in THF, 1.48 mmol, 1.3 equiv.), *p*-anisaldehyde (180 µL, 1.48 mmol, 1.3 equiv.) and THF (10 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (85:15) as eluent was performed to get the desired compound **3f** (130 mg, yield = 35%) as a white solid. Mp = 95-103 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.19 (*s*, 1H), 7.17 (*d*, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.87 (*d*, *J* = 8.8 Hz, 2 H), 6.32 (*s*, 1 H), 3.94 (*s*, 3 H), 3.91 (*s*, 3 H), 3.80 (*s*, 3 H), 3.48 (*s*, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.4, 160.2, 158.8, 147.9, 147.4, 135.5, 128.8 (2C), 128.3, 121.0, 114.0 (2C), 102.6, 81.1, 61.1, 60.4, 56.4, 55.3. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{18}H_{18}O_6$: 331.11761; found: 331.11702.

*4.1.4.7. 4,5,6-3-(2-Butoxy-3-methoxyphenyl)-4,5,6-trimethoyisobenzofuran-1(3H)-one (**3g**).* Following the above procedure using **2** (500 mg, 1.44 mmol, 1 equiv.), *i*PrMgCl•LiCl

(3.74 mL, 0.5 M solution in THF, 1.87 mmol, 1.3 equiv.), 2-butoxy-3-methoxybenzaldehyde (389 mg, 1.87 mmol, 1.3 equiv.) and THF (20 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/Et_2O (85:15) as eluent was performed to get the desired compound **112g** (240 mg, yield = 42%) as a yellow oil. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.20 (*s*, 1 H), 6.99–6.88 (*m*, 2 H), 6.83 (*s*, 1 H), 6.41 (dd, *J* = 7.3 Hz, 1.8 Hz, 1 H), 4.14 (dd, *J* = 6.7 Hz, 2.3 Hz, 1 H), 3.98 (dd, *J* = 6.9 Hz, 2.2 Hz, 1 H),3.94 (*s*, 3 H), 3.90 (*s*, 3 H), 3.86 (*s*, 3 H), 3.50 (*s*, 3 H), 1.82–1.71 (*m*, 2 H), 1.57–1.42 (*m*, 2 H), 0.96 (*t*, *J* = 7.4 Hz, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.83, 155.81, 153.06, 147.98, 147.64, 147.36, 135.44, 130.07, 124.04, 121.84, 119.87, 113.45, 102.60, 76.17, 74.04, 61.22, 60.32, 56.59, 55.99, 32.39, 19.31, 14.06. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{22}H_{29}O_7$: 403.17513; found: 403.17465.

*4.1.4.8. 3-(4-chlorophenyl)-4,5,6-trimethoxyisobenzofuran-1(3H)-one (**3h**).* Following the above procedure using **2** (400 mg, 1.14 mmol, 1 equiv.), *i*PrMgCl•LiCl (2.96 mL, 0.5 M solution in THF, 1.48 mmol, 1.3 equiv.), 4-chlorobenzaldehyde (207 µL, 1.48 mmol, 1.3 equiv.) and THF (10 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (80:20) as eluent was performed to get the desired compound **3h** (100 mg, yield = 26%) as a bright yellow solid. Mp = 82–85 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.34 (*d*, *J* = 8.3 Hz, 2 H), 7.24-7.18 (*m*, 3 H), 6.31 (*s*, 1 H), 3.94 (*s*, 3 H), 3.91 (*s*, 3 H), 3.53 (*s*, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.2, 161.3, 156.2, 147.8, 147.5, 134.9, 128.9 (2C), 128.7 (2 C), 128.3, 120.7, 102.6, 80.3, 61.1, 60.5, 56.5. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{17}H_{15}$ $^{35}ClO_5$: 335.06808; found: 335.06755.

*4.1.4.9. 4,5,6-Trimethoxy-3(4-(trifluoromethyl)phenyl)isobenzofuran-1(3H)-one (**3i**).* Following the above procedure using **2** (500 mg, 1.48 mmol, 1 euiv.), *i*PrMgCl•LiCl (3.85 mL, 0.5 M solution in THF, 1.93 mmol, 1.3 equiv.), 4-(trifluoromethyl)-benzaldehyde (263 μL, 1.93 mmol, 1.3 equiv.) and THF (20 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (70:30) as eluent was performed to get the desired compound **3i** (380 mg, yield = 70%) as a white solid. Mp = 104-107 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.63 (*d*, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 7.42 (*d*, *J* = 8.2 Hz, 2 H), 7.20 (*s*, 1 H), 6.38 (*s*, 1 H), 3.94 (*s*, 3 H), 3.90 (*s*, 3 H), 3.54 (*s*, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.0, 156.2, 147.7, 147.3, 140.3, 134.8, 130.7 (q, *J* = 32 Hz), 127.6 (2C), 125.6 (*q*, *J* = 3.2 Hz, 2C), 122.9 (*q*, *J* = 270 Hz) 120.4, 102.6, 80.0, 61.0, 60.3, 56.4. ^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ = –62.7. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{18}H_{15}$ F_3O_5: 369.09443; found: 369.09414.

*4.1.4.10. 4,5,6-Trimethoxy-3-(4-(trifluromethoxy)phenyl)isobenzofuran-1(3H)-one (**3j**).* Following the above procedure using **2** (500 mg, 1.44 mmol, 1 equiv.), *i*PrMgCl•LiCl (3.74 mL, 0.5 M solution in THF, 1.87 mmol, 1.3 equiv.), 4-(trifluoromethoxy)-benzaldehyde (262 µL, 1.84 mmol, 1.3 equiv.) and THF (20 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (80:20) as eluent was performed to get the desired compound **3j** (330 mg, yield = 60%) as a white solid. Mp = 97–100 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.32 (*d*, *J* = 8 Hz, 2H), 7.25–7.17 (*m*, 3 H), 6.34 (*s*, 1 H), 3.94 (*s*, 3H), 3.91 (*s*, 3 H), 3.53 (*s*, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.1, 156.2, 149.6 (q, *J* = 3.2 Hz), 147.8, 147.4, 135.2, 135.1, 128.9 (2C), 121.0 (2C), 120.6, 120.4 (*q*, *J* = 256 Hz), 102.7, 80.1, 61.1, 60.3, 56.5. ^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ = −57.9. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{18}H_{15}$ F_3O_6: 385.08935; found: 385.08886.

*4.1.4.11. 4,5,6-Trimethoxy-3-(3-(trifluromethyl)phenyl)isobenzofuran-1(3H)-one (**3k**).* Following the above procedure using **2** (830 mg, 2.35 mmol, 1 equiv.), *i*PrMgCl•LiCl (6.12 mL, 0.7 M solution in THF, 3.06 mmol, 1.3 equiv.), 3-(trifluromethyl)benzaldehyde (409 μL, 3.06 mmol, 1.3 equiv.) and THF (20 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (80:20) as eluent was performed to get the desired compound **3k** (510 mg, yield = 54%) as a yellow solid. Mp = 86-89°C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.64-7.55 (*m*, 2 H), 7.52–7.44 (*m*, 2 H), 7.21 (*s*, 1 H), 6.38 (*s*, 1 H), 3.95 (*s*, 3 H), 3.90 (*s*, 3 H), 3.52 (*s*, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.1, 156.3, 147.8, 147.5, 137.6, 134.8, 131.1 (*q*, *J* = 32.5 Hz), 130.4, 129.2, 125.8 (q, *J* = 3.7 Hz), 124.2 (q, *J* = 3.9 Hz), 124.1 (q, *J* = 270 Hz), 120.5, 102.7, 80.1, 61.1, 60.3, 56.5. ^{19}F NMR (282 MHz, $CDCl_3$) δ = −62.7. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{18}H_{15}$ F_3O_5: 369.09443; found: 369.09406.

*4.1.4.12. 3-(4-(Dimethylamino)phenyl)-4,5,6-trimethoxyisobenzofuran-1(3H)-one (**3l**).* Following the above procedure using **2** (400 mg, 1.14 mmol, 1 equiv.), *i*PrMgCl•LiCl (2.96 mL, 0.5 M solution in THF, 1.48 mmol, 1.3 equiv.), 4-(dimethylamino)benzaldehyde (222 mg, 1.48 mmol, 1.3 equiv.) and THF (10 mL). Chromatography on silica gel with Petroleum ether/EtOAc (80:20) as eluent was performed to get the desired compound **3h** (180 mg, yield = 46%) as a yellow solid. Mp = 113–116 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.19 (s, 1H), 7.08 (*d*, *J* = 8.8 Hz, 2 H), 6.66 (*d*, *J* = 8.8 Hz, 2 H), 6.31 (*s*, 1 H), 3.94 (*s*, 3 H), 3.91(*s*, 3 H), 3.50 (*s*, 3 H), 2.95 (*s*, 6 H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.7, 155.6, 151.1, 148.0, 147.3, 135.6, 128.6 (2C), 123.2, 121.4, 112.1 (2C), 102.5, 81.8, 61.1, 60.4, 56.4, 40.4 (2C). HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{19}H_{22}NO_5$: 344.1493; found: 344.1488.

*4.1.5. Typical procedure for the preparation of compounds **4a-k***

A dry and argon-flushed flask equipped with a magnetic stirrer and a septum was charged with a solution of phthalide **3a-k** (1 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (5 mL) and was cooled at −30 °C. A solution of BBr_3 (6 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred overnight. The reaction mixture was hydrolysed with water (20 mL) and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel.

*4.1.5.1. 3-Heptyl-4,5,6-trihydroxyisobenzofuran-1(3H)-one (**4a**).* Following the above procedure using **3a** (322 mg, 1.0 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (6 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 6 mmol, 6 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Chromatography on silica gel with dichloromethane/methanol (95:5) as eluent was performed to get the desired compound **4a**, (45 mg, yield = 52%) as a white solid. . Mp = 170–173 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ = 9.03 (*s*, 1 H), 9.39 (*s*, 1 H), 6.83 (*s*, 1 H), 5.44 (dd, *J* = 7.7 Hz, 3.0 Hz, 1 H), 2.30–2.22 (*m*, 1 H), 1.78–1.65 (*m*, 1 H), 1.45–1.20 (*m*, 10 H), 0.87 (*t*, *J* = 6.8 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ = 170.2, 146.8, 139.7, 138.8, 129.5, 117.1, 102.0, 79.2, 32.9, 31.6, 29.2, 29.0, 24.5, 22.4, 13.4.

*4.1.5.2. 4,5,6-trihydroxy-3-undecylisonenzofuran-1(3H)-one (**4b**).* Following the above procedure using **3b** (96 mg, 0.25 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (1.5 mL, 1 M in CH_2Cl_2,1.5 mmol, 6 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Chromatography on silica gel with dichloromethane/methanol (95:5) as eluent was performed to get the desired compound **4b** (80 mg, yield = 90%) as a white solid. Mp = 157–160 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ = 9.02 (*s*, 1 H), 8.33 (*s*, 1 H), 8.25(*s*, 1 H), 6.83 (*s*, 1 H), 5.43 (dd, *J* = 7.7 Hz, 3.0 Hz, 1 H), 2.32–2.18 (*m*, 1 H), 1.77–1.65 (*m*, 1 H), 1.45–1.23 (*m*, 18 H), 0.87 (*t*, *J* = 6.7 Hz, 3 H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ = 170.1, 146.8, 139.7, 138.7, 129.5, 117.2, 102.0, 79.2, 33.0, 31.7, 29.5 (2C), 29.4, 29.33, 29.2 (2C), 24.6, 22.4, 13.4. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{19}H_{28}$ O_5: 337.20095; found: 337.20048.

*4.1.5.3. 3-butyl-4,5,6-trihydroxyisobenzofuran-1(3H)-one (**4c**).* Following the above procedure using **3c** (70 mg, 0.25 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (1.5 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 1.5 mmol, 6 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Chromatography on silica gel with

dichloromethane/methanol (95:5) as eluent was performed to get the desired compound **4c** (54 mg, yield = 89%) as a white solid. Mp = 132-135°C. ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ = 9.09 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 5.44 (dd, J = 7.6, 2.9 Hz, 1H), 2.25 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.32 (m, 4H), 0.90 (t, J = 6.8 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ = 170.3, 146.9, 139.7, 138.9, 129.4, 117.0, 102.0, 79.3, 32.6, 26.7, 22.2, 13.4. HRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ $C_{12}H_{14}O_5$: 239.09140; found: 239.09094.

*4.1.5.4. 4,5,6-trihydroxy-3-isobutylisobenzofuran-1(3H)-one (**4d**).* Following the above procedure using **3d** (100 mg, 0.36 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (2.16 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 2.16 mmol, 6 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Chromatography on silica gel with dichloromethane/methanol (95:5) as eluent was performed to get the desired compound **4d** (60 mg, yield = 71%) as a white solid. Mp = 197-200°C. ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ 9.07 (s, 1H), 8.39 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 5.47 (dd, J = 9.9, 2.5 Hz, 1H), 2.13 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.48 (m, 1H), 1.04 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ = 170.1, 146.8, 139.7, 138.8, 130.1, 116.8, 102.0, 77.9, 42.4, 25.1, 23.0, 21.3. HRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ $C_{12}H_{14}$ O_5: 239.09140; found: 239.0909.

*4.1.5.5. 4,5,6-trihydroxy-3-phenylisobenzofuran-1(3H)-one (**4e**).* Following the above procedure using **3e** (120 mg, 0.40 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (2.4 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 2.4 mmol, 6 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Filtration over a plug of silica using ethyl acetate as eluant was performed to get the desired compound **4e** (70 mg, yield = 67%) as black solid. Mp = 234-237°C. ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ = 9.12 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.38-7.31 (m, 5H), 6.93 (s, 1H), 6.40 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ = 170.6, 147.8, 145.0, 140.8, 138.0, 129.2, 129.0 (2C), 128.1 (2C), 117.4, 102.6, 81.0. HRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ $C_{14}H_{10}O_5$: 259.06010; found: 259.05973.

*4.1.5.6. 4,5,6-trihydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)isobenzofuran-1(3H)-one (**4f**).* Following the above procedure using **3f** (100 mg, 0.33 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (1.98 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 1.98 mmol, 6 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Filtration over a plug of silica using ethyl acetate as eluant was performed to get the desired compound **4f** (33 mg, yield = 33%) as dark solid. Mp > 250°C (decomposition). ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ = 9.12 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.38-7.31 (m, 5H), 6.93 (s, 1H), 6.40 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ = 170.2, 157.9, 147.4, 140.2, 139.5, 129.1 (2C), 129.0, 128.2, 116.7, 115.2 (2C), 101.8, 80.4. HRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ $C_{14}H_{11}O_6$: 275.0550; found: 275.0546.

*4.1.5.7. 3-(2,3-dihydroxyphenyl)-4,5,6-trihydroxyisobenzofuran-1(3H)-one (**4g**).* Following the above procedure using **3g** (100 mg, 0.25 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (2 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 2 mmol, 8 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Chromatography on silica gel with dichloromethane/methanol (90:10) as eluent was performed to get the desired compound **4g** (30 mg, yield = 44%) as dark brown solid.

Mp = 180-190°C. ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ = 8.45 (s, 5H), 6.92 (s, 1H), 6.86 (dd, J = 7.9 Hz, 1.5 Hz, 1H), 6.78 (s, 1H), 6.67 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.43 (dd, J = 7.9 Hz, 1.5 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ = 171.3, 148.1, 145.8, 144.2, 140.6, 139.8, 129.5, 124.9, 120.8, 118.8, 118.0, 116.3, 103.2, 75.9. HRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ $C_{14}H_{10}$ O_7: 29104993; found: 291.04940.

*4.1.5.8. 3-(4-(chlorophenyl)-4,5,6-trihydroxy-isobenzofuran-1(3H)-one (**4h**).* Following the above procedure using **3h** (100 mg, 0.29 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (1.74 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 1.74 mmol, 6 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Chromatography on silica gel with dichloromethane/methanol (95:5) as eluent was performed to get the desired compound **127l** (27 mg, yield = 32%) as a brownish white solid. Mp = 185-188°C. ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ = 9.43 (br s, 1H), 8.52-8.31 (br s, 2H), 7.42 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.92 (s, 1H), 6.41 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ = 170.0, 147.5, 140.1, 139.4, 136.4, 133.9, 129.3 (2C), 128.6, 128.5 (2C), 116.5, 102.1, 79.4. HRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ $C_{14}H_{10}ClO_5$: 293,0211; found: 293.0217.

*4.1.5.9. 4,5,6-trihydroxy-3(4-(trifluoromethyl)phenyl)isobenzofuran-1(3H)-one (**4i**).* Following the above procedure using **3i** (160 mg, 0.43 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (2.58 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 2.58 mmol, 6 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Chromatography on silica gel with dichloromethane/methanol (95:5) as eluent was performed to get the desired compound **4i** (60 mg, yield = 42%) as brownish white solid. Mp = 233-236°C. ^{1}H NMR (300 MHz, methanol-d_4) δ = 7.66 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.49 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 6.89 (s, 1H), 6.46 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, methanol-d_4) δ = 170.8, 146.6, 140.0, 139.0, 138.0, 129.1 (q, J = 32.3 Hz), 127.4, 126.6 (2C), 123.8 (q, J = 3.8 Hz, 2C), 122.9 (q, J = 270.0 Hz), 114.0, 100.4, 79.0. ^{19}F NMR (282 MHz, methanol-d_4) δ = −64.1. HRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ $C_{15}H_9F_3O_5$: 327.04748; found: 327.04696.

*4.1.5.10. 4,5,6-Trihydroxy-3(4-(trifluoromethoxy)phenyl)isobenzofuran-1(3H)-one (**4j**).* Following the above procedure using **3j** (150 mg, 0.39 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (2.34 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 2.34 mmol, 6 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Chromatography on silica gel with dichloromethane/methanol (95:5) as eluent was performed to get the desired compound **4j** (60 mg, yield = 45%) as a white solid.

Mp = 155-158°C. ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ = 8.64 (s, 3H), 7.48 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.35 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.93 (s, 1H), 6.47 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ = 169.8, 149.1 (q, J = 2.2 Hz), 147.4, 140.1, 139.3, 136.7, 129.4 (2C), 128.7, 121.0 (2C), 120.5 (J = 254 Hz), 116.6, 102.2, 79.3. ^{19}F NMR (282 MHz, acetone-d_6) δ = −58.6. HRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ $C_{15}H_9F_3O_6$: 343.04240; found: 343.04186.

*4.1.5.11. 4,5,6-trihydroxy-3(3-(trifluoromethyl)phenyl)isobenzofuran-1(3H)-one (**4k**).* Following the above procedure using **3k** (282 mg, 0.77 mmol, 1 equiv.), BBr_3 (4.62 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 2.62 mmol, 6 equiv.) and CH_2Cl_2 (5 mL). Chromatography on silica gel with dichloromethane/methanol (90:10) as eluent was performed to get the desired compound **4k** (170 mg, yield = 68%) as brown solid. Mp = 233-236°C. ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ = 9.20 (br s, 1H), 8.48 (br s, 1H), 8.28 (br s, 1H), 7.75-7.69 (m, 2H), 7.66-7.62 (m, 2H), 6.95 (s, 1H), 6.55 (s, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ = 169.8, 147.4, 140.0, 139.1, 138.9, 132.1, 130.2 (q, J = 32 Hz), 129.5, 128.4, 125.4 (q, J = 3.7 Hz), 124.3 (q, J = 270.0 Hz), 124.2 (J= 3.7 Hz), 116.5, 102.3, 79.3. ^{19}F NMR (282 MHz, acetone-d_6) δ = −63.1. HRMS (ESI): m/z calcd for $[M+H]^+$ $C_{15}H_9F_3$ O_5: 327.04748; found: 327.04700.

*4.1.6. Ethyl 3,4,5-tri((tert-butoxycarbonyl)oxy benzoate (**6**)*

A dry and argon-flushed round bottom flask was charged with a solution of ethyl gallate **5** (2.97 g, 15 mmol, 1 equiv.) in dried dichloromethane (50 mL) and stirred at 0°C, then trimethylamine (1.5 mL, 20 mmol, 1.3 equiv.), DMAP (244 mg, 2 mmol, 0.1 equiv.) and Boc_2O (11.7g, 54 mmol, 3.6 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred overnight at room temperature and saturated aqueous solution of NH_4Cl (40 mL) was added. The aqueous phase was washed with dichloromethane (3 × 100 mL). The combined organic phases were washed with brine (100 mL), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed under reduce pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using petroleum ether/diethyl ether (85:15) as eluent to afford the compound **6** (7.2 g, yield = 97%) as a white solid. Mp = 77-80°C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.84 (s, 1H), 4.36 (q, J = 7.2 Hz,

2H), 1.69-1.46 (m, 27H), 1.37 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 164.5 150.1, 148.8, 143.7, 138.9, 128.2, 121.7, 84.5, 84.4, 61.6, 27.6, 25.5, 14.3.

*4.1.7. Tri-tert-butyl(3-(4-(dimethylamino)phenyl)-1-oxo-1,3-dihydroisobenzofuran-4,5,6-triyl)tricarbonate (**7**)*

A dry and argon-flushed round bottom flask was charged with a solution of **6** (400 mg, 0.8 mmol, 1 equiv.) in dry THF (4 mL). The mixture was stirred under argon atmosphere at –20°C and TMP.MgCl.LiCl (0.88 mL, 0.88 mmol, 1.1 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred for 3 h at –40°C and 4-(dimethyl amino)benzaldehyde (180 mg, 1.2 mmol, 1.5 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred for 3 h at –40°C and saturated aqueous solution of NH_4Cl (30 mL) was added at –40°C. The aqueous phase was washed with dichloromethane (3 × 30 mL). The combined organic phases were washed with brine (50 mL), dried over $MgSO_4$ and solvent was removed under reduce pressure. The residue was purified by flash chromatography using petroleum ether: diethyl ether (80:20) as eluent to afford compound **7** (250 mg, yield= 52%) as a white solid. Mp = 110-113°C^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ= 7.78 (s, 1H), 7.04(d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.62(d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.42 (s, 1H), 2.94 (s, 6H), 1.56 (s, 9H), 1.52 (s, 9H), 1.36 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ= 169.6, 151.4, 149.9, 148.6, 148.5, 145.2, 140.3, 139.4, 138.8, 129.1 (2C), 124.6, 120.5, 117.1, 112.2 (2C), 84.9, 84.8, 84.7, 82.3, 40.3 (2C), 27.6 (3C), 27.5 (3C), 27.4 (3C). HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{31}H_{39}NO_{11}$: 602.25959; found: 602.25876.

*4.1.8. 3-(4-(dimethylamino)phenyl)-4,5,6-trihydroxyisobenzofuran-1(3H)-one (**4l**)*

A dry and argon-flushed flask equipped with a magnetic stirrer and a septum was charged with a solution of **7** (200 mg, 0.33 mmol, 1 equiv.) in trifluoroacetic acid (3 mL) and stirred for 15 min. Excess trifluoroacetic acid was evaporated. Reaction mixture was filtered through a pad of silica gel. Compound **4l** (80 mg, yield= 81%) was obtained as a black solid. Mp = 120-123°C. ^{1}H NMR (300 MHz, acetone-d_6) δ= 8.15 (s, 3H), 7.18 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 8.7 Hz, 3H), 6.33 (s, 1H), 3.01 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, acetone-d_6) δ= 171.0, 149.6, 148.2, 141.0, 139.9, 130.0, 129.8, 129.7, 118.0, 115.8, 102.9, 81.2, 42.5. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{16}H_{15}NO_5$: 302.10230; found: 302.10189.

*4.1.9. 2-Iodo-4-methoxybenzoic acid (**9**) [24]*

A dry and argon-flushed three-neck round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, condenser, a bubbler and a bromine funnel was charged with a 50% aqueous solution of sulfuric acid (75 mL) and 4-methoxyantranilic acid **8** (6 g, 36 mmol, 1 equiv.) at 0°C. A solution of sodium nitrite (2.75 g, 30 mmol, 1.1 equiv.) in water (10 mL) was added dropwise and the temperature was kept below 5°C. After 10 min of stirring at 0°C, a solution of potassium iodide (8.25 g, 50 mmol, 1.4 equiv.) in water (20 mL) was added dropwise. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h then heated to 70°C until the nitrogen release was ceased. The reaction mixture was cooled to room temperature and then extracted with ethyl acetate (3 × 50 mL). The organic phases were combined and washed with water (2 × 50 mL) and brine (1 × 50 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure to afford **9** (5.32 g, yield = 53%) as yellow solid. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.05 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 8.9 Hz, 2.5 Hz, 1H), 3.87 (d, J = 7.8 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d6) δ = 166.9, 161.4, 132.1, 131.3, 127.2, 113.7, 96.0, 55.7.

*4.1.10. Methyl-2-iodo-4-methoxybenzoate (**10**) [25]*

A dry and argon-flushed round bottom flask equipped with a magnetic stirrer and a septum was charged with a solution of **9** (5 g, 18 mmol, 1 equiv.) in dry acetonitrile (40 mL). Iodomethane (1.46 mL, 23.4 mmol, 1.3 equiv.) and DBU (3.95 mL, 19.8 mmol, 1.1 equiv.) were successively added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The solvent was removed and the residue was diluted in ethyl acetate (50 mL). The organic phase was washed with water (3 × 50 mL), a aqueous solution of HCl 1 M (2 × 50 mL), a aqeous saturated solution of $NaHCO_3$ (2 × 50 mL) and brine (50 mL). The organic phase was the dried over $MgSO_4$, filtered and solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using petroleum ether/ethyl acetate (95:5) as eluent to afford **10** (3.11 g, yield = 60%) as clear oil. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.85 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.8, 2.6 Hz, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.83 (s, 3H). ^{13}C NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 166.0, 162.0, 132.5, 131.6, 127.0, 113.6, 95.6, 55.6, 52.1.

*4.1.11. 3-Heptyl-5-methoxyisobenzofuran-1(3H)-one (**11**)*

A dry and argon-flushed flask equipped with a magnetic stirrer and a septum was charged with a solution of **10** (500 mg, 1.7 mmol, 1 equiv.) in dry THF (10 mL) and was cooled at −78°C. A solution of *i*PrMgCl•LiCl (2.35 mL, 0.94 M solution in THF, 2.2 mmol, 1.3 equiv) was added dropwise and the reaction mixture was stirred for 30 min at −78°C. Then octanal (345 µL, 2.2 mmol, 1.3 equiv.) was added and the reaction mixture was slowly warm to room temperature and stirred overnight. The reaction mixture was hydrolysed with water (20 mL) and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using petroleum ether/ethyl acetate (90:10) as eluent to afford **11** (230 mg, yield = 52%) as clear oil. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.76 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.98 (dd, J = 8.5 Hz, 2.1 Hz, 1H), 6.81 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 5.35 (dd, J = 7.9 Hz, 4.0 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.96 (d, J = 4.1 Hz, 2H), 1.70 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 1.35-1.15 (m, 8H), 0.83 (d, J = 7.0 Hz, 3H).^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 170.8, 165.0, 153.3, 127.6, 118.9, 116.5, 106.3, 81.1, 56.2, 35.2, 32.1, 29.7, 29.5, 25.2, 23.0, 14.5. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{16}H_{22}O_3$: 236.1642; found. 263.1645.

*4.1.12. 3-Heptyl-5-hydroxylisobenzofuran-1(3H)-one (**12**)*

A dry and argon-flushed flask equipped with a magnetic stirrer and a septum was charged with a solution of **11** (191 mg, 0.73 mmol, 1 equiv.) in dry CH_2Cl_2 (10 mL) and was cooled at −40°C. A solution of BBr_3 (1.46 mL, 1 M in CH_2Cl_2, 1.46 mmol, 2 equiv.) was added and the reaction mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was hydrolysed with water (20 mL) and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over $MgSO_4$, and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using petroleum ether/ethyl acetate (60:40) as eluent to afford **12** (102 mg, yield = 56 %) as white solid. Mp = 83-86°C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.76 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 5.39 (dd, J = 7.7 Hz, 4.1 Hz, 1H), 2.07-1.94 (m, 1H), 1.80-1.68 (m, 1H), 1.53-1.40 (m, 2H), 1.40-1.20 (m, 8H), 0.87 (t, J = 6.4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 171.1, 161.5, 153.2, 127.6, 118.3, 117.3, 108.1, 81.0, 34.7, 31.7, 29.3, 29.1, 24.7, 22.6, 14.1. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{15}H_{20}O_3$: 249.1485; found. 249.1489.

*4.1.13. 4,6-Dichloro-3-heptyl-5-hydroxylisobenzofuran-1(3H)-one (**13**)*

A dry and argon-flushed flask equipped with a magnetic stirrer and a septum was charged with a solution of **12** (60 mg, 0.24 mmol, 1 equiv.) in toluene (5 mL), diisopropylamine (1 μL, 0.007 mmol, 0.03 equiv.) and sulfuryl chloride (36 μL, 0.44 mmol,

1.8 equiv.) were added successively. The reaction mixture was stirred at 70°C for 1 h, then cooled to room temperature and hydrolysed with methanol (5 mL) and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over $MgSO_4$ and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography on silica gel using dichloromethane (100%) as eluent to afford **13** (26 mg, yield = 43%) as white solid. Mp = 119-122°C. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ = 7.83 (s, 1H), 6.54 (s, 1H), 5.49 (dd, J = 7.7 Hz, 2.6 Hz, 1H), 2.40-2.25 (m, 2H), 1.87-1.74 (m, 2H), 1.40-1.15 (m, 8H), 0.86 (t, J = 6.3 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ = 168.2, 152.7, 147.4, 125.1, 123.0, 120.1, 115.1, 80.6, 32.0, 31.7, 29.1, 29.0, 24.4, 22.6, 14.1. HRMS (ESI): *m/z* calcd for $[M+H]^+$ $C_{15}H_{18}Cl_2O_3$: 317.0706; found. 317.0712.

4.2. Biology

4.2.1. Antibacterial assays

Tested compounds were dissolve in DMSO to get a mother solution of 3 mg/mL and then further dilutions were made in Mueller Hinton (MH) to get a range of tested concentration (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25. 3.125 µg.mL^{-1}). Broth microdilution method and numerations were used for the determination of minimal inhibitory and bactericidal concentrations (MIC and MBC).

4.2.1.1. Bacterial culture. *S. aureus* and *E. coli* strains were cultured on Luria-Bertani (LB) plates overnight. Several isolated colonies were suspended in 5 mL of MH media and grown overnight at 37°C, under agitation (200 rpm). Optical density (OD) was measured and then several dilutions of this fresh suspension were prepared in MH medium to obtain 2.10^5 CFU/mL (CFU for colony forming unit). The inoculum size was verified by plating 5-fold dilutions on LB plates and incubating overnight at 37°C for CFU counts.

Subculturing of PAO1 Lux strain was performed on TSA agar from an aliquot stored at −80°C. After one night at 37°C, few colonies were suspended in 3 mL of LB medium and incubated at 37°C, with agitation at 200 rpm, overnight. The next day, several dilutions were made in LB medium to obtain OD between 0.3-0.6. This dilution was then incubated at 37°C, with agitation for approximately 3 h, then it was centrifuged at 3000 *g* for 10 min, at 6°C. Then the bacterial pellet was suspended in MH and adjusted to an OD of 0.4, corresponding to 2.10^8 CFU/mL, which was then diluted to obtain a bacterial suspension containing 2.10^5 CFU/mL The inoculum size was verified by plating 100 μL 3-fold dilutions on TSA agars and incubating overnight at 37°C for CFU counts.

4.2.1.2. MIC and MBC evaluation. Hundred microliter/well of the bacterial suspension was inoculated into 96-well microtiter plate (Greiner Bio-One; Cellstar/*S. aureus* and *E. coli*), (Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France/*PAO*1). 100 µL/well of MH (control) or molecules was added in duplicate for each condition. The microtiter plate was incubated in Eon thermo-regulated spectrophotometer plate reader (BioTek Instruments / *S. aureus* and *E. coli*), (Tecan, Lyon, France / *PAO*1) for 24 h at 37°C in ambient air with continuous shaking. The absorbance at OD 600 nm was read at 30 min intervals. After MIC determination, corresponding to the first well without bacterial growth, the MBC was evaluated. For that purpose, 50 µL of each well were 5-fold diluted and each of dilutions were plated on a LB agar plate, which was then incubated at 37°C for 24 h. The MBCs were recorded as the lowest dilution that produced a ≥ 99.99% reduction in growth (≥4-log10 reduction in CFU/mL) in comparison to the initial inoculum. This test were performed in triplicate at three independent times.

4.2.2. Cytotoxicity assays

4.2.2.1. Culture, maintenance and preparation of Beas-2B cells. The Beas-2B line is a line of human bronchial epithelial cells transformed with the SV40 virus. These cells are adherent and become immortal. A culture medium F12Mix+Glutamax (Ref 31765-027 Gibco) was used, to which was added Fetal Bovine Serum (FBS) at 10% final as well as Penicillin-Streptomycin (P/S) at 1% final. This medium was called complete F12K medium. The cells were stored in complete F12K culture medium to which was added 10% DMSO, at −196°C. For their preparation, the cells were first thawed rapidly at 37°C with stirring. They were then diluted in 10 mL of complete medium before centrifugation at 150 g for 5 min, at 20°C. Once the supernatant has been removed, the cells were cultured in 75 cm² dishes in the presence of 15 mL of complete medium, then incubated at 37°C under a humid atmosphere in the presence of 5% CO_2. After 48 h of incubation, the medium was replaced with new complete medium. The medium was removed as the cell were at confluence and the cells were detached from the dish by the action of trypsin, an endoprotease which hydrolyzes peptide bonds. After rinsing the cell layer with 2 mL of trypsin, 3 mL were added and the flask was incubated 1 at 2 min at 37°C, under a humid atmosphere in the presence of 5% CO_2. After cell detachement the action of the trypsin was neutralized by the addition of 7 mL of complete medium. The cells were then transferred to a Falcon tube and 100 μL are taken in order to determine the total number of cells by the Malassez cell counting technique. Centrifugation of the tube was carried out for 5 min at 150 g, at 20°C. The supernatant has been removed and the cells were placed in culture at a rate of 300,000 in 15 mL of complete medium in a 75 cm² dish. The dish was then incubated at 37°C in a humid atmosphere in the presence of 5% CO_2.

4.2.2.2. Principle of the MTS test [26]. Cellular cytotoxicity is linked to cell survival. The latter can be evaluated by a colorimetric method based on the detection of the conversion of a tetrazolium derivative (MTS) by cells metabolically active, CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay Promega was used. Succinate dehydrogenases in cells reduce the yellow tetrazolium compound MTS, also called (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2*H*-tetrazolium, yellow into purple formazan, soluble in the culture medium. Thus, after incubation for 1 h, the intensity of the purple color is directly proportional to the number of living cells. A determination was carried out by measuring the absorbance of the formazan at 490 nm. The cytotoxicity was calculated as following: Cell viability (%) = [OD of exposed cells / (OD of control cells)] x 100. A compound was described as non-cytotoxic when the resulting cell viability is greater than 80%. The cells were seeded in a 96-well plate at a rate of 10 000 cells in 150 μL of medium. Some wells were not inoculated to serve as a positive control (control cells) for MTS. The cells were incubated for 48 h in a humid atmosphere in the presence of 5% CO_2, at 37°C. After incubation and verification of the confluence of the cells, the wells were washed with 200 μL of medium without FBS, then 100 μL of each compound were deposited per well, at a rate of 6 wells per compound (or dilution) tested. The MTS was diluted to 1/6 in FK12 without FBS and 100 μL were deposited in each well. The plate was then incubated for 1 h in a humid atmosphere in the presence of 5% CO_2, at 37°C. After the incubation was completed, the plate was placed in the Tecan spectrometer to measure the absorbance of the wells at 490 nm. The results were normalized against the control MTS and expressed as a percentage. This test was perfomed in duplicata at two independent times

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRediT authorship contribution statement

Walaa Ibraheem: Investigation. **Capucine Chaar:** Investigation. **Emilie Camiade:** Conceptualization, Supervision, Visualization. **Virginie Hervé:** Conceptualization, Supervision, Visualization. **Delphine Fouquenet:** Investigation, Validation. **Anne-Emmanuelle Roux:** Investigation. **Mustapha Si-Tahar:** Resources, Visualization. **Elhadi Ahmed:** Supervision. **Jérôme Thibonnet:** Resources, Visualization. **Emilie Thiery:** Conceptualization, Supervision, Visualization. **Julien Petrignet:** Conceptualization, Investigation, Supervision, Writing – review & editing.

Acknowledgments

We acknowledge Prof. Leslie Delaye-Boudescoque for her helpful discussion and for providing the NaDES solvent. We would also like to thank Dr. Frédéric Montigny (University of Tours) for mass spectra and HRMS and the French Ministry for Research and Innovation for the financial support.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.molstruc.2021.132135.

References

[1] C.L. Ventola, The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats, P T 40 (4) (2015) 277–283.
[2] (a) S.B. Levy, B. Marshall, Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, Nat. Med. 10 (2004) S122–S129, doi:10.1038/nm1145; (b) A.P. Magiorakos, A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice, J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, D.L. Monnet, Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, Clin. Microbiol. Infect. 18 (2012) 268–281, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
[3] E. Tacconelli, E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D.L. Monnet, C. Pulcini, G. Kahlmeter, J. Kluytmans, Y. Carmeli, M. Ouellette, K. Outterson, J. Patel, M. Cavaleri, E.M. Cox, C.R. Houchens, M.L. Grayson, P. Hansen, N. Singh, U. Theuretzbacher, N. Magrini, WHO Pathogens Priority List Working Group, Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis, Lancet Infect. Dis. 18 (2018) 318–327, doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
[4] (a) S. Gatadi, J. Gour, S. Nanduri, Natural product derived promising anti-MRSA drug leads: A review, Biorg. Med. Chem. 27 (2019) 3760–3774, doi:10.1016/j.bmc.2019.07.023; (b) C.G. Bologa, O. Ursu, T.I. Oprea, C.E. Melançon, G.P. Tegos, Emerging trends in the discovery of natural product antibacterials, Curr. Opin. Pharmacol. 13 (2013) 678–687, doi:10.1016/j.coph.2013.07.002; (c) R.H. Baltz, V. Miao, S.K. Wrigley, Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics, Nat. Prod. Rep. 22 (2005), doi:10.1039/b416648p; (d) Q. Kong, Y. Yang, Recent advances in antibacterial agents, Bioorg. Med. Chem. 35 (2021), doi:10.1016/j.bmcl.2021.127799.
[5] (a) R. Karmakar, P. Pahari, D. Mal, Phthalides and Phthalans: Synthetic Methodologies and Their Applications in the Total Synthesis, Chem.Rev. 114 (2014) 6213–6284, doi:10.1021/cr400524q; (b) A. Awasthi, M. Singh, G. Rathee, R. Chandra, Recent advancements in synthetic methodologies of 3-substituted phthalides and their application in the total synthesis of biologically active natural products, RSC Adv. 10 (2020) 12626–12652, doi:10.1039/d0ra00701c.
[6] A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons, Y. Asakawa & J. K. Liu (Eds.). (2017). Progress in the chemistry of organic natural products.
[7] K. Liberra, R. Jansen, U. Lindequist, Corollosporine, a new phthalide derivative from the marine fungus Corollospora maritima Werderm. 1069, Pharmazie 53 (1998) 578–581, doi:10.1002/chin.199847275.
[8] K.A. Dekker, T. Inagaki, T.D. Gootz, K. Kaneda, E. Nomura, T. Sakakibara, S. Sakemi, Y. Sugie, Y. Yamauchi, N. Yoshikawa, N. Kojima, CJ-12,954 and its congeners, new anti-Helicobacter pylori compounds produced by Phanerochaete velutina: fermentation, isolation, structural elucidation and biological activities, J. Antibiot. 50 (1997) 833–839, doi:10.7164/antibiotics.50.833.
[9] S.F. Brady, M.M. Wagenaar, M.P. Singh, J.E. Janso, J. Clardy, The Cytosporones, New Octaketide Antibiotics Isolated from an Endophytic Fungus, Org. Lett. 2 (2000) 4043–4046, doi:10.1021/ol006680s.
[10] W. Ibraheem, Q. Wils, E. Camiade, E. Ahmed, J. Thibonnet, E. Thiery, J. Petrignet, Synthesis and antibacterial activity of racemic paecilocin A and its derivatives against methicillin-sensitive and -resistant Staphylococcus aureus, Tetrahedron Lett. 67 (2021), doi:10.1016/j.tetlet.2021.152888.
[11] (a) H. Neumann, D. Strübing, M. Lalk, S. Klaus, S. Hübner, A. Spannenberg, U. Lindequist, M. Beller, Synthesis and antimicrobial activity of N-analogous corollosporines, Org. Biomol. Chem. 4 (2006) 1365, doi:10.1039/b517101f; (b) A. Mikolasch, S. Hessel, M.G. Salazar, H. Neumann, K. Manda, D. Gordes, E. Schmidt, K. Thurow, E. Hammer, U. Lindequist, M. Beller, F. Schauer, Synthesis of new N-analogous corollosporine derivatives with antibacterial activity by laccase-catalyzed amination, Chem. Pharm. Bull. 56 (2008) 781–786, doi:10.1248/cpb.56.781.
[12] (a) F.J. Radcliff, J.D. Fraser, Z.E. Wilson, A.M. Heapy, J.E. Robinson, C.J. Bryant, C.L. Flowers, M.A. Brimble, Anti-Helicobacter pylori activity of derivatives of the phthalide-containing antibacterial agents spirolaxine methyl ether CJ-12,954, CJ-13,013, CJ-13,102, CJ-13,104, CJ-13,108 and CJ-13,015, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 6179–6185, doi:10.1016/j.bmc.2008.04.037; (b) Z.E. Wilson, A.M. Heapy, M.A. Brimble, Synthesis of indole analogues of the anti-Helicobacter pylori compounds CJ-13,015, CJ-13,102, CJ-13,104 and CJ-13,108, Tetrahedron 63 (2007) 5379–5385, doi:10.1016/j.tet.2007.04.067; (c) I. Dimitrov, D.P. Furkert, J.D. Fraser, F.J. Radcliff, O. Finch, M.A. Brimble, Synthesis and anti-Helicobacter pylori activity of analogues of spirolaxine methyl ether, MedChemComm 3 (2012) 938, doi:10.1039/c2md00314g.
[13] (a) J.D. Hall, N.W. Duncan-Gould, N.A. Siddiqi, J.N. Kelly, L.A. Hoeferlin, S.J. Morrison, J.K. Wyatt, Cytosporone E: racemic synthesis and preliminary antibacterial testing, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 1409–1413, doi:10.1016/j.bmc.2004.10.018; (b) M.P. Singh, J.E. Janso, S.F. Brady, Cytoskyrins and Cytosporones Produced by Cytospora sp. CR200: Taxonomy, Fermentation and Biological Activities, Mar. Drugs 5 (2007) 71–84, doi:10.3390/md503071; (c) J. Beau, N. Mahid, W.N. Burda, L. Harrington, L.N. Shaw, T. Mutka, D.E. Kyle, B. Barisic, A. van Olphen, B.J. Baker, Epigenetic Tailoring for the Production of Anti-Infective Cytosporones from the Marine Fungus Leucostoma persoonii, Mar. Drugs 10 (2012) 762–774, doi:10.3390/md10040762; (d) J. Kornsakulkarn, W. Somyong, S. Supothina, N. Boonyuen, C. Thongpanchang, Bioactive oxygen-bridged cyclooctadienes from endophytic fungus Phomopsis sp. BCC 45011, Tetrahedron 71 (2015) 9112–9116, doi:10.1016/j.tet.2015.10.015.
[14] E.L. Mullady, W.P. Millett, H.D. Yoo, A.S. Weiskopf, J. Chen, D. DiTullio, V. Knight-Connoni, D.E. Hughes, W.E. Pierceall, A Phthalide with in Vitro Growth Inhibitory Activity from an Oidiodendron Strain, J. Nat. Prod. 67 (2004) 2086–2089, doi:10.1021/np040123n.
[15] T. Takano, T. Koseki, H. Koyama, Y. Shiono, A New Cytosporone Derivative from the Endophytic Fungus Cytospora sp, Nat. Prod. Commun. 9 (2014) 973–975, doi:10.1177/1934578x1400900723.
[16] T. Ohzeki, K. Mori, Synthetic Racemate and Enantiomers of Cytosporone E, a Metabolite of an Endophytic Fungus, Show Indistinguishably Weak Antimicrobial Activity, Biosci. Biotechnol. Biochem. 67 (2003) 2584–2590, doi:10.1271/bbb.67.2584.
[17] (a) J.T. Kuethe, K.M. Maloney, A concise synthesis of 3,4-fused spiro[isobenzofuran-3-ones], spiro[furo[3,4-b]pyridin-5(7H)-ones], 3-aryl-, and alkylphthalides, Tetrahedron 69 (2013) 5248–5258, doi:10.1016/j.tet.2013.02.051; (b) A. Krasovskiy, P. Knochel, A LiCl-Mediated Br/Mg Exchange Reaction for the Preparation of Functionalized Aryl- and Heteroarylmagnesium Compounds from Organic Bromides, Angew. Chem. Int. Ed. 43 (2004) 3333–3336, doi:10.1002/anie.200454084.
[18] K. Ohba, Y. Koga, S. Nomura, M. Nakata, Functionalized aryl-β-C-glycoside synthesis by Barbier-type reaction using 2,4,6-triisopropylphenyllithium, Tetrahedron Lett. 56 (2015) 1007–1010, doi:10.1016/j.tetlet.2015.01.054.
[19] W. Lin, O. Baron, P. Knochel, Highly Functionalized Benzene Syntheses by Directed Mono or Multiple Magnesiations with TMPMgCl·LiCl, Org. Lett. 8 (2006) 5673–5676, doi:10.1021/ol0625536.
[20] S. Niu, L. Si, D. Liu, A. Zhou, Z. Zhang, Z. Shao, S. Wang, L. Zhang, D. Zhou, W. Lin, Spiromastilactones: A new class of influenza virus inhibitors from deep-sea fungus, Eur. J. Med. Chem. 108 (2016) 229–244, doi:10.1016/j.ejmech.2015.09.037.
[21] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition. CLSI document M07–A9 2012 Wayne, PA.
[22] K. Ohba, Y. Koga, S. Nomura, M. Nakata, Functionalized aryl-β-C-glycoside synthesis by Barbier-type reaction using 2,4,6-triisopropylphenyllithium, Tetrahedron Lett 56 (2015) 1007–1010, doi:10.1016/j.tetlet.2015.01.054.
[23] H.-S. Lin, L.A. Paquette, A Convenient Method for Determining the Concentration of Grignard Reagents, Synth. Commun. 24 (1994) 2503–2506, doi:10.1080/00397919408010560.
[24] A.D. Marchese, T. Adrianov, M.F. Köllen, B. Mirabi, M. Lautens, Synthesis of Carbocyclic Compounds via a Nickel-Catalyzed Carboiodination Reaction, ACS Catalysis 11 (2021) 925–931, doi:10.1021/acscatal.0c04956.
[25] K. Vong, T. Yamamoto, T.-c. Chang, K. Tanaka, Bioorthogonal release of anticancer drugs via gold-triggered 2-alkynylbenzamide cyclization, Chem. Sci. 11 (2020) 10928–10933, doi:10.1039/d0sc04329j.
[26] A.H. Cory, T.C. Owen, J.A. Barltrop, J.G. Cory, Use of an Aqueous Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth Assays in Culture, Cancer Commun 3 (1991) 207–212, doi:10.3727/095535491820873191.

B. Communications affichées en congrès

Anne-Emmanuelle Roux, Sylvie Robert, Mathilde Bastat, Isabelle Rosinski-Chupin, Vanessa Rong, Sébastien Holbert, Laurent Mereghetti, Emilie Camiade. Role of CcpA, a pleiotropic regulator, in the physiology and stress response of the pathogen *Streptococcus agalactiae*. 17ème Congrès national de la SFM, Microbes, Octobre 2022, Montpellier, France.

Anne-Emmanuelle Roux, Sylvie Robert, Mathilde Bastat, Isabelle Rosinski-Chupin, Vanessa Rong, Sébastien Holbert, Laurent Mereghetti, Emilie Camiade. Role of CcpA, a pleiotropic regulator, in the physiology and stress response of the pathogen *Streptococcus agalactiae*. Journées d'Animation scientifique de la Fédération de Recherche en Infectiologie (FéRI), Juillet 2022, Joué-lès-Tours, France.

Anne-Emmanuelle Roux, Laurent Mereghetti, Emilie Camiade. Determination of the Regulon of CcpA, a pleiotropic regulator, in the pathogen *Streptococcus agalactiae*. 2nd International Symposium on '*Streptococcus agalactiae*' Disease (ISSAD), Novembre 2021, en ligne.

Anne-Emmanuelle Roux, Laurent Mereghetti, Emilie Camiade. Determination of the regulon of CcpA, a pleiotropic regulator, in the pathogen *Streptococcus agalactiae*. 33ème Colloque Biotechnocentre, Octobre 2021, Chaumont-sur-Tharonne, France.

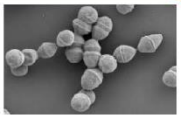
Anne-Emmanuelle Roux, Laurent Mereghetti, Emilie Camiade. Determination of the Regulon of CcpA, a pleiotropic regulator, in the pathogen *Streptococcus agalactiae*. World Microbe Forum (An ASM FEMS Collaboration), Juin 2021, en ligne.

Communication affichée 33ème Colloque Biotechnocentre, octobre 2021

Determination of the Regulon of CcpA, a Pleiotropic Regulator in the Pathogen *Streptococcus agalactiae*

Anne-Emmanuelle Roux (a), Laurent Mereghetti (a,b) and Emilie Camiade (a)
(a) ISP, Université de Tours, INRAE, Tours, F-37000, France
(b) CHRU de Tours, Service de Bactériologie–Virologie, F-37044 Tours, France

Streptococcus agalactiae (GBS)

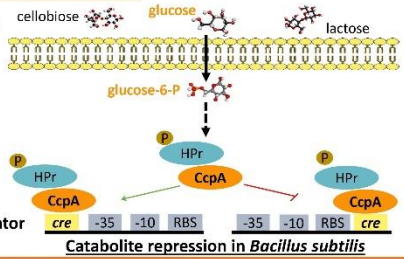


- ✓ Gram-positive bacterium
- ✓ **Leading cause of neonatal morbidity and mortality**
- ✓ Emerging pathogen in elderly and immunocompromised adults
- ✓ An opportunistic pathogen with a **broad spectrum of host**

→ **High level of adaptability**

Catabolite repression = glucose effect

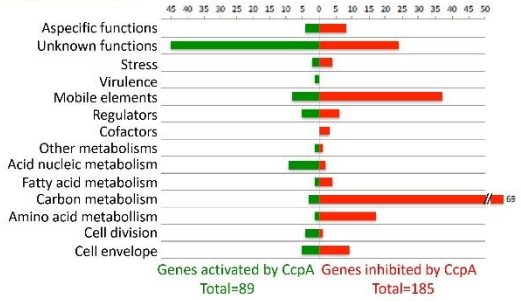
- ✓ **Avoids waste of energy** by prioritizing the use of sugars **rapidly metabolizable**
- ✓ **CcpA: a pleiotropic regulator**



Catabolite repression in *Bacillus subtilis*

1. Which genes are regulated by CcpA?
2. What is the *cre* site in *GBS*?
3. Is there a link between catabolite repression and stress response?

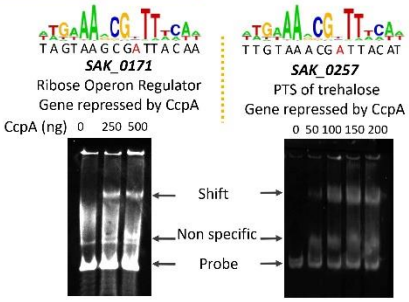
1. Regulon of CcpA



RNAseq: A909WT *vs.* A909Δ*ccpA*

→ **CcpA regulates 13,5% of the genome** in CDM + 0,25% glucose in mid-exponential phase

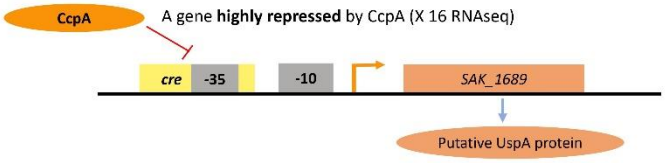
2. Confirmation of the *cre* sites



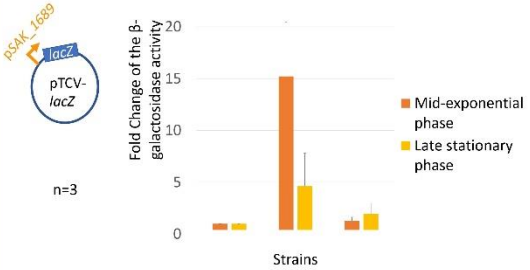
Electrophoretic mobility shift assay

→ The EMSA **confirms the *cre* consensus** sequence proposed by Regprecise

3. *SAK_1689*, a gene regulated by CcpA putatively involved in stress response

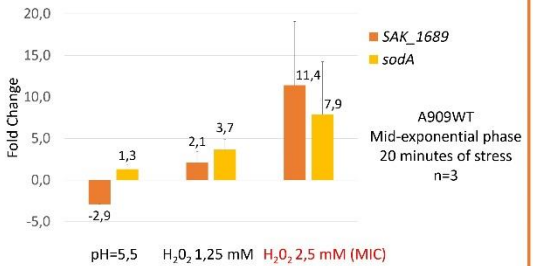


50% of sequence identity with Lmo1580 of *Listeria monocytogenes* = UspA protein involved in **acid and oxidative stress resistance**



Effect of CcpA on the expression of p*SAK_1689* in mid-exponential phase and late stationary phase in CDM+ 0,25% glucose

→ Transcriptional fusions confirm the **regulation of *SAK_1689* by CcpA**



Effect of acid and oxidative stresses on the gene *SAK_1689* expression measured by qRT-PCR

→ *SAK_1689* is **overexpressed in H2O2** (2,5 mM)

As a conclusion, CcpA regulates 13,5% of the genome in *GBS*. It binds to *cre* sites and regulates several genes putatively involved in stress response. Survival experiments in oxidative condition and in macrophages with A909Δ*SAK_1689* and its complement are on going.

Communication affichée 17ème Congrès national de la SFM, Microbes, Octobre 2022

Role of CcpA in the adaptation of the pathogen *Streptococcus agalactiae*

Anne-Emmanuelle Roux[a], Sylvie Robert[a], Mathilde Bastat[a], Isabelle Rosinski-Chupin[b], Vanessa Rong[a], Sébastien Holbert[a], Laurent Mereghetti[a,c], Emilie Camiade[a]
(a) ISP, Université de Tours, INRAE (b) Institut Pasteur Paris (c) CHRU de Tours, Service de Bactériologie-Virologie

Streptococcus agalactiae



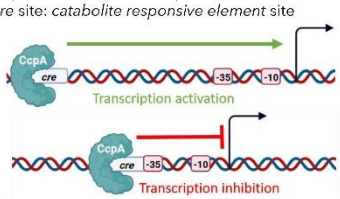
- ✓ Gram-positive bacterium
- ✓Vaginal colonization
- ✓**Leading cause of neonatal morbidity and mortality**
- ✓Emerging pathogen in elderly adults
- ✓An opportunistic pathogen with a **broad spectrum of host**

→ High level of adaptability

CcpA, a pleiotropic regulator

A regulator of major importance in Firmicutes

CcpA : catabolite control protein A
cre site: *catabolite responsive element* site



Is CcpA involved in the adaptation of *S. agalactiae* to its host?

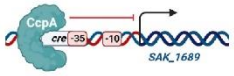
CcpA regulon

RNAseq with Δ*ccpA*/WT A909 strains:

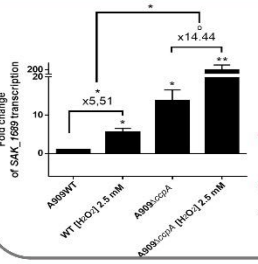
- CcpA regulates **13,5% of the genome** (274 genes)
- CcpA acts mostly as a **repressor**
- CcpA regulates **12 genes** putatively involved in **stress response**

SAK_1689

- **Highly regulated by CcpA** (X30 in RNAseq)
- Sérine/Thréonine phosphoprotein
- 50% of sequence identity with Lmo1580 of *Listeria monocytogenes* = UspA protein involved in **acid and oxidative stress resistance**



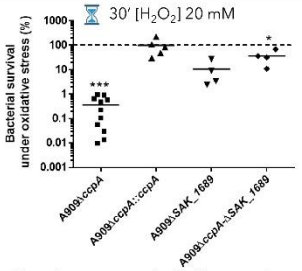
SAK_1689 expression under H_2O_2 stress

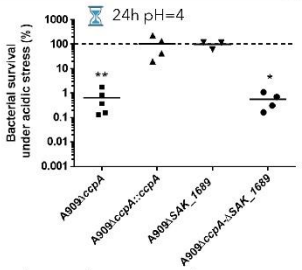


RT-qPCR
20′
[H_2O_2] 2.5 mM (CMI)
Mid-exponential phase

- **Activated under oxidative stress**
- **Repressed by CcpA**
- Underexpressed under acidic stress (not shown)

Role of CcpA and SAK_1689 under oxidative and acidic stress…

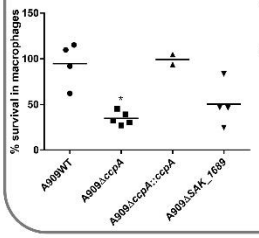




- **Δ*ccpA* mutant survival is impacted under stresses**
- Δ*SAK_1689* mutant survival is not impacted
- Deletion of *SAK_1689* in the Δ*ccpA* mutant restores partially the survival under oxidative stress

➢ CcpA is essential under stress, unlike SAK_1689

… in macrophages survival

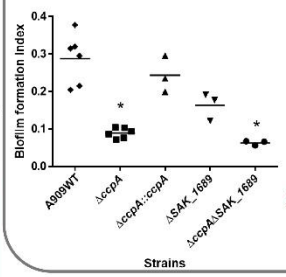


RAW264.7 24h

- **Δ*ccpA* mutant survival is impacted in macrophages**

➢ CcpA is essential for survival in macrophages, unlike SAK_1689

… and biofilm formation



- A909 is a low biofilm forming strain
- **Δ*ccpA* mutant biofilm formation is impacted**

➢ CcpA is essential for biofilm formation, unlike SAK_1689

Conclusion

- CcpA is a major pleiotropic regulator
- CcpA is essential under oxiditative and acidic stress, in macrophages survival and in biofilm formation → CcpA participates probably to host colonization
- CcpA represses *SAK_1689* protecting the bacterium from harmful overexpression under oxidatitive stress

C. Communications orales en congrès

Anne-Emmanuelle Roux, Laurent Mereghetti, Emilie Camiade. Determination of the regulon of CcpA, a pleiotropic regulator, in the pathogen *Streptococcus agalactiae*. 16ème Congrès national de la SFM, Microbes, Septembre 2021, Nantes, France.

Anne-Emmanuelle Roux, Laurent Mereghetti, Emilie Camiade. Determination of the Regulon of CcpA, a Pleiotropic Regulator, in the pathogen *Streptococcus agalactiae*. Journées d'Animation scientifique de la Fédération de Recherche en Infectiologie (FéRI), Juillet 2021, en ligne, France.

Anne-Emmanuelle Roux, Laurent Mereghetti, Emilie Camiade. Determination of the Regulon of CcpA, a Pleiotropic Regulator, in the pathogen *Streptococcus agalactiae*. PhD day, UMR Infectiologie et Santé Publique (ISP), INRAE, Septembre 2021, Nouzilly, France.

Anne-Emmanuelle Roux, Laurent Mereghetti, Emilie Camiade. Role(s) of CcpA and HPr, two actors of the carbon catabolite repression of the pathogen *Streptococcus agalactiae*. PhD day 2020, INRAE, UMR Infectiologie et Santé Publique, Septembre 2020, Nouzilly, France.

D. Formations suivies pendant la thèse

-Formation à l'enseignement supérieur

-Formation biostatistiques

-Formation à l'information et communication : formation PAPIRUS proposée par l'INRAE

-Formation éthique, recherche et intégrité scientifique

D. Participation à l'organisation d'événements scientifiques

-Participation à la fête de la Science de Tours en 2019

-Organisation du PhD day de l'unité de recherche en 2020

E. Charges d'enseignements

Enseignant vacataire dans le département de Microbiologie de la faculté des Sciences et Techniques de l'Université de Tours (38 heures Eq TD) : TD de bactériologie licence 2, TD ateliers interdisciplinaires chimie-biologie licence 2, TP de bactériologie licence 2.

Anne-Emmanuelle Roux

Rôle de la répression catabolique dans la physiologie et l'adaptation à l'hôte de *Streptococcus agalactiae*

Chez l'Homme, *Streptococcus agalactiae* est capable de coloniser le tractus intestinal et le vagin et est la cause majeure d'infections chez les nouveau-nés. Ce pathogène doit faire face à divers stress lors de la colonisation et/ou de l'infection et a la capacité de mettre en place de nombreux mécanismes d'adaptation dont les régulateurs pléiotropes font partie. Dans cette étude nous sommes intéressés au lien entre répression catabolique et mécanismes d'adaptation. Nous avons mis en évidence que le régulateur transcriptionnel pléiotrope CcpA (catabolite control protein A) contrôlait 13,5 % des gènes en mi-phase exponentielle de croissance dont 30 % grâce à sa fixation à un site *cre* (*cis*-acting catabolite responsive element) sur l'ADN. Nous avons montré qu'il régulait majoritairement des gènes impliqués dans le métabolisme du carbone, notamment des transporteurs de sucres mais aussi les voies de fermentation conduisant à la production de formate et d'acétate ou encore la synthèse de fumarate. Nous avons également mis en évidence que la protéine CcpA était essentielle dans la résistance à divers stress retrouvés lors de la colonisation et l'infection de l'hôte. Nous nous sommes intéressés aux rôles de plusieurs protéines régulées par CcpA et potentiellement impliquées dans la réponse au stress. Nous avons montré que CcpA protégeait *S. agalactiae* d'une surexpression délétère de SAK_1689, une protéine universelle de stress, lors d'un stress oxydatif en réprimant son expression via un site *cre*. Par ailleurs nous avons montré que SAK_1741, une protéine analogue à SAK_1689 était surexprimée en condition de stress acide et qu'elle favorisait la formation de biofilm.

Mots clés : répression catabolique, *Streptococcus agalactiae*, adaptation à l'hôte, stress, CcpA

In humans, *Streptococcus agalactiae* can colonize the intestinal tract and vagina and is the major cause of infections in neonates. This pathogen must face various stresses during colonization and/or infection and can set up numerous adaptation mechanisms of which pleiotropic regulators are part. In this study we were interested in the link between catabolic repression and adaptation mechanisms. We demonstrated that the pleiotropic transcriptional regulator CcpA (catabolite control protein A) controlled 13.5% of genes in the mid-exponential phase of growth, 30% of which were controlled by its binding to a *cre* (*cis*-acting catabolite responsive element) site on DNA. We have shown that it mainly regulates genes involved in carbon metabolism, in particular sugar transporters but also fermentation pathways leading to formate and acetate production or fumarate synthesis. We also demonstrated that CcpA protein was essential in the resistance to various stresses found during colonization and infection of the host. We investigated the roles of several previously unstudied proteins regulated by CcpA and potentially involved in the stress response. We showed that CcpA protects S. agalactiae from deleterious overexpression of SAK_1689, a universal stress protein, under oxidative stress conditions by repressing its expression via a cre site. Furthermore, we showed that SAK_1741, a protein analogous to SAK_1689, was overexpressed under acidic stress conditions and that it promoted biofilm formation.

Keywords : catabolic repression, *Streptococcus agalactiae*, host adaptation, stress, CcpA