HAL
open science

Les régulateurs transcriptionnels Rgg de Streptococcus thermophilus LMG18311 : étude du rôle de la protéine Rgg0182

Emmanuelle Bruneau

To cite this version:

Emmanuelle Bruneau. Les régulateurs transcriptionnels Rgg de Streptococcus thermophilus LMG18311 : étude du rôle de la protéine Rgg0182. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0139 . tel-01750132

HAL Id: tel-01750132

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750132v1

Submitted on 29 Mar 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole doctorale RP2E (Ressources, Procédés, Produits, Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

par Emmanuelle BRUNEAU

Les régulateurs transcriptionnels Rgg de *Streptococcus thermophilus* LMG18311 : Etude du rôle de la protéine Rgg_{0182}

Soutenance le 24 septembre 2013

Membres du Jury :

Rapporteurs :	**M. Jean-François Cavin**	Professeur, Université de Bourgogne
	M. Axel Hartke	Professeur, Université de Caen
Examinateurs :	**M. Eric Guédon**	Chargé de recherche, INRA, Jouy en Josas
	M. Pierre Leblond	Professeur, Université de Lorraine
	Mme Nathalie Leblond-Bourget	Professeur, Université de Lorraine, directeur de thèse

---

Laboratoire DynAMic – UMR UL/INRA 1128 – IFR EFABA
Faculté des Sciences et Technologies - 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy CEDEX

Remerciements

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à Nathalie Leblond-Bourget qui m'a confié ce travail de recherche et permis de réaliser ce rêve un peu fou qu'est de faire une thèse. Merci pour votre soutien et vos encouragements dans les périodes les plus difficiles. Je vous remercie également pour les conseils et les discussions autour de la thématique qui ont fait avancer le projet. Merci de m'avoir fait confiance et laissé mener ces travaux de manière autonome. Merci aussi pour les derniers mois et les corrections du manuscrit qui m'ont permis d'avancer et d'avoir l'honneur de défendre mes travaux de thèse devant un jury.

Mes remerciements vont ensuite à Pierre Leblond. Merci de m'avoir accueilli au sein de l'unité ex-Génétique et Microbiologie et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Je tiens à remercier chaleureusement les membres de mon jury de thèse, Jean-François Cavin et Axel Hartke, qui ont accepté de juger ces travaux de thèse en qualité de rapporteurs, ainsi qu'Eric Guédon et Pierre Leblond, de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse. Je les remercie grandement pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de ce travail et de l'intérêt qu'ils y ont porté.

Je voudrais remercier l'ensemble des personnes qui ont collaboré à ce travail et sans qui il n'aurait eu la même dimension.

- Merci à Véronique Monnet, Rozenn Gardan et Betty Fleuchot du laboratoire Peptides et communications bactériennes de l'institut Micalis pour leur participation au premier article et pour m'avoir inculqué de nouvelles notions du quorum sensing.

- Merci à Grégory Francius du LCPME, qui a réalisé les analyses par microscopie à force atomique, et Jérôme Duval du LEM pour leur participation à l'étude physico-chimique de S. thermophilus.

- Merci à Nicolas Rouhier pour ses nombreux conseils sur la purification des protéines.

- Merci à Véronique Monnet et Didier Chevret de la plateforme PPAPSO pour les analyses protéomiques par LC-MS/MS.

- Merci à Yves Leroux et Maxime Bruto pour leur aide précieuse sur les analyses statistiques et leurs explications qui m'ont permis de mieux comprendre le monde obscur des statistiques.

Je tiens tout particulièrement à remercier Romain Henry, qui dès mon arrivée, m'a initié à la manipulation de S. thermophilus et m'a transmis l'ensemble de ses connaissances sur les Rgg. Merci pour les deux années passées à travailler en osmose sur le même sujet et pour nos nombreuses discussions constructives sur la thématique. Merci pour les innombrables conseils qui ont sus, plus d'une fois, débloquer la situation. Merci de m'avoir transmis notre « bébé ». J'espère que la tournure qu'ont pris les choses après ton départ te satisfait. Je voudrais également te remercier pour ton soutien sans faille et la confiance que tu m'as accordée même après ton départ !

Je voudrais également remercier Stéphane Bertin, adjoint technique de l'équipe, pour avoir participé au sujet. Merci pour ton investissement, notamment, lors des manips en doublon. Merci pour ta bonne humeur et nos nombreuses discussions aux pauses café.

Je remercie Mathieu, mon premier stagiaire, qui m'a fait découvrir les joies de l'encadrement. Merci pour ta participation à ces travaux.

Merci à l'ensemble du personnel du LGM pour leur accueil et leur sympathie. Je vous remercie pour tous les moments passés ensemble et pour les nombreux échanges scientifiques qui m'ont permis d'évoluer. Je tiens à remercier tout particulièrement Laurence et Virginie pour leur bonne humeur et leur soutien !

Merci à Justine, Xavier et Wessam pour nos nombreuses conversations ARN et quanti !

Je voudrais remercier tout spécialement Romain, Nico, Sarah, Aurore, Emilie, Max, Janek, PV et petit Manu pour vos conseils et votre aide durant mon passage au LGM. Je vous remercie également pour votre solidarité et votre amitié qui m'ont permis d'avancer, même dans les moments les moins faciles. Merci pour le temps passé ensemble au RU et les pauses café qui ont toujours su booster le moral quand il y en avait besoin ! Et aussi merci pour tous les à-côtés, les soirées et les bons moments ensemble, qui je sais, vont continuer !

Merci Romain pour ta joie de vivre et ton humour si particulier qui m'a, hélas, toujours fait rire ! Merci de m'avoir intégrée au labo et fait découvrir les plaisirs de vivre en Lorraine !

Merci Nico pour tous tes conseils toujours pertinents et pour ta bonne humeur légendaire. Merci aussi pour ton humour si propre à toi-même et pour ton style au goût toujours aussi sûr qui m'ont toujours rendu le sourire !

Merci Sarah d'avoir illuminé le ciel gris de Lorraine par ton arrivée ! Je te remercie pour tout, tes conseils si judicieux, ton aide considérable depuis le début. Je te remercie aussi pour nos discussions sans fin, nos fous rires et par-dessus tout ton amitié si précieuse à mes yeux.

Merci Aurore, l'autre tiers du trio de choc, pour ton soutien et ton amitié. Je te remercie pour les encouragements et les « reboostages » tout au long de cette thèse, et en particulier lors de la dernière année de manip ! Tu m'as devancée de peu dans la rédaction et c'est avec un grand plaisir que je clôture notre « ère » !

Merci Emilie pour ta bonne humeur infaillible qui, même les matins les moins réveillés, m'ont donné du baume au cœur ! Merci pour ton amitié qui a su m'apporter de l'aide quand cela était nécessaire !

Merci Max de m'avoir sauvé la vie au dernier moment. Merci pour toutes nos conversations toujours pleines de sens et pour ton amitié. Tu es le prochain et ça sera avec grand plaisir que je serai là à mon tour pour toi.

Un grand merci à la promo ICMV, et en particulier à Will, Louise et Lily, avec qui j'ai découvert le monde un peu fou de la recherche. Je vous remercie de m'avoir montré ce qu'était l'esprit scientifique. Merci pour votre amitié et votre soutien sans faille depuis le début. Merci aussi, et surtout, pour tous les bons moments passés ensemble.

Je tiens à remercier tous mes amis, qui malgré l'absence et la distance, m'ont soutenu dans ce projet.

Enfin, je voudrais remercier ma famille qui m'a soutenu depuis le début. Je voudrais remercier tout spécialement mes parents, sans qui, rien n'aurait été possible. Merci de m'avoir permis depuis toutes ces années d'évoluer et de grandir en me soutenant et m'encourageant. Merci pour votre compréhension face à mon investissement professionnel. Cette thèse est un peu la vôtre…

Je remercie également mes deux sœurs, qui sont un peu comme des modèles de réussite pour moi. J'espère pouvoir bientôt arriver à votre hauteur. Merci d'avoir compris les impératifs liés à mes études et ma thèse. Merci d'avoir toujours été là pour moi dans les bons et les moins bons moments.

Finalement, je voudrais surtout remercier celui qui partage ma vie depuis bientôt 4 ans. Merci de m'avoir épaulé et relevé quand cela était nécessaire. Merci pour tes encouragements perpétuels, ton aide précieuse qui m'ont permis d'en arriver là. Merci d'avoir toujours été là pour moi et d'avoir tant assuré depuis toujours. Merci pour tout et bien plus encore. Je te dédie ce travail.

Et pour terminer, je voudrais remercier les rgg qui ont consenti à me révéler quelques-uns de leurs secrets !

Sommaire

Sommaire

SOMMAIRE **1**

ABREVIATIONS **7**

PREAMBULE **13**

INTRODUCTION **17**

1. LA FAMILLE DES REGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS RGG **17**
1.1. CARACTERISATION DE LA FAMILLE RGG 17
1.1.1. Les régulateurs transcriptionnels 17
1.1.1.1. Le rôle des régulateurs transcriptionnels 17
1.1.1.2. Les différents types de régulateurs transcriptionnels 18
1.1.2. Une nouvelle famille de régulateurs transcriptionnels : les Rgg 19
1.1.2.1. Une famille restreintes aux bactéries Gram positives à bas pourcentage en G et C 19
1.1.2.2. Présence de plusieurs gènes *rgg* par génome 22
1.1.3. Polymorphisme des protéines Rgg 23
1.1.4. Caractéristiques des protéines Rgg 26
1.1.4.1. Présence d'un domaine HTH à leur extrémité N-terminale 26
1.1.4.2. Présence d'un second domaine au sein des protéines Rgg : le domaine médian 27
1.2. FIXATION DES PROTEINES RGG A L'ADN 28
1.2.1. Fixation des protéines Rgg au niveau des régions promotrices des gènes cibles 28
1.2.2. Absence de séquence consensus de fixation à l'ADN des protéines Rgg 29
1.3. LES GENES CIBLES DES PROTEINES RGG 30
1.3.1. Les gènes adjacents aux loci *rgg* sont des cibles privilégiées 30
1.3.2. Les cibles des protéines Rgg sont diverses et variées 31
1.4. PARTICIPATION DE CERTAINES PROTEINES RGG AUX MECANISMES DE QUORUM SENSING 34
1.4.1. Les mécanismes de quorum sensing chez les bactéries à coloration Gram positive 34
1.4.2. Identification dans les génomes bactériens de petites ORF non annotées pouvant participer à un mécanisme de quorum sensing 36
1.4.3. Modèle de quorum sensing proposé pour les couples Rgg/SHP 37
1.4.4. Appartenance des protéines Rgg à la famille RNPP 40
1.5. ORIGINE PUTATIVE DES GENES *RGG* 40

2. DIVERSITE DES FONCTIONS BIOLOGIQUES ASSOCIEES AUX GENES REGULES PAR LES PROTEINES RGG **42**
2.1. IMPLICATION DES PROTEINES RGG DANS LA REGULATION DE LA VIRULENCE 42
2.2. IMPLICATION DES PROTEINES RGG DANS LA REPONSE AUX STRESS 43
2.2.1. Implication de la protéine GadR dans la réponse au stress acide 43
2.2.2. Implication de la protéine RopB dans la réponse au stress thermique 43
2.2.3. Implication de protéines Rgg dans la réponse au stress oxydant 44
2.3. IMPLICATION DES PROTEINES RGG DANS LA REGULATION DU METABOLISME 45
2.4. IMPLICATION DES PROTEINES RGG DANS LA PRODUCTION DE BACTERIOCINES 46
2.5. IMPLICATION DES PROTEINES RGG DANS LA BIOSYNTHESE DE LA PAROI CELLULAIRE 47
2.6. IMPLICATION DES PROTEINES RGG DANS L'ADHESION BACTERIENNE 47
2.7. IMPLICATION DES PROTEINES RGG DANS LA FORMATION DE BIOFILM 48

3. *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* : UN MODELE D'ETUDE DES GENES *RGG* **50**
3.1. L'ESPECE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* 50
3.1.1. Le genre *Streptococcus* 50
3.1.2. L'espèce *Streptococcus thermophilus* 52

3.1.3. *S. thermophilus*, une bactérie utilisée en industrie agroalimentaire 54
3.1.4. Une bactérie soumise à de nombreux changements environnementaux et stress 54
3.2. *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* POSSEDENT DE NOMBREUSES COPIES *RGG* 56
3.2.1. *S. thermophilus* possèdent plusieurs copies *rgg* par génome 56
3.2.2. Polymorphisme et parenté des protéines Rgg de *S. thermophilus* 57
3.2.3. L'environnement génétique des copies *rgg* de *S. thermophilus* 57

4. OBJECTIFS DE THESE 59

MATERIELS ET METHODES 63

1. SOUCHES ET CONDITIONS DE CROISSANCE 63

2. MANIPULATIONS GENETIQUES ET DE BIOLOGIE MOLECULAIRE 65
2.1. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN 65
2.2. REACTIONS D'AMPLIFICATIONS EN CHAINE PAR POLYMERASE (OU PCR POUR POLYMERASE CHAIN REACTION) 66
2.2.1. PCR standards 66
2.2.2. PCR haute-fidélité et séquençage 66
2.3. MANIPULATION DE L'ADN : DIGESTION ENZYMATIQUE ET LIGATION 67
2.4. ELECTROPHORESE 68
2.5. TRANSFORMATION 68
2.5.1. Electroporation chez *E. coli* 68
2.5.2. Transformation naturelle de *S. thermophilus* 68
2.6. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GENES 69
2.6.1. Extraction des ARN totaux 69
2.6.2. Transcription inverse 69
2.6.3. PCR quantitative 70

3. MANIPULATIONS BIOCHIMIQUES 71
3.1. SURPRODUCTION ET PURIFICATION DE PROTEINES A PARTIR D'*E. COLI* 71
3.1.1. Production de protéines chez *E. coli* 71
3.1.2. Lyse des cellules pour la purification de protéines 71
3.1.3. Purification de protéine par IMAC (Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography) 71
3.2. GELS D'ELECTROPHORESE EN POLYACRYLAMIDE (PAGE) 72
3.3. WESTERN BLOT 73
3.4. EXPERIENCES DE RETARD DE MIGRATION SUR GEL D'ELECTROPHORESE 73
3.5. EXTRACTION DE PROTEINES ISSUES DE *S. THERMOPHILUS* 74
3.6. SPECTROMETRIE DE MASSE LC-MS/MS 74

4. ANALYSES PHENOTYPIQUES 75
4.1. MESURE DE LUMINESCENCE 75
4.2. TEST DE SURVIE AU STRESS CHAUD 75
4.3. CINETIQUE DE CROISSANCE 75
4.4. ANALYSE MORPHOLOGIQUE DES CELLULES DE *S. THERMOPHILUS* 76
4.4.1. Dénombrement du nombre de cellules par chaine de *S. thermophilus* 76
4.4.2. Microscopie à force atomique (AFM) 76

RESULTATS 81

1. LA PROTEINE RGG_{0182} DE *S. THERMOPHILUS* LMG18311 EST UN REGULATEUR TRANSCRIPTIONNEL IMPLIQUE DANS UN MECANISME DE QUORUM SENSING 81
1.1. CARACTERISATION DU LOCUS RGG_{0182} DE *S. THERMOPHILUS* LMG18311 81
1.1.1. Analyse de la séquence du gène rgg_{0182} 81
1.1.2. Similarité de l'environnement génétique des gènes rgg_{0182} et *rgg1358* 84
1.2. LE GENE RGG_{0182} DE *S. THERMOPHILUS* LMG18311 CODE UN REGULATEUR TRANSCRIPTIONNEL 85

1.2.1. Implication du gène *rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus* LMG18311 dans la transcription des gènes adjacents 85
1.2.2. Fixation de la protéine Rgg$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311 sur la région promotrice de ses gènes cibles 87
1.2.2.1. Production de la protéine Rgg$_{0182}$ 87
1.2.2.1.1. Construction de plasmides permettant la production des protéines Rgg$_{0182}$ et Rgg$_{1947}$ 87
1.2.2.1.2. Surproduction des protéines Rgg 89
1.2.2.1.3. Purification des protéines Rgg 89
1.2.2.1.4. Obtention de la protéine Rgg$_{0182}$ 91
1.2.2.2. Etude de la fixation de la protéine Rgg$_{0182}$ aux régions promotrices de ces gènes cibles 92
1.3. LE GENE *RGG$_{0182}$* DE *S. THERMOPHILUS* LMG18311 EST IMPLIQUE DANS UN MECANISME DE QUORUM SENSING 94
1.3.1. Etude de la fonctionnalité du système Rgg$_{0182}$/Shp$_{0182}$ 94
1.3.1.1. Stratégie expérimentale 94
1.3.1.2. Etude de la fonctionnalité du système *rgg$_{0182}$/shp$_{0182}$* 97
1.3.2. Le gène *pep$_{0182}$*, une cible du couple *rgg$_{0182}$/shp$_{0182}$* 100

2. IMPLICATION DE LA PROTEINE RGG$_{0182}$ DANS L'ADAPTATION DE *S. THERMOPHILUS* LMG18311 A SON ENVIRONNEMENT 102
2.1. IMPLICATION DE LA PROTEINE RGG$_{0182}$ DANS L'ADAPTATION AUX CHANGEMENTS DE TEMPERATURE 102
2.1.1. Rôle du régulateur transcriptionnel Rgg$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311 dans la réponse aux changements de température....102
2.1.2. Implication de la protéine Rgg$_{0182}$ dans la réponse au stress chaud....104
2.1.3. Etude de la fixation de Rgg$_{0182}$ aux régions promotrices des gènes codants les chaperonnes et protéases....105
2.2. IMPLICATION DE RGG$_{0182}$ DANS L'ADHESION DE *S. THERMOPHILUS* 106
2.2.1. Adhésion température dépendante du mutant Δ*rgg$_{0182}$*....106
2.2.1.1. Adhésion thermo-induite des cellules Δ*rgg$_{0182}$* aux parois latérales de micro-puits.... 106
2.2.1.2. Adhésion thermo-induite des cellules Δ*rgg$_{0182}$* spécifique à la croissance en microplaques 109
2.2.2. Analyse morphologique des cellules des souches LMG183311 et Δ*rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus*..110
2.2.3. Propriétés électrocinétiques et hydrophobes des cellules des souches sauvage et Δ*rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus* LMG18311 113
2.2.4. Rugosité et hydrophobicité de la surface des puits des microplaques....116

3. LA PROTEINE RGG$_{0182}$ EST UN REGULATEUR GLOBAL DE L'EXPRESSION GENIQUE DE *S. THERMOPHILUS* LMG18311 . 117
3.1. ETUDE DU REGULON DE LA PROTEINE RGG$_{0182}$ 117
3.2. ETUDE TRANSCRIPTOMIQUE DU REGULON DE LA PROTEINE RGG$_{0182}$ 120
3.2.1. Validation du choix du gène rapporteur utilisé pour les expériences de PCR quantitative....120
3.2.2. Etude de la transcription des gènes cibles putatifs de la protéine Rgg$_{0182}$ 121
3.2.3. Implication de la protéine Rgg$_{0182}$dans la régulation de la transcription d'autre gène *rgg* 124

4. LA TRANSCRIPTION DES GENES *RGG* DE *S. THERMOPHILUS* LMG18311 EST DEPENDANTE DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES 125
4.1. VALIDATION DU CHOIX DU GENE RAPPORTEUR UTILISE POUR LES EXPERIENCES DE PCR QUANTITATIVE 125
4.2. LA TRANSCRIPTION DES GENES *RGG* DE LA SOUCHE LMG18311 DE *S. THERMOPHILUS* EST DEPENDANTE DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES 126
4.3. COMPARAISON DES PROFILS DE TRANSCRIPTION DES GENES *RGG* DE *S. THERMOPHILUS* LMG18311 133
4.4. ETUDE DE L'IMPACT DES GENES *RGG* SUR LA CROISSANCE DE LA SOUCHE LMG18311 DE *S. THERMOPHILUS* 135

DISCUSSION 139

1. COMMENT FONCTIONNENT LES PROTEINES RGG ? 139
1.1. LES PROTEINES RGG DE *S. THERMOPHILUS* PARTICIPENT-ELLES A UN MECANISME DE QUORUM SENSING ? 140
1.2. QUELLES SONT LES CIBLES REGULEES PAR LES COUPLES RGG/SHP CHEZ *S. THERMOPHILUS* ? 147
1.3. COMMENT LA PROTEINE RGG$_{0182}$ SE FIXE-T-ELLE A L'ADN ? 151

2. QUEL EST LE ROLE PHYSIOLOGIQUE DES PROTEINES RGG DE *S. THERMOPHILUS* LMG18311 ? 153
2.1. LA PROTEINE RGG_{0182} PARTICIPE-T-ELLE A LA REPONSE AUX STRESS ? 153
2.2. COMMENT LA PROTEINE RGG_{0182} PARTICIPE-T-ELLE A LA DIVISION CELLULAIRE CHEZ *S. THERMOPHILUS* ? 155
2.3. COMMENT LA PROTEINE RGG_{0182} PARTICIPE-T-ELLE A L'ADHESION DE *S. THERMOPHILUS* LMG18311 ? 157
2.4. LA PROTEINE RGG_{0182} EST-ELLE UN REGULATEUR GLOBAL DE L'EXPRESSION GENIQUE DE *S. THERMOPHILUS* ? 158

3. QUEL EST L'AVANTAGE POUR *S. THERMOPHILUS* DE POSSEDER PLUSIEURS COPIES RGG ? 163

4. CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES 165

BIBLIOGRAPHIE 169

ANNEXE 1 193

ANNEXE 2 209

ANNEXE 3 221

ANNEXE 4 (LISTE DES COMMUNICATIONS) 225

Abréviations

Abréviations

A : Adénine
aa : Acides aminés
ABC : ATP Binding Cassette
Ac : Anti-corps
ADI : arginine diminase
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADNg : ADN génomique
ADP : Adénosine diphosphate
AFM : Microscopie à force atomique
Ag : Antigène
AHL : N-acyl homosérine lactone
AI : autoinduceur
ARN : Acide Ribonucléique
ARNr : ARN ribosomique
ATP : Adénosine TriPhosphate
B. : *Bacillus*
BET : Bromure d'éthidium
C : Cytosine
CcpA : Catabolite control protéine A
CFM : Microscopie de force chimique
ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation
Csp : Protéine de stress froid
Da : Daltons
dNTP : Deoxynucleotide
DO : Densité optique
DR : Séquence répétée directe
E. : *Escherichia*
EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay pour expériences de retard de migration sur gel d'électrophorèse
EPS : Exopolysaccharides
FI : Fraction insoluble
FS : Fraction soluble
G : Guanine
g : Gramme
GABA : Glutamate γ aminobutyrate
GPS : protéine de réponse général au stress
GRAS : generaly recognized as safe
GTF : Glycosyltransférase
h : Heure
HK : Histidine Kinase
HLH : Helix-Loop-Helix pour hélice-boucle-hélice
HMM : Hidden markov model
HTH : Hélice-Tour-Hélice
Hsp : Protéine de choc chaud

ICE : Elément intégratif et conjugatif
IMAC : Chromatographie d'affinité sur ion métallique immobilisé
IPTG : Isopropy β-D-thiogalactopyranoside
IR : Séquence répétée inversée
IRL : Séquence répétée inversée gauche
IRR : Séquence répétée inversée droite
IS : Séquence d'insertion
Kb : Kilo-base
kDa : Kilo Daltons
L : Litre
L. : *Lactococcus*
LB : Milieu Luria-Bertani
Lb. : *Lactobacillus*
LM17 : Milieu M17 supplémenté en lactose
M : Mole/litre
mA : Milliampère
MCD : Milieu chimiquement défini
MCS : Multi-Component System
min : Minute
MLST : Multilocus sequence typing
N : Nano
NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : Nicotinamide adénine dinucleotide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate
NJ : Neighbor-Joining
nt : Nucleotide
OCS : One Component System
ORF : Cadre ouvert de lecture
Ors : Oxidative stress resistance
QS : Quorum sensing
pb : Paire de base
PCR : Réaction de polymérisation en chaine
PEI : Polyethylèneimine
PG : Peptidoglycane
p/p : Poid/poid
p/v : Poid/volume
PSI-BLAST : Position-Specific Iterated Basic Local Alignment Search Tool
PTS : Phosphoenol pyruvate sugar phosphotransferase system
qPCR : PCR quantitative
QS : Quorum Sensing
RBS : Ribosome Binding Site
rgg : Regulatory glycosyltransferase gene
RNPP : Rap, NprR, PlcR et PrgX
rpm : Tour par minute
rovS : Regulator of virulence in *Streptococcus agalactiae*
RR : Régulateur de Réponse
RT-PCR : PCR de transcription inverse
s : Seconde

S.	: *Streptococcus*
SAM	: S-adenosyl méthionine
SDS-PAGE	: Sodiumdodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
SHP	: Small Hydrophobic Peptide
SPR	: Surface Plasmon Resonance pour résonance des plasmons de surface
Ssp	: Protéine spécifique de réponse au stress
Stk	: Sérine/thréonine kinase
T	: Thymine
TCS	: Two Component System
TH	: Transfert horizontal
TPR	: Tetratricopeptide repeat
U	: Uracile
U	: Unité
UFC	: Unité formant colonies
UV	: Ultra-violet
µm	: Micromètre
V	: Volt
WHTH	: Winged-Helix-Turn-Helix pour hélice ailée
XRE	: Xenobiotic Response Element
°C	: Degré Celsius

Préambule

Préambule

Les bactéries, quel que soit leur genre ou leur espèce, occupent différentes niches écologiques. Cette diversité conduit à une variabilité des modes de vie des micro-organismes. De plus, au sein d'une niche écologique donnée, toutes les bactéries peuvent être soumises à des modifications des conditions environnementales (modifications de la température, du pH ou de la concentration en oxygène, variations de l'osmolarité, radiations, carence nutritive *etc*.). Ces changements, lorsqu'ils sont brusques, peuvent conduire à un état de stress pour les bactéries engendrant un déséquilibre cellulaire. Afin de survivre à ces stress, des mécanismes de défense sont mis en place, permettant à la bactérie de s'adapter. Ces mécanismes correspondent à l'expression coordonnée de gènes codant des protéines aux fonctions variées qui permettent de modifier la physiologie cellulaire de la bactérie. Ces protéines sont impliquées dans différents processus cellulaires (division cellulaire, métabolisme, composition membranaire, synthèse de l'ADN, *etc*.). Par ailleurs, la transcription de ces gènes peut être modulée par des facteurs de transcription. Ceux-ci permettent de faciliter ou, au contraire, d'empêcher, la fixation de l'ARN polymérase à l'ADN entraînant la transcription de gènes. Les facteurs de transcription comprennent, d'une part, les facteurs σ et, d'autre part, les régulateurs transcriptionnels. Les régulateurs transcriptionnels sont des protéines qui ont la capacité de se fixer au niveau de séquences spécifiques d'ADN situées en amont du gène régulé. La fixation de ces régulateurs à l'ADN permet de moduler la capacité de fixation de l'ARN polymérase à l'ADN entrainant ainsi un changement dans le taux de transcription.

Parmi les nombreux régulateurs transcriptionnels bactériens impliqués dans la réponse aux perturbations de l'environnement, existe la famille de régulateur transcriptionnel appelée Rgg (pour Regulatory glucosyltransferase gene). Ces derniers ont été identifiés à plusieurs reprises comme jouant un rôle majeur dans l'adaptation des Firmicutes à leur niche écologique et aux stress provoqués par les variations environnementales.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse auront pour but de mieux appréhender l'implication des régulateurs transcriptionnels Rgg dans l'adaptation de *Streptococcus thermophilus* aux variations de son environnement.

Introduction

Introduction

1. La famille des régulateurs transcriptionnels Rgg

1.1. Caractérisation de la famille Rgg

1.1.1. Les régulateurs transcriptionnels

1.1.1.1. Le rôle des régulateurs transcriptionnels

La transcription est un processus biologique ubiquitaire qui permet la copie d'une région d'ADN codante en une molécule d'ARN. La transcription se déroule en trois étapes: l'initiation, l'élongation et la terminaison. Elle est initiée par la fixation du complexe multimérique, appelé ARN polymérase, à la région promotrice du gène cible par association à un facteur σ. L'élongation de la transcription conduit à la formation d'un brin d'ARN complémentaire à l'un des deux brins d'ADN. Cependant, des régulateurs transcriptionnels peuvent également se fixer au niveau des régions promotrices et permettre soit la fixation de l'ARN polymérase à l'ADN, soit empêcher cette fixation. Ainsi, les régulateurs transcriptionnels sont des facteurs qui permettent de moduler l'efficacité de la transcription. Les régulateurs ont la capacité de se lier à l'ADN au niveau de séquences spécifiques d'ADN appelées opérateurs. Ces séquences se situent au sein de la région promotrice des gènes régulés, mais sont, dans la plupart des cas, différentes du site de fixation de l'ARN polymérase et propre à chaque régulateur transcriptionnel. Lorsqu'un régulateur transcriptionnel a une action répressive, sa fixation à l'opérateur conduit à un encombrement stérique ou un changement conformationnel de l'ADN, ce qui empêche l'ARN polymérase de se fixer au promoteur du gène et inhibe sa transcription. A l'inverse, la fixation d'un activateur au niveau de l'opérateur permet d'augmenter l'affinité de l'ARN polymérase vis-à-vis du promoteur du gène régulé, permettant ainsi une transcription plus efficace.

La fixation des régulateurs transcriptionnels sur des opérateurs se fait via des motifs protéiques spécifiques. De nombreux types de domaines de liaisons à l'ADN existent. Les motifs les plus fréquents sont les motifs « hélice-tour-hélice » appelés HTH (Helix-Turn-Helix), les motifs « hélice ailée » appelés WHTH (Winged-HTH), les motifs « hélice-boucle-hélice » appelés HLH (Helix-Loop-Helix), les motifs en feuillets β, les motifs en « doigts de zinc » (zinc fingers) et les glissières à leucine (zippers leucine) (Pabo *et al.,* 1992 ; Wintjens *et al.,* 1996). Les motifs HTH sont les mieux caractérisés et sont composés de deux hélices α, formant quasiment un angle droit, qui sont reliées par quelques acides aminés (formant le tour).

Les régulateurs transcriptionnels sont ainsi des protéines capables de moduler la transcription de gènes, dit cibles. En effet, ils peuvent soit activer, soit réprimer la transcription d'un ou plusieurs gène(s) cibles(s). De plus, certains régulateurs transcriptionnels peuvent être à la

fois activateur et répresseur. Ils peuvent contrôler la régulation de nombreux gènes impliqués dans des fonctions biologiques variées, comme le régulateur global de l'expression génique FNR d'*Escherichia coli* (Martinez-Antonio *et al.,* 2003) ou la protéine CovR chez les streptocoques (Dmitriev *et al.,* 2011), tandis que d'autres participent à la régulation d'un nombre restreint de gènes impliqués dans des fonctions plus spécifiques, comme le régulateur HrcA régulant la transcription de gènes de réponse au choc thermique (Schulz *et al.,* 1996).

1.1.1.2. Les différents types de régulateurs transcriptionnels

Différents types de systèmes de régulation existent : les systèmes à un composant (OCS pour One Component System), les systèmes à deux composants (TCS pour Two Component System) ou les systèmes à multiples composants (MCS pour Multi-Component System) (Cashin *et al.,* 2006 ; Marijuan *et al.,* 2010) (Figure 1).

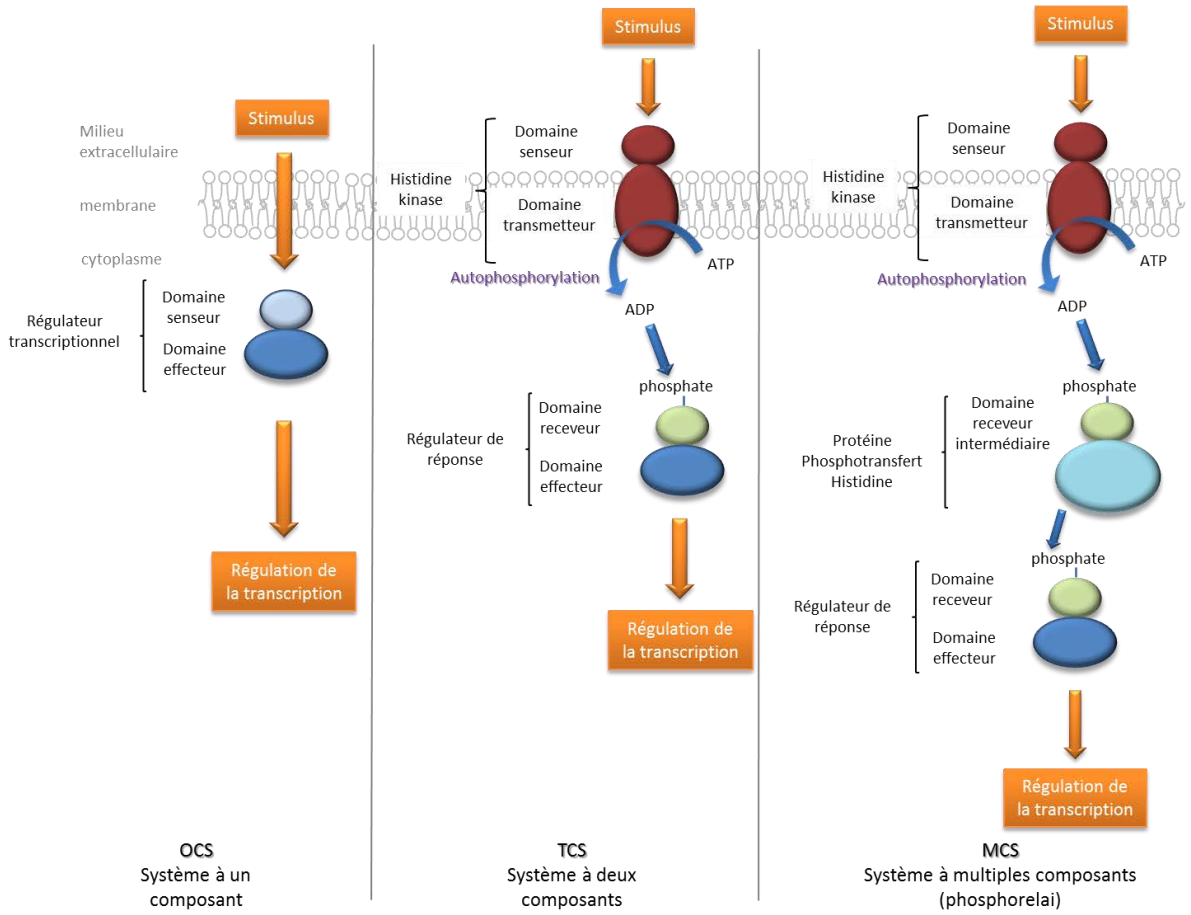


Figure 1 : Schématisation des différents systèmes de régulation transcriptionnelle bactériens (d'après Cashin et *al.*, 2006 ; Marijuan et *al.*, 2010). Un stimulus externe est perçu soit directement par un régulateur transcriptionnel cytoplasmique (OCS, à gauche), soit par un système incluant une histidine kinase transmembranaire qui transmet le signal via le transfert d'un phosphate à un régulateur transcriptionnel cytoplasmique (TCS, au milieu) ou par l'intermédiaire d'un système de phospho-relais faisant intervenir un ou plusieurs intermédiaires entre l'histidine kinase et le régulateur transcriptionnel (MCS, à droite).

Les OCS sont constitués d'une protéine unique capable de percevoir un signal cytoplasmique et de moduler la transcription de gènes cibles (Figure 1) (Cashin *et al.,* 2006 ; Marijuan *et al.,* 2010).

Les TCS sont composés de deux éléments (Figure 1). Le premier, nommé senseur, est une protéine membranaire appartenant à la famille des Histidine Kinases (HK). Les HK s'auto-phosphorylent en réponse à un stimulus extracellulaire puis le groupement phosphate est ensuite transmis au second élément du système, le Régulateur de Réponse (RR) cytoplasmique. Ce dernier se comporte comme un régulateur transcriptionnel à un composant qui permet, de par son action de modulation de la transcription de gènes, l'ajustement de la physiologie bactérienne en réponse aux signaux de l'environnement. Ainsi, dans les systèmes à deux composants, l'HK correspond au module senseur et le RR au module effecteur contrairement aux systèmes à un composant qui sont constitués des deux modules (Cashin *et al.,* 2006 ; Marijuan *et al.,* 2010).

Les MCS, quant à eux, comprennent les mêmes constituants que les systèmes à deux composants (Figure 1). Néanmoins, ils font intervenir, en plus, au moins une protéine intermédiaire pour le transfert du phosphate. Ces systèmes génèrent ainsi une cascade de régulation plus complexe appelé phospho-relais.

1.1.2. Une nouvelle famille de régulateurs transcriptionnels : les Rgg

1.1.2.1. Une famille restreintes aux bactéries Gram positives à bas pourcentage en G et C

La première protéine de la famille Rgg a été identifiée chez *Streptococcus gordonii* Challis par Sulavik *et al*. en 1992 lors de l'étude des mécanismes de régulation de la glycosyltransférase (GTF).

S. gordonii est une espèce pathogène de l'Homme. Elle a pour niche écologique la cavité buccale qu'elle partage avec d'autres espèces de streptocoques, tels que *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus salivarius*. *S. gordonii* produit une enzyme extracellulaire, la GTF, qui permet l'hydrolyse du saccharose et l'utilisation du glucose pour synthétiser des polysaccharides solubles ou non (glucane) (Mayer 1987). Le glucane permet l'adhésion bactérienne sur la surface dentaire entrainant la formation de la plaque dentaire (Ramirez-Ronda 1978 ; Scheld *et al.,* 1978) et contribue à la formation de caries chez l'hôte (Gibbons 1983 ; Loesche 1986). La production de GTF, et par conséquent la production de glucane, confère aux bactéries un phénotype caractérisé par des colonies dures, cohésives et adhérentes. Le génome de *S. gordonii* Challis présente un seul gène codant la GTF, nommé *gtfG*, situé en amont d'un gène, appelée *rgg* (pour regulatory glycosyltransferase gene). La délétion du gène *rgg* induit chez la souche délétée de ce gène, la formation de colonies molles, non cohésives et non adhérentes (Sulavik *et al.,* 1992). De plus, aucun transcrit du gène *gtfG* n'est observé chez la

souche mutante (Sulavik *et al.,* 1996). Lorsque la souche mutante *rgg* est complémentée en *trans* par l'apport du gène *rgg*, une activité GTF six fois plus importante est observée par rapport à la souche sauvage. Ces résultats indiquent que le gène *rgg* est impliqué dans la régulation de la production de la GTF (Sulavik *et al.,* 1992).

L'analyse de la séquence nucléotidique du gène *rgg* indique qu'il code une protéine de 297 acides aminés (aa) avec un poids moléculaire théorique de 34,4 kilo-Daltons (kDa). Aucune séquence « signal » permettant l'export de la protéine et aucune région transmembranaire n'ont été identifiées, suggérant ainsi que la protéine Rgg ait une localisation cytoplasmique. De plus, aucune homologie de séquence n'a été retrouvée au sein des bases de données disponibles lors de cette étude. Ainsi le gène *rgg* coderait un régulateur transcriptionnel ne présentant aucun homologue connu lors de sa découverte.

Suite à la découverte du gène *rgg* de *S. gordonii* Challis, plusieurs études ont mis en évidence la présence de gènes orthologues au gène *rgg* au sein de différentes espèces bactériennes et confirmer leur rôle de régulateur transcriptionnel (Tableau 1).

Tableau 1 : Les régulateurs transcriptionnels Rgg décrits dans la littérature

Protéine Rgg	Espèce et souche	Références
Rgg	*Streptococcus gordonii* Challis CH1	Sulavik et *al*., 1992
GadR	*Lactococcus lactis* MG1363	Sanders et *al*., 1998
RopB	*Streptococcus pyogenes* NZ131	Lyon et *al*., 1999
MutR	*Streptococcus mutans* UA140	Qi et *al*., 1999
Rgg	*Streptococcus oralis* ATCC10557	Fujiwara et *al*., 2000
LasX	*Lactobacillus sakei* L45	Rawlinson et *al*., 2002
RovS	*Streptococcus agalactiae NEM316*	Samen et *al*., 2006
RggC	*Streptococcus thermophilus* CNRZ368	Fernandez et *al*., 2006
Rgg_{1358}	*Streptococcus thermophilus LMD-9*	Ibrahim et *al*., 2007
Rgg	*Streptococcus pneumoniae* D39	Bortoni et *al*., 2009
Rgg	*Streptococcus suis* 05ZYH33	Zheng et *al*., 2011

Une recherche par PSI-BLAST (Position-Specific Iterated Basic Local Alignment Search Tool) des protéines Rgg codées par les génomes bactériens disponibles dans les banques de données a été réalisée (Henry 2011). Cette analyse a révélé l'existence de 733 copies de protéines Rgg putatives, identiques ou différentes (Tableau 2).

<u>Tableau 2 :</u> Nombre de protéines Rgg putatives mises en évidence par l'analyse PSI-BLAST au sein de différentes familles de la division des Firmicutes et des Actinobactéries (Henry 2011).

Division	Classe	Ordre	Famille	Genre	Nombre d'espèces	Nombre de copies
Firmicutes	*Bacilli*	*Lactobacillales*	*Aerococcaceae*	*Aerococcus*	1	1
			Carnobacteriaceae	*Carnobacterium*	1	1
				Granulicatella	1	1
			Enterococcaceae	*Enterococcus*	4	28
			Lactobacillaceae	*Lactobacillus*	19	109
				Pediococcus	1	1
			Leuconostocaceae	*Leuconostoc*	1	2
				Oenococcus	1	4
				Weissella	1	1
			Streptococcaceae	*Streptococcus*	29	441
				Lactococcus	2	26
		Bacillales	*Bacillaceae*	*Bacillus*	1	1
			Listeriaceae	*Listeria*	3	112
			Staphylococcaceae	*Staphylococcus*	1	2
Actinobacteria	*Actinobacteria*	*Bifidobacteriales*	*Bifidobactericeae*	*Parascardovia*	1	2
				Scardovia	1	1
					Somme	733

L'analyse a été effectuée sur l'ensemble des séquences procaryotes disponibles dans les bases de données (en mars 2011). Seuls les genres bactériens présentant au moins une souche dont le génome contient un (ou plusieurs) gène(s)codant une protéine Rgg sont indiqués dans ce tableau.

A l'exception de 3 protéines Rgg présentes chez les *Bifidobacteriaceae*, toutes les protéines Rgg sont codées par des Firmicutes appartenant plus spécifiquement à la classe des Bacilli. La majorité (60%) des protéines Rgg est codée par les streptocoques mais un grand nombre est également retrouvé au sein des génomes des genres *Listeria* (15,3%), *Lactobacillus* (14,9%), *Enterococcus* (3,8%) et *Lactococcus* (3,5%). Toutes les souches appartenant au genre *Lactococcus*, dont le génome était disponible lors de cette étude, possèdent au moins un gène *rgg*. Au sein du genre *Streptococcus*, 88% des génomes séquencés disponibles possèdent au moins une copie *rgg*, 70% pour les Listeria et 57% pour les Lactobacilles. A l'inverse, les gènes *rgg* sont peu répandus dans les génomes des genres *Bacillus* (3%) et *Staphylococcus* (7%). Pour les genres *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus* et *Enterococcus*, le faible nombre de génomes disponibles ne permet pas de conclure sur la répartition du nombre de gènes *rgg* par genre. Quant aux genres *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Granulicatella*, *Weissella*, *Parascardovia* et *Scardovia*, aucun génome n'était disponible au moment de l'étude (Henry 2011).

Ainsi, la famille de régulateur transcriptionnel Rgg n'est pas ubiquitaire dans les génomes bactériens. En effet, les protéines appartenant à la famille de régulateur transcriptionnel Rgg sont restreintes aux bactéries à coloration Gram positive à bas pourcentage en bases G et C. Elles sont majoritairement retrouvées au sein des genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Listeria* et *Lactobacillus*.

1.1.2.2. Présence de plusieurs gènes *rgg* par génome

Les données de la littérature rapportent la présence de plusieurs gènes *rgg* distincts, appelés copies, au sein d'un seul et même génome. En effet, dans le génome de *S. gordonii* Challis CH1, trois copies de gènes *rgg* ont été identifiées (Sulavik *et al.,* 1992 ; Kili *et al.,* 1999 ; Vickerman *et al.,* 2001). De même, le génome de la souche NEM316 de *S. agalatiae* porte trois copies *rgg* : les gènes *gbs0230*, *gbs1555*, également appelé *rovS* (pour regulator of virulence in *Streptococcus agalactiae*) et *gbs2117* (Samen *et al.,* 2006). De manière similaire, Ibrahim *et al.* (2007) ont mis en évidence la présence de 7 copies *rgg* au sein du génome de la souche CNRZ1066 de *Streptococcus thermophilus*. La présence de plusieurs gènes appartenant à la famille *rgg* a également été rapportée chez *S. pneumoniae* (Bortoni *et al.,* 2009) et chez la souche NZ131 de *S. pyogenes* avec les gènes *ropB*, *rgg2* et *rgg3* (Lyon *et al.,* 1998 ; Chang *et al.,* 2011).

Une étude de la répartition du nombre de copies de gène *rgg* par génome réalisée sur l'ensemble des génomes séquencés disponibles indique que, chez les génomes possédant au moins une copie de gènes *rgg*, 25% ne contient qu'un seul gène *rgg* tandis que 75% en possède au moins 2. (Figure 2) (Henry 2011). Le nombre de copies de gène *rgg* par génome est compris entre 1 à 7 (Henry 2011).

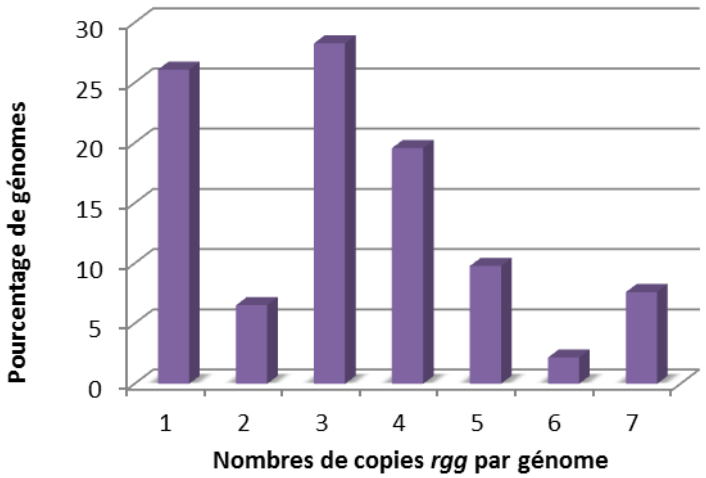


Figure 2 : Histogramme représentant le pourcentage de génomes séquencés qui possèdent une ou plusieurs copies *rgg* (Henry 2011).

Une analyse plus fine au sein des différents genres bactériens a également été réalisée et a permis de mettre en évidence le fait que les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria* et *Streptococcus* sont ceux qui possèdent le plus de copies de gènes *rgg* par génome (Figure 3) (Henry 2011).

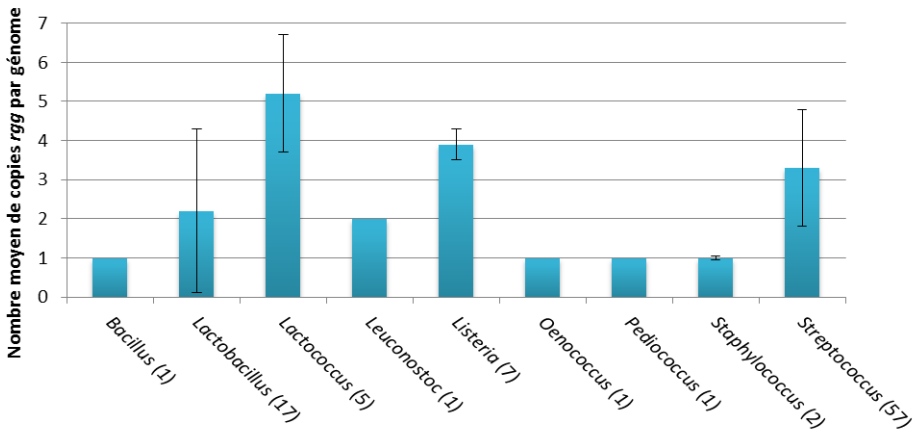


Figure 3 : Nombre moyen de copies *rgg* présentes dans les génomes qui possèdent au moins un gène *rgg* (Henry 2011). Les résultats présentés correspondent à la moyenne ± la déviation standard. Le nombre de génomes séquencés au sein de chacun des genres considérés est indiqué entre parenthèses.

Une grande majorité des souches appartenant aux genres *Lactococcus*, *Listeria* et *Streptococcus* possèdent au moins 2 copies *rgg* par génome. De plus, ces trois genres bactériens sont ceux qui ont le plus grand nombre de gènes *rgg* par génome. Par ailleurs, une grande variabilité du nombre de copies de gène *rgg* est observée pour les genres *Lactobacillus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Les espèces possédant le plus de copies de gène *rgg* sont *Lb. rhamnosus*, *L. lactis*, *S. gallolyticus* et S. *thermophilus* (Henry 2011).

1.1.3. Polymorphisme des protéines Rgg

La présence de plusieurs copies *rgg* distinctes au sein d'une même souche suggère que les produits de ces gènes sont polymorphes. Afin d'étudier ce polymorphisme, l'étude *in silico* des séquences conservées des protéines Rgg a été réalisée (Henry 2011). Pour cela, un alignement des séquences primaires de 499 séquences différentes et non redondantes de protéines Rgg retrouvées au sein de toutes les séquences disponibles a été effectué à l'aide du logiciel ClustalW. Plusieurs résidus conservés ont ainsi pu être identifiés. Cependant, ils ne représentent qu'une faible proportion de la séquence protéique. En effet, seulement 12 résidus sont conservés dans 80% des séquences étudiées contenant en moyenne 295 aa (Henry 2011). Ils ne représentent alors qu'environ 4% des aa constituants les protéines Rgg. Les protéines Rgg se caractérisent donc par un fort polymorphisme, comme l'illustre les pourcentages d'identité des protéines Rgg décrites dans la littérature prises 2 à 2. En effet, à quelques exceptions près, les protéines Rgg se caractérisent par seulement 30% d'identité en moyenne (Tableau 3).

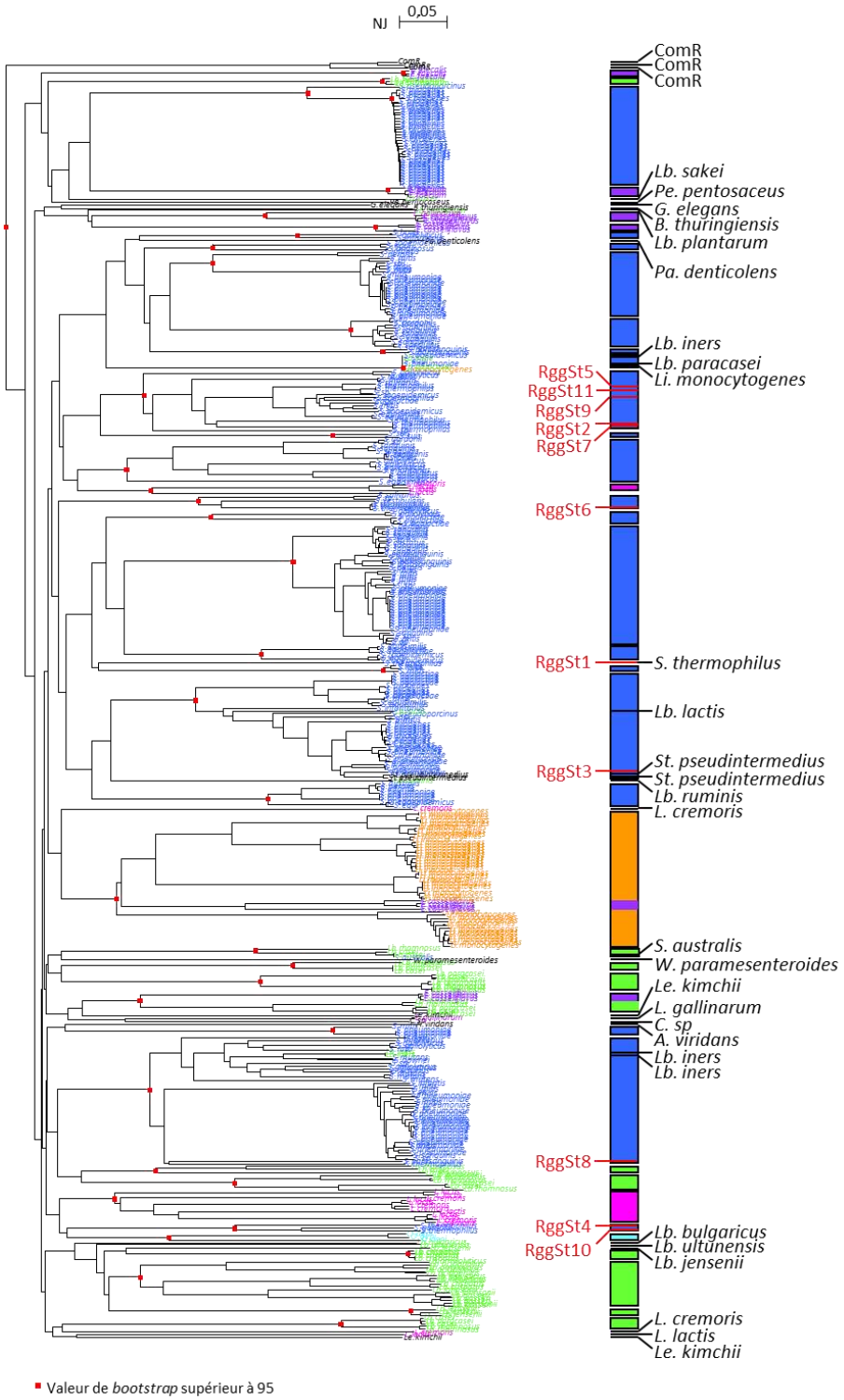
<u>Tableau 3 :</u> Pourcentage d'identité entre les différentes protéines Rgg décrites dans la littérature.

Protéine Rgg		*S. gordonii* Challis CH1 Rgg	*L. lactis* MG1363 GadR	*S. mutans* UA140 MutR	*S. pyogenes* NZ131 RopB	*S. oralis* ATCC10557 Rgg	*S. agalactiae* NEM316 RovS	*S. suis* 05ZYH33 Rgg	*Lb. sakei* L45 LasX	*S. thermophilus* LMD-9 Rgg1358	*S. thermophilus* CNRZ368 RggC
GadR	*L. lactis* MG1363	23%									
MutR	*S. mutans* UA140	28%	41%								
RopB	*S. pyogenes* NZ131	23%	24%	24%							
Rgg	*S. oralis* ATCC10557	76%	24%	25%	22%						
RovS	*S. agalactiae* NEM316	28%	28%	29%	24%	26%					
Rgg	*S. suis* 05ZYH33	34%	24%	26%	27%	32%	28%				
LasX	*Lb. sakei* L45	21%	22%	47%	28%	19%	41%	33%			
Rgg1358	*S. thermophilus* LMD-9	32%	28%	50%	29%	33%	46%	43%	25%		
RggC	*S. thermophilus* CNRZ368	32%	23%	32%	22%	31%	27%	40%	23%	63%	
Rgg	*S. pneumoniae* D39	29%	56%	23%	26%	26%	26%	24%	32%	31%	29%

Par ailleurs, une étude phylogénétique des différentes copies protéiques Rgg présentes dans les bases de données a été réalisée (Figure 4).

Cette analyse a mis en évidence le fait que les protéines Rgg ne forment pas un seul groupe monophylétique mais qu'elles peuvent être classées en au moins 39 groupes distincts (Henry 2011). La plupart des groupes identifiés sont issus d'un même genre bactérien. Cependant, les protéines Rgg d'un même genre bactérien ne se retrouvent pas systématiquement au sein d'un même groupe. Par exemple, les protéines Rgg présentes chez les streptocoques sont présentes dans 19 groupes différents, celles des entérocoques sont réparties dans 6 groupes et celles présentes chez les lactocoques dans 2 groupes. De plus, certaines copies Rgg appartenant à un genre bactérien peuvent être incluses dans le groupe formé par un autre genre bactérien. Ceci suggère que les copies Rgg ont pu être transférées d'un genre bactérien à un autre par transfert horizontal. Ainsi, la classification des protéines Rgg n'est pas en lien avec la taxonomie bactérienne.

L'ensemble de ces données montre que les protéines appartenant à la famille Rgg sont polymorphes entre elles et ne forment pas un groupe monophylétique (Henry 2011).



<u>Figure 4 :</u> Arbre phylogénétique des copies Rgg putatives réalisé par la méthode du Neighbour-Joining (NJ) (Henry 2011). Afin de permettre l'interprétation de l'arbre (à gauche), une représentation (à droite) a été réalisée avec un regroupement monophylétique des copies Rgg (valeur de Bootstrap supérieure à 95). Les valeurs de Bootstrap ont été obtenues à partir de 1000 répliques. L'arbre a été enraciné à l'aide de la séquence primaire de 3 copies ComR de streptocoques. Les copies Rgg présentes chez les streptocoques sont présentées en bleu foncé, en vert chez les lactobacilles, en rose chez les lactocoques, en violet chez les entérocoques, en orange chez les listeria et en bleu clair chez les oenocoques. Les copies Rgg isolées apparaissent en noir et celles de *S. thermophilus* apparaissent en rouge.

1.1.4. Caractéristiques des protéines Rgg

1.1.4.1. Présence d'un domaine HTH à leur extrémité N-terminale

Les protéines de la famille Rgg se caractérisent par la présence d'un domaine Hélice-Tour-Hélice (HTH) à leur extrémité N-terminale (Figure 5).

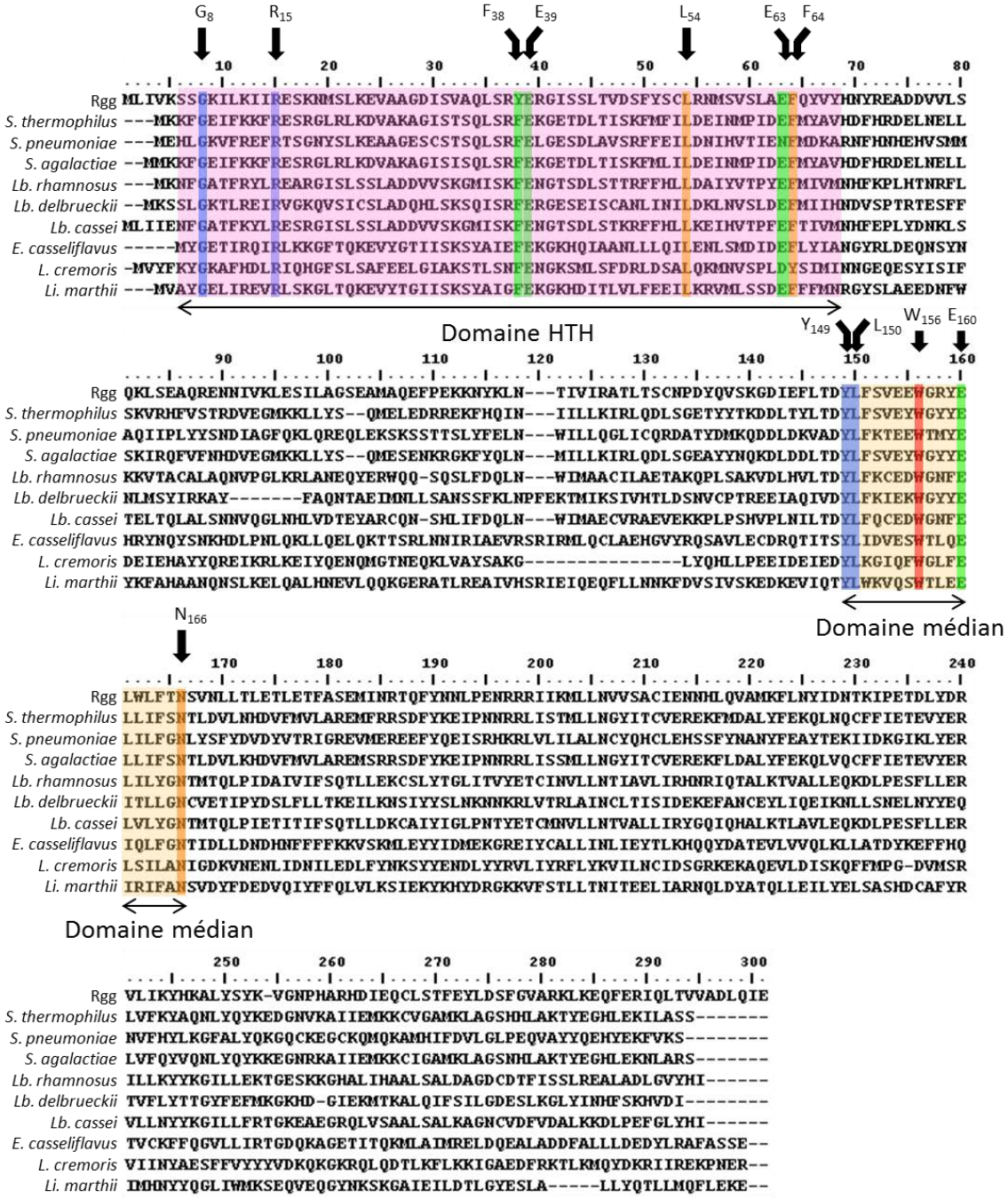


Figure 5 : Alignement de la séquence primaire de différentes protéines Rgg (Henry 2011). L'alignement des séquences protéiques de 7 copies Rgg illustre l'alignement obtenu avec les 499 séquences primaires distinctes des protéines Rgg. Les résidus conservés dans 95% des 499 séquences primaires apparaissent sur fond rouge, ceux conservés dans 90% sur fond bleu, dans 85% sur fond vert et ceux conservés dans 80% des séquences apparaissent sur fond orange. Les aa constituant le domaine HTH-XRE, tel qu'annoté dans les bases de données, sont encadrés sur fond rose. Les acides aminés constituant le domaine médian sont encadrés sur fond jaune. Les acides aminés conservés au sein des différentes protéines Rgg sont indiqués par des flèches.

Le domaine HTH des protéines Rgg est situé de la position 8 à la position 70 (Henry 2011). Ce domaine HTH conservé est apparenté à la famille XRE (pour Xenobiotic Response Element). Il permet la fixation des protéines Rgg à l'ADN. En effet, lors d'une étude portant sur l'analyse de structures communes et du mécanisme d'action des protéines Rgg, un alignement de la structure primaire de 57 protéines Rgg non redondantes a été réalisé (Loughman *et al.,* 2007). Deux acides aminés conservés, la glycine en position 4 (G_8 sur la Figure 5) et l'arginine en position 11 (R_{15} sur la Figure 5), ont été mis en évidence dans le domaine HTH. Le rôle du résidu G_8 n'a pas été clairement établi. Par contre, le résidu R_{15} a clairement été montré comme impliqué dans la liaison de la protéine Rgg à l'ADN (Loughman *et al.,* 2007). L'analyse de la structure d'autres domaines HTH-XRE a révélé que le résidu arginine à cette position est important pour la stabilité de la liaison de la protéine à l'ADN (Wigneshweraraj SR 2001). L'étude *in silico* des séquences de 499 protéines Rgg différentes et non redondantes a confirmé la conservation des deux résidus G_8 et R_{15} au sein de toutes les séquences étudiées (Henry 2011). D'autres résidus conservés au sein du domaine HTH, dans au moins 80% des séquences étudiées, ont été identifiés : la tyrosine en position 38 (Y_{38}), les acides glutamique en position 39 et 63 (E_{39} et E_{63}), la leucine en position 54 (L_{54}) et la phénylalanine en position 64 (F_{64}). Le mécanisme d'action qui permettrait à la protéine Rgg de se lier à l'ADN est le suivant : la deuxième hélice du motif HTH (dite de reconnaissance) pénètrerait dans le grand sillon de l'hélice de l'ADN cible entrainant la formation de liaisons hydrogènes entre les chaînes latérales de la protéine et l'ADN, ce qui permettrait la fixation de la protéine à l'ADN. La deuxième hélice stabiliserait ensuite l'interaction entre la protéine et l'ADN (Luscombe *et al.,* 2000).

1.1.4.2. Présence d'un second domaine au sein des protéines Rgg : le domaine médian

Aucun autre domaine au sein des protéines Rgg n'est répertorié dans les banques de données. Cependant, l'alignement réalisé sur les 499 séquences primaires distinctes des protéines Rgg a permis la caractérisation d'un autre domaine, appelé domaine médian, situé au centre de la protéine (Figure 5) (Henry 2011). Ce dernier est constitué d'une région de la séquence primaire présentant plusieurs résidus conservés : la tyrosine en position 149 (Y_{149}), la leucine en position 150 (L_{150}), le tryptophane en position 156 (W_{156}), l'acide glutamique en position 160 (E_{160}) et l'asparagine en position 166 (N_{166}). Ces données corroborent les résultats de Loughman et Caparon qui, en 2007, ont mis en évidence la conservation du W_{156} au sein des protéines Rgg et émis l'hypothèse d'une implication de ce résidu dans une liaison protéine-protéine (Loughman *et al.,* 2007). En effet, la conservation d'un résidu tryptophane au niveau d'un domaine de liaison protéine-protéine a déjà était décrit (Ma *et al.,* 2003). De plus, les données de la littérature montrent que certaines protéines Rgg, dont la protéine RovS de *S. agalactiae* (Samen *et al.,* 2006), sont retrouvées sous forme d'homodimères, tandis que d'autres, telles que la protéine RopB de *S. pyogenes* (Loughman *et al.,* 2006) ou la protéine Rgg1358 de *S. thermophilus* LMD-9 (Fleuchot *et*

al., 2011), interagissent avec d'autres protéines. Les résidus du domaine médian pourraient jouer un rôle dans ces interactions et, par conséquent, seraient importants pour la fonctionnalité des protéines Rgg.

1.2. Fixation des protéines Rgg à l'ADN

1.2.1. Fixation des protéines Rgg au niveau des régions promotrices des gènes cibles

La présence du domaine HTH chez les protéines Rgg suggère qu'elles seraient capables de réguler la transcription de leurs gènes cibles en se fixant à l'ADN, au niveau des régions promotrices. La première étude démontrant cette fixation a été réalisée par Vickerman *et al.,* en 2003, pour la protéine Rgg de *S. gordonii* Challis. Les auteurs ont montré que la protéine Rgg est capable de se fixer à une région intergénique de 107 pb située en amont du gène *gtfG* régulé par la protéine Rgg. Cette séquence contient la région promotrice du gène *gtfG* (Vickerman *et al*., 2003).

L'étude *in vitro* de la fixation des protéines Rgg dans la région promotrice de leur gène(s) cible(s) a été étendue à de nombreuses autres protéines Rgg. Ainsi, la protéine RopB de *S. pyogenes* NZ131 se fixe à la région promotrice du gène *speB* (Neely *et al.,* 2003). La protéine LasX de *Lb. sakei* L45 se fixe à celle de l'opéron $las_{A\text{-}W}$ (Rawlinson *et al.,* 2005). La protéine RovS de *S. agalactiae* NEM316 se fixe sur les régions promotrices des gènes *fbsA*, *gbs0230*, *sodA* et de l'opéron *cyl* (Samen *et al.,* 2006). La protéine Rgg3 de *S. pyogenes* NZ131 se fixe aux promoteurs des gènes *shp2* et *shp3* (Chang *et al.,* 2011). De même, la protéine Rgg1358 de *S. thermophilus* LMD-9 se fixe aux régions promotrices des gènes *ster_1357* et *shp1358* (Fleuchot *et al.,* 2011).

Par ailleurs, une étude a mis en évidence, par des expériences de ChIP (Chromatin ImmunoPrecipitation), que la protéine RopB était capable de se fixer à l'ADN génomique au niveau de 65 sites chez une souche de *S. pyogenes* NZ131 cultivée en phase stationnaire de croissance (Anbalagan *et al.,* 2011). Ces sites de fixation se situent aussi bien au niveau de séquences codantes que de séquences non codantes. Dans la plupart des cas, la protéine RopB se lie à des séquences situées en amont de ses gènes cibles (Dmitriev *et al.,* 2006). Le nombre de sites de fixation de la protéine RopB est comparable à celui d'autres régulateurs transcriptionnels tels que CodY de *Bacillus subtilis* (68 sites de fixation) (Molle *et al.,* 2003) ou FNR d'*E. coli* (63 sites de fixation) (Grainger *et al.,* 2007). Les régulateurs transcriptionnels bactériens se lient souvent à de l'ADN non codant localisé en amont de leur gène cible. Cependant, des promoteurs intragéniques peuvent également être présents chez les procaryotes (Tutukina *et al.,* 2007). Ainsi, chez *E. coli*, le nombre de promoteurs localisés au niveau d'ADN codant est estimé à 28% (Shimada *et al.,* 2008). Chez *S. pyogenes*, plus de la moitié des sites de fixation de la protéine RopB (55%) est localisé au niveau d'ADN codant (Anbalagan *et al.,* 2011).

Une étude similaire a été réalisée lors d'une croissance en phase exponentielle de la souche NZ131 de *S. pyogenes*. Dans cette condition, 62 sites de fixation de la protéine RopB ont pu être identifiés (Anbalagan *et al.,* 2012). Parmi eux, 24 sites sont localisés au sein d'ADN codant et 38 au niveau d'ADN non codant. Parmi ces sites de fixation, 70% sont adjacents à des gènes connus pour être régulés par la protéine RopB.

Ainsi, au total, 125 sites de fixation différents ont pu être mis en évidence pour la protéine RopB (Anbalagan *et al.,* 2012). En effet, seuls 2 sites de fixation sont communs aux deux phases de croissance (Anbalagan *et al.,* 2011 ; Anbalagan *et al.,* 2012) indiquant ainsi une fixation différentielle de la protéine Rgg en fonction de l'état physiologique des cellules. Ceci corrobore les résultats précédemment acquis par la même équipe démontrant que la protéine RopB ne se fixe au promoteur du gène *speB* qu'en phase stationnaire de croissance (Anbalagan *et al.,* 2011).

Dans le modèle de régulation de la transcription du gène *speB* par la protéine RopB, proposé par Loughman et Caparon (2006), la protéine RopB nécessiterait la présence du cofacteur protéique LacD.1, une tagatose-1,6-bisphosphate aldolase impliquée dans le métabolisme du lactose. En phase exponentielle de croissance, la protéine LacD.1 se fixerait à la protéine RopB en réponse à des concentrations élevées en composés intermédiaires issus du métabolisme des carbohydrates, tels que le glycéraldéhyde-3-phosphate et le dihydroxyacétone, et modulerait la spécificité de fixation de la protéine RopB au promoteur du gène *speB* (Loughman *et al.,* 2006 ; Anbalagan *et al.,* 2012).

Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que les protéines Rgg réguleraient de manière fine la transcription de leurs gènes cibles et ceci, en fonction des conditions environnementales et de la présence de cofacteurs.

1.2.2. Absence de séquence consensus de fixation à l'ADN des protéines Rgg

Chez *Lb. sakei*, l'étude de la fixation de la protéine LasX sur la région promotrice de l'opéron *lasA-W* a permis de restreindre la séquence de fixation à une région de 19 pb (AATTTAATATATTATCCCT) située en amont de la boite -35 (Rawlinson *et al.,* 2005). Un alignement des régions promotrices des gènes régulés par différentes protéines Rgg a été réalisé (promoteurs des gènes *gtfG* régulé par la protéine Rgg de *S. gordonii, gtfR* régulé par la protéine Rgg de *S. oralis*, *mutA* régulé par la protéine MutR de *S. mutans* et *gad* régulé par la protéine GadR de *L. lactis*). Sur une région de 74 nucléotides (nt), seuls 3 sont identiques et ces derniers sont tous situés dans la séquence de fixation proposée pour la protéine LasX (Rawlinson *et al.,* 2005).

Chez la souche *S. agalactiae* NEM316, des expériences de retard de migration sur gels d'électrophorèse (EMSA) ont permis de déterminer une séquence consensus de fixation pour la protéine RovS (Samen *et al.,* 2006). Cette région est constituée d'une séquence palindromique dégénérée: **AWAAW**VH**T**D**A**W-N6/7-**WTKWWAMD**W**AK** (les nucléotides conservés sont en gras ;

W correspond à une base A ou T ; V à une base G, C ou A ; H à une base A, C ou T ; D à une base G, A ou T ; K à une base G ou T et M à une base A ou C). Un total de 25 sites contenant cette séquence sont présents sur le génome de *S. agalactiae* NEM316 et sont ainsi des sites potentiels de fixation de la protéine RovS.

Par ailleurs, la comparaison des 125 sites de fixation de la protéine RopB à l'ADN chromosomique de *S. pyogenes* NZ131 n'a pas permis de déterminer de séquence consensus (Anbalagan *et al.,* 2011 ; Anbalagan *et al.,* 2012). Ceci suggère que l'interaction de la protéine RopB avec un ou plusieurs cofacteurs modulerait sa capacité de fixation.

La comparaison des séquences consensus de fixation à l'ADN des protéines RovS et LasX indique qu'elles sont différentes, suggérant que les séquences de fixation à l'ADN des protéines Rgg sont propres à chaque protéine. Ceci est corrélé par le grand polymorphisme du domaine HTH des protéines de la famille Rgg.

L'absence de consensus de fixation communs à toutes les protéines Rgg suggère que les différentes protéines Rgg auraient des cibles distinctes. De plus, la nécessité d'un ou plusieurs cofacteurs modulant la spécificité de fixation de la protéine Rgg rend délicate l'identification de ses cibles *in silico*.

1.3. Les gènes cibles des protéines Rgg

1.3.1. Les gènes adjacents aux loci *rgg* sont des cibles privilégiées

Les protéines de la famille Rgg décrites dans la littérature régulent la transcription d'un ou plusieurs gènes adjacents à leurs loci (Figure 6).

Par exemple, la protéine Rgg de *S. gordonii* Challis régule le gène *gtfG* distant de 66 nucléotides et positionné en aval du gène *rgg* (Sulavik *et al.,* 1992). La protéine MutR de *S. mutans* régule la transcription de l'opéron *mutAMTFEG* séparés de 584 pb et orientés dans un sens inverse (Qi *et al.,* 1999). Cependant, l'implication des protéines Rgg de *S. pneumoniae*, Rgg de *S. suis* et RovS de *S. agalactiae* dans la transcription des gènes adjacents aux gènes qui les codent n'a pas été étudiée.

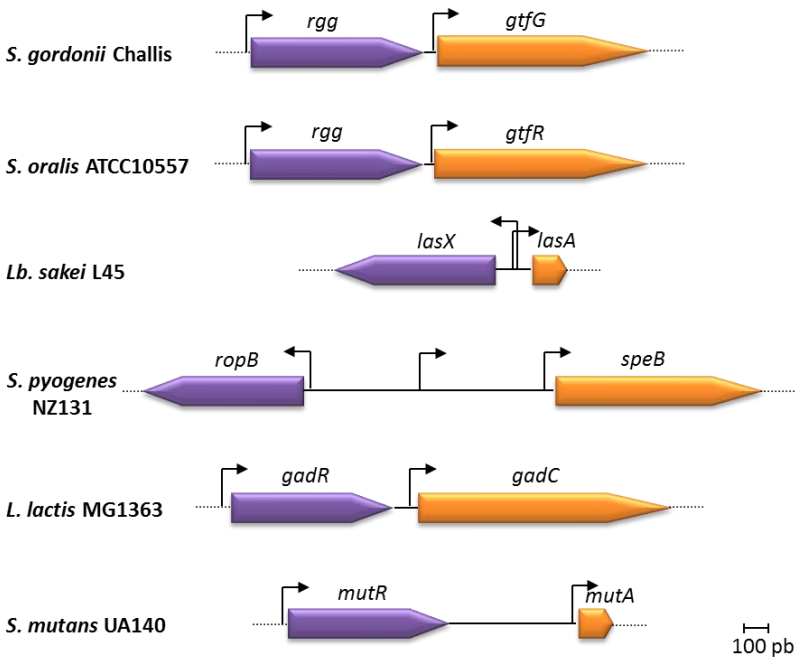
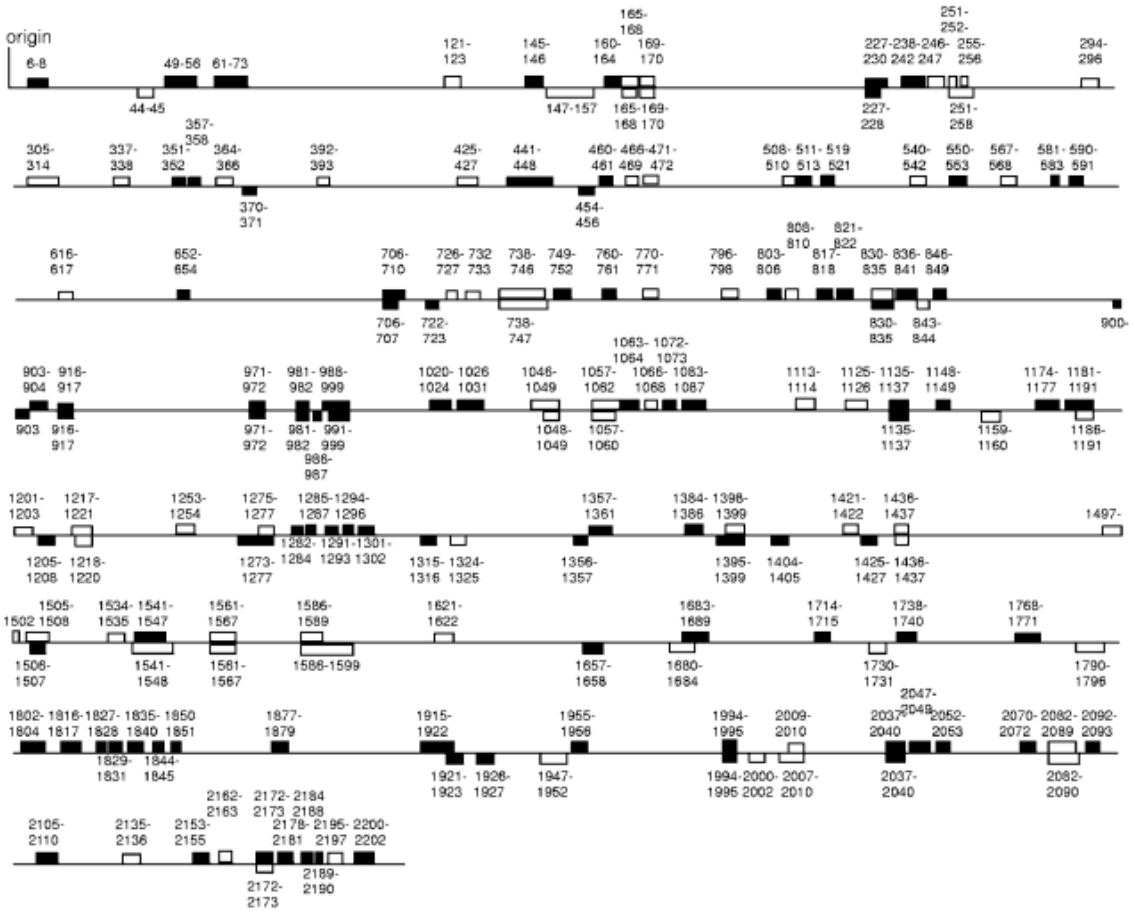


Figure 6 : Schématisation de l'orientation génétique des gènes codant les protéines Rgg et de leur cible. Les flèches en violet représentent les gènes de la famille *rgg*, les flèches en orange représentent les gènes régulés. Les flèches cassées noires représentent les promoteurs.

Ainsi, les données de la littérature soulignent l'association des régulateurs transcriptionnels de la famille Rgg avec leurs gènes cibles au sein d'un même locus. Néanmoins, l'orientation des deux gènes l'un par rapport à l'autre ne semble pas constituer une caractéristique commune (Figure 6).

1.3.2. Les cibles des protéines Rgg sont diverses et variées

Le transcriptome et le protéome d'une souche de *S. pyogenes,* dans laquelle le gène *ropB* a été inactivé, comparés à ceux de la souche sauvage indique que la protéine RopB est impliquée dans la transcription de nombreux gènes (Chaussee *et al.,* 2002 ; Chaussee *et al.,* 2004 ; Dmitriev *et al.,* 2006). Une étude analogue réalisée chez *S. suis* SS2 a permis de déterminer le régulon de la protéine Rgg, soit 345 gènes, ce qui représente 16% des ORF de *S. suis* (Zheng *et al.,* 2011). Les gènes cibles de ces deux protéines sont répartis tout au long du génome des souches qui les possèdent, comme l'illustre la Figure 7.



<u>Figure 7 :</u> Localisation des gènes dont la transcription est régulée par la protéine RopB sur le chromosome de *S. pyogenes* SF370 (Dmitriev *et al.,* 2006). Les opérons polyscistroniques régulés par la protéine RopB pendant la phase exponentielle et stationnaire de croissance sont indiqués par des rectangles situés respectivement au-dessus et en dessous de la ligne. Les rectangles blancs et noirs indiquent les gènes dont les transcrits sont respectivement plus ou moins abondants chez la souche delétée du gène *ropB* par rapport à la souche sauvage. Les nombres correspondent à l'annotation des gènes au sein du génome de *S. pyogenes* SF370.

L'étude réalisée par Dmitriev *et al*. (2006) a permis de démontrer la capacité de la protéine RopB de *S. pyogenes* à contrôler la transcription de ses gènes cibles aussi bien par une action inductive que par une action répressive. En effet, l'analyse transcriptomique a permis l'identification de 165 transcrits de gènes plus abondants alors que 134 sont moins abondants chez la souche mutante délétée du gène *ropB* lors d'une croissance en phase exponentielle (Dmitriev *et al.,* 2006). Pendant la phase stationnaire de croissance, 227 et 340 transcrits de gènes sont respectivement plus et moins abondants chez le mutant. Une étude similaire réalisée pour la protéine Rgg de *S. suis* SS2 a permis d'identifier 345 gènes différemment exprimés entre les deux souches, 195 gènes sont plus abondants et 150 sont moins abondants chez la souche mutante (Zheng *et al.,* 2011). Ainsi, une même protéine Rgg peut à la fois être un activateur et un répresseur de la transcription.

Par ailleurs, les gènes appartenant aux régulons des protéines RopB de *S. pyogenes* et Rgg de *S. suis* codent des protéines impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques telles que le

métabolisme des carbohydrates, des aa *etc*., la virulence ou la réponse aux stress (Dmitriev *et al.,* 2006 ; Zheng *et al.,* 2011). Parmi les gènes régulés par les protéines Rgg sont également retrouvés des régulateurs transcriptionnels. Par exemple, la protéine RopB de *S. pyogenes* régule l'expression de régulateurs transcriptionnels, tel que les gènes *mga* et *sagA*, le système à deux composants codé par les gènes *csrR/S* et le système à trois composants codés par les gènes *fasABC* (Chaussee *et al.,* 2002).

Ces données suggèrent que les protéines RopB de *S. pyogenes* et Rgg de *S. suis* SS2 pourraient participer à des réseaux complexes de régulation. En effet, l'augmentation de la transcription des gènes *hasAB*, *ska*, *sagA* et *mf-1* chez une souche délétée du gène *ropB* (Chaussee *et al.,* 2002) peut s'expliquer, en partie, par le fait que la protéine RopB régule positivement la transcription du gène codant le régulateur transcriptionnel CsrRS qui lui-même réprime l'expression des gènes *hasAB*, *ska*, *sagA* et *mf-1* (Miller *et al.,* 2001). La protéine RopB pourrait donc contrôler la transcription de certains gènes via un ou plusieurs intermédiaires, en régulant la transcription de gènes ayant une fonction de régulateur transcriptionnel (Figure 8).

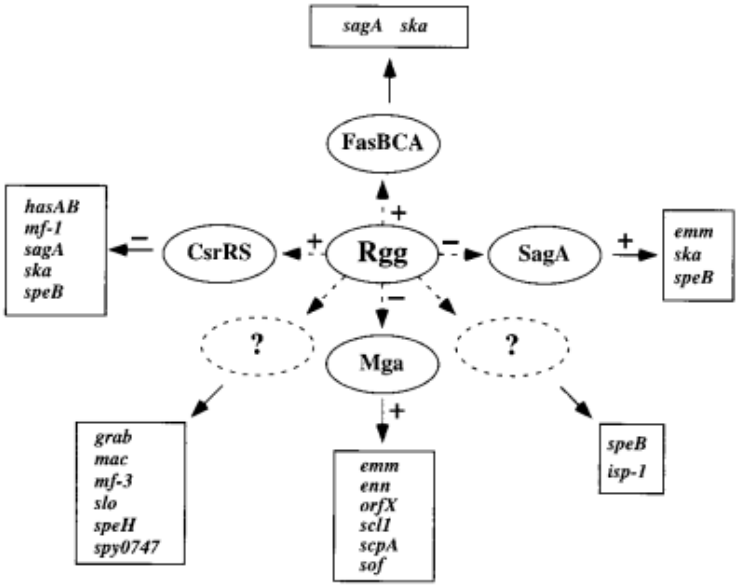


Figure 8 : La protéine RopB est incluse dans un réseau complexe de régulation (Chaussee *et al.,* 2002). La régulation positive et négative de la transcription de gènes est désignée par respectivement des symboles + et -. Les flèches en pointillés indiquent la possible influence indirecte sur l'expression de gènes. Les ovales en pointillés représentent les intermédiaires putatifs de régulation.

Le nombre important de gènes constituant les régulons des protéines RopB de *S. pyogenes* et Rgg de *S. suis*, la diversité des fonctions codées par ces gènes ainsi que la participation des protéines Rgg dans des réseaux de régulation, indiquent qu'elles sont des régulateur globaux de l'expression génique, posant la question de la généralisation aux autres protéines Rgg.

1.4. Participation de certaines protéines Rgg aux mécanismes de quorum sensing

1.4.1. Les mécanismes de quorum sensing chez les bactéries à coloration Gram positive

Depuis quelques décennies, des mécanismes de communications cellulaires entre bactéries ont été identifiés. Parmi eux, des mécanismes, appelés quorum sensing (QS), permettent le contrôle de l'expression de gènes en réponse à l'augmentation de la densité cellulaire. Cette communication cellulaire se fait via des molécules de signalisation sécrétées qui sont produites puis détectées par les cellules. La détection de la phéromone appelée « sensing » dépend de sa concentration seuil ou « quorum » qui n'est atteinte que si un nombre suffisant de cellules la synthétise. Ainsi, ce système permet à la totalité des individus de la population bactérienne de modifier de façon coordonnée l'expression de ses gènes, conférant ainsi simultanément à l'ensemble de la population de nouvelles propriétés (Atkinson *et al.,* 2009).

Ainsi, une molécule de signalisation est produite par les bactéries puis secrétée dans l'environnement extracellulaire par un transporteur et s'y accumule. Lorsque la concentration seuil est atteinte, la molécule signal est détectée par un récepteur inter-membranaire ou cytoplasmique conduisant à la modulation de l'expression de gènes au sein de la population (Rutherford *et al.,* 2012). Toutefois les mécanismes de QS peuvent différer entre les bactéries Gram positives et négatives. D'une part, la nature de la molécule de signalisation diffère entre les deux types de bactéries. En effet, chez les bactéries Gram négatives, ces molécules peuvent être une N-acyl homosérine lactone (AHL), une 2-alkyl-4-quinolone, une γ-butyrolactone, *etc*. Au contraire, chez les bactéries Gram positives, la molécule de signalisation est généralement de nature peptidique (Atkinson *et al.,* 2009). D'autre part, le QS est différent par la voie de réimportation du signal au sein de la cellule. Chez les bactéries à coloration Gram négative, la réimportation de la molécule signale peut se faire librement à travers les membranes externe et interne et interagir directement avec le régulateur transcriptionnel alors que la présence d'un transporteur est requise chez les bactéries Gram positives. La réimportation peut également se faire via un système à deux composants chez les deux groupes de bactéries.

Chez les bactéries à coloration Gram positive, la molécule de signalisation est un peptide, appelé autoinduceur (AI) ou phéromone. Il existe deux voies générales d'activation du QS qui diffèrent par leur mécanisme de perception du signal (Figure 9) (Williams *et al.,* 2007).

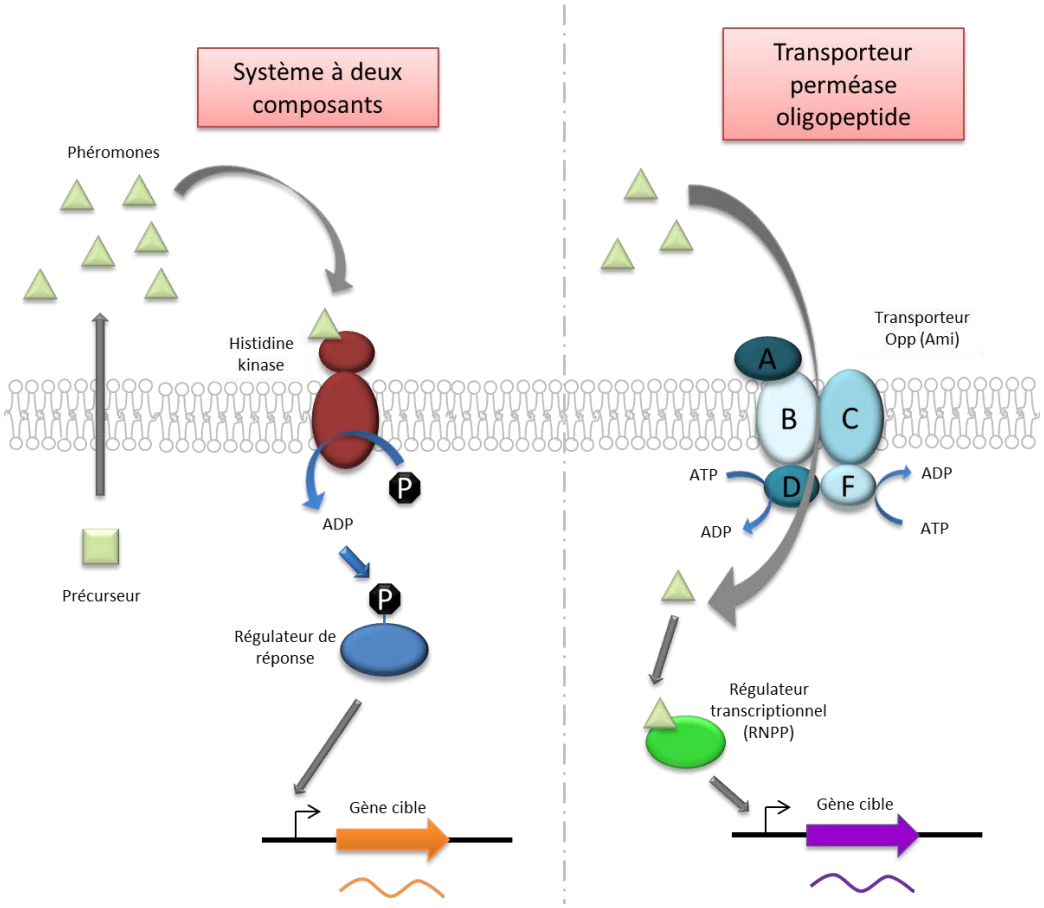


Figure 9 : Schématisation des deux voies d'activation de QS chez les bactéries Gram positives. La phéromone est produite puis excrétée dans l'environnement extracellulaire. A une concentration seuil, le peptide peut être (i) soit perçu par une HK d'un système à deux composants conduisant à sa phosphorylation/déphosphorylation et celle du régulateur de réponse qui, par la suite, module la transcription de ses gènes cibles ; (ii) soit réimporté à l'intérieur de la cellule par un transporteur de type perméase d'oligopeptide (Opp ou Ami) et peut interagir avec un régulateur transcriptionnel qui, par la suite, module la transcription de ses gènes cibles.

Dans la première voie d'activation, la phéromone est perçue par une HK d'un système à deux composants. La détection du peptide conduit à la phosphorylation ou à la déphosphorylation de l'HK puis du régulateur transcriptionnel cytoplasmique spécifique. Cet état de phosphorylation modifie l'habilité du régulateur à se fixer à l'ADN, modulant ainsi sa capacité à activer ou réprimer la transcription de ces gènes cibles. Cette voie d'activation de QS a été décrite pour de nombreux systèmes participant, par exemple, à la transformation naturelle de *S. pneumoniae* et *B. subtilis* (Claverys *et al.,* 2002 ; Claverys *et al.,* 2006) ou à la régulation de gènes de virulence chez *Staphylococcus aureus* (Novick *et al.,* 2008).

Dans la seconde voie d'activation du QS, le peptide est réimporté au sein de la cellule par un système de transport de type perméase d'oligopeptide, appelé Opp ou Ami, appartenant à la famille des transporteurs ABC (pour ATP-binding cassette) (Linton *et al.,* 2007). Une fois internalisée, la phéromone interagit directement avec un régulateur transcriptionnel, pouvant appartenir à la famille RNPP (pour Rap, NprR, PlcR et PrgX). Par la suite, ces derniers modulent leur

activité et, par conséquent, l'expression de leurs gènes cibles (Declerck *et al.,* 2007 ; Rocha-Estrada *et al.,* 2010). Cette deuxième voie d'activation du QS a été décrite dans le contrôle de la sporulation, de la compétence et la production d'antibiotique chez *B. subtilis* (Pottathil *et al.,* 2003) ; le contrôle du transfert conjugatif chez *Enterococcus faecalis* (Dunny 2007) ; le déclenchement de la virulence chez les bactéries du groupe cereus (Slamti *et al.,* 2002 ; Bouillaut *et al.,* 2008).

1.4.2. Identification dans les génomes bactériens de petites ORF non annotées pouvant participer à un mécanisme de quorum sensing

Une étude *in silico* portant sur l'indentification de petites ORF (Open Reading Frame pour cadre ouvert de lecture) au sein des génomes disponibles de streptocoques dans les bases de données a permis d'identifier une nouvelle famille de nouvelles petites ORF non annotées qui coderaient des peptides pouvant être impliqués dans un mécanisme de QS (Ibrahim *et al.,* 2007). Ces petites ORF présentent la particularité d'être systématiquement localisées en amont de gènes codant des régulateurs transcriptionnels de la famille Rgg. Cette étude a permis d'identifier au moins une copie de ces ORF par génome étudié au sein des streptocoques. Cette famille code des petits peptides hydrophobes, appelées SHP (pour Small Hydrophobic Peptide). Ces derniers présentent une taille allant de 20 à 23 aa et sont caractérisés par la présence, dans leur partie N-terminale, de résidus chargés positivement (lysine), d'un domaine central hydrophobe présentant soit un résidu glutamate soit un résidu aspartate et, dans la partie C-terminale, d'un résidu glycine (Ibrahim *et al.,* 2007). Les gènes codant les peptides SHP sont systématiquement orientés dans le sens inverse des gènes *rgg*.

L'étude phylogénétique de ces ORF a permis de mieux définir les relations associant un gène *rgg* à un gène codant un SHP (Figure 10).

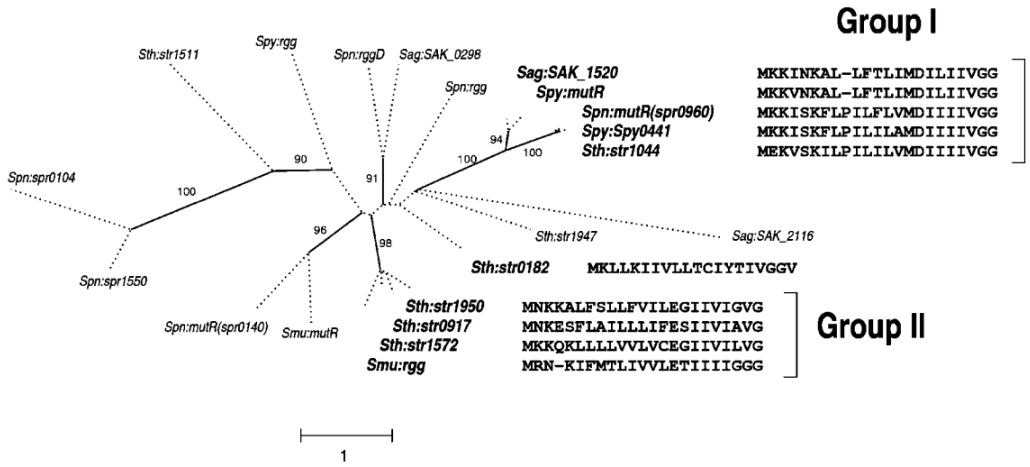


Figure 10 : Arbre phylogénétique des protéines de la famille Rgg (Ibrahim et al., 2007). Lorsqu'une ORF codant un peptide hydrophobe est trouvée en amont du gène *rgg*, le nom est indiqué en gras et la séquence primaire potentielle du peptide est présentée.

Une coévolution des protéines Rgg avec les petits peptides hydrophobes a ainsi pu être démontrée bien que les gènes *rgg* ne soient pas automatiquement associés à un gène *shp*. Par ailleurs, l'existence de deux groupes de couples Rgg/SHP a pu être déterminée (Ibrahim *et al.,* 2007). Les peptides SHP présentent, au sein de leur domaine central, un résidu aspartate lorsqu'ils sont associés au groupe I et un glutamate lorsqu'ils sont associés au groupe II.

Les peptides SHP présentent une similarité avec des anti-phéromones d'*Enterococcus faecalis* (Chandler *et al.,* 2004). Ces anti-phéromones sont de petits peptides qui possèdent une activité antagoniste à celles des peptides sex-phéromones, et toutes deux sont associées à un mécanisme de QS contrôlant le transfert conjugatif chez *Enterococcus faecalis* (Wirth 2000). Cette analogie suggère ainsi que les couples Rgg/SHP pourraient participer à un mécanisme de type QS.

Une autre famille de peptides associés à des régulateurs transcriptionnels a été découverte : ComR/ComS ou XIP (Fontaine *et al.,* 2010 ; Mashburn-Warren *et al.,* 2010). Ce système est lui-aussi associé à un mécanisme de QS impliqué dans la transformation naturelle de *S. thermophilus*, *S. salivarius* et *S. mutans*, et probablement d'autres streptocoques (Gardan *et al.,* 2009 ; Fontaine *et al.,* 2010 ; Mashburn-Warren *et al.,* 2010). Cependant, bien que le régulateur transcriptionnel ComR soit décrit dans la littérature comme une protéines Rgg-like (Fontaine *et al.,* 2010 ; Mashburn-Warren *et al.,* 2010), ce dernier est atypique car il ne possède pas le domaine médian caractéristique des protéines Rgg (Henry 2011).

Une étude phylogénétique plus récente, réalisée sur les séquences primaires uniques de SHP et XIP associées aux deux couples SHP/Rgg et ComR/XIP, a permis de confirmer leur spécificité au genre *Streptococcus* (Fleuchot *et al.,* 2011). D'une part, bien que similaires, ces deux systèmes appartiennent à deux branches phylogénétiques distinctes indiquant qu'ils font partie de deux sous-familles différentes. D'autre part, cette étude a confirmé la distinction de deux groupes de SHP. De plus, l'identification d'un troisième groupe a été possible. En effet, ce dernier rassemble des couples SHP/Rgg pour lesquels les deux ORF sont chevauchantes, au niveau de la partie 3' du gène *rgg* et de la partie 5' du gène *shp*, et possède une orientation convergente (Fleuchot *et al.,* 2011).

1.4.3. Modèle de quorum sensing proposé pour les couples Rgg/SHP

Chez *S. thermophilus* LMD-9, Ibrahim *et al.* (2007) ont mis en évidence la présence d'un autre type de peptide présent dans le surnageant de culture. Ce peptide, uniquement produit par la souche LMD-9, est codé par un gène (*ster_1357*) localisé en amont d'un gène *rgg* (*rgg1358*) associé à un gène codant un peptide SHP (SHP1358). Ce peptide de 9 aa, nommé Pep1357c, est issu d'un clivage de son précurseur et présente une modification post-traductionnelle résultant d'une cyclisation entre une lysine et un tryptophane (Ibrahim *et al.,* 2007). Cependant, la fonction biologique du peptide Pep1357c reste inconnue et aucune homologie de séquence avec des

peptides répertoriés dans les bases de données n'a pu être détectée. La présence de ce peptide dans le surnageant de culture nécessite la présence des gènes *rgg1358* et *shp1358* mais aussi des gènes *ami* codant un transporteur de type ABC (Ibrahim *et al.,* 2007). Ces données suggèrent l'implication de ces différents composants dans un mécanisme de QS dans lequel le peptide SHP jouerait le rôle d'une phéromone, le transporteur Ami (Opp) assurerait la réimportation de la phéromone au sein de la cellule bactérienne permettant ainsi au régulateur transcriptionnel Rgg1358 de contrôler l'expression de ses gènes cibles (Ibrahim *et al.,* 2007).

L'étude plus approfondie de l'implication du couple Rgg1358/SHP1358 de *S. thermophilus* a permis d'affiner le mécanisme de QS auquel il participe (Figure 11) (Fleuchot *et al.,* 2011).

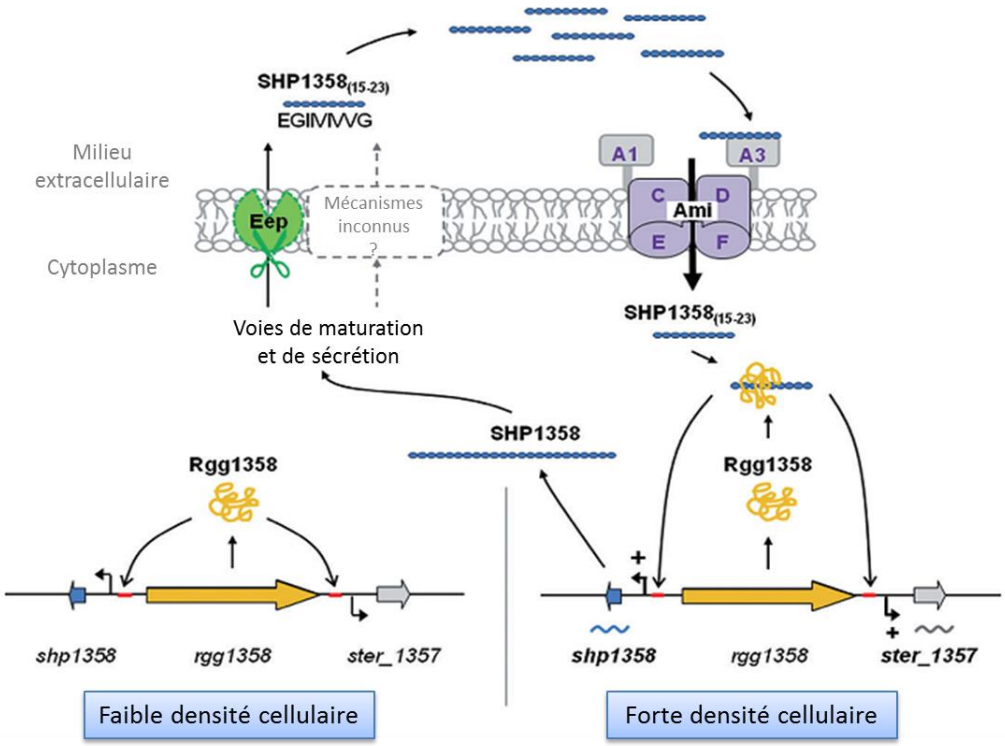


Figure 11 : Représentation schématique du mécanisme de QS du couple Rgg1358/SHP1358 (Fleuchot *et al.,* 2011). La phéromone SHP1358 est maturée par l'endopeptidase transmembranaire Eep puis est sécrétée dans le milieu extracellulaire. A densité cellulaire élevée, le SHP1358 mature est réimporté par le transporteur AmiCDEF au sein de la cellule où il interagit avec le régulateur transcriptionnel Rgg1358.

Le déclenchement du mécanisme de QS est dépendant de la biomasse et nécessite la présence du produit mature du gène *shp1358* dans le milieu extracellulaire. La forme mature de SHP1358 correspond à la partie C-terminale du produit du gène *shp1358*, composée des aa 15 à 23 (EGIIVIVVG), générée par un clivage. La maturation du précurseur du peptide SHP1358 implique l'endopeptidase transmembranaire Eep. A une concentration seuil, le peptide SHP1358 mature est réimporté par le transporteur d'oligopeptides AmiCDEF, probablement suite à la liaison du peptide à la sous-unité AmiA3 du transporteur. Une fois à l'intérieur de la cellule, le peptide SHP interagit

avec le régulateur transcriptionnel Rgg1358, permettant vraisemblablement la régulation positive de la transcription des gènes *shp1358* et *ster_1357* (Fleuchot *et al.,* 2011).

Par ailleurs, un deuxième mécanisme de QS impliquant deux couples Rgg/SHP a été étudié chez *S. pyogenes* et est schématisé dans la Figure 12 (Chang *et al.,* 2011).

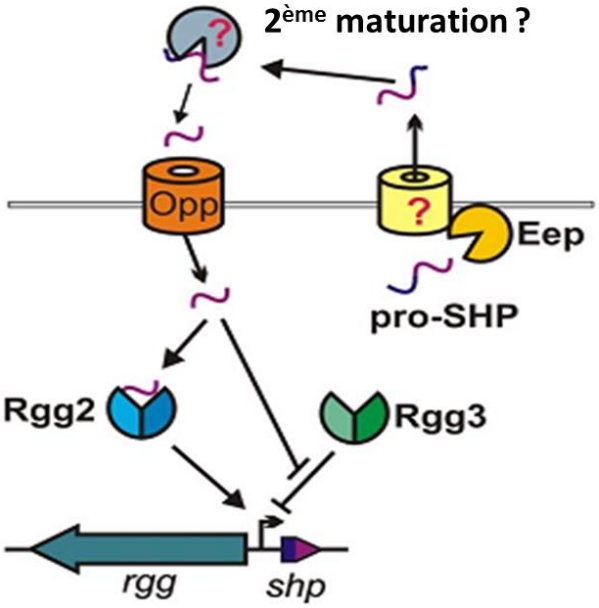


Figure 12 : Schématisation du modèle de régulation par QS des couples Rgg2/3-SHP2/3 (Chang *et al.,* 2011). Le peptide SHP non mature (pro-SHP) est transformé par l'endopeptidase transmembranaire Eep puis est sécrété par un transporteur inconnu. Dans le milieu extracellulaire, le peptide subit une seconde transformation en une forme active. L'oligopeptidase Opp réimporte le peptide SHP dans le cytoplasme où la phéromone interagit avec les protéines régulatrices Rgg2 et Rgg3. En absence de peptides SHP, la protéine Rgg3 réprime la transcription des gènes *shp*. Une dérépression se produit lorsque la protéine Rgg3 interagit avec l'un ou l'autre des peptides SHP alors que l'interaction Rgg2-SHP facilite l'activation de la transcription des gènes *shp*.

La présence d'ORF codant des petits peptides hydrophobes apparentés aux peptides SHP a été détectée à proximité de deux gènes *rgg*, *rgg2* et *rgg3*, au sein de tous les génomes séquencés de *S. pyogenes*. Les auteurs ont montré que la protéine Rgg3 réprime l'activité des promoteurs des gènes *shp2* et *shp3*. Chez un double mutant de délétion *rgg2-3*, aucune activité des promoteurs n'est observée, signifiant que la mutation du gène *rgg2* annule l'effet de la délétion du gène *rgg3*. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'expression des promoteurs *shp* requière la protéine Rgg2, et que la protéine Rgg3 bloque l'activation Rgg2-dépendante. La protéine Rgg2 serait donc un activateur des promoteurs des gènes *shp3* et *shp2*. Ces travaux représentent la première démonstration d'une communication cellulaire médiée par un couple Rgg/SHP chez cette espèce et la première description d'un effet antagoniste entre des membres de la famille Rgg basé sur des petits peptides. De plus, les voies d'activation des protéines Rgg2 et Rgg3 influencent la capacité *in vitro* de *S. pyogenes* à former des biofilms. Pour la première fois, un mécanisme de QS impliquant un couple Rgg/SHP est associé à une fonction biologique (Chang *et al.,* 2011).

1.4.4. Appartenance des protéines Rgg à la famille RNPP

La famille RNPP rassemble des effecteurs protéiques impliqués dans des mécanismes de QS où la phéromone est réimportée au sein de la cellule et agit directement sur l'effecteur qui, dans la majorité des cas, est un régulateur transcriptionnel (Declerck *et al.,* 2007). Les quatre effecteurs formant cette famille, Rap, NprR, PlcR et PrgX, partagent des caractéristiques communes : (i) ils appartiennent tous au phylum des Firmicutes et, plus particulièrement, aux classes des Bacilli et des Clostridia ; (ii) ils interagissent directement avec un peptide de signalisation dont la forme mature est issue du clivage d'un précurseur, importé dans le cytoplasme par un système Opp ; (iii) ils sont codés par un gène situé en amont du gène codant la phéromone. De plus, les régulateurs de la famille RNPP sont constitués d'un nombre variable de répétitions d'un domaine, appelé TPR (tetratricopeptide repeat). Les domaines TPR sont décrits comme impliqués dans les interactions protéine/protéine ou peptide/protéines (Goebl *et al.,* 1991). En plus des motifs TPR, les effecteurs NprR, PlcR et PrgX présentent à leur extrémité N-terminale un motif HTH de type XRE permettant leur liaison à l'ADN (Perchat *et al.,* 2011).

Des analyses de type PSI-BLAST ont mis en évidence des identités de séquence entre les protéines PlcR, PrgX et d'autres régulateurs transcriptionnels de la famille des Firmicutes (Declerck *et al.,* 2007). Parmi ces régulateurs sont retrouvées des protéines Rgg. En effet, les protéines appartenant à la famille Rgg possèdent un domaine HTH de type XRE en position N-terminale comme les protéines de la famille RNPP. De plus, les protéines Rgg associées à des peptides SHP participent à un mécanisme de QS dans lequel le peptide SHP est maturé par une endopeptidase Eep puis réimporté au sein de la cellule par un transporteur Opp comme pour l'anti-phéromone d'*E. feacalis* associée à la protéine PrgX (An *et al.,* 1999 ; An *et al.,* 2002 ; Fleuchot *et al.,* 2011). Toutefois, les analyses *in silico* n'ont pas permis d'identifier la présence de motifs TPR chez les protéines Rgg (Fleuchot *et al.,* 2011). Cependant, les domaines TPR du répresseur PrgX n'ont pu être identifiés qu'après analyse structurale (Shi *et al.,* 2005). En 2011, Fleuchot *et al.* ont donc proposé que les systèmes Rgg/SHP puissent être un nouveau membre de la famille RNPP. Par ailleurs, les auteurs ont également proposé que le système ComR/XIP puisse lui aussi appartenir à la famille RNPP. Toutefois, en vue des analyses phylogénétiques les systèmes Rgg/SHP et ComR/XIP appartiendraient à 2 branches distinctes de la famille RNPP (Fleuchot *et al.,* 2011).

1.5. Origine putative des gènes *rgg*

La recherche de gènes acquis par transfert horizontal (TH) au sein du génome de *S. thermophilus* CNRZ1066 par une méthode utilisant les modèles de Markov cachés (HMM, Hidden Markov Model) a permis de détecter 146 régions d'ADN, représentant 17,7 % du génome, possédant une composition atypique en bases par rapport au reste du génome. Les 7 copies de gènes appartenant à la famille *rgg* de cette souche sont présents dans ces régions suggérant qu'ils

aient pu être acquis par TH (Eng *et al.,* 2011). Par ailleurs, le contenu en base G et C du gène *ropB* est de 32%, c'est-à-dire nettement inférieur à celui du génome de la souche NZ131 de *S. pyogenes* (39%) mais identique à celui de prophages présents sur son génome. De plus, le pourcentage en base G et C d'autres gènes *rgg*, tels *lasX* de *Lb. sakei*, *gadR* de *L. lactis*, *mutR* de *S. mutans* et *rgg* de *S. suis* SS2 sont respectivement de 25, 29, 30 et 36% alors que celui des chromosomes sur lesquels ils sont présents sont, respectivement, de 38, 35, 37 et 41,1%. Ces données suggèrent que tous ces gènes *rgg* aient pu être acquis par TH et posent la question de l'origine des copies *rgg* au sein des génomes bactériens.

La souche NZ131 de *S. pyogenes* contient 3 prophages (NZ131.1, NZ131.2 et NZ131.3) qui représente 5,6% de son chromosome (McShan *et al.,* 2008). Les prophages codent des intégrases, requises pour leur intégration au sein du génome bactérien et des excisionases qui, en complexe avec une intégrase, participent à leur excision (Cho *et al.,* 2002). Des études ont mis en évidence que la protéine RopB de *S. pyogenes* régule la transcription de gènes codant des intégrases prophagiques entrainant l'excision du prophage NZ131.2 (Dmitriev *et al.,* 2006). De même, chez *S. suis* SS2, l'inactivation du gène *rgg* est associé à l'augmentation de la transcription de 9 gènes codant des intégrases phagiques (Zheng *et al.,* 2011). En outre, plusieurs sites de fixation à l'ADN de la protéine RopB localisés au sein d'éléments issus du TH ont été identifiés (Anbalagan *et al.,* 2011 ; Anbalagan *et al.,* 2012). Parmi eux sont retrouvés des régions localisées en amont de gènes codant des régulateurs transcriptionnels portés par des prophages (Anbalagan *et al.,* 2012). L'ensemble de ces données suggèrent ainsi que le gène *ropB* aurait pu être acquis par TH et qu'il pourrait dériver d'un gène phagique.

Chez *S. suis* SS2, l'inactivation du gène *rgg* altère la transcription de 21 gènes localisés dans l'élément intégrative et conjugatif 86k (ICE pour Integrative and Conjugative Element) (Zheng *et al.,* 2011). Les ICE sont des d'éléments génétiques mobiles intégrés dans les chromosomes bactériens, capables de se transférer de façon autonome par conjugaison. De plus, la composition en base G et C du gène *rgg* est similaire à celle de l'ICE 86k mais diffère du reste du génome (Zheng *et al.,* 2011). Ainsi, le gène *rgg* de *S. suis* SS2 aurait pu être acquis par un mécanisme de TH médié par un ICE.

Ainsi les gènes de la famille *rgg* pourraient avoir été acquis par des mécanismes de TH impliquant notamment la transduction et la conjugaison. Cette hypothèse est en adéquation avec le fait que les protéines Rgg régulent l'expression de gènes retrouvés au sein de séquences d'ADN transmises horizontalement et pourraient, en partie, justifier leur répartition au sein des espèces bactériennes.

2. Diversité des fonctions biologiques associées aux gènes régulés par les protéines Rgg

2.1. Implication des protéines Rgg dans la régulation de la virulence

La majorité des protéines Rgg décrites dans la littérature ont été étudiées chez des espèces pathogènes qui se caractérisent par leur capacité à provoquer une maladie chez l'hôte. Pour cela, elles synthétisent une multitude de facteurs de virulence qui sont requis à divers moments du processus infectieux (invasion, colonisation, échappement aux mécanismes de résistance de l'hôte, multiplication bactérienne, production d'élément nocif pour l'hôte). Les données de la littérature indiquent que certaines protéines de la famille Rgg participent à la régulation transcriptionnelles de facteurs de virulence.

Par exemple, Lyon *et al.* (1998) ont mis en évidence l'implication de la protéine RopB dans la régulation de la transcription du gène *speB* chez *S. pyogenes* (Lyon *et al.,* 1998 ; Chaussee *et al.,* 1999). La protéase SpeB est un facteur de virulence (Kapur *et al.,* 1994 ; Lukomski *et al.,* 1997 ; Lukomski *et al.,* 1998) qui clive ou dégrade des protéines de la matrice extracellulaire de l'hôte, des immunoglobulines, des composants du complément ainsi que des adhésines présentes à la surface bactérienne. Ainsi, la protéase SpeB permet à la bactérie de résister au système immunitaire de l'hôte et participe à la dissémination au sein de l'hôte (Chiang-Ni *et al.,* 2008). La protéine RopB réprime également l'expression des gènes *emm* et *scpA*, codant respectivement la protéine M et la peptidase C5a participant toutes deux à la résistance à la phagocytose, et des gènes codant les enzymes hémolytique Streptolysine S et O (Chaussee *et al.,* 2002). Elle est également impliquée dans la régulation de l'expression de gènes contribuant aux interactions hôte-pathogène (Chaussee *et al.,* 2002).

Un autre exemple est celui du régulateur transcriptionnel RovS de *S. agalactiae*, une bactérie commensale qui colonise le tractus gastro-intestinal et génital de l'Homme (van der Mee-Marquet *et al.,* 2008). Elle est également responsable d'infections invasives chez les nouveaux nés pouvant conduire à des septicémies, des méningites et des pneumonies (Zangwill *et al.,* 1992 ; Waite *et al.,* 1996). Samen *et al.* (2006) ont montré que la protéine RovS régule négativement la transcription du gène *fbsA*, impliqué dans l'interaction de *S. agalactiae* avec le fibrinogène humain, et, positivement, l'opéron *cyl*, codant une hémolysine importante pour l'invasion bactérienne des cellules épithéliales (Spellerberg *et al.,* 1999 ; Doran *et al.,* 2002 ; Samen *et al.,* 2006).

Chez *S. suis* SS2, la délétion du gène *rgg*, bien qu'entrainant une hyper adhésion du mutant aux cellules épithéliales et une augmentation de l'activité hémolytique, atténue la virulence de la bactérie dans un modèle d'infection du porcelet (Zheng *et al.,* 2011). Chez *S. pneumoniae* D39, la

protéine Rgg participe à la virulence de cette souche dans un modèle d'infection chez des souris (Bortoni *et al.,* 2009).

2.2. Implication des protéines Rgg dans la réponse aux stress

Les bactéries sont toutes soumises à des changements brusques de leurs conditions environnementales. Ces changements entrainent des stress qui sont dommageables pour la cellule bactérienne. Elles doivent donc mettre en place une réponse adaptée au stress subit afin de survivre. Pour moduler leur physiologie, les bactéries ont recours à la régulation génique médiée par des régulateurs transcriptionnels. Les protéines de la famille Rgg participe à ce processus.

2.2.1. Implication de la protéine GadR dans la réponse au stress acide

Une étude a montré l'implication de la protéine GadR dans la réponse au stress acide de *Lactococcus lactis* (Sanders *et al.,* 1998). Cette bactérie lactique acquière de l'énergie par la fermentation des sucres en acide lactique entrainant une acidification du milieu. L'homéostasie du pH se fait par la combinaison d'un antiport d'acides aminés, qui permet l'échange d'un aa acide par un aa basique, avec la décarboxylation d'aa qui permet la consommation intracellulaire d'un proton (Molenaar *et al.,* 1993). L'opéron *gadCB* code un système anti-porteur du glutamate-γ-aminobutyrate (GABA) (Hersh *et al.,* 1996 ; Waterman *et al.,* 1996) et confère une résistance à l'acide en présence de glutamate chez *L. lactis*. En amont de l'opéron *gadCB*, est localisé le gène *gadR*, membre de la famille *rgg*, qui est indispensable pour la transcription du gène *gadC* (Sanders *et al.,* 1998). Ainsi la protéine GadR participe à la résistance à l'acidité chez *L. lactis* en régulant la transcription de l'opéron *gadCB*.

2.2.2. Implication de la protéine RopB dans la réponse au stress thermique

La protéine RopB de *S. pyogenes* régule la transcription de gènes *clp* (Chaussee *et al.,* 2001 ; Chaussee *et al.,* 2004) qui codent des protéines chaperonnes impliquées notamment dans la réponse au stress thermique (Kroh *et al.,* 1990 ; Choi *et al.,* 1999 ; Nair *et al.,* 1999 ; Kwon *et al.,* 2003). Les protéines Clp sont des protéases ATP dépendantes qui participent à la dégradation des protéines mal repliées et contribuent ainsi à l'élimination de protéines non-fonctionnelles évitant, ainsi, la formation d'agrégats protéiques (Kress *et al.,* 2009).

La protéine ClpL est exprimée chez un mutant délété du gène *ropB* alors qu'elle ne l'est pas, dans les conditions testées, chez la souche sauvage (Chaussee *et al.,* 2004). L'expression de son homologue est, par ailleurs, également sous le contrôle de la protéine Rgg de *S. suis* SS2 (Zheng *et al.,* 2011). De façon analogue, la protéine RopB de *S. pyogenes* participe à la régulation de l'expression des protéines ClpE, ClpP et ClpB (Chaussee *et al.,* 2001 ; Chaussee *et al.,* 2004), dont les homologues chez *E. coli* et *Saccharomyces cerevisiae* jouent un rôle essentiel à la survie

de ces bactéries à de forte températures (Squires *et al.,* 1992 ; Schirmer *et al.,* 1996 ; Suzuki *et al.,* 1997).

L'ensemble de ces résultats montre que l'inactivation de *ropB* de *S. pyogenes* est associée à l'augmentation de la synthèse ou de la stabilité des protéines Clp et pourrait donc être impliquée dans la réponse au stress thermique (Kroh *et al.,* 1990 ; Nair *et al.,* 1999 ; Kwon *et al.,* 2003).

2.2.3. Implication de protéines Rgg dans la réponse au stress oxydant

Chez *S. pneumoniae*, un gène codant une protéine appartenant à la famille de régulateur transcriptionnel Rgg est plus exprimée en condition aérobie qu'en condition anaérobie (Bortoni *et al.,* 2009) suggérant que ce régulateur joue un rôle dans la réponse de *S. pneumoniae* au stress oxydant. En conditions aérobie, une souche délétée du gène *rgg* possède un temps de doublement plus faible que la souche sauvage tandis qu'en anaérobie, aucune différence n'est observée (Bortoni *et al.,* 2009). En présence de paraquat (molécule génératrice de radicaux superoxydes), la survie du mutant *rgg* est diminuée par rapport à la souche sauvage et cela, de façon proportionnelle à la concentration en paraquat. Les auteurs ont montré que la transcription des gènes *sodA* et *tpx* sont sous la dépendance de la protéine Rgg (Bortoni *et al.,* 2009). Le gène *sodA* code une superoxyde dismutase manganèse dépendante qui convertit les anions superoxydes en oxygène et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ($2\ O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$). Ce dernier sera ensuite métabolisé par des catalases ($2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O$) et des peroxydases ($NADPH + H_2O_2 + H_+ \rightarrow NAD^+ + H_2O$). Le gène *tpx* code une thiol peroxydase qui est importante pour l'élimination du H_2O_2. La surexpression de ce gène chez le mutant *rgg* peut en partie expliquer pourquoi la survie de *S. pneumoniae* n'est pas affectée par l'H_2O_2.

L'implication de protéines Rgg dans la détoxication d'ions superoxydes a également été démontrée chez *S. thermophilus* dont la protéine RggC est codée par 2 ORF distinctes : *rggC1* et *rggC2* (Fernandez *et al.,* 2004). La protéine RggC est produite par un mécanisme de frame shift impliquant un glissement du cadre de lecture généré par l'ARN polymérase au niveau d'un nonamère de thymine connu pour être instable (Larsen *et al.,* 2000). Un mutant délété du gène *rggC1* est deux fois plus résistant à une exposition de ménadione (générant des composés superoxydes) par rapport à la souche sauvage tandis que le mutant *rggC2* y est deux fois plus sensible (Fernandez *et al.,* 2006). La protéine RggC de *S. thermophilus* pourrait donc réprimer l'expression de gènes impliqués dans le mécanisme de défense au stress oxydant.

D'autres protéines Rgg sont impliquées dans la détoxication du peroxyde d'hydrogène chez les streptocoques. Ainsi, la protéine RopB de *S. pyogenes* régule négativement la transcription des alkyl-hydroperoxyde réductases AhpC et AphF (Chaussee *et al.,* 2004). Ces protéines forment un complexe protéique, appartenant à la famille des peroxydases, qui permet la réduction de l'H_2O_2 (Poole *et al.,* 2000 ; Brenot *et al.,* 2005).

En conclusion, plusieurs protéines Rgg distinctes participent à la régulation de gènes codant des protéines de réponse générale aux stress ou des protéines plus spécialement impliquées dans la réponse aux stress thermique, acide ou oxydant.

2.3. Implication des protéines Rgg dans la régulation du métabolisme

Les protéines Rgg participe également à la régulation de nombreuses fonctions cataboliques et anaboliques.

Plusieurs protéines Rgg appartenant aux espèces *S. gordonii* Challis, *S. oralis* et *S. sanguis* (Sulavik *et al.,* 1992 ; Vickerman *et al.,* 1995 ; Fujiwara *et al.,* 2000), régulent la transcription de gènes codant des GTF qui hydrolysent le saccharose et utilisent le glucose pour synthétiser des polysaccharides tels que du 1,3-α et du 1,6-α-glucane (Mayer 1987).

Par exemple, l'inactivation du gène *ropB* de *S. pyogenes* entraine une altération de la croissance bactérienne, associée à de profondes modifications du métabolisme des acides aminées et des carbohydrates (Figure 13) (Chaussee *et al.,* 2003 ; Chaussee *et al.,* 2004 ; Dmitriev *et al.,* 2006).

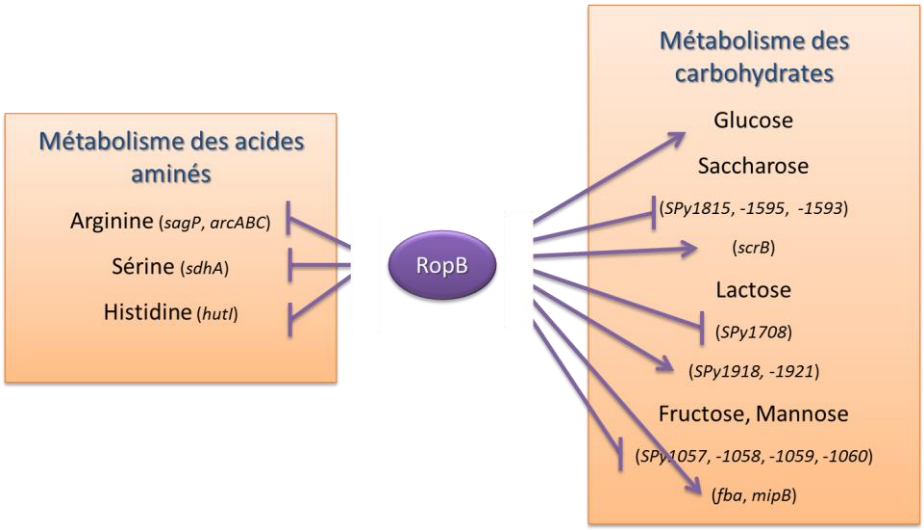


Figure 13 : Régulation par la protéine RopB du métabolisme de *S. pyogenes*. Les gènes dont la transcription est sous le contrôle de la protéine RopB sont indiqués entre parenthèses. Les flèches indiquent une activation de la transcription par RopB et les traits fléchés indiquent une inhibition de la transcription par la protéine RopB.

En effet, la protéine RopB inhibe le catabolisme de l'arginine en présence de glucose (Chaussee *et al.,* 2003). De plus, elle réprime le métabolisme de la sérine. Les transcrits du gène *sdhA* codant une sous-unité putative de la sérine déshydratase, enzyme qui dégrade la sérine en pyruvate et NH3, et du gène *sagP*, codant l'arginine déiminase qui catalyse la désamination de l'arginine en NH3 et citrulline, sont plus abondant chez le mutant que chez la souche sauvage

(Chaussee *et al.,* 2003). La protéine RopB participe également à la régulation de l'expression de plusieurs enzymes de la voie ADI (voie de l'arginine déiminase) (ArcABC) (Chaussee *et al.,* 2004). Enfin, elle régule le métabolisme de l'histidine. En effet, une inactivation du gène *ropB* altère l'expression de la protéine HutI, enzyme qui hydrolyse l'imidazolone 5-propionate pour former du N-formimino-L-glutamate qui est ensuite dégradé en L-glutamate par HutG (Chaussee *et al.,* 2004), ainsi que d'autre gènes impliqués dans cette voie métabolique (Dmitriev *et al.,* 2006).

De la même façon, la protéine Rgg de *S. suis* participe à la régulation du catabolisme de l'arginine (Zheng *et al.,* 2011).

2.4. Implication des protéines Rgg dans la production de bactériocines

Une large gamme de bactéries produisent des peptides antimicrobiens sécrétés dans le milieu extracellulaire appelés bactériocines (Jack *et al.,* 1995). Ces dernières possèdent un spectre d'action étroit constitué de souches phylogénétiquement proches de la souche productrice. Différents mécanismes d'action sont connus, le plus courant consistant en une perméabilisation de la membrane de la bactérie cible (Baba *et al.,* 1998). Les lantibiotiques constitue l'un des groupes de bactériocines produits par les bactéries à coloration Gram positive (Schnell *et al.,* 1988).

La production de mutacines (bactériocines) permet à *S. mutans* de rivaliser avec les autres streptocoques présents dans la plaque dentaire et de coloniser la surface des dents (Merritt *et al.,* 2012). Plusieurs mutacines, appartenant au groupe des lantibiotiques, ont été caractérisées chez cette espèce. Le locus impliqué dans la production de mutacine II (Novak *et al.,* 1994 ; Chikindas *et al.,* 1995 ; Jack *et al.,* 1995 ; Novak *et al.,* 1996) est constitué d'un opéron de 7 gènes, lui-même constitué de 2 unités de transcription : le gène *mutR*, codant un régulateur transcriptionnel de la famille Rgg et les gènes *mutAMTFEG* (Qi *et al.,* 1999). En absence du gène *mutR*, aucun transcrit *mutA* n'est détecté. Ces données montrent que la protéine MutR régule positivement la transcription de l'opéron *mutAMTFEG* (Qi *et al.,* 1999). Chez *S. mutans*, l'étude des voies de biosynthèse des mutacines I et III a permis d'identifier les locus impliqués dans leur expression : *mutRAA'BCDPTFEG* (mutacine I) (Qi *et al.,* 2000) et *mutRAA'BCDPT* (mutacine III) (Qi *et al.,* 1999). Sachant que tous 2 possèdent le gène *mutR*, la protéine MutR pourrait également participer à la régulation de l'expression des mutacines I et III (Kreth *et al.,* 2004).

De même, chez *Lactobacillus sakei*, la production de la lactocine S, peptide antimicrobien appartenant au groupe des lantibiotiques, est dépendante de la protéine LasX, un régulateur de la famille des Rgg (Skaugen *et al.,* 2000 ; Skaugen *et al.,* 2002).

2.5. Implication des protéines Rgg dans la biosynthèse de la paroi cellulaire

Le peptidoglycane (PG) est le constituant majeur de la paroi cellulaire et est essentiel pour le maintien de l'intégrité structurale de la cellule bactérienne. La synthèse du PG est un processus hautement contrôlé qui nécessite, entre autres, l'action d'hydrolases du PG (Layec *et al.,* 2008). L'expression de certaines d'entre elles est contrôlée par des protéines Rgg. Ainsi, la protéine RopB de *S. pyogenes* régule l'expression de deux hydrolases du PG : une autolysine et un lysozyme (Chaussee *et al.,* 2001). De plus, l'analyse comparative du transcriptome de *S. pyogenes* à celui d'un mutant *ropB* permet d'identifier 9 gènes en phase exponentielle de croissance et 31 gènes en phase stationnaire de croissance différemment exprimés dans ces 2 souches et qui codent des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la paroi bactérienne (Dmitriev *et al.,* 2006).

Par ailleurs, la protéine Rgg de *S. suis* régule négativement la transcription des gènes codant les protéines FtsE et FtsI, impliquées dans la division cellulaire (Zheng *et al.,* 2011). Ce mécanisme est un processus complexe comprenant l'invagination de la membrane plasmique, la synthèse du PG, la réplication et la partition des chromosomes et la synthèse coordonnée du septum permettant la scission de la cellule mère en 2 cellules filles. La protéine FtsE participerait à la translocation des précurseurs du PG au travers de la membrane plasmique tandis que la protéine FstI permet la synthèse du PG (Vicente *et al.,* 2006 ; Egan *et al.,* 2013). La protéine Rgg de la souche SS2 de *S. suis* contrôle, au total, la transcription de 14 gènes impliqués dans la division cellulaire. Parmi eux, 9 participent à la biosynthèse de la paroi cellulaire (Zheng *et al.,* 2011). En outre, les cellules du mutant *rgg* sont, comme celles de la souche sauvage, organisées en chaines mais composées de plus de cellules. De plus, les cellules du mutant présentent une morphologie anormale (diamètre cellulaire altéré, marges irrégulières) (Zheng *et al.,* 2011). Ce phénotype peut s'expliquer par la transcription diminuée du gène *divIVA* chez le mutant (Zheng *et al.,* 2011). En effet, ce gène est requis pour permettre une division cellulaire correcte et pour la ségrégation du chromosome (Vicente *et al.,* 2007). Chez d'autres espèces de streptocoques et chez *Synechococcus elongatus*, une délétion du gène *divIVA* entraine une diminution de la fréquence de séparation des cellules et une division polaire aberrante, ce qui conduit à une formation de « mini-cellules » anucléées et des chaines de cellules non-séparées, 2 à 3 fois plus longues (Fadda *et al.,* 2003 ; Miyagishima *et al.,* 2005).

2.6. Implication des protéines Rgg dans l'adhésion bactérienne

Lors de la colonisation d'une nouvelle niche écologie, l'adhésion des bactéries aux surfaces leur permet d'accéder plus facilement aux éléments nutritifs qui s'y accumulent, et est donc un paramètre important de leur survie (Busscher *et al.,* 2012). L'adhésion de bactéries pathogènes aux cellules de l'hôte est, dans de nombreux cas, médiée par l'interaction entre des protéines localisées à la surface bactérienne, appelées adhésines, et des molécules des tissus de l'hôte, dites

molécules réceptrices. Des études ont montré que les protéines Rgg pouvaient réguler la transcription de gènes codant des protéines d'adhésion cellulaire.

Ainsi, la comparaison de la capacité d'adhésion à diverses cellules épithéliales humaines, comme celles de la cavité orale ou de la peau, d'une souche de S. *pyogenes* et de son dérivé délété du gène *ropB* a été réalisée par cytométrie en flux. En absence du gène *ropB*, l'adhésion de *S. pyogenes* aux cellules épithéliales humaines est augmentée (Hytonen *et al.,* 2006). Ce phénotype s'explique par le fait que la protéine RopB régule négativement l'expression du gène *pulA* codant une pullulanase. Cette protéine est ancrée à la surface de *S. pyogenes* et comporte un domaine de dégradation des carbohydrates mais également un domaine de fixation aux glycoprotéines facilitant la fixation de *S. pyogenes* sur des cellules hôtes (Hytonen *et al.,* 2003).

Un autre exemple est celui de la protéine Rgg de *S. suis* qui régule négativement la capacité de fixation de cette bactérie aux cellules épithéliales du larynx humain (Zheng *et al.,* 2011). Enfin, la protéine RovS de S. *agalactiae* est également impliquée dans la fixation aux cellules épithéliales de l'hôte. En effet, la délétion du gène *rovS* entraine une augmentation de la fixation de *S. agalactiae* au fibrinogène immobilisé, composant de la matrice extracellulaire (structure macromoléculaire stable sous-jacente des cellules épithéliales et endothéliales) et aux cellules épithéliales pulmonaires (Samen *et al.,* 2006).

2.7. Implication des protéines Rgg dans la formation de biofilm

Dans la nature, la majorité des bactéries se déposent sur des surfaces inertes et y prolifèrent en formant des communautés complexes, appelées biofilm (Costerton *et al.,* 1987 ; Costerton *et al.,* 1995). Les biofilms sont constitués d'une agrégation de micro-organismes intégrés dans une matrice extracellulaire d'exopolymères (EPS) produite par les bactéries. Cette architecture particulière permet aux bactéries de survivre dans des environnements hostiles et leur confèrent une résistance accrue aux stress environnementaux et aux défenses de l'hôte (Hall-Stoodley *et al.,* 2005 ; Mai-Prochnow *et al.,* 2008). Du fait de l'implication de protéines Rgg dans l'adhésion des bactéries, des études se sont intéressées à l'implication potentielle de protéines Rgg dans la formation de biofilm.

Bortoni *et al.* (2009) ont ainsi montré l'implication de la protéine Rgg de *S. pneumoniae* dans la capacité de la bactérie à former des biofilms lors de croissance réalisée en microplaque de polystyrène (Bortoni *et al.,* 2009). En absence de capsule (structure polyosidique entourant certaines cellules bactériennes), la souche délétée du gène *rgg* présente une capacité à former un biofilm 50 fois moins importante que la souche sauvage non capsulée (Bortoni *et al.,* 2009). La protéine Rgg régule donc positivement la formation de biofilm de *S. pneumoniae* mais uniquement en absence de la capsule bactérienne.

Au sein des biofilms, les bactéries vivent en communauté et peuvent communiquer les unes avec les autres à l'aide du mécanisme de QS. Des études ont montré que des mécanismes de QS pouvaient intervenir lors des différentes étapes de la formation de biofilms : lors de l'étape initiale d'attachement des bactéries à la surface en modulant leur capacité d'adhésion ; lors de l'étape du développement et de la maturation du biofilm en modulant la production d'EPS par les bactérie ou leur mobilité ; et lors de la dernière étape de dispersion des bactéries formant le biofilm leur permettant la colonisation d'une nouvelle niche écologique (Cvitkovitch *et al.,* 2003 ; Parsek *et al.,* 2005). Chez *S. pyogenes*, deux systèmes Rgg/SHP sont impliqués dans un mécanisme de QS : Rgg2/SHP2 et Rgg3/SHP3 (Chang *et al.,* 2011). Une délétion du gène *rgg3* entraine une augmentation du développement du biofilm du mutant comparée à la souche sauvage (Figure 14). A l'inverse, l'inactivation du gène *rgg2* résulte en une production de biofilm faible, similaire à celle de la souche parentale (Chang *et al.,* 2011).

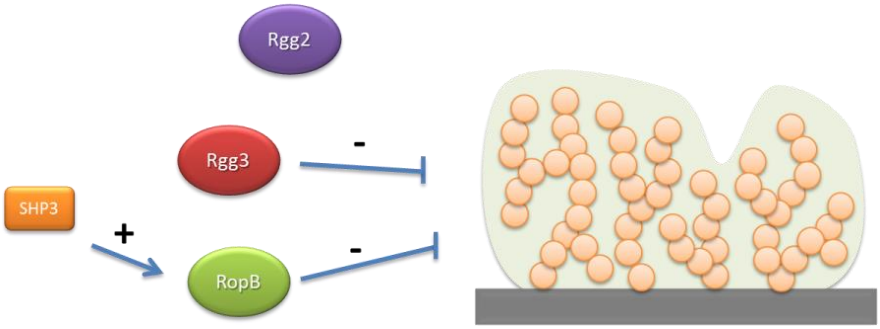


Figure 14 : Schématisation de rôle des protéines Rgg dans la capacité de formation de biofilm chez *S. pyogenes*. Les flèches indiquent une activation, les traits fléchés indiquent une inhibition.

Par ailleurs, la protéase à cystéine secrétée SpeB affecte de façon négative la production de biofilms chez *S. pyogenes* (Doern *et al.,* 2009). Comme l'expression de cette protéine est activée par le régulateur transcriptionnel RopB, la capacité de formation de biofilm d'un mutant délétée du gène *ropB* a aussi été étudiée et s'avère être fortement augmentée en comparaison à la souche sauvage. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une diminution de l'activité protéase entrainerait une réduction du clivage des protéines et, par conséquent, du nombre de peptides présents dans le milieu extracellulaire. Ainsi, cela favoriserait la disponibilité du transporteur d'oligopeptides et donc de la signalisation peptides-dépendante, médiée par les systèmes SHP/Rgg. Une autre hypothèse est que la protéine RopB régulerait l'expression de protéines inhibant la formation du biofilm. Lorsque les gènes *rgg3* et *ropB* sont délétés simultanément, un effet cumulatif est observé. Celui-ci se traduit par une forte capacité du double mutant à former un biofilm (Tableau 4) (Chang *et al.,* 2011). Au contraire, le double mutant *ropB-rgg2* ne forme pas plus de biofilm que la souche sauvage (Tableau 4).

Tableau 4 : Capacité de formation de biofilms de *S. pyogenes* et de ses dérivés délétés d'un ou plusieurs gènes *rgg* (Chang *et al.,* 2011).

	souche de *S. pyogenes*					
Condition	sauvage	Δ*rgg2*	Δ*rgg3*	Δ*ropB*	Δ*ropB* Δ*rgg2*	Δ*ropB* Δ*rgg3*
Normale	=	=	+	+	=	++
Ajout de SHP3	+	=	+	+++		

La capacité de formation de biofilm des différentes souches est comparée à celle de la souche sauvage de *S. pyogenes* en conditions normale ou lorsque du peptide SHP3 synthétique est ajouté. Le symbole = représente la capacité naturelle de formation de biofilm de *S. pyogenes*, le symbole + indique une capacité augmentée. La cumulation de plusieurs symboles + est proportionnelle à la quantité de biofilm formé.

L'addition du peptide SHP3 synthétique dans le milieu extracellulaire améliore la production de biofilm de *S. pyogenes* et du mutant Δ*ropB* (six fois supérieure) mais ne change pas les capacités de formation de biofilm des mutant *rgg2* et *rgg3* (Chang *et al.,* 2011). La biomasse du biofilm est donc augmentée après induction des voies Rgg2/3 suite à une stimulation par SHP. Ces résultats indiquent que la modulation du niveau de production de biofilm chez *S. pyogenes* est un rôle de premier plan pour les voies Rgg/SHP. De plus, les rôles opposés de ces protéines Rgg suggèrent qu'elles contrôleraient l'agrégation ou la désagrégation des cellules entre-elles.

3. *Streptococcus thermophilus* : un modèle d'étude des gènes *rgg*

3.1. L'espèce *Streptococcus thermophilus*

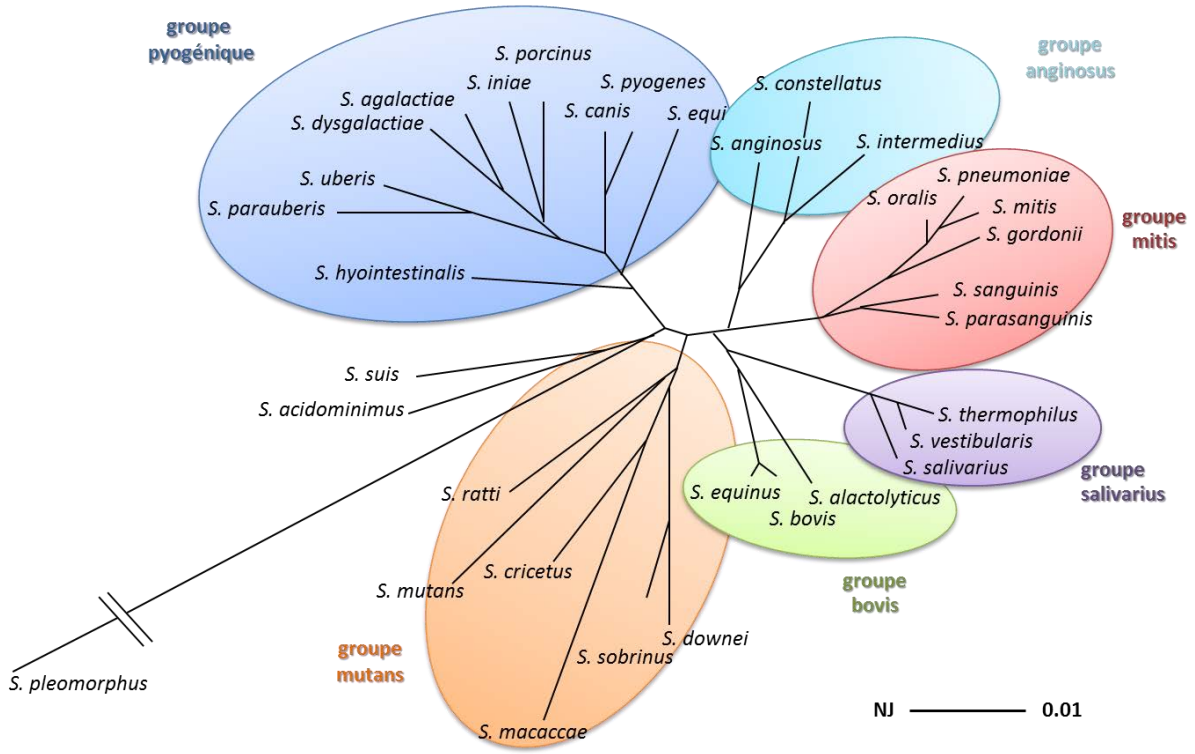
3.1.1. Le genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* appartient au phylum des Firmicutes, à la classe des Bacilli, à l'ordre des *Lactobacillales* et à la famille des *Streptococcaceae*. Les streptocoques possèdent une morphologie cellulaire caractéristique : des cellules en forme de coques à coloration Gram positive. Les cellules sont organisées sous forme de chainettes de longueur variable. Les cellules ont une taille comprise entre 0,5 et 1 µm de diamètre et sont immobiles. Ce sont des bactéries non sporulantes et rarement capsulées. Elles possèdent un métabolisme anaérobie mais peuvent, pour certaines, être aéro-tolérantes. Ce sont des bactéries homo-fermentaires dépourvu d'activité catalase (Dellaglio 1994).

La classification des espèces appartenant au genre *Streptococcus* a longtemps été sujet à discussion et n'a cessé d'évoluer depuis le début du XXème siècle. En effet, les streptocoques ont d'abord été classés en fonction de leur capacité d'hémolyse. Sur ce critère, elles ont été rassemblées en 3 groupes distincts : les β-hémolytiques produisant une hémolyse complète, les α-hémolytiques produisant une hémolyse incomplète et les γ-hémolytiques qui ne produisent aucune hémolyse. Par la suite, les bactéries du genre *Streptococcus* ont été classées en 12 groupes, en fonction de la présence et de la nature de leurs antigènes (Ag) de surface (Lancefield

1933). Par exemple, les groupes sérologique A, B, C, F et G possèdent des Ag de nature polysaccharidique tandis que les bactéries du groupe D présentent un Ag formé par l'acide lipotéichoïque (Facklam 2002).

L'avancée des techniques moléculaires a permis, par la suite, de classer les streptocoques sur des critères phylogénétiques. Ainsi, 6 groupes de taille variable ont pu être identifiés au sein du genre *Streptococcus* par l'analyse comparative des séquences de leurs ARNr 16S : le groupe pyogénique, le groupe anginosus, le groupe mitis, le groupe salivarius, le groupe bovis et le groupe mutans (Bentley *et al.,* 1991 ; Kawamura *et al.,* 1995) (Figure 15).



<u>Figure 15 :</u> Relations phylogénétiques établies à partir de l'ARNr 16s de 33 espèces de *Streptococcus* (Kawamura *et al.,* 1995). Les distances ont été calculées à l'aide de la méthode du plus proche voisin (Neighbour-joining ou NJ).

Depuis cette classification, d'autres études, prenant en compte d'autres critères génétiques tels que le polymorphisme du gène *sodA* (Poyart *et al.,* 1998) ou du gène *rnpB*, codant l'endoribonucléase P (Tapp *et al.,* 2003), ont été réalisées. Elles ont permis de mieux appréhender les relations phylogéniques existant entre les différentes espèces du genre *Streptococcus*. Les liens phylogénétiques mis en évidence par ces études sont cohérents entre eux, malgré quelques divergences. Par exemple, le regroupement de l'espèce *S. agalactiae* au sein du groupe pyogénique est remis en cause par l'étude de Poyart et *al*. (1998) tandis que l'étude de Trap et *al.* (2003) montre que les groupes mitis et anginosus pourraient ne former qu'un seul groupe monophylétique.

Par ailleurs, Les bactéries du genre *Streptococcus* se caractérisent par la présence d'un génome composé d'un bas pourcentage en bases G et C, compris entre 35,7% et 39,8% (Farrow *et al.,* 1984 ; Tettelin *et al.,* 2002). Le chromosome des bactéries du genre *Streptococcus* est circulaire, de taille avoisinant les 2,2 Mb (Tettelin *et al.,* 2002). Le génome « core », c'est-à-dire l'ensemble des gènes présents chez tous les streptocoques, est évalué à 600 gènes. Le génome « accessoire », correspondant à la partie variable du génome, comprenant les gènes spécifiques à la souche bactérienne, l'espèce ou le genre, constitue 90% du génome. Le pan-génome des streptocoques, constitué de l'ensemble des gènes non redondants présents chez un organisme et correspondant à la somme du génome « core » et du génome « accessoire », est composé d'environ 6000 gènes. Les flux de gènes sont donc importants au sein de ce genre bactérien (Lefebure *et al.,* 2007).

La plupart des espèces du genre *Streptococcus* regroupe des souches pouvant être pathogènes pour l'homme et/ou les animaux. Les principales pathologies associées aux streptocoques sont des pharyngites, des pneumonies, des méningites, des endocardites et des septicémies. Toutefois, bien que de nombreuses espèces du genre *Streptococcus* soient pathogènes, certaines souches sont commensales de l'Homme, et peuvent être retrouvées au niveau du tractus respiratoire ou de la cavité orale. Parmi les espèces connues du genre *Streptococcus*, seules les espèces *S. thermophilus* et *S. macedonicus* sont non pathogènes (Tsakalidou *et al.,* 1998).

3.1.2. L'espèce *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus thermophilus est une bactérie lactique appartenant au groupe salivarius qui inclut également les espèces *S. salivarius* et *S. vestibularis* (Figure 15). La diversité génétique au sein du groupe salivarius a été étudiée par MLST (MultiLocus Sequence Typing) de sept gènes conservés. Cette analyse révèle un faible polymorphisme (de l'ordre de 0,19%) au sein de l'espèce *S. thermophilus* contre 6,6% chez *S. salivarius* et 3,6% chez *S. vestibularis* (Delorme *et al.,* 2007 ; Delorme 2008). La faible variabilité génétique de *S. thermophilus* suggère que cette espèce ait récemment émergée.

S. thermophilus est la seule espèce du genre *Streptococcus* à avoir été isolée à partir de produits laitiers (Bolotin *et al.,* 2004) bien que certaines souches aient été isolées à partir de plantes (Michaylova *et al.,* 2007). *S. thermophilus* est le seul streptocoque à être reconnue comme GRAS (Generally Recognized As Safe) (Bolotin *et al.,* 2004). *S. thermophilus* est une bactérie micro-aérophile dont la température optimale de croissance est comprise entre 42 et 44°C.

Le génome de la plupart des souches de *S. thermophilus* s'organise en une seule unité chromosomique dont la taille est de 1,82 Mb. De plus, quelques rares souches possèdent un ou deux petits plasmides (Janzen *et al.,* 1992 ; Makarova *et al.,* 2006). Par ailleurs, les génomes des

souches de *S. thermophilus* contiennent une forte proportion de pseudogènes, en moyenne de 10%, ce qui suggère que cette espèce évolue par perte de fonction (Delorme *et al.,* 2010). L'adaptation de *S. thermophilus* au milieu lait aurait entrainé une inactivation de nombreux gènes, non essentiels à la survie de cette espèce dans cet environnement, suivie d'une stabilisation du génome (Bolotin *et al.,* 2001 ; Bolotin *et al.,* 2004 ; Siezen *et al.,* 2005). Chez *S. thermophilus*, le génome « core » est estimé à 1271 ORF et le génome variable à 700 ORF (Rasmussen *et al.,* 2008). Ces gènes variables pourraient résulter d'une acquisition de gènes par TH (Liu *et al.,* 2009 ; Eng *et al.,* 2011). En effet, le génome de *S. thermophilus* présente de nombreuses IS (séquence d'insertion), des ICE ainsi que des traces d'évènements d'intégration/excision de phages (Guedon *et al.,* 1995 ; Pavlovic *et al.,* 2004). Des échanges de gènes entre des souches de *S. thermophilus* et d'autres bactéries lactiques, comme *L. lactis* et *Lb. bulgaricus*, ont déjà été reportés comme le montre la figure 16 (Bourgoin *et al.,* 1996 ; Liu *et al.,* 2009).

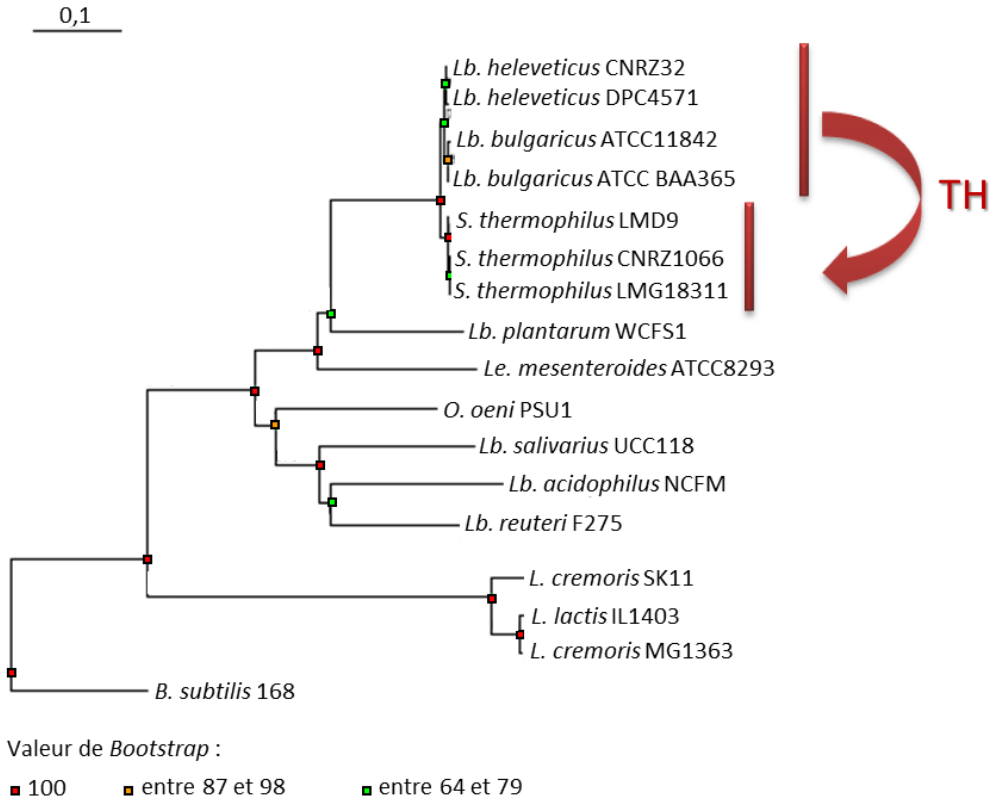


Figure 16 : Arbre phylogénétique du cluster de gènes *cbs-cblB* (*cglB*)-*cysE* présent dans les génomes de bactéries lactiques (Liu *et al.,* 2009). L'arbre a été construit à partir de l'alignement de séquences en concatémère des gènes *cbs* avec *cblB* ou *cglB*. Bien que le gène *cysE* soit un pseudogène dans quelques génomes, celui-ci a été utilisé pour l'analyse phylogénétique. Les valeurs de *Bootstrap* ont été mesurées à partir de 1000 répliques. Les gènes *cbs*, *cblB* et *cglB* tronqués de *Lb. acidophilus* NCFM ont été inclus dans l'analyse. Des gènes de *B. subtilis* 168 ont été utilisés comme groupe externe. L'évènement de TH est indiqué par la flèche en rouge.

3.1.3. *S. thermophilus*, une bactérie utilisée en industrie agroalimentaire

S. thermophilus appartient au groupe des bactéries lactiques (LAB pour Lactic Acid Bacteria). Ce dernier est un groupe hétérogène de bactéries rassemblées d'un point de vue fonctionnel et non phylogénétique (de Roissard 1986). En effet, toutes les LAB possèdent un métabolisme fermentaire saccharolytique produisant principalement de l'acide lactique. Les LAB sont utilisées par l'Homme dans la production de nombreux produits alimentaires fermentés, comme le fromage, le vin, la choucroute et les produits à base de céréales, de tubercules, de poisson et de viande (Taillez 2001).

S. thermophilus est la seule espèce appartenant au genre *Streptococcus* à présenter un intérêt industriel. Elle est utilisée comme ferment dans l'industrie laitière, en association avec *Lactobacillus bulgaricus* pour la fabrication de yaourts (Pette 1950) et en association avec *L. lactis* dans la fabrication de nombreux fromages à pâte pressée cuite, tels que l'Emmental, le Parmesan, le Provolone, la Mozzarelle et l'Asiago (Giraffa *et al.,* 2001 ; Parente 2004). *S. thermophilus* provoque une acidification rapide du lait, lors de la fermentation lactique, permettant la coagulation du lait. De plus, *S. thermophilus* joue un rôle dans les propriétés organoleptiques, par la synthèse de composés aromatiques tels que l'acétaldéhyde, des cétones, du di-acétyle et de l'acétoïne (Imhof R. 1995 ; Ott 1997). *S. thermophilus* participe aussi à la consistance et à la texture du produit fini via la production de métabolites, tels que les EPS (De Vuyst *et al.,* 1999), et à leur conservation par la production de bactériocines qui inhibent la croissance d'autres espèces bactériennes indésirables comme les Listeria et les Entérobactéries (Villani *et al.,* 1995).

Par ailleurs, *S. thermophilus* est aussi reconnue pour ces propriétés bénéfiques pour l'Homme. Elle stimule les défenses immunitaires de l'hôte, améliore la digestion du lactose (Guarner *et al.,* 2005) et participe à l'équilibre de la flore intestinale (Menard *et al.,* 2004 ; Elli *et al.,* 2006).

3.1.4. Une bactérie soumise à de nombreux changements environnementaux et stress

Au cours des processus industriels de production de laits fermentés, des changements des conditions de cultures de *S. thermophilus* surviennent. Ceux-ci peuvent être dus notamment à des modifications du pH, de la température ou de la concentration en oxygène (Figure 17).

Par exemple, lors de la fabrication des produits laitiers dans lesquels *S. thermophilus* intervient, les bactéries sont soumises à de nombreux changements de température. En effet, plusieurs étapes de chauffages interviennent, durant lesquelles la température peut être nettement supérieure à celle optimale pour la croissance de *S. thermophilus* (étape d'échaudage des fromages à pâte pressée : 52-55°C). Elle peut également subir de brusques baisses de la

température comme lors de l'égouttage (24°C), du salage (15°C) ou même lors du stockage (4°C) (Figure17) (Benachour 2009).

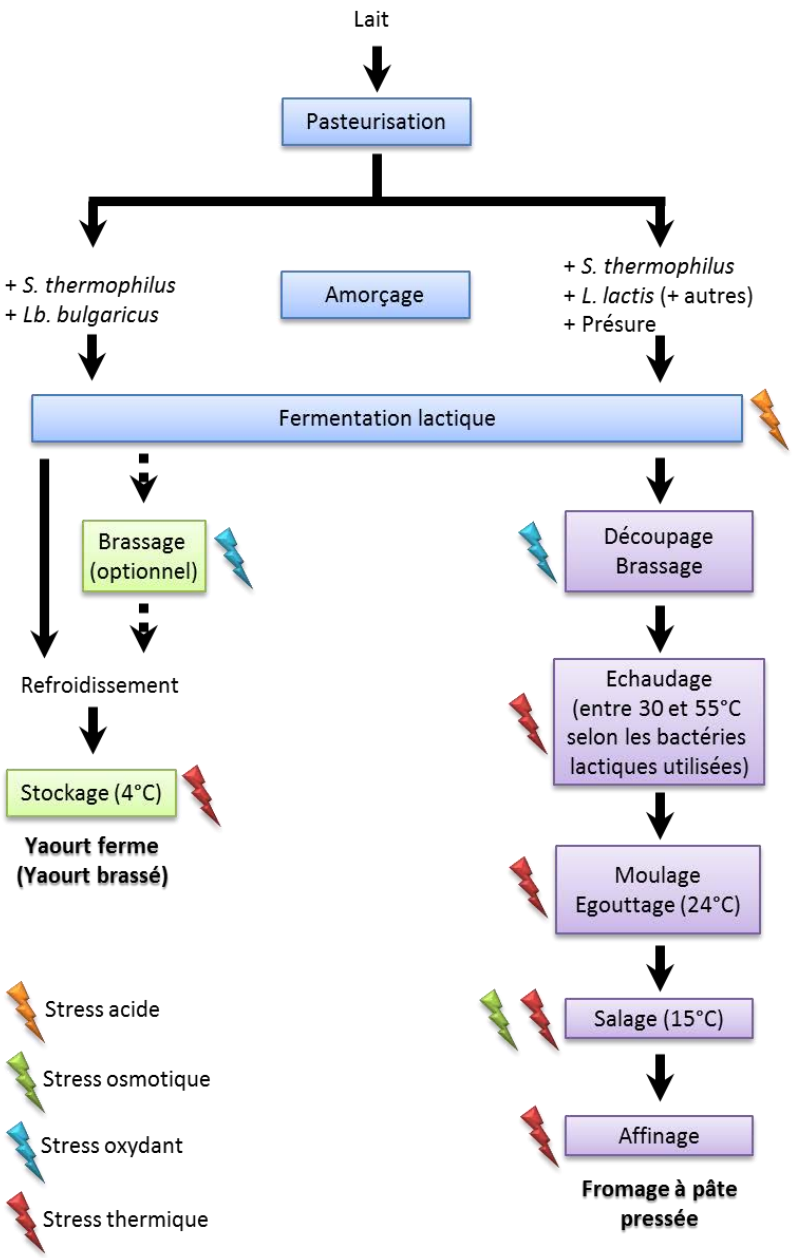


Figure 17 : Schématisation des différentes étapes de fabrication des yaourts et des fromages à pâte pressée (Henry 2011).

Face à des conditions de stress, les bactéries doivent moduler leur physiologie pour répondre aux variations environnementales via la mise en place de réseaux de régulation qui induisent des protéines dites de stress qui peuvent être rassemblées en deux groupes : les protéines de réponse générale au stress (GSP pour General Stress Protein) qui sont induites quelle que soit la nature du stress et les protéines de réponse spécifiques au stress (SSP pour Specific Stress Protein) qui permettent l'adaptation à un stress donné (Hecker *et al.,* 1996). Par ailleurs, les GSP sont nombreuses et diverses au sein d'une espèce bactérienne. Par exemple, chez *Bacillus*

subtilis, plus de 150 protéines GSP ont été identifiées et celles-ci peuvent être impliqués dans le contrôle des flux entrant et sortant de solutés, dans le métabolisme carboné, des protéines de l'enveloppe cellulaire et des régulateurs transcriptionnels ou post-transcriptionnels (Price *et al.,* 2001).

3.2. *Streptococcus thermophilus* possèdent de nombreuses copies *rgg*

3.2.1. *S. thermophilus* possèdent plusieurs copies *rgg* par génome

Des protéines appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels Rgg ont été retrouvée chez *S. thermophilus*. Une analyse par PSI-BLAST, réalisée sur les 7 génomes de *S. thermophilus* séquencés et disponibles, a permis d'identifier au sein d'eux la présence d'ORF codant 11 protéines différentes appartenant à la famille Rgg. Ces protéines ont été appelées RggSt1 à RggSt11 (Rgg de S. thermophilus) (Tableau 5).

Tableau 5 : Protéines Rgg codées par les 7 génomes séquencés de *S. thermophilus.*

Nom de la protéine Rgg	Nom de la souche de *S. thermophilus*						
	LMG18311	CNRZ1066	LMD9	ND03	JIM8232	MN-ZLW-002	CNCM I-1630
RggSt1	stu0182	str0182					STHE1630_00503
RggSt2	stu0917	str0917	STER_0934	STND_0883	STH8232_1116-1117	Y1U_C0964	STHE1630_01460
RggSt3	stu1044	str1044					STHE1630_01803
RggSt4	stu1511	str1511					
RggSt5	stu1572	str1572	STER_1530	STND_1506	STH8232_1809	Y1U_C1466	
RggSt6	stu1947	str1947	STER_1919		STH8232_2247	Y1U_C1843	STHE1630_01780
RggSt7	stu1950	str1950		STND_1893	STH8232_2252	Y1U_C1846	STHE1630_01784
RggSt8			STER_1299		STH8232_1541		
RggSt9			STER_1358	STND_1322	STH8232_1611	Y1U_C1296	
RggSt10				STND_0397		Y1U_C0384	STHE1630_01635
RggSt11					STH8232_1792		
Total	7	7	5	5	7	6	6

L'analyse a été réalisée sur les génomes de LMG18311, CNRZ1006 (Bolotin *et al.,* 2004), LMD-9 (Hols *et al.,* 2005), ND03 (Sun *et al.,* 2011), JIM8232 (Delorme *et al.,* 2011), MN-ZLW-002 (Kang *et al.,* 2012) et CNCM I-1630 partiellement séquencé (McNulty *et al.,* 2011). Les noms des ORF codant les copies Rgg sont ceux indiqués dans les banques de données. Les copies situées sur la même ligne sont identiques. Les cases grisées indiquent que la protéine Rgg n'a pas été retrouvée chez la souche étudiée.

Ainsi, tous les génomes séquencés de *S. thermophilus* possèdent 5 à 7 copies de gènes *rgg*. Toutefois, la composition en copies *rgg* diffère d'une souche à l'autre hormis pour les souches LMG18311 et CNRZ1066 qui possèdent les même copies *rgg*. Seule la copie RggSt2 est commune aux 7 souches de *S. thermophilus*, suggérant qu'elle ait été transmise à partir d'un ancêtre commun. Par contre, la copie RggSt11 est présente uniquement au sein du génome de la souche JIM8232 et pourrait avoir été acquise récemment par TH ou perdues simultanément par toutes les autres souches.

3.2.2. Polymorphisme et parenté des protéines Rgg de *S. thermophilus*

Les protéines Rgg retrouvées chez les différentes souches de *S. thermophilus* sont polymorphes. En effet, le pourcentage d'identité entre les 11 protéines Rgg différentes retrouvées chez *S. thermophilus*, prises 2 à 2, a été calculé et est indiqué dans le tableau 6 (Henry 2011).

Tableau 6 : Pourcentage d'identité entre les différentes copies Rgg de *S. thermophilus* (Henry 2011).

	RggSt1	RggSt2	RggSt3	RggSt4	RggSt5	RggSt6	RggSt7	RggSt8	RggSt9	RggSt10
RggSt2	28%									
RggSt3	30%	25%								
RggSt4	25%	26%	23%							
RggSt5	35%	**62%**	27%	28%						
RggSt6	33%	26%	29%	30%	28%					
RggSt7	31%	**64%**	24%	23%	**61%**	30%				
RggSt8	28%	31%	28%	25%	29%	28%	31%			
RggSt9	36%	**63%**	26%	28%	**81%**	28%	**62%**	31%		
RggSt10	23%	24%	22%	**56%**	26%	27%	26%	24%	26%	
RggSt11	31%	44%	25%	26%	47%	27%	46%	27%	47%	25%

En gras sont indiqués les pourcentages d'identité supérieurs à 50%.

A l'exception de quelques-unes, les protéines Rgg de *S. thermophilus* présentent de faibles pourcentages d'identité entre elles et ne sont pas plus proches entre elles qu'avec les autres protéines de la famille Rgg retrouvées chez d'autres espèces bactériennes. Le polymorphisme suggère que ces protéines pourraient avoir des rôles biologiques différents. Seules les protéines RggSt2, RggSt5, RggSt9 présentent un fort pourcentages d'identité entre elles (entre 61 et 81%) et appartiennent au même groupe monophylétique, appelée RggSt I (Figure 4, page 25) (Henry 2011). De même les protéines RggSt4 et RggSt10 appartient au même groupe phylogénétique, appelée RggSt II et présente un pourcentage d'identité de 56 %. Par ailleurs, les domaines caractéristiques des protéines de la famille Rgg (HTH et médian) sont mieux conservés au sein de chacun de ces deux groupes. Ainsi, les protéines Rgg issues de ces deux groupes monophylétiques pourraient résulter chacune de la duplication d'un gène *rgg* ancestrale qui aurait évolué de façon divergente pour chacune des copies (Henry 2011).

3.2.3. L'environnement génétique des copies *rgg* de *S. thermophilus*

Bien que les différentes copies des gènes *rgg* chez *S. thermophilus* soient très polymorphes, leurs environnements génétiques présentent des caractéristiques communes (Figure 18) (Henry 2011).

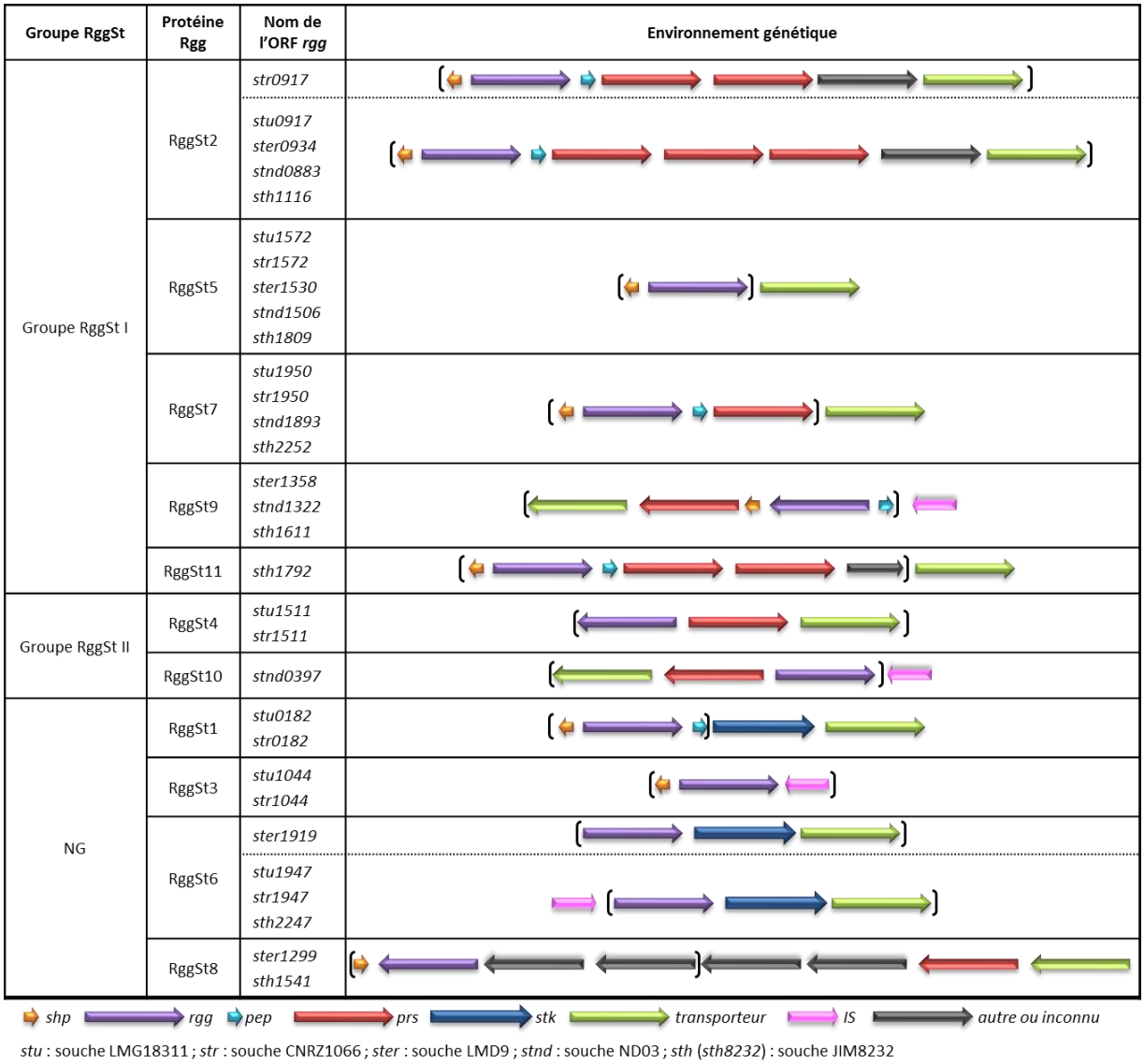


Figure 18 : Présentation des environnements génétiques des différents loci *rgg* présents sur les génomes de *S. thermophilus* (Henry 2011). Les noms d'ORF *rgg* correspondent aux annotations des banques de données. NG : Non Groupé ; *stk* : sérine/thréonine kinase ; *prs* : protéine à radical SAM ; *IS* : Séquence d'Insertion. Les régions indiquées entre parenthèses présentent un pourcentage en bases G et C plus faible (entre 25 et 31%) que la moyenne de l'ensemble du génome (39% ± 4%) sur lequel elles se trouvent.

L'analyse du positionnement des ORF *rgg* montre qu'elles sont réparties tout le long du génome. Par ailleurs, l'étude des gènes situés dans l'environnement proche des gènes *rgg* (loci *rgg*) indique qu'ils sont toujours localisés à proximité de gènes codant des transporteurs putatifs, à l'exception du gène *rggSt3*.De plus, les gènes rgg sont souvent localisés à proximité d'ORF codant potentiellement des sérine/thréonine kinases et des petits peptides, suggérant un mode d'action commun (Henry 2011).

Par ailleurs, 9 des 11 gènes *rgg* de *S. thermophilus* sont flanqués d'un gène codant un peptide hydrophobe de type SHP. Toutes les ORF codant des SHP appartenant au groupe II sont localisées en amont des ORF *rgg* classées dans le groupe RggSt I, alors que les ORF codant des SHP

appartenant au groupe I sont présentes uniquement en amont de gènes *rgg* appartenant au groupe RggSt II ou de copies *rgg* isolées (Ibrahim *et al.,* 2007 ; Henry 2011).

En outre, le pourcentage en bases G et C des ORF *rgg* étant plus faible que celui du génome et la présence de séquences IS dans l'environnement génétique de 4 des gènes *rgg* sont en cohérence avec leur probable acquisition par TH (Eng *et al.,* 2011 ; Henry 2011).

4. Objectifs de thèse

Nathalie Leblond-Bourget et son équipe s'intéresse à l'adaptation de la bactérie *S. thermophilus* aux changements de son environnement. Des études préalables, réalisées au laboratoire, ont permis d'identifier des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant de *S. thermophilus*. Ces gènes ont été mis en évidence par sélection de la résistance/sensibilité au stress oxydant de mutants obtenus par mutagenèse insertionnelle aléatoire (Fernandez *et al.,* 2004 ; Thibessard *et al.,* 2004). Parmi eux, le mutant appelé OsrC (puis RggC) (pour Oxidative stress resistance) était plus résistant au stress oxydant que la souche sauvage. L'analyse du locus interrompu a montré qu'il codait un gène appartenant à la famille de régulateurs transcriptionnels Rgg (Fernandez *et al.,* 2004 ; Fernandez *et al.,* 2006). Au cours de sa thèse Annabelle Fernandez a mis en évidence que les souches de *S. thermophilus* présentaient un grand nombre d'ORF *rgg* par rapport aux autres streptocoques (Fernandez 2004).

Les régulateurs transcriptionnels de la famille Rgg sont décrits dans la littérature comme des régulateurs majeurs de la virulence chez les streptocoques pathogènes (Chaussee *et al.,* 2002 ; Dmitriev *et al.,* 2006 ; Samen *et al.,* 2006 ; Bortoni *et al.,* 2009 ; Zheng *et al.,* 2011). Ces données posent la question du rôle des gènes *rgg* chez *S. thermophilus*, l'une des deux seules espèces non pathogène du genre *Streptococcus*. Participent-ils à l'adaptation à l'environnement de *S. thermophilus* ? Codent-ils des régulateurs transcriptionnel globaux ou sont-ils impliqués dans une régulation spécifique d'un processus biologique ? Afin de répondre à ces questions, la caractérisation des régulateurs transcriptionnels Rgg de *S. thermophilus* et l'étude de l'implication de ces gènes dans l'adaptation de la bactérie à l'environnement ont été initiées par les travaux de thèse de Romain Henry. Une collection de mutants présentant chacun une délétion d'un gène *rgg* a été réalisée chez la souche LGM18311 de *S. thermophilus*. Ceux-ci ont ensuite été analysés dans leur capacité de tolérance à différents stress. Cependant, aucun phénotype particulier n'a pu être observé dans les conditions testées (Henry 2011). Toutefois, l'un des mutants, délété du gène rgg_{0182}, présente une morphologie cellulaire particulière, avec une organisation cellulaire en chaines différente de celle de la souche sauvage (Henry 2011). Du fait de ce phénotype particulier, la suite de l'étude s'est focalisée sur le gène rgg_{0182} et, plus particulièrement, sur l'étude de son rôle dans l'adaptation de *S. thermophilus* LMG18311 aux changements environnementaux.

Les objectifs de cette thèse sont multiples. Comme l'organisation génétique du locus *rgg*$_{0182}$ présente des similarités avec celui du gène *rgg1358* de *S. thermophilus* LMD-9, impliqué dans un mécanisme de QS, le premier objectif consiste à étudier l'implication du couple *rgg*$_{0182}$/*shp*$_{0182}$ dans un mécanisme de quorum sensing. Le second objectif consiste à déterminer si le gène *rgg*$_{0182}$ participe à l'adaptation de *S. thermophilus* LMG18311 à l'environnement. Puisque de nombreuses protéines Rgg sont décrites dans la littérature comme étant des régulateurs globaux de l'expression génique, le troisième objectif de ces travaux consiste à déterminer quels sont les gènes dont la transcription est régulée par la protéine Rgg$_{0182}$ afin de comprendre quel est le rôle biologique de cette protéine et de déterminer quelles sont les fonctions biologiques dans laquelle elle est impliquée. La présence d'un grand nombre de copies de gènes *rgg* au sein du génome de *S. thermophilus*, bactérie qui évolue par perte de fonction, pose la question du rôle de ces différents gènes. Le dernier objectif de ces travaux consiste ainsi à comprendre quels avantages la présence de ces différents gènes *rgg* peuvent procurer à *S. thermophilus* et s'ils possèdent ou non le même rôle au sein de la cellule.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

1. Souches et conditions de croissance

Les souches LMG19311 et LMD-9 de *S. thermophilus* et leurs dérivées utilisées lors de ces travaux sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Souches bactériennes de *S. thermophilus* utilisées lors de ces travaux.

Streptococcus thermophilus		
Souche et plasmide	**Genotype/phenotype**	**Origine**
LMG18311	Souche sauvage isolée de yahourt	BCCM LMG
Δ*rgg* $_{0182}$	Dérivé ede LMG18311 portant une délétion de 699 pb dans le gène *rgg* $_{0182}$	Henry R.
Δ*rgg* $_{0917}$	Dérivée de LMG18311 portant une délétion de 806 pb dans le gène *rgg* $_{0917}$	Henry R.
Δ*rgg* $_{1511}$	Dérivée de LMG18311 portant une délétion de 775 pb dans le gène *rgg* $_{1511}$	Henry R.
Δ*rgg* $_{1947}$	Dérivée de LMG18311 portant une délétion de 818 pb dans le gène *rgg* $_{1947}$	Henry R.
Δ*rgg* $_{1950}$	Dérivée de LMG18311 portant une délétion de 723 pb dans le gène *rgg* $_{1950}$	Henry R.
LMG18311 *blp* ::P$_{pep}$ -*luxAB*	LMG18311 contenant la fusion transcriptionnelle du promoteur du gène *pep* $_{0182}$ aux gènes *luxAB* intégrée au locus *blp* , issue du plasmide pGICB004::P*pep* $_{0182}$	Gardan R.
LMG18311 *blp* ::P$_{shp}$ -*luxAB*	LMG18311 contenant la fusion transcriptionnelle du promoteur du gène *shp* $_{0182}$ aux gènes *luxAB* intégrée au locus *blp* , issue du plasmide pGICB004::P*shp* $_{0182}$	Gardan R.
Δ*rgg* $_{0182}$ *blp* ::P$_{pep}$ -*luxAB*	Δ*rgg* $_{0182}$ contenant la fusion transcriptionnelle du promoteur du gène *pep* $_{0182}$ aux gènes *luxAB* intégrée au locus *blp* , issue du plasmide pGICB004::P*pep* $_{0182}$	Gardan R.
Δ*rgg* $_{0182}$ *blp* ::P$_{shp}$ -*luxAB*	Δ*rgg* $_{0182}$ contenant la fusion transcriptionnelle du promoteur du gène *shp* $_{0182}$ aux gènes *luxAB* intégrée au locus *blp* , issue du plasmide pGICB004::P*shp* $_{0182}$	Gardan R.
LMD-9	Souche sauvage isolée de yahourt	Makarova *et al* ., 2006
LMD-9 *blp* ::*rgg* $_{0182}$ -*shp* $_{0182}$	LMD-9 contenant la fusion transcriptionnelle du promoteur du gène *shp* $_{0182}$ aux gènes *luxAB* ainsi que les gènes *rgg* $_{0182}$ et *shp* $_{0182}$ intégrés au locus *blp* , issue du plasmide pGICB004::*aphA3 rgg* $_{0182}$ -*shp* $_{0182}$ -*luxAB*	cette étude
LMD-9 *blp* ::*shp* $_{0182}$	LMD-9 contenant la fusion transcriptionnelle du promoteur du gène *shp* $_{0182}$ aux gènes *luxAB* ainsi que le gène *shp* $_{0182}$ intégrés au locus *blp* , issue du plasmide pGICB004::*aphA3 shp* $_{0182}$ -*luxAB*	cette étude
LMD-9 *blp* ::*rgg* $_{0182}$ -P*shp* $_{0182}$	LMD-9 contenant la fusion transcriptionnelle du promoteur du gène *shp* $_{0182}$ aux gènes *luxAB* ainsi que le gène *rgg* $_{0182}$ intégrés au locus *blp* , issue du plasmide pGICB004::*aphA3 rgg* $_{0182}$ -P*shp* $_{0182}$ -*luxAB*	cette étude
LMD-9 *blp* ::*rgg* $_{0182}$ -*shp* $_{0182}$ Δ*amiCDE*	LMD-9 contenant la fusion transcriptionnelle du promoteur du gène *shp* $_{0182}$ aux gènes *luxAB* ainsi que les gènes *rgg* $_{0182}$ et *shp* $_{0182}$ intégrés au locus *blp* , issue du plasmide pGICB004::*aphA3 rgg* $_{0182}$ -*shp* $_{0182}$ -*luxAB* ; délétée des gènes *amiCDE*	cette étude
LMG18311 *blp* ::*rgg* $_{0182}$ -*shp* $_{0182}$	LMG18311 contenant la fusion transcriptionnelle du promoteur du gène *shp* $_{0182}$ aux gènes *luxAB* ainsi que les gènes *rgg* $_{0182}$ et *shp* $_{0182}$ intégrés au locus *blp* , issue du plasmide pGICB004::*aphA3 rgg* $_{0182}$ -*shp* $_{0182}$ -*luxAB*	cette étude

Les souches de *S. thermophilus* sont cultivées dans trois milieux différents : en lait reconstitué (10% p/v, Régilait), en milieu M17 en présence de lactose à 10 g/L (LM17, milieu classique de culture de *S. thermophilus*) (Terzaghi *et al.,* 1975) ou en milieu chimiquement défini (MCD, milieu sans peptide) (Letort *et al.,* 2001) supplémentés ou non en antibiotique.

Pour toutes les cultures, une première pré-culture (PC1) est réalisée en milieu lait. Celle-ci est ensemencée à partir d'un clone isolé sur milieu LM17 gélosé (agar 20g/L) puis elle est incubée 15 h à 42°C sans agitation. Les cultures en milieu lait sont ensemencées au 1/500ème à partir de la PC1. Pour les cultures en milieu LM17 ou MCD, une seconde pré-culture (PC2) est réalisée. Celle-ci est ensemencée au 1/100ème en milieu LM17 à partir de la PC1 puis est incubée 7 h à 42°C sans agitation. Dans le cas d'une culture en milieu MCD, une nouvelle pré-culture (PC3) en milieu MCD

est ensemencée au 1/100ème à partir de la PC2 et est incubée 7 h à 42°C sans agitation. Enfin, les cultures en milieux LM17 ou MCD sont ensuite ensemencées respectivement à partir de la PC2 ou de la PC3 à une densité optique (DO) à 600 nm égale à 0,1. Toutes les cultures sont ensuite incubées sans agitation à la température étudiée.

Les cultures sur milieu solide sont incubées en condition anaérobie en jarres dans lesquelles sont placés des générateurs d'anaérobiose GENbox anaer (BioMérieux). Lorsque cela nécessaire, des antibiotiques sont ajoutés au milieu de culture : érythromycine à 5 µg/mL et/ou kanamycine à 500 µg/mL.

Les souches d'*E. coli* utilisées lors de ces travaux sont présentées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Souches bactériennes d'*E. coli* utilisées lors de ces travaux.

Escherichia coli		
Souche et plasmide	**Genotype/phenotype**	**Origine**
DH5α	F^- ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rk^-, mk^+) phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1	Stratagen
DH5α pET15b	DH5α portant le plasmide pET15b	cette étude
DH5α pET28a	DH5α portant le plasmide pET28a	cette étude
DH5α pET32a	DH5α portant le plasmide pET32a	cette étude
DH5α pET15b::*rgg* $_{0182}$	DH5α portant le plasmide pET15b::*rgg* $_{0182}$	cette étude
DH5α pET28a::*rgg* $_{0182}$	DH5α portant le plasmide pET28a::*rgg* $_{0182}$	cette étude
DH5α pET32a::*rgg* $_{0182}$	DH5α portant le plasmide pET32a::*rgg* $_{0182}$	cette étude
DH5α pET28a::*rgg* $_{1947}$	DH5α portant le plasmide pET28a::*rgg* $_{1947}$	cette étude
DH5α pET32a::*rgg* $_{1947}$	DH5α portant le plasmide pET32a::*rgg* $_{1947}$	cette étude
Rosetta (DE3) pLysS	F^- ompT $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam^R)	Novagen
BL21 (DE3)	F^- ompT $hsdSB(r_B^- m_B^-)$ gal dcm (DE3)	Novagen
Soluble BL21		Rouhier N.
C41(DE3)	Dérivée de BL21 (DE3) portant au moins une mutation non caractérisée	Lucigen
BL21 (DE3) pSBET	BL21 (DE3) contenant le plasmide pSBET	Rouhier N.
C41(DE3) pET15b::*rgg* $_{0182}$	C41(DE3) portant le plasmide pET15b::*rgg* $_{0182}$	cette étude
C41(DE3) pET15b	C41(DE3) portant le plasmide pET15b	cette étude
C41(DE3) pET28a::*rgg* $_{0182}$	C41(DE3) portant le plasmide pET28a::*rgg* $_{0182}$	cette étude
C41(DE3) pET32a::*rgg* $_{0182}$	C41(DE3) portant le plasmide pET32a::*rgg* $_{0182}$	cette étude
C41(DE3) pET28a::*rgg* $_{1947}$	C41(DE3) portant le plasmide pET28a::*rgg* $_{1947}$	cette étude
C41(DE3) pET32a::*rgg* $_{1947}$	C41(DE3) portant le plasmide pET32a::*rgg* $_{1947}$	cette étude
BL21 soluble pET28a::*rgg* $_{0182}$	BL21 soluble portant le plasmide pET28a::*rgg* $_{0182}$	cette étude
BL21 soluble pET32a::*rgg* $_{0182}$	BL21 soluble portant le plasmide pET32a::*rgg* $_{0182}$	cette étude
BL21 soluble pET28a::*rgg* $_{1947}$	BL21 soluble portant le plasmide pET28a::*rgg* $_{1947}$	cette étude
BL21 soluble pET32a::*rgg* $_{1947}$	BL21 soluble portant le plasmide pET32a::*rgg* $_{1947}$	cette étude
Rosetta pET28a::*rgg* $_{0182}$	Rosetta portant le plasmide pET28a::*rgg* $_{0182}$	cette étude
Rosetta pET32a::*rgg* $_{0182}$	Rosetta portant le plasmide pET32a::*rgg* $_{0182}$	cette étude
Rosetta pET28a::*rgg* $_{1947}$	Rosetta portant le plasmide pET28a::*rgg* $_{1947}$	cette étude
Rosetta pET32a::*rgg* $_{1947}$	Rosetta portant le plasmide pET32a::*rgg* $_{1947}$	cette étude
BL21 pSBET pET32a::*rgg* $_{0182}$	BL21 pSBET portant le plasmide pET32a::*rgg* $_{0182}$	cette étude
BL21(DE3) pET28a::*rgg* $_{1947}$	BL21(DE3) portant le plasmide pET28a::*rgg* $_{1947}$	cette étude
BL21 pSBET pET32a::*rgg* $_{1947}$	BL21 pSBET portant le plasmide pET32a::*rgg* $_{1947}$	cette étude
TG01 *repA* $^+$	Dérivée de la TG01 (*supE hsd* Δ*5 thi* Δ*(lac-proAB) F'* [*traD36 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ* ΔM15]) avec le gène *repA* intégré au crhomosome	Gardan R.
TG01 *repA* $^+$ pGICB004::*aphA3*	TG01 *repA* $^+$ contenant le plasmide pGICB004::aphA3	cette étude
TG01 *repA* $^+$ pGICB004::*aphA3 rgg* $_{0182}$ *-shp* $_{0182}$ *-luxAB*	TG01 *repA* $^+$ contenant le plasmide pGICB004::*aphA3 rgg* $_{0182}$ *-shp* $_{0182}$ *-luxAB*	cette étude
TG01 *repA* $^+$ pGICB004::*aphA3 shp* $_{0182}$ *-luxAB*	TG01 *repA* $^+$ contenant le plasmide pGICB004::*aphA3 shp* $_{0182}$ *-luxAB*	cette étude
TG01 *repA* $^+$ pGICB004::*aphA3 rgg* $_{0182}$ - P*shp* $_{0182}$ *-luxAB*	TG01 *repA* $^+$ contenant le plasmide pGICB004::*aphA3 rgg* $_{0182}$ - P*shp* $_{0182}$ *-luxAB*	cette étude

Les souches d'*E. coli* sont cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) (Sambrook *et al.,* 1989). Les pré-cultures sont ensemencées à partir d'un clone isolé sur milieu LB gélosé (agar 20 g/L) puis sont incubées 15 h à 37°C sous agitation (250 rpm). Les cultures sont ensuite ensemencées au 1/50ème à partir de la pré-culture. Lorsque cela est nécessaire, des antibiotiques sont ajoutés au milieu de culture : érythromycine à 200 µg/mL, kanamycine à 50 µg/mL et/ou ampicilline à 150 µg/mL.

Les plasmides utilisés dans ces travaux sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : plasmides utilisés lors de ces travaux.

Plasmide	Genotype/phenotype/source	Origine
pGICB004	Plasmide thermosensible, Em^r; utilisé pour la construction de fusion transcriptionnelle aux gènes *luxAB* genes de *Photorabdus luminescens* et permettant l'intégration de la fusion transcriptionnelle au locus *blp* locus de *S. thermophilus*	Fleuchot et al., 2011
pGICB004::$P_{pep0182}$	Dérivé du pGICB004 utilisé pour introduire la fusion transcriptionnelle $P_{pep0182}$-*luxAB* au locus *blp*	Gardan R. ; Fleuchot B.
pGICB004::$P_{shp0182}$	Dérivé du pGICB004 utilisé pour introduire la fusion transcriptionnelle $P_{shp0182}$-*luxAB* au locus *blp*	Gardan R. ; Fleuchot B.
pGICB004::*aphA3*	Dérivé du plasmide pGICB004 contenant un gène de résitance à la kanamycuine en aval des gènes *luxAB* et permettant l'intégration de fusion transcriptionnel au locus *blp* de *S.thermophilus* ; Erm^R, Km^R	Gardan R. ; Fleuchot B.
pGICB004::*aphA3 rgg* $_{0182}$-*shp* $_{0182}$-*luxAB*	Dérivé du plasmide pGICB004::*aph3* contenant la fusion transcriptionnel du promoteur du gène *shp* $_{0182}$ en présence des gènes *rgg* $_{0182}$ et *shp* $_{0182}$	cette étude
pGICB004::*aphA3 shp* $_{0182}$-*luxAB*	Dérivé du plasmide pGICB004::*aph3* contenant la fusion transcriptionnel du promoteur du gène *shp* $_{0182}$ en présence du gène *shp* $_{0182}$	cette étude
pGICB004::*aphA3 rgg* $_{0182}$-P*shp* $_{0182}$-*luxAB*	Dérivé du plasmide pGICB004::*aph3* contenant la fusion transcriptionnel du promoteur du gène *shp* $_{0182}$ en présence du gène *rgg* $_{0182}$	cette étude
pET15b	Vecteur d'expression pour protéine fusion maquée par une étiquette hexa-histidine en N-terminale ; Amp^R	Novagen
pET28a	Vecteur d'expression pour protéine fusion maquée par une étiquette hexa-histidine en N-terminale ou C-terminale ; Km^R	Novagen
pET32a	Vecteur d'expression pour protéine fusion maquée par une étiquette hexa-histidine et thioredoxine en N-terminale ; Amp^R	Novagen
pET15b::*rgg* $_{0182}$	Dérivé du pET15b exprimant la protéine Rgg_{0182}	cette étude
pET28a::*rgg* $_{0182}$	Dérivé du pET28a exprimant la protéine Rgg_{0182}	cette étude
pET32a::*rgg* $_{0182}$	Dérivé du pET32a exprimant la protéine Rgg_{0182}	cette étude
pET28a::*rgg* $_{1947}$	Dérivé du pET15b exprimant la protéine Rgg_{1947}	cette étude
pET32a::*rgg* $_{1947}$	Dérivé du pET28a exprimant la protéine Rgg_{1947}	cette étude

2. Manipulations génétiques et de biologie moléculaire

2.1. Extraction et purification d'ADN

L'extraction d'ADN génomique (ADNg) de *S. thermophilus* est réalisée selon les recommandations du Molecular Clonning (Sambrook *et al.,* 1989).

Les ADN plasmidiques nécessitant une purification sont extraits sur colonne en utilisant le kit « Pasmid mini kit» (Qiagen). Dans le cas contraire, l'extraction d'ADN plasmidique est réalisée par lyse alcaline selon les instructions du Molecular Cloning (Sambrook *et al.,* 1989).

La purification des produits de PCR et d'ADN à parti d'un gel l'électrophorèse est réalisée à l'aide du kit de purification «High Pure PCR Product Purification Kit» (Roche Applied Science) selon les recommandations du fournisseur.

2.2. Réactions d'amplifications en chaine par polymérase (ou PCR pour Polymerase Chain Reaction)

2.2.1. PCR standards

Les PCR standards sont réalisées dans un volume final de 25 µL contenant 1 unité (U) de Taq polymerase (New England BioLabs) ou 1 U de DreamTaq (Finnzymes), un tampon associé concentré 1x, des amorces à 0,5 µM, un mix de dNTP à 0,2 mM et 100 ng d'ADN matrice.

Les PCR sont réalisées par un premier cycle de dénaturation à 95°C pendant 5 min, suivi par un deuxième cycle, répété 30 fois, composé de trois étapes : une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 s, une étape d'hybridation au Tm des amorces pendant 30 s et une étape d'élongation à 72°C (1 min par kb amplifié) et suivi, enfin, par un dernier cycle d'élongation à 72°C pendant 7 min.

2.2.2. PCR haute-fidélité et séquençage

Les PCR « haute-fidélité » sont réalisées dans un volume final de 50 µL contenant 1 U de phusion DNA polymerase (Finnzymes), un tampon associé concentré 1x, des amorces à 0,5 µM, un mix de dNTP à 0,2 mM et 100 ng d'ADN matrice. Les conditions de PCR sont réalisées par un premier cycle de dénaturation à 98°C pendant 30 s suivi par un deuxième cycle, répété 30 fois, composé d'une étape de dénaturation pendant 10 s, d'une étape d'hybridation (3°C au-dessus du Tm des amorces) pendant 30 s et d'une étape d'élongation à 72°C (30 s par kb amplifi2) et, enfin, suivi d'un cycle final d'élongation réalisé à 72°C pendant 10 min.

L'ensemble des amorces utilisées pour les PCR sont listées dans le tableau 10.

Tableau 10 : liste des amorces utilisées en PCR.

Nom	Séquence 5'-3'	Caractéristiques	Utlitisation
EB1	CCCCCCC**CATATG**GGAAAACAAAATGAACTG	site ***Nde*I**, ATG de *rgg* $_{0182}$	Clonage *rgg* $_{0182}$ pour surexpression protéique à l'aide du plasmide pET15b et pET28a ; séquençage du gène *rgg* $_{0182}$
EB2	CCCC**GGATCC**TTAACCTACAATCGACTTAAA	site ***BamH*I**, stop de *rgg* $_{0182}$	Clonage *rgg* $_{0182}$ pour surexpression protéique à l'aide du plasmide pET15b, pET28a et pET32a ; séquençage du gène *rgg* $_{0182}$
var-cse for var-cse rev	CTGTAGTAGCAGAATCTAAC GCACTAGCAATCCAGTCTT		Amplification de la région variable du gène *cse*
EB4	CCCC**CCATGG**GAAAACAAAATGAACTG	site ***Nco*I**, ATG de *rgg* $_{0182}$	Clonage *rgg* $_{0182}$ pour surexpression protéique à l'aide du plasmide pET32a
EB5	CCCCCCC**CATATG**ATTGATACTATTGACATAGGT	site ***Nde*I**, ATG de *rgg* $_{1947}$	Clonage *rgg* $_{1947}$ pour surexpression protéique à l'aide du plasmide pET15b et pET28a
EB6	CCCC**GGATCC**TCATATAATAGAATTCAATAATTCTTC	site ***BamH*I**, stop de *rgg* $_{1947}$	Clonage *rgg* $_{1947}$ pour surexpression protéique à l'aide du plasmide pET15b, pET28a et pET32a
EB8	CCCCCC**GAAGACCCCATG**ATTGATACTATTGACATAGGT	site ***Nco*I/*Bbs*I**, ATG de rgg$_{1947}$	Clonage *rgg* $_{1947}$ pour surexpression protéique à l'aide du plasmide pET32a
Pshp0182-for Pshp0182-rev	GTAAATACATGTCAATAGGAC TTTGTTTTCCCATATATGCAACC		Sonde P*shp* $_{0182}$ pour EMSA
Ppep0182-for Ppep0182-rev	AGCATCAGATTTTACTCCAGATG TTGTAGGTTAATCCCGTTTATGC		sonde P*pep* $_{0182}$ pour EMSA
Pldh-5' Pldh-3'	ACGCTTTCACTTAATAATTC TGGTCTAAACATCTCCTTA		Sonde P*ldh* pour EMSA
A1 A2 A3 A4	GAA**GAATTC**CATAAACGGGATTAACCT GAA**GAATTC**TTACACACCACCAACTAT GAA**GAATTC**ATATGCAACCTTCTTTTAAA GAA**GAATTC**AACAATTTCATATGATTTCC	site ***EcoR*I** site ***EcoR*I**, stop de *shp* $_{0182}$ site ***EcoR*I** site ***EcoR*I**, start de *shp* $_{0182}$	Construction fusion transcriptionnelle P*shp* $_{0182}$ dans plasmide pGICB0004::*aph3*
pGICB004::*aph3*-for pGICB004::*aph3*-rev	TTTTTTATGAGTGTAAAATGA AGATGCGACCTAATTTAA		Vérification clonage P*shp* $_{0182}$ dans pGICB004::*aph3*
MC3 MC5 MC6	ATATCCTCACCCCAGA CCAAAAAGACTACGAGG TTGAAAAGTGTGGTGCG		Vérification intégration fusion transcriptionnelle issu de pGICB004::*aph3* au locus *blp* de *S. thermophilus*
BF5 BF6 BF7 BF8 erm-1 erm-2	GTGTCAACAGGTGTCTTG GTGAGTATCTGAAACTTG CACTCCGTTCTCTATTGT CAATTTCTGTCTTGTTAC GTAACGTGTAACTTTCC CGTAAAAGAAGTTATGG		Vérification délétion des gènes *amiCDE* chez *S. thermophilus*
PclpE-for PclpE-rev	GGCAGAGCATATCAGTACCT CGTGTTCCTCAAGTACCAAA		Sonde P*clpE* pour EMSA
PgroES-for PgroES-rev	TCGGTTAATATACTAGAAAA ATTACCTCCAAAAATGTTAT		Sonde P*groES* pour EMSA
PdnaK-for PdnaK-rev	GAACTAAAAAAACCTTGTCC TTAGACATATGTTCTATCTC		Sonde P*dnaK* pour EMSA
PhrcA-for PhrcA-rev	TCGCTGATATTAGAACACCC GTAATCACGATGTCACCTCA		Sonde P*hrcA* pour EMSA
PcspB-for PcspB-rev	ATAAATGAGTTAAAGCATGG CATTTTACTCATTACAAAATC		Sonde P*cspB* pour EMSA
Pstk1-for Pstk1-rev	AATTAAATGCCCTTAAGAGC CTCAATTTTTTTGAAATCAGAG		Sonde P*stk1* pour EMSA
PclpL-for PclpL-rev	GTTCATATAATCACCTCATACTGT TGAAAGTTCTCAGCCTTC		Sonde P*clpL* pour EMSA
PclpP-for PclpP-rev	CTGTTTGGTACAAAATAAGTTG CGGAATCATATGAATTCTC		Sonde P*clpP* pour EMSA
PclpX-for PclpX-rev	CAATTCCTGCCTTTCGTAA CATTACGATTTCCAGCCAT		Sonde P*clpX* pour EMSA
Phsp33-for Phsp33-rev	CACCTGTAATAAGGTAGAAGC ATTTATCCATAGTGTTTCCAT		Sonde P*hsp33* pour EMSA
PclpC-for PclpC-rev	TGCTTTTTGATGAAAAGATTAT CCTGCATTTTTCTTGAATATATC		Sonde P*clpC* pour EMSA

Les réactions de séquençage sont réalisées par Beckman Coulter Genomics. Les données obtenues sont traitées grâce au logiciel BioEdit.

2.3. Manipulation de l'ADN : digestion enzymatique et ligation

Les enzymes de restriction sont utilisées dans les conditions recommandées par les fournisseurs (Biolabs New England et Finzymmes).

Les réactions de ligation des fragments d'ADN sont réalisées avec un rapport 10 d'insert pour 1 de plasmide à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase (1 U par µg d'ADN) (Biolabs New England et Finzymmes) selon les recommandations du fournisseur et sont incubées pendant 16 h à 4°C.

2.4. Electrophorèse

La séparation des fragments d'ADN se fait par électrophorèse en gel d'agarose dans du tampon TBE 1x (Tris, Borate, EDTA). La concentration en gel d'agarose, le voltage et la durée de migration sont adaptés en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer. Après migration, le gel d'agarose est immergé 15 min dans une solution de BET (pour Bromure d'éthidium) (0,5 µg/ml) et les profils de restriction sont visualisés sous UV à λ=254 nm à l'aide du logiciel Quantity One (BioRad).

2.5. Transformation

2.5.1. Electroporation chez *E. coli*

Les cellules d'*E. coli* sont tout d'abord rendues compétentes. Pour cela, une culture de 50 mL ($DO_{600\ nm}$ comprise entre 0,5 et 0,7) est centrifugée 10 min à 4000 rpm à 4 °C. Le culot cellulaire est resuspendu dans 10 mL de glycérol froid à 10%. Les cellules sont lavées deux fois avec 10 mL de glycérol froid à 10%. Le culot cellulaire est ensuite repris dans 250 µL de glycérol froid à 10%.

Dans une cuve d'électroporation de 2 mm (Biorad) préalablement refroidie, 50 µl de cellules compétentes sont mélangées à 250 ng de produit de ligation ou de plasmide et une électroporation (2.5 kV, 200 Ω et 25 µF) est réalisée à l'aide de l'appareil gene pulser Xcell (Biorad). Les cellules sont ensuite rapidement reprises dans 1 mL de milieu SOC (tryptone à 2 %, extrait de levure à 0,5 %, NaCl à 2 mM, KCl à 2,5 mM, $MgCl_2$ à 10 mM, $MgSO_4$ à 10 mM, glucose à 20 mM) et sont incubées 1 h à 37°C sous agitation afin de permettre la régénération des cellules. Les cellules sont ensuite étalées sur milieu solide, en présence d'antibiotiques si nécessaire.

2.5.2. Transformation naturelle de *S. thermophilus*

Dans le cas de la souche LMD-9 de *S. thermophilus*, la transformation naturelle se déroule comme suit. Une culture de 5 mL est ensemencée en milieu MCD à DO_{600nm} = 0,05, à partir de cellules en phase stationnaire cultivées en milieu MCD, et est incubée à 42°C, sans agitation, jusqu'à une DO_{600nm} d'environ 0,2. Ensuite, 100 µL de culture sont prélevés puis mis en présence de 1 à 5 µg d'ADN. Après incubation d'1 h à 42°C, les cellules sont étalées sur un milieu gélosé approprié et sont incubées en conditions anaérobie pendant au moins 24 h.

Dans le cas de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*, la transformation naturelle est réalisée de la même façon que chez la souche LMD-9, à l'exception de l'ajout d'1 µM de peptide

d'induction de compétence (LPYFAGCL) en même temps que l'ADN, suivi d'une incubation de 2 h à 42°C sans agitation.

2.6. Analyse de l'expression des gènes

2.6.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits à partir de cellules en milieu de phase exponentielle ou en début de phase stationnaire, cultivées en milieu MCD ou en lait à 30°C, 42°C ou 50°C. Avant extraction des ARN totaux, les cultures en milieu MCD sont centrifugées 15 min à 4500 rpm et le culot cellulaire est stocké à -80°C jusqu'à extraction des ARN. Les cellules issues d'une culture en milieu lait sont lavées comme : 3,975 mL de solution saline froide (0,85% NaCl, 0,5% glycérophosphate de sodium, 0,1% tween 80) et 975 µL de tampon citrate froid (1M citrate tri-sodique) sont additionnés à 30 mL de culture lait ; le mélange est centrifugé 15 min à 4000 rpm à 4°C et le culot cellulaire est repris dans 30 mL d'eau distillée stérile ; un second lavage est réalisé dans les mêmes conditions, puis un troisième avec 10 mL de tampon d'extraction (5 mM phosphate de sodium, 1 mM EDTA, 2 mM β-mercapto-éthanol, pH 7) ; les cellules sont alors stockées à -80°C jusqu'à extraction des ARN.

Les ARN sont extraits à l'aide du kit Aurum™ Total RNA Mini Kit (Biorad) selon les recommandations du fournisseur, à l'exception de l'ajout, pendant la lyse cellulaire, d'une étape de sonication (15 min par périodes de 30 s de sonication et 30 s de repos) à l'aide de l'appareil Bioruptor. Les ARN sont élués dans un volume final de 30 µL et sont ensuite dosés à l'aide du NanoDrop-1000.

Un traitement DNase est réalisé sur les ARN extraits. Pour cela, 1 U de DNase I (Fermentas) ainsi que 10 U de RiboLock RNase Inhibitor (Fermentas) sont ajoutés à 1 µg d'ARN dans le tampon associé (1x) puis incubé à 37°C. Après 30 min d'incubation, 1 U de DNase I est ajouté au mélange réactionnel et incubé 1 h à 37°C. Un second traitement est réalisé puis est incubé 1 h à 37°C. La DNase I est inactivée par une incubation de 10 min à 65°C en présence d'EDTA. L'absence d'ADNg est vérifiée par PCR puis par électrophorèse. L'intégrité des ARN ainsi obtenus est vérifiée par électrophorèse. La quantité d'ARN est estimée par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide du NanoDrop-1000.

2.6.2. Transcription inverse

Les ARN sont ensuite convertis en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse (RT-PCR pour Retro-Transcription PCR) à l'aide du kit iScript Advanced cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Biorad) selon les recommandations du fournisseur. L'efficacité de la réverse transcription est vérifiée par PCR puis électrophorèse.

2.6.3. PCR quantitative

Les amorces utilisées pour les réactions de PCR quantitatives (qPCR) sont dessinées à l'aide du logiciel Primer 3 input (http://Prodom.wi.mil.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). Elles présentent les caractéristiques suivantes : une taille d'amplicon comprise entre 75 et 150 pb, un Tm de 58°C, un pourcentage en bases G et C compris entre 50 et 60% et une taille d'amorce comprise entre 18 et 25 nt. L'ensemble des amorces utilisées pour les réactions de qPCR est présenté dans le tableau11.

Tableau 11 : Liste des amorces utilisées en qPCR.

Nom	Séquence 5'-3'	Gène étudié	Nom	Séquence 5'-3'	Gène étudié
RTrplA_5'	ACTTCGTTGGTGAAGACG	*rplA*	RTdltA_5'	ATCACAACCCGACTTTCC	*dltA*
RTrplA_3'	CAAGTTACGTGGTCCAAGG		RTdltA_3'	CCGCCATAAACTACAACAGG	
RTrspC_5'	GCAGAAGGATACTCAGAAGG	*rspC*	RTacoC_5'	GCGTACCCTTATGAAAGAGG	*acoC*
RTrspC_3'	ACTTCTCCACGGTAGATCC		RTacoC_3'	ACCAAGCCATCATCTAGACC	
RTalaS_5'	GGAAACTGCAGAAAGTCG	*alaS*	RTdeaD_5'	ACCCTAGCCTACCTTTTCC	*deaD*
RTalaS_3'	GAAATAGTACCGTGGTCTGC		RTdeaD_3'	GTGATTCCTAGAGGTTCAGC	
RTpepQ_5'	TTGTTCCTGCTCTTGAGG	*pepQ*	RTfabZ_5'	CGTGAAGCTTTACCACACC	*fabZ*
RTpepQ_3'	GATGTCTGTACTTGCTAGAC		RTfabZ_3'	GGCATAACTGGGTATTGAGG	
RTstu1986_5'	GGAAGTGGTTGAAGTTAATGTAG	*stu1986*	RTsipA_5'	CTCGGAGATAACCGTATCG	*sipA*
RTstu1986_3'	CTTGTTGATTCAACAACTCCAG		RTsipA_3'	AGTTGTCCTCAACTGTGC	
RTtuf_5'	TTGGTACAATCGGACACG	*tuf (tufA)*	RT1950_5'	GCCAAAGAAATGTGTCATC	*rgg 1950*
RTtuf_3'	GCGTTCACGTTCTTCTGG		RT1950_3'	AGCGTCCATCCATTCATTG	
RTpurB_5'	AATCTTGGCTGACGAAGC	*purB*	RT1511_5'	ATTGCCAGCCAAGAACTG	*rgg 1511*
RTpurB_3'	GTGAAAGCAACCACATCG		RT1511_3'	CGGCTTCTTCTTTGTCACA	
RTamiA3_5'	GTGCAACTCTAGCTGTTCG	*amiA3*	RT0917_5'	GCAGCAAACGACTTTCAG	*rgg 0917*
RTamiA3_3'	ACACCTGACCATTCATCC		RT0917_3'	TCCATACCTGACACGTTCCT	
RTgapN_5'	CTGTCTTCACACAAGACTACCC	*gapN*	RT1947.5'	TGAACGTGGCGAGTCTGA	*rgg 1947*
RTgapN_3'	GCACCAGATCCTTTAACACC		RT1947.3'	TGCCTTACTGACCCTTGCT	
RTserC_5'	CACTTCGCGAGCTTATGG	*serC*	RT0182_5'	CGAAGTGGAGGAGTTGCCTAA	*rgg 0182*
RTserC_3'	CCATGAACCACCTACAAGG		RT0182_3'	CCCAGCTCTCAATCCCAAA	
RTcarA_5'	GCTGATGTGGATGTGACG	*carA*	RTldh_5'	AATAGCAGGTTGACCGATAA	*ldh*
RTcarA_3'	CGGTTAACCCCATAGTTTCC		RTldh_3'	AAGCTATCCTTGACGATGAA	
RTmanL_5'	GTACGCTCACTTCAACAACG	*manL*	RT1044_5'	TACACACAATGGATTCAAG	*rgg 1044*
RTmanL_3'	ATCTGGGTTTTCCCTAGC		RT1044_3'	GACGGAGTTGTAGTCAATGG	
RTmurA1_5'	GGTGAGGTTGTCATTGAAGG	*murA1*	RT1572_5'	TTTCATCGTGATGATCTGAA	*rgg 1577*
RTmurA1_3'	ATATCCAAGCCACGAACC		RT1577_3'	TGTGATGAAACTTCTCTCGTT	
RTdnaN_5'	AGCCCTTCATACAACTCG	*dnaN*	RTgyrA_5'	GATGCCGTTAAATTGTTGAT	*gyrA*
RTdnaN_3'	CTTCTGAAGCAGAGATGC		RTgyrA_3'	GAGCCTTTACCAGTTTCGTA	
RTlivF_5'	AGACATCAAGGCTCAAGG	*livF*	RTsigma70_5'	GACCCAACACCTGAGCAAAT	*sigma70*
RTlivF_3'	CCAGTACCTGAAAGAACC		RTsigma70_3'	CCAAATGGCTGTCATCCTCT	
RTmurE_5'	TTGTGCCAGAGCAAATCAAAG	*murE*			
RTmurE_3'	GGCTAGCTCCAACTGGATTC				

Les réactions de qPCR sont réalisées à l'aide de l'appareil CFX96 (Bio-Rad) dans des microplaques (Multiplate™ 96-Well Unskirted PCR Plates, Low-Profil Bio-Rad) recouvertes d'un film Microseal 'B' Adhesive Seals (Bio-Rad). Le mélange réactionnel est composé de 5 µL de SYBR

Green Supermix (Bio-Rad), 0,3 µM de chaque amorces et 1 µL d'ADNc dilué au 1/10ème. La qPCR est réalisé par un cycle de dénaturation de 3 min à 98°C suivi d'un cycle, répété 40 fois, composé d'une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 s et d'une étape d'hybridation/élongation à 58°C pendant 45 s. Afin de vérifier que l'amplification des ADNc ne génère pas de produits secondaires, des courbes de fusions sont réalisées de 55 à 95°C, avec une augmentation de 0,5°C toutes les 10 s.

Par ailleurs, l'efficacité des couples d'amorces est vérifiée par qPCR en utilisant une série de dilution d'ADN correspondant à l'amplicon obtenu par PCR classique avec les amorces à vérifier et dont la concentration est connue. L'efficacité de l'ensemble des couples d'amorces utilisés pour les expériences de qPCR est comprise entre 95 et 105%. L'analyse des résultats de qPCR est réalisée à l'aide du logiciel CFX96 manager software (Bio-Rad) et la détermination des Cq est calculée par le mode régression du logiciel.

3. Manipulations biochimiques

3.1. Surproduction et purification de protéines à partir d'*E. coli*

3.1.1. Production de protéines chez *E. coli*

La souche transformée par le plasmide d'intérêt est ensemencée au 1/20ème à partir de la pré-culture approprié dans du milieu LB puis est incubée à 37°C sous agitation. La production de protéines est induite sur des cellules en phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} =0,5) par l'ajout d'IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) à une concentration finale de 1 mM.

3.1.2. Lyse des cellules pour la purification de protéines

Les cellules ayant synthétisées la protéine d'intérêt sont reprises dans du tampon de lyse (Sodium phosphate 50 mM pH 8, NaCl à 300 mM, imidazole à 10mM), puis sont congelées à - 20°C pendant 15 h afin de fragiliser leur paroi. Elles sont ensuite lysées par sonication (15 min par périodes de 30 s de sonication et 30 s de repos, à l'aide du Bioruptor). Le lysat cellulaire est centrifugé pendant 30 min à 14 000 rpm à 4°C. La phase soluble (FS pour Fraction Soluble) correspond au surnageant et la phase insoluble (FI pour Fraction Insoluble) correspond au culot contenant les protéines de paroi et de la membrane cellulaire. Ce dernier est repris dans un volume restreint de tampon de lyse. Les différentes fractions sont conservées à - 20°C.

3.1.3. Purification de protéine par IMAC (Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography)

La purification des protéines marquées avec une queue histidine s'est réalisée de deux manières. Dans les deux cas, la purification s'est faite par chromatographie d'affinité sur ion

métallique immobilisé (IMAC), à l'aide d'ion nickel permettant la liaison à la protéine contenant des histidines. Cette technique est réalisée à partir de la FS.

La première méthode consiste à charger la FS sur une colonne de chromatographie d'affinité chargée au nickel équilibrée avec du tampon de lyse (Sodium phosphate à 50 mM pH 8, NaCl à 300 m, imidazole à 10mM). La colonne de chromatographie est ensuite lavée avec du tampon de lyse. Quand l'absorbance à 280 nm est redescendu au niveau de zéro, la protéine recombinante est éluée par du tampon d'élution (50 mM phosphate sodium pH 8, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole). L'imidazole est une molécule qui entre en compétition avec la protéine d'intérêt pour la fixation aux ions nickel. La fraction d'élution est collectée et concentrée dans du tampon Tris EDTA pH 8.

La seconde méthode consiste à utiliser du gel contenant 6% d'agarose perlé chargé au nickel (His-select Nickel Affinity gel, Sigma). La fraction protéique soluble est mise en contact avec le gel équilibré avec du tampon de lyse. Après 1 h d'incubation à 4°C sous agitation, le mélange est centrifugé 30 s à 10 000 rpm à 4°C. Le surnageant est éliminé (correspondant à la fraction appelée PT). Le gel est ensuite lavé à trois reprises avec du tampon de lyse (correspondant aux fractions L). Après le lavage du gel, la protéine recombinante marquée par des histidines est éluée dans un volume restreint de tampon d'élution.

La pureté de la protéine étiquetée hexa-histidine est confirmée par SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis). La concentration de la protéine éluée est estimée l'aide d'un spectrophotomètre mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 280 nm (NanoDrop-1000).

3.2. Gels d'électrophorèse en polyacrylamide (PAGE)

Les gels de polyacrylamide sont composés de deux gels : un gel de concentration (polyacrylamide 4% p/v) et un gel de séparation (polyacrylamide 12% p/v). Les extraits protéiques sont mélangés pour moitié avec du tampon de dénaturation/dépôt (glycérol 20%, Tris-base 60 mM, SDS 2%, bleu de bromophénol 0,01%, β-mercaptoéthanol 0,5%), puis sont dénaturés (98°C, 10 min) avant d'être déposés sur gel. Après migration (150 V), les protéines sont révélées par incubation du gel de séparation pendant 20 min dans une solution de coloration au bleu de coomassie (acide acétique 10%, éthanol 45%, bleu de coomassie 2,75%) puis pendant 2 h dans une solution de décoloration (acide acétique 7,5%, éthanol 5%). L'acquisition de l'image est réalisée soit à partir d'un scanner (Canon) soit à l'aide de l'appareil Chemidoc (Biorad) et au logiciel Quantity One (Biorad).

3.3. Western blot

Les protéines ayant au préalable migrées en SDS-PAGE ont été transférées sur une membrane de polyvinyl de fluor (Roche), précédemment activée par incubation de 10 min dans du méthanol, grâce au dispositif Mini Transfer Blot (Biorad). Le transfert s'effectue pendant 1 h à 400 mA à l'aide d'une solution de transfert (Tris base 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20%). Les protéines sont ensuite révélées par 5 min d'incubation de la membrane dans une solution de rouge Ponceau (Ponceau S 0,5%, acide acétique 0,1%). L'excès de Rouge Ponceau est éliminé par lavage de la membrane dans une solution d'acide acétique à 5% (v/v) pendant 20 min. L'acquisition de l'image de la membrane s'effectue grâce à un scanner (Canon).

La membrane est ensuite incubée pendant 1 h dans du tampon de blocage (Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, Twin 20 0,1%, Lait écrémé 5%), puis 1 h en présence de l'anticorps anti-penta-histidine (Anti-His Antibody, Qiagen). Après trois lavage avec du TBS-T (Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, Twin 20 0,1%), elle est incubée avec l'anticorps secondaire (Blotting grade affinity purified goat anti-mouse IgG (H+L) horseradish peroxidase conjugate -Biorad) selon les recommandations du fournisseur. La révélation se fait par chimioluminescence à l'aide de l'appareil Chemidoc (Biorad) et au logiciel Quantity One (Biorad).

3.4. Expériences de retard de migration sur gel d'électrophorèse

Les régions promotrices des gènes d'intérêt sont amplifiées par PCR haute-fidélité à l'aide des amorces appropriées à partir de l'ADNg de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* puis sont marquées à la biotine à l'aide du kit « Biotin 3' end DNA labeling kit » (Thermo Scientific) selon les recommandations du fournisseur. L'efficacité du marquage est vérifiée par dépôt d'1 µL de sonde marquée sur une membrane de nylon N+ (Amersham) fixé aux UV_{254nm} pendant 1 min. La membrane est ensuite révélée à l'aide du kit « Chemiluminescent nucleic acid detection module » (Thermo Scientific) selon les recommandations du fournisseur.

Les expériences d'EMSA (DNA electrophoretic mobility shift assay) sont réalisées à l'aide du kit « LightShift Chemiluminescent EMSAKit » (Thermo Scientific). Brièvement, 0,1 pmol de sonde marquée à la biotine est mélangé à 2 pmol de protéine purifiée dans du tampon 1x (Binding buffer : 100 mM Tris, 500 mM KCL, 10 mM dithiothréitol, pH 7,5) puis incubée 20 min à 25°C. Du tampon de charge est ajouté au mélange avant le dépôt sur le gel de polyacrylamide 5%. La migration est effectuée à 100 V dans un tampon TBE 0,5x durant environ 1 h. Puis l'ADN est transféré sur une membrane de nylon N+ (Amersham) à 400 mA pendant 30 min dans un tampon TBE 0,5x grâce à l'utilisation d'un dispositif Mini Transfer Blot (Biorad) et fixé par exposition d'1 min aux rayonnements UV_{254nm}.

La révélation de l'ADN marqué à la biotine sur la membrane est effectuée à l'aide du kit « Chemiluminescent nucleic acid detection module » (Thermo Scientific) selon les recommandations du fournisseur en utilisant l'appareil Chemi-Doc (Bio-Rad).

3.5. Extraction de protéines issues de *S. thermophilus*

Les protéines de *S. thermophilus* sont extraites à partir de cellules en début de phase stationnaire de croissance (10 h) cultivées en milieu MCD dans un volume de 50 mL et incubées à 30°C sans agitation. Avant extraction de leur protéines, les cellules sont lavées avec du tampon phosphate de sodium (0,2 M, pH 6,4) puis reprises dans du tampon $NaPO_4$ (20 mM, pH 6,4), TBP (pour tributylphosphine, 10 mM), cocktail d'inhibiteur (1/20) et catalase (1/40000) de façon à avoir une DO_{600nm} de 40. Elles sont ensuite lysées par sonication (15 min par périodes de 30 s de sonication et 30 s de repos, à l'aide du Bioruptor). Le lysat est centrifugé 1 h à 14 000 rpm à 4°C afin de séparer la FS de la FI. Les protéines issues de la FS sont dosées par la méthode de Bradford (Bradford 1976).

3.6. Spectrométrie de masse LC-MS/MS

Les expériences de spectrométrie de masse ont été réalisées par la plateforme PAPPSO de l'INRA de Jouy en Josas.

Pour ce faire, 10 µg de protéines issues des souches LMG18311 et Δrgg_{0182} de *S. thermophilus* sont séparées en fonction de leur taille à l'aide d'un gel SDS-PAGE concentré à 12% de polyacrylamide. Chaque piste du gel d'acrylamide est découpée en 24 fragments de 2 mm qui sont lavés deux fois avec une solution d'acétonitrile (50%) et de carbonate d'ammonium (25 mM). Les cystéines sont réduites dans du DTT (10 mM) puis alkylées dans une solution de iodoacétamide (55 mM). Les échantillons sont ensuite lavés avec de l'acétonitrile puis sont séchés sous vide. Les protéines présentes dans l'échantillon sont digérées par 100 ng de trypsine dissoute dans du NH_4CO_3 (25 nM). Les peptides issus de la digestion trypsidique sont extraits avec une solution d'acétonitrile (50%) et de trifluoroacétique (0,5%).

L'analyse LC-MS/MS est réalisée par le système Ultimate 3000 LC (Dionex) connecté à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Discovery (Thermo Fisher). Les peptides sont injectés dans une colonne de séparation Pepmap C18 (0.075 x 15cm, 100Å, 3 µm) puis sont élués avec un gradient linéaire de 2 à 36% de tampon B (acétonitrile 80%, acide formique 0.1%) dans du tampon A (acétonitrile 2%, acide formique 0.1%) à raison de 300 L/min pendant 50 min. Les fractions obtenues sont analysées par MS/MS. Les données sont ensuite comparées à la base de données des protéines de *S. thermophilus* LMG18311 (Uniprot, 13/12/2011) en utilisant le logiciel X!Tandem (http://www.thegpm.org). Les protéines sont identifiées par la présence d'au moins deux peptides la composant et présentant une E-value inférieure à 4.

4. Analyses phénotypiques

4.1. Mesure de Luminescence

Les suivis de luminescence sont réalisés selon deux méthodes.

La première méthode, utilisée pour les premières expériences de suivi de luminescence réalisées dans ces travaux, est effectuée manuellement. Un volume de 1 mL de culture ensemencée à DO_{600nm} = 0,05 avec la pré-culture appropriée est prélevé à des intervalles réguliers durant la croissance jusqu'en phase stationnaire. La DO_{600nm} est mesurée puis 10 µL de nonyl-aldehyde 0,1% sont ajoutés à l'échantillon et la luminescence est ensuite mesurée avec le Luminoskan TL (Labsystems). Les résultats sont rapportés à la luminescence relative divisée par la DO_{600nm}.

La seconde méthode utilise des microplaques de 96 puits (blanche à fond plat et transparent, Greiner bio-one) qui sont lues par un lecteur automatique (Biotek). Ainsi, 250 µL de culture en milieu MCD, ensemencée à DO_{600nm} = 0,05 à partir de la pré-culture appropriée, sont déposés par puits. Ensuite, 50 µL de nonyl-aldhéhyde concentré à 1% sont déposés dans chaque espace inter-puits de la plaque. La plaque est ensuite incubée dans le lecteur Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (Biotek) à 30°C pendant 10 h avec une mesure toutes les 10 min précédée d'une agitation de type médium pendant 5 s. Ce lecteur permet une mesure simultanée de la $DO_{600\ nm}$ et de la luminescence (sensibilité de 120).

4.2. Test de survie au stress chaud

Les cellules de *S. thermophilus* sont cultivées jusqu'en phase stationnaire en milieu MCD à 30°C sans agitation. Elles sont ensuite lavées deux fois avec du tampon phosphate 10 mM à pH 7 puis elles sont resuspendues à une concentration finale correspondant à 1 unité de DO_{600nm}. Pour le test de stress chaud, les cellules sont traitées par une incubation à 52°C pendant 15, 30, 45 ou 60 min (condition de stress chaud) ou non (condition contrôle). Les suspensions cellulaires sont alors diluées aux concentrations appropriées puis étalées sur milieu LM17 gélosé et incubées sur la nuit à 42°C en condition d'anaérobiose. Le pourcentage de survie a été calculé par la formule suivante : $N/N_0 \times 100$, où N_0 est le nombre d'UFC (Unité Formant Colonie) de la condition contrôle et N le nombre d'UFC de la condition de stress chaud.

4.3. Cinétique de croissance

Les cinétiques de croissance sont réalisées selon trois méthodes.

La première méthode consiste en l'utilisation du spectrophotomètre-incubateur de microplaques Bioscreen C. Les cultures sont ensemencées à une DO_{600nm} initiale de 0,1, à partir de

la pré-culture appropriée, et 350 µL ont été déposés par puits. Ensuite, 50 µL d'huile stérile sont ajoutés dans chaque puits afin de placer les cultures en conditions anaérobie. La plaque est ensuite placée dans le lecteur Bioscreen C durant 20 h à la température souhaitée. Une lecture de la DO_{600nm} est réalisée toutes les 15 min précédée d'une agitation d'amplitude moyenne pendant 20 s afin d'homogénéiser la culture.

La seconde méthode de suivi de croissance consiste en un suivi manuel de la densité optique. Les cultures sont ensemencé à DO_{600nm} = 0,1, à partir de la pré-culture appropriée, puis sont réparties dans différents tubes (tube de 5, 10 ou 50 mL). A intervalle régulier, un tube est sacrifié et la DO_{600nm} est mesurée à l'aide du spectrophotomètre SmartSpec 3000 (Biorad).

La troisième méthode de suivi de croissance concerne le suivi de culture en milieu lait et se fait par un suivi d'acidification couplé à un dénombrement cellulaire. Pour cela, les cultures sont ensemencées au 1/500ème puis réparties dans différents tubes. Elles sont ensuite incubées à la température souhaitée. A chaque mesure, un tube est utilisé. Celui-ci est vortexé pendant 3 min. Une partie de la culture sert à la mesure du pH à l'aide du pH-mètre CyberScan 500 pH (Eutech Instruments). La seconde partie est étalée sur milieu LM17 gélosé après dilution dans de l'eau peptonée (peptone 10 g/L, NaCL 5 g/L, pH 7,2) à la concentration appropriée, à l'aide de l'appareil EasySpiral (Interscience). Les boites sont ensuite incubées à 42°C en condition anaérobie sur la nuit. Le nombre d'UFC est ensuite calculé après dénombrement des colonies.

4.4. Analyse morphologique des cellules de *S. thermophilus*

4.4.1. Dénombrement du nombre de cellules par chaine de *S. thermophilus*

Les cellules de *S. thermophilus* sont observées à l'aide du microscope photonique Nikon OPTIPHOT en contraste de phase avec l'objectif x 100 avec le condenseur en position Ph4 (soit un grossissement final x 1000). Le nombre de cellules par chaines est évalué à partir du comptage d'au moins 1000 cellules de trois cultures indépendantes.

4.4.2. Microscopie à force atomique (AFM)

Les expériences d'AFM ont été réalisées au Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, LCPME, UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine de Villèrs-les-Nancy.

Les mesures d'AFM, permettant de réaliser de l'imagerie cellulaire et de calculer des forces d'adhésion de surfaces biotiques ou abiotiques, sont obtenues à l'aide du microscope à force atomique MFP3D-BIO (Asylum Research Technology). Pour obtenir ces mesures, une pointe AFM scanne la surface de l'échantillon à analyser. Les pointes AFM utilisées sont en nitrure de silicium (MLCT-AUNM, Bruker Nano AXS).

Les images AFM sont réalisées à température ambiante pour les suspensions bactériennes, préalablement immobilisées sur une surface en verre recouverte de PEI (Polyethyleneimine). La morphologie cellulaire des bactéries est analysée sur 10 cellules, à la température étudiée, à l'aide du logiciel MFP3D software (Atomic Force F&E GmbH). La hauteur de l'image AFM a été aplatie par l'utilisation de deux filtres avant l'évaluation de la rugosité de surface.

Les mesures de forces d'interaction sont mesurées par la technique de la microscopie de force chimique (CFM) utilisant l'AFM. Pour réaliser cette technique, la pointe AFM est modifiée en fonction de la mesure souhaitée, l'hydrophobicité dans le cas présent. Concernant les mesures réalisées sur les surfaces cellulaires, les pointes AFM sont incubées 2 h en présence des cellules d'intérêt à la température souhaitée. Elles sont ensuite lavées trois fois avec de l'eau milli-Q. Les mesures de CFM sont ensuite réalisées dans du tampon PBS (NaCl à 137 mM, KCl à 2,7 mM, Na_2HPO_4 à 10 mM, KH_2PO_4 à 1,76 mM, pH 7,4) à 42 et 50°C pour le suivi des forces d'adhésion, entre la surface hydrophobe de référence (constituée de 1-dodecanethiol) et la pointe AFM (recouverte des cellules bactériennes). L'hydrophobicité des surfaces abiotiques (puits des microplaques, tube de 50 mL) est évaluée par la mesure de leur force d'interaction avec une pointe AFM couverte de 1-dodecanethiol hydrophobe par CFM. La moyenne des valeurs de forces d'adhésion est obtenue par l'analyse de 5 images (composées de 1024 points/pixels) obtenues par CFM.

Résultats

Résultats

1. La protéine Rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 est un régulateur transcriptionnel impliqué dans un mécanisme de quorum sensing

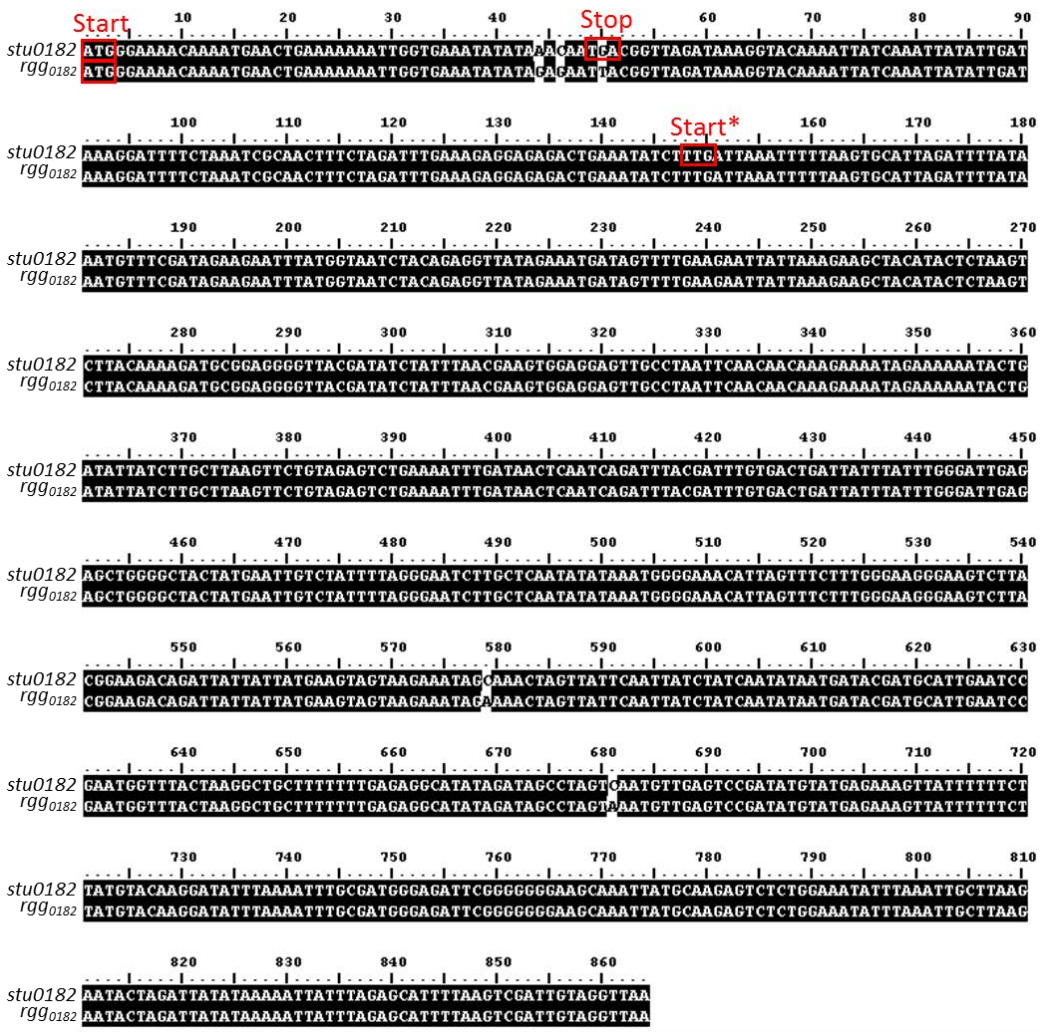
S. thermophilus est une espèce bactérienne qui a la particularité de posséder au sein de son génome 7 copies de gène codant des régulateurs transcriptionnels de la famille Rgg. Sachant que cette bactérie évolue majoritairement par perte de fonction (Bolotin *et al.,* 2004), la présence d'un si grand nombre de gène *rgg* suggère que ces gènes sont importants pour la vie de la cellule et pose la question de leur rôle chez cette espèce. Des données préliminaires obtenues au laboratoire avant le commencement de ces travaux de thèse mettent en évidence un phénotype de courtes chaines pour une souche de *S. thermophilus* LMG18311 délétée du gène rgg_{0182} (*rggSt1*). Ceci suggère que le gène rgg_{0182} de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* serait impliqué dans la morphologie cellulaire (Henry 2011). Ainsi, l'étude de la famille des régulateurs transcriptionnels Rgg de *S. thermophilus* LMG18311 s'est axée sur la protéine Rgg_{0182}.

Une partie des résultats présentés dans les parties 1.1 et 1.2 ont été publiés dans BMC microbiology en 2011 (11:223) : **The rgg_{0182} gene encodes a transcriptional regulator required for the full *Streptococcus thermophilus* LMG18311 thermal adaptation**. Romain Henry, Emmanuelle Bruneau, Rozenn Gardan, Stéphane Bertin, Betty Fleuchot, Bernard Decaris and Nathalie Leblond-Bourget (Annexe 1).

1.1. Caractérisation du locus rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311

1.1.1. Analyse de la séquence du gène rgg_{0182}

Le gène rgg_{0182} a été séquencé à l'aide des amorces EB1 et EB2. La séquence obtenue diffère de celle présente sur le génome de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* telle qu'annotée dans les banques de données, appelée *stu0182* (Bolotin *et al.,* 2004) (Figure 19).



<u>Figure 19 :</u> Alignement des séquences nucléotidiques des ORF *stu0182* et *rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus* LMG18311. La séquence *stu0182* a été obtenue lors du séquençage complet de la souche LMG18311 (Bolotin *et al.,* 2004). La séquence *rgg$_{0182}$* a été obtenue lors de ce travail. Le sigle « Start* » correspond au codon d'initiation de la traduction annoté dans les banques de données.

La présence de 5 substitutions a pu être observée aux positions 44, 46, 50, 579 et 681. Celle en position 50 engendre un codon stop dû à la présence d'une guanine dans la séquence *stu0182*. Cela conduit à considérer le codon annoté « start* » comme le codon d'initiation de traduction de la protéine Stu0182 (Bolotin *et al.,* 2004). Les deux ORF *stu0182* et *rgg$_{0182}$* différent donc par une troncature de 147 nt au début du gène *stu0182*. Le gène *rgg$_{0182}$* a une taille de 864 pb et code une protéine putative de 287 aa avec une masse moléculaire prédite de 33,6 kDa. Le produit du gène *rgg$_{0182}$* possède les deux domaines caractéristiques des protéines de la famille Rgg (Henry 2011) : le domaine HTH est situé dans la partie N-terminale de la protéine entre la glycine en position 11 et celle en position 73 ; le domaine médian est constitué des aa situés entre la tyrosine en position 145 et l'asparagine en position 162 (Figure 20).

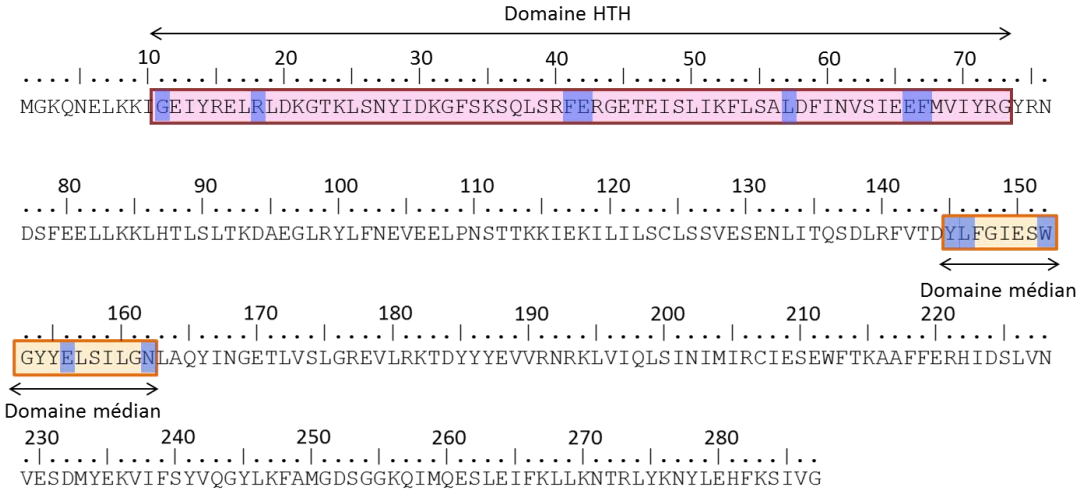


Figure 20 : Séquence primaire de la protéine Rgg_{0182}. Les acides aminés constituant le domaine HTH-XRE, tel qu'annoté dans les bases de données, sont encadrés sur fond rose. Les acides aminés constituant le domaine médian sont encadrés sur fond jaune. Les résidus conservés dans plus de 80% des 499 séquences primaires de protéines Rgg analysées par Henry (2011) apparaissent sur fond bleu.

La séquence nucléotidique du gène *rgg_{0182}* présente une identité de 100% avec celle du gène *str0182* de la souche CNRZ1066 de *S. thermophilus*. L'homologie de ces deux gènes et les divergences observées avec l'allèle *stu0182* de la souche LMG18311 annoté dans les bases de données a conduit à vérifier la nature de la souche utilisée. Pour cela, la région variable du gène *cse*, spécifique à chaque souche (Borges *et al.,* 2005), a été amplifiée par PCR à partir de l'ADNg de *S. thermophilus* LMG18311 à l'aide des amorces var-cse for et var-cse rev. Le produit obtenu a été digéré par l'enzyme de restriction *Nhe*I. Le profil électrophorétique obtenu est présenté sur la figure 21.

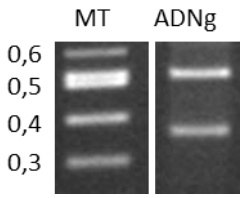


Figure 21 : Profil de restriction obtenu après digestion, par l'enzyme de restriction *Nhe*I, de l'amplicon de la région variable du gène *cse* de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*. MT = marqueur de taille. ADNg indique que la PCR a été réalisée avec pour matrice l'ADNg de la souche LMG18311.

La digestion de la région variable du gène *cse* de la souche LMG18311 du laboratoire conduit à l'obtention de 2 fragments (520 et 354 pb) compatibles avec ceux attendus alors que 3 fragments auraient été obtenus (383, 276 et 213 pb) par digestion de l'allèle *cse* de la souche CNRZ1066. La séquence du gène *rgg_{0182}* de la souche *S. thermophilus* LMG18311 du laboratoire a été soumise dans les banques de données sous le numéro d'accession : GenBank JF699754.

1.1.2. Similarité de l'environnement génétique des gènes *rgg$_{0182}$* et *rgg1358*

Le gène *rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus* LMG18311 est encadré par deux ORF codant des petits peptides. Ces ORF sont non annotées sur le génome de la souche LMG18311 mais ont été révélées par des analyses réalisées avec le logiciel bactageneSHOW permettant de détecter de petites ORF (Ibrahim *et al.,* 2007). Le premier est l'ORF *shp$_{0182}$* de 63 pb qui coderait un petit peptide hydrophobe appartenant au groupe I de la famille SHP (Ibrahim *et al.,* 2007). Le second est l'ORF *pep$_{0182}$* de 42 pb qui coderait un petit peptide ne possédant aucune homologie avec les peptides présents dans les banques de données. L'environnement génétique du gène *rgg$_{0182}$* présente des similarités avec celui du gène *rgg1358* de la souche LMD-9 de *S. thermophilus* (Ibrahim *et al.,* 2007 ; Fleuchot *et al.,* 2011). La comparaison de ces deux environnements génétiques est présentée dans la figure 22.

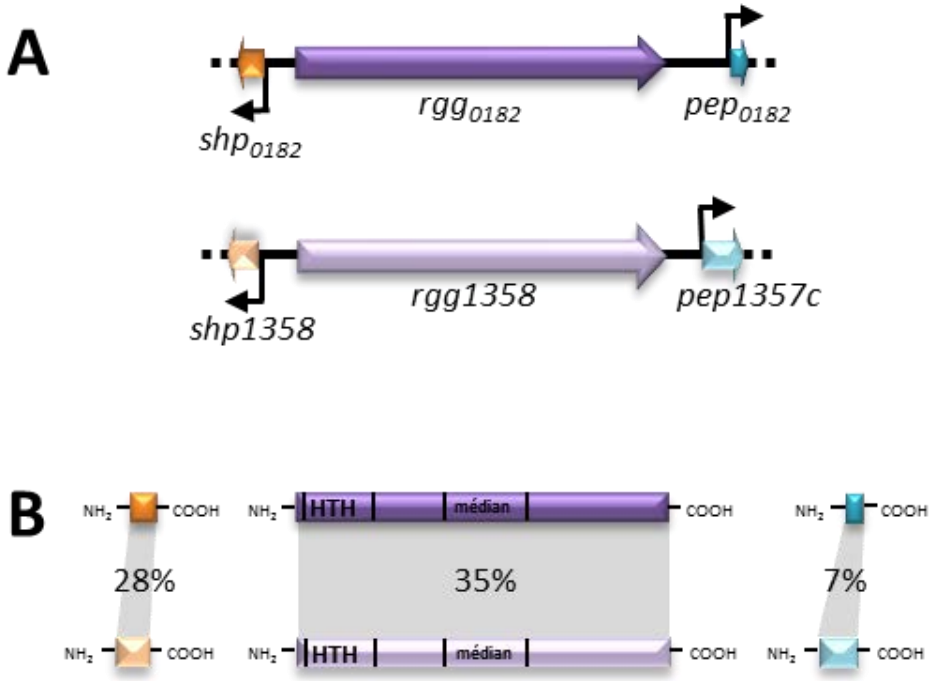


Figure 22 : Représentation schématique des loci *rgg$_{0182}$* de la souche LMG18311 et *rgg1358* de la souche LMD9 de *S. thermophilus* (A) et des protéines correspondantes (B). Les gènes sont représentés par des flèches et les protéines par des rectangles. Les flèches cassées indiquent les promoteurs. L'identité entre les séquences primaires des protéines est indiquée en pourcentage.

Bien que les deux loci présentent une organisation génétique similaire, les protéines qu'ils codent présentent un faible pourcentage d'identité (SHP 28%, Rgg 35% et Pep 7%) (Figure 22) et leur protéine SHP ne sont pas classées dans les mêmes groupes (SHP1358 appartient au groupe I et Shp$_{0182}$ au groupe II) tels que définis par Ibrahim *et al* (2007).

1.2. Le gène *rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus* LMG18311 code un régulateur transcriptionnel

1.2.1. Implication du gène *rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus* LMG18311 dans la transcription des gènes adjacents

Les données de la littérature indiquent que les gènes de la famille *rgg* codent des régulateurs transcriptionnels qui, dans la plupart des cas, régulent la transcription de gènes qui leur sont adjacents (Sulavik *et al.,* 1992 ; Lyon *et al.,* 1998 ; Sanders *et al.,* 1998 ; Qi *et al.,* 1999 ; Fujiwara *et al.,* 2000 ; Skaugen *et al.,* 2002 ; Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,* 2011). Ainsi la protéine Rgg$_{0182}$ pourrait réguler la transcription des gènes *shp$_{0182}$* et *pep$_{0182}$* qui lui sont adjacents sur le génome. Comme ces deux ORF sont de petites tailles, une analyse transcriptionnelle comparative entre les souches sauvage et délétée du gène *rgg$_{0182}$*, appelé Δ*rgg$_{0182}$*, n'a pas pu être réalisée par PCR quantitative. Une stratégie alternative consistant en l'étude de l'activité des promoteurs des gènes *shp$_{0182}$* et *pep$_{0182}$* à l'aide de fusions transcriptionnelles, dans des contextes sauvage et Δ*rgg$_{0182}$*, a été choisie. Pour cela, des plasmides portant le promoteur des gènes *shp$_{0182}$* et *pep$_{0182}$* en amont des gènes *luxAB*, codant la luciférase, ont été construits et intégrés au niveau de l'opéron *blp* des génomes des souches LMG18311 et Δ*rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus*. Ainsi, 4 souches ont été obtenues et ont été appelées LMG18311 blp::P*pep$_{0182}$-luxAB*, LMG18311 *blp*::P*shp$_{0182}$-luxAB*, Δ*rgg$_{0182}$ blp*::P*pep$_{0182}$-luxAB* et Δ*rgg$_{0182}$ blp*::P*shp$_{0182}$-luxAB*. Le niveau relatif de l'activité du promoteur des gènes *shp$_{0182}$* et *pep$_{0182}$* a ensuite été déterminé par mesure de luminescence dans différentes conditions. Lors d'une croissance en milieu LM17 à 30 et à 42°C, pas ou peu d'activité luciférase n'a été détectée dans les contextes sauvage et mutant pour les deux types de constructions (Figure 23). Ainsi, dans ces conditions, les promoteurs des gènes *shp$_{0182}$* et *pep$_{0182}$* sont inactifs, suggérant que ces gènes ne sont pas transcrits.

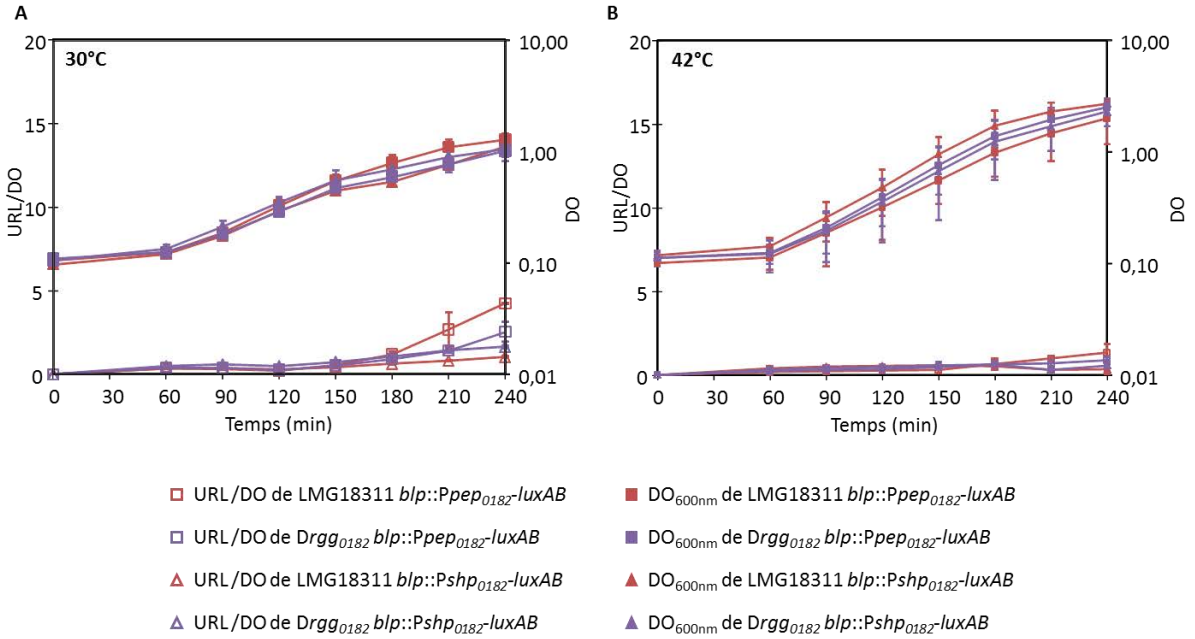


Figure 23 : Cinétique de croissance et de l'activité luciférase des souches LMG18311 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus*, contenant les fusions transcriptionnelles appelées P*pep*$_{0182}$-*luxAB* et P*shp*$_{0182}$-*luxAB*, en milieu LM17. L'expression des fusions a été réalisée sur des cellules cultivées en milieu LM17 à 30°C (A) et à 42°C (B). Les résultats correspondent à la moyenne ± la déviation standard de trois expériences indépendantes. DO : Densité Optique ; URL : Unité Relative de la Luminescence normalisée par la DO à 600nm.

Au contraire, lors d'une croissance réalisée en milieu MCD, une activité luciférase est détectée à 30 et à 42°C pour toutes les souches étudiées (figure 24).

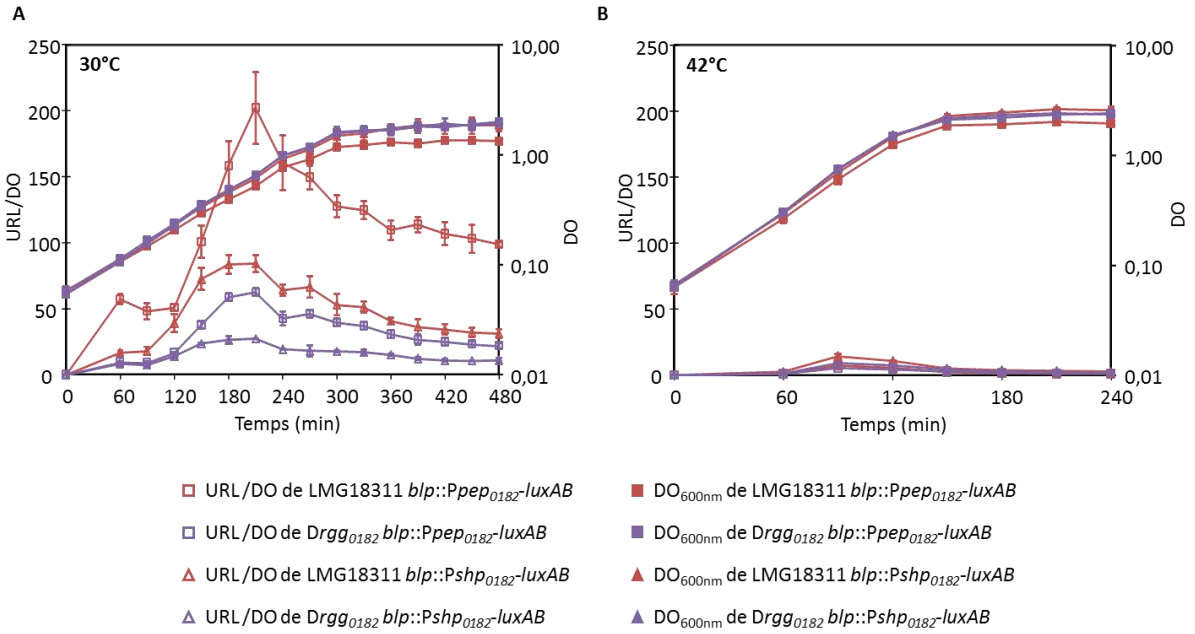


Figure 24 : Cinétique de croissance et de l'activité luciférase des souches LMG18311 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus*, contenant les fusions transcriptionnelles appelées P*pep*$_{0182}$-*luxAB* et P*shp*$_{0182}$-*luxAB*, en milieu MCD. L'expression des fusions a été réalisée sur des cellules cultivées en milieu LM17 à 30°C (A) et à 42°C (B). Les résultats correspondent à la moyenne ± la déviation standard de trois expériences indépendantes. DO : Densité Optique ; URL : Unité Relative de la Luminescence normalisée par la DO à 600nm.

Quelles que soient les souches étudiées, l'activité des promoteurs des gènes *pep*$_{0182}$ et *shp*$_{0182}$ est plus élevée à 30°C qu'à 42°C. Le maximum d'activité des fusions P*pep*$_{0182}$-*luxAB* et P*shp*$_{0182}$-*luxAB* est respectivement 28 et 6 fois supérieur à 30°C qu'à 42°C ($p < 0,001$). De plus, l'activité luciférase de ces fusions transcriptionnelles diffère entre les souches LMG18311 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus*. En effet, lorsque les cellules sont cultivées en milieu MCD à 30°C, le maximum d'activité est trois fois moins important dans le contexte mutant que le contexte sauvage ($p < 0,001$) pour les deux constructions. Ces résultats démontrent ainsi que le gène *rgg*$_{0182}$ joue un rôle dans la régulation de la transcription des gènes *shp*$_{0182}$ et *pep*$_{0182}$.

Par ailleurs, aucune différence de croissance n'est observée entre les souches LMG18311 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* lors d'une culture en milieu LM17 ou MCD à 30°C ou 42°C. En effet, les souches Δ*rgg*$_{0182}$ et LMG18311 de *S. thermophilus* présentent des paramètres de croissance (taux de croissance spécifique et biomasse finale) similaires. Ainsi, le gène *rgg*$_{0182}$ ne semble pas impliqué dans la croissance de *S. thermophilus* LMG18311 dans les conditions testées.

1.2.2. Fixation de la protéine Rgg$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311 sur la région promotrice de ses gènes cibles

Les résultats précédents, ainsi que la présence d'un motif HTH dans la région N-terminale de la protéine Rgg$_{0182}$ suggèrent qu'elle puisse réguler l'activité transcriptionnelle des promoteurs P*shp*$_{0182}$ et P*pep*$_{0182}$ en se fixant sur l'ADN de leur région promotrice. Pour tester cette hypothèse, la fixation de la protéine Rgg$_{0182}$ à l'ADN des régions promotrices des gènes *shp*$_{0182}$ et *pep*$_{0182}$ a été étudiée à l'aide d'expériences de retard de migration sur gel d'électrophorèse.

1.2.2.1. Production de la protéine Rgg$_{0182}$

Afin d'étudier la fixation de la protéine Rgg$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311 à l'ADN, la production de la protéine Rgg$_{0182}$ a tout d'abord été nécessaire. Pour cela plusieurs stratégies ont été mises en place pour l'obtention de protéines Rgg$_{0182}$ recombinantes.

1.2.2.1.1. Construction de plasmides permettant la production des protéines Rgg$_{0182}$ et Rgg$_{1947}$

La production de la protéine Rgg$_{0182}$ a été réalisée dans le but d'étudier, d'une part, sa capacité de fixation à l'ADN et, d'autre part, sa structure tridimensionnelle par cristallographie. Parallèlement, la surproduction de la protéine Rgg$_{1947}$ (RggSt6) a été réalisée. En effet, l'étude de la protéine Rgg$_{1947}$ semble également intéressante car le gène *rgg*$_{1947}$ et le gène *rgg*$_{0182}$ possède un environnement génétique similaire, avec la présence au niveau de leurs loci d'un gène *stk* codant une kinase à sérine-thréonine ainsi qu'un gène codant un transporteur transmembranaire de type ABC. Toutefois, le locus *rgg*$_{1947}$ ne possède pas de gène *shp* dans son environnement génétique proche (Figure 25).

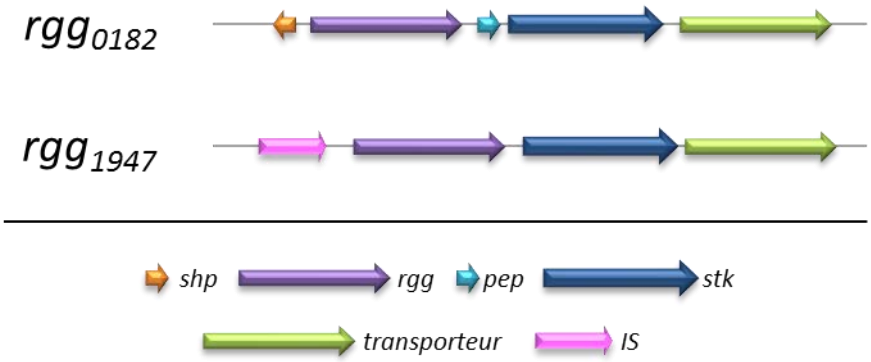


Figure 25 : Environnement génétique des loci *rgg0182* et *rgg1947* de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*. *stk* : sérine/thréonine kinase ; *IS* : Séquence d'Insertion.

L'étude tridimensionnelle d'une protéine par cristallographie nécessite un rendement de production important. Afin d'obtenir une quantité suffisante de protéine et permettre sa purification, différents vecteurs de surproduction de protéines ont été choisis : le plasmide pET28a permettant la production d'une protéine portant un marquage hexa-histidine dans la partie N-terminale de la protéine et le plasmide pET32a permettant la production d'une protéine portant un marquage hexa-histidine et thiorédoxine dans la partie N-terminale de la protéine. Au sein de ces vecteurs, l'expression du gène *rgg0182* est sous le contrôle d'un promoteur fort, T7, inductible à l'IPTG.

Le gène *rgg0182* (du codon start au codon stop, Figure 19) a été amplifié par PCR à partir de l'ADN chromosomique de *S. thermophilus* LMG18311 à l'aide des couples d'amorces EB1/EB2 pour le clonage dans le plasmide pET28a et EB4/EB2 pour le clonage dans le plasmide pET32a. Les produits de PCR obtenus, ainsi que l'ADN des plasmides, ont été digérés par les enzymes de restriction *Nde*I/*Bam*HI (produit de PCR EB1/EB2, plasmide pET28a) et *Nco*I/*Bam*HI (produit de PCR EB4/EB2, plasmide pET32a) puis ligués entre eux. Les produits de ligation ont été transformés par électroportation dans la souche DH5α d'*Escherichia coli*. Les souches portant les plasmides d'intérêt ont été sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline dans le cas du plasmide pET32a ou kanamycine dans le cas du plasmide pET28a. L'absence de mutations a été vérifiée par séquençage.

Le gène *rgg1947* a également été amplifié par PCR à partir de l'ADNg de *S. thermophilus* LMG18311 à l'aide des couples d'amorces EB5/EB6 pour le clonage dans le plasmide et pET28a et EB8/EB6 pour le clonage dans le plasmide pET32a. L'obtention des différentes constructions pour le gène *rgg1947*, et leurs vérifications, ont été réalisées de la même façon que pour celles du gène *rgg0182*.

1.2.2.1.2. Surproduction des protéines Rgg

Afin de produire les protéines Rgg_{0182} et Rgg_{1947}, plusieurs souches d'*E. coli* dites « de surproduction » (C41(DE3), BL21, rosetta, BL21 solube, BL21 pSBET) ont été transformées avec l'ADN des différents plasmides précédemment obtenus. La production des protéines d'intérêt par ces dernières a été induite par ajout d'IPTG et vérifiée par SDS-PAGE (12% d'acrylamide) (Figure 26).

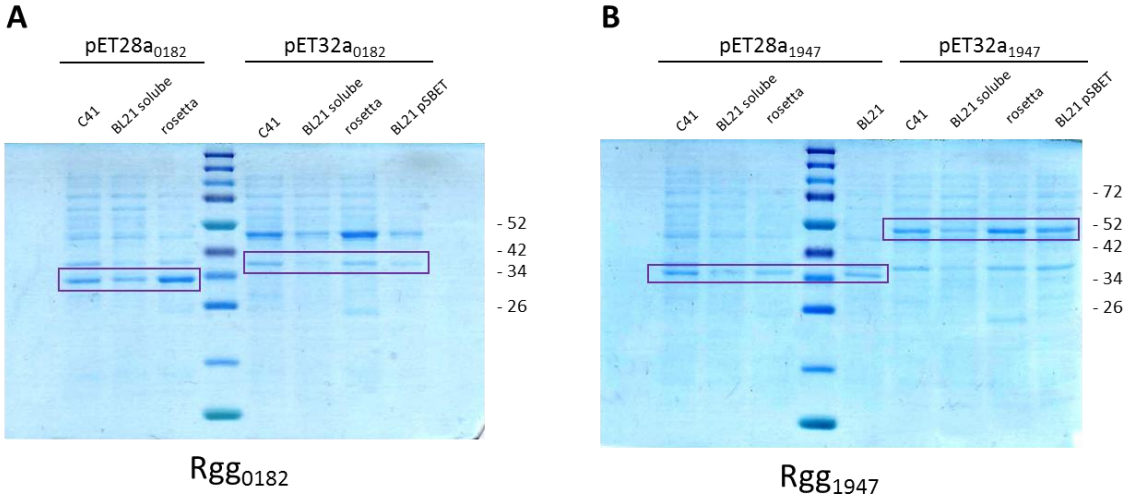


Figure 26 : SDS-PAGE des fractions protéiques issues des cultures d'*Escherichia coli* permettant la production de protéines Rgg recombinantes. Les extraits protéiques des différentes souches ont été déposés sur SDS-PAGE (12% d'acrylamide). A : Production de la protéine Rgg_{0182}. B : Production de la protéine Rgg_{1947}. Les protéines d'intéret sont encadrées par un rectangle violet. Les tailles sont indiquées en KDa.

Les protéines Rgg_{0182} et Rgg_{1947} sont produites quel que soit le vecteur et la souche d'expression. Le choix du vecteur ne semble pas influencer significativement la quantité de protéine produite. Toutefois, le choix de la souche d'expression semble affecter le rendement observé sur gel, avec un meilleur rendement chez la souche Rosetta. Les protéines recombinantes Rgg_{1947} produites sont observées aux tailles attendues (45,42 kDa avec le pET32a et 35,80 kDa avec le pET28a). Cependant, les protéines recombinantes Rgg_{0182} sont observées à des tailles légèrement inférieures à celles attendues (45,37 kDa avec le pET32a et 35,74 kDa avec le pET28a). Ceci pourrait s'expliquer par un clivage de la protéine chez *E. coli* ou par un repliement de la protéine entrainant une migration plus rapide.

1.2.2.1.3. Purification des protéines Rgg

Comme les protéines Rgg sont des régulateurs transcriptionnels, elles sont présentes au niveau du cytoplasme bactérien et devraient donc être solubles. La solubilité des protéines Rgg_{0182} et Rgg_{1947} a été évaluée par SDS-PAGE (12% d'acrylamide) (Figure 27).

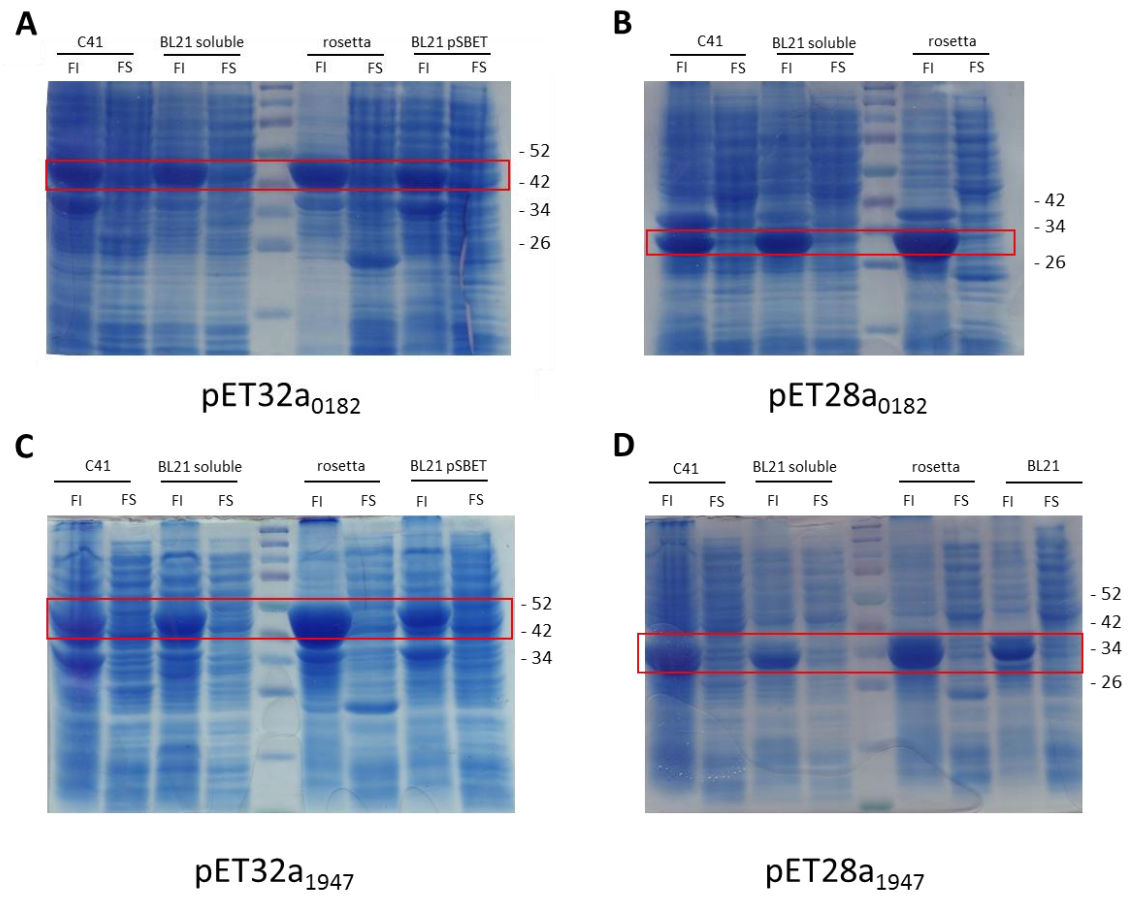


Figure 27 : Profils SDS-PAGE des fractions solubles (FS) et insolubles (FI) des extraits protéiques issues des cultures d'*E. coli* permettant la production de protéines Rgg recombinantes. Les différentes fractions obtenues ont été déposées sur SDS-PAGE (12% d'acrylamide). A : Production de la protéine Rgg_{0182} par le plasmide pET32a. B : Production de la protéine Rgg_{0182} par le plasmide pET28a. C : Production de la protéine Rgg_{1947} par le plasmide pET32a. D : Production de la protéine Rgg_{1947} par le plasmide pET28a. Les protéines d'intéret sont encadrées par un rectangle rouge. Les tailles sont indiquées en KDa.

Quelles que soient les conditions testées, les protéines Rgg_{0182} et Rgg_{1947} sont observées en faible quantité dans la FS, et en majorité dans la FI, contrairement à ce qui était attendu. Ceci peut en partie s'expliquer par une lyse cellulaire partielle. La protéine Rgg_{0182} semble être légèrement plus abondante que la protéine Rgg_{1947} dans la FS.

Un premier test de purification a été réalisé pour les deux protéines. La protéine Rgg_{0182} a été purifiée par chromatographie d'affinité aux ions métalliques immobilisés (IMAC pour Immobilized Metal Affinity Chromatography). Pour cela, les protéines solubles (correspondant à la FS) obtenue d'une culture de la souche Rosetta contenant le plasmide pET28a::*rgg_{0182}* ont été chargées dans la colonne IMAC. Après lavage des protéines non retenues, la protéine d'intérêt a été éluée. Les différentes fractions obtenues tout au long de la purification, ainsi que l'éluât contenant la protéine purifiée, ont été déposé sur SDS-PAGE (12% acrylamide) (Figure 28).

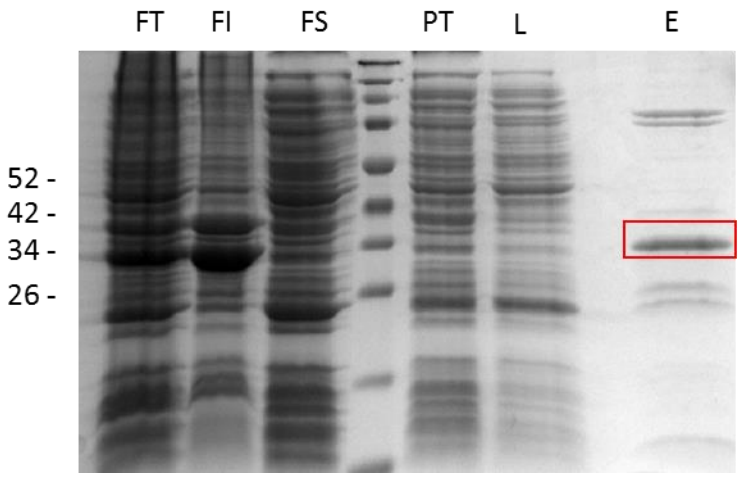


Figure 28 : Purification de la protéine Rgg_{0182} à partir de la fraction soluble d'une culture de la souche Rosetta d'*E. coli* portant le plasmide pET28a::*rgg_{0182}*. Les différentes fractions obtenues au cours de la purification ont été déposées sur SDS-PAGE (12% d'acrylamide). FT : Fraction Totale, correspondant à la culture après induction. FI : Fraction insoluble ; FS : Fraction soluble ; PT : Passe à travers, correspond à ce qui sort de la colonne après chargement de la FS ; L : lavage; E : éluât. La protéine Rgg_{0182} est encadrée par un rectangle rouge. Les tailles sont indiquées en KDa.

La protéine Rgg_{0182} semble être bien présente dans l'éluât, cependant, des contaminants retenus par la colonne IMAC sont également présents. Afin d'avoir une concentration suffisante de protéine, l'éluât a été concentré et sa présence vérifiée sur SDS-PAGE. Cette étape n'ayant pas permis d'obtenir une grande quantité de protéine Rgg_{0182} pure, un changement de stratégie consistant à utiliser un nouveau couple vecteur/souche a été décidé.

La purification de la protéine Rgg_{1947} a également été tentée. Cependant, aucune protéine n'est visible dans l'éluât après SDS-PAGE. Ainsi, l'étude de cette protéine n'a pas été poursuivie lors de ce travail.

1.2.2.1.4. Obtention de la protéine Rgg_{0182}

L'ensemble des protéines retrouvées dans la FS sont codées soit par le plasmide soit par le chromosome de la souche bactérienne utilisée. Parmi ces protéines, certaines peuvent posséder plusieurs résidus histidines adjacents, sur la chaine polypeptidique, entrainant une rétention par la colonne IMAC lors de la purification et expliquant donc la présence de contaminants dans l'éluât. Afin de s'affranchir des contaminants identifier plus tôt, le choix du vecteur et de la souche d'expression s'est porté sur le plasmide pET15b, permettant un marquage de la protéine en N-terminale par une étiquette histidine et la souche C41(DE3) d'*E. coli*.

La stratégie de construction a été la même que pour la construction du plasmide pET28a::*rgg_{0182}*, à l'exception de la sélection des souches portant le plasmide pET15b::*rgg_{0182}* qui a été réalisée sur milieu LB additionnée en ampicilline.

La production de la protéine Rgg_{0182} a ensuite été réalisée dans différentes conditions d'induction : 15 h à 16°C ou 25°C, 4 h à 30°C ou 37°C. La protéine semble plus exprimée après une induction de 4 h à 37°C. Cette condition a donc été retenue pour la suite de l'étude. La solubilité de la protéine Rgg_{0182} produite à partir du plasmide pET15b::*rgg_{0182}*, chez la souche C41(DE3) d'*E. coli*, a ensuite été testée (Figure 29 A).

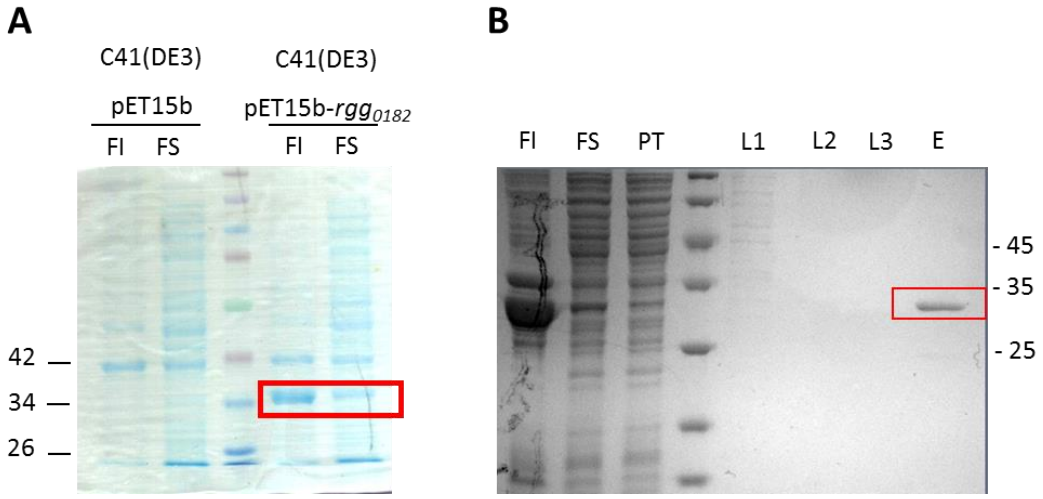


Figure 29 : Production et purification de la protéine Rgg_{0182} à partir de la fraction soluble d'une culture de la souche C41(DE3) d'*E. coli* portant le plasmide pET15b::*rgg_{0182}*. Les différentes fractions obtenues au cours de la purification ont été déposées sur SDS-PAGE (12% d'acrylamide). A : test de solubilité de la protéine Rgg_{0182}. B : purification de la protéine Rgg_{0182} par IMAC. FI : Fraction insoluble ; FS : Fraction soluble ; PT : correspond à ce qui sort de la colonne après chargement de la FS ; L 1 à 3 : lavage ; E : éluât. La protéine Rgg_{0182} est encadrée par un rectangle rouge. Les tailles sont indiquées en KDa.

La protéine Rgg_{0182} est présente dans la FS et semble être en quantité plus importante que pour les autres constructions déjà testées. La présence de la protéine Rgg_{0182} a également été vérifiée par western blot à l'aide d'anticorps anti-histidine. La protéine Rgg_{0182} correspond bien à la protéine la plus fortement exprimée sur gel SDS-PAGE. La protéine Rgg_{0182} a ensuite été purifiée par technique IMAC (Figure 29 B).

Ainsi, le couple C41(DE3)/pET15b permet de produire et de purifier la protéine Rgg_{0182} sans trop de contaminants et donc de l'utiliser dans des expériences de retard de migration sur gel d'électrophorèse. Toutefois, la protéine Rgg_{0182} est trop faiblement concentrée (100 µg/mL) pour envisager son étude tridimensionnelle par cristallographie. En effet, l'analyse de la forme tertiaire de la protéine Rgg_{0182} aurait nécessité une concentration de 10 mg/mL.

1.2.2.2. Etude de la fixation de la protéine Rgg_{0182} aux régions promotrices de ces gènes cibles

Les données de la littérature ont démontré que certaines protéines appartenant à la famille Rgg sont capables de se fixer à l'ADN via leur domaine HTH (Neely *et al.,* 2003 ; Vickerman *et al.,* 2003 ; Rawlinson *et al.,* 2005 ; Loughman *et al.,* 2007 ; Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,*

2011). Comme la protéine Rgg_{0182} possède, elle aussi, un domaine HTH et qu'elle est impliquée dans la régulation de l'activité des promoteurs des gènes *pep*$_{0182}$ et *shp*$_{0182}$, la fixation de la protéine Rgg_{0182} sur l'ADN des régions promotrices de ces gènes a été étudiée. Pour ce faire, des expériences de retards de migration sur gel d'électrophorèse ont été réalisées.

Pour cela, l'ADN des régions intergéniques *shp*$_{0182}$-*rgg*$_{0182}$ et *rgg*$_{0182}$-*pep*$_{0182}$ a été amplifié par PCR à partir de l'ADNg de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* à l'aide, respectivement, des couples d'amorces P*shp*$_{0182}$-5'/P*shp*$_{0182}$-3' et P*pep*$_{0182}$-5'/P*pep*$_{0182}$-3'. Les régions intergéniques P*shp*$_{0182}$ et P*pep*$_{0182}$ comprennent, respectivement, les régions promotrices des gènes *shp*$_{0182}$ et *pep*$_{0182}$ (Figure 30).

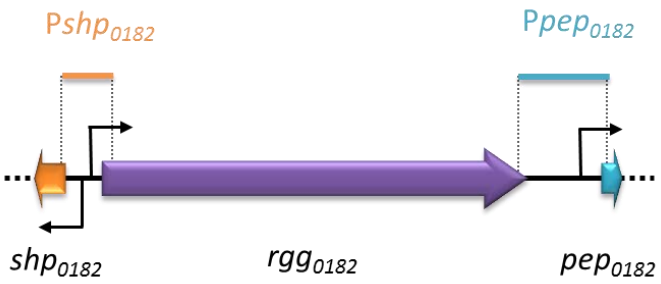


Figure 30 : Représentation schématique de la position des sondes P*shp*$_{0182}$ et P*pep*$_{0182}$, utilisées pour les expériences de retard de migration sur gel. Le fragment P*shp*$_{0182}$ de 126 pb contient les 72 pb de la région intergénique *shp*$_{0182}$-*rgg*$_{0182}$ et une partie de la région 5' du gène *shp*$_{0182}$ et 5' du gène *rgg*$_{0182}$. Le fragment P*pep*$_{0182}$ de 165 pb contient les 150 pb de la région intergénique *rgg*$_{0182}$-*pep*$_{0182}$ et une partie de la région 3' du gène *rgg*$_{0182}$ et 5' du gène *pep*$_{0182}$.

Les produits de PCR correspondant aux régions promotrices P*shp*$_{0182}$ et P*pep*$_{0182}$ ont été marqués à la biotine à leur extrémité 3'. Ensuite, 0,1 pmol de chacune de ces sondes ont été incubés avec 2 pmol de la protéine purifiée His_6-Rgg_{0182}, puis des expériences de retard de migration sur gel d'électrophorèse ont été réalisées avec les mélanges ADN/protéine (Figure 31).

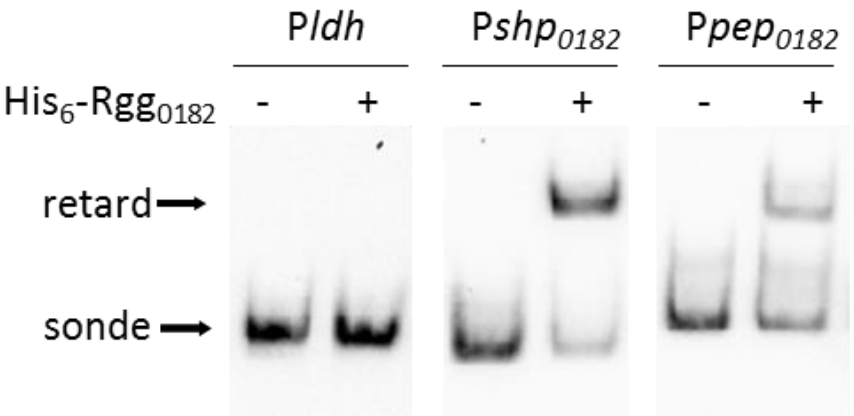


Figure 31 : Profil de retard de migration sur gel d'électrophorèse de l'ADN des régions promotrices P*shp*$_{0182}$, P*pep*$_{0182}$ et P*ldh* en présence de la protéine His_6-Rgg_{0182}. La sonde P*ldh* correspond à la région promotrice du gène *ldh* et a été utilisée comme témoin négatif. L'ADN (0,1 pmol) marqué à la biotine est incubé en absence ou en présence (2 pmol) de la protéine His_6-Rgg_{0182} purifiée.

La protéine His_6-Rgg_{0182} retarde la migration des fragments d'ADN P*shp*$_{0182}$ et P*pep*$_{0182}$ mais pas celle du gène *ldh* utilisé comme témoin négatif. Ces résultats indiquent que la fixation de la protéine Rgg_{0182} sur les régions promotrices des gènes *shp*$_{0182}$ et *pep*$_{0182}$ est spécifique. Ainsi, sachant que la protéine Rgg_{0182} influence la transcription des gènes *shp*$_{0182}$ et *pep*$_{0182}$, la protéine Rgg_{0182} est un régulateur transcriptionnel direct de la transcription des gènes *pep*$_{0182}$ et *shp*$_{0182}$.

1.3. La protéine Rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 est impliquée dans un mécanisme de quorum sensing

La présence d'un gène codant un peptide de type SHP immédiatement en amont du gène *rgg*$_{0182}$, d'une part, et la similarité du locus *rgg*$_{0182}$ avec celui du gène *rgg1358* de la souche LMD-9, d'autre part, suggèrent que la protéine Rgg_{0182} pourrait, tout comme la protéine Rgg1358 (Ibrahim *et al.,* 2007 ; Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,* 2011), être impliquée dans un mécanisme de quorum sensing utilisant la molécule SHP comme phéromone.

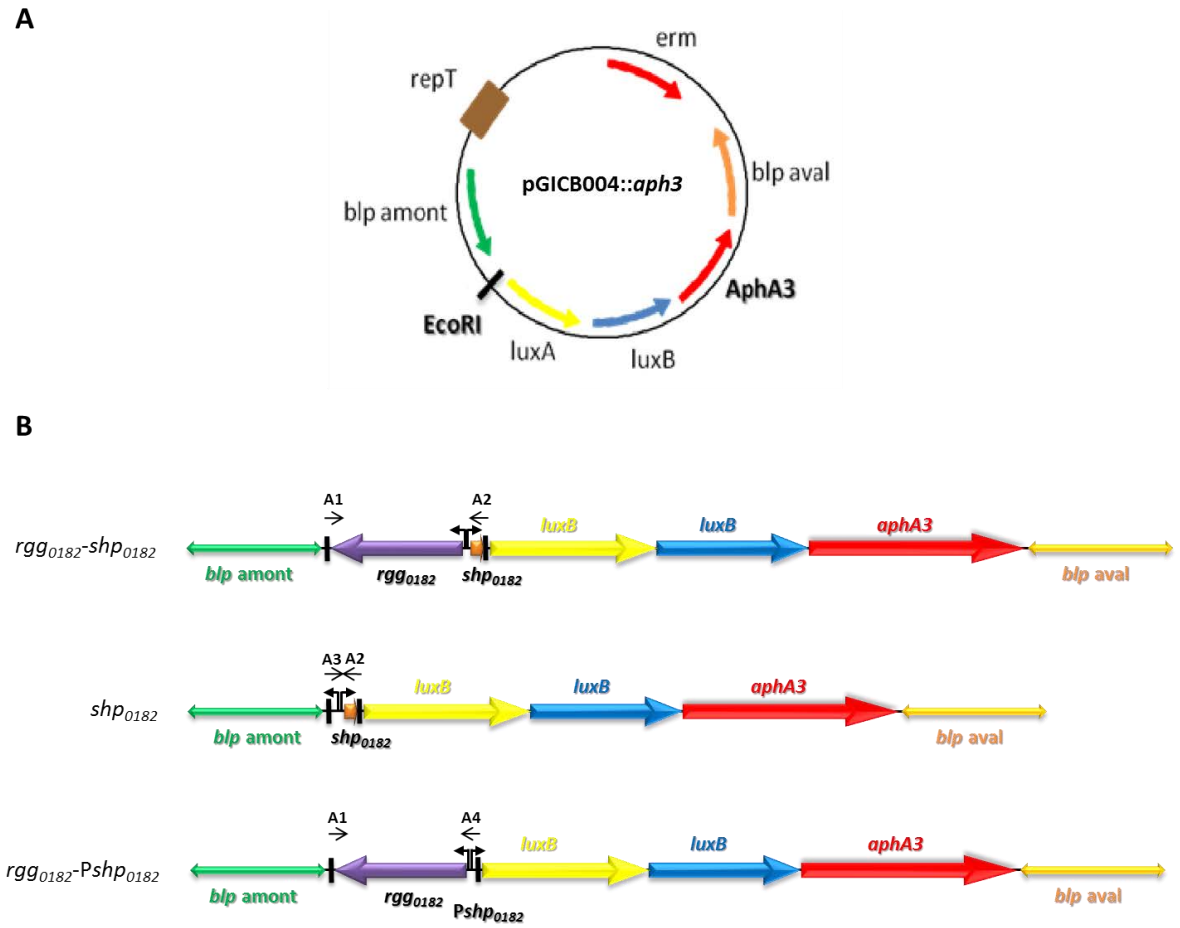
1.3.1. Etude de la fonctionnalité du système Rgg_{0182}/Shp_{0182}

Dans le cadre d'une collaboration avec Rozenn Gardan et Betty Fleuchot de l'UMR1319 MICALIS de Jouy en Josas, l'étude de la fonctionnalité de différents loci *rgg*/*shp* dans un mécanisme de quorum sensing a été entreprise. Cette étude porte sur trois nouveaux systèmes appartenant à des espèces de streptocoques pathogènes (*S. agalactiae* NEM316 et *S. mutans* UA159) et GRAS (*S. thermophilus* LMG18311). Afin de s'affranchir d'un effet souche, l'étude de la fonctionnalité des différents systèmes *rgg*/*shp* a été réalisée en système hétérologue chez la souche LMD-9 de *S. thermophilus* ne possédant aucun des systèmes étudiés.

Les travaux présentés ci-dessous sont ceux réalisés au cours de cette thèse et porte uniquement sur le locus *rgg*$_{0182}$/*shp*$_{0182}$.

1.3.1.1. Stratégie expérimentale

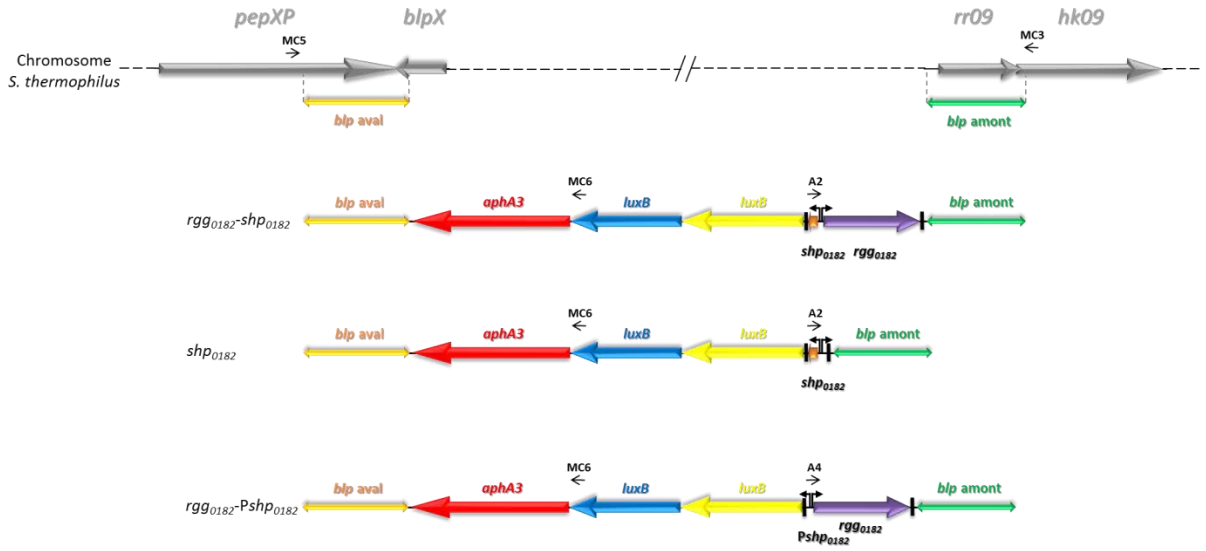
L'étude du locus *rgg1358*/*shp* de *S. thermophilus* LMD-9 a révélé que le gène *shp* code une phéromone dont l'expression auto-induite nécessite la présence du régulateur transcriptionnel Rgg1358 et d'un transporteur d'oligopeptides AmiCDEF (Fleuchot *et al.,* 2011). La découverte d'autres systèmes *rgg*/*shp* chez *S. pyogenes* suggère que tous les systèmes *rgg*/*shp* pourraient fonctionner de manière similaire (Chang *et al.,* 2011). Afin d'étudier la fonctionnalité du système *rgg*$_{0182}$/*shp*$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311, différentes fusions transcriptionnelles du promoteur du gène *shp*$_{0182}$ avec les gènes codant la luciférase (P*shp*$_{0182}$::*luxAB*) ont été construites (Figure 32).



<u>Figure 32 :</u> Construction des fusions transcriptionnelles pour l'étude de la fonctionnalité du système *rgg$_{0182}$/shp$_{0182}$*. A : Représentation schématique du plasmide pGICB004::*aph3* utilisé pour la construction des fusions transcriptionnelles. Le gène *apha3* confère la résistance à la kanamycine et le gène *erm* la résistance à l'érythromycine. B : Représentation schématique des différentes fusions transcriptionnelles construites pour l'étude de la fonctionnalité du système *rgg$_{0182}$/shp$_{0182}$; rgg$_{0182}$-shp$_{0182}$, shp$_{0182}$ et rgg$_{0182}$-*P*shp$_{0182}$*.

Les plasmides construits couplent le promoteur du gène *shp$_{0182}$* au système rapporteur *luxAB* et présentent ou non les gènes *shp$_{0182}$* et *rgg$_{0182}$* selon la construction considérée. Pour les construire, les régions contenant le promoteur du gène *shp$_{0182}$* et portant ou non les gènes *rgg$_{0182}$* et *shp$_{0182}$* ont été amplifiées par PCR à partir de l'ADNg de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*, à l'aide des couples amorces A1/A2 pour l'amplification de la région *rgg$_{0182}$-shp$_{0182}$*, A3/A2 pour l'amplification de la région *shp$_{0182}$* et A1/A4 pour l'amplification de la région *rgg$_{0182}$*-P*shp$_{0182}$* (Figure 32). Les produits PCR ont ensuite été digérés à l'aide de l'enzyme de restriction *Eco*RI et introduite par ligation dans le plasmide pGICB004::*aphA3*, digéré au préalable par la même enzyme. Les produits de ligation ont ensuite été électroporés dans la souche TG01 *repA*$^{+}$ d'*E. coli*. Les constructions ainsi obtenues (pGICB004::*aphA3 rgg$_{0182}$-shp$_{0182}$-luxAB*, pGICB004::*aphA3 shp$_{0182}$-luxAB* et pGICB004::*aphA3 rgg$_{0182}$*-P*shp$_{0182}$-luxAB*) ont été vérifiées par PCR par amplification des bornes gauche et droite afin de vérifier l'orientation des fragments d'intérêt, à l'aide des amorces pGICB004::*aph3*-for et pGICB004::*aph3*-rev s'hybridant à l'ADN du plasmide de part et d'autre du site de restriction *Eco*RI. L'ADN des trois constructions obtenues

après intégration dans le plasmide pGICB004::*aphA3* a été séquencé puis transformé chez la souche LMD-9 de *S. thermophilus*. Les souches portant les fusions transcriptionnelles intégrées au locus *blp* du chromosome bactérien par recombinaison homologue, aux niveaux des sites *blp* aval et *blp* amont, ont été sélectionnées sur la résistance à la kanamycine et la sensibilité à l'érythromycine. La présence de la fusion transcriptionnelle a été vérifiée par amplification par PCR de la borne droite de l'insert (amorce MC3 s'hybridant au chromosome de la souche LMD-9 en aval du locus *blp* et l'amorce A2 dans le cas des constructions 1 et 2 ou amorce A4 dans le cas de la construction 3) et de la borne gauche (amorces MC5 s'hybridant au chromosome de la souche LMD-9 en amont du locus *blp* et MC6 s'hybridant à la fin du gène *luxB* dans les 3 constructions) (Figure 33).



<u>Figure 33 :</u> Schématisation de l'intégration des 3 différentes fusions transcriptionnelles (*rgg$_{0182}$-shp$_{0182}$, shp$_{0182}$ et rgg$_{0182}$-Pshp$_{0182}$*) au locus *blp* du chromosome bactérien de *S. thermophilus*. Le gène *aphA3* confère la résistance à la kanamycine et les gènes *luxA* et *luxB* codent la luciférase. Les amorces sont indiquées par des flèches noires.

Les souches ainsi obtenues ont été appelées LMD-9 *blp*::*rgg$_{0182}$-shp$_{0182}$*, LMD-9 *blp*::*shp$_{0182}$* et LMD-9 *blp*::*rgg$_{0182}$-Pshp$_{0182}$*, respectivement, pour les constructions *rgg$_{0182}$-shp$_{0182}$, shp$_{0182}$ et rgg$_{0182}$-Pshp$_{0182}$*.

Comme le rôle du transporteur AmiCDEF a été démontré dans la réimportation de phéromone SHP aussi bien chez *S. thermophilus* que chez *S. pyogenes* (Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,* 2011), la fusion transcriptionnelle *rgg$_{0182}$-shp$_{0182}$* a également été réalisée dans un contexte génétique Δ*ami*. Pour cela, la souche LMD-9 *blp*::*rgg$_{0182}$-shp$_{0182}$* a été transformée avec l'ADNg la souche LMD-9 Δ*amiCDE*. La présence de la construction *rgg$_{0182}$-shp$_{0182}$* a été vérifiée par PCR, comme précédemment décrit, et la délétion des gènes *amiCDE* a été vérifiée par PCR, à l'aide des couples d'amorces BF5/BF6 s'hybridant de part et d'autre de la délétion, BF7/erm1

permettant la vérification de la borne droite et BF8/erm2 permettant la vérification de la borne gauche (Figure 34).

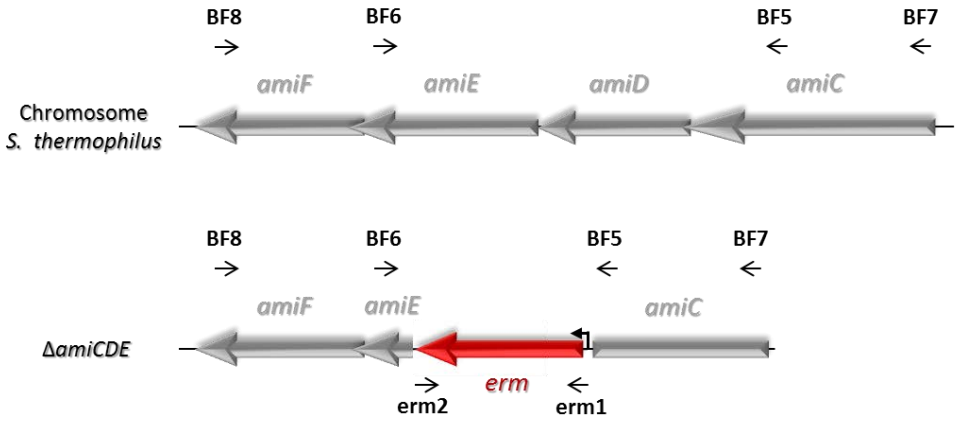


Figure 34 : Schématisation de la délétion des gènes *amiCDE* chez la souche LMD-9 de *S. thermophilus* par remplacement par le gène *erm* conférant la résistance à l'érythromycine. Les amorces sont indiquées par des flèches noires.

La souche ainsi obtenue a été appelée LMD-9 *blp*::rgg_{0182}-shp_{0182} Δ*amiCDE*. Ces fusions transcriptionnelles permettront (si le système rgg_{0182}/shp_{0182} fonctionne comme ceux déjà décrits) de vérifier que l'activité du promoteur Pshp_{0182} est dépendante des trois partenaires, c'est-à-dire de la phéromone Shp_{0182}, du régulateur transcriptionnel Rgg_{0182} et du système de transport d'oligopeptides AmiCDEF.

1.3.1.2. Etude de la fonctionnalité du système rgg_{0182}/shp_{0182}

Les résultats obtenus précédemment indiquent que l'activité du promoteur du gène shp_{0182} est maximale lors d'une croissance en milieu MCD à 30°C. Ces conditions ont donc été utilisées pour étudier l'implication du système rgg_{0182}/shp_{0182} dans un mécanisme de QS. L'analyse de la cinétique de l'activité luciférase des différentes fusions transcriptionnelles montre qu'aucune activité de luminescence n'est observée quelle que soit la construction considérée (Figure 35 A).

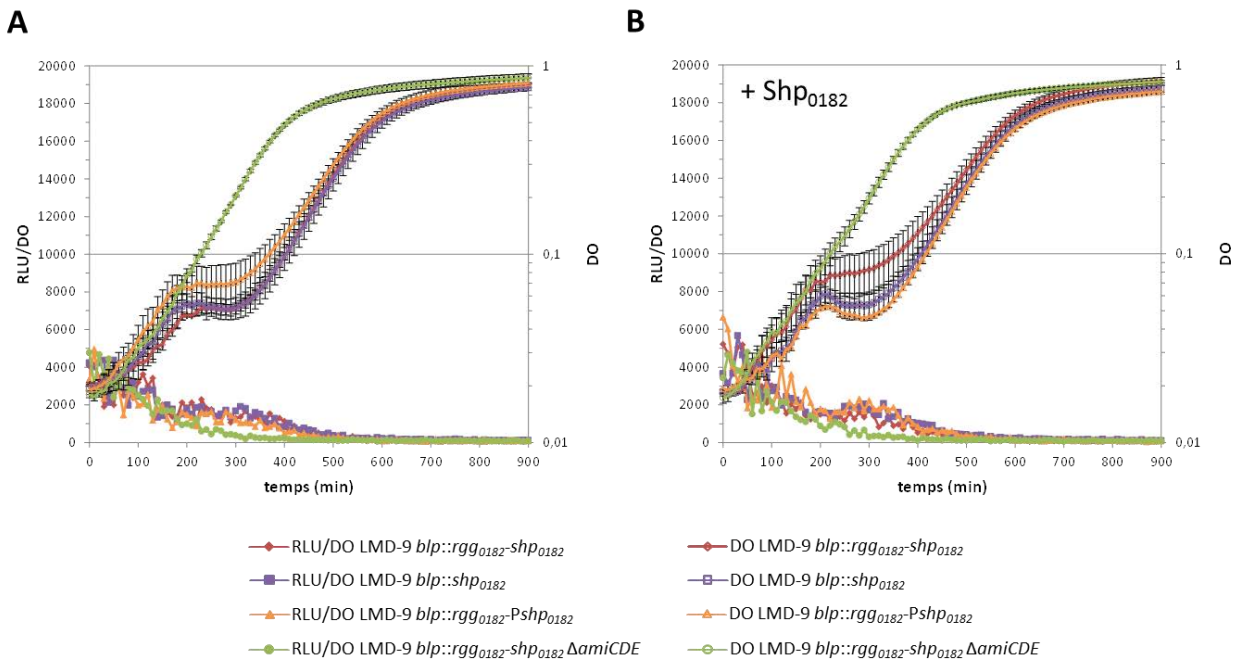


Figure 35 : Cinétiques de croissance et de l'activité luciférase des souches de *S. thermophilus* LMD-9 *blp*::*rgg*$_{0182}$-*shp*$_{0182}$, LMD-9 *blp*::*shp*$_{0182}$, LMD-9 *blp*::*rgg*$_{0182}$-P*shp*$_{0182}$ et LMD-9 *blp*::*rgg*$_{0182}$-*shp*$_{0182}$ Δ*amiCDE* contenant les fusions transcriptionnelles du promoteur du gène *shp*$_{0182}$ avec les gènes codant la luciférase. L'expression des fusions a été réalisée sur des cellules cultivées en milieu MCD à 30°C en absence (A) ou en présence (B) du peptide Shp$_{0182}$ synthétique (1µM final). Les résultats correspondent à la moyenne ± écart-type de moyenne de trois expériences indépendantes.DO : Densité Optique à 600 nm ; URL : Unité Relative de la Luminescence normalisée par la DO$_{600nm}$.

Ces résultats indiquent qu'aucune activité luciférase n'est détectée pour toutes les fusions transcriptionnelles étudiées. Ainsi, les constructions ne semblent pas être fonctionnelles. Les données de la littérature suggèrent que le régulateur Rgg interagirait avec la forme mature du peptide Shp, ce qui conduirait en une activation du régulateur transcriptionnel Rgg et donc de la transcription de ses gènes cibles (Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,* 2011).). La forme mature des peptides SHP décrits dans la littérature (Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,* 2011) est composée des 9 derniers acides aminés du produit du gène *shp*. Ainsi, afin de déterminer si l'absence d'activité du promoteur du gène *shp*$_{0182}$ est due à l'absence d'activation du régulateur transcriptionnel Rgg$_{0182}$ par Shp$_{0182}$, la forme mature du peptide Shp$_{0182}$ composée des 9 derniers aa (CIYIIVGGV) a été synthétisée et les expériences ont été réitérées en présence du peptide Shp$_{0182}$ synthétique dans le milieu de culture (Figure 35 B). Cependant, l'ajout de Shp$_{0182}$ synthétique ne modifie pas l'expression de la luciférase chez les différentes fusions transcriptionnelles. L'absence d'activité du promoteur du gène *shp*$_{0182}$ n'est pas cohérente avec les résultats obtenus dans la littérature ou lors des résultats précédemment obtenus.

Sachant que le locus *rgg*$_{0182}$/*shp*$_{0182}$ n'est pas naturellement présent dans la souche LMD-9 de *S. thermophilus*, la fonctionnalité du plasmide pGICB004::*aphA3 rgg*$_{0182}$-*shp*$_{0182}$-*luxAB* a été testée dans le contexte génétique d'origine, c'est-à-dire chez la souche LMG18311. Pour cela,

l'ADN du plasmide pGICB004::*aphA3* rgg_{0182}-shp_{0182}-*luxAB* a été transformé chez la souche LMG18311 de *S. thermophilus*. Les cinétiques de croissance et d'activité luciférase ont été déterminées chez cette souche, appelée LMG18311 *blp*::rgg_{0182}-shp_{0182} (figure 36).

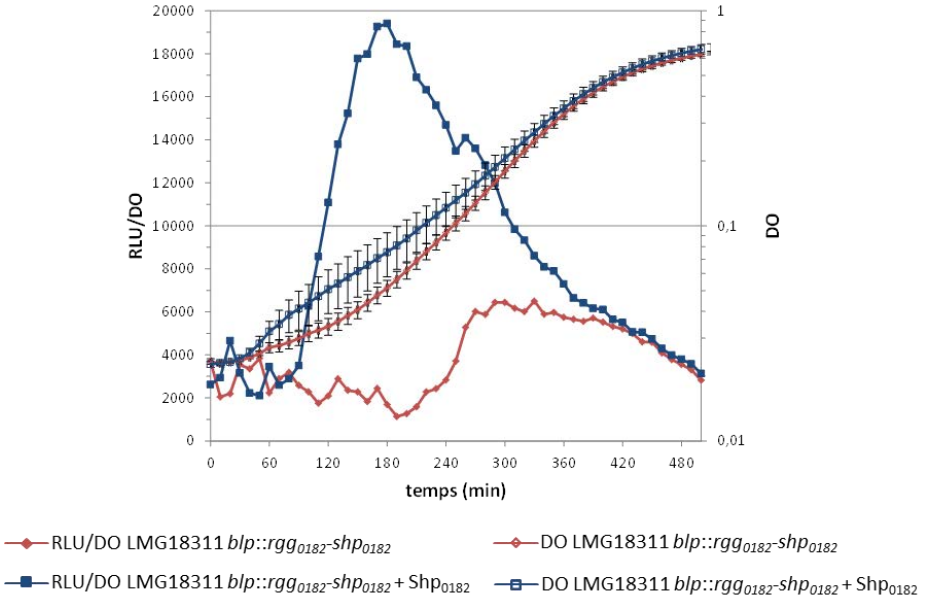


Figure 36 : Cinétiques de croissance et d'activité luciférase de la souche LMG18311 *blp*::rgg_{0182}-shp_{0182} de *S. thermophilus* contenant la fusion transcriptionnelle du promoteur du gène shp_{0182} avec les gènes codant la luciférase. L'expression des fusions a été réalisée sur des cellules cultivées en milieu MCD à 30°C en présence ou non de Shp_{0182} synthétique. Les résultats correspondent à la moyenne ± écart-type de moyenne de trois expériences indépendantes.DO : Densité Optique à 600 nm ; URL : Unité Relative de la Luminescence normalisée par la DO_{600nm}.

Ces données montrent qu'une activité luciférase est observée sans ajout de peptide Shp_{0182}. Cela indique que le promoteur du gène shp_{0182} est actif chez la souche LMG18311 de *S. thermophilus*. Par ailleurs, l'ajout de peptide Shp_{0182} à une concentration de 1 µM final dans le milieu de culture augmente fortement l'activité du promoteur Pshp_{0182} (16 fois). La cinétique d'activité luciférase indique également que lorsque le peptide Shp_{0182} est ajouté, la luminescence est produite plus précocement, avec un maximum d'activité observé au milieu de la phase exponentielle de croissance. Au contraire, dans des conditions normales de croissance, le promoteur a une activité maximale en fin de phase exponentielle de croissance. Ainsi, le promoteur du gène shp_{0182} est sous la dépendance de la forme mature du produit du gène shp_{0182} suggérant, par ailleurs, que le peptide Shp_{0182} est bien importé au sein de la cellule à l'aide d'un transporteur. En outre, ces résultats indiquent que le peptide Shp_{0182} composé des 9 derniers aa du produit du gène shp_{0182} constitue une forme active de la phéromone.

Afin de déterminer si le gène rgg_{0182} est lui aussi impliqué dans un mécanisme de quorum sensing, la cinétique d'activité luciférase du promoteur du gène shp_{0182} a été étudiée chez la souche LMG18311 de *S. thermophilus* en présence ou non du gène rgg_{0182} à l'aide des fusions

transcriptionnelles du promoteur du gène *shp$_{0182}$* intégré au chromosome des souches de *S. thermophilus* LMG18311 et Δ*rgg$_{0182}$* (LMG18311 *blp*::P*shp$_{0182}$-luxAB* et Δ*rgg$_{0182}$blp*::P*shp$_{0182}$-luxAB*) utilisées pour l'étude de rôle de la protéine Rgg$_{0182}$ sur la transcription du gène *shp$_{0182}$*. L'analyse a été réalisée en présence ou non du peptide Shp$_{0182}$ dans le milieu de culture (Figure 37).

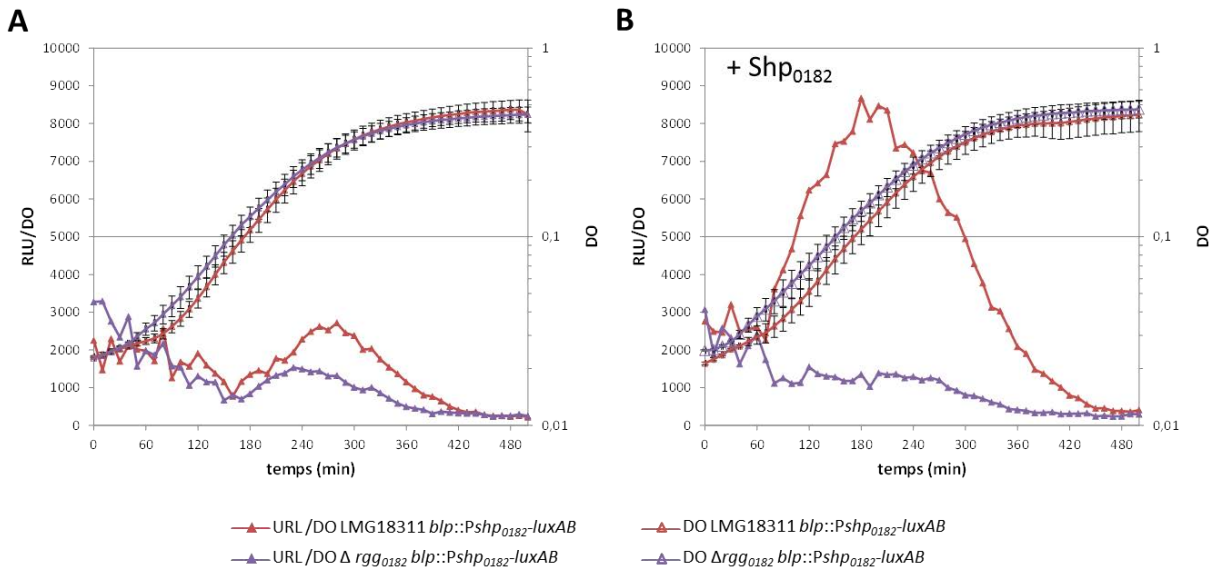


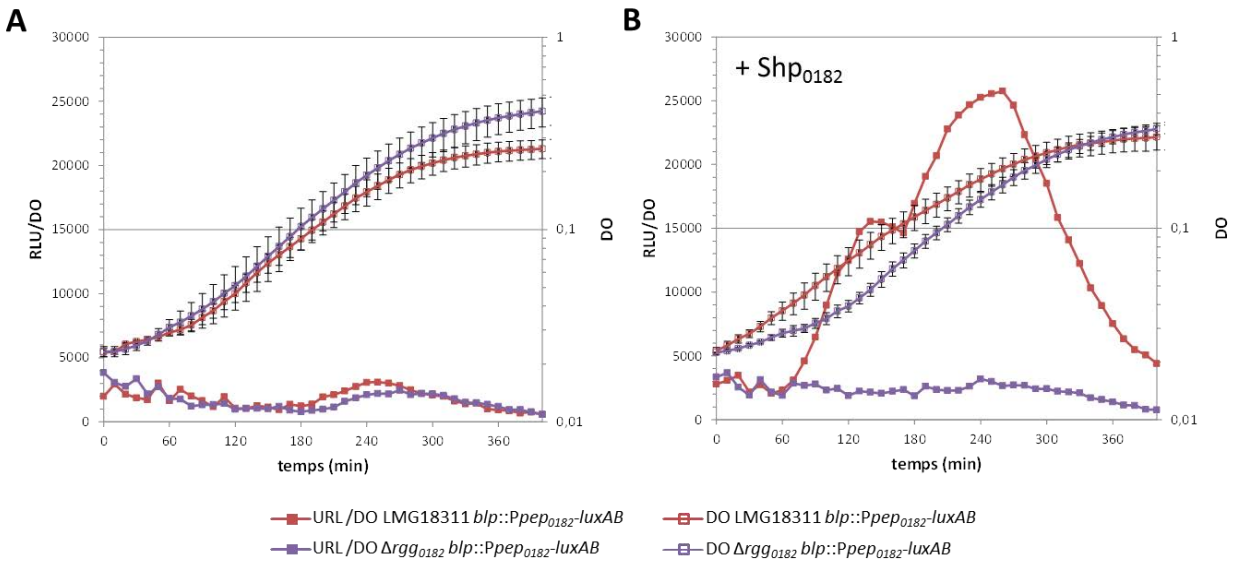
Figure 37 : Cinétiques de croissance et d'activité luciférase des souches LMG18311 et Δ*rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus*, contenant la fusion transcriptionnelle appelée P*shp$_{0182}$-luxAB*. L'expression des fusions transcriptionnelles a été réalisée sur des cellules cultivées en milieu MCD à 30°C en absence (A) ou en présence (B) du peptide Shp$_{0182}$ synthétique dans le milieu de culture (1µM final). Les résultats correspondent à la moyenne ± l'écart-type de moyenne de trois expériences indépendantes.DO : Densité Optique ; URL : Unité Relative de la Luminescence normalisée par la DO$_{600nm}$.

L'activité luciférase est fortement augmentée (9,8 fois) dans le contexte sauvage lorsque du peptide Shp$_{0182}$ mature est ajouté au milieu de croissance (Figure 37 B). Au contraire dans un contexte où le gène *rgg$_{0182}$* est absent, l'ajout de peptide Shp$_{0182}$ ne modifie pas le taux de luminescence observé. Ces résultats indiquent que le gène *rgg$_{0182}$* est nécessaire pour que le peptide Shp$_{0182}$ induise l'activité de son propre promoteur. Ainsi, le système *rgg$_{0182}$/shp$_{0182}$* pourrait être impliqué dans un mécanisme de quorum sensing qui nécessite la présence des deux partenaires *rgg* et *shp*, ainsi que la réimportation du peptide Shp$_{0182}$ sous forme mature à l'intérieur de la cellule. Cette réimportation se fait probablement grâce à un transporteur qui, comme le suggère les donnée de la littérature, pourrait être le transporteur d'oligopeptide Ami. Afin de vérifier cette hypothèse, les expériences réalisées devront être effectuées dans un contexte LMG18311 Δ*ami*.

1.3.2. Le gène *pep$_{0182}$*, une cible du couple *rgg$_{0182}$/shp$_{0182}$*

Le modèle de quorum sensing proposé pour le locus *rgg1358* de la souche LMD-9 de *S. thermophilus* suggère que l'une des cibles régulées par ce mécanisme est le gène *pep1358* situé

en aval du gène *rgg1358*. Afin de vérifier si l'expression du gène pep_{0182} pourrait être sous la dépendance du couple rgg_{0182}/shp_{0182}, l'activité du promoteur du gène pep_{0182} a été étudiée chez les souches LMG18311 et Δrgg_{0182} (LMG18311 *blp*::Ppep_{0182}-*luxAB* et Δrgg_{0182}*blp*::Ppep_{0182}-*luxAB*) utilisées pour l'étude de rôle de la protéine Rgg_{0182} sur la transcription du gène pep_{0182}, en présence ou non du peptide mature Shp_{0182} dans le milieu de culture (Figure 38).



<u>Figure 38 :</u> Cinétiques de croissance et d'activité luciférase des souches LMG18311 et Δrgg_{0182} de *S. thermophilus*, contenant la fusion transcriptionnelle appelée Ppep_{0182}-*luxAB*. L'expression des fusions transcriptionnelles a été réalisée sur des cellules cultivées en milieu MCD à 30°C en absence (A) ou en présence (B) du peptide mature Shp_{0182} dans le milieu de culture (1 µM final). Les résultats correspondent à la moyenne ± l'écart-type de moyenne de trois expériences indépendantes.DO : Densité Optique à 600 nm ; URL : Unité Relative de la Luminescence normalisée par la DO_{600nm}.

Lorsque du peptide mature Shp_{0182} est ajouté (1 µM final) dans le milieu de culture, l'activité du promoteur Ppep_{0182} est augmentée 14 fois dans le contexte sauvage (Figure 38), tandis que dans le contexte mutant Δrgg_{0182} aucune différence n'est observée. Ces résultats indiquent que l'ajout du peptide Shp_{0182} induit fortement l'activité du promoteur du gène pep_{0182} mais uniquement lorsque le gène rgg_{0182} est présent. Ainsi, l'expression du gène pep_{0182} dépend à la fois du régulateur transcriptionnel Rgg_{0182} et de la phéromone Shp_{0182}. Ces résultats indiquent que la transcription du gène pep_{0182} est sous la dépendance du couple rgg_{0182}/shp_{0182} et ceci pourrait se faire via un mécanisme de quorum sensing. Toutefois, la démonstration que le système est sous la dépendance de la concentration cellulaire sera nécessaire pour vérifier si le couple Rgg_{0182}/Shp_{0182} participe bien à un mécanisme de QS.

2. Implication de la protéine Rgg_{0182} dans l'adaptation de *S. thermophilus* LMG18311 à son environnement

De nombreuses protéines de la famille Rgg sont décrites dans la littérature comme participant à l'adaptation à l'environnement. Ainsi, l'implication de la protéine Rgg_{0182} dans l'adaptation à l'environnement de *S. thermophilus* LMG18311 a été étudiée.

2.1. Implication de la protéine Rgg_{0182} dans l'adaptation aux changements de température

Une partie des résultats présentés dans cette partie ont été publiés dans BMC microbiology en 2011 (11:223) : **The *rgg_{0182}* gene encodes a transcriptional regulator required for the full *Streptococcus thermophilus* LMG18311 thermal adaptation**. Romain Henry, Emmanuelle Bruneau, Rozenn Gardan, Stéphane Bertin, Betty Fleuchot, Bernard Decaris and Nathalie Leblond-Bourget (Annexe 1).

2.1.1. Rôle du régulateur transcriptionnel Rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 dans la réponse aux changements de température

Dans un premier temps, la transcription du gène *rgg_{0182}* de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* a été analysée dans différentes conditions. Cette étude a été réalisée au sein de l'équipe de Nathalie Leblond-Bourget lors des travaux de thèse de Romain Henry, effectués en parallèle à ceux présentées ici. Le taux de transcrit du gène *rgg_{0182}* a été déterminé à différents temps lors d'une croissance en milieu LM17 (milieu complet) ou en milieu MCD, à 30 et à 42°C. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 39.

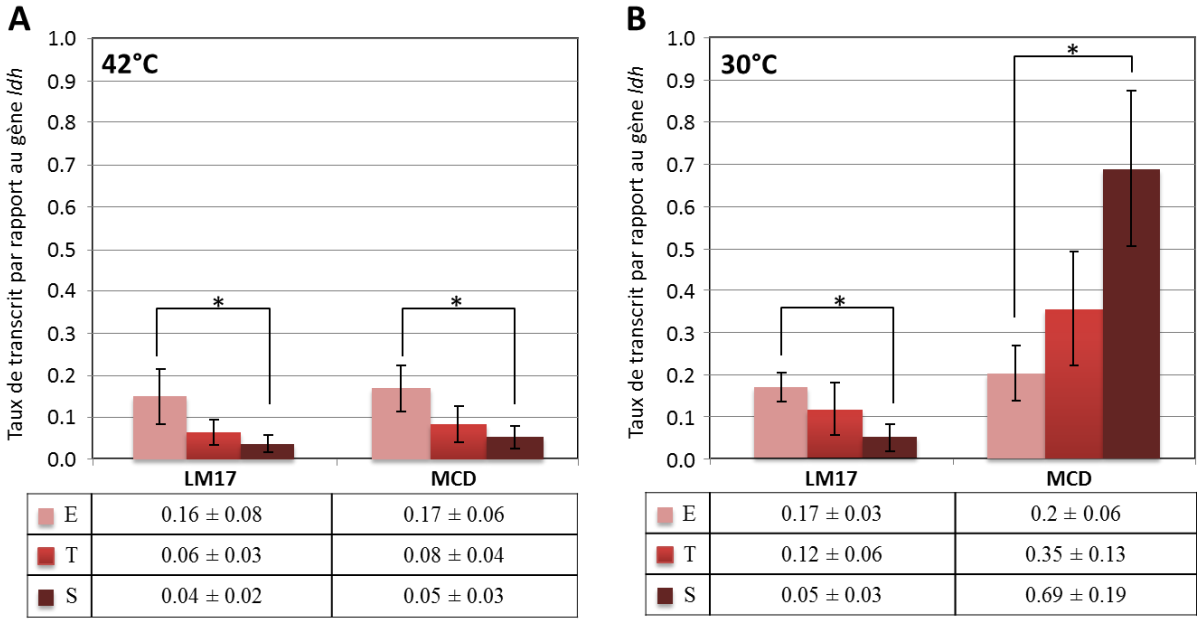


Figure 39 : Taux de transcrit relatif du gène *rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus* LMG18311 cultivée à 42°C (A) et à 30°C (B) (Henry 2011). Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage en phase exponentielle (E, barres rouge clair), en phase stationnaire (T, barres rouge) et en phase stationnaire de croissance (S, barres rouge foncé). Les résultats correspondent à la moyenne ± la déviation standard de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. Test de Student t: *, p<0,001

Les résultats obtenus montrent qu'à 42°C, quel que soit le milieu considéré, une diminution significative du taux de transcrit du gène *rgg$_{0182}$* est observée au cours de la croissance (Figure 39 A). Le niveau de transcription du gène *rgg$_{0182}$* est donc modulé en fonction de la phase de croissance. Lors d'une croissance en milieu LM17 à 30°C, (température à laquelle *S. thermophilus* est souvent exposée lors des procédés industriels), le taux de transcrit du gène *rgg$_{0182}$* est similaire à celui observé à 42°C. De plus, le taux de transcrit du gène *rgg$_{0182}$* lors d'une culture en milieu MCD à 30°C est trois fois plus élevé en phase stationnaire qu'en phase exponentielle de croissance (Figure 39 B). Enfin, la comparaison du niveau de transcription du gène *rgg$_{0182}$* chez des cellules en phase stationnaire cultivées en milieu MCD indique qu'il est 14 fois supérieur à 30°C qu'à 42°C (Henry 2011). Ces résultats montrent que la transcription du gène *rgg$_{0182}$* est influencée à la fois par le milieu de culture et par la température à laquelle *S. thermophilus* est soumise.

L'impact de la température sur la transcription du gène *rgg$_{0182}$* suggère que la protéine Rgg$_{0182}$ joue un rôle dans l'adaptation aux changements de température de *S. thermophilus* et pourrait réguler la transcription de protéines Hsp (pour Heat shock protein) ou de protéines Csp (pour Cold shock protein). Ces protéines incluent des chaperonnes et des protéases ATP-dépendantes qui jouent un rôle majeur dans la survie des bactéries soumises à des conditions où les protéines sont agrégées ou mal repliées. Elles interviennent également dans la biogénèse des protéines en absence de stress. Ainsi, la transcription de gènes prédits comme codant des chaperonnes et des protéases présents au sein du génome de *S. thermophilus* LMG18311 a été

analysée sur des cellules cultivées en phase stationnaire de croissance en milieu MCD à 30°C (condition dans laquelle le gène *rgg$_{0182}$* est le plus transcrit). Les taux de transcrits des gènes *clpC*, *dnaK*, *hsp33*, *groES*, *clpP*, *clpX*, *clpE* et *clpL* sont moins abondants chez la souche délétée du gène *rgg$_{0182}$* par rapport à la souche sauvage. De plus, la transcription du régulateur transcriptionnel *hrcA* contrôlant la transcription des gènes *dnaK* et *groES* (Zuber *et al.,* 1994) est également 4 fois moins importante chez le mutant comparé à la souche sauvage (Henry 2011). Ces résultats indiquent que la protéine Rgg$_{0182}$ participe à la régulation de la transcription de gènes codant des chaperonnes et des protéases.

2.1.2. Implication de la protéine Rgg$_{0182}$ dans la réponse au stress chaud

Pour confirmer la participation de la protéine Rgg$_{0182}$ dans l'adaptation de *S. thermophilus* LMG18311 au stress thermique, le taux de survie de cellules sauvage et Δ*rgg$_{0182}$* exposées pendant 15, 30, 45 et 60 minutes d'incubation à 52°C (température limite de croissance de *S. thermophilus* LMG18311 en conditions de laboratoire) a été déterminé. Les résultats obtenus pour des cellules cultivées en milieu LM17 sont présentés sur la figure 40 et pour celles cultivées en milieu MCD sur la figure 41.

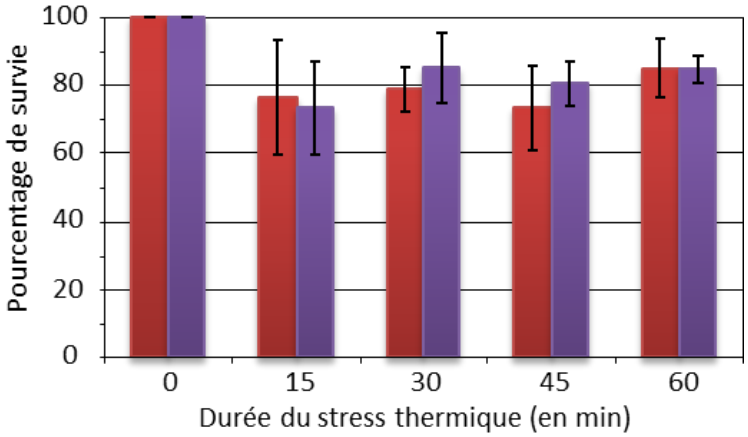


Figure 40 : Histogramme représentant le taux de survie des souches sauvage et Δ*rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus* LMG18311 soumises à un choc thermique (0, 15, 30, 45 et 60 min à 52°C) lors d'une culture en milieu LM17. Les cellules de *S. thermophilus* ont été cultivées en milieu LM17 à 30°C puis exposée à un choc chaud. Le pourcentage de survie a été calculé par la formule $N/N_0 \times 100$ où N_0 est le nombre d'UFC obtenues dans la condition contrôle et N est le nombre d'UFC après exposition au stress. Les histogrammes rouges correspondent à la souche sauvage et les violets à la souche Δ*rgg$_{0182}$*. Les résultats présentent la moyenne des valeurs ± la déviation standard de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Lors d'une culture en milieu LM17, quelle que soit la durée du stress thermique, l'exposition à 52°C conduit à une réduction d'environ 20% de la survie des deux souches testées mais aucune différence significative n'est observée entre les deux souches (Figure 40). Ces résultats suggèrent donc que dans ces conditions le gène *rgg$_{0182}$* n'est pas nécessaire à la survie de *S. thermophilus* au stress chaud.

Au contraire, en milieu MCD, à partir de 30 min d'incubation à 52°C, la survie de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ est statistiquement inférieure à celle de la souche sauvage ($p < 0,001$) (Figure 41).

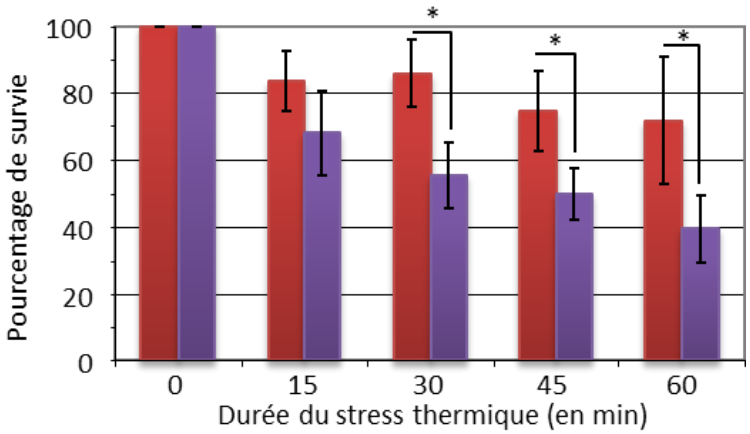


Figure 41 : Histogramme représentant la survie des souches sauvage et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311 soumises à un choc thermique (0, 15, 30, 45 et 60 min à 52°C) lors d'une culture en milieu MCD. Les cellules de *S. thermophilus* ont été cultivées en milieu MCD à 30°C puis exposée à 52°C. Le pourcentage de survie a été calculé par la formule $N/N_0 \times 100$ où N_0 est le nombre d'UFC obtenues dans la condition contrôle et N est le nombre d'UFC après exposition au stress. Les histogrammes rouges correspondent à la souche sauvage et les violets à la souche Δ*rgg*$_{0182}$. Les résultats présentent la moyenne des valeurs ± la déviation standard de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat. Test de Student *t* : *, $p < 0.001$.

De plus, la tolérance au stress chaud de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ diminue proportionnellement avec le temps d'exposition (72%, 53%, 46% et 38% de survie à respectivement 15, 30, 45 et 60 min). Ces données suggèrent que la protéine Rgg$_{0182}$ joue un rôle dans la tolérance de *S. thermophilus* LMG18311 à une exposition à la chaleur (52°C) qui pourrait s'expliquer en partie par la régulation en conditions de stress chaud de l'expression de protéines chaperonnes : *clpE* et *cspB* notamment (Henry 2011).

2.1.3. Etude de la fixation de Rgg$_{0182}$ aux régions promotrices des gènes codants les chaperonnes et protéases

La protéine Rgg$_{0182}$ participe à l'adaptation de *S. thermophilus* LMG18311 aux changements de température et à la tolérance au stress chaud en régulant les gènes codant des chaperonnes et des protéases. Afin de déterminer si cette régulation se fait directement par la fixation de la protéine Rgg$_{0182}$ aux régions promotrices des gènes cibles ou indirectement via un intermédiaire, la fixation de la protéine Rgg$_{0182}$ a été analysée *in vitro*, à l'aide d'expérience d'EMSA, sur l'ADN situé en amont des gènes dont elle régule la transcription. Pour cela, des fragments d'ADN contenant la région promotrices des gènes *clpE*, *clpL*, *clpP*, *clpX*, *clpC*, *groES*, *dnaK*, *hrcA*, *cspB* et *hsp33* ont été amplifiés par PCR, à partir de l'ADN chromosomique de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* (à l'aide des amorces indiquées dans le tableau 10). Les sondes ont été obtenues par marquage en 3' des produits de PCR et ont été incubées avec la protéine purifiée His$_6$-Rgg$_{0182}$,

avant le dépôt sur gel d'acrylamide. Aucun retard de migration n'a pu être observé, suggérant que la protéine Rgg_{0182} ne se fixe pas aux régions promotrices des gènes codant les chaperonnes et les protéases dans les conditions testées. La régulation de la transcription de ces gènes pourrait se faire indirectement via la régulation, par la protéine Rgg_{0182}, de l'expression d'autres régulateurs transcriptionnels (autre que les protéines HrcA et CtsR).

2.2. Implication de Rgg_{0182} dans l'adhésion de *S. thermophilus*

Les résultats présentés dans cette partie ont été publiés dans Langumir en 2013 (29, 4847−4856) : **Thermo-Regulated Adhesion of the *Streptococcus thermophilus* Δ*rgg*$_{0182}$ Strain**. Grégory Francius *, Romain Henry *, Jérôme F. L. Duval, Emmanuelle Bruneau, Jenny Merlin, Ahmad Fahs and Nathalie Leblond-Bourget. *: les auteurs ont contribué équitablement à ce travail (Annexe 2).

2.2.1. Adhésion température dépendante du mutant Δ*rgg*$_{0182}$

2.2.1.1. Adhésion thermo-induite des cellules Δ*rgg*$_{0182}$ aux parois latérales de micro-puits

Afin de déterminer l'impact de la température sur la croissance des souches LMG18311 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus*, les cinétiques de croissance de ces deux souches ont été étudiées lors de cultures en milieu LM17 réalisées à différentes températures (de 30 à 55°C) à l'aide du spectrophotomètre-incubateur à plaque (Bioscreen C) permettant de suivre la turbidimétrie de 100 micro-cultures simultanément. Comme attendu pour *S. thermophilus* (De Vuyst *et al.,* 1998), le taux de croissance optimale des deux souches est obtenu à 42°C et demeure constant jusqu'à 52°C. Quelle que soit la température, les deux souches présentent un taux de croissance similaire. Toutefois, une différence est observée dans la DO maximum (DOmax) entre la souche sauvage et le mutant Δ*rgg*$_{0182}$, uniquement quand les cellules sont cultivées à plus de 46°C. Les résultats obtenus à 42 et à 50°C sont présentés dans la figure 42.

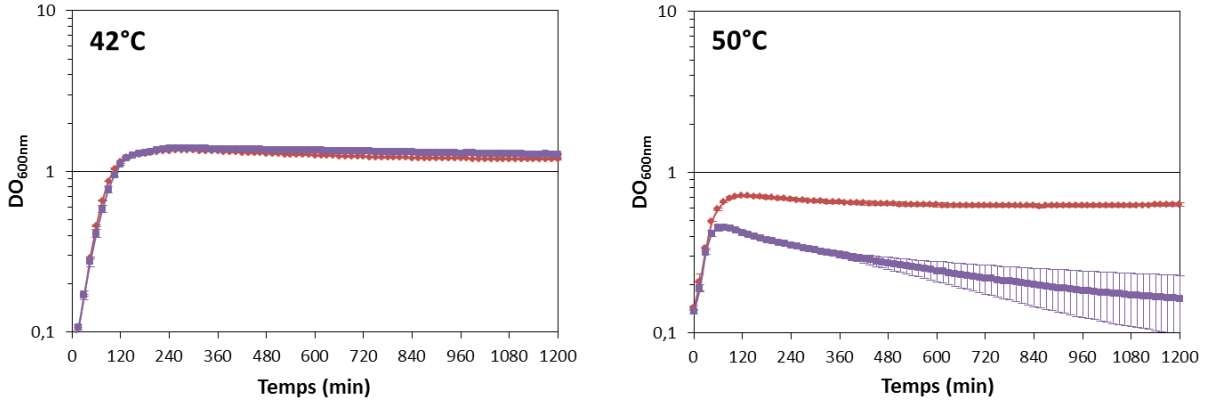


Figure 42 : Cinétiques de croissance des souches sauvage et Δ*rgg0182* de *S. thermophilus* LMG18311, réalisées à l'aide du Bioscreen C, en milieu LM17 à 42°C et à 50°C. La croissance de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* est représentée en rouge et celle de la souche Δ*rgg0182* en violet. Les résultats présentent la moyenne des valeurs ± la déviation standard de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

La différence de croissance observée à 50°C entre les souches sauvage et le mutant Δ*rgg0182* se caractérise par un arrêt prématuré de la croissance exponentielle suivi d'une chute progressive de la DO_{600nm}. Afin de déterminer si la diminution de la densité optique pourrait résulter d'une lyse des cellules du mutant Δ*rgg0182*, des échantillons des cultures des souches Δ*rgg0182* et LMG18311 ont été prélevés à différents temps et étalés sur milieu LM17 gélosé. Aucune différence significative de la survie n'a été observée entre les deux souches.

Afin de mieux appréhender le phénotype de croissance associé au mutant lorsque les cellules sont cultivées à 46°C et plus, les valeurs de DO_{600nm} obtenues durant la croissance des deux souches aux différentes températures ont été normalisées par la DO_{600nm} initiale et ont ensuite été représentées en fonction de la température. Les données obtenues à 300 min de croissance (phase stationnaire) sont représentées dans la figure 43.

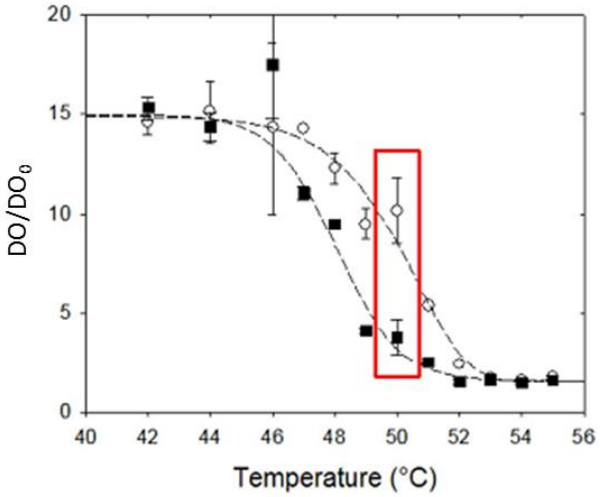


Figure 43 : Représentation de la DO/DO$_0$ obtenue à 6 h aux différentes températures de croissances des souches sauvage et Δ*rgg$_{0182}$* de *S. thermophilus* LMG18311. Les croissances ont été réalisées à l'aide du Bioscreen C à 42, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 et 55°C. Les valeurs obtenues pour la souche LMG18311 de *S. thermophilus* sont représentées par un cercle blanc et celle de la souche Δ*rgg$_{0182}$* par des carrés noirs. La DO$_0$ correspond à la DO initiale des cultures. Les résultats présentent la moyenne des valeurs ± la déviation standard de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Les valeurs de DO/DO$_0$ obtenues pour la souche Δ*rgg$_{0182}$* aux températures comprises entre 47 et 52°C sont significativement plus faibles que celles obtenues pour la souche sauvage. A 50°C, l'écart des valeurs DO/DO$_0$ obtenues pour les souches sauvage et Δ*rgg$_{0182}$* est le plus significatif. Ces données suggèrent que pour la souche Δ*rgg$_{0182}$* le nombre de cellules est moins important que pour la souche sauvage. Cependant, l'observation attentive des cultures dans les puits de la microplaque révèle que les cellules de la souche Δ*rgg$_{0182}$* cultivées dans une gamme de température allant de 47°C à 52°C ne restent pas en suspension dans le milieu de culture mais sont, en réalité, déposées sur les parois latérales du puits comme le montre la photographie du fond des puits de la microplaque sur la figure 44.

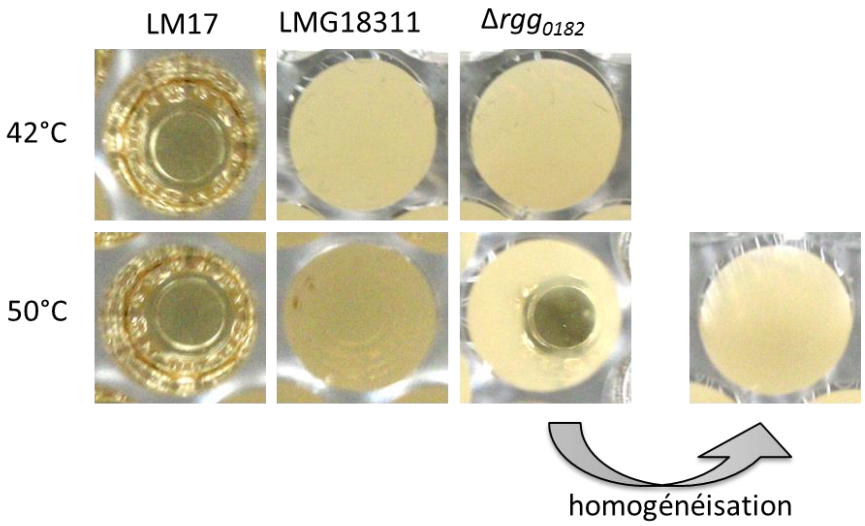


Figure 44 : Photographies du fond des micro-puits contenant des cellules sauvages et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311, prises après 20 h de culture en milieu LM17 à 42°C ou à 50°C.

Du fait de leur fixation sur la paroi latérale, les cellules de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ ne sont pas comptabilisées lors de la mesure de DO_{600nm} qui se fait au centre des puits. Afin de le vérifier, en fin de culture, les cellules de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ ont été remises en suspension et présentent après homogénéisation une DO_{600nm}, et donc une biomasse finale, comparable à celle de la culture sauvage (Figure 44).

Ces résultats suggèrent que contrairement à la souche sauvage, les cellules du mutant adhérent aux parois latérales des micro-puits de manière thermo-dépendante.

2.2.1.2. Adhésion thermo-induite des cellules Δ*rgg*$_{0182}$ spécifique à la croissance en microplaques

Afin de vérifier si le phénomène d'adhésion cellulaire de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ est également observé lors d'une croissance en plus grand volume, la cinétique de croissance a été déterminée pour une culture effectuée en tube de 50 mL (marque Falcon), en milieu LM17 et aux différentes températures choisies précédemment. Les résultats obtenus pour les croissances réalisées à 42 et 50°C sont présentés dans la figure 45.

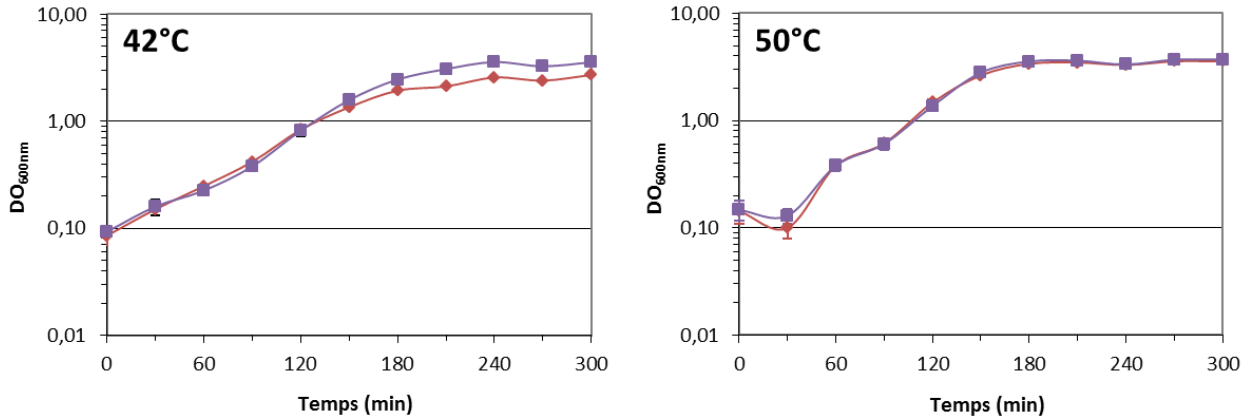


Figure 45 : Cinétiques de croissance des souches sauvage et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311, réalisé en tube de 50mL (marque Falcon), en milieu LM17 à 42°C et à 50°C. La croissance de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* est représentée en rouge et celle de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ en violet. Les résultats correspondent à la moyenne ± la déviation standard de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Dans ce cas, les cinétiques de croissances des 2 souches sont similaires quelle que soit la température étudiée. Ces données indiquent que le phénomène d'adhésion cellulaire de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ ne se produit pas dans les conditions testées. Des analyses similaires ont été réalisées en tube de 5 mL (tube à hémolyse) et aucune adhésion cellulaire n'a été observée.

Deux paramètres diffèrent entre les expériences réalisées en Bioscreen C et en tubes (de 5 ou 50 mL) : le volume des cultures et la nature du plastique des contenants. Les microplaques utilisées en Bioscreen C et les tubes de marque Falcon sont constituées de polystyrène de nature différente alors que les tubes à hémolyse sont faits de polypropylène. Ceci pourrait justifier, du moins en partie, pourquoi le phénotype d'adhésion thermo-induit est spécifique à la croissance en microplaque.

2.2.2. Analyse morphologique des cellules des souches LMG183311 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus*

Afin de mieux comprendre la différence d'adhésion observée entre les souches sauvage et Δ*rgg*$_{0182}$, les propriétés de surfaces des deux types de cellules ont été étudiées à l'aide d'imagerie obtenue par microscopie à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy). L'AFM permet de visualiser la topographie d'une surface en caractérisant ses propriétés physicochimiques et mécaniques. Cette technique est basée sur l'analyse de la surface d'un échantillon point par point par balayage d'une pointe effilée sur la surface étudiée. Ceci permet de réaliser une cartographie tridimensionnelle locale des grandeurs physiques caractéristiques de l'objet d'étude, telles que la force d'adhésion, l'élasticité, la force de détachement.

Pour cela, des cellules vivantes des deux souches issues de cultures réalisées en milieu LM17 à 42 ou 50°C ont été immobilisées sur des membranes poreuses et observées par AFM (Figure 46).

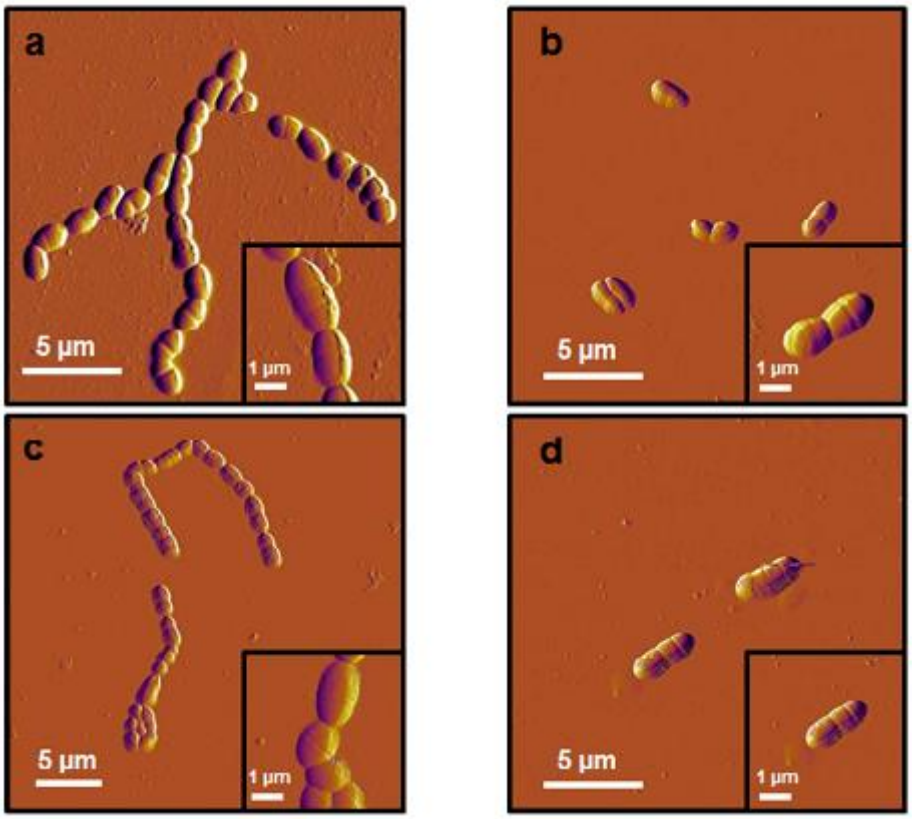


Figure 46 : Imagerie AFM sur des cellules de la souche LMG18311 (a, c) et Δ*rgg*$_{0182}$ (b, d) de *S. thermophilus* cultivées en milieu LM17 à 42°C (a, b) et 50°C (c, d).

Les images obtenues par AFM montrent que les cellules de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* cultivées à 42 ou 50°C présentent une forme ovoïde de 2 à 2,5 µm de long et sont organisées en chaines (Figure 46 a et c). En revanche, celles de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ sont longues de 1 à 1,5 µm et forment des diplocoques aux deux températures étudiées (Figure 46 b et d). Le dénombrement du nombre de cellules par chaines de ces deux souches cultivées à 42 ou 50°C à ainsi été réalisé (Figure 47).

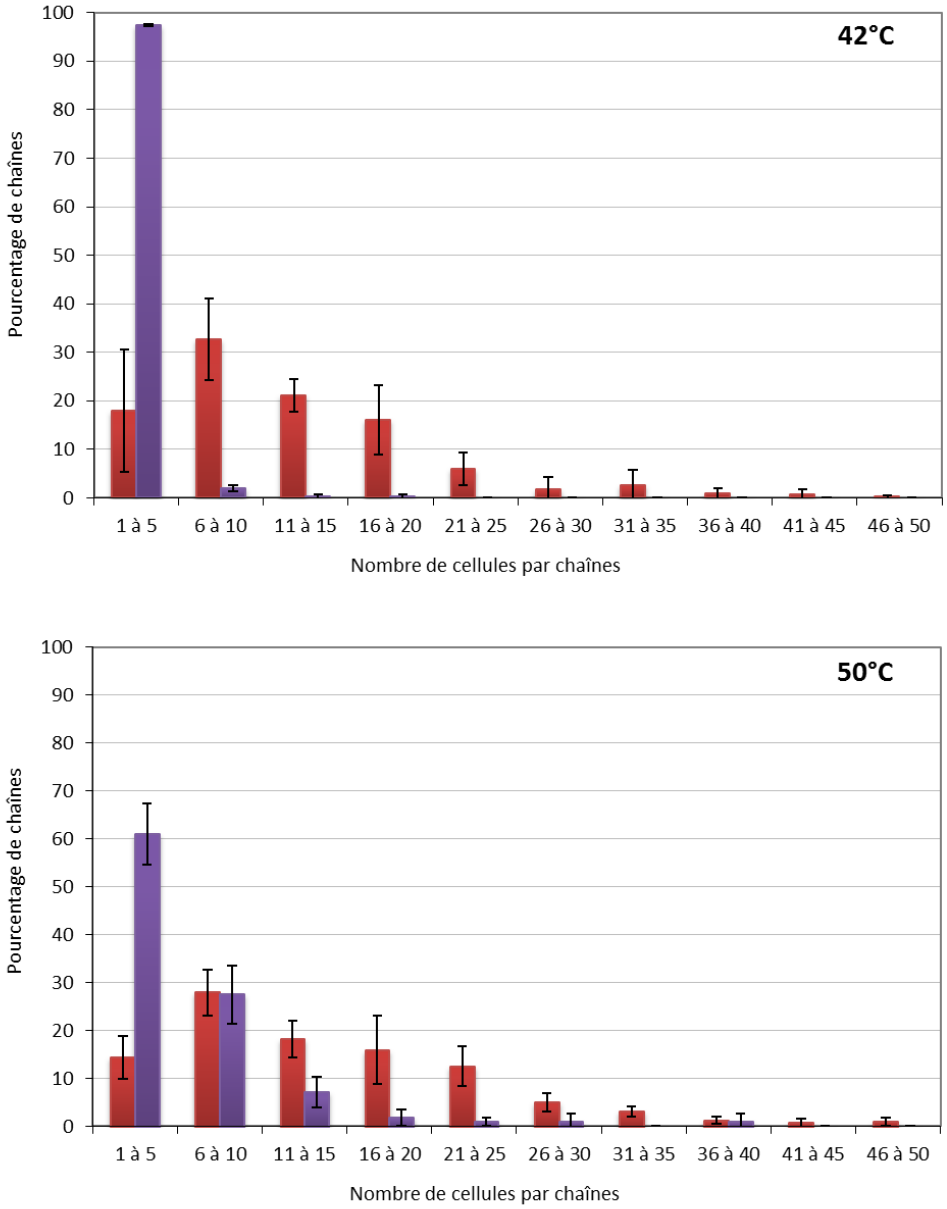


Figure 47 : Histogramme représentant la répartition du nombre de cellules par chaînes des souches LMG18311 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* issues d'une culture en milieu LM17 à 42 et à 50°C. Les valeurs de la souche LMG18311 sont en rouge et celles du mutant Δ*rgg*$_{0182}$ sont en violet. Les résultats représentent la moyenne des valeurs ± la déviation standard de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Lors d'une croissance à 42°C, les cellules de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* sont organisées en chaines constituées de 2 à 20 cellules dans 80% des chaines, avec seulement 18% de chaines comportant moins de 5 cellules. Au contraire, la souche Δ*rgg*$_{0182}$ se développe sous forme de chaines composées dans 97% de 2 à 5 cellules et dans seulement 3 % de chaines composées de 6 à 20 cellules. Lors d'une croissance à 50°C, une augmentation de la longueur des chaines est observée chez le mutant. En effet, alors qu'à 42°C quasiment 100 % des chaines sont composées de 2 cellules, à 50°C, 40% des chaines sont constituées de plus de deux cellules. Ces résultats

suggèrent que la taille des chaines de *S. thermophilus* puisse être influencée de manière thermo-dépendante par la protéine Rgg_{0182}.

L'analyse de la rugosité de surface des cellules de la souche sauvage et de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ lorsqu'elles sont cultivées à 42°C (Tableau 12) ne montre aucune différence. Toutefois, alors que la rugosité de surface des cellules de la souche LMG18311 reste inchangée entre les deux températures, celle de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ est diminuée d'un facteur de 3 à 4 quand la température de croissance passe de 42 à 50°C.

Tableau 12 : Rugosité des surfaces des cellules des souches LMG18311 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* cultivées en milieu LM17 à 42 ou à 50°C.

	42°C	50°C
LMG18311	10,26 ± 1,41	11,20 ± 1,78
Δ*rgg* $_{0182}$	8,73 ± 1,42	2,60 ± 0,37

La rugosité (en nm) a été calculée à partir des imageries AFM de la surface bactérienne. Les résultats indiquent la moyenne des valeurs obtenues par l'analyse de 10 cellules.

2.2.3. Propriétés électrocinétiques et hydrophobes des cellules des souches sauvage et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311

L'une des hypothèses permettant d'expliquer l'adhésion des cellules du mutant Δ*rgg*$_{0182}$, aux bords des puits de la microplaque, est qu'elle résulte d'interactions électrostatiques. Pour le vérifier, des mesures de mobilité électrophorétique ont été réalisées. Cependant, celles-ci n'ont pas permis de discriminer de différence entre la souche sauvage de la souche mutante. En conséquence, cette hypothèse est réfutée.

Une autre hypothèse est que le mutant adhère aux surfaces via des interactions hydrophobes. Afin d'éclaircir les différences des propriétés d'adhésion respectives de la souche sauvage et du mutant Δ*rgg*$_{0182}$, des mesures de forces d'adhésion ont été réalisées sur ces deux souches à 42 et 50°C par microscopie de force chimique (CFM pour Chemical Force Microscopy). Cette technique est dévirée de l'AFM et permet d'observer la présence ou non de molécules sur les surfaces bactériennes mais, également, de déterminer la dynamique et les interactions de ces molécules. Ces mesures permettent ainsi de mettre en évidence des forces d'adhésion spécifique. Dans le cas présent, les cellules ont été cultivées en présence de la pointe AFM (sur laquelle elles se sont fixées) et les forces d'adhésion à une surface hydrophobe de référence ont été mesurées par CFM (Figure 48).

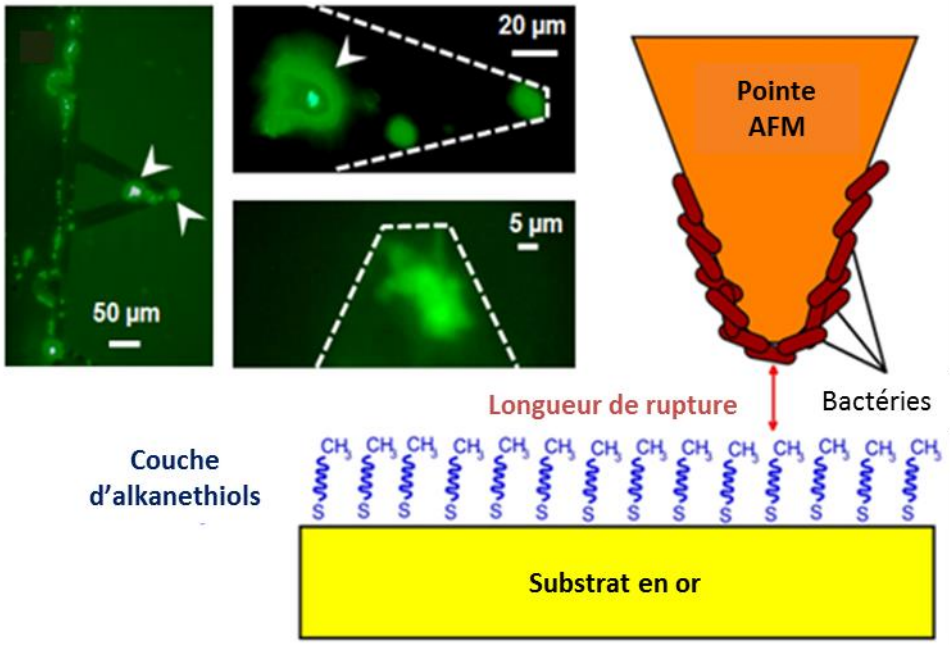


Figure 48 : Schématisation des expériences de CFM décrivant la mesure de la force d'adhésion entre la pointe AFM recouverte de cellules et la surface hydrophobe de référence. La surface hydrophobe de référence est du 1-dodecanethiol (couche d'alkanethiols) auto-assemblé en monocouche sur une surface en or. Les cellules fixées à la pointe AFM ont été marquées à l'aide de SybrGreen II puis photographiées par microscopie à fluorescence. Les flèches blanches indiquent la présence de bactéries vivantes fixées à la pointe AFM.

Les résultats de CFM obtenus se distinguent par la force d'adhésion, la longueur de rupture et le nombre d'évènements de rupture. La force d'adhésion correspond à la force nécessaire pour rompre l'adhésion entre les cellules fixées à la pointe AFM et la surface hydrophobe, qui correspond dans le cas présent à la force d'hydrophobicité existant entre les cellules bactériennes et la surface. La longueur de rupture correspond à la distance séparant la pointe AFM de la surface lorsqu'un évènement de rupture a lieu. Cela correspond généralement à l'étirement moléculaire ou le déroulement de macromolécules situées à la surface de la paroi bactérienne (Quiles *et al.,* 2012). Enfin, le nombre d'évènements de rupture peut être corrélé, quant à lui, au nombre de macromolécules pouvant être présentes à la surface des bactéries. Les résultats de CFM obtenus à 42 et à 50°C pour les souches LMG18311 et Δrgg_{0182} de *S. thermophilus* sont présentés dans la figure 49.

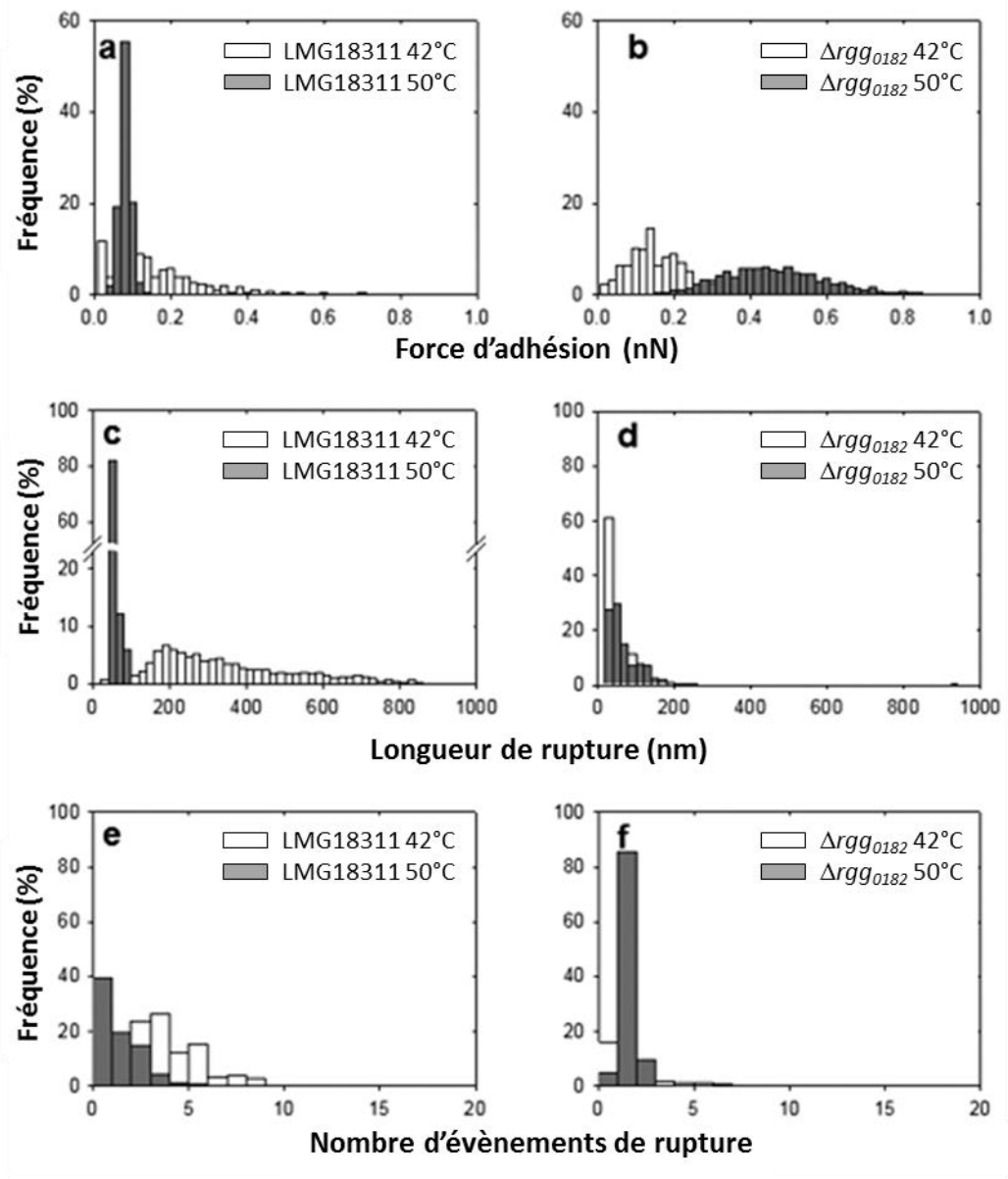


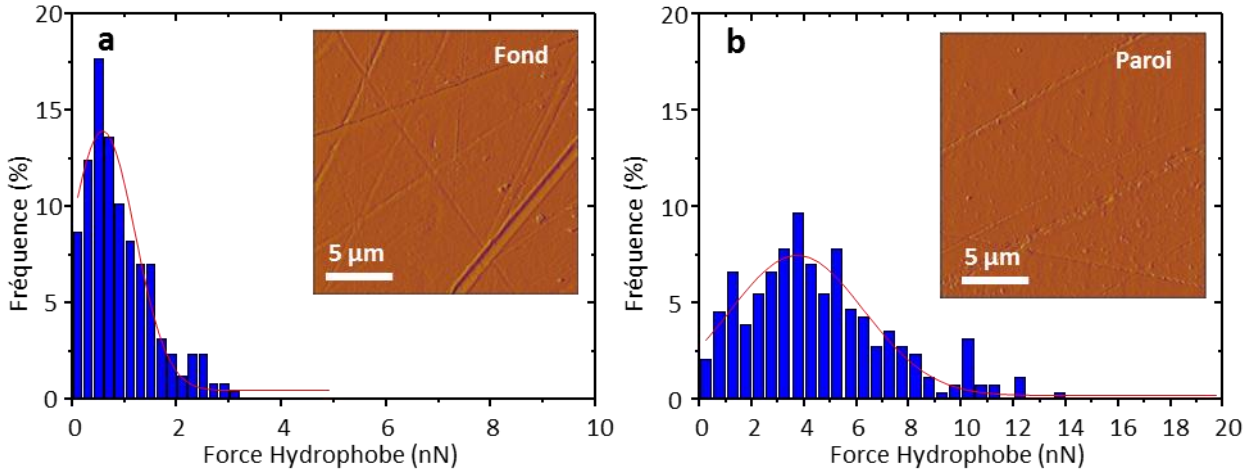
Figure 49 : Distribution statistique de la force d'adhésion, de la longueur de rupture et du nombre d'évènements de rupture à 42°C et 50°C obtenus par l'analyse des interactions des forces CFM entre les cellules sauvages ou mutantes Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311 et la surface hydrophobe de référence. Distribution statistique de la force d'adhésion (a, b), de la longueur de rupture (c, d) et du nombre d'évènements de rupture (e, f) entre la souche LMG18311 de *S thermophilus* (a, c, e) ou Δ*rgg*$_{0182}$ (b, d, f) et la surface hydrophobe à 42°C (barre blanche) et à 50°C (barre grise).

Pour les cellules de la souche sauvage, la force d'adhésion ne change pas de manière significative entre 42 et 50°C (respectivement 0,12 ± 0,04 nN et 0,08 ± 0,01 nN) (Figure 49 a). Au contraire, la force d'adhésion des cellules de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ augmente significativement de 0,13 ± 0,07 nN à 0,44 ± 0,13 nN à respectivement 42°C et 50°C (Figure 49 b). Ainsi, la force d'adhésion des cellules de la souche mutante augmente avec l'augmentation de la température. Ces résultats suggèrent que l'adhésion des cellules du mutant Δ*rgg*$_{0182}$ à la surface des puits est générée par des interactions de type hydrophobe modulées par la température.

Par ailleurs, cette analyse montre que de multiples évènements de rupture ont lieu pour la souche LMG18311 de *S. thermophilus* (Figure 49 e), indiquant la présence de macromolécules sur la surface cellulaire. De plus, à 42°C, les macromolécules mesurent 100 à 800 nm tandis qu'à 50°C elles sont plus courtes (jusqu'à 100 nm) (Figure 49 c). La température module donc la structure macromoléculaire de la surface des cellules de type sauvage. Au contraire, les cellules de la souche Δrgg_{0182} présentent peu d'évènements de rupture, ce qui peut correspondre à une interaction non spécifique et, plus exactement, à l'adhésion hydrophobe à la surface hydrophobe (Figure 49 e, f). De plus, dans le cas du mutant, les mesures de CFM ne révèlent aucune différence significative de la longueur des macromolécules entre les deux températures. L'ensemble de ces données suggèrent que la nature des macromolécules observées à la surface des cellules diffère avec la température.

2.2.4. Rugosité et hydrophobicité de la surface des puits des microplaques

La technique AFM utilisant des pointes hydrophobes (CFM) a également été utilisée pour étudier la surface des puits de la microplaque. L'analyse des images topographique obtenues ainsi que les mesures d'hydrophobicité réalisées sur le fond et la paroi des puits de la microplaque sont présentés dans la figure 50.



<u>Figure 50 :</u> Imagerie et mesure de la force hydrophobe réalisées par CFM sur le fond (a) et la paroi (b) des puits des microplaques utilisées pour les croissances en Bioscreen C.

L'analyse des images topographiques obtenues par CFM révèle que la rugosité du fond (23,67 ± 1,64 nm) et celle de la paroi (17,63 ± 1,02 nm) du puits de la microplaque diffèrent de manière significative. De plus, la mesure de la force d'adhésion entre ces surfaces et la pointe AFM suggère que le fond du puits est moins hydrophobe que la paroi du puits de la microplaque, avec des valeurs de respectivement 0,57 ± 0,06 nN et 3,74 ± 0,17 nN. Les différences observées entre le fond et la paroi du puits peuvent expliquer en partie pourquoi, dans certaines conditions, les

cellules de la souche mutante présentent des propriétés d'adhésion aux parois du puits plus importantes.

Par ailleurs, l'analyse topographique par AFM de la surface d'un tube de type Falcon révèle que ces derniers sont striés de manière régulière et présentent une rugosité de 29 nm ainsi qu'une force d'adhésion hydrophobe de 1,18 ± 0,06 nN (Figure 51).

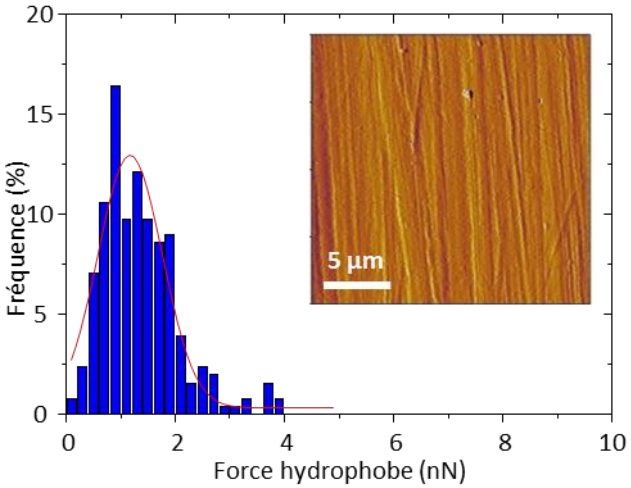


Figure 51 : Imagerie et mesure AFM de la force hydrophobe de la paroi de tubes de marque Falcon.

Ainsi, la rugosité des tubes de marque Falcon est plus élevée que celle du fond des puits de la microplaque et l'hydrophobicité, bien que légèrement supérieure à celle du fond des puits de la microplaque, est nettement plus faible que celle des parois des puits de la microplaque.

L'ensemble de ces données expliquent pourquoi le phénotype d'adhésion thermo-induit de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ est observé uniquement lors d'une culture en microplaque. Les différents résultats obtenus durant cette étude suggèrent que la surface des cellules de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ acquière en fin de phase exponentielle de croissance des propriétés hydrophobes accrues leurs permettant d'adhérer préférentiellement aux parois hydrophobes du puits de la microplaque.

3. La protéine Rgg$_{0182}$ est un régulateur global de l'expression génique de *S. thermophilus* LMG18311

3.1. Etude du régulon de la protéine Rgg$_{0182}$

Les données de la littérature démontrent que plusieurs des protéines Rgg participent à la régulation globale de l'expression génique (Chaussee *et al.,* 2002 ; Chaussee *et al.,* 2004 ; Samen *et al.,* 2006 ; Bortoni *et al.,* 2009 ; Zheng *et al.,* 2011). Par ailleurs, les données concernant la protéine Rgg$_{0182}$ de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* mettent en évidence sa participation dans la régulation transcriptionnelle de gènes impliqués dans différentes fonctions biologique (réponse au stress thermique, adhésion thermo-régulée) et qui sont localisés au sein de différents loci sur le

génome. Ainsi, la protéine Rgg_{0182} pourrait elle aussi prendre part à la régulation globale de la transcription génique de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*.

Afin de vérifier cette hypothèse, une approche comparative du protéome de la souche LMG18311 et de son dérivé, le mutant Δrgg_{0182}, a été réalisée. Pour cela, les protéines de ces deux souches ont été extraites en phase stationnaire de croissance à partir d'une culture réalisée en milieu MCD à 30°C, condition dans laquelle le taux de transcrit du gène rgg_{0182} est maximal. Les protéines, issues essentiellement du cytoplasme, ont ensuite été séparées en fonction de leurs tailles, à l'aide d'un SDS-PAGE, puis digérées par la trypsine. L'identification des peptides ainsi obtenus a été réalisée à l'aide de chromatographie LC-MS/MS et plus spécifiquement par la technique dite de « mass matching » ou empreinte de fragmentation. Cette technique permet de comparer les masses mesurées des peptides obtenus par digestion avec les masses théoriques de fragmentation générées à partir d'une base de données protéiques de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*. Par cette approche, 585 protéines distinctes ont pu être identifiées à partir d'au minimum deux peptides différents les constituants.

Par ailleurs, cette méthode permet une quantification relative de la concentration protéique sans marquage. En effet, l'abondance d'une protéine donnée est corrélée avec le nombre de spectres et donc de peptides permettant son identification. Cette méthode, semi-quantitative, est appelée « spectral counting » et utilise le nombre de peptides uniques pour l'identification d'une protéine donnée au sein de l'échantillon comme mesure de l'abondance relative de cette dernière (Liu *et al.,* 2004 ; Zybailov *et al.,* 2005). L'analyse statistique (test de student, p-value < 0,1) comparative du nombre de peptides a permis l'observation de différence significative de la quantité de 65 protéines entre les souches sauvage et mutante Δrgg_{0182} (Annexe 3). Ces protéines ont été répertoriées en fonction de leurs COG (pour Clusters of Orthologous Group) qui regroupent des protéines paralogues (Tatusov *et al.,* 1997 ; Tatusov *et al.,* 2003). La classification de ces 65 protéines révèle qu'elles appartiennent à une grande variée de COG (Figure 52).

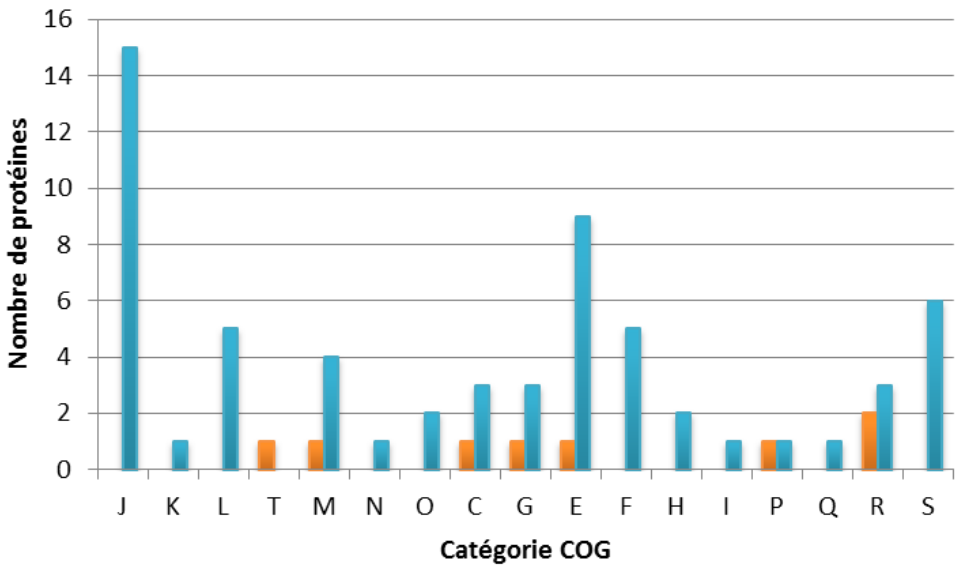


Figure 52 : Répartition au sein de COG des protéines identifiées par LC-MS/MS dont l'abondance diffère entre la souche LMG1831 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* de manière significative. J: traduction, biogenèse et structure des ribosomes ; K : transcription ; L : réplication, recombinaison et réparation de l'ADN ; T : mécanisme de transduction du signal ; M : biogénèse de la paroi, de la membrane et de l'enveloppe cellulaire ; N : mobilité cellulaire ; O : modification post-transcriptionnelle, renouvellement protéique, chaperonnes ; C : production et conversion de l'énergie ; G : métabolisme et transport des carbohydrates ; E : métabolisme et transport des acides aminés ; F : métabolisme et transport des nucléotides ; H : métabolisme des coenzymes ; I : métabolisme et transport des lipides ; P : métabolisme et transport d'ion inorganique; Q : biosynthèse, transport et catabolisme des métabolites secondaires ; R : prédiction de fonction générale, S : fonction inconnue. Les histogrammes en bleu correspondent aux protéines dont la quantité est plus importante chez la souche LMG18311 que chez le mutant Δ*rgg*$_{0182}$ et en orange, celles qui sont plus abondantes chez le mutant Δ*rgg*$_{0182}$ que chez la souche sauvage.

Parmi les protéines différentiellement exprimées, 21 participent au stockage et à la transformation de l'information cellulaire : 15 sont impliquées dans la traduction, la biosynthèse et la structure des ribosomes (COG : J), 1 est impliquée dans la transcription (COG : K) et 5 dans la réplication, recombinaison et réparation de l'ADN (COG : L). De plus, 9 de ces protéines participent aux processus cellulaires et à la signalisation : 1 dans le mécanisme de la transduction de signal (COG : T), 5 dans la biosynthèse de la paroi et de la membrane cellulaire (COG : M), 1 dans la mobilité cellulaire (COG : N) et 2 dans la modification post-transcriptionnelle, le renouvellement protéique et les chaperonnes (COG : O). En outre, 29 des protéines identifiées participent au métabolisme : 4 sont impliquées dans la production et la conversion d'énergie (COG : C), 4 dans le métabolisme des carbohydrates, 10 dans celui des acides aminées, 5 dans celui des nucléotides, 2 dans celui des coenzymes, 1 dans le métabolisme des lipides, 2 dans le métabolisme des ions inorganiques et 1 dans la biosynthèse, le transport et le catabolisme des métabolites secondaire. Par ailleurs, 9 protéines de fonction inconnue ont été identifiées. Parmi toutes ces protéines, certaines ont la particularité d'être classées dans plusieurs COG, comme la protéine DeaD appartenant aux COG L, K et J.

Au sein des 65 protéines identifiées, 57 protéines sont plus abondantes chez la souche

LMG18311 que chez le mutant Δ*rgg*$_{0182}$. Au contraire, seules 8 protéines sont retrouvées en quantité plus importante chez le mutant Δ*rgg*$_{0182}$ par rapport à la souche sauvage. Ces données suggèrent que la délétion du gène *rgg*$_{0182}$ entraine majoritairement une diminution de la production des protéines cibles.

L'ensemble de ces résultats soutiennent l'hypothèse selon laquelle la protéine Rgg$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311 est impliquée dans la régulation génique globale.

3.2. Etude transcriptomique du régulon de la protéine Rgg$_{0182}$

Afin de vérifier l'implication de la protéine Rgg$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311 dans la régulation de la production des protéines mises en évidence par l'expérience de LC-MS/MS effectuée sur les protéomes des souches sauvages et Δ*rgg*$_{0182}$, la transcription des gènes codant certaines des protéines identifiées a été étudiée. Pour cela, les ARN totaux des deux souches, sauvage et Δ*rgg*$_{0182}$, ont été extraits de cellules en phase stationnaire de croissance cultivées à 30°C en milieu MCD, condition utilisée pour la comparaison des protéomes. Ces ARN ont ensuite été rétro-transcrits puis quantifiés par qPCR.

3.2.1. Validation du choix du gène rapporteur utilisé pour les expériences de PCR quantitative

L'une des méthodes les plus utilisées pour étudier la transcription de gènes est la RT-PCR quantitative (RT-qPCR) qui permet de déterminer le nombre de transcrit d'un gène donné dans différentes conditions. Cependant, afin de s'affranchir des variations générées par les manipulations, telles que l'efficacité de l'extraction des ARN ou de la rétro-transcription, la normalisation des données par un gène interne, appelé gène rapporteur, est nécessaire. Toutefois, la stabilité de la transcription de ce gène doit être vérifiée dans les conditions étudiées.

Ainsi, la stabilité de la transcription de quatre gènes rapporteurs, utilisés dans différentes étude chez *S. thermophilus*, a été analysée chez la souche LMG18311 et le mutant Δ*rgg*$_{0182}$: le gène *ldh* codant la lactate déshydrogénase (Fernandez *et al.,* 2004), le gène *gyrA* codant la sous-unité A de la gyrase (Thevenard *et al.,* 2011), le gène *sigma70/32* codant le facteur de transcription sigma 70 (Galia 2011) et le gène *murE* codant la UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamate--L-lysine ligase E (Herve-Jimenez *et al.,* 2008). Ces gènes codent des protéines impliquées dans des fonctions biologiques différentes et sont localisés sur différents loci du génome de *S. thermophilus*, minimisant les risques de co-transcription. Le nombre de transcrit de ces quatre gènes a été mesuré par qPCR pour les deux conditions étudiées en triplicat biologique. Le programme NormFinder (Andersen *et al.,* 2004) a été utilisé afin de déterminer quel gène a la transcription la plus stable parmi les quatre gènes étudiés. La « Stability value » (NormFinder) est inversement corrélée à la stabilité de la transcription des gènes candidats. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Stabilité des transcrits des gènes de référence candidats : *murE*, *ldh*, *sigma70* et *gyrA* évaluée à l'aide des logiciel NormFinder.

NormFinder (Stability value)			
murE	*sigma70*	*gyrA*	*ldh*
0,128	0,129	0,131	0,222

Ainsi, la stabilité des transcrits du gène *ldh* est nettement inférieure aux 3 autres gènes étudiés. Les résultats obtenus par l'analyse NormFinder indiquent que le gène *murE* présente la meilleure stabilité de transcription. Toutefois, les valeurs de stabilité des transcrits des gènes *murE*, *gyrA* et *sigma70* sont quasiment identiques. Afin de déterminer parmi ces 3 gènes lequel possède la plus grande stabilité de transcrits, la variation du nombre de transcrits de ces gènes a été analysée et les résultats sont présentés dans la figure 53.

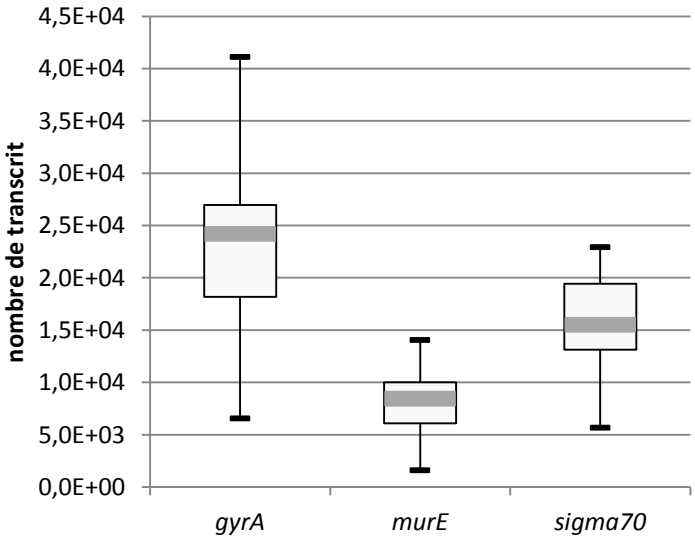


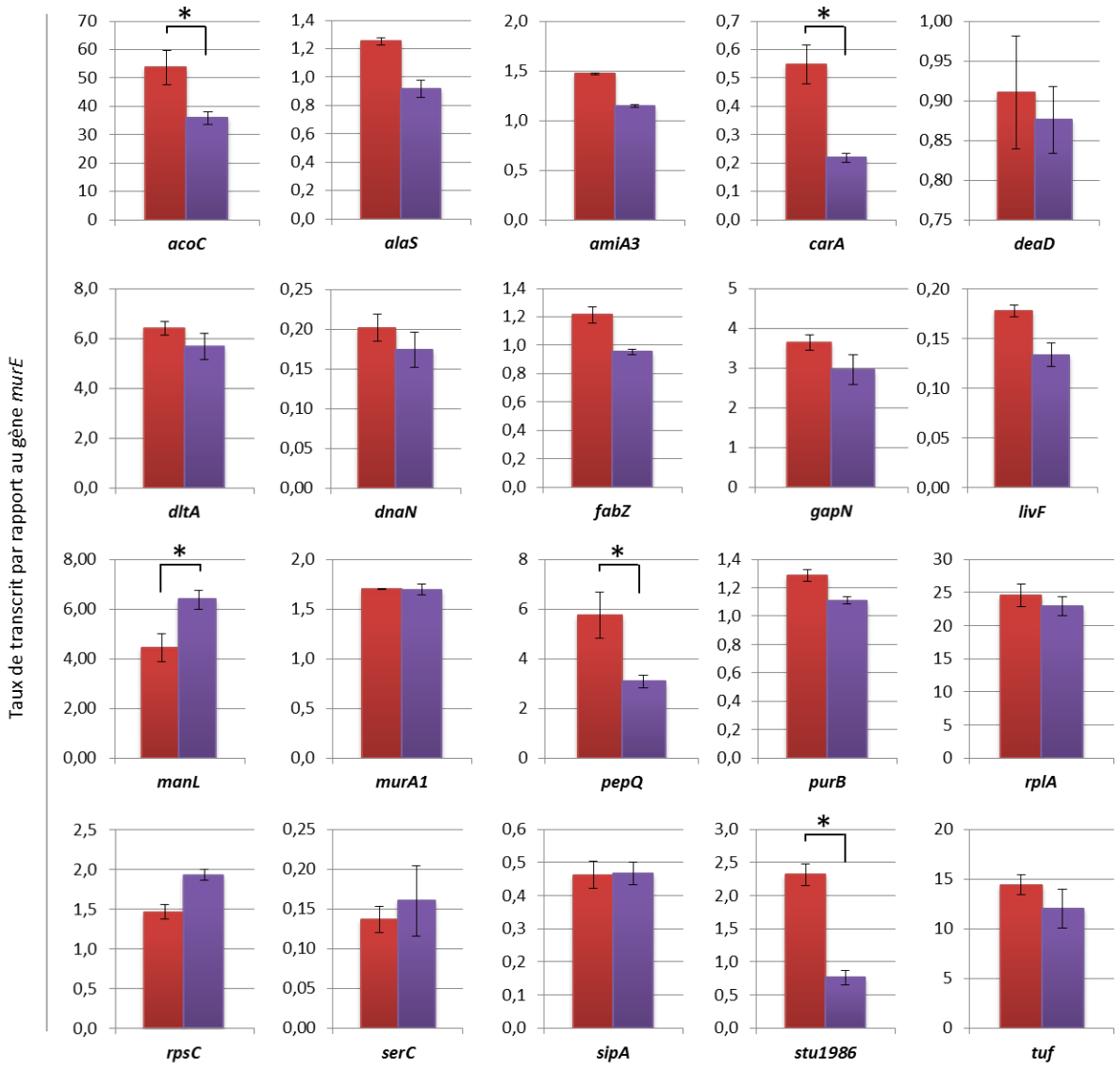
Figure 53 : Variation du nombre de transcrits des gènes candidats *murE*, *gyrA* et *sigma70*. Le nombre de transcrits des gènes est indiqué par la médiane représenté par le rectangle gris, le premier et le quatrième quartile sont indiqués par la boite et les extrêmes par les moustaches.

Le gène dont la transcription présente le moins de variation dans les conditions testées est le gène *murE*. Il a donc été choisi comme gène rapporteur.

3.2.2. Etude de la transcription des gènes cibles putatifs de la protéine Rgg_{0182}

Afin de vérifier si la transcription des gènes codant les 65 protéines différentiellement exprimées au sein des souches sauvage et Δrgg_{0182} est régulée par la protéine Rgg_{0182}, la transcription de certains de ces gènes a été étudiée dans un contexte sauvage et Δrgg_{0182} par qPCR. Pour cela, les 20 gènes cibles putatifs suivants ont été sélectionnés sur différents critères (appartenance à des COG différents, ratio mutant/sauvage du nombre de peptides permettant

l'identification de la protéines par LC-MS/MS, valeur de p-value au t-test) : *acoC*, *alaS*, *amiA3*, *carA*, *deaD*, *dltA*, *dnaN*, *fabZ*, *gapN*, *livF*, *manL*, *murA1*, *pepQ*, *purB*, *rplA*, *rpsC*, *serC*, *sipA*, *stu1986* et *tuf*. Le taux de transcrit de ces gènes a été mesuré par qPCR sur des cellules en phase stationnaire de croissance issues d'une culture réalisée sur les souches sauvage et Δrgg_{0182} en milieu MCD à 30°C. L'expérience a été réalisée à partir de 3 cultures indépendantes en duplicat (figure 54).



<u>Figure 54 :</u> Taux de transcrit relatif de gènes de *S. thermophilus* sur des cellules en phase stationnaire de croissance dont la croissance a été réalisée en milieu MCD à 30°C. Les ARN totaux ont été extraits à partir des cellules de la souche sauvage (barres rouges) et du mutant Δrgg_{0182} (barres violettes). Les résultats correspondent à la moyenne des valeurs ± l'écart-type de moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. * : différence d'un facteur ≥ 1,5 et test de Student $p < 0,0525$.

Ces résultats montrent que, dans les conditions testées, les gènes *acoC*, *carA*, *pepQ* et *stu1986* sont moins abondants chez le mutant Δrgg_{0182} par rapport à la souche sauvage tandis que le gène *manL* est sur-transcrit chez le mutant Δrgg_{0182} par rapport à la souche sauvage. En effet, la

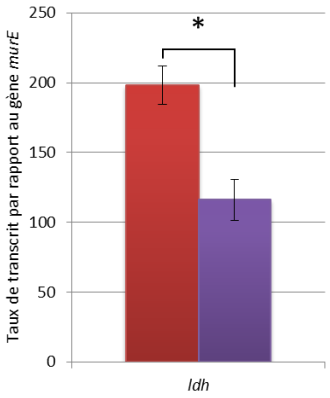
différence du taux de transcrit entre les deux souches varie de 1,5 à 3 fois, selon le gène considéré, de manière significative ($p < 0.0525$) (tableau 14), sachant qu'une différence de l'ordre de 1,5 fois du taux de transcrit est considéré comme ayant une signification biologique (Yuan *et al.,* 2005).

Tableau 14 : Taux de transcrit relatif au gène *murE* des gènes de *S. thermophilus* sur des cellules en phase stationnaire de croissance dont la croissance a été réalisée en milieu MCD à 30°C.

	LMG18311	Δrgg_{0182}	ratio WT/m	*p*-value	Catégorie GOG
acoC	5,36E+01 ± 6,17E+00	3,58E+01 ± 2,12E+00	1,50	0,05247	C
carA	5,47E-01 ± 6,81E-02	2,18E-01 ± 1,56E-02	2,51	0,00930	EF
manL	4,33E+00 ± 5,52E-01	6,45E+00 ± 3,82E-01	0,67	0,04460	G
pepQ	5,75E+00 ± 9,3E-01	3,08E+00 ± 2,67E-01	1,86	0,05139	E
stu1986	2,32E+00 ± 1,62E-01	7,64E-01 ± 1,08E-01	3,03	0,00134	S
ldh	1,98E+02 ± 1,38E+01	1,16E+02 ± 1,45E+01	1,70	0,01497	C

Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage et du mutant Δrgg_{0182}. Les taux de transcrits correspondent à la moyenne des valeurs ± l'écart-type de moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. Le ratio WT/m correspond au ratio du taux de transcrit du gène d'intérêt chez la souche LMG18311 par rapport à celui chez la souche Δrgg_{0182}. Les valeurs de p-value sont celles obtenues suite à la réalisation d'un test de Student.

De plus, la comparaison du taux de transcrit du gène *ldh* a été réalisée bien que celui-ci était un gène candidat pour la normalisation de la transcription. Une différence significative d'un facteur de 1,7 est observée entre les deux conditions, indiquant que la transcription du gène *ldh* est sous la dépendance du gène rgg_{0182} dans la condition testée (Figure 55).



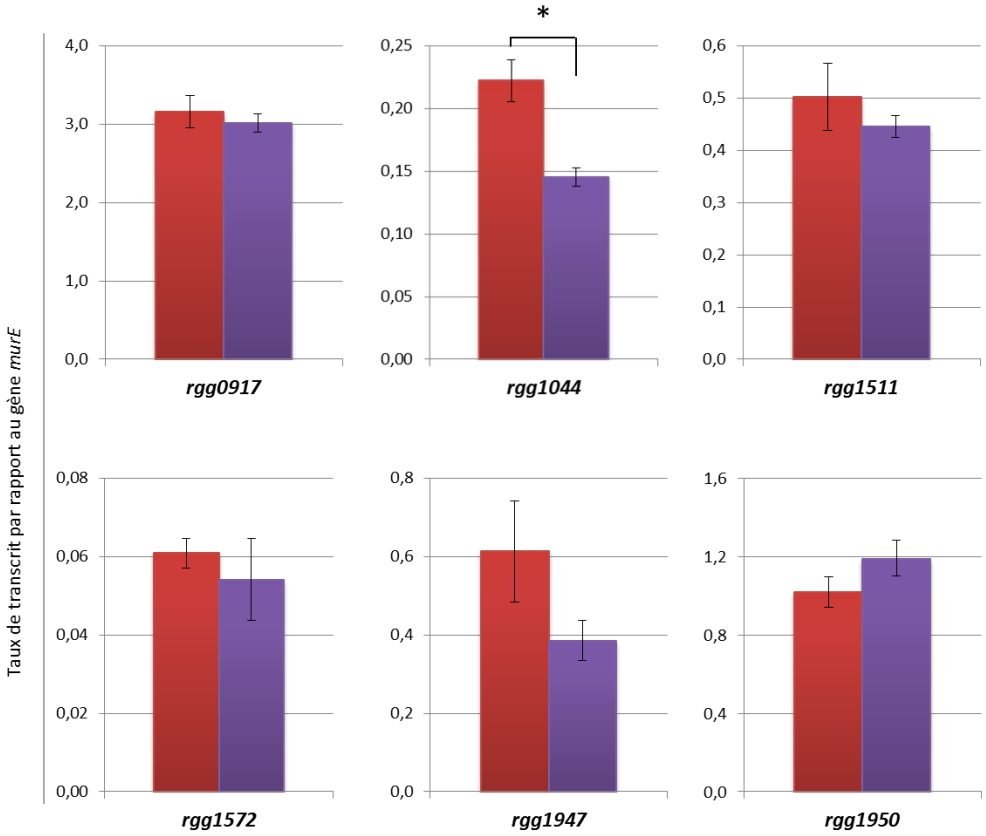
<u>Figure 55 :</u> Taux de transcrit relatif du gène *ldh* de *S. thermophilus* sur des cellules en phase stationnaire de croissance cultivées en milieu MCD à 30°C. Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage (barres rouges) et du mutant Δrgg_{0182} (barres violettes). Les résultats correspondent à la moyenne des valeurs ± l'écart-type de moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. * : différence d'un facteur ≥ 1,5et test de de Student $p < 0,0525$.

Par ailleurs, les taux de transcrits observés pour les différents gènes testés possèdent les mêmes tendances lorsqu'ils sont normalisés par les gènes rapporteur *gyrA* ou *sigma70*, confirmant ainsi les résultats obtenus.

Ces expériences ont permis de valider l'implication de la protéine Rgg_{0182} dans la régulation de la transcription des gènes *acoC*, *carA*, *ldh*, *manL*, *pepQ* et *stu1986*. Ces gènes appartiennent à des catégories COG différentes, suggérant ainsi que la protéine Rgg_{0182} serait un régulateur global de l'expression génique de *S. thermophilus* LMG18311.

3.2.3. Implication de la protéine Rgg_{0182}dans la régulation de la transcription d'autre gène *rgg*

La présence de 7 gènes *rgg* distincts au sein du génome de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* pose la question d'une possible régulation croisée entre les différents gènes *rgg*. En effet, la protéine Rgg_{0182} pourrait participer à la régulation transcriptionnelle d'un autre gène *rgg* présent sur le génome. Afin de vérifier cette hypothèse, la transcription des autres gènes *rgg* de *S. thermophilus* LMG18311 a été étudiée par qPCR sur des cellules en phase stationnaire de croissance cultivée en milieu MCD à 30°C (condition dans laquelle le gène rgg_{0182} est le plus transcrit). L'expérience a été réalisée à partir de 3 cultures indépendantes en duplicat (figure 56).



<u>Figure 56 :</u> Taux de transcrit relatif de gènes *rgg* de *S. thermophilus* sur des cellules en phase stationnaire de croissance cultivées en milieu MCD à 30°C. Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage (barres rouges) et du mutant Δrgg_{0182} (barres violettes). Les résultats correspondent à la moyenne des valeurs ± l'écart-type de moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. * : différence d'un facteur ≥1,5 et test de Student $p < 0,0525$.

Parmi les 6 autres gènes *rgg* présents sur le génome de *S. thermophilus* LMG18311, seul le gène rgg_{1044} présente un taux de transcrit significativement différent d'un facteur de 1,53 (*p* value = 0,0113) entre les conditions sauvage et mutant Δ*rgg0182*. Ainsi la protéine Rgg_{0182} régulerait positivement la transcription du gène rgg_{1044}. Cette donnée suggère que la protéine Rgg_{0182} serait impliquée dans un réseau de régulation impliquant la régulation d'autre régulateurs transcriptionnels Rgg, rendant leur étude d'autant plus complexe.

4. La transcription des gènes *rgg* de *S. thermophilus* LMG18311 est dépendante des conditions environnementales

L'étude de la transcription du gène rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311, sur des cellules cultivées dans différentes conditions de croissance, a révélé qu'elle était influencée à la fois par le milieu de culture et par la température à laquelle *S. thermophilus* est soumise (Henry 2011). Ainsi, la transcription des autres gènes appartenant à la famille *rgg* présents au sein du génome de *S. thermophilus* LMG18311 pourrait être elle aussi sous la dépendance des conditions environnementales. Afin de vérifier cette hypothèse, la transcription des 7 gènes *rgg* du génome de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* a été étudiée dans différentes conditions. Pour cela, la transcription des gènes rgg_{0182}, rgg_{0917}, rgg_{1044}, rgg_{1511}, rgg_{1572}, rgg_{1947} et rgg_{1950} a été analysée par des expériences de qPCR, utilisant comme matrice des ARN totaux extraits de cellules cultivées dans différentes conditions. Les conditions choisies sont : (i) deux milieux de culture (le lait et un milieu chimiquement défini appelé MCD) ; (ii) trois températures de croissance (30°C, 42°C et 50°C, température fréquemment utilisée lors des procédés industriels) ; (iii) 2 phases de croissance (milieu de la phase exponentielle et début de la phase stationnaire). Les ARN extraits lors des croissances dans ces différentes conditions ont été rétro-transcrits puis quantifiés par des expériences de qPCR. Les expériences de qPCR ont été réalisées, en duplicat, à partir de trois extractions d'ARN totaux indépendantes (6 mesures par gènes et par conditions).

4.1. Validation du choix du gène rapporteur utilisé pour les expériences de PCR quantitative

Les variations de l'environnement peuvent entrainer une forte modulation du transcriptome de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*, aussi bien, en terme de quantité de transcrits pour un gène donné, qu'en en terme de nature des gènes transcrits (un gène pouvant être transcrit dans une condition et pas dans une autre). La comparaison de la transcription des gènes *rgg* dans de nombreuses conditions de croissance nécessite donc une normalisation par un gène rapporteur dont la transcription reste stable dans les conditions étudiées. Ainsi, la transcription de différents gènes rapporteurs candidats (*ldh*, *gyrA*, *sigma70* et *murE*) a été analysée dans les différentes conditions choisies.

Le nombre de transcrits de ces quatre gènes a été mesuré par qPCR pour toutes les conditions étudiées en triplicat biologique. Le programme NormFinder (Andersen *et al.,* 2004) a été utilisé afin de déterminer quel gène a la transcription la plus stable parmi les quatre gènes étudiés. La « Stability value » (NormFinder) est inversement corrélée à la stabilité de la transcription des gènes candidat. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Stabilité de la transcription des gènes de références candidats : *murE*, *ldh*, *sigma70* et *gyrA* évaluée à l'aide des logiciel NormFinder.

NormFinder (Stability value)			
sigma70	*gyrA*	*murE*	*ldh*
0,267	0,269	0,402	0,475

Les valeurs obtenues indiquent que les transcrits des gènes *ldh* et *murE* sont les moins stables dans les différentes conditions étudiées. Au contraire, les transcrits des gènes *sigma70* et *gyrA* présentent une stabilité nettement plus forte. Arbitrairement, le gène *sigma70* a été utilisé comme gène rapporteur, sachant que les taux de transcrits des différents gènes *rgg* de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* normalisés par le gène *gyrA* sont similaires à ceux obtenus par le gène s*igma70*.

4.2. La transcription des gènes *rgg* de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* est dépendante des conditions environnementales

Les taux relatifs de transcrits des gènes *rgg* observés dans les différentes conditions de températures (30, 42 et 50°C), de milieux (lait et MCD) et de phases de la croissance (milieu de phase exponentielle et début de phase stationnaire) révèlent que les 7 gènes *rgg* sont transcrits dans les conditions testées, suggérant qu'ils jouent un rôle dans ces conditions. Les taux de transcrits ont été analysés statistiquement par un test d'ANOVA (Analysis Of Variance) couplé à un test de tukey et sont présentés dans les figures 57 à 63.

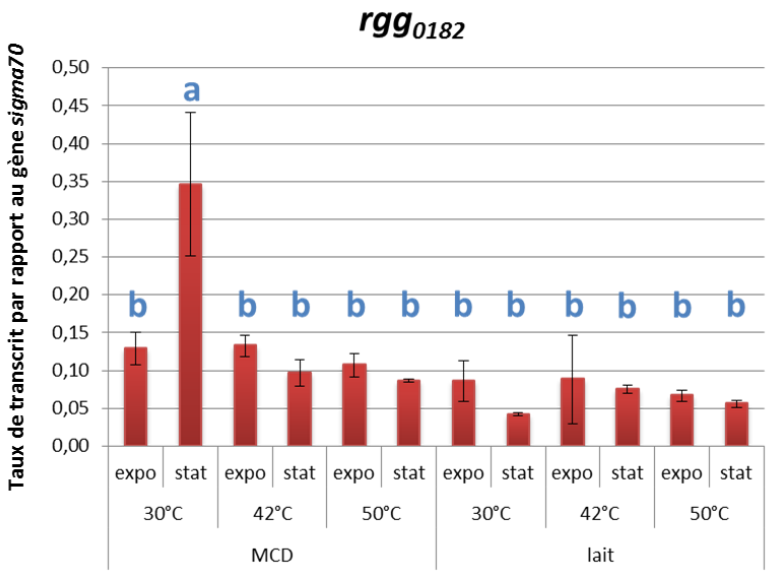


Figure 57 : Taux de transcrit relatif du gène *rgg0182* de *S. thermophilus* LMG18311 cultivée en milieu MCD ou lait à 30°C, 42°C ou 30°C. Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage en phase exponentielle (expo) et en phase stationnaire (stat). Les résultats correspondent à la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. a, b : catégories statistiques significativement différentes entre-elles générées par un test LSD suite à l'analyse par ANOVA, $p \leq 0,05$.

L'analyse du taux de transcrit du gène *rgg0182* dans les différentes conditions révèle que, quel que soit le milieu et la température considérée, ce gène présente une transcription similaire en phase exponentielle et stationnaire de croissance, excepté en milieu MCD à 30°C où son taux de transcrit augmente d'un facteur 2,6 entre les phases exponentielle et stationnaire de croissance. Le taux de transcrit maximum pour ce gène est observé en phase stationnaire lors d'une culture en milieu MCD à 30°C. Ces résultats sont cohérent avec ceux précédemment obtenus par Romain Henry (Henry 2011).

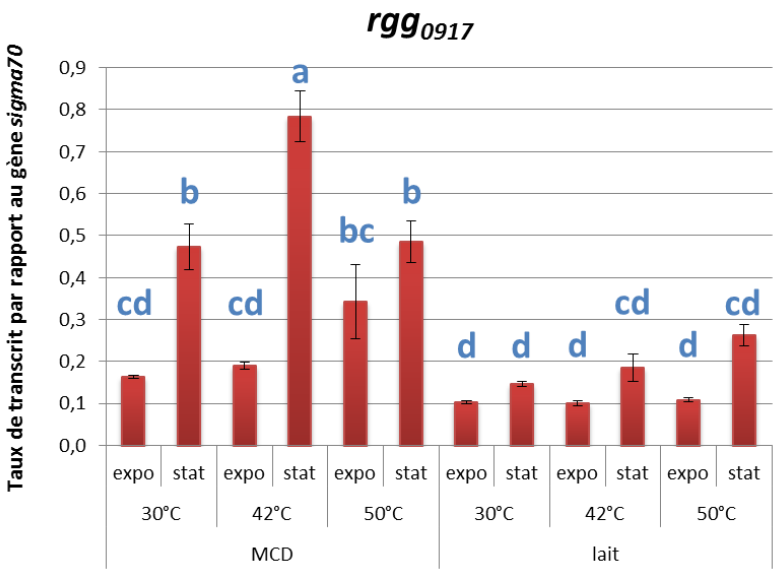


Figure 58 : Taux de transcrit relatif du gène *rgg*$_{0917}$ de *S. thermophilus* LMG18311 cultivée en milieu MCD ou lait à 30°C, 42°C ou 30°C. Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage en phase exponentielle (expo) et en phase stationnaire (stat). Les résultats correspondent à la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. a, b, c, d : catégories statistiques significativement différentes entre elles générées par un test LSD suite à l'analyse par ANOVA, $p \leq 0,05$.

L'analyse du taux de transcrit du gène *rgg*$_{0917}$ dans les différentes conditions révèle qu'en milieu MCD, à 30°C et à 42°C, le taux de transcrit augmente au cours de la croissance respectivement d'un facteur 2,89 et 4,12, ainsi qu'en milieu lait à 50°C avec un facteur 2,42 (test de student, $p \leq 0,05$). Dans les autres conditions, la même tendance est observée mais les différences ne sont pas assez marquées pour être significatives (test de student, $p \leq 0,05$). Par ailleurs, le taux de transcrit du gène *rgg*$_{0917}$ est majoritairement plus élevé en milieu MCD qu'en milieu lait, et principalement en phase stationnaire, avec un maximum de transcription en phase stationnaire de croissance à 42°C.

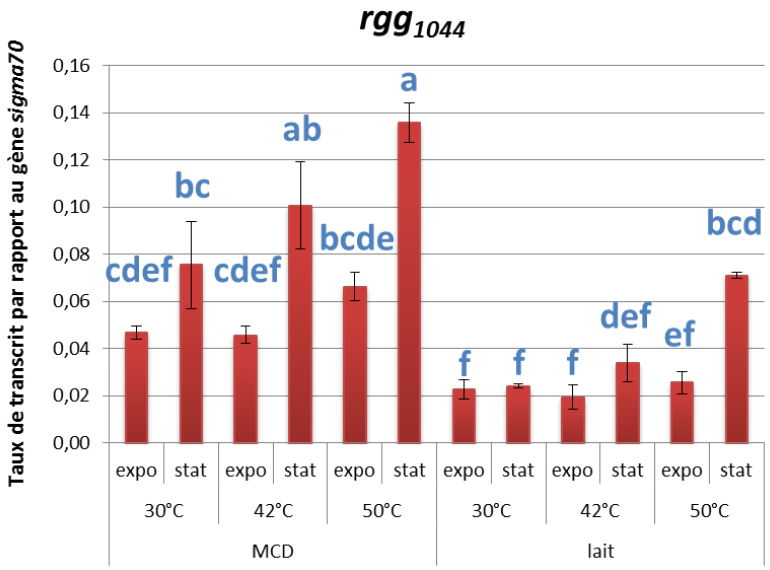
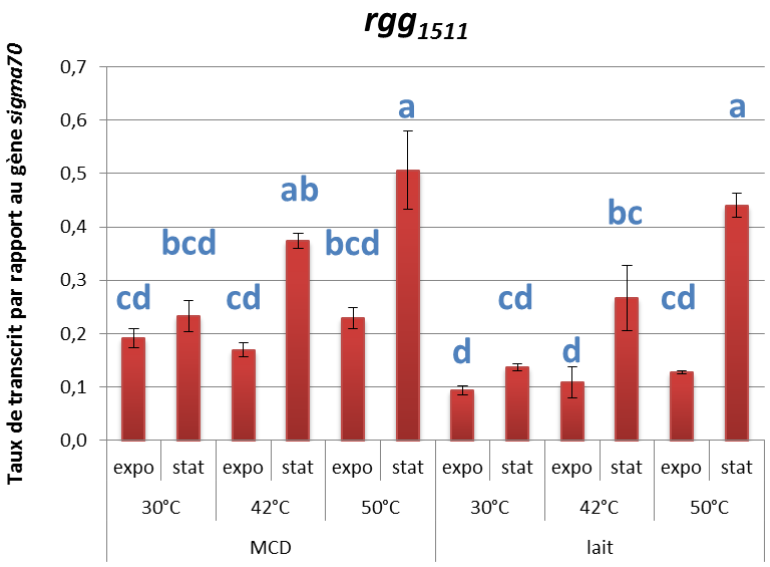


Figure 59 : Taux de transcrit relatif du gène *rgg*$_{1044}$ de *S. thermophilus* LMG18311 cultivée en milieu MCD ou lait à 30°C, 42°C ou 30°C. Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage en phase exponentielle (expo) et en phase stationnaire (stat). Les résultats correspondent à la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. a, b, c, d, e, f : catégories statistiques significativement différentes entre elles générées par un test LSD suite à l'analyse par ANOVA ≤ 0,05.

L'analyse du taux de transcrit du gène *rgg*$_{1044}$ dans les différentes conditions révèle qu'en milieu MCD, quelle que soit la température considérée, le taux de transcrit augmente au cours de la croissance. Toutefois, l'augmentation n'est statistiquement significative qu'à 42 et 50°C, avec respectivement un facteur d'augmentation de 2,2 et de 2,05 (ANOVA, $p \leq 0,05$). Lorsque la culture est réalisée en milieu lait, à 30 ou 42°C, le taux de transcrit reste constant au cours de la croissance tandis qu'à 50°C il augmente durant la croissance de manière significative d'un facteur 2,63 (ANOVA, $p \leq 0,05$). Quel que soit le milieu, le gène *rgg*$_{1044}$ est plus transcrit à 50°C qu'aux autres températures. De même, il est plus transcrit lors d'une croissance en milieu MCD qu'en milieu lait. Son taux de transcrit maximum est observé lors d'une croissance en phase stationnaire en milieu MCD à 50°C.



<u>Figure 60 :</u> Taux de transcrit relatif du gène *rgg$_{1511}$* de *S. thermophilus* LMG18311 cultivée en milieu MCD ou lait à 30°C, 42°C ou 30°C. Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage en phase exponentielle (expo) et en phase stationnaire (stat). Les résultats correspondent à la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. a, b, c, d : catégories statistiques significativement différentes entre elles générées par un test LSD suite à l'analyse par ANOVA, $p \leq 0,05$.

Pour le gène *rgg$_{1511}$* un même profil de transcription est observé dans les deux milieux de culture, à 42°C et à 50°C. En effet, son taux de transcrit augmente au cours de la croissance de façon significative (ANOVA, $p \leq 0,05$), avec un facteur d'augmentation de 2,2 ; 2,22 ; 2,46 et 3,46, respectivement, lors de cultures en milieu MCD à 42°C et 50°C, et en milieu lait à 42°C et à 50°C. Par ailleurs, en phase stationnaire de croissance, le taux de transcrit du gène *rgg$_{1511}$* augmente avec la température, suggérant que la transcription de ce gène est sous la dépendance de la température. Pour ce gène, un taux de transcrit maximal est observé en phase stationnaire en milieu MCD à 50°C.

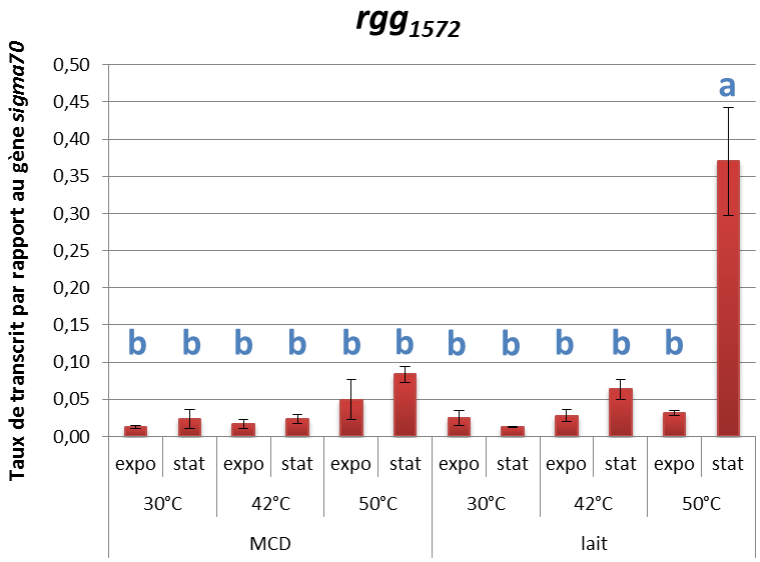


Figure 61 : Taux de transcrit relatif du gène *rgg*$_{1572}$ de *S. thermophilus* LMG18311 cultivée en milieu MCD ou lait à 30°C, 42°C ou 30°C. Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage en phase exponentielle (expo) et en phase stationnaire (stat). Les résultats correspondent à la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. a, b : catégories statistiques significativement différentes entre elles générées par un test LSD suite à l'analyse par ANOVA, $p \leq 0,05$.

L'analyse du taux de transcrit du gène *rgg*$_{1572}$ dans les différentes conditions montre qu'il est peu transcrit sauf en milieu lait à 50°C en phase stationnaire de croissance (ANOVA, $p \leq 0,05$).

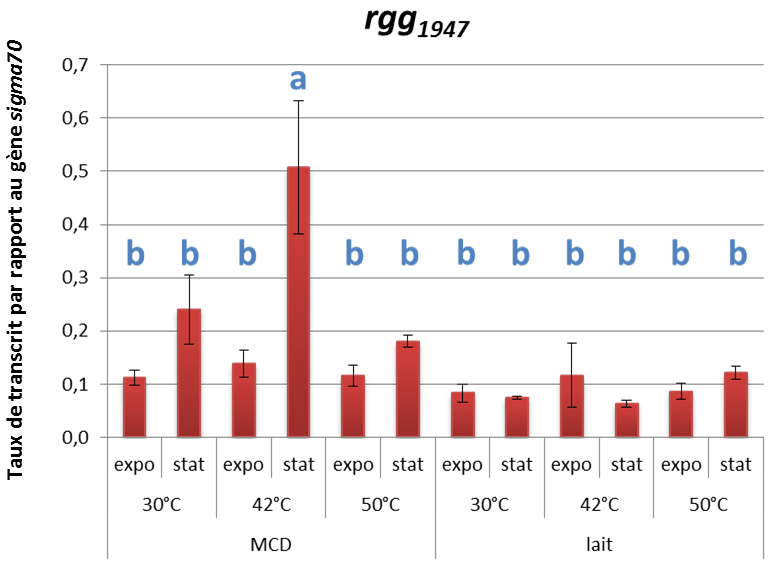


Figure 62 : Taux de transcrit relatif du gène *rgg*$_{1947}$ de *S. thermophilus* LMG18311 cultivée en milieu MCD ou lait à 30°C, 42°C ou 30°C. Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage en phase exponentielle (expo) et en phase stationnaire (stat). Les résultats correspondent à la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. a, b : catégories statistiques significativement différentes entre elles générées par un test LSD suite à l'analyse par ANOVA, $p \leq 0,05$.

L'analyse du taux de transcrit du gène *rgg*$_{1572}$ dans les différentes conditions indique que quel que soit le milieu et la température considérée, le taux de transcrit reste constant au cours de la croissance à l'exception de la condition MCD à 42°C où sa transcription, en phase stationnaire

de croissance, est augmentée d'un facteur 3,68 par rapport à celle de la phase exponentielle (ANOVA, p ≤ 0,05).

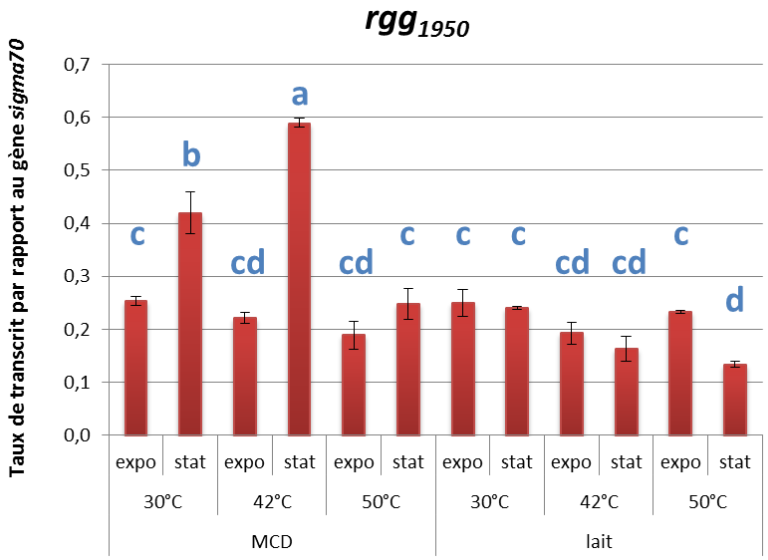


Figure 63 : Taux de transcrit relatif du gène *rgg*$_{1950}$ de *S. thermophilus* LMG18311 cultivée en milieu MCD ou lait à 30°C, 42°C ou 30°C. Les ARN totaux ont été extraits de la souche sauvage en phase exponentielle (expo) et en phase stationnaire (stat). Les résultats correspondent à la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de trois expériences indépendantes réalisées en duplicat. a, b, c, d : catégories statistiques significativement différentes entre elles générées par un test LSD suite à l'analyse par ANOVA, p ≤ 0,05.

L'analyse du taux de transcrit du gène *rgg*$_{1950}$ indique que lors d'une culture réalisée en milieu MCD à 30°C et 42°C, le taux de transcrit augmente de façon significative au cours de la croissance avec, respectivement, un facteur d'augmentation de 1,65 et 2,67 fois (ANOVA, p ≤ 0,05). A l'opposé, lorsque la culture est réalisée en milieu lait, à 30°C et 42°C, le taux de transcrit du gène *rgg*$_{1950}$ reste constant au cours de la croissance, sauf à 50°C où il diminue d'un facteur 1,74 en phase stationnaire (ANOVA, p ≤ 0,05). Par ailleurs, le taux de transcrit du gène *rgg*$_{1950}$ est maximale lors d'une culture en phase stationnaire de croissance réalisé en milieu MCD à 42°C.

L'étude de la transcription des 7 gènes *rgg* de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* suggèrent que les conditions environnementales influencent leur niveau de transcription. Afin d'affiner ce résultat, une analyse statistique via un test ANOVA a été réalisée afin de déterminer l'impact des différents paramètres de croissance étudiés sur la transcription des 7 gènes *rgg* (Tableau 16).

Tableau 16 : Analyse statistique par test ANOVA de l'impact des différents facteurs de croissance (milieu de culture, température et phase de croissance) sur le taux de transcription de gènes *rgg* de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*. Les *p*-values sont représentées comme ceci : 0 ≤ « *** » ≤ 0,001 « ** » ≤ 0,01 « * » ≤ 0,05 « . » ≤ 0,1 « »≤1.

	rgg $_{0182}$	*rgg* $_{0917}$	*rgg* $_{1044}$	*rgg* $_{1511}$	*rgg* $_{1572}$	*rgg* $_{1947}$	*rgg* $_{1950}$
milieu	***	***	***	***	***	***	***
température	*	**	***	***	***	*	***
phase de croissance		***	***	***	***	**	***
milieu + tempétaure	*	*			**	*	***
milieu + phase de croissance	.	***	**		***	**	***
tempérautre + phase de croissance	.	**	**	***	***		***
milieu + température + phase de crossance	*	***			***	*	***

Ainsi pour les 7 gènes *rgg* étudiés, le milieu de culture et la température influent de manière significative sur le niveau de transcription de ces gènes. De même, la phase de croissance influence les taux de transcrits des gènes *rgg*, à l'exception du gène rgg_{0182}. De plus, la combinaison des plusieurs facteurs a également été analysée et révèle que les différentes associations n'influent pas de la même façon la transcription de chaque gène *rgg*. Par exemple, la combinaison des paramètres milieu de culture et phase de croissance influence de manière signification la transcription des gènes rgg_{0182}, rgg_{0917}, rgg_{1572}, rgg_{1947} et rgg_{1950}, tandis que la combinaison des paramètres température et phase de croissance influence celle des gènes rgg_{0182}, rgg_{0917}, rgg_{1044}, rgg_{1511}, rgg_{1572} et rgg_{1950}.

L'ensemble de ces résultats indiquent que les conditions environnementales influencent significativement la transcription des 7 gènes *rgg* de *S. thermophilus* LMG18311. De plus, la transcription de certains gènes *rgg* est sous l'influence de plusieurs paramètres couplés entre eux. Par ailleurs, les 7 gènes *rgg* étudiés semblent présenter des profils de transcription différents suggérant que ceux-ci soient différemment requis en fonction des conditions environnementales.

4.3. Comparaison des profils de transcription des gènes *rgg* de *S. thermophilus* LMG18311

La comparaison des profils de transcription des 7 gènes *rgg* de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* dans les différentes conditions étudiées révèle des différences significatives comme en témoigne l'analyse statistique de leur taux de transcription par ANOVA de Welch (Tableau 17).

<u>Tableau 17 :</u> Analyse statistique par ANOVA de Welch du taux moyen de transcrit relatif des 7 gènes *rgg* de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* dans chacune des conditions de croissance (en milieu MCD ou milieu lait à 30, 42 ou 50°C, en phase exponentielle ou stationnaire de croissance). L'analyse statistique a été réalisée dans chaque condition étudiée pour les 7 gènes *rgg* et a permis de générer des catégories significativement différentes des taux de transcrits relatifs des gènes *rgg*. Elles sont représentées par les lettres a, b, c, d et e et sont indépendantes pour chaque condition considérée.

			rgg_{0182}		rgg_{0917}		rgg_{1044}		rgg_{1511}		rgg_{1572}		rgg_{1947}		rgg_{1950}	
MCD	30°C	expo	cd	1,29E-01	bc	1,64E-01	e	4,67E-02	b	1,92E-01	e	1,26E-02	d	1,13E-01	a	2,54E-01
		stat	abc	3,46E-01	a	4,72E-01	de	7,54E-02	cd	2,33E-01	e	2,33E-02	bcd	2,41E-01	ab	4,20E-01
	42°C	expo	c	1,32E-01	ab	1,90E-01	d	4,56E-02	bc	1,70E-01	d	1,71E-02	c	1,38E-01	a	2,21E-01
		stat	d	9,69E-02	a	7,83E-01	d	1,01E-01	c	3,74E-01	d	2,35E-02	bc	5,07E-01	b	5,89E-01
	50°C	expo	bc	1,07E-01	a	3,43E-01	cd	6,63E-02	ab	2,28E-01	cd	4,97E-02	bcd	1,15E-01	bcd	1,89E-01
		stat	c	8,67E-02	a	4,85E-01	bc	1,36E-01	a	5,06E-01	c	8,37E-02	bc	1,80E-01	b	2,47E-01
lait	30°C	expo	b	8,62E-02	b	1,02E-01	c	2,27E-02	b	9,31E-02	c	2,43E-02	b	8,32E-02	a	2,49E-01
		stat	d	4,23E-02	b	1,47E-01	e	2,40E-02	b	1,37E-01	e	1,29E-02	c	7,36E-02	a	2,40E-01
	42°C	expo	ab	8,86E-02	ab	1,01E-01	b	1,94E-02	ab	1,08E-01	b	2,82E-02	ab	1,16E-01	a	1,92E-01
		stat	c	7,50E-02	ab	1,86E-01	c	3,39E-02	a	2,66E-01	c	6,33E-02	c	6,26E-02	b	1,63E-01
	50°C	expo	d	6,71E-02	bc	1,08E-01	e	2,55E-02	b	1,27E-01	e	3,20E-02	cb	8,65E-02	a	2,33E-01
		stat	c	5,60E-02	b	2,62E-01	c	7,10E-02	a	4,40E-01	a	3,70E-01	c	1,21E-01	c	1,34E-01

Les catégories statistiques sont représentatives du niveau de transcription des gènes *rgg*. En effet, les catégories statistiques sont classées, pour chaque condition, en fonction du (des) gène(s) le(s) plus transcrit(s) (catégorie a) au(x) gène(s) les moins transcrit(s) (catégorie c, d, ou e en fonction de la condition considérée). Par exemple, en milieu MCD à 30°C en phase exponentielle, 5 catégories statistiquement différentes (a, b, c, d, e) sont observées. En effet, le taux de transcrit du gène rgg_{1950} (catégorie a) est significativement différent des 6 autres gènes. Ceux des gènes rgg_{1044} et rgg_{1572} sont similaires entre eux (catégorie e) mais différents des 5 autres gènes. Le gène rgg_{1947} présente un taux de transcrit uniquement similaire à celui du gène rgg_{0182} (catégorie d). Cependant, le taux de transcrit du gène rgg_{0182} est également similaire à celui du gène rgg_{0917} (catégorie c), lui-même similaire à celui du gène rgg_{1511} (catégorie b).

Cette analyse montre ainsi que les gènes *rgg* les plus transcrits et, de la même façon les gènes *rgg* les moins transcrits, ne sont pas les mêmes en fonction des conditions considérées. Ainsi, les taux de transcrits des 7 gènes *rgg* diffèrent les uns par rapport aux autres pour chaque conditions étudiées. Par ailleurs, les gènes rgg_{0917}, rgg_{1511} et rgg_{1950} sont, de manière générale, plus transcrits que les autres gènes dans les différentes conditions testées. Au contraire, les gènes rgg_{1044} *et* rgg_{1572} sont les moins transcrits dans ces conditions. Cela suggère que les gènes rgg_{0917}, rgg_{1511} et rgg_{1950} seraient, de manière générale, plus requis dans ces conditions, à l'inverse les gènes rgg_{1044} et rgg_{1572} seraient moins requis.

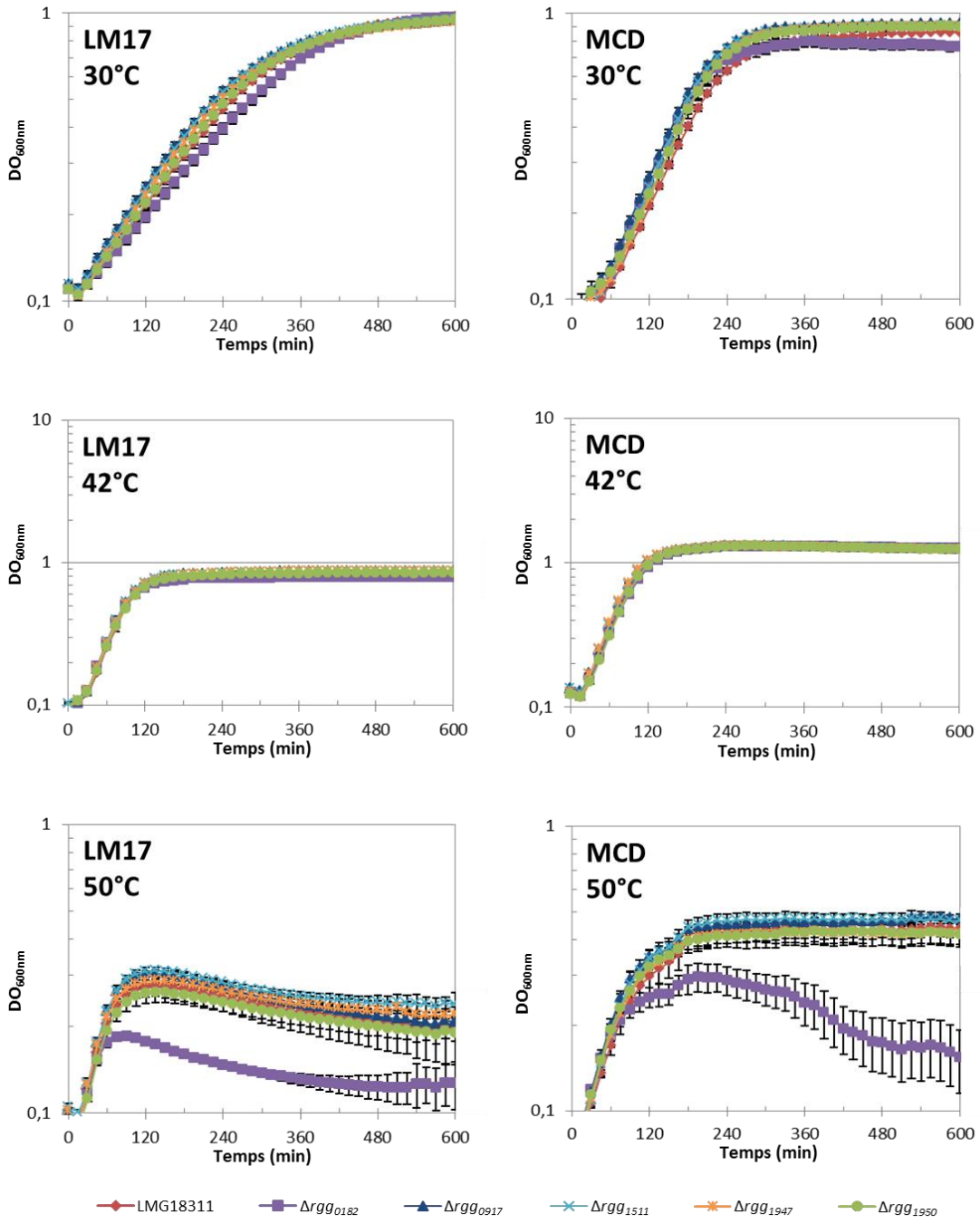
En conclusion, l'ensemble des résultats indiquent que le niveau de transcription des gènes *rgg* diffère en fonction des conditions environnementales suggérant qu'ils sont tous impliqués dans l'adaptation de *S. thermophilus* à son environnement.

4.4. Etude de l'impact des gènes *rgg* sur la croissance de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*

Sachant que les conditions environnementales influencent le niveau de transcription des 7 gènes *rgg* de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*, ces gènes pourraient jouer un rôle dans l'adaptation de *S. thermophilus* LMG18311 à son environnement. Afin de vérifier cette hypothèse, la croissance de la souche LMG18311 et des mutants présentant la délétion d'un gène *rgg* a été étudiée dans différentes conditions environnementales : (i) deux milieux de culture (milieu LM17 et milieu MCD) et (ii) trois températures de croissance (30°C, 42°C et 50°C). Les cinétiques de croissances sont présentées dans la figure 64.

Les courbes de croissance obtenues pour l'ensemble des souches étudiées sont similaires dans les différentes conditions. Toutefois, lors d'une croissance réalisée à 50°C, la souche Δrgg_{0182} se caractérise par un arrêt prématuré de la croissance suivi d'une chute progressive apparante de la DO_{600nm}, contrairement aux autres souches. Ce phénotype déjà observé lors d'une culture en milieu LM17 correspond à une adhésion préférentielle aux parois du puits de la microplaque via des interactions hydrophobes induite par la température. Ce phénotype est donc également observé en milieu MCD, suggérant, par ailleurs, que la nature du milieu n'influence pas sur la capacité d'adhésion du mutant Δrgg_{0182}.

Par ailleurs, des résultats préliminaires suggèrent qu'aucune différence de croissance entre la souche LMG18311 de *S. thermophilus* et ses dérivées délétées d'un gène *rgg* n'est observée lors d'une culture réalisée en milieu lait.



<u>Figure 64 :</u> Cinétiques de croissance de la souche de *S. thermophilus* LMG18311 et de ses dérivés Δ*rgg*$_{0182}$, Δ*rgg*$_{0917}$, Δ*rgg*$_{1511}$, Δ*rgg*$_{1947}$ et Δ*rgg*$_{1950}$, réalisée à l'aide du Bioscreen C, en milieu LM17 ou MCD à 30°C, à 42°C et à 50°C. La croissance de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* est représentée en rouge, celle de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ en violet, celle de la souche Δ*rgg*$_{1917}$ en bleu foncé, celle de la souche Δ*rgg*$_{1511}$en bleu ciel, celle de la souche Δ*rgg*$_{1947}$ en orange et celle de la souche Δ*rgg*$_{1950}$ en vert. Les résultats correspondent à la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicat.

Ainsi, ces résultats indique que les gènes *rgg*$_{0182}$, *rgg*$_{0917}$, *rgg*$_{1511}$, *rgg*$_{1947}$ et *rgg*$_{1950}$ n'influent pas sur la croissance de *S. thermophilus* LMG18311 dans les conditions testées.

Discussion

Discussion

1. Comment fonctionnent les protéines Rgg ?

La famille Rgg est composée de régulateurs transcriptionnels, codés uniquement par les génomes de bactéries à coloration Gram positive à bas pourcentage en bases G et C. Elle se caractérise par la conservation de deux domaines : le domaine HTH et le domaine médian (Loughman *et al.,* 2007 ; Henry 2011). Toutefois, bien que plusieurs membres de la famille Rgg aient été décrits dans littérature, peu d'information sont disponibles sur leur mode d'action. La structure tridimensionnelle des protéines Rgg n'a jamais été étudiée. Ainsi, leurs cristallisations permettraient (i) de caractériser leurs structures tertiaires et définir si les différents membres de cette famille, bien qu'ayant des séquences en acides aminés très différentes, présentent des structures similaires, (ii) de déterminer si, comme d'autres membres de la famille RNPP (Rocha-Estrada *et al.,* 2010), les protéines Rgg sont capables de se multimériser et (iii) de mieux comprendre le fonctionnement des protéines Rgg par cristallisation de ces protéines en présence d'ADN des régions promotrices des gènes dont elles contrôlent la transcription. En outre, l'étude tridimensionnelle des protéines de la famille Rgg permettrait de caractériser les motifs qui les composent, comme par exemple des motifs TPR qui confirmerait ou non leur appartenance à la famille RNPP (Fleuchot *et al.,* 2011).

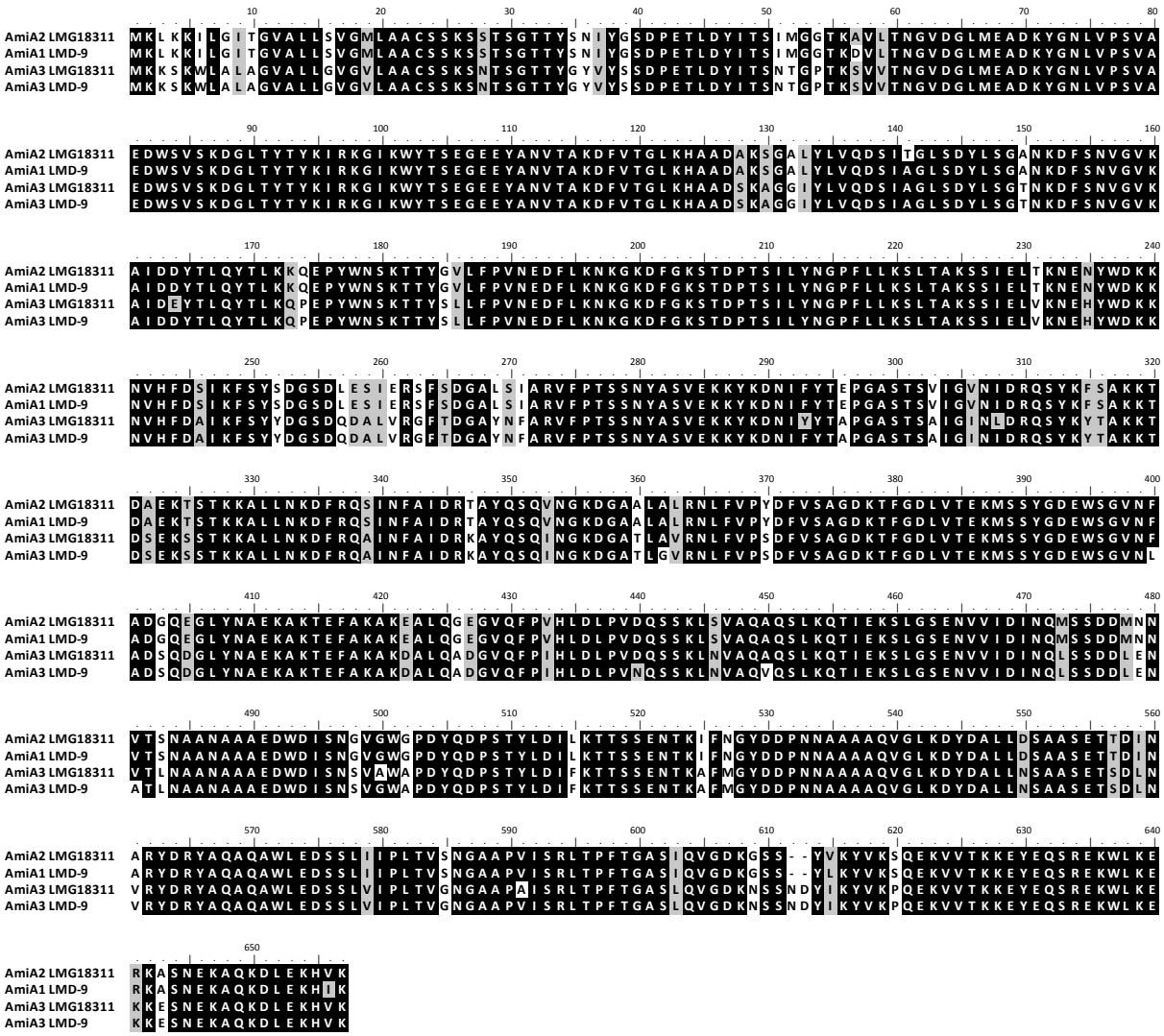
Au cours de ces travaux de thèse, la production des protéines Rgg_{0182} et Rgg_{1947} de *S. thermophilus* LMG18311 a été entreprise. Néanmoins, la production et la purification de la protéine Rgg_{0182} n'a pas pu être réalisée en quantité suffisante pour étudier sa structure tridimensionnelle par cristallographie. La purification de la protéine Rgg_{1947} n'a quant à elle pas abouti. La production et la purification de ces protéines devront donc être améliorées en jouant, d'une part, sur l'étape d'induction de leur synthèse et, d'autre part, sur la solubilisation des protéines par ajout d'agents solubilisant. L'amélioration de la lyse cellulaire permettrait également d'obtenir une quantité protéique plus importante. L'utilisation de différents tampons de lyse contenant des adjuvants d'extraction (inhibiteurs de protéases, chélateur…) est également envisagée afin d'augmenter la stabilité des protéines purifiées.

Par ailleurs, les régulateurs transcriptionnels Rgg sont décrits dans la littérature comme régulant, notamment, les gènes qui sont adjacent à leur loci (Sulavik *et al.,* 1996 ; Lyon *et al.,* 1998 ; Sanders *et al.,* 1998 ; Qi *et al.,* 1999 ; Fujiwara *et al.,* 2000 ; Rawlinson *et al.,* 2002 ; Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,* 2011). Les résultats obtenus montrent que la protéine Rgg_{0182} contrôle positivement la transcription des gènes pep_{0182} et shp_{0182} adjacents à son locus. A chaque fois que l'étude de la transcription des gènes adjacents à un gène codant une protéine Rgg a été entreprise, celle-ci a révélé que leurs transcriptions étaient sous la dépendance de la protéine Rgg

(Sulavik *et al.,* 1996 ; Lyon *et al.,* 1998 ; Sanders *et al.,* 1998 ; Qi *et al.,* 1999 ; Fujiwara *et al.,* 2000 ; Rawlinson *et al.,* 2002 ; Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,* 2011). Cette observation pose la question d'une généralisation à l'ensemble des protéines Rgg. Ainsi, les gènes *rgg* seraient localisés à proximité des certains de leurs gènes cibles, suggérant un maintien de l'intégrité de leur locus.

1.1. Les protéines Rgg de *S. thermophilus* participent-elles à un mécanisme de quorum sensing ?

L'implication de protéines Rgg dans un mécanisme de quorum sensing a été démontré pour 3 couples Rgg/Shp : Rgg1358/SHP138 de *S. thermophilus* LMD-9, Rgg2/SHP2 et Rgg3/SHP3 de *S. pyogenes* NZ131 (Ibrahim *et al.,* 2007 ; Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,* 2011). La présence d'un gène codant un peptide de la famille SHP à côté du gène rgg_{0182} chez *S. thermophilus* LMG18311 suggère que le système Rgg_{0182}/Shp_{0182} pourrait lui aussi participer à un mécanisme de QS. Afin de vérifier cette hypothèse, la fonctionnalité de ce système a été étudiée chez la souche LMG18311 et en système hétérologue chez la souche LMD-9 de *S. thermophilus* à l'aide de fusions transcriptionnelles du promoteur du gène shp_{0182} avec les gènes codant la luciférase dans différents contexte (en présence ou non des gènes shp_{0182} et/ou rgg_{0182}). Toutefois, une activité du promoteur Pshp_{0182} n'a été observée que chez la souche LMG18311, indiquant que le système Rgg_{0182}/Shp_{0182} n'est pas fonctionnel chez la souche LMD-9. L'étude réalisée par Fleuchot *et al*. (2011) a mis en évidence que les deux protéines affines AmiA sont impliquées dans la détection de la phéromone SHP1358. Ainsi, une hypothèse pour expliquer ce résultat est que les protéines AmiA des souches LMD9 et LMG18311 aient des spécificités différentes et que celles de la souche LMD9 ne permettent pas l'importation de la phéromone Shp_{0182}. Un argument en faveur de cette hypothèse est que les souches LMG18311 et LMD-9 de *S. thermophilus* présentent des sous-unités AmiA différentes. En effet, la souche LMD-9 possède les sous-unités AmiA3 et AmiA1 tandis que la souche LMG18311 possède les sous-unités AmiA3 et AmiA2. Ces sous-unités affines présentent des séquences primaires différentes (Figure 65).



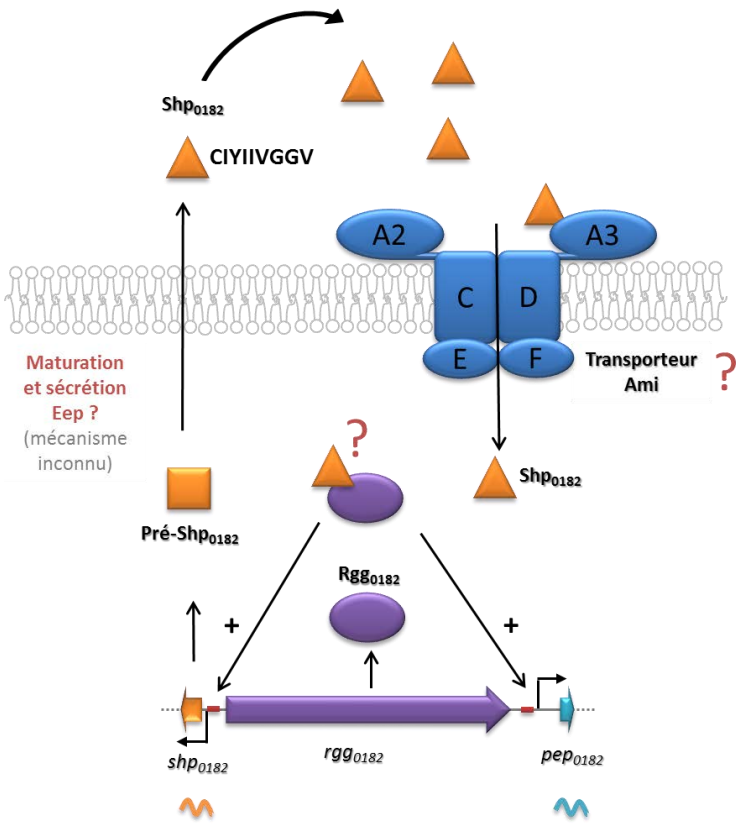
<u>Figure 65 :</u> Alignement des séquences primaires des sous-unités affines AmiA des souches LMG18311 et LMD-9 de *S. thermophilus*. Les alignements ont été réalisés par ClustalW. Les résidus conservés à 75% sont sur fond noir lorsqu'ils sont identiques et sur fond gris lorsqu'ils sont similaires.

Néanmoins, la présence de résidus spécifiques dans la séquence primaire des sous-unités affines du transporteur Ami pourrait jouer un rôle dans la spécificité de liaison à la phéromone. En effet, Picon *et al*. (2005) ont montré que la mutation d'un résidu de la sous-unité AmiA de *L. lactis* module la spécificité du transporteur Ami en favorisant la réimportation de peptides hydrophiles par rapport à la souche sauvage (Picon *et al.,* 2005). Les souches CNRZ1066 et CNCM I-1630 de *S. thermophilus* qui possèdent toutes deux le locus rgg_{0182} présentent elles aussi la sous-unité affine AmiA3. Ainsi, la sous unité AmiA3 pourrait être requise pour l'importation de la phéromone Shp_{0182}. Cependant, l'identité du transporteur permettant la réimportation de la forme mature de la phéromone Shp_{0182} n'a pas été déterminée. Pour vérifier si, comme pour les systèmes Rgg/SHP déjà décrits dans la littérature, la réimportation du peptide Shp_{0182} se fait par le transporteur d'oligopeptide Ami (Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,* 2011), l'activité du promoteur du gène shp_{0182} devrait être étudiée dans un contexte où les gènes codant le transporteur AmiCDEF sont

délétés. De plus, l'étude de la fonctionnalité du mécanisme de QS impliquant le couple Rgg_{0182}/Shp_{0182} chez *S. thermophilus* LMG18311 n'exprimant qu'un seul type de sous-unité affine ou exprimant celles de la souche LMD-9 permettrait de vérifier si la nature des sous-unités affines influe sur la spécificité du substrat du transporteur Ami .De plus, ceci permettrait de déterminer, si comme le suppose les résultats obtenus, la sous-unité AmiA3 joue un rôle majeur dans la réimportation de la forme mature de la phéromone Shp_{0182}.

Une autre explication de la non-fonctionnalité du couple Rgg_{0182}/Shp_{0182} chez la souche LMD-9 de *S. thermophilus* est que celle-ci bien qu'apparentée à la souche LMG18311 ne coderait pas un élément essentiel pour l'activation du système Rgg_{0182}/Shp_{0182}. En effet, bien que la réimportation de la forme phéromone Shp_{0182} puisse se faire par le transporteur Ami, une étape supplémentaire non caractérisée pourrait avoir lieu entre la réimportation de Shp_{0182} et son interaction avec Rgg_{0182}. La présence d'un co-facteur permettant l'activation du régulateur transcriptionnel Rgg_{0182} par la forme mature du peptide Shp_{0182} est l'une des hypothèses envisageables.

Le mécanisme de QS décrit par Fleuchot *et al*. (2011) indique que la phéromone SHP1358 est synthétisée sous la forme d'un pré-peptide, qui est maturé par clivage lors de son export. Afin de savoir si tel est le cas pour Shp_{0182} et d'identifier sa forme mature, la comparaison des peptides identifiés par spectrométrie de masse dans le surnageant de culture de la souche LMG18311 et de celui d'une souche délétée du gène shp_{0182} devra être réalisée. Les données de la littérature indiquent que la forme mature des peptides de la famille SHP est composée des 9 derniers aa situés dans la partie C-terminale du produit du gène *shp* (Chang *et al*., 2011 ; Fleuchot *et al*., 2011). Ainsi, sur la base des séquences des phéromones SHP connues, le nonapeptide CIYIIVGGV, correspondant à la partie C-terminale de la séquence précurseur pourrait être la forme mature du peptide Shp_{0182}. L'utilisation de ce peptide de synthèse de 9 aa permet d'activer l'expression du promoteur du gène shp_{0182} indiquant que cette forme est active. Ce peptide présente la particularité de posséder un résidu cystéine à la place de l'aspartate ou du glutamate conservé, respectivement, chez le groupe I ou II de la famille SHP. La présence d'un tel résidu rend la phéromone Shp_{0182} atypique par rapport aux autres peptides SHP identifiés et le rôle du résidu cystéine devra donc être étudié dans la spécificité du mécanisme associant le peptide Shp_{0182} avec le régulateur transcriptionnel Rgg_{0182}. Si les expériences réalisées lors de cette thèse permettent (i) d'affirmer que le peptide Shp_{0182} est requis pour l'expression du promoteur de son propre gène et (ii) que l'auto induction de la production du peptide Shp_{0182} nécessite la présence du régulateur transcriptionnel Rgg_{0182}, l'implication de cette phéromone dans un mécanisme QS dépendant n'a pas été démontré (Figure 66).



<u>Figure 66 :</u> Modèle du mécanisme de QS proposée pour le couple Rgg_{0182}/Shp_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311.

Afin de savoir si une concentration seuil de Shp_{0182} est requise, l'activité du promoteur P*shp*$_{0182}$ devrait être analysée en présence de différentes concentrations en Shp_{0182} synthétique, dans le milieu extracellulaire.

Les molécules de signalisation participant à des mécanismes de QS subissent une étape de maturation impliquant un ou plusieurs clivages par des enzymes protéolytiques. Les données de la littérature indiquent que les mécanismes de QS auxquels participent les couples Rgg/SHP impliquent l'endopeptidase membranaire Eep (Chang *et al.,* 2011 ; Fleuchot *et al.,* 2011). Cette enzyme clive le pré-peptide SHP1358 entre la phénylalanine en position 14 et l'acide glutamique en position 15 permettant la libération de la forme C-terminale active. Le rôle de cette enzyme dans la maturation d'autres phéromones a également été démontré pour d'autres mécanisme de QS (Chandler *et al.,* 2008 ; Denham *et al.,* 2008 ; Vickerman *et al.,* 2010 ; Gardan *et al.,* 2013). La recherche d'un gène *eep* au sein du génome de *S. thermophilus* LMG18311 montre la présence d'un gène présentant 99,8% d'identité avec celui de la souche LMD9. Ainsi, le peptide Shp_{0182} pourrait lui aussi être maturé en une forme active par l'endopeptidase Eep. L'étude de l'activité du promoteur du gène *shp*$_{0182}$ chez la souche sauvage LMG18311 et un mutant dérivé Δ*eep* permettrait de vérifier la maturation du peptide Shp_{0182} par cette endopeptidase.

Outre la protéine Eep, l'export de la forme active du peptide Shp_{0182} pourrait nécessiter le système de sécrétion Sec comme c'est le cas des effecteurs de la famille RNPP, telles les

phéromones PapR de *B. cereus* (Agaisse *et al.,* 1999) et Phr de *B. sutilis* (Lazazzera 2001). Un argument en faveur de cette hypothèse est la présence d'une séquence signal à l'extrémité 5' des gènes *shp* (Palmer *et al.,* 2005 ; Hutchings *et al.,* 2009). Cependant, l'importance de cette voie dans la survie bactérienne rend difficile l'étude de son implication dans l'export de phéromones. Une hypothèse alternative serait que la sécrétion des phéromones SHP se fasse via un transporteur de type ABC ou, de par leur nature hydrophobe, de manière passive.

L'étude réalisée par Fleuchot *et al.* (2011) a mis en évidence l'interaction de la phéromone SHP1358 avec le régulateur transcriptionnel Rgg1358. Cependant, le rôle de cette interaction n'a pas été déterminé. En effet, l'ajout de peptide SHP1358 ne module pas la capacité de fixation à l'ADN de la protéine Rgg1358. Les auteurs ont ainsi proposé que cette interaction entraîne une activation du régulateur transcriptionnel via un changement conformationnel ou une oligomérisation de la protéine Rgg1358. Une telle activation a, en effet, été mise en évidence dans le cas de la phéromone PapR de *B. cereus.* En effet, la liaison de la phéromone PapR au régulateur transcriptionnel PlcR entraine sa multimérisation qui est déterminante pour sa fixation à l'ADN au niveau des régions promotrices de ses gènes cibles (Slamti *et al.,* 2002 ; Declerck *et al.,* 2007). Par contre, chez *E. faecalis*, le régulateur transcriptionnel PrgX est capable de se fixer à l'ADN en absence de ses phéromones associées (Bae *et al.,* 2002) bien que leurs interactions soient essentielles pour permettre la régulation de la transcription des gènes cibles. L'interaction entre la protéine PrgX et la sex-phéromone cCf10 transforme l'état d'oligomérisation de la protéine, passant d'un état tétramérique à un état dimérique, modifiant ainsi l'affinité de liaison à l'ADN du régulateur transcriptionnel PrgX. Au contraire, la liaison avec l'anti-phéromone, appelée iCF10, neutralise l'activité de la sex-phéromone et favorise le retour à la conformation tétramérique de la protéine PrgX (Shi *et al.,* 2005 ; Dunny 2007) (Figure 67).

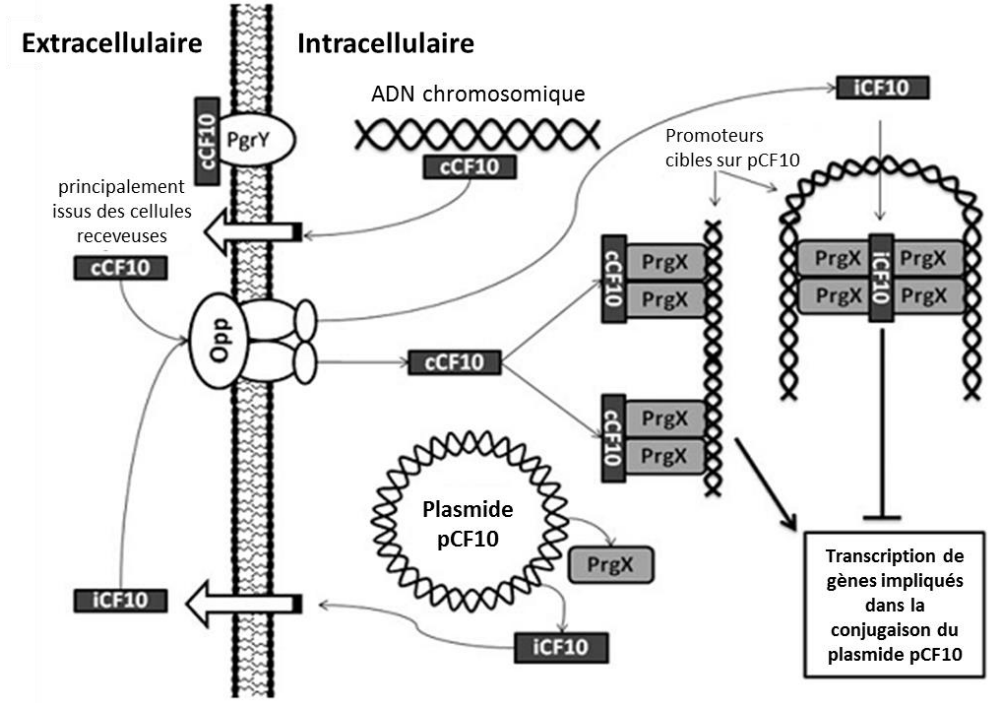


Figure 67 : Modèle du mécanisme de QS de la protéine PrgX et de ses phéromones chez *E. faecalis* (Rocha-Estrada *et al.,* 2010). Les cellules donneuses et receveuses d'*E. faecalis* synthétisent la sex-phéromone cCF10 (codé par le chromosome bactérien) ; la plupart des phéromones cCF10 des cellules donneuses est séquestrée par la protéine PrgY au niveau membranaire. Cependant, le peptide sous forme libre est transporté dans le cytoplasme par le transporteur Opp, comme pour l'anti-phéromone iCF10. Les dimères de PrgX se lient spécifiquement aux promoteurs de ses gènes cibles situés sur l'ADN du plasmide pCF10. L'anti-phéromone iCF10 stabilise le tétramère PrgX entrainant la formation d'une boucle d'ADN empêchant l'accès de l'ARN polymérase aux promoteurs des gènes. Les deux phéromones sont en compétition pour la liaison avec la protéine PrgX. Quand cCF10 se lie à la protéine PrgX, le tétramère est dissocié et les dimères de PrgX se fixent à l'ADN des régions promotrices de ses gènes cibles.

Concernant les protéines Rgg, l'étude réalisée par Chang *et al.* (2011) indique que la présence des phéromones SHP2 et SHP3 inhibe la fixation de la protéine Rgg3 de *S. pyogenes* à l'ADN. Ainsi, le peptide Shp_{0182} pourrait, lui aussi, se lier à la protéine Rgg_{0182}. Des expériences de SPR réalisées sur ces 2 partenaires permettraient de vérifier cette hypothèse. L'interaction entre la phéromone et le régulateur transcriptionnel pourrait influencer la conformation tridimensionnelle de la protéine Rgg_{0182} et entrainer une modulation de son affinité de liaison à l'ADN. Afin de vérifier ces hypothèses, la capacité de fixation de la protéine Rgg_{0182} à l'ADN devrait être étudiée en présence du peptide Shp_{0182} et l'état d'oligomérisation de la protéine Rgg_{0182} devrait être déterminé en présence de la phéromone Shp_{0182}.

Par ailleurs, les protéines Rgg possèdent dans leur partie centrale un domaine médian contenant 5 résidus conservés (Loughman *et al.,* 2007 ; Henry 2011) Ce domaine est décrit comme permettant la liaison protéine/protéine (Ma *et al.,* 2003 ; Loughman *et al.,* 2007). Ainsi, la protéine Rgg_{0182} pourrait être capable de se lier à d'autres protéines. L'une des hypothèses est que les protéines Rgg puissent s'homodimériser (Samen *et al.,* 2006 ; Loughman *et al.,* 2007). Afin de vérifier si la protéine Rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 est capable de s'oligomériser, une

électrophorèse en condition non dénaturante, suivie d'un Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques dirigées contre la protéine Rgg_{0182} devra être réalisée.

S'il est vraisemblable que le couple Shp_{0182}/Rgg_{0182} participe à un mécanisme de quorum sensing, qu'en est-il des 6 autres gènes *rgg* codés par le génome de S. *thermophilus* LMG18311. Parmi eux, 5 des 7 gènes *rgg* (*rggSt1*, *rggSt2*, *rggSt3*, *rggSt5* et *rggSt7*) présentent un gène *shp* dans leur proximité immédiate suggérant qu'ils soient eux aussi impliqués dans un mécanisme de QS. Pour le démontrer, l'activité des promoteurs des gènes *shp* devra être analysée, en présence, ou non, des 3 partenaires du mécanisme de QS : SHP, Rgg et Ami. Toutefois, l'absence d'un gène *shp* en amont des gènes *rggSt4* et *rggSt6* n'exclut pas qu'ils puissent eux aussi être régulés par mécanisme de quorum sensing. En effet, ces gènes *rgg* pourraient être activés par une ou plusieurs phéromone(s) SHP codées par le génome de LMG18311 ou d'autres phéromones SHP produites par d'autres souches ou espèces bactériennes. L'étude de l'interaction des différentes protéines Rgg codées au sein du génome de *S. thermophilus* LMG18311 avec les différentes phéromones SHP codées par le génome permettrait de déterminer si les autres gènes *rgg* sont activés par un mécanisme de QS.

La mise en évidence d'une action croisée entre deux couples Rgg/SHP a déjà été mise en évidence. Chez *S. pyogenes* (Chang *et al.,* 2011), des couples Rgg/SHP présentent des interactions croisées de nature antagoniste En effet, la protéine Rgg2 active la transcription des gènes *shp2* et *shp3* alors que la protéine Rgg3 la réprime. Ainsi, certains gènes *rgg* de *S. thermophilus*, associés à des gènes *shp* codant des peptides de la même classe pourraient avoir des effets synergiques ou antagonistes. Néanmoins, des effets croisés entre des protéines Rgg associées à des peptides SHP de classes différentes est tout à fait envisageable. De plus, une protéine Rgg donnée pourrait interagir avec un peptide SHP associé à un autre gène *rgg* comme le suggère les travaux de Chang *et al*. (2011). L'étude de l'activité du promoteur du gène shp_{0182} en présence ou non de chaque gène *rgg* codé par le génome de *S. thermophilus* permettrait de déterminer : (i) si le mécanisme de QS auquel participe la phéromone Shp_{0182} est sous la dépendance de plusieurs protéines Rgg et (ii) quels sont les effets de ces protéines sur la transcription du gène shp_{0182}. Par ailleurs, les gènes *rgg* qui ne sont pas associés à des gènes *shp* pourraient eux aussi interagir avec des phéromones SHP codées par des gènes associés aux autres gènes *rgg*, et ainsi être impliqués dans un mécanisme de QS.

Par ailleurs, l'étude réalise par Fleuchot *et al.* (2011) a mis en évidence que la protéine Rgg1358 de la souche LMD-9 de *S. thermophilus* est un répresseur de la transcription de son propre gène. Cette capacité d'autorégulation négative d'une protéine Rgg a également été démontrée pour la protéine LasX de *Lb. sakei*(Rawlinson *et al.,* 2002). Ainsi, la protéine Rgg_{0182} pourrait, elle aussi, être capable de réprimer la transcription de son propre gène. Afin de vérifier

cette hypothèse, l'activité du promoteur du gène *rgg$_{0182}$* en présence ou non du gène *rgg$_{0182}$* devra être analysée. En outre, afin de déterminer si l'autorégulation de la protéine Rgg$_{0182}$ est sous la dépendance du mécanisme de QS auquel elle participe, l'activité du promoteur P*rgg$_{0182}$* devra également être analysée, en présence ou non, du gène codant la phéromone Shp$_{0182}$.

1.2. Quelles sont les cibles régulées par les couples Rgg/SHP chez *S. thermophilus* ?

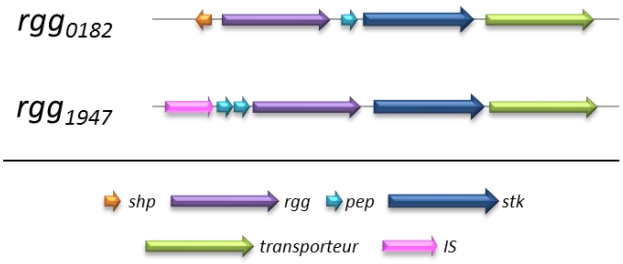
L'étude réalisée par Ibrahim *et al.* (2007) a mis en évidence dans le surnageant de culture de la souche LMD-9 de *S. thermophilus* un petit peptide, Pep1357c, codé par un gène localisé en aval des gènes *shp1358* et *rgg1358*. Les auteurs ont démontré qu'en absence des gènes *shp1358*, *rgg1358* et *amiCDEF*, le peptide n'est plus retrouvé dans le milieu extracellulaire, suggérant que l'expression du petit peptide Pep1357c est sous la dépendance du mécanisme de QS auquel participe un système Rgg/SHP (Ibrahim *et al.,* 2007). Ces données sont cohérentes avec celles obtenues au cours de ces travaux qui montrent que la transcription du gène *pep$_{0182}$* est induite uniquement en présence du couple Rgg$_{0182}$/Shp$_{0182}$, suggérant que le gène *pep$_{0182}$* est l'une des cibles du mécanisme de QS impliquant le couple Rgg$_{0182}$/Shp$_{0182}$. Cependant, le rôle de ces petits peptides, Pep1357c et Pep$_{0182}$, restent inconnus à ce jour.

L'identification du peptide Pep1357c dans le surnageant de culture de la souche LMD-9 de *S. thermophilus* indique que celui-ci est excrété dans le milieu extracellulaire. Afin de vérifier si le peptide Pep$_{0182}$ de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* est lui aussi sécrété dans le milieu extracellulaire, la comparaison des peptides présents dans le surnageant de culture de la souche LMG18311 et celui d'une souche délétée du gène *pep$_{0182}$* par spectrométrie de masse permettra, d'une part, de vérifier cette hypothèse et, d'autre part, de déterminer quelle est la forme mature du peptide Pep$_{0182}$. En effet, le peptide Pep1357c identifié dans le surnageant de culture de la souche LMD-9 est constitué de 9 aa situés dans la partie centrale du produit du gène *pep1357* (MSKELEKVLESSSMAKGDGWKVMAKGDGWE, les 9 aa composant le peptide Pep1357C sont soulignés) indiquant que le produit du gène *pep1357* est clivé avant d'être sécrété dans le milieu extracellulaire. De plus, celui-ci subit des modifications post-traductionnelle conduisant en une cyclisation du peptide par liaison du résidu tryptophane en position 6 avec le résidu lysine en position 2. L'ensemble de ces données suggère que le peptide Pep1357c puisse agir comme molécule signale ou peptide antimicrobien de par sa localisation extracellulaire. Afin de déterminer si tel est le cas pour le peptide Pep$_{0182}$, l'analyse phénotypique d'une souche de *S. thermophilus* LMG18311 délétée du gène *pep$_{0182}$* devra être réalisée.

L'environnement génétique du locus *shp1358*/*rgg1358*/*pep1357* est similaire à celui des gènes *rggSt1* et *rggSt7.* En effet, juste à côté du gène codant le peptide Pep se trouve un gène codant une protéine à radical S-adenosyl méthionine (SAM) suivi d'un gène codant un transporteur multidrogue de type ABC. La conservation de cette organisation par plusieurs couples

rgg/*shp* chez *S. thermophilus* suggère un mécanisme d'action commun. Ainsi, l'enzyme à radical SAM codée par le locus *rgg* pourrait générer des modifications post-traductionnelle sur le produit du gène *pep*, telle que la cyclisation. En effet, les enzymes à radical SAM catalysent des réactions variées comme le transfert de groupement méthyle ou de soufre, des réactions de cyclisation, d'isomérisation, d'oxydation ou encore de modification d'acides aminés (Sofia *et al.,* 2001 ; Booker 2012). Le peptide Pep pourrait ensuite être exporté à l'extérieur de la cellule par le transporteur codé par le gène présent au sein du locus *rgg*.

Cependant, le locus $shp_{0182}/rgg_{0182}/pep_{0182}$ de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* diffère de celui du gène *rgg1358* de la souche LMD-9. En effet, le gène pep_{0182} est localisé juste en amont du gène *stk1* (*stu0183*) codant une sérine/thréonine kinase (Stk). Une telle organisation est également retrouvé pour le gène rgg_{1947} qui est adjacent à un gène codant un petit peptide de fonction inconnue et un gène *stk* (*stu1948* = *stk2*) (Figure 68).



<u>Figure 68 :</u> Organisation génétique des loci rgg_{0182} et rgg_{1947} de *S. thermophilus*.

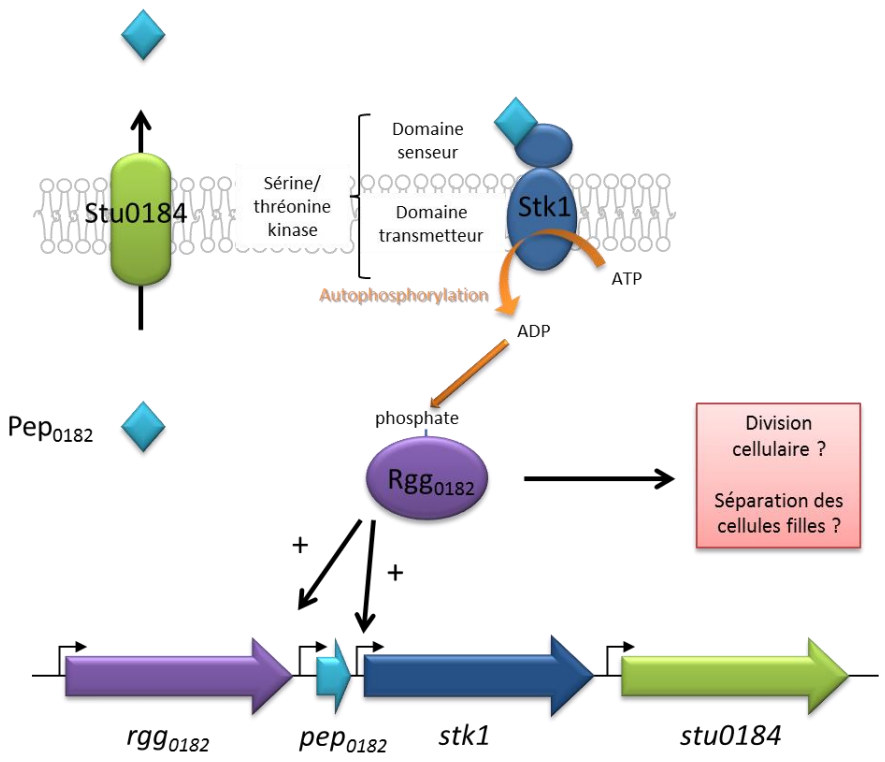
Les Stk permettent la phosphorylation de protéines cibles par la capture d'un ATP qu'elles dégradent en ADP. Le phosphate ainsi libéré est ensuite transféré au substrat. Ces kinases interviennent ainsi dans la transduction de signaux chez les bactéries permettant la régulation de nombreux processus biologiques, tels que la virulence, la biosynthèse de la paroi bactérienne, la division cellulaire, l'osmorégulation et le métabolisme (Cousin *et al.,* 2013). Ces protéines sont composées d'un domaine cytoplasmique kinase conservé dans leur partie N-terminale (Hanks *et al.,* 1988 ; Alber 2009) associé par une hélice transmembranaire à un domaine extracellulaire, permettant la détection d'une molécule signale, situé dans la partie C-terminale de la protéine (Petrickova *et al.,* 2003). Chez les bactéries à coloration Gram positive, les gènes *stk* sont associés à des gènes *stp* codant des phosphatases et plusieurs couples *stk*/*stp* peuvent être retrouvés au sein d'un génome. Toutefois, les streptocoques se caractérisent par la présence d'un seul couple *stk*/*stp* par génome (Rajagopal *et al.,* 2003 ; Jin *et al.,* 2006 ; Saskova *et al.,* 2007). La souche LMG18311 de *S. thermophilus* ne déroge pas à cette règle mais présente, en plus d'un couple *stk*/*stp (pknB/pppL)*, deux gènes, *stk1* (= *stu0183*) et *stk2* (= *stu1948*), non associés à des gènes codant des phosphatases. Par ailleurs, les protéines Stk1 (Stu0183) et Stk2 (Stu1948) présentent un faible pourcentage d'identité avec les protéines Stk de streptocoques associées à des protéines Stp décrites dans la littérature (Tableau 18).

<u>Tableau 18 :</u> Pourcentage d'identité entre les protéines Stk de *S. thermophilus* LMG18311 et celles de streptocoques décrites dans la littérature. Les alignements ont été réalisés par ClustalW à partir de la séquence primaire en acide aminés.

		S. thermophilus			*S. pneumoniae*	*S. agalactiae*	*S. pyogenes*
		Stu0183	Stu1948	PknB	StkP	Stk1	Stk
S. thermophilus	Stu1948	17,7%					
	PknB	7,2%	9,8%				
S. pneumoniae	StkP	4,7%	9,0%	41,1%			
S. agalactiae	Stk1	7,5%	11,2%	54,6%	42,7%		
S. pyogenes	Stk	6,3%	11,2%	57,3%	43,2%	59,0%	
S. mutans	PknB	6,0%	11,2%	59,0%	42,9%	56,5%	62,6%

Ainsi les protéines Stk1 et Stk2 de *S. thermophilus* LMG18311 présentent de nombreuses divergences dans leur séquence primaire par rapport aux Stk décrites dans la littérature. La faible conservation du domaine catalytique des protéines Stk1 et Stk2 de *S. thermophilus* suggère qu'elles puissent avoir des modes d'action différents aux protéines Stk associées à des phosphatases. Ainsi, comme les histidines kinases, les protéines Stk1 et Stk2 pourraient avoir une activité kinase et phosphatase, justifiant l'absence d'association au niveau de leur loci avec des gènes codant des phosphatases. Toutefois, les protéines Stk1 et Stk2 pourraient aussi interagir avec la sérine/thréonine phosphatase codé par le génome de *S. thermophilus*. De plus, les protéines Stk1 et Stk2 de *S. thermophilus* ne possèdent pas de domaine PASTA à leur extrémité C-terminale contrairement aux protéines Stk associées à une phosphatase. Ce domaine est décrit dans la littérature comme permettant la liaison au substrat, tel que des peptides issus du clivage du peptidoglycane (Yeats *et al.,* 2002 ; Jones *et al.,* 2006), suggérant qu'elles pourraient interagir avec des substrats différents. De plus, le pourcentage en bases G et C des gènes *stk1* (25%) et *stk2* (28%) est plus faible que celui du génome de *S. thermophilus* LMG18311 (39%), tandis que celui du gène *pkn* codant une sérine/thréonine kinase associée à un gène codant une phosphatase est similaire à celui du génome. Ces données suggèrent que les gènes *stk1* et *stk2* auraient été acquis par TH contrairement au gène *pkn*. De manière intéressante, les gènes *stk1* et *stk2* présentent un pourcentage en bases G et C similaire à celui des gènes *rgg* associés, suggérant qu'ils aient été acquis ensemble et qu'ils soient impliqués dans un mécanisme commun.

En aval des gènes *stk1* et *stk2* est retrouvé un gène codant un transporteur. Ainsi, de par une organisation génétique similaire, ces locus pourraient être impliqués dans un mécanisme de régulation dans lequel le peptide serait exporté à l'extérieur de la cellule par le transporteur puis se lierait au domaine C-terminale de la sérine/thréonine kinase, conduisant à une phosphorylation de la protéine Stk puis du régulateur transcriptionnel ce qui entrainerait une modulation de sa capacité de fixation à l'ADN et donc de la transcription de ses gènes cibles (Lin *et al.,* 2009 ; Ulijasz *et al.,* 2009) (Figure 69).



<u>Figure 69 :</u> Mécanisme proposé de régulation impliquant Rgg_{0182}, Pep_{0182} et Stk1 chez *S. thermophilus* LMG18311.

Un argument en faveur d'un mécanisme commun impliquant les protéines/peptide Rgg_{0182}, Pep_{0182} et Stk1 est que la délétion du gène *pep_{0182}* chez *S. thermophilus* LMG18311 entraine une organisation des cellules en chaine similaire à celle du mutant Δ*rgg_{0182}*, suggérant une implication de la protéine Rgg_{0182} et du peptide Pep_{0182} dans une même voie biologique. De plus, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire indiquent que la délétion du gène *stk1* chez *S. thermophilus* LMG18311 entraine une augmentation du nombre de cellules par chaines (Communication personnelle, Romain Henry). Ces données sont cohérentes avec les données de la littératures où la délétion de gènes codant des protéines Stk entraine une inhibition de la division cellulaire et de la séparation des cellules filles (Rajagopal *et al.,* 2003 ; Banu *et al.,* 2010 ; Beilharz *et al.,* 2012 ; Fleurie *et al.,* 2012). Ainsi, l'ensemble de ces données suggèrent que les trois partenaires Rgg_{0182}, Pep_{0182} et Stk1 seraient impliqués dans la régulation de la séparation cellulaire. Par ailleurs, l'analyse morphologique de la souche LMG18311 délétée du gène *shp_{0182}* a révélée qu'elle présentait également une organisation des cellules en chaines différente de celle de la souche sauvage, avec un nombre de cellules par chaine plus important. Ainsi, le mécanisme de quorum sensing impliquant le couple Rgg_{0182}/Shp_{0182} pourrait permettre l'activation du mécanisme de régulation impliquant ces 3 partenaires Pep_{0182}, Stk1 et Rgg_{0182}, entrainant un contrôle de la division cellulaire et plus spécifiquement de la séparation des cellules filles. De plus, la transcription des gènes *pep_{0182}* et *stk1* (communication personnelle, Romain Henry) est activée par la protéine Rgg_{0182}, suggérant que ce mécanisme pourrait s'autoréguler.

Ce mécanisme de régulation impliquant les partenaires Stk1, Rgg_{0182} et Pep_{0182} devra être étudié de manière plus approfondie par comparaison du régulon de la protéine Rgg_{0182} en présence ou non des deux autres partenaires ainsi qu'en étudiant la capacité de liaison du peptide Pep_{0182} et de la protéine Stk1 après détermination de la forme mature du peptide Pep_{0182}. Ainsi, la protéine Rgg_{0182} pourrait être impliquée dans un mécanisme de quorum sensing, qui permettrait l'activation d'un second mécanisme de régulation impliquant un système peptide/kinase.

1.3. Comment la protéine Rgg_{0182} se fixe-t-elle à l'ADN ?

Les expériences de retard de migration sur gel d'électrophorèse ont révélé que la protéine Rgg_{0182} régule directement la transcription des gènes *shp*$_{0182}$ et *pep*$_{0182}$ en se fixant à l'ADN de leurs régions promotrices. Ainsi, 2 sites de fixation à l'ADN de la protéine Rgg_{0182} ont pu être mis en évidence. L'alignement des séquences d'ADN contenant les régions promotrices des gènes *shp*$_{0182}$ et *pep*$_{0182}$ a permis de déterminer une séquence consensus putative de fixation de la protéine Rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 (Henry 2011) (Figure 70). Cependant, des expériences d'empreinte à la DNase I permettraient de confirmer ces sites de fixation de la protéine Rgg_{0182}.

Figure 70 : Schématisation des sites potentiels de fixation de la protéine Rgg_{0182} dans la région promotrice des gènes *shp*$_{0182}$ et *pep*$_{0182}$ (Henry 2011). (A) Positionnement des séquences inverses répétées (IR) sur la séquence nucléotidique des régions promotrices P*shp*$_{0182}$ et P*pep*$_{0182}$. (B) Alignement des IR. Les séquences indiquées en violet correspondent aux codons stop, en bleu les boîtes -10 étendue (GNTTNTATAAT), en rouge les RBS (GGAGGAAA) et en vert les codons initiateurs de traduction. Les séquences encadrées en orange correspondent aux IR. La séquence putative de fixation proposée possède une partie très conservée (en majuscule) et une partie moins conservée (en minuscule). IRL : Inverted Repeat Left ; IRR : Inverted Repeat Right.

Toutefois, les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse indiquent que la protéine Rgg_{0182} ne se fixe pas sur l'ADN des régions promotrices des gènes *clpE*, *clpL*, *clpP*, *clpX*, *clpC*,

groES, *dnaK*, *hrcA*, *cspB* et *hsp33* dans les conditions testées. Ceci suggère que la régulation de la transcription de ces gènes par la protéine Rgg_{0182} se fasse indirectement, via l'intervention d'un autre régulateur transcriptionnel non identifié. L'identification d'autres sites de fixation à l'ADN de la protéine Rgg_{0182} permettrait de confirmer ou d'infirmer la séquence consensus de fixation proposé par Romain Henry. A partir de la séquence de fixation putative ainsi obtenue, l'analyse *in silico* du génome de *S. thermophilus* LMG18311 permettra d'identifier des sites de fixation potentiels de la protéine Rgg_{0182} à l'ADN et ainsi de prédire son régulon.

Les études de la fixation de la protéine RopB à l'ADN chromosomique de *S. pyogenes in vivo* ont mis en évidence 62 sites de fixation lors d'une croissance en phase exponentielle et 65 sites lors d'une croissance en phase stationnaire (Anbalagan *et al.,* 2011 ; Anbalagan *et al.,* 2012). Bien que 125 sites de fixation de la protéine RopB à l'ADN ont ainsi pu être identifiés, seuls 2 sont communs aux deux phases de croissance (Anbalagan *et al.,* 2012). Ces données suggèrent que la phase de croissance influe sur la capacité de fixation à l'ADN de la protéine RopB. De plus, malgré le grand nombre de site de fixation à l'ADN retrouvé, aucune séquence consensus de fixation à l'ADN n'a pu être déterminée. Ainsi, les conditions de croissance, et donc l'environnement bactérien, pourraient influer sur la fixation à l'ADN des protéines Rgg. Afin de mieux caractériser la capacité de la protéine Rgg_{0182} à se fixer à l'ADN, des expériences d'immuno-précipitation des complexes Rgg_{0182}/ADN *in vivo* permettraient d'étudier la fixation de la protéine Rgg_{0182} dans différents contextes environnementaux (phase de croissance, milieu…).

La présence d'un domaine HTH dans la partie N-terminale des protéines Rgg suggère que la fixation à l'ADN de ces protéines se fasse via ce domaine. Toutefois, ceci n'a pas encore été démontré. Le fort polymorphisme de ce domaine au sein des protéines Rgg, avec seulement 7 aa conservés sur les 62 aa constituant le domaine HTH (Henry 2011), pourrait expliquer la divergence des séquences consensus de fixation à l'ADN définies pour certaines protéines Rgg (Rawlinson *et al.,* 2005 ; Samen *et al.,* 2006). Ainsi, une protéine Rgg_{0182} chimérique possédant à la place de son domaine HTH celui d'une autre protéine Rgg incapable de se fixer à l'ADN des régions promotrice des gènes shp_{0182} et pep_{0182} pourrait être construite. L'étude de sa fixation à l'ADN permettrait de vérifier si la nature de la séquence primaire du domaine HTH confère une spécificité de fixation.

La mise en évidence d'une interaction entre la protéine RopB de *S. pyogenes* et un co-facteur, LacD.1, entrainant une modulation de la spécificité de fixation à l'ADN de RopB (Loughman *et al.,* 2006 ; Anbalagan *et al.,* 2012), suggère qu'au sein de la cellule bactérienne, les protéines Rgg peuvent nuancer leur fixation à l'ADN aussi bien en fonction des conditions environnementales qu'en fonction de la présence de co-facteurs. Ainsi, l'absence de tels cofacteurs dans les réaction d'EMSA pourrait expliquer la non-fixation de la protéine Rgg_{0182} sur l'ADN des régions promotrices des gènes *clpE*, *clpL*, *clpP*, *clpX*, *clpC*, *groES*, *dnaK*, *hrcA*, *cspB* et *hsp33.* Toutefois, ces mêmes expériences ayant permis de démontrer que la fixation de la protéine

Rgg_{0182} sur les promoteurs des gènes *pep_{0182}* et *shp_{0182}* suggère que, si de tels cofacteurs existent, ceux-ci ne seraient requis que pour la fixation de la protéine Rgg_{0182} sur des loci éloignés au gène *rgg_{0182}*.

2. Quel est le rôle physiologique des protéines Rgg de *S. thermophilus* LMG18311 ?

2.1. La protéine Rgg_{0182} participe-t-elle à la réponse aux stress ?

S. thermophilus est une bactérie capable de faire face aux contraintes environnementales (faible pH, faible osmolarité, stress oxydant, carence nutritive, concurrence avec d'autres micro-organismes, congélation …) générés par les procédés technologiques. Cette habilité à survivre à ces pressions environnementales est essentielle pour son utilisation en tant que starter dans l'industrie agroalimentaire. Ces changements environnementaux génèrent un état de stress pour la cellule qui conduit à une modulation de l'expression de ses protéines (Arena *et al.,* 2006 ; Salzano *et al.,* 2007 ; Zotta *et al.,* 2008). Différents gènes sont associés à l'adaptation et à la réponse aux stress acide, thermique ou oxydant (Wouters *et al.,* 1999 ; Giliberti *et al.,* 2002 ; Varcamonti *et al.,* 2003 ; Thibessard *et al.,* 2004 ; Varcamonti *et al.,* 2006 ; Li *et al.,* 2011). Chez les bactérie lactiques, les protéines HrcA (répresseur de gènes de réponse aux stress de classe I chez *B. subtilis*) (Narberhaus 1999) et CtsR (répresseur de gènes de réponse aux stress de classe III chez *B. subtilis*) (Derre *et al.,* 1999) sont impliqués dans la régulation, respectivement, de chaperonnes (GrpE/DnaK/DnaJ, GroEL/GroES) et des protéases ATP dépendantes Clp (ClpP, ClpX, ClpC, ClpE, ClpL) (van de Guchte *et al.,* 2002). Les régulateurs de l'expression des protéines de réponse aux stress jouent un rôle majeur dans la survie bactérienne aussi bien en conditions de stress qu'en condition normale de croissance. Leur inactivation affecte la transcription, la synthèse de protéines, la croissance et la tolérance aux stress chez plusieurs espèces, incluant *L. lactis* (Varmanen *et al.,* 2000), *S. pyogenes* (Chastanet *et al.,* 2001 ; Woodbury *et al.,* 2003), *S. mutans* (Lemos *et al.,* 2001) et *Lb. sakei* (Hufner *et al.,* 2007).

Les travaux de thèse de Romain Henry ont mis en évidence l'implication de la protéine Rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 dans la régulation de protéines de stress lors d'une croissance en milieu MCD à 30°C. En effet, la protéine Rgg_{0182} régule négativement la transcription des gènes *hrcA*, *clpC*, *clpE*, *clpL*, *clpP*, *clpX*, *dnaK*, *groES*, *hsp33*. Toutefois, elle n'influe pas sur la transcription des gènes *ctsR*, *dnaJ*, *groEL*, *cspA* et *cspB* (Henry 2011). Ainsi, bien que régulant la transcription des gènes de la famille *clp* appartenant au régulon de CtsR, la protéine Rgg_{0182} ne contrôle pas la transcription du régulateur transcriptionnel CtsR. Au contraire Rgg_{0182} régule le régulateur transcriptionnel HrcA mais n'influe pas sur l'ensemble de son régulon car seuls les gènes *dnaK* et *groES* voient leur transcription modulée en absence du gène *rgg_{0182}*. Ainsi, dans les conditions testées, la protéine HrcA ne régulerait pas la transcription des gènes *dnaJ* et *groEL* et la

protéine Rgg_{0182} agirait sur la transcription du régulon du régulateur CtsR sans réguler l'expression de ce dernier. De manière étonnante, la diminution de la transcription du gène *hrcA* chez une souche de *S. thermophilus* LMG18311 dans laquelle le gène rgg_{0182} est inactivé n'entraine pas une levée de la répression de la transcription des gènes *dnaK*/*dnaJ* et *groEL*/*groES* mais, au contraire, une diminution de la transcription des gènes *groES* et *dnaK* (Henry 2011). Ces résultats laissent penser que la protéine Rgg_{0182} participerait à la régulation de ces gènes sans l'intermédiaire de la protéine HrcA et pourrait donc avoir un effet antagoniste de la protéine HrcA dans les conditions testées.

Par ailleurs, la souche Δrgg_{0182} présente une sensibilité plus importante que la souche sauvage à une exposition de 30 min à 52°C conduisant à une diminution de sa survie. Ainsi la protéine Rgg_{0182} participe à la tolérance au stress chaud de *S. thermophilus* LMG18311. Ces travaux démontrent pour la première fois l'implication d'une protéine de la famille Rgg dans la tolérance au stress thermique. En effet, bien que la protéine RopB de *S. pyogenes* participe à la régulation de l'expression de protéine chaperonnes (Chaussee *et al.,* 2001 ; Chaussee *et al.,* 2004), aucun phénotype n'a été associé à la tolérance au stress thermique. Le fait que la survie du mutant Δrgg_{0182} face à un stress thermique n'ait été observée qu'en milieu MCD suggère que les protéines de la famille Rgg soient requises dans des conditions spécifiques pour répondre aux stress. L'analyse des taux de transcription des gènes codant des chaperonnes et protéases en condition de stress réalisée par Romain Henry a révélé que seule la transcription des gènes *clpE* et *cspB* est modulée entre la souche LMG18311 et le mutant Δrgg_{0182} (Henry 2011). La diminution du taux de transcription du gène *cspB* suggère que la protéine CspB ne soit pas sollicitée dans ces conditions et que la protéine Rgg_{0182} réprimerait donc son expression. Ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature qui montrent que la protéine CspB est requise à bases températures (Perrin *et al.,* 1999 ; Wouters *et al.,* 1999). Au contraire, la transcription du gène *clpE* est induite par la protéine Rgg_{0182}. Chez *S. pneumoniae*, le gène *clpE* est requis dans la tolérance au stress chaud (Chastanet *et al.,* 2001). Ainsi, la diminution de la survie du mutant Δrgg_{0182} pourrait être due, en partie, à la diminution du taux de transcrit du gène *clpE*. La construction d'un mutant de délétion $\Delta clpE$ et l'analyse de sa tolérance au stress chaud permettrait de vérifier cette hypothèse. L'étude réalise par Li *et al*. (2012) met en évidence que l'exposition pendant 15 ou 30 min à 50°C d'une culture de *S. thermophilus* LMG18311 réalisée à 42°C induit des différences de transcription de 196 gènes, dont 102 qui sont sur-transcrits et 94 sous-transcrits par rapport à la condition non stressée. Ces gènes codent aussi bien des protéines de réponses aux stress que des régulateurs transcriptionnels, des protéines impliquées dans la transduction de signaux, des protéines de paroi… (Li *et al.,* 2011). Ainsi, pour faire face à un stress chaud, *S. thermophilus* LMG18311 module la transcription d'un nombre important de gènes impliqués dans des fonctions biologiques variées. La protéine Rgg_{0182} pourrait donc réguler la transcription d'autres gènes codant des protéines importantes pour la survie de *S. thermophilus* lors d'une exposition à forte température. L'analyse

du régulon de la protéine Rgg_{0182} par comparaison du transcriptome et/ou protéome de la souche LMG18311 et son dérivé Δ*rgg*$_{0182}$ en conditions de stress chaud permettrait d'identifier les gènes qui participe à sa tolérance au stress thermique.

Par ailleurs, les données de la littérature montrent que plusieurs protéines appartenant à la famille Rgg sont impliquées dans la réponse à différents stress (Sanders *et al.,* 1998 ; Fernandez *et al.,* 2006 ; Bortoni *et al.,* 2009). Comme les protéines chaperonnes et les protéases ne participent pas uniquement à la réponse au stress thermique mais également à d'autres stress (Zugel *et al.,* 1999 ; van de Guchte *et al.,* 2002 ; Arena *et al.,* 2006), la protéine Rgg_{0182} pourraient être requise pour l'adaptation de *S. thermophilus* à divers stress. L'étude comparative de la survie de la souche LMG18311 et du mutant Δ*rgg*$_{0182}$ à différents stress (osmotique, oxydant, nutritif, acide) n'a pas, pour l'instant, permis d'étayer cette hypothèse et devra donc être poursuivie. De la même façon, les 6 autres gènes *rgg* présents sur le génome de *S. thermophilus* LMG18311 pourraient, eux aussi, participer à la réponse à différents stress. La réponse à divers stress des différents mutant Δ*rgg* de *S. thermophilus* LMG18311 pourra également être étudiée.

2.2. Comment la protéine Rgg_{0182} participe-t-elle à la division cellulaire chez *S. thermophilus* ?

La division cellulaire est un processus fondamental nécessaire à la régénération de tout organisme consistant à transmettre le patrimoine génétique d'une bactérie à ses descendants. Ce processus complexe permet la division d'une cellule mère pour former deux cellules filles identiques. Ce processus est composé de quatre grands mécanismes : la réplication de l'ADN, la ségrégation du chromosome, la scission de la cellule mère en deux cellules filles par la mise en place d'un septum et la séparation des deux cellules filles en cellules individuelles par clivage du peptidoglycane les reliant. Le processus de division cellulaire nécessite le recrutement de diverses protéines de la division (Rothfield *et al.,* 1999 ; Buddelmeijer *et al.,* 2002 ; Errington 2003 ; Egan *et al.,* 2013). Ces protéines interviennent dans différentes étapes telles que l'invagination de la membrane plasmique, la synthèse du peptidoglycane permettant l'accroissement de la taille cellulaire et dans la synthèse du peptidoglycane septal permettant la scission de la cellule mère en deux cellules filles. La division cellulaire peut s'achever par la séparation des deux nouvelles cellules filles en cellules individuelles.

La présence d'un phénotype de courtes chaines pour la souche LMG18311 de *S. thermophilus* dans laquelle le gène *rgg*$_{0182}$ est délétée ainsi qu'une morphologie cellulaire différente à celle de la souche sauvage suggèrent que la protéine Rgg_{0182} interviendrait dans la division cellulaire. Comme la souche Δ*rgg*$_{0182}$ présente des chaines de cellules plus courte que la souche sauvage, l'hypothèse la plus probable est que la protéine Rgg_{0182} régulerait négativement un ou plusieurs gènes impliqués dans la séparation des cellules filles. Ce mécanisme est sous la dépendance d'hydrolases du peptidoglycane qui clive les liaisons du PG reliant les deux cellules

filles (Layec *et al.,* 2008). Chez *S. thermophilus*, seule l'hydrolase du PG, Cse, a été identifiée comme participant à la séparation des cellules (Borges *et al.,* 2005). Toutefois, la protéine Rgg_{0182} ne régulerait pas la transcription de ce gène (Henry 2011). L'existence d'autres hydrolases du PG, non caractérisées, impliquées dans la séparation des cellules filles lors de la division cellulaire est envisageable. De par la présence d'une morphologie anormale des cellules de la souche Δrgg_{0182}, la protéine Rgg_{0182} pourrait réguler l'expression de protéines impliquées dans la division cellulaire et/ou la séparation des cellules filles. Chez *S. pneumoniae*, 9 protéines ont été identifiées comme participant à ces mécanismes. La protéine FtsZ polymérise une structure en anneau au niveau du site de septation permettant l'invagination de la membrane plasmique entrainant l'initiation de la scission cellulaire. La protéine FtsA participe à ce phénomène en assurant l'interaction entre FtsZ et la membrane plasmique (Lara *et al.,* 2005). Les protéines DivIB, FtsL et DivC sont recrutées au niveau du plan équatorial au niveau du site de septation bien que leurs actions soient inconnues à ce jour (Noirclerc-Savoye *et al.,* 2005 ; Le Gouellec *et al.,* 2008). Les protéines FtsW et PBP3 participent quant à elles à la biosynthèse de la paroi. La protéine FtsW permet la translocation des précurseurs du PG à travers la membrane plasmique qui sont ensuite incorporés dans le PG par l'intermédiaire des protéines PBP (Gerard *et al.,* 2002). La protéine PBP3 assure la synthèse du PG septal permettant la scission de la cellule mère en deux cellules filles (Morlot *et al.,* 2003). Les protéines PBP2x, PBP1a, PBP2b et RodA participent à la synthèse du PG non-septale et longitudinale (Noirclerc-Savoye *et al.,* 2003). La protéine DivIVA est recrutée tardivement lors de la scission et est impliquée dans la formation et la maturation des pôles cellulaires avant la séparation des cellules (Fadda *et al.,* 2007). Les gènes codant ces protéines sont présents sur le génome de *S. thermophilus* LMG18311. De plus, chez *S. thermophilus*, la délétion des gènes *rodA*, *pbp2* et *mrdE* entraine la production de chaînes de longues tailles (Thibessard *et al.,* 2002 ; Thibessard *et al.,* 2004), suggérant que ces enzymes sont impliquées directement ou indirectement dans la séparation cellulaire. Ainsi, la protéine Rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 pourrait réguler négativement l'expression d'une ou plusieurs de ces protéines participant aux mécanismes de division cellulaire et de séparation des cellules filles. Cette hypothèse est corroborée par les données de la littérature. En effet, l'étude réalisée par Zheng *et al.* (2010) a mis en évidence un phénotype de longues chaines pour une souche de *S. suis* délétée du gène *rgg*. Ce phénotype s'explique, du moins en partie, par le fait que la protéine Rgg régule la transcription du gène *divIVA* (Zheng *et al.,* 2011). L'étude des taux de transcrits des gènes codant les protéines participant au mécanisme de division cellulaire dans un contexte sauvage et mutant Δrgg_{0182} permettrait de vérifier cette hypothèse. Toutefois, le génome de *S. thermophilus* LMG18311 code au moins 81 protéines impliquées dans la formation du peptidoglycane et de l'enveloppe cellulaire et au moins 20 protéines participant à la division cellulaire et à la séparation des cellules filles. Afin de vérifier si la protéine Rgg_{0182} régule la transcription d'un ou plusieurs des gènes codant ces

protéines, l'analyse comparative du taux de transcription de ces gènes dans un contexte sauvage et mutant Δ*rgg*$_{0182}$ devra être effectuée.

2.3. Comment la protéine Rgg$_{0182}$ participe-t-elle à l'adhésion de *S. thermophilus* LMG18311 ?

Les résultats obtenus durant ces travaux de thèse ont permis de caractériser un phénotype d'adhésion thermo-induite par des interactions hydrophobes observé chez la souche Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus*. Ce phénotype est indépendant du phénotype courtes chaines puisqu'il n'est observé qu'à 50°C alors que la souche mutante présente le phénotype courtes chaines quelle que soit la température étudiée. Les résultats obtenus par AFM indiquent que la paroi cellulaire de la souche LMG18311 présente des macromolécules flexibles dont la structure est fortement modulée par la température. La longueur des macromolécules lorsqu'elles sont étirées est diminué à 50°C par rapport à 42°C. La température influerait donc sur la conformation et/ou la nature des polymères à la surface cellulaire de *S. thermophilus*. De plus, de tels polymères ne sont pas retrouvés à la surface cellulaire du mutant Δ*rgg*$_{0182}$ suggérant que la protéine Rgg$_{0182}$ régulerait positivement la production de ces molécules de surface. Cette hypothèse est en accord avec les données de la littérature puisque les protéines Rgg de *S. agalactiae*, *S. pyogenes* et *S. suis* participent à l'adhésion des bactéries qui les possèdent, en régulant l'expression de protéines de surface (Hytonen *et al.,* 2006 ; Samen *et al.,* 2006 ; Zheng *et al.,* 2011). L'augmentation des interactions hydrophobes entre la surface cellulaire de la souche mutante Δ*rgg*$_{0182}$ et les parois des puits de la microplaque en lien avec l'augmentation de la température pourrait, en partie, s'expliquer par la différence de rugosité de surface des cellules mutantes aux deux températures. En effet, à 50°C la rugosité cellulaire de la souche Δ*rgg*$_{0182}$ est significativement diminuée par rapport à 42°C, tandis que celle de la surface de la souche sauvage reste constante quelle que soit la température considérée et est similaire à celle de la souche mutante à 42°C. La protéine Rgg$_{0182}$ pourrait donc réguler de façon température dépendante des protéines de surface qui moduleraient la rugosité cellulaire. La comparaison des protéomes issus de la paroi et de l'enveloppe cellulaire de la souche LMG18311 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* par spectrométrie de masse permettrait d'identifier quelles sont les molécules responsables de la différence de rugosité entre les deux types de cellules ainsi que les polymères de surface présents sur les cellules sauvage et donc de mieux caractériser le phénotype d'adhésion thermo-induite de la souche Δ*rgg*$_{0182}$.

Par ailleurs, les données de la littérature indiquent que plusieurs protéines appartenant à la famille de régulateur transcriptionnel Rgg sont impliquées dans la capacité de formation de biofilm des souches qui les possèdent (Bortoni *et al.,* 2009 ; Chang *et al.,* 2011). La modulation des protéines de surface suggèrent que la protéine Rgg$_{0182}$ pourrait jouer un rôle dans l'adhésion de *S. thermophilus*, étape initiale de la formation de biofilm. Ainsi, les données de la littérature

montrant l'implication d'un mécanisme de QS dans la formation de biofilm via des protéines Rgg et les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse suggèrent que la protéine Rgg_{0182} pourrait être impliquée dans la formation de biofilm. La comparaison de la capacité de formation de biofilm entre la souche sauvage et Δ*rgg*$_{0182}$ par des expériences au cristal violet permettrait de vérifier cette hypothèse.

2.4. La protéine Rgg_{0182} est-elle un régulateur global de l'expression génique de *S. thermophilus* ?

Les données de la littérature indiquent que certaines protéines appartenant à la famille Rgg sont des régulateur globaux de la transcription génique (Chaussee *et al.,* 2003 ; Dmitriev *et al.,* 2006 ; Samen *et al.,* 2006 ; Zheng *et al.,* 2011). Un régulateur global se définit par (i) sa capacité à réguler un grand nombre de gènes appartenant à des classes différentes, c'est-à-dire intervenant dans des fonctions biologiques distinctes, (ii) sa capacité à réguler la transcription de gènes codant d'autres régulateurs transcriptionnels et (iii) sa participation directe ou indirecte (par l'intermédiaire de régulateurs variés agissant eux-mêmes sur des gènes spécifiques) à une cascade de régulations complexes (Martinez-Antonio *et al.,* 2003).

Les résultats obtenus au cours de ce travail permettent de faire l'hypothèse que le gène *rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* LMG18311 pourrait coder un régulateur transcriptionnel global de l'expression génique. En effet, la protéine Rgg_{0182} (i) est impliquée dans des fonctions biologiques distinctes comme la réponse au stress thermique, la séparation cellulaire et l'adhésion, (ii) contrôle la transcription de gènes inclus dans les régulons HrcA et CtsR et (iii) contrôle directement l'expression des gènes *pep*$_{0182}$ et *shp*$_{0182}$ (elle se fixe sur leur promoteur) et indirectement celle des gènes *hrcA*, *clpC*, *dnaK*, *hsp33*, *groES*, *clpP*, *clpX*, *clpE* et *clpL* et *cspB*.

Afin de vérifier cette hypothèse et de mieux caractériser le régulon de la protéine Rgg_{0182}, la comparaison des protéomes de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* et du mutant Δ*rgg*$_{0182}$ a été réalisée par spectrométrie de masse. Ainsi, 65 protéines dont la quantité diffère entre les deux souches ont pu être identifiées. Celles-ci participent à différentes fonctions biologique. La vérification par une approche transcriptomique de l'implication de la protéine Rgg_{0182} dans la régulation de la transcription des gènes codant ces protéines a permis de valider seulement 6 gènes cibles sur les 21 testées. L'absence de corrélation entre l'approche transcriptomique et l'approche protéomique peut s'expliquée, d'une part, par des modifications post-transcriptionnelles différentes chez les deux souches. En effet, la protéine Rgg_{0182} pourrait, comme pour d'autres protéines Rgg ayant une fonction de régulateur global de l'expression génique, réguler la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans la stabilité des ARN ou des RNase, des protéines participant à la traduction ou générant des modifications post-traductionnelles, ou encore des protéases (Dmitriev *et al.,* 2006 ; Zheng *et al.,* 2011). Ceci engendrerait des variations de l'abondance des protéines produites entre les deux types de

cellules. D'autre part, la méthode employée peut également justifier l'absence de corrélation entre les deux approches. En effet, la méthode du « spectral counting » est une approche semi-quantitative (Liu *et al.,* 2004 ; Zybailov *et al.,* 2005), ne représentant pas de façon sûre la quantité des protéines identifiées car seule la corrélation du nombre de peptides identifiant la protéine avec son abondance permet de quantifier celle-ci. Sachant que seules les protéines qui sont en quantité suffisante peuvent être identifiées, cette technique n'est pas représentative de l'ensemble des protéines présentes au sein des cellules. De plus, un autre biais est la nature des protéines présentes dans l'échantillon. En effet, les protéines extraites utilisées pour ces expériences sont majoritaire solubles, et représentent donc les protéines issues du cytoplasme cellulaire. Ainsi, les protéines membranaires et de la paroi cellulaire sont peu présentes dans l'échantillon et, par conséquent, sont peu détectées par la méthode utilisée. Ainsi, le faible nombre de cibles putatives de la protéine Rgg_{0182} identifiées peut s'expliquer pour ces différentes raisons. Une approche transcriptomique par des puces à ADN permettrait d'éviter ces biais et de caractériser avec plus de précision le régulon du régulateur transcriptionnel Rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311.

Néanmoins, l'étude du régulon de la protéine Rgg_{0182} de *S. thermophilus* a permis de montrer l'implication de la protéine Rgg_{0182} dans la régulation transcriptionnel des gènes *acoC*, *carA*, *manL*, *pepQ*, *ldh* et *stu1986*.

La transcription du gène *acoC* est régulée positivement par la protéine Rgg_{0182}. Ce gène appartient à l'opéron *acoABCL* qui code les différentes sous-unités du complexe protéique de l'acétoïne déshydrogénase : le gène *acoA* code la sous-unité E1 α, le gène *acoB* la sous-unité E1 β, le gène *acoC* la sous-unité E2 et le gène *acoL* la sous-unité E3 (Huang *et al.,* 1999). Cette enzyme transforme l'acétoïne en acétaldéhyde. L'acétoïne et l'acétaldéhyde sont des composés issus du métabolisme du pyruvate participant à la flaveur des produits laitiers (Imhof R. 1995 ; Ott 1997). Chez *B. subtilis*, la transcription de l'opéron *acoABCL* est sous la dépendance du régulateur transcriptionnel AcoR codé par le gène *acoR* situé en aval de l'opéron *acoABCL* sur le chromosome (Ali *et al.,* 2001). Cependant, le gène *acoR* n'est pas présent sur le génome de *S. thermophilus*. Ainsi la protéine Rgg_{0182} pourrait avoir le même rôle que le régulateur transcriptionnel AcoR et permettrait de réguler positivement la transcription de l'opéron *acoABCL*. Afin de vérifier cette hypothèse, le dosage d'acétoïne dans le milieu de culture de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* et de son dérivé délété du gène rgg_{0182} pourrait être effectué.

Par ailleurs, la protéine Rgg_{0182} régule négativement la transcription du gène *manL* organisé en opéron avec les gènes *manN* et *manM*. Cet opéron code le système phosphotransférase phosphoénolpyruvate dépendant (PTS pour phosphoenolpyruvate (PEP)-sugar phosphotransferase system) qui couple le transport et la phosphorylation du glucose, du mannose, du glucose non-métabolisé ou l'analogue du mannose le 2-déoxyglucose et du fructose

(Liberman *et al.,* 1984 ; Neron *et al.,* 1987 ; Vadeboncoeur *et al.,* 1997). Ce système multienzymatique est composé des protéines générales HPr et de l'enzyme EI et des trois protéines spécifiques aux sucres appelées IIAB, IIC et IID (Bourassa *et al.,* 1990 ; Lortie *et al.,* 2000). L'enzyme catalyse le transfert d'un groupe phosphate du PEP à la HPr qui le transmet ensuite au domaine EIIA qui lui-même le transfert au domaine IIB. Ce dernier transfert le groupement phosphate au sucre qui est transporté par la perméase composée des protéines IIC et IID (Figure 71).

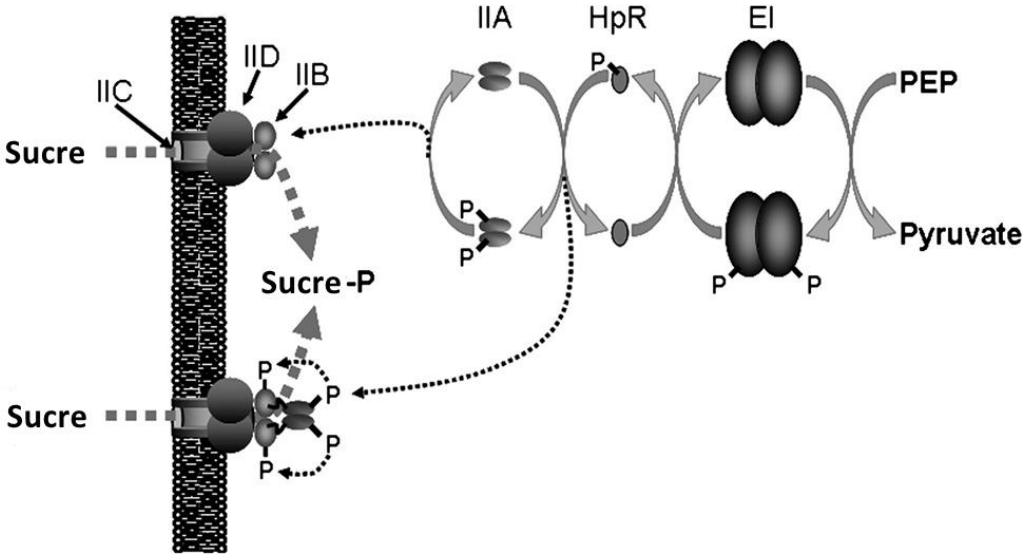


Figure 71 : Représentation schématique du système de transport PTS-mannose et de la cascade de phosphorylation (Zuniga *et al.,* 2005). Le groupement phosphate est transféré successivement du PEP au EI, HPr puis à la sous-unité IIAB. Finalement le groupement phosphate est transféré du domaine IIB au sucre entrant.

Toutefois, chez *S. thermophilus* le système PTS codé par les gènes *manLMN* ne permet pas l'import de mannose ni du 2-deoxyglucose (Cochu *et al.,* 2003). L'étude de la croissance avec différentes sources de carbone, tel que le fructose et le glucose, d'un mutant délété des gènes *manLMN* permettrait de vérifier si ces derniers sont bien impliqués dans le transport de ces sucres chez *S. thermophilus*. De même, l'étude de la croissance d'un mutant Δ*rgg*$_{0182}$ dans un milieu supplémenté par les mêmes sources de carbone permettrait d'analyser l'implication de la protéine Rgg$_{0182}$ dans la régulation du transport ces sucres chez *S. thermophilus* LMG18311.

De plus, la protéine Rgg$_{0182}$ régule positivement le gène *ldh*. Celui-ci code la L-lactate déshydrogénase qui catalyse la conversion du pyruvate en lactate et permet l'oxydation d'un NADH en NAD$^+$. En condition de métabolisme homolactique, cette voie permet également de ré-oxyder la majeure partie du NADH. L'inactivation du gène *ldh* chez *S. thermophilus* a été testée par différentes approches mais sans succès suggérant que la protéine Ldh joue un rôle indispensable à la survie de *S. thermophilus* (Hols *et al.,* 2005). L'étude de la croissance d'une souche délétée du gène *rgg*$_{0182}$ en milieu minimum contenant comme seule source de carbone du lactate ou du

pyruvate permettrait de vérifier l'implication de la protéine Rgg_{0182} dans la voie métabolique à laquelle participe la protéine Ldh de *S. thermophilus* LMG18311.

La protéine Rgg_{0182} régule également positivement la transcription du gène *pepQ*. Ce dernier code une dipeptidase hydrolysant des peptides contenant un résidu proline (Stucky *et al.,* 1995). *S. thermophilus* possède un système protéolytique similaire à ceux retrouvé chez d'autres bactéries lactique composé (i) d'une protéase extracellulaire ancrée à la cellule capable d'hydrolyser la caséine, composant majeur du lait, (ii) d'un lot de système de transport de peptides et d'aa permettant leur importation au sein de la cellule et (iii) d'un lot de peptidases intracellulaires impliquées dans l'hydrolyse des peptides issus de la caséine (Hols *et al.,* 2005). *S. thermophilus* possède une vingtaine de peptidases présentant des homologies avec celle de *L. lactis* (Hols *et al.,* 2005). Toutefois, seul un nombre limité de peptidases a été caractérisé (PepO, PepA, PepC, PepN, PepS et PepX) chez *S. thermophilus* (Chapot-Chartier *et al.,* 1994 ; Rul *et al.,* 1997 ; Chavagnat *et al.,* 2000). De par le grand nombre de peptidases codées par le génome de *S. thermophilus* LMG18311 (Bolotin *et al.,* 2004), l'étude du rôle de la peptidase PepQ et de l'effet de sa régulation par la protéine Rgg_{0182} semble donc très complexe.

De manière intéressante, l'expression des gènes *acoC*, *manL*, *pepQ* et *ldh* est sous le contrôle de la protéine CcpA (catabolite control protein A) (van den Bogaard *et al.,* 2000 ; Ali *et al.,* 2001 ; Zomer *et al.,* 2007 ; Tong *et al.,* 2011). Cette protéine est un régulateur transcriptionnel qui forme un complexe avec la protéine HPr phosphorylée au niveau d'un résidu sérine et se fixe au niveau des régions promotrices des gènes cibles qu'elle régule. Cette fixation à l'ADN se fait uniquement en présence d'intermédiaire de la glycolyse, tels que le fructose-1,6- bisphosphate et le glucose-6-phosphate (Hueck *et al.,* 1995 ; Stulke *et al.,* 2000 ; van den Bogaard *et al.,* 2000 ; Schumacher *et al.,* 2007). Ainsi, la protéine Rgg_{0182} pourrait réguler la transcription du gène *ccpA* présent sur le génome de *S. thermophilus* LMG18331 et régulerait donc indirectement la transcription des gènes *acoC*, *manL*, *pepQ* et *ldh*. Afin de vérifier cette hypothèse, le taux de transcrit du gène *ccpA* devra être analysé dans un contexte sauvage et Δrgg_{0182} et l'étude de la fixation de la protéine Rgg_{0182} à l'ADN des régions promotrices des gènes *acoC*, *manL*, *pepQ* et *ldh* permettra de déterminer si la protéine Rgg_{0182} régule la transcription de ces gènes indirectement.

La protéine Rgg_{0182} régule positivement la transcription du gène *carA* qui code la petite sous-unité de la carbamyl phosphate synthétase. Le gène *carA* est organisé en structure opéronique avec le gène *carB* codant la grande sous-unité de la carbamyl phosphate synthétase. Cette enzyme permet la production de carbamyl phosphate à partir de bicarbonate, de glutamine et d'ATP (Martinussen *et al.,* 2001) (Figure 72).

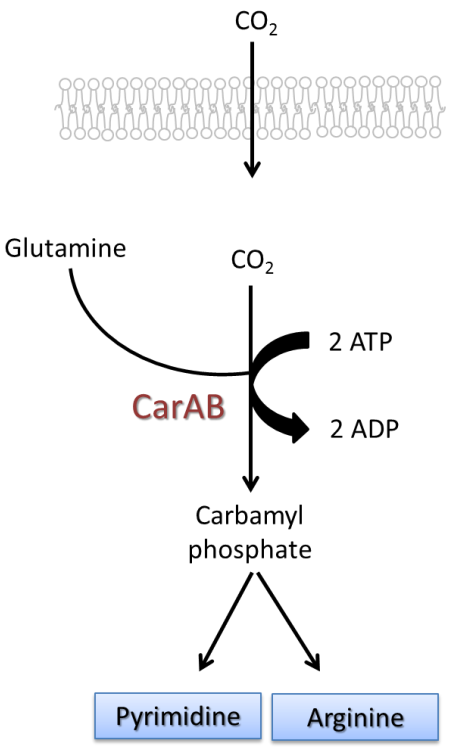


Figure 72 : Représentation schématique de la réaction enzymatique de la carbamyl phosphate synthétase CarAB chez *S. thermophilus* (d'après Arioli *et al*., 2008).

Cette réaction enzymatique est la première étape des voies de biosynthèse de la pyrimidine et de l'arginine chez *S. thermophilus* (Arioli *et al.,* 2009). Contrairement à *B. subtilis*, les streptocoques ne possèdent qu'une seule carbamyl phosphate synthétase (Nicoloff *et al.,* 2001). La délétion du gène *carB* chez *S. thermophilus* entraine une auxotrophie à l'arginine et à l'uracile (Arioli *et al.,* 2009). Ainsi, l'étude de la croissance de la souche de LMG18311 de *S. thermophilus* délétée du gène rgg_{0182} en présence d'arginine et/ou de pyrimidine permettrait de vérifier si la protéine Rgg_{0182} participe bien à la régulation de l'entrée dans les voies de biosynthèse de l'arginine et des pyrimidines.

Enfin, la protéine Rgg_{0182} régule positivement la transcription du gène *stu1986*. Bien que le produit du gène *stu1986* soit annoté dans les bases de données comme étant de fonction inconnue, l'analyse par BLASTP de la séquence primaire de Stu1986 a révélé que celle-ci présente un fort pourcentage d'identité avec des protéines appartenant à la famille Gls24 chez les streptocoques. La famille Gls24 a été identifiée pour la première fois chez *Enterococcus faecalis* comme une protéine de réponse générale au stress (Giard *et al.,* 1997 ; Giard *et al.,* 2000). La délétion de ce gène conduit à une réduction de la survie d'*E. faecalis* en présence de sels biliaires (Giard *et al.,* 2000). De plus, l'expression de la protéine Gls24 est induite en présence de sels biliaires (0,3%), lors d'une carence en glucose (Giard *et al.,* 2002), par une exposition à pH acide (3,2) (Hew *et al.,* 2007), en présence de nitrite (Lenz *et al.,* 2010), de cuivre, de zinc ou en condition oxydante (Stoyanov *et al.,* 2010). La protéine Gls24 participe également à la virulence

d'*E. faecalis*, puisque qu'une délétion du gène *gls24* conduit à une atténuation de sa virulence (Teng *et al.,* 2005). Par ailleurs, la délétion du gène *gls24* chez *E. faecalis* conduit à une diminution du nombre de cellules par chaines (Giard *et al.,* 2002). Ainsi, la protéine Rgg_{0182} régule positivement la transcription du gène *stu1986* qui coderait une protéine de réponse générale au stress. Les phénotypes « courtes chaines » et de diminution de la tolérance au stress chaud de la souche Δrgg_{0182} pourraient s'expliquer par la régulation du gène *stu1986* par la protéine Rgg_{0182}. Afin de confirmer le rôle de la protéine Stu1986 dans la réponse au stress et la séparation cellulaire, la construction d'une souche de *S. thermophilus* LMG18311 délétée du gène *stu1986* a été entreprise au laboratoire et l'analyse morphologique du mutant Δ*stu1986* ainsi que l'étude de sa tolérance face à différents stress permettront de vérifier cette hypothèse.

L'analyse de la transcription des 6 autres gènes *rgg* présents sur le génome de *S. thermophilus* LMG18311 dans un contexte sauvage et mutant Δrgg_{0182} a mis en évidence que la protéine Rgg_{0182} régule la transcription du gène Rgg_{1044}. Ainsi, la protéine Rgg_{0182} participerait à un réseau complexe de régulation impliquant une autre protéine Rgg. Cette nouvelle information rend d'autant plus complexe l'étude de la régulation génique par la protéine Rgg_{0182}. La caractérisation du régulon de la protéine Rgg_{0182} et celle de la protéine Rgg_{1044} permettrait de mieux appréhender ce réseau de régulation. De manière intéressante, les gènes rgg_{0182} et rgg_{1044} sont retrouvé uniquement au sein des mêmes génomes suggérant que ces deux gènes aient un mécanisme d'action commun.

L'ensemble des résultats obtenus durant ces travaux de thèse permettre de valider l'hypothèse que la protéine Rgg_{0182} est bien un régulateur global de l'expression génique chez *S. thermophilus* LMG18311.

Les données de la littérature, ainsi que les résultats obtenus lors de ces travaux de thèse posent la question de la généralisation du rôle de régulateur global de l'expression génique des protéines appartenant à la famille Rgg. Ainsi, les 6 autres protéines Rgg de *S. thermophilus* LMG18311 pourraient être elles-aussi des régulateurs transcriptionnels globaux. La caractérisation des régulons de chaque protéine Rgg de *S. thermophilus* LMG18311 permettra de vérifier cette hypothèse.

3. Quel est l'avantage pour *S. thermophilus* de posséder plusieurs copies Rgg ?

L'étude de la transcription des 7 gènes *rgg* présents au sein du génome de *S. thermophilus* LMG18311 a révélé que la transcription de ces gènes est modulée en fonction des conditions de croissance et que celles-ci n'influent pas de la même façon sur la transcription de tous les gènes *rgg*. Ces données suggèrent que chaque gène *rgg* de *S. thermophilus* serait exprimé, et donc requis, à des moments et/ou à des conditions particulières de la croissance.

Mis à part cette étude, l'expression de gènes *rgg* n'a pour l'instant été étudiée que pour le gène *ropB* de *S. pyogenes* dont la transcription est modulée en fonction de la phase de croissance (Neely *et al.,* 2003). La caractérisation du régulon de la protéine RopB en phase exponentielle et stationnaire de croissance a révélé que cette protéine possède deux régulons distincts (différent par la nature des gènes régulés et leur niveau de transcription), spécifiques de chacune des phases (Dmitriev *et al.,* 2006). Ainsi, les conditions environnementales influenceraient, d'une part, le niveau de transcription de gènes *rgg* et, d'autre part, la nature des gènes qu'ils régulent. C'est précisément le cas de la protéine Rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 qui régule différentiellement la transcription de gènes codant des chaperonnes et des protéases lorsque les cellules sont soumises ou non à un stress chaud (Henry 2011). La détermination des paramètres de la croissance (phase de croissance, nature des nutriments, acidité, concentration en oxygène, température…) permettant l'activation des régulons *rgg* de *S. thermophilus* LMG18311 permettrait de compléter cette analyse et de déterminer si ces régulons diffèrent d'une protéine Rgg à une autre.

Le phénotype « courtes chaines » du mutant Δrgg_{0182} n'est pas observé chez les autres mutants Δ*rgg* de *S. thermophilus* LMG183111. Ceci suggère que les différentes protéines Rgg n'auraient pas des régulons identiques. La mise en évidence d'un effet antagoniste des protéines Rgg2 et Rgg3 de *S. pyogenes* sur la transcription des gènes *shp2* et *shp3* suggère que les protéines Rgg codées par un même génome pourraient avoir des effets croisés (Chang *et al.,* 2011). Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire révèlent qu'un double mutant de *S. thermophilus* LMG18311 délété des gènes rgg_{0182} et rgg_{1511} présente un défaut de croissance en milieu saccharose et glucose alors que les simples mutants Δrgg_{0182} et Δrgg_{1511} ont une croissance comparable à la souche sauvage. Ces données corroborent l'hypothèse d'un effet croisé entre différentes protéines Rgg qui, dans ce cas, se traduit par un effet synergique dans le métabolisme du glucose.

Par ailleurs, l'action antagoniste des protéines Rgg2 et Rgg3 s'explique par une compétition de leur fixation au niveau de la région promotrice des gènes *shp2* et *shp3*. Ainsi, en fonction de l'abondance des protéines Rgg2 et Rgg3, celle qui est présente en plus grande quantité se fixe préférentiellement à la région promotrice du gène et active (dans le cas de la protéine Rgg2) ou réprime (dans le cas de la protéine Rgg3) la transcription des gènes cibles (Lasarre *et al.,* 2013). Cette compétition dépendante de la concentration en protéine Rgg permettrait d'empêcher l'induction prématurée du mécanisme de QS auquel elles participent. Ainsi, la modulation de l'expression des protéines Rgg par les conditions environnementales permettrait à la cellule d'exprimer les protéines Rgg uniquement lorsque celles-ci sont nécessaires et entrainerait une réponse adaptée pour répondre aux variations de l'environnement. Ainsi, les protéines Rgg de *S. thermophilus* LMG18311 assureraient la régulation fine et complexe de gènes permettant à la bactérie d'adapter sa physiologie aux changements environnementaux. Le maintien de multiples

gènes *rgg* dans les génomes de *S. thermophilus*, dont l'adaptation au milieu lait s'est traduit par la perte de nombreuses fonctions (Bolotin *et al.,* 2001 ; Bolotin *et al.,* 2004 ; Siezen *et al.,* 2005), est en faveur d'un rôle important de ces gènes dans la survie de *S. thermophilus.*

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse ainsi que les données de la littérature mettent en avant le lien entre les protéines Rgg et l'adaptation à l'environnement des bactéries qui les possèdent. Ainsi, l'appellation Rgg comme famille codant des régulateurs transcriptionnels de l'adaptation à l'environnement parait plus appropriée que celle de régulateur de la virulence, puisque celles-ci sont également retrouvées chez des espèces non-pathogènes. De plus, cette hypothèse est étayée par le fait que les génomes d'espèces non pathogènes (*S. thermophilus*, *L. lactis*, *Lb. sakei*...) semblent présenter un nombre de gènes *rgg* plus important que les génomes d'espèces pathogènes (Henry 2011).

4. Conclusions générales et perspectives

Les résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse ont permis de démontrer que le gène rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 code un régulateur transcriptionnel de la famille Rgg. La protéine Rgg_{0182} régule positivement la transcription des gènes shp_{0182} et pep_{0182} et participerait ainsi à un mécanisme de quorum sensing. Toutefois, le mécanisme de maturation de la phéromone Shp_{0182} devra être déterminé et son action concentration dépendante devra être démontrée. De même, l'identification du transporteur permettant la réimportation du peptide Shp_{0182} ainsi que l'étude d'une interaction possible entre ce dernier et le régulateur Rgg_{0182} devront être entreprises. Enfin, le rôle biologique de ce mécanisme et celui du peptide Pep_{0182} devront être déterminés.

Par ailleurs, les résultats obtenus durant cette thèse ont permis de démontrer l'implication de la protéine Rgg_{0182} dans la survie de *S. thermophilus* LMG18311 face à un stress chaud. La caractérisation des candidats potentiels responsables de la tolérance au stress chaud dont la transcription est sous la dépendance de la protéine Rgg_{0182} permettra de mieux appréhender le mécanisme de résistance au stress thermique de *S. thermophilus*. De plus, l'étude de l'implication de la protéine Rgg_{0182} à d'autres stress devra être entreprise.

En outre, l'étude morphologique d'un mutant Δrgg_{0182} a révélé une organisation majoritaire en diplocoques et une morphologie cellulaire atypiques indiquant que la protéine Rgg_{0182} est impliquée dans la régulation de la division cellulaire et la séparation des cellules chez *S. thermophilus*. L'identification des gènes cibles de la protéine Rgg_{0182}, responsable de ce phénotype, permettrait de comprendre la base moléculaire de ce phénomène. De plus, l'observation d'un phénotype d'adhésion thermo-induite due à une interaction hydrophobe du mutant Δrgg_{0182} aux parois des puits de la microplaque ainsi que la caractérisation de la surface cellulaire des souches sauvage et mutante met en évidence l'implication de la protéine Rgg_{0182}

dans la régulation de protéines de surface responsables des phénotypes observés. L'étude comparative des protéomes des souches LMG18311 et Δ*rgg*$_{0182}$ de *S. thermophilus* permettra d'identifier les produits de gènes régulés par la protéine Rgg$_{0182}$ responsables de ce phénotype. L'implication de la protéine Rgg$_{0182}$ dans la capacité à former des biofilms chez *S. thermophilus* devra également être étudiée.

Ces travaux de thèse ont permis de démontrer que le gène *rgg*$_{0182}$ code un régulateur global de l'expression génique chez *S. thermophilus* LMG18311. En effet, la protéine Rgg$_{0182}$ régule la transcription de gènes dont les produits sont impliqués dans différentes fonctions biologiques (métabolisme des carbohydrates, synthèse des pyrimidines et de l'arginine, réponse au stress…). Cependant, l'implication phénotypique du mutant Δ*rgg*$_{0182}$ dans ces différentes fonctions biologiques devra être analysée. De plus, la protéine Rgg$_{0182}$ régule la transcription d'autres régulateurs transcriptionnels dont une autre protéine Rgg et participerait ainsi à un réseau de régulation complexe. La détermination du régulon de la protéine Rgg$_{0182}$ et des réseaux de régulation auxquels elle participe devra être entreprise.

Enfin, l'analyse de la transcription des 7 gènes *rgg* de *S. thermophilus* LMG18311 a révélé que celle-ci est sous la dépendance des conditions environnementales. De plus, cette étude a mis en évidence que les protéines Rgg seraient requises dans des conditions spécifiques qui diffèrent en fonction de la protéine Rgg considérée. Afin de déterminer si les différentes protéines Rgg de *S. thermophilus* participent à une régulation fine de la transcription et si elles possèdent des actions croisées entre elles, la caractérisation des régulons des 7 protéines Rgg de *S. thermophilus* LMG18311 dans différentes conditions environnementales (phase de croissance, milieu de culture, température…) devra être effectuée.

Bibliographie

Bibliographie

Agaisse, H., M. Gominet, O. A. Okstad, A. B. Kolsto and D. Lereclus (1999). "PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in Bacillus thuringiensis." Mol Microbiol **32**(5): 1043-1053.

Alber, T. (2009). "Signaling mechanisms of the Mycobacterium tuberculosis receptor Ser/Thr protein kinases." Curr Opin Struct Biol **19**(6): 650-657.

Ali, N. O., J. Bignon, G. Rapoport and M. Debarbouille (2001). "Regulation of the acetoin catabolic pathway is controlled by sigma L in Bacillus subtilis." J Bacteriol **183**(8): 2497-2504.

An, F. Y. and D. B. Clewell (2002). "Identification of the cAD1 sex pheromone precursor in Enterococcus faecalis." J Bacteriol **184**(7): 1880-1887.

An, F. Y., M. C. Sulavik and D. B. Clewell (1999). "Identification and characterization of a determinant (eep) on the Enterococcus faecalis chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1." J Bacteriol **181**(19): 5915-5921.

Anbalagan, S., A. Dmitriev, W. M. McShan, P. M. Dunman and M. S. Chaussee (2012). "Growth phase-dependent modulation of Rgg binding specificity in Streptococcus pyogenes." J Bacteriol **194**(15): 3961-3971.

Anbalagan, S., W. M. McShan, P. M. Dunman and M. S. Chaussee (2011). "Identification of Rgg binding sites in the Streptococcus pyogenes chromosome." J Bacteriol **193**(18): 4933-4942.

Andersen, C. L., J. L. Jensen and T. F. Orntoft (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." Cancer Res **64**(15): 5245-5250.

Arena, S., C. D'Ambrosio, G. Renzone, R. Rullo, L. Ledda, F. Vitale, G. Maglione, M. Varcamonti, L. Ferrara and A. Scaloni (2006). "A study of Streptococcus thermophilus proteome by integrated analytical procedures and differential expression investigations." Proteomics **6**(1): 181-192.

Arioli, S., C. Monnet, S. Guglielmetti and D. Mora (2009). "Carbamoylphosphate synthetase activity is essential for the optimal growth of Streptococcus thermophilus in milk." J Appl Microbiol **107**(1): 348-354.

Atkinson, S. and P. Williams (2009). "Quorum sensing and social networking in the microbial world." J R Soc Interface **6**(40): 959-978.

Baba, T. and O. Schneewind (1998). "Instruments of microbial warfare: bacteriocin synthesis, toxicity and immunity." Trends Microbiol **6**(2): 66-71.

Bae, T., B. Kozlowicz and G. M. Dunny (2002). "Two targets in pCF10 DNA for PrgX binding: their role in production of Qa and prgX mRNA and in regulation of pheromone-inducible conjugation." J Mol Biol **315**(5): 995-1007.

Banu, L. D., G. Conrads, H. Rehrauer, H. Hussain, E. Allan and J. R. van der Ploeg (2010). "The Streptococcus mutans serine/threonine kinase, PknB, regulates competence development, bacteriocin production, and cell wall metabolism." Infect Immun **78**(5): 2209-2220.

Beilharz, K., L. Novakova, D. Fadda, P. Branny, O. Massidda and J. W. Veening (2012). "Control of cell division in Streptococcus pneumoniae by the conserved Ser/Thr protein kinase StkP." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(15): E905-913.

Benachour, A., Sauvageot, N., Pichereau, V. and Giard, J.C. (2009). Les réponses aux stress technologiques et environnementaux. Bactéries lactiques : physiologie, métabolisme, génomique et applications industrielles**:** 127-160.

Bentley, R. W., J. A. Leigh and M. D. Collins (1991). "Intrageneric structure of Streptococcus based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences." Int J Syst Bacteriol **41**(4): 487-494.

Bolotin, A., B. Quinquis, P. Renault, A. Sorokin, S. D. Ehrlich, S. Kulakauskas, A. Lapidus, E. Goltsman, M. Mazur, G. D. Pusch, M. Fonstein, R. Overbeek, N. Kyprides, B. Purnelle, D. Prozzi, K. Ngui, D. Masuy, F. Hancy, S. Burteau, M. Boutry, J. Delcour, A. Goffeau and P. Hols (2004). "Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium Streptococcus thermophilus." Nat Biotechnol **22**(12): 1554-1558.

Bolotin, A., P. Wincker, S. Mauger, O. Jaillon, K. Malarme, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich and A. Sorokin (2001). "The complete genome sequence of the lactic acid bacterium Lactococcus lactis ssp. lactis IL1403." Genome Res **11**(5): 731-753.

Booker, S. J. (2012). "Radical SAM enzymes and radical enzymology." Biochim Biophys Acta **1824**(11): 1151-1153.

Borges, F., S. Layec, A. Thibessard, A. Fernandez, B. Gintz, P. Hols, B. Decaris and N. Leblond-Bourget (2005). "cse, a Chimeric and variable gene, encodes an extracellular protein involved in cellular segregation in Streptococcus thermophilus." J Bacteriol **187**(8): 2737-2746.

Bortoni, M. E., V. S. Terra, J. Hinds, P. W. Andrew and H. Yesilkaya (2009). "The pneumococcal response to oxidative stress includes a role for Rgg." Microbiology **155**(Pt 12): 4123-4134.

Bouillaut, L., S. Perchat, S. Arold, S. Zorrilla, L. Slamti, C. Henry, M. Gohar, N. Declerck and D. Lereclus (2008). "Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides." Nucleic Acids Res **36**(11): 3791-3801.

Bourassa, S., L. Gauthier, R. Giguere and C. Vadeboncoeur (1990). "A IIIman protein is involved in the transport of glucose, mannose and fructose by oral streptococci." Oral Microbiol Immunol **5**(5): 288-297.

Bourgoin, F., G. Guedon, M. Pebay, Y. Roussel, C. Panis and B. Decaris (1996). "Characterization of a mosaic ISS1 element and evidence for the recent horizontal transfer of two different types of ISS1 between Streptococcus thermophilus and Lactococcus lactis." Gene **178**(1-2): 15-23.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brenot, A., K. Y. King and M. G. Caparon (2005). "The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of Streptococcus pyogenes." Mol Microbiol **55**(1): 221-234.

Buddelmeijer, N. and J. Beckwith (2002). "Assembly of cell division proteins at the E. coli cell center." Curr Opin Microbiol **5**(6): 553-557.

Busscher, H. J. and H. C. van der Mei (2012). "How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state?" PLoS Pathog **8**(1): e1002440.

Cashin, P., L. Goldsack, D. Hall and R. O'Toole (2006). "Contrasting signal transduction mechanisms in bacterial and eukaryotic gene transcription." FEMS Microbiol Lett **261**(2): 155-164.

Chandler, J. R. and G. M. Dunny (2004). "Enterococcal peptide sex pheromones: synthesis and control of biological activity." Peptides **25**(9): 1377-1388.

Chandler, J. R. and G. M. Dunny (2008). "Characterization of the sequence specificity determinants required for processing and control of sex pheromone by the intramembrane protease Eep and the plasmid-encoded protein PrgY." J Bacteriol **190**(4): 1172-1183.

Chang, J. C., B. LaSarre, J. C. Jimenez, C. Aggarwal and M. J. Federle (2011). "Two group A streptococcal peptide pheromones act through opposing Rgg regulators to control biofilm development." PLoS Pathog **7**(8): e1002190.

Chapot-Chartier, M. P., F. Rul, M. Nardi and J. C. Gripon (1994). "Gene cloning and characterization of PepC, a cysteine aminopeptidase from Streptococcus thermophilus, with sequence similarity to the eucaryotic bleomycin hydrolase." Eur J Biochem **224**(2): 497-506.

Chastanet, A., M. Prudhomme, J. P. Claverys and T. Msadek (2001). "Regulation of Streptococcus pneumoniae clp genes and their role in competence development and stress survival." J Bacteriol **183**(24): 7295-7307.

Chaussee, M. A., E. A. Callegari and M. S. Chaussee (2004). "Rgg regulates growth phase-dependent expression of proteins associated with secondary metabolism and stress in Streptococcus pyogenes." J Bacteriol **186**(21): 7091-7099.

Chaussee, M. S., D. Ajdic and J. J. Ferretti (1999). "The rgg gene of Streptococcus pyogenes NZ131 positively influences extracellular SPE B production." Infect Immun **67**(4): 1715-1722.

Chaussee, M. S., G. A. Somerville, L. Reitzer and J. M. Musser (2003). "Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in Streptococcus pyogenes." J Bacteriol **185**(20): 6016-6024.

Chaussee, M. S., G. L. Sylva, D. E. Sturdevant, L. M. Smoot, M. R. Graham, R. O. Watson and J. M. Musser (2002). "Rgg influences the expression of multiple regulatory loci to coregulate virulence factor expression in Streptococcus pyogenes." Infect Immun **70**(2): 762-770.

Chaussee, M. S., R. O. Watson, J. C. Smoot and J. M. Musser (2001). "Identification of Rgg-regulated exoproteins of Streptococcus pyogenes." Infect Immun **69**(2): 822-831.

Chavagnat, F., J. Meyer and M. G. Casey (2000). "Purification, characterisation, cloning and sequencing of the gene encoding oligopeptidase PepO from Streptococcus thermophilus A." FEMS Microbiol Lett **191**(1): 79-85.

Chiang-Ni, C. and J. J. Wu (2008). "Effects of streptococcal pyrogenic exotoxin B on pathogenesis of Streptococcus pyogenes." J Formos Med Assoc **107**(9): 677-685.

Chikindas, M. L., J. Novak, A. J. Driessen, W. N. Konings, K. M. Schilling and P. W. Caufield (1995). "Mutacin II, a bactericidal antibiotic from Streptococcus mutans." Antimicrob Agents Chemother **39**(12): 2656-2660.

Cho, E. H., R. I. Gumport and J. F. Gardner (2002). "Interactions between integrase and excisionase in the phage lambda excisive nucleoprotein complex." J Bacteriol **184**(18): 5200-5203.

Choi, I. H., J. H. Shim, S. W. Kim, S. N. Kim, S. N. Pyo and D. K. Rhee (1999). "Limited stress response in Streptococcus pneumoniae." Microbiol Immunol **43**(8): 807-812.

Claverys, J. P. and L. S. Havarstein (2002). "Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in Streptococcus pneumoniae." Front Biosci **7**: d1798-1814.

Claverys, J. P., M. Prudhomme and B. Martin (2006). "Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria." Annu Rev Microbiol **60**: 451-475.

Cochu, A., C. Vadeboncoeur, S. Moineau and M. Frenette (2003). "Genetic and biochemical characterization of the phosphoenolpyruvate:glucose/mannose phosphotransferase system of Streptococcus thermophilus." Appl Environ Microbiol **69**(9): 5423-5432.

Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta and T. J. Marrie (1987). "Bacterial biofilms in nature and disease." Annu Rev Microbiol **41**: 435-464.

Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber and H. M. Lappin-Scott (1995). "Microbial biofilms." Annu Rev Microbiol **49**: 711-745.

Cousin, C., A. Derouiche, L. Shi, Y. Pagot, S. Poncet and I. Mijakovic (2013). "Protein-serine/threonine/tyrosine kinases in bacterial signaling and regulation." FEMS Microbiol Lett.

Cvitkovitch, D. G., Y. H. Li and R. P. Ellen (2003). "Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections." J Clin Invest **112**(11): 1626-1632.

de Roissard, H. (1986). Laits et produits laitiers.

De Vuyst, L. and B. Degeest (1999). "Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria." FEMS Microbiol Rev **23**(2): 153-177.

De Vuyst, L., F. Vanderveken, S. Van de Ven and B. Degeest (1998). "Production by and isolation of exopolysaccharides from Streptococcus thermophilus grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis." J Appl Microbiol **84**(6): 1059-1068.

Declerck, N., L. Bouillaut, D. Chaix, N. Rugani, L. Slamti, F. Hoh, D. Lereclus and S. T. Arold (2007). "Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(47): 18490-18495.

Dellaglio, F., de Roissart, H.,Torriani ,S., Curk, M.C. and Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Bactéries lactiques. d. R. H. L. F.M., Lorica**:** 25-116.

Delorme, C. (2008). "Safety assessment of dairy microorganisms: Streptococcus thermophilus." Int J Food Microbiol **126**(3): 274-277.

Delorme, C., C. Bartholini, A. Bolotine, S. D. Ehrlich and P. Renault (2010). "Emergence of a cell wall protease in the Streptococcus thermophilus population." Appl Environ Microbiol **76**(2): 451-460.

Delorme, C., C. Bartholini, M. Luraschi, N. Pons, V. Loux, M. Almeida, E. Guedon, J. F. Gibrat and P. Renault (2011). "Complete genome sequence of the pigmented Streptococcus thermophilus strain JIM8232." J Bacteriol **193**(19): 5581-5582.

Delorme, C., C. Poyart, S. D. Ehrlich and P. Renault (2007). "Extent of horizontal gene transfer in evolution of Streptococci of the salivarius group." J Bacteriol **189**(4): 1330-1341.

Denham, E. L., P. N. Ward and J. A. Leigh (2008). "Lipoprotein signal peptides are processed by Lsp and Eep of Streptococcus uberis." J Bacteriol **190**(13): 4641-4647.

Derre, I., G. Rapoport and T. Msadek (1999). "CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria." Mol Microbiol **31**(1): 117-131.

Dmitriev, A., S. S. Mohapatra, P. Chong, M. Neely, S. Biswas and I. Biswas (2011). "CovR-controlled global regulation of gene expression in Streptococcus mutans." PLoS One **6**(5): e20127.

Dmitriev, A. V., E. J. McDowell, K. V. Kappeler, M. A. Chaussee, L. D. Rieck and M. S. Chaussee (2006). "The Rgg regulator of Streptococcus pyogenes influences utilization of nonglucose carbohydrates, prophage induction, and expression of the NAD-glycohydrolase virulence operon." J Bacteriol **188**(20): 7230-7241.

Doern, C. D., A. L. Roberts, W. Hong, J. Nelson, S. Lukomski, W. E. Swords and S. D. Reid (2009). "Biofilm formation by group A Streptococcus: a role for the streptococcal regulator of virulence (Srv) and streptococcal cysteine protease (SpeB)." Microbiology **155**(Pt 1): 46-52.

Doran, K. S., J. C. Chang, V. M. Benoit, L. Eckmann and V. Nizet (2002). "Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8." J Infect Dis **185**(2): 196-203.

Dunny, G. M. (2007). "The peptide pheromone-inducible conjugation system of Enterococcus faecalis plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **362**(1483): 1185-1193.

Egan, A. J. and W. Vollmer (2013). "The physiology of bacterial cell division." Ann N Y Acad Sci **1277**: 8-28.

Elli, M., M. L. Callegari, S. Ferrari, E. Bessi, D. Cattivelli, S. Soldi, L. Morelli, N. Goupil Feuillerat and J. M. Antoine (2006). "Survival of yogurt bacteria in the human gut." Appl Environ Microbiol **72**(7): 5113-5117.

Eng, C., A. Thibessard, M. Danielsen, T. B. Rasmussen, J. F. Mari and P. Leblond (2011). "In silico prediction of horizontal gene transfer in Streptococcus thermophilus." Arch Microbiol **193**(4): 287-297.

Errington, J. (2003). "Dynamic proteins and a cytoskeleton in bacteria." Nat Cell Biol **5**(3): 175-178.

Facklam, R. (2002). "What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes." Clin Microbiol Rev **15**(4): 613-630.

Fadda, D., C. Pischedda, F. Caldara, M. B. Whalen, D. Anderluzzi, E. Domenici and O. Massidda (2003). "Characterization of divIVA and other genes located in the chromosomal region downstream of the dcw cluster in Streptococcus pneumoniae." J Bacteriol **185**(20): 6209-6214.

Fadda, D., A. Santona, V. D'Ulisse, P. Ghelardini, M. G. Ennas, M. B. Whalen and O. Massidda (2007). "Streptococcus pneumoniae DivIVA: localization and interactions in a MinCD-free context." J Bacteriol **189**(4): 1288-1298.

Farrow, J. A. and M. D. Collins (1984). "DNA base composition, DNA-DNA homology and long-chain fatty acid studies on streptococcus thermophilus and Streptococcus salivarius." J Gen Microbiol **130**(2): 357-362.

Fernandez, A. (2004). Gènes de la réponse au stress oxydant de Streptococcus thermophilus ; implication de la famille multigénique polymorphe codant des régulateurs transcriptionnels Rgg-like. thèse, Université Henri Poincare, Nancy 1.

Fernandez, A., F. Borges, B. Gintz, B. Decaris and N. Leblond-Bourget (2006). "The rggC locus, with a frameshift mutation, is involved in oxidative stress response by Streptococcus thermophilus." Arch Microbiol **186**(3): 161-169.

Fernandez, A., A. Thibessard, F. Borges, B. Gintz, B. Decaris and N. Leblond-Bourget (2004). "Characterization of oxidative stress-resistant mutants of Streptococcus thermophilus CNRZ368." Arch Microbiol **182**(5): 364-372.

Fleuchot, B., C. Gitton, A. Guillot, J. Vidic, P. Nicolas, C. Besset, L. Fontaine, P. Hols, N. Leblond-Bourget, V. Monnet and R. Gardan (2011). "Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci." Mol Microbiol **80**(4): 1102-1119.

Fleurie, A., C. Cluzel, S. Guiral, C. Freton, F. Galisson, I. Zanella-Cleon, A. M. Di Guilmi and C. Grangeasse (2012). "Mutational dissection of the S/T-kinase StkP reveals crucial roles in cell division of Streptococcus pneumoniae." Mol Microbiol **83**(4): 746-758.

Fontaine, L., C. Boutry, M. H. de Frahan, B. Delplace, C. Fremaux, P. Horvath, P. Boyaval and P. Hols (2010). "A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in Streptococcus thermophilus and Streptococcus salivarius." J Bacteriol **192**(5): 1444-1454.

Fujiwara, T., T. Hoshino, T. Ooshima, S. Sobue and S. Hamada (2000). "Purification, characterization, and molecular analysis of the gene encoding glucosyltransferase from Streptococcus oralis." Infect Immun **68**(5): 2475-2483.

Galia, W. (2011). Caractérisation de la variabilité du système protéolytique de surface de la bactérie lactique Streptococcus thermophilus, Institut National Polytechnique de Lorraine.

Gardan, R., C. Besset, C. Gitton, A. Guillot, L. Fontaine, P. Hols and V. Monnet (2013). "Extracellular life cycle of ComS, the competence-stimulating peptide of Streptococcus thermophilus." J Bacteriol **195**(8): 1845-1855.

Gardan, R., C. Besset, A. Guillot, C. Gitton and V. Monnet (2009). "The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in Streptococcus thermophilus strain LMD-9." J Bacteriol **191**(14): 4647-4655.

Gerard, P., T. Vernet and A. Zapun (2002). "Membrane topology of the Streptococcus pneumoniae FtsW division protein." J Bacteriol **184**(7): 1925-1931.

Giard, J. C., A. Hartke, S. Flahaut, P. Boutibonnes and Y. Auffray (1997). "Glucose starvation response in Enterococcus faecalis JH2-2: survival and protein analysis." Res Microbiol **148**(1): 27-35.

Giard, J. C., A. Rince, H. Capiaux, Y. Auffray and A. Hartke (2000). "Inactivation of the stress- and starvation-inducible gls24 operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in Enterococcus faecalis." J Bacteriol **182**(16): 4512-4520.

Giard, J. C., N. Verneuil, Y. Auffray and A. Hartke (2002). "Characterization of genes homologous to the general stress-inducible gene gls24 in Enterococcus faecalis and Lactococcus lactis." FEMS Microbiol Lett **206**(2): 235-239.

Gibbons, R. J. (1983). "Importance of glucosyltransferase in the colonization of oral bacteria." Chem. Senses **Sp. Suppl.** : 11-19.

Giliberti, G., G. Naclerio, L. Martirani, E. Ricca and M. De Felice (2002). "Alteration of cell morphology and viability in a recA mutant of Streptococcus thermophilus upon induction of heat shock and nutrient starvation." Gene **295**(1): 1-6.

Giraffa, G., A. Paris, L. Valcavi, M. Gatti and E. Neviani (2001). "Genotypic and phenotypic heterogeneity of Streptococcus thermophilus strains isolated from dairy products." J Appl Microbiol **91**(5): 937-943.

Goebl, M. and M. Yanagida (1991). "The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription." Trends Biochem Sci **16**(5): 173-177.

Grainger, D. C., H. Aiba, D. Hurd, D. F. Browning and S. J. Busby (2007). "Transcription factor distribution in Escherichia coli: studies with FNR protein." Nucleic Acids Res **35**(1): 269-278.

Guarner, F., G. Perdigon, G. Corthier, S. Salminen, B. Koletzko and L. Morelli (2005). "Should yoghurt cultures be considered probiotic?" Br J Nutr **93**(6): 783-786.

Guedon, G., F. Bourgoin, M. Pebay, Y. Roussel, C. Colmin, J. M. Simonet and B. Decaris (1995). "Characterization and distribution of two insertion sequences, IS1191 and iso-IS981, in Streptococcus thermophilus: does intergeneric transfer of insertion sequences occur in lactic acid bacteria co-cultures?" Mol Microbiol **16**(1): 69-78.

Hall-Stoodley, L. and P. Stoodley (2005). "Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens." Trends Microbiol **13**(1): 7-10.

Hanks, S. K., A. M. Quinn and T. Hunter (1988). "The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains." Science **241**(4861): 42-52.

Hecker, M., W. Schumann and U. Volker (1996). "Heat-shock and general stress response in Bacillus subtilis." Mol Microbiol **19**(3): 417-428.

Henry, R. (2011). Caractérisation des régulateurs transcriptionnels Rgg et étude du rôle de la protéine Rgg0182 de Streptococcus thermophilus. thèse, Université Henry Poincaré, Nancy 1.

Hersh, B. M., F. T. Farooq, D. N. Barstad, D. L. Blankenhorn and J. L. Slonczewski (1996). "A glutamate-dependent acid resistance gene in Escherichia coli." J Bacteriol **178**(13): 3978-3981.

Herve-Jimenez, L., I. Guillouard, E. Guedon, C. Gautier, S. Boudebbouze, P. Hols, V. Monnet, F. Rul and E. Maguin (2008). "Physiology of Streptococcus thermophilus during the late stage of milk fermentation with special regard to sulfur amino-acid metabolism." Proteomics **8**(20): 4273-4286.

Hew, C. M., M. Korakli and R. F. Vogel (2007). "Expression of virulence-related genes by Enterococcus faecalis in response to different environments." Syst Appl Microbiol **30**(4): 257-267.

Hols, P., F. Hancy, L. Fontaine, B. Grossiord, D. Prozzi, N. Leblond-Bourget, B. Decaris, A. Bolotin, C. Delorme, S. Dusko Ehrlich, E. Guedon, V. Monnet, P. Renault and M. Kleerebezem (2005). "New insights in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics." FEMS Microbiol Rev **29**(3): 435-463.

Huang, M., F. B. Oppermann-Sanio and A. Steinbuchel (1999). "Biochemical and molecular characterization of the Bacillus subtilis acetoin catabolic pathway." J Bacteriol **181**(12): 3837-3841.

Hueck, C. J., A. Kraus, D. Schmiedel and W. Hillen (1995). "Cloning, expression and functional analyses of the catabolite control protein CcpA from Bacillus megaterium." Mol Microbiol **16**(5): 855-864.

Hufner, E., T. Markieton, S. Chaillou, A. M. Crutz-Le Coq, M. Zagorec and C. Hertel (2007). "Identification of Lactobacillus sakei genes induced during meat fermentation and their role in survival and growth." Appl Environ Microbiol **73**(8): 2522-2531.

Hutchings, M. I., T. Palmer, D. J. Harrington and I. C. Sutcliffe (2009). "Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em." Trends Microbiol **17**(1): 13-21.

Hytonen, J., S. Haataja and J. Finne (2003). "Streptococcus pyogenes glycoprotein-binding strepadhesin activity is mediated by a surface-associated carbohydrate-degrading enzyme, pullulanase." Infect Immun **71**(2): 784-793.

Hytonen, J., S. Haataja and J. Finne (2006). "Use of flow cytometry for the adhesion analysis of Streptococcus pyogenes mutant strains to epithelial cells: investigation of the possible role of surface pullulanase and cysteine protease, and the transcriptional regulator Rgg." BMC Microbiol **6**: 18.

Ibrahim, M., A. Guillot, F. Wessner, F. Algaron, C. Besset, P. Courtin, R. Gardan and V. Monnet (2007). "Control of the transcription of a short gene encoding a cyclic peptide in Streptococcus thermophilus: a new quorum-sensing system?" J Bacteriol **189**(24): 8844-8854.

Ibrahim, M., P. Nicolas, P. Bessieres, A. Bolotin, V. Monnet and R. Gardan (2007). "A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci." Microbiology **153**(Pt 11): 3631-3644.

Imhof R., G. H., Bosset J.O. (1995). "Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic single strain dairy starter cultures." Food Sci Technol **28**(1): 78-86.

Jack, R. W., J. R. Tagg and B. Ray (1995). "Bacteriocins of gram-positive bacteria." Microbiol Rev **59**(2): 171-200.

Janzen, T., J. Kleinschmidt, H. Neve and A. Geis (1992). "Sequencing and characterization of pST1, a cryptic plasmid from Streptococcus thermophilus." FEMS Microbiol Lett **74**(2-3): 175-180.

Jin, H. and V. Pancholi (2006). "Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in Streptococcus pyogenes: their biological functions and substrate identification." J Mol Biol **357**(5): 1351-1372.

Jones, G. and P. Dyson (2006). "Evolution of transmembrane protein kinases implicated in coordinating remodeling of gram-positive peptidoglycan: inside versus outside." J Bacteriol **188**(21): 7470-7476.

Kang, X., N. Ling, G. Sun, Q. Zhou, L. Zhang and Q. Sheng (2012). "Complete genome sequence of Streptococcus thermophilus strain MN-ZLW-002." J Bacteriol **194**(16): 4428-4429.

Kapur, V., J. T. Maffei, R. S. Greer, L. L. Li, G. J. Adams and J. M. Musser (1994). "Vaccination with streptococcal extracellular cysteine protease (interleukin-1 beta convertase) protects mice against challenge with heterologous group A streptococci." Microb Pathog **16**(6): 443-450.

Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura and T. Ezaki (1995). "Determination of 16S rRNA sequences of Streptococcus mitis and Streptococcus gordonii and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus." Int J Syst Bacteriol **45**(2): 406-408.

Kili, A. O., M. C. Herzberg, M. W. Meyer, X. Zhao and L. Tao (1999). "Streptococcal reporter gene-fusion vector for identification of in vivo expressed genes." Plasmid **42**(1): 67-72.

Kress, W., Z. Maglica and E. Weber-Ban (2009). "Clp chaperone-proteases: structure and function." Res Microbiol **160**(9): 618-628.

Kreth, J., J. Merritt, C. Bordador, W. Shi and F. Qi (2004). "Transcriptional analysis of mutacin I (mutA) gene expression in planktonic and biofilm cells of Streptococcus mutans using fluorescent protein and glucuronidase reporters." Oral Microbiol Immunol **19**(4): 252-256.

Kroh, H. E. and L. D. Simon (1990). "The ClpP component of Clp protease is the sigma 32-dependent heat shock protein F21.5." J Bacteriol **172**(10): 6026-6034.

Kwon, H. Y., S. W. Kim, M. H. Choi, A. D. Ogunniyi, J. C. Paton, S. H. Park, S. N. Pyo and D. K. Rhee (2003). "Effect of heat shock and mutations in ClpL and ClpP on virulence gene expression in Streptococcus pneumoniae." Infect Immun **71**(7): 3757-3765.

Lancefield, R. C. (1933). "A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci." J Exp Med **57**(4): 571-595.

Lara, B., A. I. Rico, S. Petruzzelli, A. Santona, J. Dumas, J. Biton, M. Vicente, J. Mingorance and O. Massidda (2005). "Cell division in cocci: localization and properties of the Streptococcus pneumoniae FtsA protein." Mol Microbiol **55**(3): 699-711.

Larsen, B., N. M. Wills, C. Nelson, J. F. Atkins and R. F. Gesteland (2000). "Nonlinearity in genetic decoding: homologous DNA replicase genes use alternatives of transcriptional slippage or translational frameshifting." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(4): 1683-1688.

Lasarre, B., C. Aggarwal and M. J. Federle (2013). "Antagonistic Rgg regulators mediate quorum sensing via competitive DNA binding in Streptococcus pyogenes." MBio **3**(6).

Layec, S., B. Decaris and N. Leblond-Bourget (2008). "Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation." Res Microbiol **159**(7-8): 507-515.

Lazazzera, B. A. (2001). "The intracellular function of extracellular signaling peptides." Peptides **22**(10): 1519-1527.

Le Gouellec, A., L. Roux, D. Fadda, O. Massidda, T. Vernet and A. Zapun (2008). "Roles of pneumococcal DivIB in cell division." J Bacteriol **190**(13): 4501-4511.

Lefebure, T. and M. J. Stanhope (2007). "Evolution of the core and pan-genome of Streptococcus: positive selection, recombination, and genome composition." Genome Biol **8**(5): R71.

Lemos, J. A., Y. Y. Chen and R. A. Burne (2001). "Genetic and physiologic analysis of the groE operon and role of the HrcA repressor in stress gene regulation and acid tolerance in Streptococcus mutans." J Bacteriol **183**(20): 6074-6084.

Lenz, C. A., C. M. Hew Ferstl and R. F. Vogel (2010). "Sub-lethal stress effects on virulence gene expression in Enterococcus faecalis." Food Microbiol **27**(3): 317-326.

Letort, C. and V. Juillard (2001). "Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of Streptococcus thermophilus." J Appl Microbiol **91**(6): 1023-1029.

Li, J. S., Y. T. Bi, C. Dong, J. F. Yang and W. D. Liang (2011). "Transcriptome analysis of adaptive heat shock response of Streptococcus thermophilus." PLoS One **6**(10): e25777.

Liberman, E. S. and A. S. Bleiweis (1984). "Transport of glucose and mannose by a common phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system in Streptococcus mutans GS5." Infect Immun **43**(3): 1106-1109.

Lin, W. J., D. Walthers, J. E. Connelly, K. Burnside, K. A. Jewell, L. J. Kenney and L. Rajagopal (2009). "Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B Streptococcus response regulator CovR." Mol Microbiol **71**(6): 1477-1495.

Linton, K. J. and C. F. Higgins (2007). "Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control." Pflugers Arch **453**(5): 555-567.

Liu, H., R. G. Sadygov and J. R. Yates, 3rd (2004). "A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics." Anal Chem **76**(14): 4193-4201.

Liu, M., R. J. Siezen and A. Nauta (2009). "In silico prediction of horizontal gene transfer events in Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus reveals protocooperation in yogurt manufacturing." Appl Environ Microbiol **75**(12): 4120-4129.

Loesche, W. J. (1986). "Role of Streptococcus mutans in human dental decay." Microbiol Rev **50**(4): 353-380.

Lortie, L. A., M. Pelletier, C. Vadeboncoeur and M. Frenette (2000). "The gene encoding IIAB(Man)L in Streptococcus salivarius is part of a tetracistronic operon encoding a phosphoenolpyruvate: mannose/glucose phosphotransferase system." Microbiology **146 (Pt 3)**: 677-685.

Loughman, J. A. and M. G. Caparon (2006). "A novel adaptation of aldolase regulates virulence in Streptococcus pyogenes." EMBO J **25**(22): 5414-5422.

Loughman, J. A. and M. G. Caparon (2007). "Contribution of invariant residues to the function of Rgg family transcription regulators." J Bacteriol **189**(2): 650-655.

Lukomski, S., E. H. Burns, Jr., P. R. Wyde, A. Podbielski, J. Rurangirwa, D. K. Moore-Poveda and J. M. Musser (1998). "Genetic inactivation of an extracellular cysteine protease (SpeB) expressed by Streptococcus pyogenes decreases resistance to phagocytosis and dissemination to organs." Infect Immun **66**(2): 771-776.

Lukomski, S., S. Sreevatsan, C. Amberg, W. Reichardt, M. Woischnik, A. Podbielski and J. M. Musser (1997). "Inactivation of Streptococcus pyogenes extracellular cysteine protease significantly decreases mouse lethality of serotype M3 and M49 strains." J Clin Invest **99**(11): 2574-2580.

Luscombe, N. M., S. E. Austin, H. M. Berman and J. M. Thornton (2000). "An overview of the structures of protein-DNA complexes." Genome Biol **1**(1): REVIEWS001.

Lyon, W. R., C. M. Gibson and M. G. Caparon (1998). "A role for trigger factor and an rgg-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of Streptococcus pyogenes." EMBO J **17**(21): 6263-6275.

Ma, B., T. Elkayam, H. Wolfson and R. Nussinov (2003). "Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(10): 5772-5777.

Mai-Prochnow, A., P. Lucas-Elio, S. Egan, T. Thomas, J. S. Webb, A. Sanchez-Amat and S. Kjelleberg (2008). "Hydrogen peroxide linked to lysine oxidase activity facilitates biofilm differentiation and dispersal in several gram-negative bacteria." J Bacteriol **190**(15): 5493-5501.

Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D. M. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J. H. Lee, I. Diaz-Muniz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer and D. Mills (2006). "Comparative genomics of the lactic acid bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15611-15616.

Marijuan, P. C., J. Navarro and R. del Moral (2010). "On prokaryotic intelligence: strategies for sensing the environment." Biosystems **99**(2): 94-103.

Martinez-Antonio, A. and J. Collado-Vides (2003). "Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria." Curr Opin Microbiol **6**(5): 482-489.

Martinussen, J., J. Schallert, B. Andersen and K. Hammer (2001). "The pyrimidine operon pyrRPB-carA from Lactococcus lactis." J Bacteriol **183**(9): 2785-2794.

Mashburn-Warren, L., D. A. Morrison and M. J. Federle (2010). "A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in Streptococcus spp. via an Rgg regulator." Mol Microbiol **78**(3): 589-606.

Mayer, R. M. (1987). "Dextransucrase: a glucosyltransferase from Streptococcus sanguis." Methods Enzymol **138**: 649-661.

McNulty, N. P., T. Yatsunenko, A. Hsiao, J. J. Faith, B. D. Muegge, A. L. Goodman, B. Henrissat, R. Oozeer, S. Cools-Portier, G. Gobert, C. Chervaux, D. Knights, C. A. Lozupone, R. Knight, A. E. Duncan, J. R. Bain, M. J. Muehlbauer, C. B. Newgard, A. C. Heath and J. I. Gordon (2011). "The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins." Sci Transl Med **3**(106): 106ra106.

McShan, W. M., J. J. Ferretti, T. Karasawa, A. N. Suvorov, S. Lin, B. Qin, H. Jia, S. Kenton, F. Najar, H. Wu, J. Scott, B. A. Roe and D. J. Savic (2008). "Genome sequence of a nephritogenic and highly transformable M49 strain of Streptococcus pyogenes." J Bacteriol **190**(23): 7773-7785.

Menard, S., C. Candalh, J. C. Bambou, K. Terpend, N. Cerf-Bensussan and M. Heyman (2004). "Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport." Gut **53**(6): 821-828.

Merritt, J. and F. Qi (2012). "The mutacins of Streptococcus mutans: regulation and ecology." Mol Oral Microbiol **27**(2): 57-69.

Michaylova, M., S. Minkova, K. Kimura, T. Sasaki and K. Isawa (2007). "Isolation and characterization of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus and Streptococcus thermophilus from plants in Bulgaria." FEMS Microbiol Lett **269**(1): 160-169.

Miller, A. A., N. C. Engleberg and V. J. DiRita (2001). "Repression of virulence genes by phosphorylation-dependent oligomerization of CsrR at target promoters in S. pyogenes." Mol Microbiol **40**(4): 976-990.

Miyagishima, S. Y., C. P. Wolk and K. W. Osteryoung (2005). "Identification of cyanobacterial cell division genes by comparative and mutational analyses." Mol Microbiol **56**(1): 126-143.

Molenaar, D., J. S. Bosscher, B. ten Brink, A. J. Driessen and W. N. Konings (1993). "Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in Lactobacillus buchneri." J Bacteriol **175**(10): 2864-2870.

Molle, V., Y. Nakaura, R. P. Shivers, H. Yamaguchi, R. Losick, Y. Fujita and A. L. Sonenshein (2003). "Additional targets of the Bacillus subtilis global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis." J Bacteriol **185**(6): 1911-1922.

Morlot, C., A. Zapun, O. Dideberg and T. Vernet (2003). "Growth and division of Streptococcus pneumoniae: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle." Mol Microbiol **50**(3): 845-855.

Nair, S., C. Frehel, L. Nguyen, V. Escuyer and P. Berche (1999). "ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of Listeria monocytogenes." Mol Microbiol **31**(1): 185-196.

Narberhaus, F. (1999). "Negative regulation of bacterial heat shock genes." Mol Microbiol **31**(1): 1-8.

Neely, M. N., W. R. Lyon, D. L. Runft and M. Caparon (2003). "Role of RopB in growth phase expression of the SpeB cysteine protease of Streptococcus pyogenes." J Bacteriol **185**(17): 5166-5174.

Neron, S. and C. Vadeboncoeur (1987). "Two functionally different glucose phosphotransferase transport systems in Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus." Oral Microbiol Immunol **2**(4): 171-177.

Nicoloff, H., J. Hubert and F. Bringel (2001). "Carbamoyl-phosphate synthetases (CPS) in lactic acid bacteria and other Gram-positive bacteria." Lait **81**: 151-159.

Noirclerc-Savoye, M., A. Le Gouellec, C. Morlot, O. Dideberg, T. Vernet and A. Zapun (2005). "In vitro reconstitution of a trimeric complex of DivIB, DivIC and FtsL, and their transient co-localization at the division site in Streptococcus pneumoniae." Mol Microbiol **55**(2): 413-424.

Noirclerc-Savoye, M., C. Morlot, P. Gerard, T. Vernet and A. Zapun (2003). "Expression and purification of FtsW and RodA from Streptococcus pneumoniae, two membrane proteins involved in cell division and cell growth, respectively." Protein Expr Purif **30**(1): 18-25.

Novak, J., P. W. Caufield and E. J. Miller (1994). "Isolation and biochemical characterization of a novel lantibiotic mutacin from Streptococcus mutans." J Bacteriol **176**(14): 4316-4320.

Novak, J., M. Kirk, P. W. Caufield, S. Barnes, K. Morrison and J. Baker (1996). "Detection of modified amino acids in lantibiotic peptide mutacin II by chemical derivation and electrospray ionization-mass spectroscopic analysis." Anal Biochem **236**(2): 358-360.

Novick, R. P. and E. Geisinger (2008). "Quorum sensing in staphylococci." Annu Rev Genet **42**: 541-564.

Ott, A., Fay, L. B., Chaintreau, A. 19 (1997). " Determination and origin of the aroma impact compounds of yoghurt flavor. ." Journal of Agricultural and Food Chemistry **45**: 850-858.

Pabo, C. O. and R. T. Sauer (1992). "Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition." Annu Rev Biochem **61**: 1053-1095.

Palmer, T., F. Sargent and B. C. Berks (2005). "Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway." Trends Microbiol **13**(4): 175-180.

Parente, E., Cogan, T. (2004). Starter cultures: general aspects.

Parsek, M. R. and E. P. Greenberg (2005). "Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms." Trends Microbiol **13**(1): 27-33.

Pavlovic, G., V. Burrus, B. Gintz, B. Decaris and G. Guedon (2004). "Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICESt1-related elements from Streptococcus thermophilus." Microbiology **150**(Pt 4): 759-774.

Perchat, S., T. Dubois, S. Zouhir, M. Gominet, S. Poncet, C. Lemy, M. Aumont-Nicaise, J. Deutscher, M. Gohar, S. Nessler and D. Lereclus (2011). "A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the Bacillus cereus group." Mol Microbiol **82**(3): 619-633.

Perrin, C., C. Guimont, P. Bracquart and J. L. Gaillard (1999). "Expression of a new cold shock protein of 21.5 kDa and of the major cold shock protein by Streptococcus thermophilus after cold shock." Curr Microbiol **39**(6): 342-0347.

Petrickova, K. and M. Petricek (2003). "Eukaryotic-type protein kinases in Streptomyces coelicolor: variations on a common theme." Microbiology **149**(Pt 7): 1609-1621.

Pette, J. a. L., H. (1950). "Symbiosis and antibiosis in mixed cultures *Lb. bulgaricus* and *S. thermophilus*." Neth Milk Dairy Journal **4**: 197-208.

Picon, A., B. de Torres, P. Gaya and M. Nunez (2005). "Cheesemaking with a Lactococcus lactis strain expressing a mutant oligopeptide binding protein as starter results in a different peptide profile." Int J Food Microbiol **104**(3): 299-307.

Poole, L. B., M. Higuchi, M. Shimada, M. L. Calzi and Y. Kamio (2000). "Streptococcus mutans H2O2-forming NADH oxidase is an alkyl hydroperoxide reductase protein." Free Radic Biol Med **28**(1): 108-120.

Pottathil, M. and B. A. Lazazzera (2003). "The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of Bacillus subtilis." Front Biosci **8**: d32-45.

Poyart, C., G. Quesne, S. Coulon, P. Berche and P. Trieu-Cuot (1998). "Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase." J Clin Microbiol **36**(1): 41-47.

Price, C. W., P. Fawcett, H. Ceremonie, N. Su, C. K. Murphy and P. Youngman (2001). "Genome-wide analysis of the general stress response in Bacillus subtilis." Mol Microbiol **41**(4): 757-774.

Qi, F., P. Chen and P. W. Caufield (1999). "Functional analyses of the promoters in the lantibiotic mutacin II biosynthetic locus in Streptococcus mutans." Appl Environ Microbiol **65**(2): 652-658.

Qi, F., P. Chen and P. W. Caufield (1999). "Purification of mutacin III from group III Streptococcus mutans UA787 and genetic analyses of mutacin III biosynthesis genes." Appl Environ Microbiol **65**(9): 3880-3887.

Qi, F., P. Chen and P. W. Caufield (2000). "Purification and biochemical characterization of mutacin I from the group I strain of Streptococcus mutans, CH43, and genetic analysis of mutacin I biosynthesis genes." Appl Environ Microbiol **66**(8): 3221-3229.

Quiles, F., P. Polyakov, F. Humbert and G. Francius (2012). "Production of extracellular glycogen by Pseudomonas fluorescens: spectroscopic evidence and conformational analysis by biomolecular recognition." Biomacromolecules **13**(7): 2118-2127.

Rajagopal, L., A. Clancy and C. E. Rubens (2003). "A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in Streptococcus agalactiae reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence." J Biol Chem **278**(16): 14429-14441.

Ramirez-Ronda, C. H. (1978). "Adherence of glucan-positive and glucan-negative streptococcal strains to normal and damaged heart valves." J Clin Invest **62**(4): 805-814.

Rasmussen, T. B., M. Danielsen, O. Valina, C. Garrigues, E. Johansen and M. B. Pedersen (2008). "Streptococcus thermophilus core genome: comparative genome hybridization study of 47 strains." Appl Environ Microbiol **74**(15): 4703-4710.

Rawlinson, E. L., I. F. Nes and M. Skaugen (2002). "LasX, a transcriptional regulator of the lactocin S biosynthetic genes in Lactobacillus sakei L45, acts both as an activator and a repressor." Biochimie **84**(5-6): 559-567.

Rawlinson, E. L., I. F. Nes and M. Skaugen (2005). "Identification of the DNA-binding site of the Rgg-like regulator LasX within the lactocin S promoter region." Microbiology **151**(Pt 3): 813-823.

Rocha-Estrada, J., A. E. Aceves-Diez, G. Guarneros and M. de la Torre (2010). "The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria." Appl Microbiol Biotechnol **87**(3): 913-923.

Rothfield, L., S. Justice and J. Garcia-Lara (1999). "Bacterial cell division." Annu Rev Genet **33**: 423-448.

Rul, F. and V. Monnet (1997). "Presence of additional peptidases in Streptococcus thermophilus CNRZ 302 compared to Lactococcus lactis." J Appl Microbiol **82**(6): 695-704.

Rutherford, S. T. and B. L. Bassler (2012). "Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(11).

Salzano, A. M., S. Arena, G. Renzone, C. D'Ambrosio, R. Rullo, M. Bruschi, L. Ledda, G. Maglione, G. Candiano, L. Ferrara and A. Scaloni (2007). "A widespread picture of the Streptococcus thermophilus proteome by cell lysate fractionation and gel-based/gel-free approaches." Proteomics **7**(9): 1420-1433.

Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual.

Samen, U. M., B. J. Eikmanns and D. J. Reinscheid (2006). "The transcriptional regulator RovS controls the attachment of Streptococcus agalactiae to human epithelial cells and the expression of virulence genes." Infect Immun **74**(10): 5625-5635.

Sanders, J. W., K. Leenhouts, J. Burghoorn, J. R. Brands, G. Venema and J. Kok (1998). "A chloride-inducible acid resistance mechanism in Lactococcus lactis and its regulation." Mol Microbiol **27**(2): 299-310.

Sanders, J. W., G. Venema, J. Kok and K. Leenhouts (1998). "Identification of a sodium chloride-regulated promoter in Lactococcus lactis by single-copy chromosomal fusion with a reporter gene." Mol Gen Genet **257**(6): 681-685.

Saskova, L., L. Novakova, M. Basler and P. Branny (2007). "Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in Streptococcus pneumoniae." J Bacteriol **189**(11): 4168-4179.

Scheld, W. M., J. A. Valone and M. A. Sande (1978). "Bacterial adherence in the pathogenesis of endocarditis. Interaction of bacterial dextran, platelets, and fibrin." J Clin Invest **61**(5): 1394-1404.

Schirmer, E. C., J. R. Glover, M. A. Singer and S. Lindquist (1996). "HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions." Trends Biochem Sci **21**(8): 289-296.

Schnell, N., K. D. Entian, U. Schneider, F. Gotz, H. Zahner, R. Kellner and G. Jung (1988). "Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings." Nature **333**(6170): 276-278.

Schulz, A. and W. Schumann (1996). "hrcA, the first gene of the Bacillus subtilis dnaK operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes." J Bacteriol **178**(4): 1088-1093.

Schumacher, M. A., G. Seidel, W. Hillen and R. G. Brennan (2007). "Structural mechanism for the fine-tuning of CcpA function by the small molecule effectors glucose 6-phosphate and fructose 1,6-bisphosphate." J Mol Biol **368**(4): 1042-1050.

Shi, K., C. K. Brown, Z. Y. Gu, B. K. Kozlowicz, G. M. Dunny, D. H. Ohlendorf and C. A. Earhart (2005). "Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgX/pheromone complexes and regulation of conjugation in Enterococcus faecalis." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18596-18601.

Shimada, T., A. Ishihama, S. J. Busby and D. C. Grainger (2008). "The Escherichia coli RutR transcription factor binds at targets within genes as well as intergenic regions." Nucleic Acids Res **36**(12): 3950-3955.

Siezen, R. J., B. Renckens, I. van Swam, S. Peters, R. van Kranenburg, M. Kleerebezem and W. M. de Vos (2005). "Complete sequences of four plasmids of Lactococcus lactis subsp. cremoris SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment." Appl Environ Microbiol **71**(12): 8371-8382.

Skaugen, M., E. L. Andersen, V. H. Christie and I. F. Nes (2002). "Identification, characterization, and expression of a second, bicistronic, operon involved in the production of lactocin S in Lactobacillus sakei L45." Appl Environ Microbiol **68**(2): 720-727.

Skaugen, M. and I. F. Nes (2000). "Transposition in Lactobacillus sakei: inactivation of a second lactocin S operon by the insertion of IS1520, a new member of the IS3 family of insertion sequences." Microbiology **146 (Pt 5)**: 1163-1169.

Slamti, L. and D. Lereclus (2002). "A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the Bacillus cereus group." EMBO J **21**(17): 4550-4559.

Sofia, H. J., G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola and N. E. Miller (2001). "Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical

mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods." Nucleic Acids Res **29**(5): 1097-1106.

Spellerberg, B., B. Pohl, G. Haase, S. Martin, J. Weber-Heynemann and R. Lutticken (1999). "Identification of genetic determinants for the hemolytic activity of Streptococcus agalactiae by ISS1 transposition." J Bacteriol **181**(10): 3212-3219.

Squires, C. and C. L. Squires (1992). "The Clp proteins: proteolysis regulators or molecular chaperones?" J Bacteriol **174**(4): 1081-1085.

Stoyanov, J. V., S. Mancini, Z. H. Lu, F. Mourlane, K. R. Poulsen, R. Wimmer and M. Solioz (2010). "The stress response protein Gls24 is induced by copper and interacts with the CopZ copper chaperone of Enterococcus hirae." FEMS Microbiol Lett **302**(1): 69-75.

Stucky, K., J. R. Klein, A. Schuller, H. Matern, B. Henrich and R. Plapp (1995). "Cloning and DNA sequence analysis of pepQ, a prolidase gene from Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis DSM7290 and partial characterization of its product." Mol Gen Genet **247**(4): 494-500.

Stulke, J. and W. Hillen (2000). "Regulation of carbon catabolism in Bacillus species." Annu Rev Microbiol **54**: 849-880.

Sulavik, M. C. and D. B. Clewell (1996). "Rgg is a positive transcriptional regulator of the Streptococcus gordonii gtfG gene." J Bacteriol **178**(19): 5826-5830.

Sulavik, M. C., G. Tardif and D. B. Clewell (1992). "Identification of a gene, rgg, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of Streptococcus gordonii Challis." J Bacteriol **174**(11): 3577-3586.

Sun, Z., X. Chen, J. Wang, W. Zhao, Y. Shao, L. Wu, Z. Zhou, T. Sun, L. Wang, H. Meng, H. Zhang and W. Chen (2011). "Complete genome sequence of Streptococcus thermophilus strain ND03." J Bacteriol **193**(3): 793-794.

Suzuki, C. K., M. Rep, J. M. van Dijl, K. Suda, L. A. Grivell and G. Schatz (1997). "ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis." Trends Biochem Sci **22**(4): 118-123.

Taillez, P. (2001). "Les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années." Lait(81): 1-11.

Tapp, J., M. Thollesson and B. Herrmann (2003). "Phylogenetic relationships and genotyping of the genus Streptococcus by sequence determination of the RNase P RNA gene, rnpB." Int J Syst Evol Microbiol **53**(Pt 6): 1861-1871.

Tatusov, R. L., N. D. Fedorova, J. D. Jackson, A. R. Jacobs, B. Kiryutin, E. V. Koonin, D. M. Krylov, R. Mazumder, S. L. Mekhedov, A. N. Nikolskaya, B. S. Rao, S. Smirnov, A. V. Sverdlov, S. Vasudevan, Y. I. Wolf, J. J. Yin and D. A. Natale (2003). "The COG database: an updated version includes eukaryotes." BMC Bioinformatics **4**: 41.

Tatusov, R. L., E. V. Koonin and D. J. Lipman (1997). "A genomic perspective on protein families." Science **278**(5338): 631-637.

Teng, F., E. C. Nannini and B. E. Murray (2005). "Importance of gls24 in virulence and stress response of Enterococcus faecalis and use of the Gls24 protein as a possible immunotherapy target." J Infect Dis **191**(3): 472-480.

Terzaghi, B. E. and W. E. Sandine (1975). "Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages." Appl Microbiol **29**(6): 807-813.

Tettelin, H., V. Masignani, M. J. Cieslewicz, J. A. Eisen, S. Peterson, M. R. Wessels, I. T. Paulsen, K. E. Nelson, I. Margarit, T. D. Read, L. C. Madoff, A. M. Wolf, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. T. DeBoy, A. S. Durkin, J. F. Kolonay, R. Madupu, M. R. Lewis, D. Radune, N. B. Fedorova, D. Scanlan, H. Khouri, S. Mulligan, H. A. Carty, R. T. Cline, S. E. Van Aken, J. Gill, M. Scarselli, M. Mora, E. T. Iacobini, C. Brettoni, G. Galli, M. Mariani, F. Vegni, D. Maione, D. Rinaudo, R. Rappuoli, J. L. Telford, D. L. Kasper, G. Grandi and C. M. Fraser (2002). "Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V Streptococcus agalactiae." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12391-12396.

Thevenard, B., N. Rasoava, P. Fourcassie, V. Monnet, P. Boyaval and F. Rul (2011). "Characterization of Streptococcus thermophilus two-component systems: In silico analysis, functional analysis and expression of response regulator genes in pure or mixed culture with its yogurt partner, Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus." Int J Food Microbiol **151**(2): 171-181.

Thibessard, A., F. Borges, A. Fernandez, B. Gintz, B. Decaris and N. Leblond-Bourget (2004). "Identification of Streptococcus thermophilus CNRZ368 genes involved in defense against superoxide stress." Appl Environ Microbiol **70**(4): 2220-2229.

Thibessard, A., A. Fernandez, B. Gintz, N. Leblond-Bourget and B. Decaris (2002). "Effects of rodA and pbp2b disruption on cell morphology and oxidative stress response of Streptococcus thermophilus CNRZ368." J Bacteriol **184**(10): 2821-2826.

Tong, H., L. Zeng and R. A. Burne (2011). "The EIIABMan phosphotransferase system permease regulates carbohydrate catabolite repression in Streptococcus gordonii." Appl Environ Microbiol **77**(6): 1957-1965.

Tsakalidou, E., E. Zoidou, B. Pot, L. Wassill, W. Ludwig, L. A. Devriese, G. Kalantzopoulos, K. H. Schleifer and K. Kersters (1998). "Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of Streptococcus macedonicus sp. nov." Int J Syst Bacteriol **48 Pt 2**: 519-527.

Tutukina, M. N., K. S. Shavkunov, I. S. Masulis and O. N. Ozoline (2007). "Intragenic promotor-like sites in the genome of Escherichia coli discovery and functional implication." J Bioinform Comput Biol **5**(2B): 549-560.

Ulijasz, A. T., S. P. Falk and B. Weisblum (2009). "Phosphorylation of the RitR DNA-binding domain by a Ser-Thr phosphokinase: implications for global gene regulation in the streptococci." Mol Microbiol **71**(2): 382-390.

Vadeboncoeur, C. and M. Pelletier (1997). "The phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism." FEMS Microbiol Rev **19**(3): 187-207.

van de Guchte, M., P. Serror, C. Chervaux, T. Smokvina, S. D. Ehrlich and E. Maguin (2002). "Stress responses in lactic acid bacteria." Antonie Van Leeuwenhoek **82**(1-4): 187-216.

van den Bogaard, P. T., M. Kleerebezem, O. P. Kuipers and W. M. de Vos (2000). "Control of lactose transport, beta-galactosidase activity, and glycolysis by CcpA in Streptococcus thermophilus: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar." J Bacteriol **182**(21): 5982-5989.

van der Mee-Marquet, N., L. Fourny, L. Arnault, A. S. Domelier, M. Salloum, M. F. Lartigue and R. Quentin (2008). "Molecular characterization of human-colonizing Streptococcus agalactiae strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites." J Clin Microbiol **46**(9): 2906-2911.

Varcamonti, M., S. Arsenijevic, L. Martirani, D. Fusco, G. Naclerio and M. De Felice (2006). "Expression of the heat shock gene clpL of Streptococcus thermophilus is induced by both heat and cold shock." Microb Cell Fact **5**: 6.

Varcamonti, M., M. R. Graziano, R. Pezzopane, G. Naclerio, S. Arsenijevic and M. De Felice (2003). "Impaired temperature stress response of a Streptococcus thermophilus deoD mutant." Appl Environ Microbiol **69**(2): 1287-1289.

Varmanen, P., H. Ingmer and F. K. Vogensen (2000). "ctsR of Lactococcus lactis encodes a negative regulator of clp gene expression." Microbiology **146 (Pt 6)**: 1447-1455.

Vicente, M. and M. Garcia-Ovalle (2007). "Making a point: the role of DivIVA in streptococcal polar anatomy." J Bacteriol **189**(4): 1185-1188.

Vicente, M., A. I. Rico, R. Martinez-Arteaga and J. Mingorance (2006). "Septum enlightenment: assembly of bacterial division proteins." J Bacteriol **188**(1): 19-27.

Vickerman, M. M., S. E. Flannagan, A. M. Jesionowski, K. A. Brossard, D. B. Clewell and C. M. Sedgley (2010). "A genetic determinant in Streptococcus gordonii Challis encodes a peptide with activity similar to that of enterococcal sex pheromone cAM373, which facilitates intergeneric DNA transfer." J Bacteriol **192**(10): 2535-2545.

Vickerman, M. M., P. E. Minick and N. M. Mather (2001). "Characterization of the Streptococcus gordonii chromosomal region immediately downstream of the glucosyltransferase gene." Microbiology **147**(Pt 11): 3061-3070.

Vickerman, M. M., M. C. Sulavik and D. B. Clewell (1995). "Oral streptococci with genetic determinants similar to the glucosyltransferase regulatory gene, rgg." Infect Immun **63**(11): 4524-4527.

Vickerman, M. M., M. Wang and L. J. Baker (2003). "An amino acid change near the carboxyl terminus of the Streptococcus gordonii regulatory protein Rgg affects its abilities to bind DNA and influence expression of the glucosyltransferase gene gtfG." Microbiology **149**(Pt 2): 399-406.

Villani, F., O. Pepe, G. Mauriello, G. Salzano, G. Moschetti and S. Coppola (1995). "Antilisterial activity of thermophilin 347, a bacteriocin produced by Streptococcus thermophilus." Int J Food Microbiol **25**(2): 179-190.

Waite, D. C., E. J. Alper and B. J. Mady (1996). "Adult group B streptococcal disease." Ann Intern Med **125**(2): 152-153.

Waterman, S. R. and P. L. Small (1996). "Identification of sigma S-dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of Shigella flexneri." Mol Microbiol **21**(5): 925-940.

Wigneshweraraj SR, I. A., Buck M (2001). "In vitro roles of invariant helix-turn-helix motif residue R383 in sigma(54) (sigma(N))." Nucleic Acids Res. **29**(5): 1163-1174.

Williams, P., K. Winzer, W. C. Chan and M. Camara (2007). "Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **362**(1483): 1119-1134.

Wintjens, R. and M. Rooman (1996). "Structural classification of HTH DNA-binding domains and protein-DNA interaction modes." J Mol Biol **262**(2): 294-313.

Wirth, R. (2000). "Sex pheromones and gene transfer in Enterococcus faecalis." Res Microbiol **151**(6): 493-496.

Woodbury, R. and W. G. Haldenwang (2003). "HrcA is a negative regulator of the dnaK and groESL operons of Streptococcus pyogenes." Biochem Biophys Res Commun **302**(4): 722-727.

Wouters, J. A., F. M. Rombouts, W. M. de Vos, O. P. Kuipers and T. Abee (1999). "Cold shock proteins and low-temperature response of Streptococcus thermophilus CNRZ302." Appl Environ Microbiol **65**(10): 4436-4442.

Yeats, C., R. D. Finn and A. Bateman (2002). "The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain." Trends Biochem Sci **27**(9): 438.

Yuan, L., J. D. Hillman and A. Progulske-Fox (2005). "Microarray analysis of quorum-sensing-regulated genes in Porphyromonas gingivalis." Infect Immun **73**(7): 4146-4154.

Zangwill, K. M., A. Schuchat and J. D. Wenger (1992). "Group B streptococcal disease in the United States, 1990: report from a multistate active surveillance system." MMWR CDC Surveill Summ **41**(6): 25-32.

Zheng, F., H. Ji, M. Cao, C. Wang, Y. Feng, M. Li, X. Pan, J. Wang, Y. Qin, F. Hu and J. Tang (2011). "Contribution of the Rgg transcription regulator to metabolism and virulence of Streptococcus suis serotype 2." Infect Immun **79**(3): 1319-1328.

Zomer, A. L., G. Buist, R. Larsen, J. Kok and O. P. Kuipers (2007). "Time-resolved determination of the CcpA regulon of Lactococcus lactis subsp. cremoris MG1363." J Bacteriol **189**(4): 1366-1381.

Zotta, T., A. Ricciardi, F. Ciocia, R. Rossano and E. Parente (2008). "Diversity of stress responses in dairy thermophilic streptococci." Int J Food Microbiol **124**(1): 34-42.

Zuber, U. and W. Schumann (1994). "CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon dnaK of Bacillus subtilis." J Bacteriol **176**(5): 1359-1363.

Zugel, U. and S. H. Kaufmann (1999). "Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases." Clin Microbiol Rev **12**(1): 19-39.

Zuniga, M., I. Comas, R. Linaje, V. Monedero, M. J. Yebra, C. D. Esteban, J. Deutscher, G. Perez-Martinez and F. Gonzalez-Candelas (2005). "Horizontal gene transfer in the molecular evolution of mannose PTS transporters." Mol Biol Evol **22**(8): 1673-1685.

Zybailov, B., M. K. Coleman, L. Florens and M. P. Washburn (2005). "Correlation of relative abundance ratios derived from peptide ion chromatograms and spectrum counting for quantitative proteomic analysis using stable isotope labeling." Anal Chem **77**(19): 6218-6224.

Annexe 1

Henry *et al. BMC Microbiology* 2011, **11**:223
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/223

BMC Microbiology

RESEARCH ARTICLE Open Access

The rgg_{0182} gene encodes a transcriptional regulator required for the full *Streptococcus thermophilus* LMG18311 thermal adaptation

Romain Henry[1,2], Emmanuelle Bruneau[1,2], Rozenn Gardan[3], Stéphane Bertin[1,2], Betty Fleuchot[3], Bernard Decaris[1,2] and Nathalie Leblond-Bourget[1,2*]

Abstract

Background: *Streptococcus thermophilus* is an important starter strain for the production of yogurt and cheeses. The analysis of sequenced genomes of four strains of *S. thermophilus* indicates that they contain several genes of the *rgg* familly potentially encoding transcriptional regulators. Some of the Rgg proteins are known to be involved in bacterial stress adaptation.

Results: In this study, we demonstrated that *Streptococcus thermophilus* thermal stress adaptation required the rgg_{0182} gene which transcription depends on the culture medium and the growth temperature. This gene encoded a protein showing similarity with members of the Rgg family transcriptional regulator. Our data confirmed that Rgg_{0182} is a transcriptional regulator controlling the expression of its neighboring genes as well as chaperones and proteases encoding genes. Therefore, analysis of a Δrgg_{0182} mutant revealed that this protein played a role in the heat shock adaptation of *Streptococcus thermophilus* LMG18311.

Conclusions: These data showed the importance of the Rgg_{0182} transcriptional regulator on the survival of *S. thermophilus* during dairy processes and more specifically during changes in temperature.

Background

The species *Streptococcus thermophilus* is a Lactic Acid Bacterium (LAB) used as a starter of fermentation in yogurt and cheese production. In nature and during dairy fermentation processes, *S. thermophilus* is subjected to sudden changes in its environment and its industrial performance is conditioned by its ability to successfully adapt to harsh conditions. To survive, like many other bacteria, this species must develop appropriate physiological responses by modifying gene expression appropriately.

One of the stresses, that *S. thermophilus* commonly encounters, is the modification of the temperature. For instance, during the production of dairy products, temperature shifts are applied to regulate the bacterial growth and, thus, control the lactic acid production [1]. *S. thermophilus* survival against thermal stress is conditioned by its ability to sense and quickly adapt its physiology mainly by the synthesis of adequate proteins at the right moment. For example, adaptation of *S. thermophilus* to a lowering of temperature required the synthesis of a set of chaperones called cold shock proteins (Csp) that is strongly induced in response to a rapid decrease in growth temperature [2,3]. As in other Gram positive bacteria, *S. thermophilus* also responds to thermal stress by synthesizing a conserved set of heat-shock proteins (Hsp), including both chaperones and proteases [4]. Their role during heat stress is to rescue, or to scavenge, heat-denatured proteins. In LAB, the adaptation to heat shock required the two negative transcriptional factors HrcA [5] and CtsR [6] which negatively control the expression of major molecular chaperones (DnaK, DnaJ, GroEL and GroES) [7] and proteases (Clp family) [6], respectively. Furthermore, Zotta *et al.* (2009) have shown the involvement of the HrcA and CtsR proteins in the heat stress response of *S. thermophilus* Sfi39 [8]. Apart from these data, little is

* Correspondence: bourget@nancy.inra.fr
[1]INRA, UMR1128 Génétique et Microbiologie, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2011 Henry et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Henry et al. BMC Microbiology 2011, 11:223
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/223

known about the network of regulation controlling *S. thermophilus* adaptation to temperature changes.

Among bacterial transcriptional regulators is the wide conserved family of Rgg regulators encoded by genes, exclusively found in the order of *Lactobacillales* and the family *Listeriaceae* [9]. Rgg regulators act by binding to the promoter region of their target genes [10-13]. At their N-terminal end, they carry a Helix-Turn-Helix (HTH) XRE DNA-binding domain demonstrated to be important for their activity as transcriptional regulators [14]. They are positive regulator [15,16] or act both as activator and repressor [17,18]. Most of the Rgg regulators control the transcription of their neighboring genes [9,16,19,20]. However, Rgg from *S. pyogenes* NZ131, *S. agalactiae* NEM316 or *S. suis* SS2 are considered as global regulators since controlling highly diverse genes scattered on the genome [12,13,21,22]. In these cases, Rgg proteins are involved in a network of regulation and modulate the expression of other transcriptional regulators, including several two-component regulatory systems, which are important in the transcriptional response to changing environments [12,13,21]. Several Rgg proteins contribute to bacterial stress response. For instance, the Rgg protein of *Lactocccus lactis*, also known as GadR, is associated with glutamate-dependent acid tolerance [15]. Within *Streptococcus*, several Rgg proteins have been involved in oxidative- and/or to thermal-stress responses [23-25].

The high number of *rgg* genes observed in the genomes of *S. thermophilus* strains (7 in strains LMG18311 and CNRZ1066, 6 in LMD-9 and 5 in ND03) [26-28] suggests that their acquisition and their preservation are advantageous for *S. thermophilus*. However, the involvement of these genes in *S. thermophilus* LMG18311 stress response is still hypothetic and none of the 7 *rgg* genes of LMG18311 has been studied at the molecular level. To determine whether any of the *rgg* genes of *S. thermophilus* LMG18311 are involved in adaptation to changes in environmental conditions, Δ*rgg* deletion mutant was constructed and its tolerance to different stresses was tested. In this study, we demonstrate that (i) the transcription of rgg_{0182} gene from *S. thermophilus* LMG18311 is influenced by culture medium and growth temperature, (ii) Rgg_{0182} is a transcriptional regulator that modulate not only the transcription of its proximal target genes but is also involved in the network of regulation of the transcription of genes coding chaperones and proteases, (iii) this gene is involved in heat shock response.

Results

Analysis of the rgg_{0182} locus

The rgg_{0182} gene corresponds to the *stu0182* gene of the complete genome sequence of *S. thermophilus* LMG18311 [26]. However, the sequencing of the rgg_{0182} gene (GenBank Accession JF699754) followed by its sequence comparison with the *stu0182* gene revealed that this latter contained sequencing discrepancies (substitutions in positions 44, 46, 50, 579 and 681 compared to the rgg_{0182} sequence). The rgg_{0182} gene (864 bp) potentially encodes a protein of 288 amino acids with a predicted molecular mass of 35.6 kDa. This protein exhibited an identity of about 30% with other streptococcal proteins belonging to the Rgg family of transcriptional regulators and 35% identity (e-value = $8e^{-48}$) with Rgg_{1358} from *S. thermophilus* LMD-9 which was recently shown to be involved in a quorum sensing (QS) mechanism [9]. Rgg_{0182} contained a HTH-XRE motif from amino acid 11 to 67 typical of Rgg regulators and a Rgg-C-terminal motif from amino acid 70 to 288 (Figure 1). Therefore, the rgg_{0182} gene was predicted to encode a transcriptional regulator.

The gene rgg_{0182} was surrounded by two ORFs (Figure 1), not annotated in the genome of the strain LMG18311, but revealed using the software bactgeneSHOW designed for small-gene detection [29]. Indeed, upstream of the rgg_{0182} gene was the shp_{0182} gene (63 nucleotides long), potentially encoding a small hydrophobic peptide belonging to the group I of the SHP family [9]. Downstream of rgg_{0182} was the pep_{0182} gene

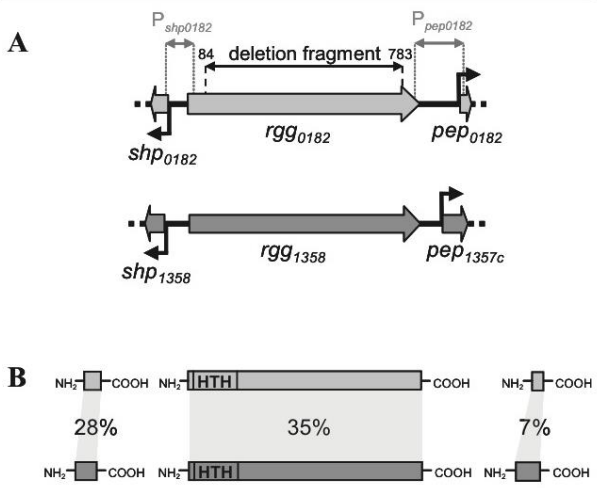


Figure 1 Schematic representation of the rgg_{0182} and rgg_{1358} loci (A) and of the corresponding proteins (B). Although the rgg_{0182} and rgg_{1358} loci present analogies (A), they encoded distinct proteins (B). Numbers in panel A indicate the position of nucleotides, with the +1 position being that of the first nucleotide of the rgg_{0182} gene. The "deletion fragment" corresponds to the deleted portion of the rgg_{0182} gene in the Δrgg_{0182} mutant. The broken arrows indicate the promoters. Pshp_{0182} and Ppep_{0182}materialized the position of the 126 bp and 165 bp PCR fragment respectively used in EMSA. In panel B, amino acids sequence identities are indicated in percent. HTH indicated the Helix-Turn-Helix-XRE motif.

Henry et al. BMC Microbiology 2011, 11:223
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/223

(42 nucleotides long), encoding a small peptide with no similarity with peptides found in databases. Although, the genetic organization of the rgg_{0182} locus was similar to that of the rgg_{1358} of the LMD-9 strain from *S. thermophilus*, these two loci were distinct as illustrated by the low sequence identity between the proteins encoded by them (Figure 1). The two *shp* genes were classified in two distinct groups from the SHP family [9]. Finally, the rgg_{0182} locus and its flanking genes were also found in the genome of CNRZ1066 strain but missing in the genome of ND03 and LMD-9 strains.

Transcription analysis of the rgg_{0182} gene

In the literature, studies of *rgg* genes transcription are scarce. Indeed, only the *ropB* transcription from *Streptococcus pyogenes* has been studied [10]. Thus, it was of interest to determine whether transcription of *rgg* was constitutive or not. To do so, the rgg_{0182} transcription was studied by qPCR from cells cultivated in LM17 or CDM medium at 30 or 42°C. In all qPCR experiments, the values were normalized to the expression of the *ldh* gene encoding the lactate dehydrogenase. This gene was considered as a relevant reference since it was demonstrated to be constitutively expressed in all tested conditions (data not shown). The qPCR experiments were realized from three independent RNA extracts and done in duplicate.

Figure 2A showed the relative transcription levels of the rgg_{0182} gene in the LMG18311 strain. When cultivated at 42°C in LM17 medium, the wild-type strain showed a significant decrease in its rgg_{0182} mRNA levels during growth. Indeed, the rgg_{0182} mRNA level was highest in the exponential phase (0.16 +/- 0.08) and was down-regulated 4-fold in stationary phase ($p = 0.01$). Similar results were obtained in CDM medium at 42°C where the transcription of rgg_{0182} was found to be more than 3-fold higher in the exponential phase than in stationary phase ($p < 0.001$). Whatever the medium tested, the transcription of rgg_{0182} was found to be growth-phases dependent.

We then investigated whether rgg_{0182} was transcribed at other temperatures and chose to work at 30°C, temperature at which *S. thermophilus* can be exposed during industrial processes (Figure 2B). When cells were cultivated at 30°C in LM17, the profile of rgg_{0182} transcripts was similar with that observed at 42°C. In contrast when cells were grown at 30°C in CDM medium, an increase of rgg_{0182} transcription was observed during the growth, i.e. the rgg_{0182} mRNA level was more than 3-fold higher ($p < 0.001$) in stationary phase than in exponential phase. The rgg_{0182} transcripts level of stationary phase cells grown in CDM medium was 14-fold higher ($p < 0.001$) at 30 than at 42°C indicating it was on the influence of the growth temperature. Taken together, these results revealed that the kinetics of rgg_{0182} transcription was medium and temperature dependent and that the transcript level of rgg_{0182} was

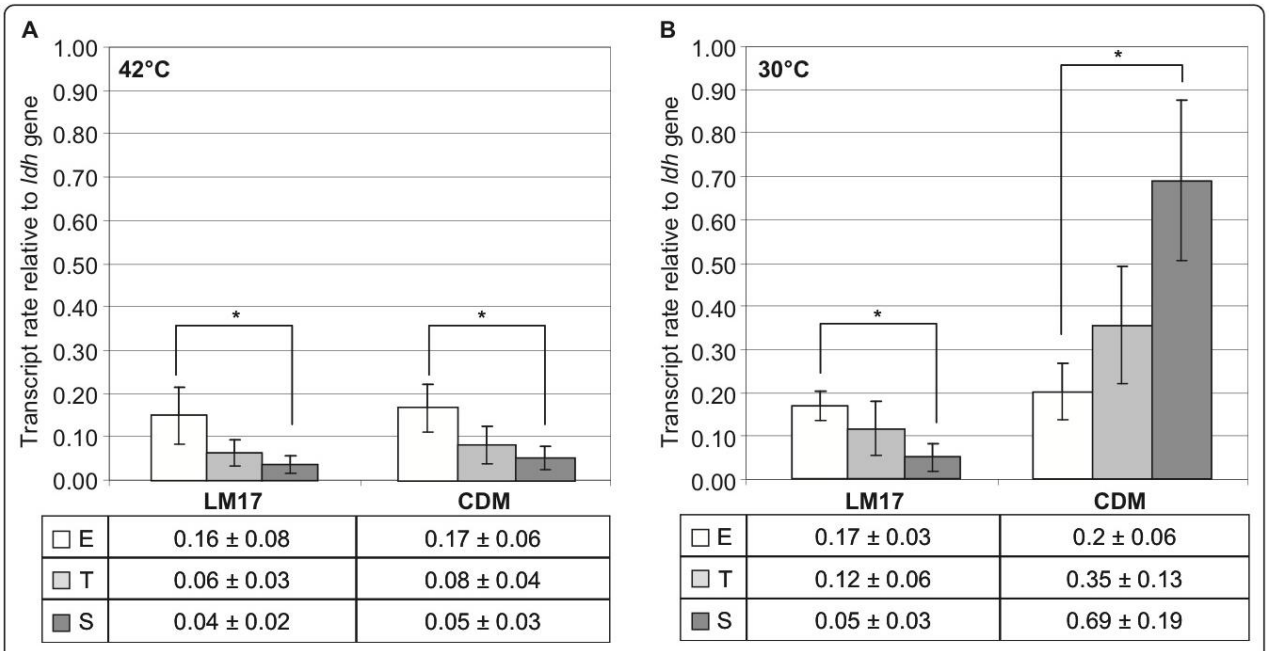


Figure 2 Relative rgg_{0182} gene transcript level from *S. thermophilus* LMG18311 cells, grown at 42°C (A) and at 30°C (B). Total RNAs from the wild type strain were extracted from exponential (E, white bars), transition (T, light gray bars) and stationary (S, dark gray bars) phase cells. Data are presented as the mean +/- standard deviation from three independent experiments performed in duplicate. Student's *t* test: *, $p < 0.001$.

Henry *et al. BMC Microbiology* 2011, **11**:223
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/223

the highest in stationary phase cells cultivated in CDM at 30°C.

Effects of the Rgg_{0182} protein on the transcription of its flanking genes

Data from the literature indicate that several products of *rgg* genes regulate adjacent genes [9,16,19,20]. To determine whether the product of the rgg_{0182} gene was involved in the transcriptional regulation of its flanking genes, we designed primers and used them in qPCR to measure the level of transcription of the shp_{0182} and pep_{0182} genes. However, the qPCR failed probably because of the small size of the pep_{0182} and shp_{0182} genes that did not allow the design of effective primers. As an alternative strategy, the activity of the pep_{0182} and shp_{0182} promoters was studied with transcriptional fusion in a wild-type and a Δrgg_{0182} background. To do so, plasmids carrying transcriptional fusions coupling the intergenic region of each flanking gene to a *luxAB*-reporter fusion were constructed and named pGICB004::$P_{pep0182}$ and pGICB004::$P_{shp0182}$, as well as the Δrgg_{0182} strain carrying a chromosomal deletion of the rgg_{0182} gene. Both plasmids were integrated in the wild-type or Δrgg_{0182} mutant chromosome. Relative levels of activity of the pep_{0182} and shp_{0182} promoters were determined in both strains either grown in LM17 or CDM (Figure 3), at 30 or 42°C. Whatever the conditions, no significant difference in the growth rate or yield was observed between the wild type and the mutant. In LM17 at 30 and 42°C, almost no luciferase activity was detected with both promoters in the wild type or the Δrgg_{0182} background (data not shown). This suggests that the promoters $P_{pep0182}$ and $P_{shp0182}$ are not active in these experimental conditions. In contrast in CDM medium, for both promoters in a wild type background, a luciferase activity was detected at 30°C and 42°C (Figure 3). Nevertheless, the maximum of $P_{pep0182}$-*luxAB* and $P_{shp0182}$-*luxAB* activity were 28- and 6-fold higher ($p < 0.001$) at 30°C than at 42°C, respectively. In addition, the level of activity of the $P_{pep0182}$-*luxAB* and $P_{shp0182}$-*luxAB* fusions differed between the wild-type and the mutant strains. Indeed, in cells cultivated in CDM at 30°C, in the Δrgg_{0182} mutant the $P_{pep0182}$-*luxAB* and the $P_{shp0182}$-*luxAB* showed both a maximum activity that was 3-fold lower ($p < 0.001$) than in the LMG18311 strain (Figure 3). These results demonstrated that rgg_{0182} played a role in the regulation of the transcription of both $P_{pep0182}$-*luxAB* and $P_{shp0182}$-*luxAB* fusions and supported the hypothesis that Rgg_{0182} may, directly or not, regulate the transcription of pep_{0182} and shp_{0182} genes. Moreover, the growth medium, as described above and by Ibrahim *et al.* (2007b), and, in an original way, the

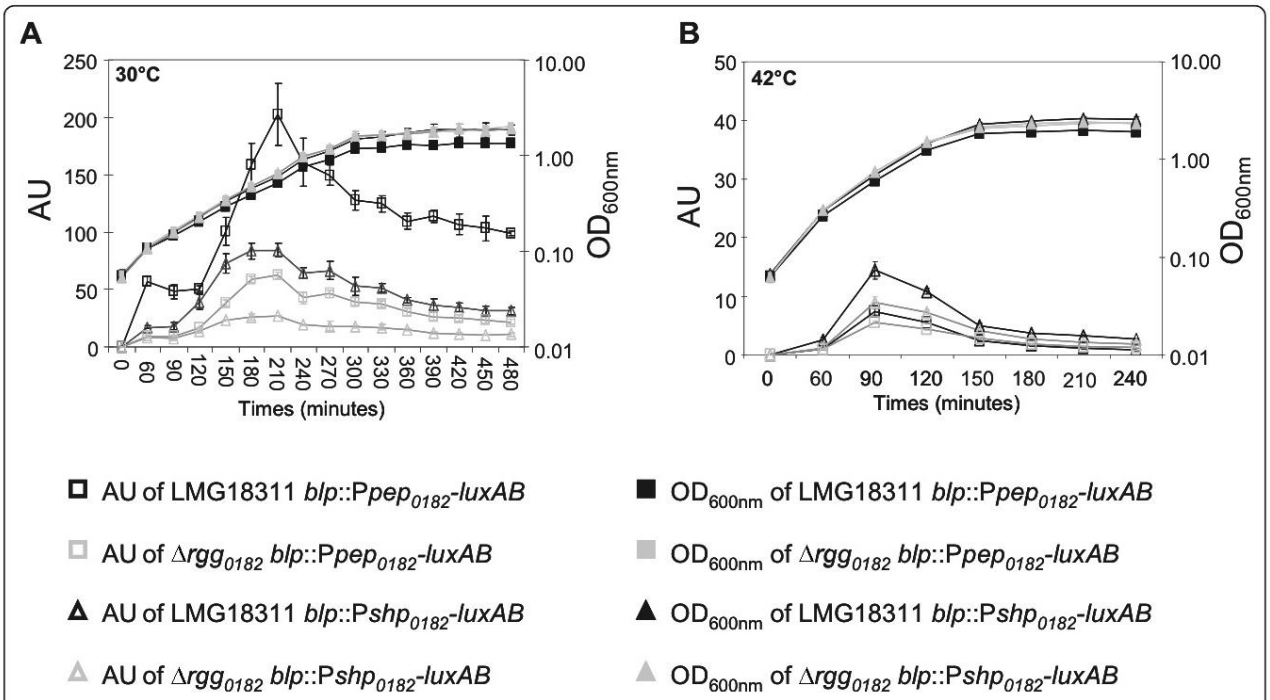


Figure 3 Luciferase activity and growth of the LMG18311 and the Δrgg_{0182} strains containing the $P_{shp0182}$-*luxAB* and $P_{pep0182}$-*luxAB* transcriptional fusions, in CDM medium. The expression of the fusions was followed in strains cultivated in CDM medium, at 30°C (A) or at 42°C (B). Data are presented as the mean +/- standard deviation of three independent experiments. AU: luminescence arbitrary units normalized against the OD_{600nm} of the cultures.

temperature were parameters that influenced the levels of activity of the promoters $P_{pep0182}$ and $P_{shp0182}$.

Study of the binding of Rgg_{0182} protein of *S. thermophilus* upstream of shp_{0182} and pep_{0182} genes

The results above and the presence of the HTH motif on the N-terminal part of Rgg_{0182} protein suggested that Rgg_{0182} may regulate the transcriptional activities of the $P_{shp0182}$ and the $P_{pep0182}$ promoters by binding to their DNA sequences. To test this hypothesis, DNA electrophoretic mobility shift assay were carried out. To do so, the His_6-Rgg_{0182} protein was overproduced in *E. coli* C41(DE3), verified by SDS-PAGE and Western blot (data not shown). Immobilized Metal ion Affinity Chromatography (IMAC) purification of the His_6-Rgg_{0182} protein was performed. The purity of the Rgg_{0182} protein was assessed by SDS-PAGE using Coomassie blue protein staining, i.e. only one band of the expected molecular mass (35.7 kDa) was revealed (data not shown).

A 126 bp PCR amplified DNA fragment (Figure 1), including the entire 72 bp intergenic rgg_{0182}-shp_{0182} region and part of the 5' end of the shp_{0182} and rgg_{0182} genes, was incubated with the purified His_6-Rgg_{0182} protein. As can be seen in Figure 4, the Rgg_{0182} protein retarded the shp_{0182} promoter DNA fragment. The same experiment was realized with a 165 bp PCR amplified fragment, covering the entire 150 bp intergenic rgg_{0182}-pep_{0182} region including the pep_{0182} promoter, and analogous results were obtained (Figure 4). The P_{ldh} probe corresponding to the promoter region of the *ldh* gene was chosen as a negative control in EMSA experiments since its expression was not under the control of Rgg_{0182}. Using P_{ldh} as a probe, no DNA retardation was observed, demonstrating that Rgg_{0182} binds specifically to the promoter of its target genes. Thus, these results demonstrated conclusively that Rgg_{0182} activated the shp_{0182} and pep_{0182} genes transcription by binding to their promoter regions.

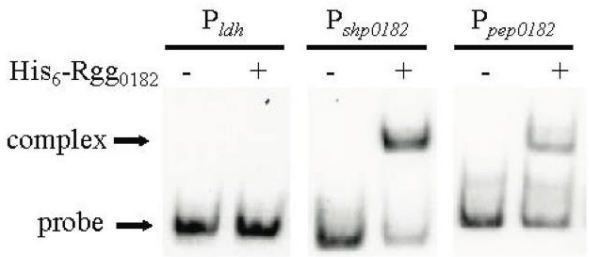


Figure 4 Analysis of the Rgg_{0182} binding to DNA. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) of the promoter regions of the two target genes (shp_{0182} and pep_{0182}) of Rgg0182 in the absence or in the presence of the purified His_6-Rgg_{0182} protein. DNA probes labelled with biotin (0.1 pmol each) were incubated with 2 pmol of Rgg_{0182}. The P_{ldh} probe is an *ldh* promoter fragment used as a negative control.

Effects of the Rgg_{0182} protein on the transcription of genes encoding protease and chaperone proteins

The impact of temperature on the rgg_{0182} gene transcription suggested a role for the Rgg_{0182} protein on *S. thermophilus* LMG18311 adaptation to thermal changes. Thus, we hypothesized that Rgg_{0182} might control the transcription of genes encoding a set of heat- and cold-shock proteins including chaperones and proteases. Chaperones and ATP-dependent proteases play a major role for bacterial survival under conditions of heat stress where proteins tend to unfold and aggregate. Based upon the *S. thermophilus* LMG18311 genome sequence [26], genes predicted to encode the major chaperones and proteases involved in heat shock responses were selected for analysis: *clpC, dnaK, dnaJ, hsp33, groES, groEL, clpP, clpX, clpE, clpL* (Genbank Accession NC_006448, locus tags stu0077, stu0120-0121, stu0180, stu0203-0204, stu0356, stu0581, stu0602, stu1614, respectively). The two *cspA* and *cspB* genes (locus tags, stu0837-0838 respectively), involved in *S. thermophilus* cold stress response, were also included in this study. The transcript levels of these genes were measured by qPCR on stationary phase cells of the wild-type and the Δrgg_{0182} mutant grown in CDM medium at 30°C (i.e. when rgg_{0182} was the most transcribed) from 3 independent experiments done in duplicate (Figure 5). In these conditions, the transcript level of almost all genes encoding protease and chaperone proteins (except that of *dnaJ, groEL, cspA* and *cspB*) was under-expressed in the Δrgg_{0182} mutant compared to the wild type strain suggesting a role for Rgg_{0182} in the control of their transcription. The difference in the transcript abundance between the wild type and Δrgg_{0182} mutant strains ranged from 1.5- to 20-fold and were statistically significant ($P < 0.001$). As described in other *Streptococcus* transcriptional analysis, a 1.5-fold difference in transcript level was interpreted as a significant difference in expression between the strains [21,23].

In low-GC Gram positive bacteria, the control of the transcription of the *clp* family genes and of *dnaK* and *groES* genes is primarily mediated by binding of the CtsR and HrcA repressors, respectively, to promoter region of target genes. In *S. thermophilus* LMG18311, we found CtsR operators (AGGTCAAANANAGGTCAAA) [6] upstream of *clpP, clpE, clpL, ctsR, clpC* and *groEL* genes and HrcA binding sites (GCACTC(N)$_9$GAGTGCTAA) [30] only upstream of *hrcA, groEL* (with 2 mismatches) and *dnaJ* (6 mismatches). These results prompted us to evaluate the level of *ctsR* and *hrcA* transcripts (locus tags, stu0076 and stu0118 respectively) in the wild-type and the Δrgg_{0182} mutant.

Henry et al. BMC Microbiology 2011, 11:223
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/223

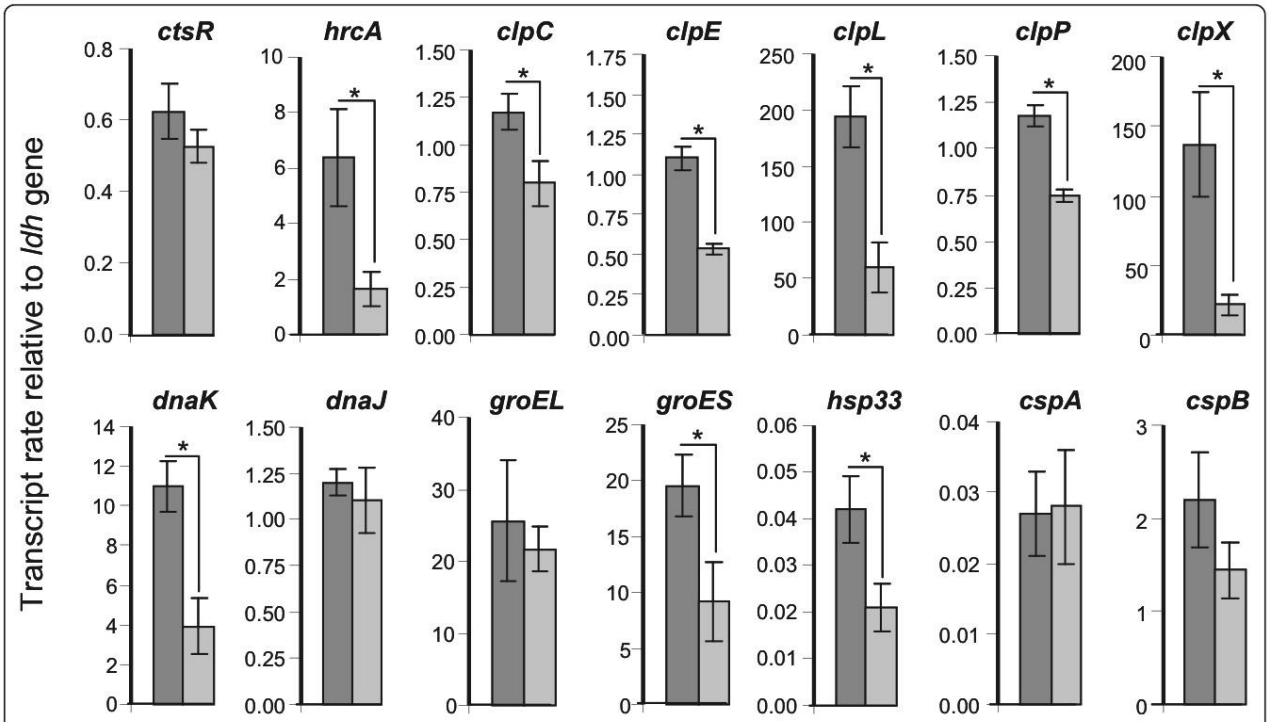


Figure 5 Relative genes transcript level of *S. thermophilus* stationary phase cells grown in CDM medium at 30°C. Total RNAs were extracted from stationary phase cells of *S. thermophilus* LMG18311 (dark gray bars) and its isogenic Δrgg_{0182} mutant (light gray bars) grown in CDM at 30°C. Data are presented as the mean +/- standard deviation of the gene transcript levels measured from 3 independent experiments done in duplicate. Student's *t* test: *, $p < 0.001$.

These data revealed no significant difference for *ctsR* gene whereas the *hrcA* transcript level was nearly 4-fold reduced in the absence of rgg_{0182} suggesting that Rgg_{0182} positively controls *hrcA* transcription.

These results indicate that Rgg_{0182} is a positive transcriptional regulator of heat shock proteins encoding genes in particular of *hrcA, clpC, clpE, clpL, clpP, clpX, dnaK, groES* and *hsp33* genes.

Role of the rgg_{0182} gene in the heat shock response of *S. thermophilus*

Knowing that several *rgg* genes from pathogenic streptococci are involved in stress response and taking into account the above data, we checked whether rgg_{0182} could be involved in the *S. thermophilus* adaptation to heat shock. The heat tolerance was evaluated on stationary phase cells grown for 10 h in CDM medium (OD_{600nm} = 1.5) or in LM17 medium (OD_{600nm} = 2.5) at 30°C (where rgg_{0182} was found to be higher or lower transcribed, respectively) before (control condition) and after a 15, 30, 45 and 60 minutes incubation at 52°C (temperature limit for growth of *S. thermophilus* LMG18311 in our laboratory conditions). The experiments were realized 3 times independently in triplicate. Using the LM17 medium (data not shown), no significant difference was observed between the strains. An exposure at 52°C, whatever its duration, resulted in a 20% decrease of the survival of both strains.

On the contrary, when stationary phase cells grown in CDM were exposed to a 52°C heat stress for up to 30 min, the mutant showed a significant increase of the sensibility compared to the wild type ($p < 0.001$) (Figure 6). The heat tolerance of the Δrgg_{0182} mutant decreased gradually with the heat exposure time (72%, 53%, 46% and 38% of survival at 15, 30, 45 and 60 minutes, respectively). Between both strains, a difference of survival was observed at 30, 45 and 60 minutes where the mutant was up to 1.75 fold less resistant than the wild type strain. Thus, the decreased of survival of the mutant show that rgg_{0182} plays a role in *S. thermophilus* adaptation to heat stress.

The Rgg_{0182} protein of *S. thermophilus* LMG18311 is involved in the transcription regulation of *clpE* and *cspB* genes in heat stress condition

The impairment of the survival of the Δrgg_{0182} mutant cells following a sudden increase in temperature suggested that the rgg_{0182} gene may act to regulate the transcription of *S. thermophilus* genes involved in the heat shock response. To investigate a possible role for

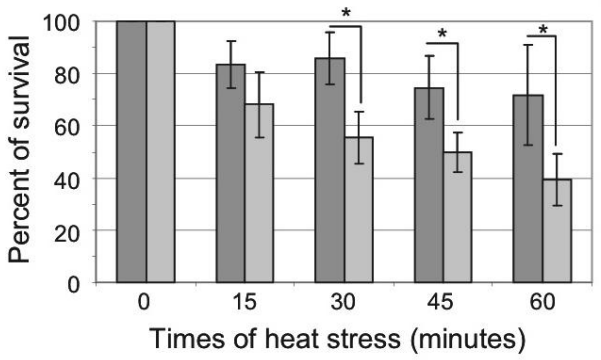


Figure 6 Survival of the *S. thermophilus* strain LMG18311 and the Δ*rgg*$_{0182}$ mutant after heat shock (0, 15, 30, 45 and 60 min at 52°C). *S. thermophilus* was cultivated in CDM medium at 30°C and then exposed to heat stress. The percentage of survival was calculated as $N/N_0 \times 100$ where N_0 is the CFU number of the control condition and N the CFU number in heat stress condition. Dark gray bars correspond to wild type strain and light gray bars correspond to Δ*rgg*$_{0182}$ strain. Data are presented as the mean +/- standard deviation of 3 independent experiments done in triplicate. Student's *t* test: *, $p < 0.001$.

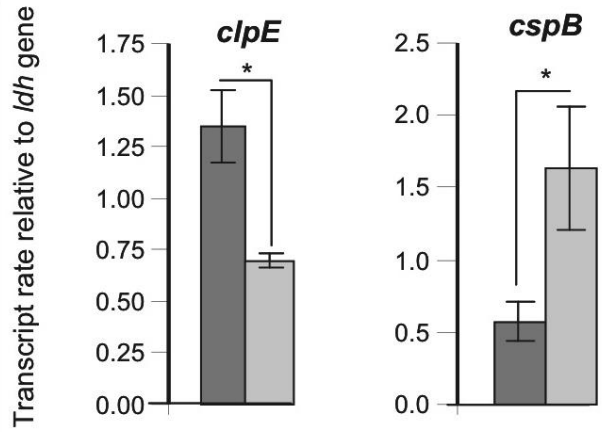


Figure 7 Relative genes transcript level of *S. thermophilus* cells exposed to a heat stress. Total RNAs were extracted from stationary phase cells of *S. thermophilus* LMG18311 (dark gray bars) and its isogenic Δ*rgg*$_{0182}$ mutant (light gray bars) grown in CDM at 30°C until stationary phase and then exposed 30 min at 52°C (heat stress condition). Data are presented as the mean +/- standard deviation of the gene transcript levels measured from 3 independent experiments done in duplicate. Student's *t* test: *, $p < 0.001$.

Rgg$_{0182}$ in changes of the transcription of heat shock genes, the transcript level of genes encoding chaperones and proteases were measured by qPCR. The transcript levels of the 14 selected stress-responsive genes were studied, in three independent experiments done in duplicate, on stationary cells of the wild-type and the Δ*rgg*$_{0182}$ mutant grown in CDM and exposed 30 minutes at 52°C. Our results showed that *clpE* and *cspB* genes were about 2-fold less and 3-fold more transcribed, respectively, in the mutant strain compared to wild-type ($p < 0.001$) (Figure 7). No significant difference was observed for the other genes studied (data not shown). This observation suggests that at high temperature, Rgg$_{0182}$ is a positive regulator of *clpE* transcription and a negative regulator of *cspB* transcription.

Discussion

The aim of the present study was to determine if Rgg$_{0182}$ functioned as a transcriptional regulator. First, we showed that it was transcribed in a growth phase dependent manner i.e., in LM17 (at 30°C and 42°C) or CDM (at 42°C), a higher expression level was observed in exponential phase than in stationary phase. Interestingly, using CDM medium, it was found that the *rgg*$_{0182}$ transcripts were more abundant at 30°C than at 42°C suggesting that *rgg*$_{0182}$ transcription was also influenced by temperature. Because of their immediate vicinity with the *rgg*$_{0182}$ gene, the transcription of *shp*$_{0182}$ and *pep*$_{0182}$ genes was hypothesized to be under the control of Rgg$_{0182}$. This was confirmed by the use of transcriptional fusions showing that the activation of the P$_{shp0182}$ and P$_{pep0182}$ promoters required the presence of Rgg$_{0182}$ and that their activity was optimal under the conditions were transcription of the *rgg*$_{0182}$ gene was mostly expressed (i.e. in CDM medium at 30°C in stationary phase growth). Finally, to confirm the probable interaction of Rgg$_{0182}$ with DNA, EMSA experiments were carried out and demonstrated conclusively that Rgg$_{0182}$ binds to the promoter region of the *shp*$_{0182}$ and *pep*$_{0182}$ target genes. Together these results were in coherence with Rgg$_{0182}$ being a transcriptional regulator, positively and directly, controlling the expression of *shp*$_{0182}$ and *pep*$_{0182}$ genes.

The *rgg*$_{0182}$ locus combined a gene encoding a transcriptional regulator of the Rgg family with another gene encoding a small hydrophobic peptide of the SHP family. Recently, one of these *shp*/*rgg* loci, named *shp*/*rgg*$_{1358}$ in LMD-9 has been demonstrated to encode two components of a novel QS mechanism [9]. This system involves a Rgg transcriptional regulator and a SHP pheromone that is detected and reimported into the cell by the Ami oligopeptide transporter. The target gene of the *shp*$_{1358}$/*rgg*$_{1358}$ pair, called *pep*$_{1357C}$, is located just downstream of the *rgg*$_{1358}$ gene, and encodes a secreted cyclic peptide [31]. By analogy with the Shp$_{1358}$/Rgg$_{1358}$ locus, we hypothesize that the SHP$_{0182}$/Rgg$_{0182}$ pair would also been involved in a QS mechanism with Shp$_{0182}$ being a pheromone possibly controlling the activation of the Rgg$_{0182}$. Thus, one hypothesis to explain the high *rgg*$_{0182}$ transcript level in CDM is to consider that the *rgg*$_{0182}$ transcription would be under the control of the Rgg$_{0182}$/

Henry et al. BMC Microbiology 2011, 11:223
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/223

SHP_{0182} pair and to consider that in a medium free of peptide, the internalization of *shp*$_{0182}$ by Ami transporter would be facilitated. Moreover, the mechanism of *rgg*$_{0182}$ expression seemed to be more complex than that of *rgg*$_{1358}$ since not only influenced by the culture medium but also by the temperature. Further experiments will be done (i) to determine whether the QS mechanism involving the SHP_{1358} and the Rgg_{1358} can be generalized to other SHP/Rgg pairs, including SHP_{0182}/Rgg_{0182} pair and (ii) to understand the mechanism by which temperature could influence the *rgg*$_{0182}$ expression.

On the other hands, induction of the *rgg*$_{0182}$ expression at 30°C suggests that this gene might participate in the physiological adaptation of *S. thermophilus* to this temperature. When cells were cultivated in CDM at 30°C, the inactivation of *rgg*$_{0182}$ was associated with a reduce expression of genes encoding chaperone and protease proteins. In *Bacillus subtilis*, the DnaKJ complex facilitates substrates folding to the native state and the GroESL complex provides an isolated environment for the proper folding of small protein substrates [32]. The degradation of unfolded proteins and small peptides is ensured by a protease complex composed of the protease subunit ClpP and several ATPases of the Clp family [32]. Thus, the Rgg_{0182} is a transcriptional regulator whose biological roles would be to control the homeostasis of chaperone and protease proteins in cells grown at 30°C in CDM. This is in concordance with data obtained in *S. pyogenes* where Rgg is found (at the protein level) to control the expression of ClpL, ClpP, GroEL and DnaK in stationary phase (4). Furthermore, it was shown that ClpL protein of *S. thermophilus* Sfi39 is necessary for correct response to both heat and cold stresses [4].

Results of qPCR experiments also showed an effect of Rgg0182 on *hrcA* expression. However, preliminary EMSA results (data not shown) indicated that the Rgg0182 protein did not bind to the *hrcA* promoter region. This suggests that the transcription of *hrcA* obviously is stimulated by Rgg_{0182} indirectly, perhaps by influencing the expression of another regulatory protein. Such indirect regulation has already been reported for other Rgg proteins [12,13,21] and, in the present study, might be extended to, at least, some of the *rgg*$_{0182}$ distal target genes.

Finally, to assess the significance of Rgg-associated changes in the expression of genes involved in the heat shock response, we checked whether the deletion of *rgg*$_{0182}$ had an impact on the survival of the strains under heat stress conditions (shift from 30°C to 52°C for 15 min to 60 min). Interestingly, an impaired survival of the mutant was observed but only when the cells were cultivated in the CDM medium, i.e. in conditions where the difference in the level of *rgg*$_{0182}$ transcripts was maximal between both strains. In the mutant cultivated in CDM, the percent of survival decreased with the duration of the heat exposure. These results demonstrated a role for Rgg_{0182} in *S. thermophilus* fitness in response to sudden increased of the temperature. As observed in other streptococcal strains [24,25], the deletion of the *rgg*$_{0182}$ gene is not associated with a drastic modification of the survival to stress suggesting that this regulator is not essential but important for heat stress adaptation. Furthermore, our results showed that *cspB* and *clpE* genes were 2-fold lower and 3-fold higher, respectively, in the mutant compared to the wild-type strain after the heat stress. Data from literature indicate that most Csp proteins are required when cells are grown at low growth temperature [2,3]. Thus, the Rgg_{0182} would negatively control the production of CspB when the latter is not required. Moreover, in *S. pneumoniae*, the *clpE* gene has been demonstrated to be required for thermo-tolerance [33], therefore we hypothesize that the heat sensitivity of the *S. thermophilus* Δ*rgg*$_{0182}$ mutant would result, at least partially, from a reduced level of ClpE expression. Alternatively, it is also conceivable that Rgg_{0182} regulates the transcription of other genes encoding proteins involved in the *S. thermophilus* heat stress response. A transcriptomic analysis would identify all targets of this regulator within *S. thermophilus* LMG18311.

Conclusions

In conclusion, our study gave a better understanding of the thermal adaptation of the important dairy starter, *S. thermophilus*. These data showed the importance of the Rgg_{0182} transcriptional regulator on the survival of *S. thermophilus* during industrial processes and more specifically during changes in temperature.

Methods

Bacterial strains, media and reagents

Streptococcus thermophilus LMG18311 and its derivatives are presented in Table 1. *S. thermophilus* strains were grown at 30 or 42°C in M17 medium with lactose (10 g/l) (LM17, a classical medium for *S. thermophilus* growth) [34] or in a chemically defined medium (CDM, a peptide free-medium) [35]. Pre-cultures were incubated at 42°C in milk medium except for the luciferase assays as mentioned below. For numeration, agar was added to the medium (15 g/l) and cells were incubated under anaerobic conditions using GENbox anaer in Generbox jars (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France). *S. thermophilus* strains containing the pG^{+}host9 vector [36] were cultivated in the presence of erythromycin (final concentration 2 μg/ml) at 30°C when plasmid self-maintenance was required and at 42°C for selection of clones with the chromosome's integrated plasmid.

Henry *et al. BMC Microbiology* 2011, **11**:223
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/223

Table 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype/phenotype/source	Origin or reference
	Streptococcus thermophilus	
LMG18311	Wild-type; isolated from yogurt.	BCCM LMG
Δrgg_{0182}	Derivative of LMG18311 carrying a 699 bp deletion in the rgg_{0182} gene	This study
LMG18311 *blp*::$P_{pep0182}$-*luxAB*	LMG18311 containing a $P_{pep0182\text{-}luxAB}$ fusion at the *blp* locus	This study
LMG18311 *blp*::$P_{shp0182}$-*luxAB*	LMG18311 containing a $P_{shp0182\text{-}luxAB}$ fusion at the *blp* locus	This study
Δrgg_{0182} *blp*::$P_{pep0182}$-*luxAB*	Δrgg_{0182} containing a $P_{pep0182\text{-}luxAB}$ fusion at the *blp* locus	This study
Δrgg_{0182} *blp*::$P_{shp0182}$-*luxAB*	Δrgg_{0182} containing a $P_{shp0182\text{-}luxAB}$ fusion at the *blp* locus	This study
	Escherichia coli	
EC101	*supE hsd-5 thi* Δ*(lac-proAB)* F′*(traD6 proAB*$^+$ *lacI*^{q} *lacZ*Δ*M15) repA*$^+$, derivative of TG1 strain	[37,38]
EC101 pG9Δrgg_{0182}	Derivative of EC101 containing pG9Δrgg_{0182}	This study
C41(DE3)	Derived from BL21(DE3) (F$^-$ *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm met* (DE3); Novagen); at least one uncharacterized mutation	[39]
C41(DE3) pET15b::rgg_{0182}	Derivative of C41(DE3) containing pET15b::rgg_{0182}	This study
	Plasmid	
pG$^+$host9	Thermosensitive plasmid replication origin from pVE6002, used for gene replacement; Ery^R	[36]
pG9Δrgg_{0182}	Derivative of pG$^+$host9 carrying a 699 bp (from nucleotide 82 to 783) deletion for rgg_{0182}	This study
pGICB004	Thermosensitive plasmid, *Em*^{r}; used for the construct of transcriptional fusions. Allow the integration of the *luxAB* genes of *Photorabdus luminescens* at the *blp* locus of the *S. thermophilus* chromosome	[9]
pGICB004::$P_{pep0182}$	Derivative of pGICB004 used to introduce a $P_{pep0182}$-*luxAB* transcriptional fusion at the *blp* locus	This study
pGICB004::$P_{shp0182}$	Derivative of pGICB004 used to introduce a $P_{shp0182}$-*luxAB* transcriptional fusion at the *blp* locus	This study
pET15b	Expression vector for N-terminal His_6-tagged fusion; Amp^R	Novagen
pET15b::rgg_{0182}	Derivative of pET15b carrying a 864 bp insert coding a Rgg_{0182} His_6-tagged protein	This study

BCCM Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, LMG Laboratory of Microbiology and Genetics, University of Gent

E. coli strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium [37] at 30 or 37°C with shaking (250 rpm). *E. coli* EC101 [38] was used as a host for recombinant plasmids derived from pG$^+$host9 [36] and *E. coli* C41(DE3) [39] for recombinant plasmids derived from pET15b (Novagen). When required, erythromycin (150 μg/ml) or ampicillin (150 μg/ml) was added.

DNA and RNA manipulations

Conventional techniques for DNA manipulation, such as preparation of chromosomal and plasmidic DNA, restriction enzymes digests, PCR experiments, transformation by electroporation and Southern blotting were performed as described [37]. Plasmids and primers used in this study are listed in Table 1 and Table 2, respectively. Oligonucleotides were purchased from Eurogentec (Liège, Belgique). Sequencing reactions were done from PCR products by the Beckman Coulter Genomics Society (Grenoble, France) using an ABI 3730XL Sanger sequencing platform.

Plasmids and strains construction

The Δrgg_{0182} mutant was constructed following the experimental procedure described by Layec *et al.* (2009) [40] using the following primers pairs: rgg_{0182}I1/rgg_{0182}I2 and rgg_{0182}II1/rgg_{0182}II2 to amplify fragments I and II, respectively. The resulting Δrgg_{0182} mutant was checked by sequencing.

The construction of pGICB004::$P_{pep0182}$ and pGICB004::$P_{shp0182}$ vectors was done as described in [9]. Briefly, the pep_{0182} and shp_{0182} promoters were amplified by PCR using the couple of oligonucleotides Pep0182up/Pep0182down and SHP0182up/SHP0182down, respectively. Following a digestion with restriction enzymes *Spe*I/*Eco*RI, both fragments were independently inserted downstream from *luxAB* in the pGICB004 plasmid previously digested with the same restriction enzymes. The pGICB004 plasmid was used since it allows the integration of transcriptional fusions to the *luxAB* reporter genes at the *blp* locus in *S. thermophilus* [9]. The final pGICB004::$P_{pep0182}$ and pGICB004::$P_{shp0182}$ plasmids

Henry *et al. BMC Microbiology* 2011, **11**:223
http://www.biomedcentral.com/1471-2180/11/223

Table 2 Primers used for PCR and qPCR

Name	Primer sequence (5'-3')
Primers for vectors construction	
Rgg_{0182}I1	CTGGAA**CTGCAG**GAGCAGC
Rgg_{0182}I2	ATAATTTGA**GAATTC**TGTACCTT
Rgg_{0182}II1	TCTCTG**GAATTC**TTTAAATTG C
Rgg_{0182}II2	CTTGTC**CTGCAG** TCTCACTCCC
Rgg_{0182}SE1	CCCCCCC**CATATG**GGAAAACAAAATGAACTG
Rgg_{0182}SE2	CCCC**GGATCC**TTAACCTACAATCGACTTAAA
Pep0182up	GAA**GAATTC**GTAAAAAGCATCAGATTTTAC
Pep0182down	AACT**ACTAGT**GCATTTTAAGTCGATTGTAGG
SHP0182up	GAA**GAATTC**AACAATTTCATATGATTTCCTCC
SHP0182down	AACT**ACTAGT**TCAGTCTCTCCTCTTTC
Primers for DNA EMSA	
Pldh-5'	ACGCTTTCACTTAATAATTC
Pldh-3'	TGGTCTAAACATCTCCTTA
Pshp-5'	GTAAATACATGTCAATAGGAC
Pshp-3'	TTTGTTTTCCCATATATGCAACC
Ppep-5'	AGCATCAGATTTTACTCCAGATG
Ppep-3'	TTGTAGGTTAATCCCGTTTATGC

Primers for gene expression analysis

Gene	Locus	Forward	Reverse
ldh	stu1280	AAGCTATCCTTGACGATGAA	AATAGCAGGTTGACCGATAA
rgg_{0182}	stu0182	GAAGTGGAGGAGTTGCCTAA	CCCAGCTCTCAATCCCAAA
hrcA	stu0118	ACACCTCTTCAAGGAACTGAT	GTCACTTCATCATCGGAGATA
dnaK	stu0120	GACATTGACGAAGTCATCCT	GCACCCATAGCAACTACTTC
dnaJ	stu0121	CGTGAAGTGACATGTAAGACA	ACCAAGTGGTGTTTGTGTATC
groES	stu0203	GAAGGTACCCGTACTCTTACTG	AACGTAATCTTCTCCGTCTTTA
groEL	stu0204	ATTGCTTATAATGCCGGTTA	AGCGTTAAATCCTGTACCAA
hsp33	stu0180	TTTAGTAGGTCCTTTCATG	CGATTTCACCAGAAATAAGC
cspA	stu0837	ATTGGTTTAACGCTGACAAAG	TAACCTTTTGACCTTCATCGT
cspB	stu0838	TATGGCAAATGGAACAGTAAA	CAAGTGATTTGAATCCATCAG
ctsR	stu0076	AGATCAGCTCAGCGAACA	AGAATACGCGAACGAATG
clpC	stu0077	ACTGGCAGATTATACCAAAGAC	CACCTACCAAGACAGGATTATT
clpP	stu0356	CTTGCTCAAGACTCGTAATAACT	AAGCCATATTCAAGTGTTTCTT
clpX	stu0581	TGGACTTATCCCTGAATTTATC	AAGACAAGAGGGTTTGATACTG
clpE	stu0602	CCGTACCAAGAACAATCCT	ACGGATAACTTGCTTGCTT
clpL	stu1614	CGTTTCGACGCAGTTATT	TTCGCTAACTGCCAAGTC

Restriction sites are indicated with bold letters: *Pst*I: CTGCAG; *Eco*RI: GAATTC; *Spe*I: ACTAGT; *Nde*I: CATATG; *Bam*HI: GGATCC

were used to transform the LMG18311 and in its derivative Δrgg_{0182} strain. The strains LMG18311 *blp*::$P_{pep0182}$-*luxAB*, LMG18311 *blp*::$P_{shp0182}$-*luxAB*, Δrgg_{182} *blp*::$P_{pep0182}$-*luxAB* and Δrgg_{182} *blp*::$P_{shp0182}$-*luxAB* were obtained by gene replacement at the *blp* locus as described in [9].

For the construction of the pET15b::rgg_{0182} plasmid necessary for the Rgg_{0182}-His_6-tagged protein overexpression, the rgg_{0182} (864 bp) gene was amplified by PCR using the primers Rgg_{0182}SE1 and Rgg_{0182}SE2 which contained *Nde*I and *Bam*HI restriction sites, respectively, with *S. thermophilus* LMG18311 chromosomal DNA as template. The amplified DNA fragment was double digested with restriction enzymes *Nde*I/*Bam*HI and fused in-frame to the 3'end His_6-tagged of pET15b vector (Novagen), generating the pET15b::rgg_{0182} plasmid. The in-frame fusion was confirmed by DNA sequencing.

Luciferase assays

To perform luciferase assays, pre-cultures were grown overnight at 30 or 42°C in CDM or LM17 medium. Pre-cultures were then diluted to an OD_{600nm} of 0.05, in 50 ml of respective appropriate medium and temperature.

A volume of 1 ml of the culture was sampled at regular intervals during the growth until the stationary phase and analyzed as follows: OD_{600nm} was measured, 10 μL of a 0.1% nonyl-aldehyde solution was added to the sample and the luminescence was measured with a Luminoskan TL (Labsystems). Results are reported in relative luminescence divided by the OD_{600nm} (AU). Three independent experiments were realized.

Overexpression, purification of Rgg_{0182}-His_6-tagged protein and Western blotting

Expression of the His_6-tagged protein was induced in *E. coli* C41(DE3) containing pET15b::rgg_{0182} for 4h at 30°C by adding Isopropyl β, D-thiogalactopyranoside (IPTG, 1mM final concentration) to the OD_{600nm} = 0.5 culture. Cells were harvested by centrifugation at 14,000 rpm, at 4°C for 30 min. The supernatant was discarded and cells were suspended in lysis buffer (50 mM phosphate sodium pH 8.0, 300 mM NaCl, and 10 mM imidazol) and stored at -20°C. The cells were disrupted on ice with a microtip of Sonifier 250 (Branson Ultrasonics). The soluble fraction including the recombinant His_6-tagged protein was collected by centrifugation at 20,000 rpm for 45 min at 4°C and loaded on an affinity chromatography column equilibrated with lysis buffer. When the UV absorbance at 280 nm had fallen to the zero baseline, the recombinant Rgg_{0182} protein was eluted by elution buffer (50 mM phosphate sodium pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol). The eluted fraction was collected and finally concentrated in Tris EDTA buffer pH 8.0. The purity of the His_6-tagged proteins was confirmed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 15% acrylamide resolving.

For Western blot experiments, proteins were size separated by SDS-PAGE 12% acrylamide resolving gel and electroblotted onto polyvinylidene difloride (PVDF) membrane (Roche Applied Science) using a semi-dry blotting system (Bio-Rad). After transfer, the PVDF membrane was blocked with 5% skim milk in Tris-buffered saline containing 0.1% tween 20 (TBS-T) for 1 h. The membrane was subsequently incubated for 1 h with penta-His antibodies (1:10,000) (Qiagen), washed three times with TBS-T and incubated for 1 h with conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (H + L)-horseradish peroxidase (1:10,000) (Bio-Rad). The membrane was washed three times with TBS-T. Finally, the antibodies-antigen complexes were visualized by using the Bio-Rad Immun-Star Western system as described by the manufacturer and were detected by chemiluminescence, using the Chemi-Doc from Bio-Rad.

DNA electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

The DNA binding of the His6-tagged Rgg_{0182} protein to the shp_{0182} and pep_{0182} promoter regions was tested by EMSA using the LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific). The promoter regions of *ldh* (P_{ldh}, 110pb), shp_{0182} ($P_{shp0182}$, 126 bp) and pep_{0182} ($P_{pep0182}$, 165 bp) were amplified by PCR using the Pldh-5'/Pldh-3', Pshp-3'/Pshp-5' and Ppep-3'/Ppep-5' primers, respectively. These were 3'-end biotin labelled with Biotin 3' End DNA Labeling Kit (Thermo Scientific) and used in EMSA according to the manufacturer's instructions. Chemiluminescent detection of biotin DNA on membranes was realised with the Chemi-Doc apparatus (Bio-Rad).

RNA extraction and quantitative RT-PCR (qPCR) experiments

RNA extractions were adapted from Kieser *et al.* (1999) [41]. RNAs were extracted from cultures grown in CDM or LM17 medium in exponential, transition, or stationary phase at 30 or 42°C. RNAs were also extracted from stationary phase cells exposed to a 30 min temperature shift from 30 to 52°C. The RNAs were treated with amplification grade DNase I (Euromedex). The quantity and quality of the RNA samples were verified by agarose gel electrophoresis and by measuring their absorbance at 260 and 280 nm (NanoDrop-1000). Reverse transcription was performed according to the manufacturer's instructions (MMLV-reverse transcriptase, Invitrogen). cDNA was generated from 1.25 μg of DNA-free RNA and used for qPCR analysis of transcription of rgg_{0182} gene and its potential target genes transcript levels. Gene transcripts quantification was done using the CFX96 manager software (Bio-Rad) with the following program: 1 cycle at 98°C for 3 min and 40 cycles at 95°C for 10 s and at 58°C for 45 s. The amplification reactions were carried out with SYBR Green Supermix (Bio-Rad). Melting curve analysis was performed with 0.5°C increments every 10 s from 55 to 95°C to check that the cDNA amplification did not lead to secondary products. The primers used for qPCR are listed in Table 2. The efficiency of all primers pairs was checked in qPCR using serial dilutions of cDNA, and ranged from 90 to 100%. The level of gene transcript was calculated with *ldh* gene as the internal control gene for normalization [23].

Physiological characterization of the Δrgg_{0182} mutant

Stationary phase cells were harvested from cultures grown in CDM at 30°C by centrifugation at 4,500 rpm for 10 min. Cells were washed twice and resuspended in 10 mM sterile phosphate buffer, pH 7.0 with a final OD_{600nm} of 1.0. Then, for heat stress, cells were treated by incubation at 52°C during 15, 30, 45 and 60 min (heat stress condition) or not (control condition). Cultures were then diluted to appropriate concentrations, spread on LM17 agar plates and incubated overnight at

42°C under anaerobic conditions. A percentage of survival was calculated as $N/N_0 \times 100$ where N_0 is the CFU number of the control condition and N the CFU number after heat stress condition. Three independent experiments done in triplicate were realized.

Statistical analysis

Data are expressed as mean +/- standard deviation (SD). Statistical analysis was performed with Student's t test. A p value < 0.05 was considered statistically different.

Nucleotide sequence accession number

The DNA sequence reported in this paper has been deposited in GenBank under accession number JF699754.

Acknowledgements

This study was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie (MENRT). We thank N. Rouhier for his technical advices and his technical supports. We thank S. Payot-Lacroix and M. Genay-Bernard for critical reading of the manuscript.

Author details

[1]INRA, UMR1128 Génétique et Microbiologie, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. [2]Université de Lorraine, UMR1128 Génétique et Microbiologie, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. [3]INRA, UMR1319 MICALIS, Equipe Peptides et Communication Bactérienne, F-78352 Jouy en Josas, France.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: RH EB BD NL. Performed the experiments: RH EB RG SB BF. Analyzed the data: RH EB RG BF NL. Wrote the paper: RH EB NL. All authors read and approved the final manuscript.

Received: 4 July 2011 Accepted: 7 October 2011
Published: 7 October 2011

References

1. Kosikoski FV, Mistry VV: **Volume 1: Origins and Principles.** 1997, in Cheese and Fermented Milk Foods, r.e. Westport, Editor..
2. Wouters JA, Rombouts FM, de Vos WM, Kuipers OP, Abee T: **Cold shock proteins and low-temperature response of *Streptococcus thermophilus* CNRZ302.** *Appl Environ Microbiol* 1999, **65(10)**:4436-42.
3. Perrin C, Guimont C, Bracquart P, Gaillard JL: **Expression of a new cold shock protein of 21.5 kDa and of the major cold shock protein by *Streptococcus thermophilus* after cold shock.** *Curr Microbiol* 1999, **39(6)**:342-0347.
4. Varcamonti M, Arsenijevic S, Martirani L, Fusco D, Naclerio G, De Felice M: **Expression of the heat shock gene *clpL* of *Streptococcus thermophilus* is induced by both heat and cold shock.** *Microb Cell Fact* 2006, **5**:6.
5. Martirani L, Raniello R, Naclerio G, Ricca E, De Felice M: **Identification of the DNA-binding protein, HrcA, of Streptococcus thermophilus.** *FEMS Microbiol Lett* 2001, **198(2)**:177-82.
6. Derre I, Rapoport G, Msadek T: **CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria.** *Mol Microbiol* 1999, **31(1)**:117-31.
7. Kilstrup M, Jacobsen S, Hammer K, Vogensen FK: **Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*.** *Appl Environ Microbiol* 1997, **63(5)**:1826-37.
8. Zotta T, Asterinou K, Rossano R, Ricciardi A, Varcamonti M, Parente E: **Effect of inactivation of stress response regulators on the growth and survival of *Streptococcus thermophilus* Sfi39.** *Int J Food Microbiol* 2009, **129(3)**:211-20.
9. Fleuchot B, Gitton C, Guillot A, Vidic J, Nicolas P, Besset C, Fontaine L, Hols P, Leblond-Bourget N, Monnet V, Gardan R: **Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in *streptococci*.** *Mol Microbiol* 2011, **80(4)**:1102-19.
10. Neely MN, Lyon WR, Runft DL, Caparon M: **Role of RopB in growth phase expression of the SpeB cysteine protease of *Streptococcus pyogenes*.** *J Bacteriol* 2003, **185(17)**:5166-74.
11. Vickerman MM, Minick PE: **Genetic analysis of the *rgg-gtfG* junctional region and its role in *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase activity.** *Infect Immun* 2002, **70(4)**:1703-14.
12. Samen UM, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ: **The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes.** *Infect Immun* 2006, **74(10)**:5625-35.
13. Chaussee MS, Sylva GL, Sturdevant DE, Smoot LM, Graham MR, Watson RO, Musser JM: **Rgg influences the expression of multiple regulatory loci to coregulate virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*.** *Infect Immun* 2002, **70(2)**:762-70.
14. Loughman JA, Caparon MG: **Contribution of invariant residues to the function of Rgg family transcription regulators.** *J Bacteriol* 2007, **189(2)**:650-5.
15. Sanders JW, Leenhouts K, Burghoorn J, Brands JR, Venema G, Kok J: **A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation.** *Mol Microbiol* 1998, **27(2)**:299-310.
16. Sulavik MC, Tardif G, Clewell DB: **Identification of a gene, *rgg*, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of *Streptococcus gordonii* Challis.** *J Bacteriol* 1992, **174(11)**:3577-86.
17. Chaussee MS, Watson RO, Smoot JC, Musser JM: **Identification of Rgg-regulated exoproteins of *Streptococcus pyogenes*.** *Infect Immun* 2001, **69(2)**:822-31.
18. Rawlinson EL, Nes IF, Skaugen M: **LasX, a transcriptional regulator of the lactocin S biosynthetic genes in *Lactobacillus sakei* L45, acts both as an activator and a repressor.** *Biochimie* 2002, **84(5-6)**:559-67.
19. Chaussee MS, Ajdic D, Ferretti JJ: **The *rgg* gene of *Streptococcus pyogenes* NZ131 positively influences extracellular SPE B production.** *Infect Immun* 1999, **67(4)**:1715-22.
20. Lyon WR, Gibson CM, Caparon MG: **A role for trigger factor and an *rgg*-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes*.** *Embo J* 1998, **17(21)**:6263-75.
21. Zheng F, Ji H, Cao M, Wang C, Feng Y, Li M, Pan X, Wang J, Qin Y, Hu F, Tang J: **Contribution of the Rgg transcription regulator to metabolism and virulence of Streptococcus suis serotype 2.** *Infect Immun* 2010, **79(13)**:1319-28.
22. Chaussee MS, Somerville GA, Reitzer L, Musser JM: **Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in *Streptococcus pyogenes*.** *J Bacteriol* 2003, **185(20)**:6016-24.
23. Fernandez A, Thibessard A, Borges F, Gintz B, Decaris B, Leblond-Bourget N: **Characterization of oxidative stress-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368.** *Arch Microbiol* 2004, **182(5)**:364-72.
24. Bortoni ME, Terra VS, Hinds J, Andrew PW, Yesilkaya H: **The pneumococcal response to oxidative stress includes a role for Rgg.** *Microbiology* 2009, **155(Pt 12)**:4123-34.
25. Chaussee MA, Callegari EA, Chaussee MS: **Rgg regulates growth phase-dependent expression of proteins associated with secondary metabolism and stress in *Streptococcus pyogenes*.** *J Bacteriol* 2004, **186(21)**:7091-9.
26. Bolotin A, Quinquis B, Renault P, Sorokin A, Ehrlich SD, Kulakauskas S, Lapidus A, Goltsman E, Mazur M, Pusch GD, Fonstein M, Overbeek R, Kyprides N, Purnelle B, Prozzi D, Ngui K, Masuy D, Hancy F, Burteau S, Boutry M, Delcour J, Goffeau A, Hols P: **Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*.** *Nat Biotechnol* 2004, **22(12)**:1554-8.
27. Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh Y, Benson A, Baldwin K, Lee JH, Diaz-Muniz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote R, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M,

Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D: **Comparative genomics of the lactic acid bacteria.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103(42)**:15611-6.
28. Sun Z, Chen X, Wang J, Zhao W, Shao Y, Wu L, Zhou Z, Sun T, Wang L, Meng H, Zhang H, Chen W: **Complete Genome Sequence of *Streptococcus thermophilus* Strain ND03.** *J Bacteriol* 2011, **193(3)**:793-4.
29. Ibrahim M, Nicolas P, Bessieres P, Bolotin A, Monnet V, Gardan R: **A genome-wide survey of short coding sequences in *streptococci*.** *Microbiology* 2007, **153(Pt 11)**:3631-44.
30. Zuber U, Schumann W: **CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon dnaK of *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 1994, **176(5)**:1359-63.
31. Ibrahim M, Guillot A, Wessner F, Algaron F, Besset C, Courtin P, Gardan R, Monnet V: **Control of the transcription of a short gene encoding a cyclic peptide in *Streptococcus thermophilus*: a new quorum-sensing system?** *J Bacteriol* 2007, **189(24)**:8844-54.
32. Moliere N, Turgay K: **Chaperone-protease systems in regulation and protein quality control in Bacillus subtilis.** *Res Microbiol* 2009, **160(9)**:637-44.
33. Chastanet A, Prudhomme M, Claverys JP, Msadek T: **Regulation of *Streptococcus pneumoniae clp* genes and their role in competence development and stress survival.** *J Bacteriol* 2001, **183(24)**:7295-307.
34. Terzaghi BE, Sandine WE: **Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages.** *Appl Microbiol* 1975, **29(6)**:807-13.
35. Letort C, Juillard V: **Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*.** *J Appl Microbiol* 2001, **91(6)**:1023-9.
36. Maguin E, Duwat P, Hege T, Ehrlich D, Gruss A: **New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria.** *J Bacteriol* 1992, **174(17)**:5633-8.
37. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: **Molecular cloning: a laboratory manual.** 1989.
38. Leenhouts K: **Integration strategies and vectors.** *Dev Biol Stand* 1995, **85**:523-30.
39. Miroux B, Walker JE: **Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels.** *J Mol Biol* 1996, **260(3)**:289-98.
40. Layec S, Gerard J, Legue V, Chapot-Chartier MP, Courtin P, Borges F, Decaris B, Leblond-Bourget N: **The CHAP domain of Cse functions as an endopeptidase that acts at mature septa to promote *Streptococcus thermophilus* cell separation.** *Mol Microbiol* 2009, **71(5)**:1205-17.
41. Kieser T, Bibb M, Buttner M, Chater K, Hopwood D: **Practical *Streptomyces* Genetics.**Edited by: John Innes Foundation 1999.

doi:10.1186/1471-2180-11-223
Cite this article as: Henry *et al.*: The rgg_{0182} gene encodes a transcriptional regulator required for the full *Streptococcus thermophilus* LMG18311 thermal adaptation. *BMC Microbiology* 2011 **11**:223.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Annexe 2

Langmuir

Article

pubs.acs.org/Langmuir

Thermo-Regulated Adhesion of the *Streptococcus thermophilus* Δ*rgg0182* Strain

Grégory Francius,*[,†,‡,#] Romain Henry,[§,∥,#] Jérôme F. L. Duval,[⊥,@] Emmanuelle Bruneau,[§,∥] Jenny Merlin,[⊥,@] Ahmad Fahs,[†,‡] and Nathalie Leblond-Bourget*[,§,∥]

[†]Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, LCPME, UMR 7564, Villers-lès-Nancy F-54600, France

[‡]CNRS, LCPME, UMR 7564, Villers-lès-Nancy F-54600, France

[§]Université de Lorraine, UMR1128 DynAMic, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes BP70239, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

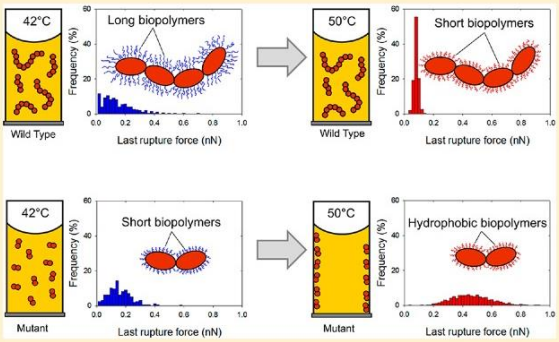
[∥]INRA, UMR1128 DynAMic, Faculté des Sciences et Technologies, Bd des Aiguillettes BP70239, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

[⊥]Université de Lorraine, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux, LIEC, UMR 7360 Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France

[@]CNRS, LIEC, UMR 7360, Vandoeuvre-lès-Nancy F-54501, France

Supporting Information

ABSTRACT: The physicochemical determinants governing the temperature-dependent adhesion of *Streptococcus thermophilus* to abiotic surfaces are identified under physiological condition for cells either lacking or not the Rgg_{0182} transcriptional regulator involved in their thermal adaptation. For that purpose, the wild type LMG18311 strain and Δrgg_{0182} mutant were imaged using highly resolved atomic force microscopy (AFM) at various cell growth temperatures (42 to 55 °C). The corresponding hydrophobic/hydrophilic balance of the cells was quantitatively addressed via the measurement by chemical force microcopy of their adhesion to a reference hydrophobic surface. Analysis of force−separation distance curves further allowed us to discriminate cell surfaces according to the presence or absence of biopolymers. These results were interpreted in relation to the measured adhesion of the Δrgg_{0182} mutant onto the hydrophobic wall of microwells in the temperature range from 46 to 52 °C. It is evidenced that the viscoelastic Δrgg_{0182} cell envelop behaves as a thermo-responsive film whose hydrophobicity increases with increasing temperature, thereby favoring cell attachment to hydrophobic surfaces. Regardless cell growth temperature, wild-type cells do not attach to hydrophobic surfaces and the presence of the Rgg_{0182} transcriptional regulator is associated with the synthesis of hydrophilic cell surface biopolymers. Throughout, the impact of electrostatics on bioadhesion is ruled out upon examination of electrohydrodynamic cell properties at 50 °C.



INTRODUCTION

The bacterial genus *Streptococcus* includes several species that are pathogenic for human and animals and the nonpathogenic food-grade species: *Streptococcus thermophilus*. *S. thermophilus* is of major importance in food industry because it is massively used for the manufacture of dairy products.[1] Due to its ability to ferment lactose into lactic acid, *S. thermophilus* is indeed employed as a thermophilic cultures starter for the processing of milk into yogurt and cheese, and it is generally present in the natural whey culture starter used for cooked cheese and "pasta filata" cheese production.[2,3] *S. thermophilus* is also recognized as a probiotic microorganism and is therefore used to promote health.[4−7]

However, a downside to the use of *S. thermophilus* cells in dairy plants is the ability of this species to adhere preferentially onto a stainless steel surface and form biofilms at the surface of industrial facilities,[8,9] which ultimately results in the contamination of milk and may lead to poor-quality dairy products.[10,11] In dairy plants, biofilms of *S. thermophilus* are difficult to remove, mainly because of the endogenous thermo-tolerance of the cells, recalling that *S. thermophilus* grows at temperatures up to 52 °C and tolerates pasteurization (72 °C, 15 s).[12] In addition, the presence of milk significantly increases the resistance of *S. thermophilus* to heat.[13]

The mechanisms underlying the attachment of *S. thermophilus* to abiotic surfaces have been so far poorly studied and, more

Received: January 16, 2013
Revised: March 21, 2013
Published: March 26, 2013

ACS Publications © 2013 American Chemical Society

specifically, the impact of growth temperature on cell adhesion properties has not been addressed. Despite this lack of basic knowledge, there is strong evidence that temperature is a key factor affecting bacterial attachment.[14,15] Indeed, a temperature significantly different from that corresponding to optimal growth conditions may affect cell survival and/or growth, and in turn impact bacterial adhesion. In addition, changes in temperature are important environmental stimuli known to affect the expression of numerous genes, some of them encoding proteins that may directly or indirectly be involved in bacterial adhesion processes. For the sake of example, a shift of the growth temperature from 42 to 50 °C modifies the expression of about 10% of *S. thermophilus* genes, several of them encoding transcriptional regulators[16] that may impact the expression of proteins controlling the adhesion of *S. thermophilus*.

In a previous study, we demonstrate that the rgg_{0182} gene encodes a transcriptional regulator that is required for the full thermal adaptation of *S. thermophilus* LMG18311.[17] In this work, we proceed for the first time to a molecular analysis of the physicochemical properties of *S. thermophilus* LMG18311 lacking or not the Rgg_{0182} transcriptional regulator and we further relate these properties to cell adhesion in order to conclude on the role of the Rgg_{0182} regulator in the cell attachment mechanism. For that purpose, using highly resolved atomic force spectroscopy (AFM), we quantify as a function of growth temperature (range 42 to 55 °C) the adhesion force between hydrophobic 1-dodecanethiol model surfaces of controlled roughness and AFM bioprobes consisting of the *S. thermophilus* LMG18311 strain isolated from a commercial yogurt,[18] or its derivative Δrgg_{0182}-deleted mutant.[17] The choice for using hydrophobic reference surfaces is motivated by the fact that most of industrial packaging consist of plastics such as polyethylene or polystyrene, well-known for their hydrophobic surface properties. The quantitative analysis of the force–separation distance curves informs not only on the impact of the Rgg_{0182} transcriptional regulator on the temperature-dependent magnitude of the hydrophobic interaction forces that lead to cell adhesion onto surfaces of the well/microplate but also on the presence or not of cell wall biopolymers that possibly mediate cell attachment to surfaces. This analysis is complemented by a detailed AFM imaging of the different cell-chaining phenotypes observed with varying temperature and with either deleting or not deleting the rgg_{0182} gene. Overall, it is shown that the absence of the Rgg_{0182} transcriptional regulator promotes cell adhesion in the temperature range from 46 to 52 °C.

■ MATERIALS AND METHODS

Bacterial Cultures. *Streptococcus thermophilus.* LMG18311 and its Δrgg_{0182}-derivative mutant[17] were grown in a milk medium (for storage) or in M17 medium[19] with lactose (10 g L^{-1}) (hereafter denoted as LM17). Strains culture was carried out in microplates suitable for a Bioscreen C Microbiological Growth Analyzer (Thermo Fisher Scientific, Saint-Herblain, France). The microplates used in this work consist of a crystal-grade uncharged polystyrene. The Bioscreen 100-well microplates were loaded with 350 μL of an exponential *S. thermophilus* culture grown in LM17 media and with 50 μL of sterile oil. The inoculation rate was normalized at OD_{600nm} = 0.10 ± 0.02. With the use of the Bioscreen C, the growth of three independent cultures of LMG18311 and Δrgg_{0182} strains, loaded in triplicate, was evaluated by OD_{600nm} measurements every 15 min over a 20 h period. Bacterial growths were carried out at a temperature from 40 to 55 °C (Figure S1 of the Supporting Information). Temperatures lower or higher than 42 °C were selected to bracket the environmental thermal stresses at which *S. thermophilus* was thought to survive in food-processing environments.

Chaining Phenotypes. *S. thermophilus.* Chaining phenotypes were investigated using a Nikon OPTIPHOT microscope mounted with "Ph" phase-contrast equipment. The cells composing the chains were observed at a magnification of 10^3. The number of cells per chain was then evaluated as a function of growth temperature for both LMG18311 and Δrgg_{0182} strains, and the repeatability of the results were addressed from measurements performed on three independent cultures in LM17.

AFM Bioprobes Preparation and Fluorescence Staining. AFM-tips (MLCT-AUNM, Bruker Nano AXS, Palaiseau, France) were washed 3 times with chloroform for 5 min and subsequently dried with nitrogen. Tips were then placed in a UV–ozone cleaner for 30 min and further rinsed with ethanol and finally dried with nitrogen. The so-prepared tips were immersed in 0.2% Polyethyleneimine (PEI, polycationic polymer) solution for 2 h, extensively rinsed with Milli-Q water, dried with nitrogen, and stored in a sterile microplate well. Then, 200 μL of bacterial suspension were directly deposited onto the PEI-coated AFM tips for 2 h, and the bacterial probes were then rinsed 3 times with Milli-Q water. Following this step, the bacterial probe was immediately transferred into the AFM tip holder for force measurements.

We observed that bacteria detached from PEI-coated surfaces, which made it impossible to record force measurements between immobilized bacteria on PEI surfaces and CH_3-coated AFM tip. This failure probably results from the overheating of the sample that is fixed on the heating resistance system within the AFM closed fluid cell. The use of bioprobes circumvents this difficulty. Adhesion force measurements were thus performed between bioprobes and a 1-dodecanethiol reference substrate in a liquid cell with addition of 2 mL of PBS solution at a pH of ~7.4 and temperatures of 42 and 50 °C.

To verify the presence of bacteria adhered all over the AFM tips, cells were stained with Sybr Green II (Invitrogen SARL, France). The bioprobes were immersed into a solution of 1 μL of the commercial Sybr Green II diluted in 2 mL of the PBS buffer for 20 min. The bioprobes were rinsed with non-pyrogenic sterile water to eliminate Sybr Green II excess and stored in PBS buffer. The AFM bioprobe was inserted into the optical head of the MFP3D-Bio AFM and visualized in PBS medium with the inverted Olympus IX 71 optical microscope (Lordil, France) at a magnification of 20× and 60× by epifluorescence.

Additional comments related to the respective preparation of the AFM probes covered by LMG18311 or Δrgg_{0182} strains are required. Both wild-type and mutant bacteria could be immobilized on the PEI-coated tip, despite their different surface properties as extensively discussed in Results and Discussion (presence or absence of long biopolymers). However, we did observe a better immobilization of the mutant cells as compared to that of the wild-type cells, since a longer contact time between AFM tip and wild-type cells is required to obtain a coverage degree similar to that reached with mutant cells. This variation in cell adhesion behavior on

the PEI-coated tip might originate from different factors that are briefly discussed in the footnote following Conclusions.

Electrophoretic Mobility Measurements. Measurements of the electrophoretic mobility (EPM) of LMG18311 and Δrgg_{0182} strains were performed in a quartz suprasil cell (Zetaphoremeter IV, CAD Instrumentations, Les essarts le Roi, France) and were determined from the reflection by bacteria of a laser beam tracked with a charge-coupled device camera. With the use of an image analysis software, recorded images were processed in real time to calculate the electrophoretic mobilities from the displacement (migration motion) of bacteria subjected to a constant direct-current electric field (800 V/m). Different cycles were recorded to carry out 100 measurements of bacterial mobility for a given KNO_3 electrolyte concentration in the range from 0.5 to 100 mM. Additionally, the reproducibility of the experiments was addressed by repeating the electrokinetic measurements with at least three different fresh bacterial dispersions (Figure S2 of the Supporting Information).

Preparation of Hydrophobic Reference Surfaces for Cell Hydrophobicity Measurement. By means of a sputter coater (EMITECH, K575 Turbo, United Kingdom), glass substrates ($10 \times 20 \times 1$ mm^3) were coated with a 10 to 20 nm thick chromium layer and a topmost 40 to 60 nm gold layer. Gold-coated glass slices were cleaned with chloroform for 10 min, dried with nitrogen, and then placed into a UV−ozone cleaner (PSD UV4, Novascan Technologies Inc. Ames, IA) for 30 min. Gold-coated substrates were then immersed into a 1 mM 1-dodecanethiol solution ($HS-C_{11}H_{22}-CH_3$) for 14 h, in order to obtain a hydrophobic reference surface, as detailed by Alsteens et al.[20] Gold-coated surfaces were extensively rinsed 10 min twice with ethanol and finally dried with nitrogen. Adhesion force between the 1-dodecanethiol reference surface and bacteria-coated AFM tip was measured by recording at least 5 force−volume images (FVI) consisting of a 32-by-32 grid of force−distance curves. The reader is referred to previous work[21,22] for further details on chemical force spectroscopy in the force−volume mode.

Atomic Force Microscopy (AFM) imaging and Chemical Force Microscopy Measurements. AFM is a tool of choice for achieving with a nanometer resolution a quantitative analysis of biological surface properties,[23−26] including bacterial adhesion determinants.[27−29] In particular, it is possible to measure via AFM force analysis on bacteria the contributions of van der Waals and electrostatic forces, hydrogen bonding, and steric interactions, which are not all accounted for in standard DVLO theory.[30] Chemical Force Spectroscopy (CFM) is a derivative of AFM and may provide information on molecular and dynamic processes,[31,32] surface reactivity,[33−35] and interactions between single molecules.[36−38] It also makes possible the probing of mechanical properties of living bacterial surfaces in their physiological environments.[39,40]

In this study, AFM images of bacterial strains and measurements of force adhesion between abiotic surfaces and the bacteria-coated AFM tip were recorded using a commercial AFM (MFP3D-BIO, Asylum Research Technology, Atomic Force F&E GmbH, Mannheim, Germany). Silicon nitride AFM tips (MLCT-AUNM, Bruker Nano AXS, Palaiseau, France) with spring constants of about 9−12 pN/nm were used for imaging. Prior to each experiment, the geometry of the tip was systematically controlled using a commercial grid for three-dimensional (3D) visualization (TGT1, NT-MTD Compagny, Moscow, Russia). AFM images were performed in air and at room temperature for bacterial suspension, previously immobilized onto PEI-coated glass surfaces. For that purpose, 2 mL of bacterial cells were deposited onto the substrate for 20 min and then slightly dehydrated with nitrogen. Bacteria morphology analyses were performed on 10 cells for each growth temperature tested (42 and 50 °C), using MFP3D (Atomic Force F&E GmbH). In that respect, each AFM height images was flattened using a Magic Mask filter before evaluation of surface roughness over a 400×400 nm^2 area taken on the bacterial surface. A second-order filter was applied on the selected area to minimize the impact of bacterial curvature (from about 0.75 to 1.00 μm) on roughness data (Table 1).

Table 1. Roughness of Bacterial Surfaces Measured at 42 and 50 °C[a]

strain/temperature	average rms (nm)	analyzed area (μm^2)
wild type/42 °C	10.26 ± 1.41	0.185 ± 0.008
mutant/42 °C	8.73 ± 1.42	0.180 ± 0.016
wild type/50 °C	11.20 ± 1.78	0.200 ± 0.011
mutant/50 °C	2.60 ± 0.37	0.190 ± 0.010

[a]The rms of roughness was calculated from AFM height images after two flattening filters applied on a bacterial surface area of 400×400 nm^2 (in order to remove bacterial curvature effect) and was averaged from the analysis of 10 cells.

CFM measurements were performed in PBS buffer (pH 7.4) at 42 and 50 °C upon monitoring the adhesion force between a 1-dodecanethiol hydrophobic reference surface and the bioprobes obtained as detailed above (measurement done upon retraction of the tip from the surface, Figure S3 of the Supporting Information). For all temperature conditions examined here, the mean adhesion force was extracted from the analysis of 5 force−volume images, each composed of 1024 points/pixels on the abiotic surface, thus corresponding to 1024 force−separation−distance curves. The hydrophobicity of the well-microplate surfaces was further addressed upon measuring their interaction force with a hydrophobic 1-dodecanethiol-coated AFM tip prepared according to the procedure detailed by Alsteens et al.[20]

As a test for checking the sensitivity of our measurements to the hydrophobicity of the substrates, the adhesion force between hydrophobic modified tips and either hydrophobic (CH_3 surface, Figure S4 of the Supporting Information) or nonhydrophobic (PEI, Figure S5 of the Supporting Information) surfaces was performed at 42 and 50 °C. The adhesion forces with PEI are 1.11 ± 0.12 nN and 1.34 ± 0.08 nN for 42 and 50 °C, respectively, while that on CH_3-coated surfaces increases from 5.91 ± 0.36 nN to 6.97 ± 0.37 nN, with increasing temperature from 42 to 50 °C.

In order to address the reproducibility of our results, AFM force measurements were carried out 3 times at 42 and 50 °C, with different cell-coated tips and different CH_3 model surfaces. Each of these AFM experiments was performed using fresh bacterial suspensions grown at the desired (and fixed) temperature of 42 or 50 °C.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Temperature-Dependent Adhesion of Δrgg_{0182} Cells to the Side Walls of Microwells. To determine the impact of temperature on the growth of the wild-type LMG18311 and Δrgg_{0182} cells, both strains were inoculated in the LM17 medium and their growth as a function of temperature (range

42 to 55 °C) and time was monitored using a Bioscreen C. As expected for *S. thermophilus* strains,[41] the optimal growth rate of the wild-type and its derivative Δrgg_{0182} mutant was obtained at 42 °C and remains constant up to 52 °C. Whatever the temperature, both strains showed similar growth rates (see a typical example in Figure 1a for 50 °C cell growth temperature

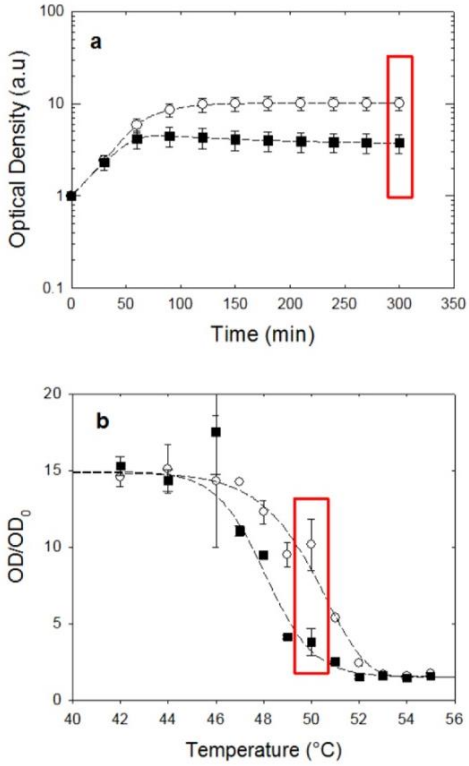


Figure 1. Dependence of wild-type and mutant growths on time and temperature. (a) Evolution of the optical density (OD) vs time at 50 °C for the wild-type strain (white circle) and the Δrgg_{0182} mutant strain (black square). (b) Dependence of normalized OD on growth temperature for bacterial cells cultivated for 300 min. In this graph, OD_i pertains to the optical density value of either wild-type (white circle) or mutant (black square) strains grown for 300 min at temperature *i*. The OD_i were evaluated from averaging data obtained from three distinct cell cultures obtained at temperature *i* and t = 300 min. OD_0 corresponds to the corresponding initial OD of each culture done in triplicate. All ODs were measured using a Bioscreen C spectrophotometer.

where both strains exhibit a doubling time of 25 ± 3 min). However, differences in OD_{max} were observed between the wild-type and the mutant strains when the cells were grown at temperatures higher than 46 °C. To illustrate this point, from the growth curves collected for each strain at a fixed temperature, optical densities were normalized by the initial OD_{600} and were then plotted versus growth temperature. Results were depicted in Figure 1b for the stationary phase of growth (t = 300 min) and in Figure S1 of the Supporting Information for the early stationary phase (t = 90 min). For cells grown at a temperature in the range from 47 to 52 °C, the normalized OD_{600} values for the mutant were significantly lower than those for the wild-type strain. The temperature of 50 °C corresponded to that where the difference between the wild-type and Δrgg_{0182} strains was the most significant. The drop of the mutants' normalized OD_{600} suggests that the number of mutant cells in the planktonic phase is less significant than that of wild-type. A careful inspection of the bacterial suspensions in the well microplates revealed that mutant cells grown within the temperature range from 47 to 52 °C did not remain suspended in the liquid culture medium but instead were significantly deposited onto the side walls of the wells (Figure 2). In contrast, wild-type cells grew as a

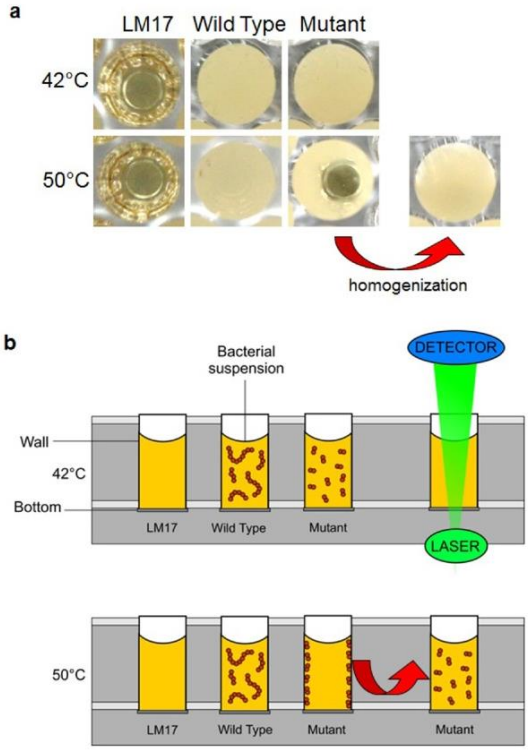


Figure 2. Scheme of microplate device and photographs of LMG18311 (WT) and Δrgg_{0182} mutant cells (MUT) grown in the microwells. (a) Cells were inoculated in LM17 medium and incubated at 42 and 50 °C in a Bioscreen C spectrophotometer. The photographs were taken below the microtiterplates. (b) Scheme of the microtiterplates and operating principle of the Bioscreen C photometer. The red arrow (in a and b) shows the materialization of the homogenization step.

homogeneous planktonic culture irrespective of the growth temperature, thereby explaining qualitatively the different temperature-dependent growth data of Figure 1b. The turbidity of the stationary phase cultures of both strains, grown at 50 °C for 300 min, was measured before and after dispersion (or homogenization) of the cells in the microwells. After homogenization, identical OD_{600} values were obtained for LMG18311 and Δrgg_{0182}, thus confirming that the volume densities of the cells were comparable for both strains. Altogether, these results suggest that, unlike wild-type strains, mutant cells adhere onto the side walls of the wells of microplates in a temperature-dependent manner. To better understand the different adhesion behavior of the wild-type and Δrgg_{0182} mutant strains, we investigated their physicochemical cell surface properties (electrostatic, hydrophobic, and structural features) as a function of temperature via AFM image analyses and adhesion CFM measurements.

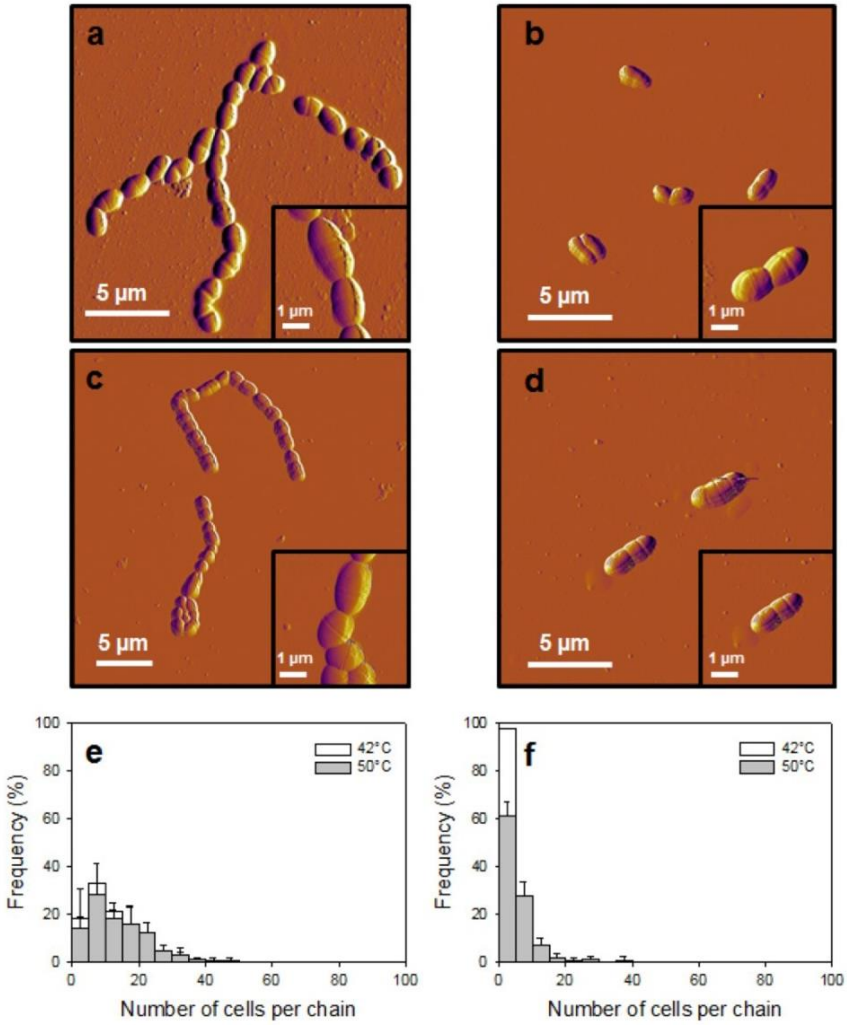


Figure 3. Imaging of *S. thermophilus* and statistic distribution of cells per chain. AFM deflection images recorded in air for the (a and c) wild-type and (b and d) mutant cells grown at (a and b) 42 °C and (c and d) 50 °C. Corresponding distribution of the number of *S. thermophilus* cells per chain at 42 °C (white bars) and 50 °C (gray bars). A total of 1000 cells were counted from three independent cultures of (e) wild-type and (f) mutant, grown in LM17.

Analyses of *S. thermophilus* wild-type and mutant cell morphologies. To gain insight into the *S. thermophilus* LMG18311 surface morphology, live bacterial cells grown at 42 and 50 °C were electrostatically immobilized onto a PEI-coated borosilicate substrate and imaged in their native state by AFM (Figure 3). The AFM images of Figure 3 clearly showed that wild-type LMG18311 cells grown at 42 or 50 °C exhibited a 2 to 2.5 μm long ovoid shape and were organized in chains (Figure 3, panels a, c, and e). Instead, those of the mutant were 1 to 1.5 μm long and formed diplococci at both temperatures (Figure 3, panels b, d, and f). This is consistent with literature reporting that a Δrgg mutant from *Streptococcus suis* displays an abnormal chain length and peculiar cell morphology.[42] The data presented above suggested that Rgg_{0182} may control (directly or indirectly) the expression of genes which play a role in the cell division process. A slight increase of mutant chain length was observed with temperature as almost 100% of the bacterial chains at 42 °C consisted of 2 cells, whereas 40% of the Δrgg_{0182} chains at 50 °C contained more than 2 cells (Figure 3f). When grown at 42 °C (Table 1 and Figure 3, panels a and b), no significant difference in surface roughness [expressed as root-mean-square (rms)] was observed between the wild-type and the mutant strains. However, while the average surface roughness of wild-type strains grown at 50 °C remain unchanged as compared to that of cells grown at 42 °C, the rms of mutant strains decrease by a factor of ~3 to 4 when increasing the temperature from 42 to 50 °C (Table 1 and Figure 3, panels b and d).

Electrokinetic and Hydrophobic Properties of the Wild-Type and Mutant Cells. Because the growth of the bacteria is systematically conducted under physiological conditions, it is expected that the electrostatic interactions between bacteria and surfaces are significantly screened to play any role in the overall adhesion processes. In order to definitely rule out electrostatics as a key factor for explaining the different adhesion behavior of LMG18311 and Δrgg_{0182} mutant cells at 50 °C as displayed in Figure 2, we performed electrophoretic mobility measurements for the two strains harvested after growth in LM17 at 50 °C for 300 min and diluted in 1 mM to 100 mM KNO_3 electrolyte solution (Figure S2 of the

Supporting Information). For both wild-type and mutant cells, two bacterial subpopulations could be distinguished according to their electrokinetic properties, thereby revealing that both mutant and wild-type cells may be categorized according to two subpopulations that differ in cell surface properties.[43] In view of this result, it is a possibility that the (cationic) PEI-coated AFM tip used for the production of bioprobes could select the cell subpopulations with the largest charge in magnitude. However, the subpopulations of both strains exhibit identical electrophoretic mobility as a function of ionic strength, which is clearly demonstrated by Figure S2 of the Supporting Information. We therefore think that our comparative AFM analysis of WT and mutant cell surface hydrophobicity properties, as described below, is not impaired by the existence of the aforementioned subpopulations. In addition, the fact that the respective subpopulations of LMG18311 and Δrgg_{0182} mutant cells do present identical electrokinetic features strongly supports the idea that differences in electrostatic forces experienced by mutant and wild-type cells cannot be argued for elucidating the different adhesion capacity of these cells at 50 °C.

To further identify the physicochemical factors determining the respective adhesion properties of mutant and wild-type cells, we performed force adhesion measurements in saline PBS buffer at 42 and 50 °C between bacterial cells grafted onto AFM probes (bioprobes) and a hydrophobic 1-dodecanethiol reference surface, as schemed in Figure 4a. Results were reported in Figure 4 (panels b and c) for wild-type strain and mutant cells, respectively. Obviously, the typical dependence of the measured force on separation distance was different for LMG18311 and Δrgg_{0182} mutant cells at fixed temperature and changes in the force−separation distance curve could also be observed for a given bacterial strain upon increase of temperature. As far as the wild-type strain was concerned, the retraction force−distance curves displayed multiple rupture events that typically correspond to molecular stretching or uncoiling of biomacromolecules located at the cell wall surface.[22] On the contrary, the retraction force−distance curves recorded for the Δrgg_{0182} mutant strain exhibited a single rupture event whose signature is characteristic of nonspecific interaction, more exactly to hydrophobic adhesion onto the 1-dodecanethiol reference surface. In line with the study by Lee et al.,[44] the linear dependence of the force on separation distance was here qualitatively similar to that obtained for nonspecific adhesive forces measured upon retraction of AFM tips with controlled surface chemistry from model surfaces of different hydrophilic/hydrophic balance. To ensure the validity of our results, control experiments were performed by measuring adhesion forces between (i) a CH_3-coated AFM tip and a PEI-coated glass slide at 42 and 50 °C (Figures S3 and S5 of the Supporting Information) and (ii) a PEI-coated AFM tip and CH_3-coated surface at 42 and 50 °C (Figures S3 and S6 of the Supporting Information). In both situations, we systematically obtained a linear dependence of the force versus separation distance upon retraction of the tip from the surface. The resulting pulling force ranges from 0.5 to 1.5 nN (Figures S5 and S6 of the Supporting Information), and it is attributed to the hydrophobic interaction taking place between the CH_2 and the NH_2 groups from the PEI and the CH_3 groups located either on the AFM tip or on the model surface. These control experiments evidence that, for example, the molecular stretching observed when measuring force interaction between wild-type cells glued on the tip via PEI and model hydrophobic surface (Figure 4b) is due to the presence of biopolymers on

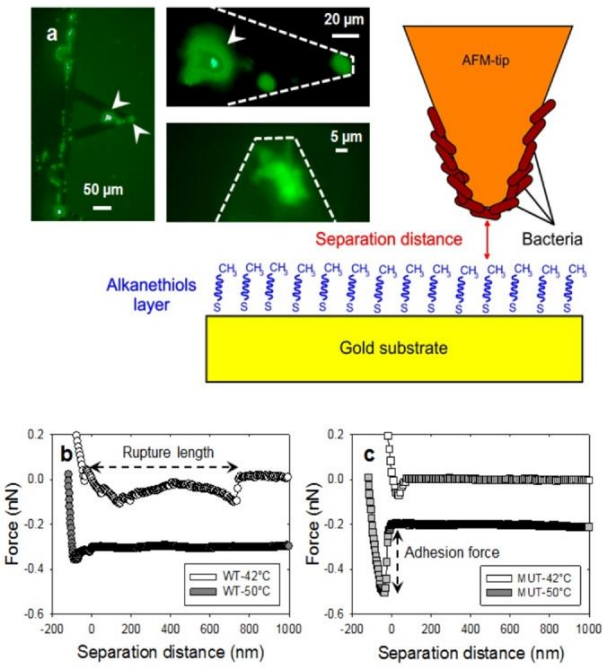


Figure 4. Scheme of CFM and typical force curves obtained with the bioprobes. (a) Scheme of chemical force microscopy experiments describing the measurement of adhesion force between a bioprobe (see fluorescence microscopy images in inset) and a hydrophobic reference surface, here a 1-dodecanethiol self-assembled monolayer grafted onto a gold surface. For the fluorescence images, bacterial cells adhered to AFM probes were stained with Sybr Green II. The white arrows indicate the presence of adhered bacteria. (b) Typical force−distance curves obtained for the wild-type-coated bioprobe and the hydrophobic model surface at 42 °C (white circle) and 50 °C (gray circle). (c) Typical force−distance curves measured between the mutant-coated bioprobe and the hydrophobic model surface at 42 °C (white square) and 50 °C (gray square). The rupture length corresponds to the separation distance where the "jump off" event of the tip is detected and the adhesion force corresponds to the force required to break the bond between the AFM bioprobe and the surface.

the cell surface and not to PEI. In addition, the nonlinear dependence of the force on separation distance as collected for the interaction between the mutant cell-coated tip and the model CH_3 surface (Figure 4c) significantly differs from the linear response obtained in the absence of mutant cells on the tip (Figure S3 of the Supporting Information). This demonstrates again that the PEI on the tip does not impair the interpretation of the measured force interaction where cells are involved.

In addition, with increasing temperature from 42 to 50 °C, we observed a drop of both the amplitude of the last rupture force and the number of rupture events for the wild-type strain (Figure 4b). For the Δrgg_{0182} mutant, the increase in temperature led to a significant increase in the adhesion force (Figure 4c). These results clearly indicated that the amplitude of the interactions (either specific or nonspecific) between a bacterial cell wall and a hydrophobic reference surface were strongly modulated by temperature. This is further confirmed in Figure 5, where we report quantitative and statistical information on the magnitude of the measured force (Figure 5, panels a and b) that corresponds to the last rupture event upon

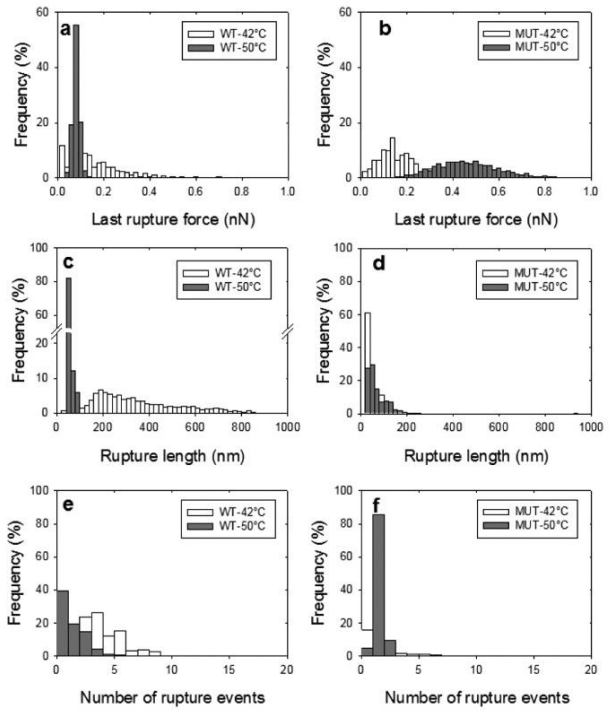


Figure 5. Statistic distribution of the last rupture force, rupture length, and number of rupture events at 42 and 50 °C, as obtained from the analysis of AFM force interaction between bioprobes and 1-dodecanethiol hydrophobic surface. (a) Statistic distribution of last rupture force between the *S. thermophilus* wild-type strain and a hydrophobic surface at 42 and 50 °C (white and gray bars, respectively). (b) Statistic distribution of last rupture force between the *S. thermophilus* mutant strain and a hydrophobic surface at 42 and 50 °C (white and gray bars, respectively). (c) Statistic distribution of rupture lengths between *S. thermophilus* wild-type strain and a hydrophobic surface at 42 and 50 °C (white and gray bars, respectively). (d) Statistic distribution of rupture lengths between the *S. thermophilus* mutant strain and a hydrophobic surface at 42 and 50 °C (white and gray bars, respectively). (e) Statistic distribution of the number of rupture events per retraction force curves during AFM experiments between the *S. thermophilus* wild-type strain and a hydrophobic surface at 42 and 50 °C (white and gray bars, respectively). (f) Statistic distribution of the number of rupture events per retraction force curves during AFM experiments between the *S. thermophilus* mutant strain and a hydrophobic surface at 42 and 50 °C (white and gray bars, respectively).

retraction of the bacteria-coated tip from the hydrophobic surface. The typical distribution of the rupture length and number of rupture events collected for both strains at 42 and 50 °C are further displayed in Figure 5 (panels c–d and e–f, respectively. For the wild-type cells, the last rupture force decreased from 0.12 ± 0.04 nN to 0.08 ± 0.01 nN with increasing temperature from 42 to 50 °C (Figure 5a and Table 2), while the adhesion force of mutant cells increased from 0.13 ± 0.07 to 0.44 ± 0.13 nN in the temperature range from 42 to 50 °C (Figure 5b and Table 2). Figure 5c evidenced the presence at 42 °C of 100–800 nm long macromolecules on wild-type LMG18311 cell walls. At 50 °C, shorter macromolecules (length 50–100 nm) decorated the outer periphery of the wild-type strain. In the case of the Δrgg_{0182} mutant, CFM measurements did not reveal any significant dependence of the rupture distance (50–200 nm) on temperature.

Table 2. Average adhesion forces to hydrophobic surface at 42 and 50°C[a]

strain/temperature	average adhesion forces (nN)	r^2
wild type/42 °C	0.12 ± 0.04	0.9247
mutant/42 °C	0.13 ± 0.07	0.9651
wild type/50 °C	0.08 ± 0.01	0.9872
mutant/50 °C	0.44 ± 0.13	0.9754

[a]Average adhesion forces correspond to the center of the Gaussian distribution taken from statistical measurements in Figure 5, panels a and b. The standard deviation and r^2 fitting parameter are given for each distribution and temperature condition.

Roughness and Hydrophobicity of the Surfaces Constituting the Walls of Well Microplate. As final measurements, we determined the respective hydrophobicity degrees and roughness of the bottom and side walls of the well microplate at 42 °C (Figure 6). Analysis of AFM topology

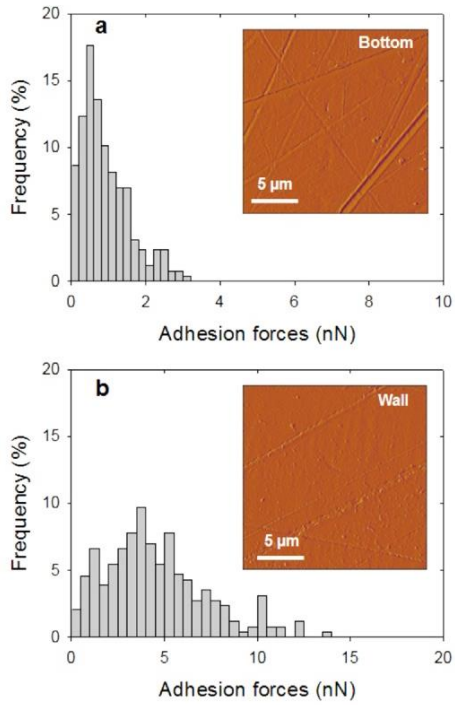


Figure 6. Characterization of microplate well surface by AFM imaging and CFM. (a) Statistic distribution of the adhesion force between the well's bottom surface and a hydrophobic AFM tip at 42 °C, topographic deflection images in inset. (b) Statistical distribution of adhesion forces between the well's wall surface and a hydrophobic AFM tip at 42 °C; the topographic deflection image is in the inset.

images revealed that the rms of the bottom and side walls of the well microplate did not significantly differ, with a rms of ∼24 nm for the former surface and a rms of ∼18 nm for the latter (Table 3). Furthermore, the adhesion force measured between these surfaces and CH_3-coated AFM tip suggested that the microwell's bottom wall was less hydrophobic than the side wall (adhesion force of ∼0.57 nN for the former and 3.74 nN for the latter) where adhesion of mutant cells was observed at 50 °C.

Physico-Chemical Determinants for the Temperature-Dependent Adhesion of *S. thermophilus*. LMG18311 and

Table 3. Roughness of Microplate Well's Surfaces Measured at 42°C[a]

Surface	average rms (nm)	analyzed area (μm^2)
Microplate (bottom)	23.67 ± 1.64	417.6 ± 9.7
Microplate (wall)	17.63 ± 1.02	410.5 ± 13.4

[a]Roughness (rms) was calculated from AFM height images after two flattening filters were applied on the well's side wall surface area of 20 × 20 μm2 and was averaged from the analysis of 10 images.

Δrgg_{0182} cells exhibit different temperature-dependent adhesion capacities onto the side walls of the well microplate. The adhesion experiments schemed in Figure 2 were carried out under a high electrolyte condition (physiological medium), which excludes *a priori* the impact of differential electrostatic forces for explaining the adhesion behavior of both strains with temperature. This conclusion was further supported by electrokinetic data collected for cells grown at 50 °C (Figure S2 of the Supporting Information). In order to examine the possible influence of the cell-chaining phenotype on cell adhesion capacity, highly resolved AFM images were recorded for both strains at 42 and 50 °C. The analysis was further complemented by a systematic counting of the number of cells per chain over the temperature range of interest (Figure 3). It is found that the different adhesion behaviors for LMG18311 and Δrgg_{0182} cells with temperature could not be attributed to their corresponding chaining phenotype and chain length. Indeed, while adhesion of mutant cells at 50 °C is positively correlated to a slight increase in chain length (Figure 3f), no adhesion is observed for wild-type cells at 42 and 50 °C despite their significant variation in chain length over the temperature range investigated here. These results suggest that mutant chain morphology is not the main factor that governs the temperature-dependent adhesion of the Δrgg_{0182} cells at 50 °C.

To further proceed, we analyzed the physicochemical surface properties of wild-type and mutant cells by means of CFM (Figures 4 and 5). The results clearly underpinned that wild-type cell wall supports flexible biomacromolecules whose structure was greatly modulated by temperature. The length of the stretched biomacromolecules and the last rupture force indeed concomitantly decreased with increasing temperature from 42 to 50 °C (Figures 4b, 5a, and 5c). These effects cannot be explained by basic and well-established physical processes that govern the change in (bio)polymer conformation with increasing temperature.[45] Indeed, such processes, which are connected to the thermo-dependent balance between hydrogen bonding and hydrophobic dehydration within/of the polymer structure, would lead to a compact (bio)polymer network as a result of increased hydrophobic interactions following an increase in temperature.[46−48] This is not in agreement with the decrease of the wild-type cells−hydrophobic surface adhesion force with increasing temperature, as clearly shown in Figure 5a. In turn, this suggests that the Rgg0182 transcriptional regulator expressed by wild-type cells may directly or indirectly control the synthesis of biomacromolecules of a different nature with changing temperature. This is supported by our previous work, demonstrating that Rgg_{0182} acts as a transcriptional regulator whose expression is modulated by the growth temperature.[17] The Rgg protein-mediated transcriptional control of genes encoding surface proteins is in agreement with data from *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, and *S. suis*.[42,49,50]

In contrast, the above features invoked with the sole consideration of physical processes underlying the temperature dependence of the (bio)polymers structure are fully in line with the AFM analysis displayed in Figures 4c, 5b, and 5d for mutant cells. In detail, with increasing temperature, the interaction between hydrophobic side groups within the cell wall network and within possibly protruding surface biostructure (not detected in the experiments because of the nonspecific nature of the bioprobe and surface) were dominant, leading to the release of water and the collapse of the soft viscoelastic cell envelope around mutant cells. Contrary to wild-type cells whose surface roughness remained unchanged with increasing temperature, the aforementioned collapse of the mutant cell envelop from 42 to 50 °C is reflected by a significant decrease of cell surface roughness (Table 1). In turn, the force that must be exerted on the AFM bioprobe to move from the hydrophobic surface increases by a factor 4 from 42 to 50 °C, while the rupture length remains basically unchanged.

At this stage of the discussion, it is emphasized that the moderate increase in CH_3 surface hydrophobicity with temperature (as shown in Figure S4 of the Supporting Information) can not explain the increase of the adhesion force displayed in Figure 5b between the mutant cell wall and the CH_3 surface. This argument is supported by two facts: (i) the adhesion force between the mutant cell wall and the CH_3 surface is 60 to 12 times lower in magnitude as compared to that for the CH_3 surface and the CH_3-AFM probe in the temperature range from 42 to 50 °C and (ii) the interaction between the CH_3 surface and the CH_3-AFM probe increases by 15% from 42 to 50 °C, whereas the interaction force between the mutant cell wall and the CH_3-surface increases by ∼340% in this temperature range. These elements ensure that the modulations of the force-separation distance curves with varying temperature for the case of wild-type cells can be assigned to accompanying cell wall surface structure modifications.

The respective temperature-dependent adhesion properties of LMG18311 and Δrgg_{0182} cells (Figure 2) may then be addressed on the basis of the corresponding physicochemical properties of their cell walls discussed above. Basically, the adhesion of Δrgg_{0182} cells onto the side wall of microplates is promoted with increasing temperature as a result of an increase in cell wall hydrophobicity, due to the corresponding change in the balance between hydrogen bonding and hydrophobic interactions of side groups and to the underlying cell envelop structure modification. In addition, the adhesion of Δrgg_{0182} cells is not observed on the bottom surface of the microplate (Figure 2) because the hydrophobicity of the latter is substantially lower (by a factor 5) than that measured for the microplate side walls (Figure 6). With regard to wild-type cells, the nature of their envelope is likely dependent on temperature via action of the Rgg0182 transcriptional regulator. However, regardless of temperature, the adhesion between such cell envelopes and the hydrophobic reference surface remains weak and hardly changes with varying temperature.

■ CONCLUSIONS

Using chemical force microscopy, we have demonstrated that the expression of the Rgg0182 transcriptional regulator in *S. thermophilus* LMG18311 is correlated with an inhibition of cell adhesion onto microplate surfaces over the temperature range from 42 to 55 °C. The adhesion of Δrgg_{0182} cells onto hydrophobic substrates at large temperatures (from 46 to 52

°C) is connected to an increase in cell wall hydrophobicity by a factor 4. The physical mechanisms governing such change in soft (bio)structure with temperature are well-known in polymer chemistry and are shown to affect *S. thermophilus* LMG18311 adhesion when cells are lacking the Rgg_{0182} transcriptional regulator. It was verified that neither the electrostatic interaction forces nor the cell-chaining phenotype can explain the observed difference in cell adhesion properties. In addition, we found that the presence of Rgg_{0182} leads to the synthesis of biopolymers whose nature is strongly connected to growth temperature.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Relationship between cell density and growth temperature; electrophoretic mobility measurements; typical force–distance curves performed with hydrophobic CH_3 tip on reference surfaces; hydrophobic/hydrophilic balance of CH_3-gold-coated surface estimated from CFM analysis; hydrophobic/hydrophilic balance of PEI-coated surface estimated from CFM analysis; and hydrophobic/hydrophilic balance of CH_3-gold-coated surface estmated from CFM analysis. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*G.F.: e-mail, gregory.francius@univ-lorraine.fr; tel, (33) 03 83 68 52 36. N.L.-B.: e-mail, bourget@nancy.inra.fr; tel, (33) 03 83 68 42 10.

Author Contributions

#The authors contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

The different adhesion behavior of wild-type and mutant cells on the cationic PEI-coated AFM probe (as invoked in Materials and Methods) may originate from the different geometries of the wild-type and mutant cells: the former exists in the form of long catenaries (Figure 3, panels a, c, and e), which in turn could lead to retarded kinetics of wild-type cell adhesion on the tip as compared to that for the mutant of smaller geometry (Figure 3, panels b, d, and f). In addition, the longer flexible polymer structure of the wild-type cells (Figure 4b) could contribute to the retardation of their kinetics of adhesion on the tip as a result of stronger steric repulsion. Finally, differences in charge distribution across the cell interphases could contribute to distinct cell binding to the AFM tip, even though electrokinetics indicates similar electrostatic features for both strains of interest here.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the Ministère de l'Education Nationale de la Recherche et de la Technologie (MENRT). We thank Stéphane Bertin and Julien Hiblot for their technical support.

■ REFERENCES

(1) Hols, P.; Hancy, F.; Fontaine, L.; Grossiord, B.; Prozzi, D.; Leblond-Bourget, N.; Decaris, B.; Bolotin, A.; Delorme, C.; Ehrlich, S. D.; Guedon, E.; Monnet, W.; Renault, P.; Kleerebezem, M. New insights in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29* (3), 435–463.

(2) Parente, E.; Moschetti, G.; Coppola, S. Starter cultures for Mozzarella cheese. *Ann. Microbiol. Enzimol.* **1998**, *48*, 89–109.

(3) Settanni, L.; Moschetti, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* **2010**, *27* (6), 691–697.

(4) Guarner, F.; Perdigon, G.; Corthier, G.; Salminen, S.; Koletzko, B.; Morelli, L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br. J. Nutr.* **2005**, *93* (6), 783–786.

(5) Pagnini, C.; Saeed, R.; Bamias, G.; Arseneau, K. O.; Pizarro, T. T.; Cominelli, F. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107* (1), 454–459.

(6) Saavedra, J. M.; Abi-Hanna, A.; Moore, N.; Yolken, R. H. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: Tolerance and safety. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79* (2), 261–267.

(7) Veiga, P.; Gallini, C. A.; Beal, C.; Michaud, M.; Delaney, M. L.; DuBois, A.; Khlebnikov, A.; Vlieg, J.; Punit, S.; Glickman, J. N.; Onderdonk, A.; Glimcher, L. H.; Garrett, W. S. Bifidobacterium animalis subsp lactis fermented milk product reduces inflammation by altering a niche for colitogenic microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107* (42), 18132–18137.

(8) Flint, S. H.; Brooks, J. D.; Bremer, P. J. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *J. Food Eng.* **2000**, *43* (4), 235–242.

(9) De Jong, P.; Te Giffel, M. C.; Kiezebrink, E. A. Prediction of the adherence, growth and release of microorganisms in production chains. *Int. J. Food Microbiol.* **2002**, *74* (1–2), 13–25.

(10) Marchand, S.; De Block, J.; De Jonghe, V.; Coorevits, A.; Heyndrickx, M.; Herman, L. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2012**, *11* (2), 133–147.

(11) Oliver, S. P.; Jayarao, B. M.; Almeida, R. A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.* **2005**, *2* (2), 115–129.

(12) Bridge, P. D.; Sneath, P. H. A. Numerical taxonomy of Streptococcus. *J. Gen. Microbiol.* **1983**, *129*, 565–597.

(13) Flint, S.; Brooks, J.; Bremer, P.; Walker, K.; Hausman, E. The resistance to heat of thermo-resistant streptococci attached to stainless steel in the presence of milk. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *28* (3), 134–136.

(14) Amano, A.; Premaraj, T.; Kuboniwa, M.; Nakagawa, I.; Shizukuishi, S.; Morisaki, I.; Hamada, S. Altered antigenicity in periodontitis patients and decreased adhesion of Porphyromonas gingivalis by environmental temperature stress. *Oral Microbiol. Immunol.* **2001**, *16* (2), 124–128.

(15) Gordesli, F. P.; Abu-Lail, N. I. The role of growth temperature in the adhesion and mechanics of pathogenic L. monocytogenes: An AFM study. *Langmuir* **2012**, *28* (2), 1360–1373.

(16) Li, J. S.; Bi, Y. T.; Dong, C.; Yang, J. F.; Liang, W. D. Transcriptome analysis of adaptive heat shock response of Streptococcus thermophilus. *PLoS One* **2011**, *6*, 10.

(17) Henry, R.; Bruneau, E.; Gardan, R.; Bertin, S.; Fleuchot, B.; Decaris, B.; Leblond-Bourget, N. The rgg0182 gene encodes a transcriptional regulator required for the full Streptococcus thermophilus LMG18311 thermal adaptation. *BMC Microbiol.* **2011**, *11*, 223.

(18) Bolotin, A.; Quinquis, B.; Renault, P.; Sorokin, A.; Ehrlich, S. D.; Kulakauskas, S.; Lapidus, A.; Goltsman, E.; Mazur, M.; Pusch, G. D.; Fonstein, M.; Overbeek, R.; Kyprides, N.; Purnelle, B.; Prozzi, D.; Ngui, K.; Masuy, D.; Hancy, F.; Burteau, S.; Boutry, M.; Delcour, J.; Goffeau, A.; Hols, P. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium Streptococcus thermophilus. *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22* (12), 1554–1558.

(19) Terzaghi, B. E.; Sandine, W. E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* **1975**, *29* (6), 807–13.

(20) Alsteens, D.; Dague, E.; Rouxhet, P. G.; Baulard, A. R.; Dufrêne, Y. F. Direct measurement of hydrophobic forces on cell surfaces using AFM. *Langmuir* **2007**, *23* (24), 11977−11979.
(21) Francius, G.; Alsteens, D.; Dupres, V.; Lebeer, S.; De Keersmaecker, S.; Vanderleyden, J.; Gruber, H. J.; Dufrêne, Y. F. Stretching polysaccharides on live cells using single molecule force spectroscopy. *Nat. Protoc.* **2009**, *4* (6), 939−946.
(22) Quilès, F.; Polyakov, P.; Humbert, F.; Francius, G. Production of extracellular glycogen by pseudomonas fluorescens: spectroscopic evidence and conformational analysis by biomolecular recognition. *Biomacromolecules* **2012**, *13* (7), 2118−2127.
(23) Wu, J.; Deng, X.; Zhang, Y.; Wang, L.; Tian, B. Q.; Xie, B. J. Application of atomic force microscopy in the study of polysaccharide. *Agric. Sci. China* **2009**, *8* (12), 1458−1465.
(24) Francius, G.; Lebeer, S.; Alsteens, D.; Wildling, L.; Gruber, H. J.; Hols, P.; De Keersmaecker, S.; Vanderleyden, J.; Dufrêne, Y. F. Detection, localization, and conformational analysis of single polysaccharide molecules on live bacteria. *ACS Nano* **2008**, *2* (9), 1921−9.
(25) Andre, G.; Deghorain, M.; Bron, P. A.; van Swam, I. I.; Kleerebezem, M.; Hols, P.; Dufrêne, Y. F. Fluorescence and atomic force microscopy imaging of wall teichoic acids in Lactobacillus plantarum. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (4), 366−376.
(26) Dufrêne, Y. F. Atomic force microscopy of fungal cell walls: An update. *Yeast* **2010**, *27* (8), 465−471.
(27) Abe, Y.; Polyakov, P.; Skali-Lami, S.; Francius, G. Elasticity and physico-chemical properties during drinking water biofilm formation. *Biofouling* **2011**, *27* (7), 739−750.
(28) Na, C. Z.; McNamara, C. J.; Konkol, N. R.; Bearce, K. A.; Mitchell, R.; Martin, S. T. The use of force-volume microscopy to examine bacterial attachment to titanium surfaces. *Ann. Microbiol.* **2010**, *60* (3), 495−502.
(29) Sirghi, L.; Ponti, J.; Broggi, F.; Rossi, F. Probing elasticity and adhesion of live cells by atomic force microscopy indentation. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **2008**, *37* (6), 935−945.
(30) Abu-Lail, N. I.; Camesano, T. A. Specific and nonspecific interaction forces between Escherichia coli and silicon nitride, determined by Poisson statistical analysis. *Langmuir* **2006**, *22* (17), 7296−7301.
(31) Getfert, S.; Reimann, P. Hidden multiple bond effects in dynamic force spectroscopy. *Biophys. J.* **2012**, *102* (5), 1184−1193.
(32) Wang, W. H.; Kistler, K. A.; Sadeghipour, K.; Baran, G. Molecular dynamics simulation of AFM studies of a single polymer chain. *Phys. Lett. A* **2008**, *372* (47), 7007−7010.
(33) Ito, T.; Grabowska, I.; Ibrahim, S. Chemical-force microscopy for materials characterization. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2010**, *29* (3), 225−233.
(34) Kim, H.; Park, J. H.; Cho, I. H.; Kim, S. K.; Paek, S. H.; Lee, H. Selective immobilization of proteins on gold dot arrays and characterization using chemical force microscopy. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *334* (2), 161−166.
(35) Wuttisela, K.; Triampo, W.; Triampo, D. Chemical force mapping of phosphate and carbon on acid-modified tapioca starch surface. *Int. J. Biol. Macromol.* **2009**, *44* (1), 86−91.
(36) Fisher, T. E.; Marszalek, P. E.; Fernandez, J. M. Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope. *Nat. Struct. Biol.* **2000**, *7* (9), 719−724.
(37) Hinterdorfer, P.; Dufrêne, Y. F. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat. Methods* **2006**, *3* (5), 347−355.
(38) Alsteens, D.; Garcia, M. C.; Lipke, P. N.; Dufrêne, Y. F. Force-induced formation and propagation of adhesion nanodomains in living fungal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2010**, *107* (48), 20744−20749.
(39) Mortensen, N. P.; Fowlkes, J. D.; Sullivan, C. J.; Allison, D. P.; Larsen, N. B.; Molin, S.; Doktycz, M. J. Effects of colistin on surface ultrastructure and nanomechanics of *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Langmuir* **2009**, *25* (6), 3728−3733.
(40) Francius, G.; Polyakov, P.; Merlin, J.; Abe, Y.; Ghigo, J. M.; Merlin, C.; Beloin, C.; Duval, J. F. L. Bacterial surface appendages strongly impact nanomechanical and electrokinetic properties of Escherichia coli cells subjected to osmotic stress. *PLoS One* **2011**, *6* (5), e20066.
(41) De Vuyst, L.; Vanderveken, F.; Van de Ven, S.; Degeest, B. Production by and isolation of exopolysaccharides from Streptococcus thermophilus grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *J. Appl. Microbiol.* **1998**, *84* (6), 1059−1068.
(42) Zheng, F.; Ji, H. F.; Cao, M.; Wang, C. J.; Feng, Y. J.; Li, M.; Pan, X. Z.; Wang, J.; Qin, Y. H.; Hu, F. Q.; Tang, J. Q. Contribution of the Rgg transcription regulator to metabolism and virulence of Streptococcus suis serotype 2. *Infect. Immun.* **2011**, *79* (3), 1319−1328.
(43) Dague, E.; Duval, J. F. L.; Jorand, F.; Thomas, F.; Gaboriaud, F. Probing surface structures of Shewanella spp. by microelectrophoresis. *Biophys. J.* **2006**, *90* (7), 2612−2621.
(44) Lee, C. K.; Wang, Y. M.; Huang, L. S.; Lin, S. M. Atomic force microscopy: Determination of unbinding force, off rate and energy barrier for protein-ligand interaction. *Micron* **2007**, *38* (5), 446−461.
(45) Cordeiro, A. L.; Zimmermann, R.; Gramm, S.; Nitschke, M.; Janke, A.; Schafer, N.; Grundke, K.; Werner, C. Temperature dependent physicochemical properties of poly(N-isopropylacrylamide-co-N-(1-phenylethyl) acrylamide) thin films. *Soft Matter* **2009**, *5* (7), 1367−1377.
(46) Ista, L. K.; Perez-Luna, V. H.; Lopez, G. P. Surface-grafted, environmentally sensitive polymers for biofilm release. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65* (4), 1603−1609.
(47) Schmaljohann, D.; Oswald, J.; Jorgensen, B.; Nitschke, M.; Beyerlein, D.; Werner, C. Thermo-responsive PNiAAm-g-PEG films for controlled cell detachment. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1733−1739.
(48) Yamada, N.; Okano, T.; Sakai, H.; Karikusa, F.; Sawasaki, Y.; Sakurai, Y. Thermoresponsive polymeric surfaces - Control of attachment and detachment of cultured-cells. *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **1990**, *11* (11), 571−576.
(49) Chaussee, M. S.; Sylva, G. L.; Sturdevant, D. E.; Smoot, L. M.; Graham, M. R.; Watson, R. O.; Musser, J. M. Rgg influences the expression of multiple regulatory loci to coregulate virulence factor expression in Streptococcus pyogenes. *Infect. Immun.* **2002**, *70* (2), 762−770.
(50) Samen, U. M.; Eikmanns, B. J.; Reinscheid, D. J. The transcriptional regulator RovS controls the attachment of Streptococcus agalactiae to human epithelial cells and the expression of virulence genes. *Infect. Immun.* **2006**, *74* (10), 5625−5635.

Annexe 3

ORF	fonction	p-value (t-test)	m/WT	COG
stu1986	Putative uncharacterized protein OS	2,12E-05	0,00	**S**
stu1462	Putative uncharacterized protein	2,19E-03	0,00	**S**
stu0165	Putative uncharacterized protein	2,19E-03	0,67	**R**
pepQ	Dipeptidase	2,89E-03	0,58	**E**
alaS	Alanyl-tRNA synthetase	2,89E-03	0,50	**J**
rpsC	ribosomal protein S3	4,81E-03	0,76	**J**
rplA	ribosomal protein L1	5,33E-03	0,60	**J**
tpiA	Triosephosphate isomerase	9,21E-03	0,61	**G**
gapN	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	9,84E-03	0,63	**C**
stu0548	protein stu0548	1,32E-02	1,55	**R**
manL	Mannose PTS system component IIAB	1,32E-02	1,38	**G**
stu0800	Putative uncharacterized protein	1,32E-02	0,14	**J**
stu0235	Putative uncharacterized protein	1,61E-02	0,67	**S**
stu1363	Putative uncharacterized protein	1,61E-02	0,00	**R**
stu0754	Putative uncharacterized protein	1,61E-02	0,00	**J**
lysA	Diaminopimelate decarboxylase	1,61E-02	0,69	**E**
tsf	Elongation factor Ts	1,69E-02	0,69	**J**
carA	Carbamoyl phosphate synthetase, small chain	2,13E-02	0,63	**EF**
ldh	L-lactate dehydrogenase	2,20E-02	0,80	**C**
serC	Phosphoserine aminotransferase	2,29E-02	0,60	**HE**
tuf	Elongation factor Tu	2,39E-02	0,89	**J**
murA1	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase 1	2,41E-02	0,57	**M**
dltA	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1	2,49E-02	0,72	**Q**
metB2	Cystathionine beta-lyase	2,75E-02	0,39	**E**
purB	Adenylosuccinate lyase	3,25E-02	0,71	**F**
aroG2	Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase	3,27E-02	0,72	**E**
sipA	Signal peptidase I	3,35E-02	0,10	**N**
amiA3	Oligopeptide ABC uptake transporter substrate-binding protein O	3,72E-02	0,69	**EP**
stu0657	Putative uncharacterized protein	3,94E-02	0,69	**S**
glyQ	Glycyl-tRNA synthetase alpha subunit	3,99E-02	0,57	**J**
dnaN	Beta subunit of DNA polymerase III	4,74E-02	0,76	**L**
stu0472	Putative uncharacterized protein	4,74E-02	0,20	**S**
livF	Branched chain amino acid ABC uptake transporter ATP binding protein	4,74E-02	5,00	**E**
rluD	Pseudouridine synthase	4,74E-02	0,20	**J**
cysM2	Cysteine synthase	4,74E-02	0,20	**E**
nrdE	Ribonucleoside-diphosphate reductase	4,74E-02	0,71	**F**
cmk	Cytidylate kinase	4,74E-02	0,50	**F**
dnaI	Primosome component (Helicase loader) DnaI	4,74E-02	0,50	**L**
stu0234	Putative uncharacterized protein	4,74E-02	0,50	**L**
serA	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	4,99E-02	0,73	**E**

ORF	fonction	p-value (t-test)	m/WT	COG
acoC	Acetoin/pyruvate dehydrogenase complex, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase	5,33E-02	1,31	**C**
stu0643	protein stu0643	5,50E-02	0,14	**S**
jag	Putative uncharacterized protein jag	5,50E-02	0,14	**R**
purD	Phosphoribosylamine-glycine ligase (GAR synthetase)	5,50E-02	0,81	**F**
rplS	ribosomal protein L19	5,50E-02	0,54	**J**
fruB	Fructose-1-phosphate kinase	5,50E-02	0,54	**G**
prfA	Peptide chain release factor 1	5,50E-02	0,37	**J**
clpE	ATP-dependent Clp protease	5,61E-02	0,75	**O**
deaD	ATP-dependent RNA helicase	6,00E-02	0,52	**LKJ**
ssbB	Single-stranded DNA-binding protein	6,02E-02	0,40	**L**
clpC	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit	6,43E-02	0,63	**O**
hipO1	Aminoacylase/N-acyl-L-amino acid amidohydrolase/hippurate hydrolase	6,68E-02	2,67	**R**
murB	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosamine reductase	6,68E-02	0,58	**M**
fabZ	(3R)-hydroxymyristoyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase	6,68E-02	0,38	**I**
thrB	Homoserine kinase	6,68E-02	0,38	**E**
trpS	Tryptophanyl-tRNA synthetase	6,86E-02	0,36	**J**
pepA	Glutamyl-aminopeptidase	7,05E-02	0,60	**G**
murC	UDP-N-acetylmuramate--L-alanine ligase	7,77E-02	0,62	**M**
galE1	UDP-glucose 4-epimerase	7,82E-02	0,54	**M**
hprK	HPr kinase/phosphorylase	8,31E-02	1,68	**T**
folA	Dihydrofolate reductase	8,90E-02	0,29	**H**
rplQ	50S ribosomal protein L17	8,90E-02	0,50	**J**
rmlD	dTDP-4-keto-L-rhamnose reductase	8,90E-02	1,45	**M**
adcA	Zinc (Zn2+) ABC uptake transporter substrate binding protein	9,13E-02	1,47	**P**
prfC	Peptide chain release factor 3	9,94E-02	0,61	**J**

Annexe 4

Journée RP2E

Publication affichée n°1 (2010):

Caractérisation des mécanismes de signalisation et de réponse aux stress impliquant les régulateurs transcriptionnels Rgg de la bactérie *Streptococcus thermophilus*

BRUNEAU Emmanuelle, HENRY Romain, HIBLOT Julien, BERTIN Stéphane et LEBLOND-BOURGET Nathalie

Publication affichée n°2 (2011):

Caractérisation des sites de fixation du régulateur transcriptionnel Rgg_{stk1} de la souche LMG18311 de *Streptococcus thermophilus* au niveau du promoteur de ses gènes cibles caractérisés.

Emmanuelle Bruneau, Romain Henry, Stéphane Bertin, Betty Fleuchot, Rozenn Gardan, Nathalie Leblond-Bourget.

Actes de congrès

Publication affichée n°1 : Congrès nationale.

Caractérisation des sites de fixation du régulateur transcriptionnel Rgg_{stk1} de la souche LMG18311 de *Streptococcus thermophilus* au niveau du promoteur de ses gènes cibles caractérisés.

Emmanuelle Bruneau, Romain Henry, Stéphane Bertin, Betty Fleuchot, Rozenn Gardan, Nathalie Leblond-Bourget.

17ème colloque du Club des Bactéries Lactiques à Nancy. Novembre 2010.

Communication orale : Congrès nationale.

Implication du régulateur transcriptionnel Rgg_{stk1} dans la réponse au stress de *Streptococcus thermophilus* LMG18311

Romain Henry, Emmanuelle Bruneau, Stéphane Bertin, Bernard Decaris, Nathalie Leblond-Bourget.

17ème colloque du Club des Bactéries Lactiques à Nancy. Novembre 2010.

Caractérisation des mécanismes de signalisation et de réponse aux stress impliquant les régulateurs transcriptionnels Rgg de la bactérie *Streptococcus thermophilus*

BRUNEAU Emmanuelle[1], HENRY Romain[1], HIBLOT Julien[1], BERTIN Stéphane[1] et LEBLOND-BOURGET Nathalie[1]

[1] Laboratoire de Génétique et Microbiologie, UMR UHP-INRA 1128/ IFR 110 Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté des Sciences et Techniques, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy

Résumé

Streptococcus thermophilus est une bactérie utilisée dans l'industrie laitière pour la fabrication de yaourts et de fromages. Lors de son utilisation industrielle, cette bactérie subit de nombreuses variations de ses conditions de cultures (modification de la température, du taux d'oxygène et de l'acidité). Le stress, provoqué par ces variations, est ressenti par la population bactérienne qui doit modifier son métabolisme en conséquence par l'induction de l'expression de nombreux gènes. Afin de coordonner la réponse au stress à l'échelle de la population, les bactéries peuvent mettre en place un mécanisme de communication intercellulaire à médiation moléculaire dépendant de la densité cellulaire appelé « Quorum Sensing ».

Le régulateur transcriptionnel Rgg_{stk1}, appartenant à la famille des protéines Rgg, est l'une des protéines induites lors de la réponse au stress de la souche LMG18311 de *S. thermophilus*. Néanmoins, la nature et le nombre de gènes régulés par Rgg_{stk1} sont inconnus ainsi que les modes d'activation et d'action de ce régulateur. Le premier objectif de ma thèse est, ainsi, de cerner le rôle du régulateur Rgg_{stk1} par la mise en évidence de ses gènes cibles. De plus, les données acquises au laboratoire et dans la littérature semblent suggérer que Rgg_{stk1} pourrait être activée par Quorum sensing, *via* une molécule de communication qui serait la phéromone Shp. Ainsi, le second objectif de mon travail consistera à déterminer si le couple Shp/Rgg est bien impliqué dans un tel mécanisme de Quorum Sensing. Le troisième objectif de ma thèse est d'étudier le rôle des gènes régulés par la protéine Rgg_{stk1} dans l'adaptation de *Streptocccus thermophilus* à son environnement.

Caractérisation des sites de fixation du régulateur transcriptionnel Rgg_{stk1} de la souche LMG18311 de *Streptococcus thermophilus* au niveau du promoteur de ses gènes cibles caractérisés

BRUNEAU Emmanuelle[1], HENRY Romain[1], BERTIN Stéphane[1], GARDAN Rozenn[2] et LEBLOND-BOURGET Nathalie[1]

[1] *Laboratoire de Génétique et Microbiologie, UMR UHP-INRA 1128/ IFR 110 Université Henri Poincaré Nancy 1, Faculté des Sciences et Techniques, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France*
[2] *Unité de Biochimie Bactérienne, UR477, INRA, 78350 Jouy en Josas, France*

Résumé

Streptococcus thermophilus est une bactérie utilisée dans l'industrie laitière pour la fabrication de yaourts et de fromages. Lors de son utilisation industrielle, cette bactérie subit de nombreuses variations des conditions de cultures (choc thermique, modification de l'oxygénation et de l'acidité). En conséquences des stress subits, la population bactérienne doit modifier son métabolisme par l'induction de l'expression de nombreux gènes. *S. thermophilus* LMG18311 possède au sein de son génome 7 copies de gènes *rgg* codant des régulateurs transcriptionnels. Chez les streptocoques pathogènes, ces protéines ont été décrites dans la littérature comme participant à la régulation de gènes impliqués dans la virulence, dans le métabolisme et dans l'adaptation aux changements environnementaux (Chaussee *et al.*, 2002 ; Chaussee *et al.*, 2004).

Des analyses réalisées au Laboratoire de Génétique et Microbiologie ont permis de mettre en évidence l'implication du gène rgg_{stk1} de la souche LMG18311 de *S. thermophilus* dans la réponse aux stress thermique et acide. Ainsi Rgg_{stk1} pourrait participer à l'adaptation de *S. thermophilus* à son environnement.

Les gènes de la famille *rgg* sont décrits dans la littérature comme régulant, dans la plupart des cas, l'expression d'un ou plusieurs gènes qui leur sont adjacents par la fixation de la protéine Rgg sur l'ADN de la région promotrice des gènes régulés (Vickerman *et al.*, 2003 ; Nelly *et al.*, 2003).

Ainsi Rgg_{stk1} pourrait réguler les gènes qui sont adjacent à son locus. Afin de vérifier cette hypothèse, des fusions avec la luciférase des promoteurs des gènes shp_{stk1} et pep_{stk1}, encadrant le gène rgg_{stk1}, ont été réalisées. L'étude transcriptionnelle de ces dernières a montré que Rgg_{stk1} régule l'expression des gènes shp_{stk1} et pep_{stk1}. Dans le but d'étudier les sites de fixation à l'ADN de la protéine Rgg_{stk1}, celle-ci a été exprimée chez *Escherichia coli* à l'aide du plasmide pET15b. Rgg_{stk1} a ensuite été purifiée pour réaliser des expériences de retard sur gel. De plus, cette technique permettra de déterminer si la régulation des gènes shp_{stk1} et pep_{stk1}, par la protéine Rgg_{stk1}, est directe ou indirecte.

Les expériences de retard sur gel permettront également d'étudier d'autres cibles potentielles qui sont actuellement en cours de caractérisation.

Références

Chaussee M. S., Sylva G. L., Sturdevant D. E., Smoot L. M., Graham M. R., Waston R. O. and Musser J. M., **2002**, Infect. Immun., (70): 762-770.
Chaussee M. A., Callegari E. A. and Chaussee M. S., **2004**, J. Bacteriol., (186): 7091-7099.
Neely M. N., Lyon W. R., Runft D. L. and Caparon M., **2003**, J. Bacteriol. (185): 5166-5174.
Vickerman M. M., Wang M. and Baker L. J., **2003**, Microbiology, (149): 399-406.

Implication du régulateur transcriptionnel Rgg_{stk1} dans la réponse au stress de *Streptococcus thermophilus* LMG18311

HENRY Romain, BRUNEAU Emmanuelle, BERTIN Stéphane, DECARIS Bernard, LEBLOND-BOURGET Nathalie

Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR-INRA 1128 / IFR 110, Faculté des Sciences et Techniques – Campus Victor Grignard, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Résumé

Les gènes *rgg* sont décrits dans la littérature comme codant des régulateurs transcriptionnels. Chez les streptocoques pathogènes, les protéines Rgg sont impliquées dans la régulation de gènes de virulence et de biosynthèse d'acides aminés et dans l'adaptation aux changements environnementaux (Sulavik *et al.*, 1992 ; Chausse *et al.*, 2002).

Au sein du genre *Streptococcus*, *S. thermophilus* est l'espèce dont le génome séquencé présente le plus grand nombre d'ORF *rgg* : 7 ORF *rgg* au sein du génome de la souche LMG18311 contre 2 au maximum pour les streptocoques pathogènes. Afin de déterminer le rôle de ces gènes au sein de la cellule, la stratégie a consisté en l'obtention de mutants, présentant la délétion de gènes *rgg*. Cinq simples mutants ont été obtenus dont le mutant présentant la délétion du gène rgg_{stk1}.

La transcription du gène rgg_{stk1} a été analysée par PCR quantitative en temps réel dans différentes conditions de croissance : milieu chimiquement défini MCD et en milieu complet M17, différentes températures (30°C et 42°C). Les résultats obtenus montrent que le gène rgg_{stk1} est transcrit de manière phase dépendante dans toutes les conditions testées. De plus le niveau de transcription dépend du milieu de culture.

Le gène rgg_{stk1} présente le plus fort taux de transcription en milieu MCD à 30°C et en phase stationnaire. Dans ces conditions, des analyses phénotypiques en réponse à un stress thermique et un stress acide été réalisées et ont permis de montrer l'implication de la protéine Rgg_{stk1}. En effet, lors d'un stress thermique (à 52°C) et lors d'un stress acide (à pH 3), réalisé pendant 30 min, le mutant Δrgg_{stk1} est, respectivement, 100 fois plus sensible et 100 fois plus résistant que la souche sauvage. Ces données suggèrent que la protéine Rgg_{stk1} pourrait réguler des gènes impliqués dans la réponse au stress thermique et acide.

Afin de vérifier cette hypothèse, des analyses de PCR quantitative en temps réel sont actuellement en cours afin de comparer la transcription de gènes cibles potentiels entre le mutant Δrgg_{stk1} et la souche sauvage. Les premiers résultats obtenus semblent suggérer que les gènes *hsp33*, *cspA* et *cspB*, tous trois impliqués dans la réponse au stress thermique, pourraient être des cibles de la protéine Rgg_{stk1}.

References

Chaussee MS, Sylva GL, Sturdevant DE, Smoot LM, Graham MR, Watson RO, Musser JM. **2002**, Infect Immun. Feb;70(2):762-70.

Sulavik MC, Tardif G, Clewell DB. **1992**, J Bacteriol. Jun;174(11):3577-86.

Résumé

Streptococcus thermophilus, bactérie utilisée en industrie agro-alimentaire, est soumise, lors de la fabrication de produits fermentés, à de nombreux stress auxquelles elle doit faire face pour survivre. Pour s'adapter à ces modifications environnementales, elle mobilise divers systèmes de défense contrôlés par des réseaux de régulation impliquant notamment des régulateurs transcriptionnels. Parmi eux, se trouvent les régulateurs de la famille *rgg* présents en multiple exemplaires distincts dans les génomes de *S. thermophilus* (entre 5 et 7 copies selon les souches).

Cette étude a pour objectif la caractérisation des gènes *rgg* de *S. thermophilus*LMG18311, et, notamment, de leur l'implication dans l'adaptation de *S. thermophilus* à son environnement. Les analyses réalisées au cours de ce travail montrent que le gène rgg_{0182} de*S. thermophilus* LMG18311 code un régulateur transcriptionnel régulant la transcription des gènes adjacents à son locus, dont le gène shp_{0182} codant probablement une phéromone. Le couple Rgg_{0182}/Shp_{0182} participerait donc à un mécanisme de quorum sensing. Ce travail indique également que la protéine Rgg_{0182} est impliquée dans la tolérance au stress chaud. De plus, la délétion du gène rgg_{0182} chez *S. thermophilus* entraine une organisation de cellules en chaines plus courte que celles de la souche parentale, suggérant que Rgg_{0182} régulerait la transcription de gènes impliqués dans la séparation cellulaire. En outre, les cellules du mutant Δrgg_{0182} présentent un phénotype d'adhésion thermo-induite via des interactions de types hydrophobes aux parois des puits de microplaque. L'analyse par microscopie à force atomique des cellules de la souche LMG18311et de son dérivé délété du gène rgg_{0182} révèle la présence de polymères de surface uniquement chez la souche sauvage, suggérant que la protéine Rgg_{0182} régulerait l'expression de protéines de surface. Une étude protéomique couplé à une analyse transcriptomique ont permis de déterminer plusieurs gènes appartenant au régulon de Rgg_{0182}, dont les produits participent à diverses fonctions biologiques, telles que la réponse générale aux stress, le métabolisme des carbohydrates, la biosynthèse des pyrimidines et de l'arginine et la régulation transcriptionnelle. L'ensemble des données obtenues au cours de ces travaux de thèse ont permis de démontrer que le gène rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 code un régulateur global de l'expression génique.

Par ailleurs, l'analyse de la transcription des 7 gènes *rgg* présents au sein du génome de *S. thermophilus* LMG18311 dans différentes conditions de croissance a révélé que celle-ci était modulée par les conditions environnementales. Cette étude a également montré que les profils de transcription des 7 gènes *rgg* diffèrent les uns par rapport aux autres, suggérant que chacune d'elles seraient requises dans des conditions de croissance différentes. Ces données posent l'hypothèse que les protéines Rgg participeraient à la régulation fine et complexe de l'expression génique de *S. thermophilus*.

Summary

Streptococcus thermophilus, a bacterium used as starter in dairy industries, is subjected, during the manufacture of fermented products, to many stresses that it must face to survive. To adapt to these environmental changes, it mobilizes various defense systems controlled by regulatory networks including transcriptional regulators. Among them, are those of the *rgg* family that are present in multiple copies in the genomes of *S. thermophilus* (between 5 and 7 copies according to the strain).

This study aims to characterize the *rgg* genes of *S. thermophilus* LMG18311 and more specifically their involvement in *S. thermophilus* adaptation to its environment. This work shows that the *S. thermophilus* LMG18311 rgg_{0182} gene encodes a transcriptional regulator controlling the transcription of its flanking shp_{0182} genes that probably encodes a pheromone. This suggests that the Rgg_{0182}/Shp_{0182} pair could be involved in a quorum sensing mechanism. This work also demonstrates that the Rgg_{0182} protein is involved in *S. thermophilus* tolerance to heat stresses. Moreover, the rgg_{0182} deletion confers to the mutant shorter chains of cells than the parental strain, suggesting that the Rgg_{0182} protein regulates the transcription of genes involved in cell separation. In addition, the mutant Δrgg_{0182} cells exhibit a thermo-induced adhesion phenotype via hydrophobic interactions with walls of microplate wells. Analyses by atomic force microscopy of LMG18311 cells of the wildtype and its derivative rgg_{0182} mutant reveal the presence of polymers only on the surface of the wild-type strain, suggesting that the protein Rgg_{0182} would regulate the expression of surface proteins. A proteomic study coupled with transcriptomic analysis led to the identification of several genes belonging to the regulon of Rgg_{0182}, whose products are involved in various biological functions, such as general stress response, carbohydrate metabolism, pyrimidine and arginine biosynthesis and transcriptional regulation. The data obtained in this work have shown that the *S. thermophilus* LMG18311 rgg_{0182} genes encodes a global regulator of gene expression.

Furthermore, transcriptional analyses, in different growth conditions, of the 7 *rgg* genes present in the genome of *S. thermophilus* LMG18311 showed that they display different expression profiles that are modulated by environmental conditions. This suggests that these genes would be required in distinct growth conditions. These data raise the hypothesis that Rgg proteins participate in the fine and complex regulation of *S. thermophilus* gene expression.

Résumé

Streptococcus thermophilus, bactérie utilisée en industrie agro-alimentaire, est soumise, lors de la fabrication de produits fermentés, à de nombreux stress auxquelles elle doit faire face pour survivre. Pour s'adapter à ces modifications environnementales, elle mobilise divers systèmes de défense contrôlés par des réseaux de régulation impliquant notamment des régulateurs transcriptionnels. Parmi eux, se trouvent les régulateurs de la famille *rgg* présents en multiple exemplaires distincts dans les génomes de *S. thermophilus* (entre 5 et 7 copies selon les souches).

Cette étude a pour objectif la caractérisation des gènes *rgg* de *S. thermophilus*LMG18311, et, notamment, de leur l'implication dans l'adaptation de *S. thermophilus* à son environnement. Les analyses réalisées au cours de ce travail montrent que le gène rgg_{0182} de*S. thermophilus* LMG18311 code un régulateur transcriptionnel régulant la transcription des gènes adjacents à son locus, dont le gène shp_{0182} codant probablement une phéromone. Le couple Rgg_{0182}/Shp_{0182} participerait donc à un mécanisme de quorum sensing. Ce travail indique également que la protéine Rgg_{0182} est impliquée dans la tolérance au stress chaud. De plus, la délétion du gène rgg_{0182} chez *S. thermophilus* entraine une organisation de cellules en chaines plus courte que celles de la souche parentale, suggérant que Rgg_{0182} régulerait la transcription de gènes impliqués dans la séparation cellulaire. En outre, les cellules du mutant Δrgg_{0182} présentent un phénotype d'adhésion thermo-induite via des interactions de types hydrophobes aux parois des puits de microplaque. L'analyse par microscopie à force atomique des cellules de la souche LMG18311et de son dérivé délété du gène rgg_{0182} révèle la présence de polymères de surface uniquement chez la souche sauvage, suggérant que la protéine Rgg_{0182} régulerait l'expression de protéines de surface. Une étude protéomique couplé à une analyse transcriptomique ont permis de déterminer plusieurs gènes appartenant au régulon de Rgg_{0182}, dont les produits participent à diverses fonctions biologiques, telles que la réponse générale aux stress, le métabolisme des carbohydrates, la biosynthèse des pyrimidines et de l'arginine et la régulation transcriptionnelle. L'ensemble des données obtenues au cours de ces travaux de thèse ont permis de démontrer que le gène rgg_{0182} de *S. thermophilus* LMG18311 code un régulateur global de l'expression génique.

Par ailleurs, l'analyse de la transcription des 7 gènes *rgg* présents au sein du génome de *S. thermophilus* LMG18311 dans différentes conditions de croissance a révélé que celle-ci était modulée par les conditions environnementales. Cette étude a également montré que les profils de transcription des 7 gènes *rgg* diffèrent les uns par rapport aux autres, suggérant que chacune d'elles seraient requises dans des conditions de croissance différentes. Ces données posent l'hypothèse que les protéines Rgg participeraient à la régulation fine et complexe de l'expression génique de *S. thermophilus*.

Mots-clés : *Streptococcus thermophilus*, Rgg, régulateur transcriptionnel globale, quorum sensing, adaptation environnementale, stress.

Summary

Streptococcus thermophilus, a bacterium used as starter in dairy industries, is subjected, during the manufacture of fermented products, to many stresses that it must face to survive. To adapt to these environmental changes, it mobilizes various defense systems controlled by regulatory networks including transcriptional regulators. Among them, are those of the *rgg* family that are present in multiple copies in the genomes of *S. thermophilus* (between 5 and 7 copies according to the strain).

This study aims to characterize the *rgg* genes of *S. thermophilus* LMG18311 and more specifically their involvement in *S. thermophilus* adaptation to its environment. This work shows that the *S. thermophilus* LMG18311 rgg_{0182} gene encodes a transcriptional regulator controlling the transcription of its flanking shp_{0182} genes that probably encodes a pheromone. This suggests that the Rgg_{0182}/Shp_{0182} pair could be involved in a quorum sensing mechanism. This work also demonstrates that the Rgg_{0182} protein is involved in *S. thermophilus* tolerance to heat stresses. Moreover, the rgg_{0182} deletion confers to the mutant shorter chains of cells than the parental strain, suggesting that the Rgg_{0182} protein regulates the transcription of genes involved in cell separation. In addition, the mutant Δrgg_{0182} cells exhibit a thermo-induced adhesion phenotype via hydrophobic interactions with walls of microplate wells. Analyses by atomic force microscopy of LMG18311 cells of the wildtype and its derivative rgg_{0182} mutant reveal the presence of polymers only on the surface of the wild-type strain, suggesting that the protein Rgg_{0182} would regulate the expression of surface proteins. A proteomic study coupled with transcriptomic analysis led to the identification of several genes belonging to the regulon of Rgg_{0182}, whose products are involved in various biological functions, such as general stress response, carbohydrate metabolism, pyrimidine and arginine biosynthesis and transcriptional regulation. The data obtained in this work have shown that the *S. thermophilus* LMG18311 rgg_{0182} genes encodes a global regulator of gene expression.

Furthermore, transcriptional analyses, in different growth conditions, of the 7 *rgg* genes present in the genome of *S. thermophilus* LMG18311 showed that they display different expression profiles that are modulated by environmental conditions. This suggests that these genes would be required in distinct growth conditions. These data raise the hypothesis that Rgg proteins participate in the fine and complex regulation of *S. thermophilus* gene expression.

Key words : *Streptococcus thermophilus*, Rgg, global transcriptional regulator, quorum sensing, environmental adaptation environnementale, stress.