



HAL
open science

Mémoire pour l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches

Rozenn Gardan

► **To cite this version:**

Rozenn Gardan. Mémoire pour l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches. Sciences du Vivant [q-bio]. Université paris sud, 2014. tel-04106661

HAL Id: tel-04106661

<https://hal.inrae.fr/tel-04106661v1>

Submitted on 25 May 2023

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.



Mémoire pour l'obtention du diplôme d'Habilitation à Diriger des Recherches

TITRES & TRAVAUX

de

Rozenn GARDAN

Chargée de Recherche 1^{ère} Classe



Institut Micalis
INRA, Domaine de Vilvert
F-78352 Jouy-en-Josas

Soutenance le 17/12/2014 devant le jury composé de :

Mme I. MARTIN-VERSTRAETE
M. P. GLASER
M. P. PIVETEAU
Mme S. NESSLER
Mme S. QUEVILLON-CHERUEL
Mme V. MONNET

Rapporteur (Pr. Université Paris Diderot)
Rapporteur (Chef de laboratoire Inst. Pasteur)
Rapporteur (MCF Université de Bourgogne)
Examineur (Pr. Université Paris Sud)
Examineur (CR CNRS)
Examineur (DR INRA)

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres du jury qui ont accepté de consacrer un peu de leur temps à l'analyse critique de ce travail ; Isabelle Martin-Verstraete, Philippe Glaser et Pascal Piveteau qui ont accepté d'être rapporteurs, Sylvie Nessler et Sophie Quevillon-Cheruel qui ont accepté d'être examinateurs. Vous avez tous répondu positivement, immédiatement et sans réserve à ma demande et je vous en suis très reconnaissante.

Véronique, je t'ai aussi demandé de participer à ce jury en tant qu'examinateur afin d'exprimer ma reconnaissance. Cela fait maintenant douze années que nous travaillons ensemble et je n'ai pas vu le temps passé. Nos compétences complémentaires ainsi que nos personnalités différentes nous ont permis de travailler, de mon point de vue, de manière efficace et harmonieuse. Je te remercie particulièrement pour l'énergie que tu as su insuffler dans les projets innovants du labo et aussi pour avoir pris mon relais quand cela a été nécessaire. J'ai la chance de pouvoir travailler avec beaucoup de liberté sur le QS chez les streptocoques, c'est une thématique que j'espère poursuivre car que je la trouve passionnante.

Colette, tu n'es pas encore partie que je te pleure déjà. Comment vais-je pouvoir avancer sans toi ? Avec qui vais-je pouvoir parler de l'importance de la préculture ou de la manière de préparer du MCD. J'ai un challenge pour cette fin d'année, trouver un sujet sympa pour que tu termines en beauté. Merci pour le beau travail que tu as fait avec moi, pour ton investissement au moment de la course pour la compétence et pour ta patience quand trop débordée, j'ai du mal à te à formaliser un planning de manip assez consistant.

David, grâce à ton travail, ton investissement et ta passion des bactéries pathogènes, nous avons pu faire du beau travail avec GBS. J'espère que nous pourrons rapidement valoriser tout ces résultats avec des papiers qui te permettront de continuer une belle carrière de chercheur. Merci pour les discussions très enrichissantes que nous pouvons avoir à l'occasion des rédactions de projets, papiers..., elles m'apportent beaucoup. Merci aussi nos échanges culturelles ou animaliers.

Françoise, merci pour tous les échanges riches et variés que nous pouvons avoir, tant professionnels que personnels. Comme c'est salutaire de refaire avec toi le monde... de la recherche. C'est aussi réconfortant d'avoir quelqu'un à ses cotés toujours disponible pour relire en urgence un papier ou un projet. J'espère que nous allons pouvoir bientôt lier les TCS à la compétence ou à un autre sujet qui me tient à cœur. Enfin, en vrac, grâce à toi, je fais un peu de sport, je fais pousser St dans du lait, je peux parler avec beaucoup de sérieux, dans la

vie civile, du yaourt ou des probiotiques, je prends l'air l'après midi, j'ai découvert la bio avec Sandrine...

Vincent, un grand merci pour ta disponibilité, tes lectures critiques, tes conseils et tes remises en cause de mes modèles simplistes même si je persiste à croire qu'Eep coupe SHP et ComS, à l'intérieur, à l'extérieur ou dans la membrane ?

De nombreux étudiants ont participé à mon travail. Tous m'ont appris quelque chose. Je remercie particulièrement Betty pour son dynamisme, sa rigueur et sa grande capacité de travail qui ont permis au sujet SHP/Rgg de décoller.

Je remercie aussi les techniciens qui permettent au laboratoire de fonctionner et aux manips d'avancer, Coralie, qui découvre la microbio avec enthousiasme, Mylène qui découvre la bio mol et qui m'a été d'une aide précieuse pour la mise en page de ce manuscrit, Christine, la reine des cinétiques lux + peptide, Benjamin qui s'occupe de la laverie. Je n'oublie pas les « anciens », Christophe, Emilie et Pascal...

Merci à l'équipe FLEC pour les moments conviviaux partagés. Que le bâtiment serait triste sans vous.

Merci à la plateforme, Alain grâce à toi, que de chemin parcouru pour moi en MS et quelle patience pour m'expliquer pour la Xième fois comment fonctionne un orbitrap, Didier, que les cafés seraient amères sans toi, Céline et Anne, notre petite dernière.

Dans l'Institut Micalis, j'aurais trop de gens à citer. Cependant, je remercie Philippe qui nous a permis de nous lancer sur GBS en toute connaissance de cause (ça pousse mal, il y a peu d'outils...) et qui par son œil externe et critique enrichi notre travail. J'ai une pensée affectueuse pour Marie, Pascale, Muriel et Christine, nous ne brainstormons pas assez à mon goût, sachons mettre en avant les vraies priorités, la convivialité, les échanges...

Pierre, merci pour les analyses bioinfo que tu as faites pour nous, si seulement j'avais plus de temps pour analyser les méga tableaux que tu nous as envoyés...

Si la vocation de chercheur est une maladie génétique ou virale, elle me vient de mon père et elle est incurable, merci pour cette transmission, dès mon plus jeune âge.

Si je peux travailler dans de bonnes conditions, c'est grâce au soutien inconditionnel de mes proches, Laurent, ma mère, ma renaissance est incommensurable.

Enfin, merci à Adri et JujuG, grâce à vous, je garde les pieds sur terre !

SOMMAIRE

CURRICULUM VITÆ	1
TRAVAUX DE RECHERCHE ANTERIEURS A 2002.....	9
1. Contrôle du catabolisme de l'arginine chez <i>Bacillus subtilis</i>	11
1.1 Contexte	11
1.2 Résultats	13
2. Stage post-doctoral	15
2.1 Analyse fonctionnelle du génome de <i>B. subtilis</i>	15
2.1.1 Contexte	15
2.1.2 Résultats.....	16
2.2 Catabolisme de l'isoleucine et la valine	16
2.2.1 Contexte	16
2.2.2 Résultats.....	17
3. Réponse au stress salin et alcalin chez <i>Listeria monocytogenes</i>	19
3.1 Contexte	19
3.2 Résultats	19
TRAVAUX DE RECHERCHE POSTERIEURS A 2002	23
1. Introduction	26
1.1 Le quorum sensing chez les bactéries Gram-positives.....	26
1.2 Contexte et stratégie	26
2. Résultats	29
2.1 Identification d'un nouveau mécanisme de QS spécifique des streptocoques..	29
2.2 Contrôle du développement de la compétence naturelle chez <i>S. thermophilus</i>	35
PROJETS DE RECHERCHE.....	39
1. Contrôle de la compétence chez <i>S. thermophilus</i>	41
1.1 Les enjeux	41
1.2 Vie extracellulaire de ComS : sécrétion et maturation (<i>Projet N°1</i>).....	42
1.3 Biodiversité de la compétence chez <i>S. thermophilus</i> (<i>Projet N°2</i>)	44
2. Mécanisme SHP/Rgg chez un streptocoque pathogène (<i>Projet N°3</i>)	49
3. Conclusion.....	52
BIBLIOGRAPHIE	53
ANNEXES	55

CURRICULUM VITÆ

Rozenn GARDAN

Chargée de Recherche 1^{ère} Classe INRA

Née le 9 novembre 1969, 2 enfants

Equipe « Peptides et Communication Bactérienne »

Unité MICALIS, Bât.526

INRA, UMR 1319

Domaine de Vilvert

78352 Jouy en Josas Cedex

<http://www.micalis.fr/micalis/Poles-et-Equipes/Pole-Risques/ComBac-Monnet>

01 34 65 27 70

rozenn.gardan@jouy.inra.fr

FORMATION

1996 Doctorat de Microbiologie. Université Paris 7. Thèse soutenue le 16/12/1996.

Directeur de thèse: Michel Débarbouillé.

1993 DEA de Microbiologie Générale. Université Paris 7.

1992 DAA Biologie Appliquée à l'Agronomie, mention 'Microbiologie et Génétique des Micro-organismes', à l'Institut National Agronomique Paris-Grignon.

Diplôme d'Ingénieur Agronome de l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes.

PARCOURS SCIENTIFIQUE

2010-2013 Chargée de Recherches 1^{ère} classe. Equipe « Peptides et communication bactérienne », Unité MICALIS, UMR1319, INRA, Centre de Jouy.

2003-2010 Chargée de Recherches 1^{ère} classe. Unité de Biochimie et Structure des Protéines, INRA, Centre de Jouy.

1998-2002 Chargée de Recherches 2^{ème} classe. Equipe « Microbiologie », Station de Recherches sur la Viande, INRA, Centre de Clermont-Ferrand-Theix.

1997-1998 Chercheur post-doctoral. Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, Paris.

1993-1996 DEA et Doctorat (allocataire de recherche et moniteur). Unité de Biochimie Microbienne, Institut Pasteur, Paris.

ACTIVITES LIES A LA RECHERCHE

Bourses et contrats de recherche

- 2014** Dépôt d'une pré-proposition ANR qui a été refusée.
Participation à un projet ANSES (retour prévu fin 2014).
- 2013** Financement post-doctoral Marie Curie IEF. Participation à la rédaction.
- 2007-2012** Participation à la rédaction d'un projet ANR blanc par an. Ces projets n'ont pas été retenus.
- 2008** Bourse de thèse du ministère. Rédaction du dossier, recrutement et préparation de la candidate au concours.

Expertise d'articles scientifiques

- 2010-2014** 4 AEM, 3 J. of proteomic research, 2 J. of Bacteriol., 1 Microbiol Cell Factories, 1 Scientific reports, 1 BMC Microbiol.

Participation à des jury diplômants

- 2013** Rapporteur de la thèse de Céline Boutry, Université catholique de Louvain-la-neuve.

Participation à un comité de thèse

- 2013-2014** Comité de Flavia Aburjaile, INRA Rennes.

Valorisation

- 2009-2013** Participation à la rédaction et valorisation du brevet EP2248823, WO2010/125091, US2012/0040365 « new competence stimulating peptide ». (inventeur principal (70%)).

Participation à un jury de concours

- 2014** Rapporteur dans un jury de recrutement de MCF à l'université de Dijon.

ENCADREMENT

- 2011-2013** David PEREZ-PASCUAL, stagiaire post-doctoral, bourse Marie Curie IEF. CellCom-GBS. Co-encadrement à 40 % (*1 article en révision à mBio*).
- 2008-2011** Betty FLEUCHOT, Doctorat de l'Université Paris 11. Les régulateurs transcriptionnels Rgg : confirmation de leur implication dans des phénomènes de quorum sensing et identification de leurs cibles. Encadrement à 90%. (*3 articles publiés, 1 en révision*).
- Janv.-juin 2008** Maximilien COTE, Master 2, Université Paris 11. Caractérisation d'un nouveau système de quorum sensing spécifique de la famille des streptocoques. Encadrement à 100%.
- Janv.-juin 2007** Guillaume NARDOUX, Master 2, Université Versailles Saint Quentin. Etude de l'implication d'un petit peptide hydrophobe dans un phénomène de communication cellulaire chez *Streptococcus thermophilus* LMD9. Encadrement à 100%.
- 2003-2007** Mariam IBRAHIM, Doctorat de l'Université Paris 11. Petits gènes et peptides sécrétés chez *Streptococcus thermophilus* : identification et implication potentielle dans la communication inter-cellulaire. Co-encadrement à 50% avec V. Monnet. (*2 articles publiés*).
- Janv.-juin 2000** Ophélie DUCHE, Doctorat de l'Université de Clermont-Ferrand. Etude de la réponse au stress salin chez *Listeria monocytogenes*. Co-encadrement à 20%. (*1 article publié*).

LISTE DES PUBLICATIONS

Article dans des revues internationales à comité de lecture (*corresponding author)

1. S. Calogero, **R. Gardan**, P. Glaser, J. Schweizer, G. Rapoport, and M. Débarbouillé. **1994**. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* 176:1234-1241.
2. **R. Gardan**, G. Rapoport, and M. Débarbouillé. **1995**. Expression of the *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 249:843-856.
3. **R. Gardan**, G. Rapoport, and M. Débarbouillé. **1997**. Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 24:825-837.

4. M. Débarbouillé, **R. Gardan**, M. Arnaud, and G. Rapoport. **1999**. Role of BkdR, a transcriptional activator of the SigL-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 181:2059-2066.
5. D. Robichon, M. Arnaud, **R. Gardan**, Z. Pragai, M. O'Reilly, G. Rapoport, and M. Débarbouillé. **2000**. Expression of a new operon from *Bacillus subtilis*, *yzkB-ykoL*, under the control of the TnrA and PhoP-phoR global regulators. J. Bacteriol. 182:1226-1231.
6. **R. Gardan***, O. Duché, S. Leroy-Setrin, the european genome consortium, and J. Labadie. **2003**. Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. Appl. Environ. Microbiol. 69:154-161.
7. K. Kobayashi, et al. **2003**. Essential *Bacillus subtilis* genes. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100:4678-4683.
8. **R. Gardan***, P. Cossart, the european genome consortium, and J. Labadie. **2003** Identification of *Listeria monocytogenes* genes involved in salt and alkaline-pH tolerance. Appl. Environ. Microbiol. 69:3137-3143.
9. M. Ibrahim, P. Nicolas, P. Bessières, A. Bolotin, V. Monnet, and **R. Gardan***. **2007**. A genome-wide survey of short coding sequence in streptococci. Microbiology. 153:3631-3644.
10. M. Ibrahim, 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. 189:8844-8854.
11. **R. Gardan***, 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. 191:4647-4655.
12. B. Fleuchot, 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. 80:1102-1119.
13. R. Henry, E. Bruneau, **R. Gardan**, S. Bertin, B. Fleuchot, B. Decaris, and N. Leblond-Bourget. **2011**. The *rgg0182* gene encodes a transcriptional regulator required for the full *Streptococcus thermophilus* LMG18311 thermal adaptation. BMC Microbiol. 11:223
14. L. Fontaine, P. Goffin, H. Dubout, B. Delplace, A. Baulard, N. Lecat-Guillet, E. Chambellon, **R. Gardan**, and P. Hols **2013**. Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci. Mol Microbiol. 87:1113-1132.
15. **R. Gardan***, C. Besset, C. Gitton, A. Guillot, L. Fontaine, P. Hols, and Monnet V. **2013**. Extracellular life cycle of ComS, the competence-stimulating peptide of *Streptococcus thermophilus*. J Bacteriol. 19:1845-55.

16. B. Fleuchot, A. Guillot, C. Mézange, C. Besset, E. Chambellon, V. Monnet, and **R. Gardan***. 2013. Rgg-associated SHP signaling peptides mediate cross-talk in streptococci. *Plos One*. 8:e66042.
17. D. Pérez-Pascual, P. Gaudu, B. Fleuchot, C. Besset, A. Guillot, V. Monnet, and **R. Gardan**. 2014. RovS and its associated signaling peptide form a cell-to-cell communication system required for *Streptococcus agalactiae* pathogenesis. *Accepté dans mBio*.
18. V. Monnet, V. Juillard, and **R. Gardan**. 2014. Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* 8 :1-13.

Chapitre de livres

- Débarbouillé M., **Gardan R.**, Arnaud M. and Rapoport G. Chapitre 30 : nitrogen sources. *Functional analysis of bacterial genes: a practical manual*. Edited by Schumann, W., Ehrlich, S.D. and Ogasawara, N. Published by John Wiley & Sons, Ltd.
- **Gardan R.**, Arnaud M., Robichon D. and Débarbouillé M. Chapitre 30A: induction or repression by nitrogen sources. *Functional analysis of bacterial genes: a practical manual*. Edited by Schumann, W., Ehrlich, S.D. and Ogasawara, N. Published by John Wiley & Sons, Ltd.
- Arnaud M., **Gardan R.** and Robichon D. Chapitre 25A: catabolite repression by glucose. *Functional analysis of bacterial genes: a practical manual*. Edited by Schumann, W., Ehrlich, S.D. and Ogasawara, N. Published by John Wiley & Sons, Ltd.

Brevet

- EP2248823, WO2010/125091, US2012/0040365 « new competence stimulating peptide ».

Posters et communications orales

- M. Débarbouillé**, S. Calogero, R. Gardan, P. Glaser and G. Rapoport. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis* belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional regulators. Seventh International conference on *Bacillus*, 18-23 juillet 1993, Institut Pasteur, Paris. *Communication orale*.
- M. Débarbouillé** and R. Gardan. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis* belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional regulators. XIVth international arginine workshop, 12-14 septembre 1994, Paris. *Communication orale*.
- R. Gardan**, M. Débarbouillé and G. Rapoport. Expression of *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. Workshop on transcriptional regulation at distance, 15-17 janvier 1996, Madrid. *Poster*.
- R. Gardan**, I. Martin-Verstraete, M. Arnaud, G. Rapoport and M. Débarbouillé. Regulation of sigmaL directed transcription in *Bacillus subtilis*. IXth international conference on *Bacillus*, juillet 1997, Lausanne. *Poster*.
- R. Gardan**, O. Duché, P. Cossart and J. Labadie. Identification de gènes impliqués dans la résistance aux stress salins et alcalin chez *L. monocytogenes*. Colloque SFM « de la génomique au génie métabolique », septembre 2000, Institut Pasteur, Paris. *Poster*.

- R. Gardan**, O. Duché, P. Cossart and J. Labadie. Etude de la réponse aux stress salins et alcalin chez *L. monocytogenes*. Colloque SFM « les micro-organismes des aliments », octobre **2000**, Institut Pasteur, Paris. **Poster**.
- M. Ibrahim, P. Nicolas, P. Courtin, P. Bessières, A. Bolotin, P. Hols, V. Monnet and **R. Gardan**. Recherche de peptides de signalisation chez *S. thermophilus*. Congrès de la SFM, 10-12 mai **2004**, Bordeaux. **Poster**.
- M. Ibrahim, P. Nicolas, P. Courtin, P. Bessières, A. Bolotin, P. Hols, V. Monnet and **R. Gardan**. Short secreted peptides as signals for communication in *S. thermophilus*. ASM conference on cell-cell communication, 23-27 juillet **2004**, Banff. **Poster**.
- R. Gardan**, M. Ibrahim, A. Guillot, F. Wessner, F. Algaron, C. Besset, P. Courtin and V. Monnet. A new quorum sensing system controls the production of a secreted cyclic peptide in *S. thermophilus*. ASM conference on cell-cell communication in bacteria, 7-10 octobre **2007**, Austin, USA. **Poster**.
- R. Gardan**, C. Besset, A. Guillot, A. Benjdia, O. Berteau, L. Fontaine, C. Boutry, P. Hols and V. Monnet. A new quorum sensing system controls the production of a secreted cyclic peptide in *S. thermophilus*. 9th Symposium on lactic acid bacteria; 31 août- 4 septembre **2008**, Egmond aan Zee, The Netherlands. **Poster**.
- R. Gardan**, A. Guillot, C. Gitton, C. Besset et V. Monnet. Apport d'une approche protéomique combinant SDS-PAGE et LC-MS/MS à l'étude d'un nouveau système de quorum sensing spécifique des streptocoques. Ecole Thématique de Microbiologie Moléculaire, 6-10 octobre **2008**, Carry-le-Rouet. **Communication orale**.
- B. Fleuchot, C. Gitton, A. Guillot, C. Besset, V. Monnet and **R. Gardan**. Molecular basis for a new quorum sensing mechanism in streptococci. SGM conference, 7 septembre **2010**, Nottingham. **Communication orale**.
- B. Fleuchot, C. Gitton, A. Guillot, C. Besset, V. Monnet et **R. Gardan**. Un nouveau mécanisme de quorum sensing spécifique des streptocoques. Ecole Thématique de Microbiologie, 11-15 octobre **2010**, Giens. **Communication orale**.
- B. Fleuchot, C. Gitton, A. Guillot, C. Besset, V. Monnet and **R. Gardan**. Molecular basis for a new quorum sensing mechanism in streptococci. Conférence Jacques Monod, 31 mai **2010**, Paris. **Poster**.
- R. Gardan**, C; Besset A. Guillot, C. Gitton and V. Monnet. A new quorum sensing mechanism controls the development of competence for natural transformation in *Streptococcus thermophilus*. Club des bactéries lactiques, 27-29 octobre **2010**, Nancy. **Poster**.
- B. Fleuchot, P. Nicolas, A. Guillot, V. Monnet and **R. Gardan**. Do the SHP pheromones allow cell-cell communication between different streptococci species? 6th International conference on Gram+ microorganisms, 19-23 juin **2011**, Montecatini. **Poster**.
- R. Gardan**, C. Besset, C. Gitton, A. Guillot, L. Fontaine, P. Hols and V. Monnet. The extracellular life cycle of the signaling peptide ComS involved in the triggering of the competence state in *Streptococcus thermophilus*. 6th International conference on Gram+ microorganisms, 19-23 juin **2011**, Montecatini. **Poster**.
- B. Fleuchot, C. Gitton, A. Guillot, J. Vidic, P. Nicolas, C. Besset, L. Fontaine, P. Hols, N. Leblond-Bourget, V. Monnet and **R. Gardan**. Rgg-associated Small Hydrophobic Peptides: a new family of pheromones involved in quorum sensing in streptococci. 6th International conference on Gram+ microorganisms, 19-23 juin **2011**, Montecatini. **Communication orale**.
- B. Fleuchot, A. Guillot, C. Mézange, C. Besset, E. Chambellon, V. Monnet and **R. Gardan**. Rgg-associated SHP signaling peptides mediate cross-talk in streptococci. 7th International conference on Gram+ microorganisms, 23-27 juin **2013**, Montecatini. **Poster**.
- D. Pérez-Pascual**, R. Gardan, P. Gaudu, V. Monnet. Peptide-mediated quorum sensing communication in *Streptococcus agalactiae*. 7th International conference on Gram+ microorganisms, 23-27 juin **2013**, Montecatini. **Communication orale**.

TRAVAUX DE RECHERCHE ANTERIEURS A 2002

Je vais présenter de manière chronologique mes travaux de recherche qui comprennent trois thématiques différentes :

(1) de 1994 à 1996, j'ai étudié la régulation du catabolisme de l'arginine chez *Bacillus subtilis*, au cours de ma thèse ;

(2) puis pendant deux ans, dans le cadre d'un stage post-doctoral financé par la communauté européenne, je me suis intéressée aux gènes de fonction inconnue codés par le génome de *B. subtilis* ainsi qu'au contrôle du catabolisme des acides aminés branchés chez cette même bactérie ;

(3) enfin, suite à mon recrutement en tant que chargée de recherche à l'INRA au centre de Theix, j'ai étudié la réponse au stress chez *Listeria monocytogenes*.

1. Contrôle du catabolisme de l'arginine chez *Bacillus subtilis*

En 1994, l'unité de Biochimie Microbienne, dirigée par G. Rapoport, avait pour thématique la régulation de l'expression génétique chez les bactéries Gram-positives. Lors de mon stage de DEA, j'ai rejoint le groupe dirigé par M. Débarbouillé. J'ai commencé par étudier la régulation du catabolisme de l'arginine chez *B. subtilis* et poursuivi ce travail durant ma thèse.

1.1 Contexte

B. subtilis est une bactérie du sol, sporulante, Gram-positive. La compétence naturelle de cette bactérie, associée à des fonctions de recombinaison homologue très efficaces, a permis à un développement très important de la génétique de ce microorganisme.

L'étude de la sporulation a mis en évidence le rôle prédominant des facteurs σ alternatifs. Ceux-ci modifient la spécificité de reconnaissance des promoteurs par l'ARN-polymérase. Le facteur σ^{54} de *B. subtilis* contrôle l'utilisation des lévanes comme source de carbone, de l'arginine et de l'ornithine, de l'isoleucine et de la valine comme sources d'azote.

Au cours de mon DEA puis de ma thèse, je me suis attachée à étudier la régulation transcriptionnelle exercée par le facteur σ^{54} chez *B. subtilis* par l'analyse d'un système concernant le catabolisme de l'arginine. Nous avons entrepris ce

travail afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation par un facteur σ^{54} chez une bactérie Gram-positif mais aussi afin d'évaluer l'importance de ce facteur σ alternatif dans la régulation globale de l'assimilation de l'azote chez *B. subtilis*.

La voie dite de l'arginase a été mise en évidence par l'équipe de Simon Baumberg (Université de Leeds, Grande-Bretagne) par la mesure des activités enzymatiques qui la composent (figure 1).

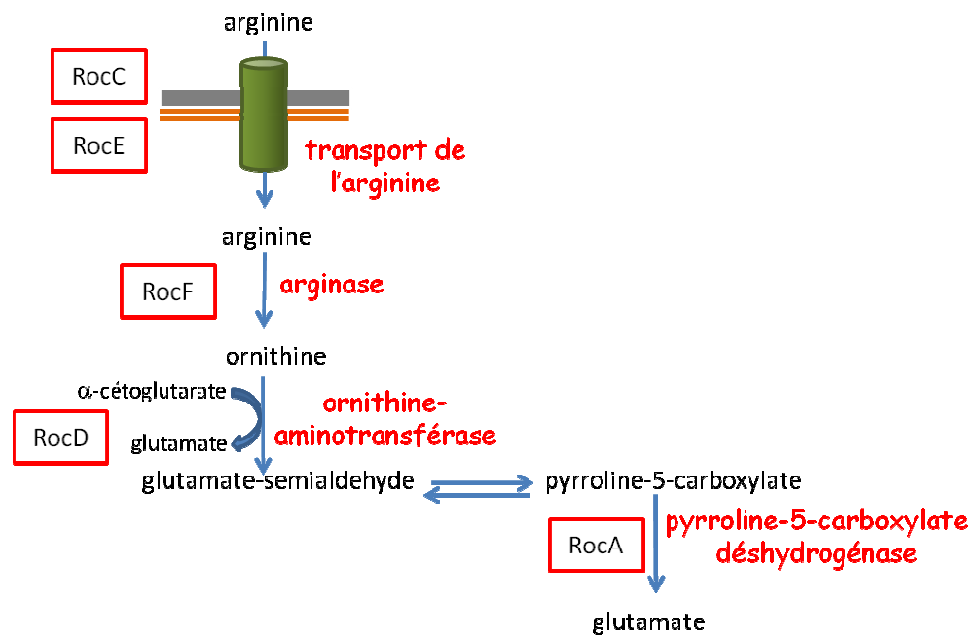


Figure 1: La voie de l'arginase chez *B. subtilis*

Dans le cadre du projet européen de séquençage du génome de *B. subtilis*, un opéron, *rocABC* a été mis en évidence par P. Glaser (Institut Pasteur, Paris). Il a montré que le gène *rocA* code une pyrroline-5-carboxylate déshydrogénase. Le gène *rocB* est de fonction inconnue, le gène *rocC* code probablement une arginine perméase. Ces données nous indiquaient que cet opéron était probablement impliqué dans le catabolisme de l'arginine. De plus, la séquence de la région promotrice de cet opéron nous suggérait que l'expression de *rocABC* était probablement contrôlée par le facteur σ^{54} . Nous avons donc entrepris l'étude de la régulation de cet opéron. Nous avons en particulier cherché à identifier le régulateur positif associé. En effet, il avait été montré que tous les promoteurs contrôlés par le facteur σ^{54} sont aussi contrôlés positivement par des régulateurs dits à domaine central. Nous avons aussi

entrepris l'identification des autres gènes impliqués dans le catabolisme de l'arginine.

1.2 Résultats

⇒ Identification d'un opéron *rocDEF* codant les deux premières étapes de la voie de l'arginase

La mutagénèse d'une souche portant une fusion *rocA-lacZ* a permis le clonage d'un nouveau gène régulateur à domaine central, RocR, contrôlant l'expression de l'opéron *rocABC*. En amont du gène codant le régulateur RocR, le début d'une phase ouverte de lecture présentant de fortes similitudes avec des ornithine aminotransférases a été identifié. Le clonage et le séquençage de la région d'ADN en aval de cette phase ouverte de lecture a permis l'identification d'un opéron de trois gènes, *rocDEF*. Nous avons montré que le premier gène de cet opéron, *rocD*, code une ornithine aminotransférase (OAT), le deuxième, *rocE*, code probablement une arginine perméase, enfin le troisième, *rocF*, code une arginase (figure 1).

L'ornithine aminotransférase de *B. subtilis* a été la première OAT d'origine procaryote à être identifiée et elle montre une remarquable conservation avec les OAT d'origine eucaryote.

⇒ *rocABC* et *rocDEF* : deux opérons contrôlés positivement par le facteur σ^{54} et le régulateurs RocR

Le gène codant la protéine RocR a été cloné au laboratoire par Sabina Calogero et ce travail a été poursuivi par le séquençage du gène. La protéine RocR présente des similitudes avec les régulateurs à domaine central au niveau de son domaine central (domaine d'hydrolyse de l'ATP) et de son domaine carboxyterminal (domaine de fixation à l'ADN). Par contre, son domaine aminoterminal est différent. Celui-ci permet habituellement une modulation de l'activité de ces protéines.

Nous avons pu montrer que :

- RocR, et σ^{54} sont indispensables à l'expression des opérons *rocABC* et *rocDEF*,

- des séquences consensus dites -12 -24 (caractéristiques des sites de fixation du complexe ARN polymérase- σ^{54}) sont présentes en amont des démarrages de transcription des deux opérons,

- les cibles putatives de RocR (identifiées comme des séquences d'ADN indispensables à l'expression des deux opérons ou UAS) sont localisées très en amont des démarrages de transcription de *rocABC* et de *rocDEF* et présentent des similitudes entre elles,

- les deux opérons ne sont exprimés que dans des conditions spécifiques : présence d'arginine, d'ornithine ou de proline dans le milieu.

Nous avons aussi montré que l'expression du gène *rocR* est autorégulée négativement. Tous ces résultats sont résumés sur la figure 2.

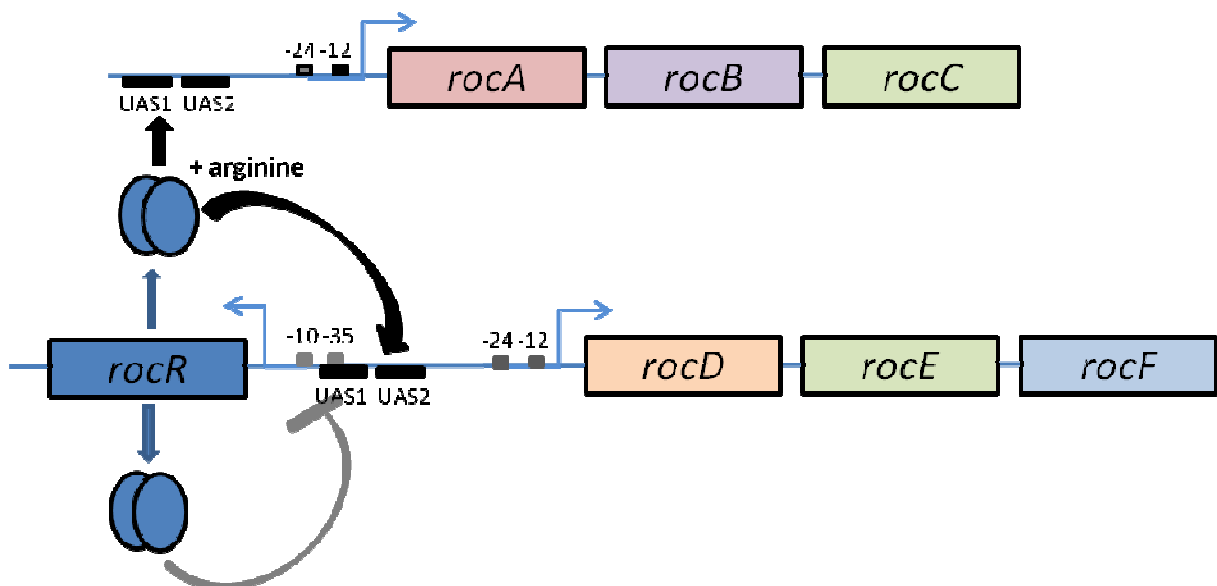


Figure 2: Le régulon Roc. Les flèches fines brisées indiquent les démarrages de transcription. Les flèches épaisses noires symbolisent une activation alors que la forme grise avec un \perp symbolise une répression.

- S. Calogero, R. Gardan, P. Glaser, J. Schweizer, G. Rapoport, and M. Débarbouillé. 1994. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. *J. Bacteriol.* 176:1234-1241.
- R. Gardan, G. Rapoport, and M. Débarbouillé. 1995. Expression of the *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 249:843-856.
- R. Gardan, G. Rapoport, and M. Débarbouillé. 1997. Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 24:825-837.

2. Stage post-doctoral

Après ma thèse, je suis restée dans le même laboratoire mais en changeant de thématique afin de pouvoir participer au programme d'analyse fonctionnelle du génome de *B. subtilis*. Ce programme faisait suite au programme de séquençage du génome complet de cette bactérie. Son but était de rechercher les fonctions possibles de gènes dont les produits ne présentaient aucune similitude avec les données des banques.

En parallèle, un travail sur la régulation du catabolisme de l'isoleucine et de la valine a été entrepris.

Ces deux projets ont été menés au laboratoire en collaboration avec M. Débarbouillé et M. Arnaud.

2.1 Analyse fonctionnelle du génome de *B. subtilis*

2.1.1 Contexte

Le programme d'analyse fonctionnelle du génome de *B. subtilis* a été financé par la Communauté Européenne. Il a été réalisé par un ensemble de 18 laboratoires européens dont 7 français.

Le programme proposé consistait d'une part, à interrompre systématiquement les gènes codant des protéines de fonction inconnue et d'autre part, à définir des caractéristiques phénotypiques pour ces mutants. Lors de la construction des mutants, les promoteurs des gènes interrompus étaient introduits en amont du gène *lacZ* d'*Escherichia coli*. Des courbes de croissance et des dosages β -galactosidases étaient effectués dans un milieu riche et dans un milieu minimum, cela constituait le premier niveau d'analyse phénotypique.

Pour le deuxième niveau d'analyse phénotypique, nous avons choisi d'étudier l'utilisation de quelques acides aminés comme sources d'azote, l'induction ou la répression par les sources d'azote, l'induction ou la répression par le glucose, l'expression des gènes en condition de stress salin.

Afin de pouvoir cribler rapidement un grand nombre de mutants, nous avons choisi un test simple qui consistait à répliquer les mutants sur différents

types de boîtes contenant un substrat chromogène de la β -galactosidase. Ces tests nous permettaient donc d'étudier le phénotype des mutants ainsi que l'expression des gènes interrompus.

2.1.2 Résultats

J'ai construit 16 mutants ne présentant pas de différence significative dans leur taux de croissance par rapport à la souche sauvage en milieu riche et en milieu minimum. Les dosages β -galactosidases effectués en phase exponentielle ou en phase stationnaire étaient dans tous les cas très faibles.

- K. Kobayashi, et al. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100:4678-4683.

2.2 Catabolisme de l'isoleucine et la valine

2.2.1 Contexte

Nous nous sommes intéressés à l'utilisation de l'isoleucine et de la valine chez *B. subtilis* car ni les voies de dégradation, ni la régulation de la synthèse des enzymes mises en jeu n'étaient connues. Cependant, le fait qu'un mutant délété du gène σ^{54} ne puisse plus utiliser l'isoleucine ou la valine comme source d'azote, nous suggérait que la synthèse d'une ou plusieurs enzymes de la voie de dégradation de ces deux acides aminés était contrôlée par un nouveau régulateur à domaine central.

Dans le cadre de la régulation globale de l'assimilation de l'azote chez *B. subtilis*, l'étude du catabolisme de ces 2 acides aminés nous a semblé intéressante car contrairement à l'arginine qui est une excellente source d'azote, l'isoleucine et la valine n'autorisent qu'une croissance lente lorsqu'elles sont utilisées comme seule source d'azote.

A l'aide d'oligonucléotides dégénérés, Tracy Nixon (Université de Pennsylvanie, Etats Unis) a amplifié le domaine central de deux nouveaux régulateurs de *B. subtilis*. A l'aide de ces deux fragments, nous avons pu construire des mutations interrompant ces deux gènes. Nous avons montré que l'un de ces deux mutants n'était plus capable d'utiliser l'isoleucine et la valine comme source d'azote. Alors que le clonage de ce nouveau régulateur à domaine central était en cours, sa

séquence complète a été obtenue par l'équipe de Y. Kobayashi (National Institute of Genetics, Japon) dans le cadre du séquençage complet du génome de *B. subtilis*. De plus, nous avons identifié à proximité de ce régulateur et transcrit dans la même orientation, un opéron putatif de sept gènes *yqiSTUVbmfBAA, BAB, BB*. La séquence de cet opéron nous indiquait qu'il était probablement impliqué dans le catabolisme de l'isoleucine et de la valine et contrôlé par le facteur σ^{54} . Nous avons donc entrepris l'étude de la régulation de l'expression de cet opéron, ainsi que l'identification de la fonction des différents gènes.

2.2.2 Résultats

⇒ **YqiR. un nouveau régulateur à domaine central contrôlant le catabolisme de l'isoleucine et de la valine chez *B. subtilis***

Ce régulateur, YqiR, présentait de fortes similitudes avec les régulateurs dépendant du facteur σ^{54} au niveau de son domaine central et de son domaine carboxyterminal. Par contre, son domaine aminoterminal, d'une longueur inhabituelle de 370 acides aminés, ne présentait pas de similitude avec le domaine aminoterminal d'autres régulateurs à domaine central, suggérant une régulation d'un type nouveau de son activité.

Nous avons construit une souche de *B. subtilis* dans laquelle le gène *yqiR* a été délété et remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine. Le mutant obtenu ne pouvait plus utiliser l'isoleucine ou la valine comme source d'azote.

⇒ **L'expression du gène *yqiS* est contrôlée par le facteur σ^{54} et YqiR**

A l'aide d'une fusion transcriptionnelle *yqiS-lacZ*, nous avons pu montrer que l'expression du gène *yqiS* est induite par l'isoleucine et la valine. Nous avons également montré que cette expression est totalement dépendante de la présence des gènes σ^{54} et *yqiR*. Nous avons confirmé la présence d'un promoteur -12/-24 par une expérience d'extension d'amorce. Enfin, nous avons identifié à une centaine de paires de bases en amont du gène *yqiS*, une séquence d'ADN palindromique indispensable à l'expression de ce gène. Nous supposons que cette séquence est la cible du régulateur YqiR.

⇒ Analyse fonctionnelle de l'opéron *yqiSTUVbmf*

Les gènes *yqiSTUV* présentent des similitudes, respectivement avec une phosphate butyryltransférase, une leucine déshydrogénase, une butyrate kinase et la protéine E3 du complexe BCDH (déshydrogénase d'acides α -cétobranchés). Les trois gènes *bmf* ont été identifiés comme codant les protéines E1 α , E1 β et E2 du complexe BCDH. Nous avons choisi d'interrompre les gènes de cet opéron putatif. Ce travail nous a confirmé que le gène *yqiT* (leucine déshydrogénase) est indispensable à l'utilisation de l'isoleucine et de la valine comme source d'azote. L'ensemble des résultats est résumé sur la figure 3.

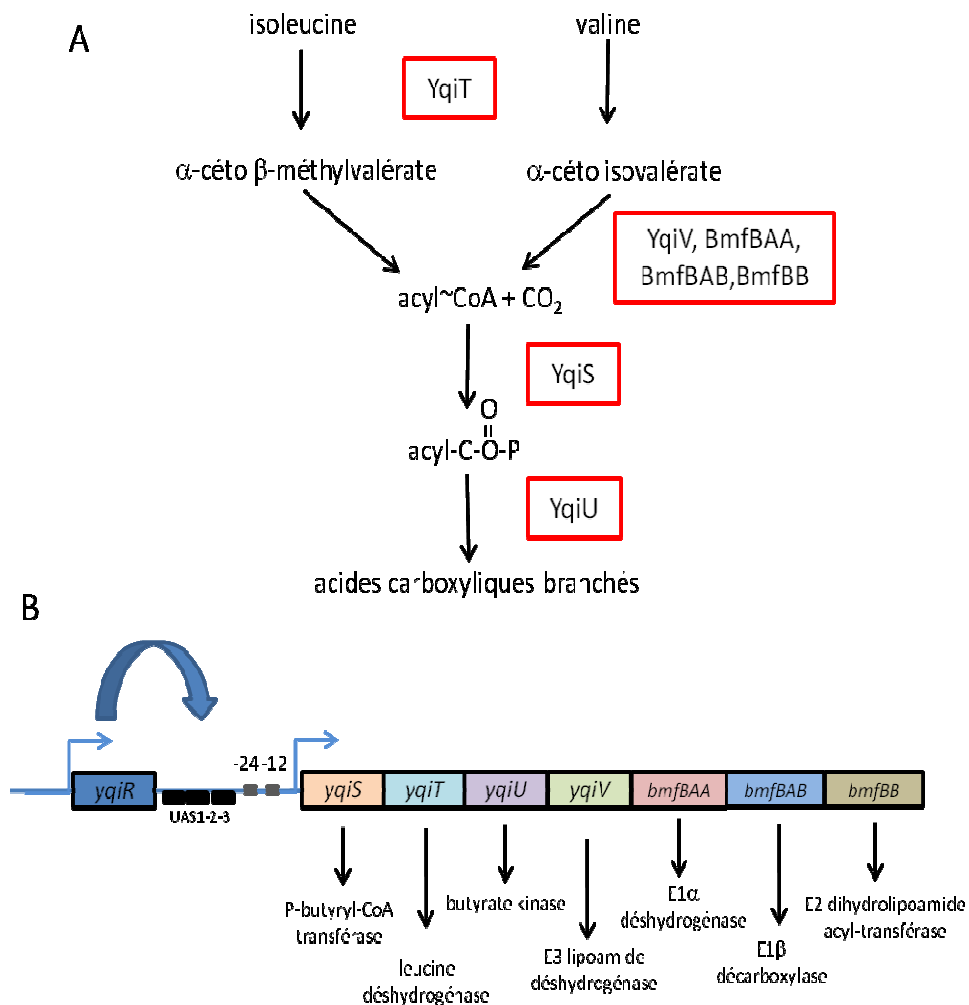


Figure 3. A. Voie de dégradation des acides aminés branchés chez *B. subtilis*. B. Organisation génétique des gènes codant les enzymes de la voie.

- M. Débarbouillé, R. Gardan, M. Arnaud, and G. Rapoport. 1999. Role of *BkdR*, a transcriptional activator of the SigL-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181:2059-2066.

3. Réponse au stress salin et alcalin chez *Listeria monocytogenes*

3.1 Contexte

Le thème de recherche sur lequel j'ai été recrutée à l'INRA était : "Etude chez *Listeria monocytogenes* de la régulation moléculaire des stress imposés par la transformation des aliments".

L. monocytogenes est une bactérie pathogène pour l'homme. La listériose humaine survient principalement de manière sporadique mais son origine alimentaire est formellement démontrée. Cette bactérie a été isolée d'environnements variés : sol, eau, végétaux. Elle est donc ubiquiste et contamine ainsi facilement les ateliers de fabrication et/ou de transformation des aliments. De plus, elle est capable de se multiplier dans des conditions difficiles telles que des températures comprises entre 3 et 45°C, des pH compris entre 5 et 9 et des concentrations élevées en sel (jusqu'à 10%). Cette bactérie contamine très fréquemment, à de faible taux, les produits carnés.

La présence de *L. monocytogenes* dans les ateliers agro-alimentaires reste donc une préoccupation majeure des industriels. L'élimination de cette bactérie des ateliers passe par le respect de règles d'hygiène strictes et de bonnes pratiques de fabrication mais aussi par la meilleure compréhension des mécanismes de résistance de cette bactérie.

Nous avons ainsi choisi d'étudier la réponse moléculaire de *L. monocytogenes* à différents stress et nous avons décidé de concentrer nos efforts sur les stress salin et alcalin car dans le cadre des ateliers de transformation des aliments, *L. monocytogenes* est soumise à des chocs osmotiques dus à de fortes concentrations en sel dans les salaisons et à des chocs alcalins lors des décontaminations des ateliers. De plus, peu d'informations étaient alors disponibles concernant les mécanismes moléculaires mis en jeu par *L. monocytogenes* pour répondre à ces deux stress.

3.2 Résultats

⇒ Identification de gènes impliqués dans la résistance au stress salin et alcalin chez *L. monocytogenes*

Pour démarrer ce projet, nous avons développé une collaboration avec P. Cossart (Directrice de l'Unité Interaction Bactéries-Cellules à l'Institut Pasteur). Celle-ci nous a fourni une banque de 2550 mutants par transposition de la souche de *L. monocytogenes*

LO28 et donné accès à la séquence complète du génome de cette souche. J'ai criblé cette banque pour la sensibilité à une concentration saline élevée et à un pH alcalin. Ce travail a permis l'isolement de 6 mutants sensibles au sel et 12 mutants à la fois sensibles au sel et à un pH alcalin.

L'identification de la position de l'insertion du transposon dans le génome de 15 mutants a été réalisée à partir d'expériences de PCR inverse. Pour 6 de ces mutants, le transposon était inséré dans des régions intergéniques et leur étude n'a pas été poursuivie. Pour les 9 autres mutants, le transposon était inséré dans des gènes, dont 2 de fonction connue, *mutS* et *mdrL* et les autres de fonction inconnue.

La caractérisation de manière plus approfondie de la physiologie de 2 mutants a ensuite été entreprise. Chez le premier mutant, le transposon était inséré dans un gène de fonction inconnue, *yadH*, codant une protéine présentant des similarités avec un ABC transporteur. Le deuxième, *lmo992*, avait un transposon inséré dans un gène de fonction totalement inconnue mais dans un opéron et en amont d'un gène, codant une protéine qui présente de fortes similarités avec un transporteur de sodium potassium, NtpJ, lié à l'homéostasie en Na^+/K^+ en conditions de stress alcalin chez *Enterococcus hirae*. Nous pouvons donc supposer que le phénotype du mutant *lmo992* était lié à un effet polaire de la mutation sur le gène *ntpJ* de *L. monocytogenes*. Nous avons montré, à l'aide d'expériences de croissance dans différents milieux, que les gènes *yadH* et *lmo992* et/ou *ntpJ* sont essentiels à la croissance en condition de stress alcalin et faiblement impliqué dans la croissance en condition de stress salin (sodium ou potassium) ou osmotique.

⇒ *ctc* est un gène impliqué dans la résistance au stress salin et dont l'expression est contrôlée par ce même stress

Parallèlement à ce travail, j'ai participé à l'encadrement d'une thèse de doctorat. En effet, O. Duché a commencé une thèse au laboratoire le 1^{er} décembre 1998 sous la direction de J. Labadie. Elle a utilisé une approche complémentaire à la mienne pour étudier la réponse physiologique et moléculaire de *L. monocytogenes* au stress salin. Par une approche protéomique, elle a mis en évidence 40 protéines dont la synthèse est spécifiquement diminuée ou augmentée au cours d'un stress salin. Douze de ces protéines ont été identifiées : 2 protéines générales de stress, DnaK et Ctc, 2 transporteurs (un ABC transporteur de glycine bétaine et un transporteur de type PTS mannose) et 8 enzymes liés à la glycolyse. J'ai encadré l'étape suivante de génétique inverse. Nous avons choisi de nous intéresser à la protéine Ctc car c'est une protéine directement liée au stress et

contrairement à la protéine DnaK ou au transporteur de glycine bétaine, cette protéine n'avait pas été étudiée chez *L. monocytogenes*. O. Duché a construit un mutant inactivé pour le gène *ctc*. J'ai ensuite caractérisé la physiologie de ce mutant et étudié la régulation de l'expression du gène *ctc*. Nous avons ainsi montré, grâce à des expériences d'hybridation d'ARN (slot blot) que la transcription du gène *ctc* est augmentée suite à un stress salin. L'analyse de la séquence promotrice du gène *ctc* nous indique que cette régulation se fait très probablement par l'intermédiaire du facteur σ^B . De plus, nous avons montré que la croissance du mutant *ctc*- est altérée en condition de stress salin mais uniquement en l'absence d'osmoprotectants dans le milieu. Des expériences de microscopie électronique nous ont montré que la morphologie du mutant était fortement altérée dans ces mêmes conditions de stress.

- R. Gardan, P. Cossart, the european genome consortium and J. Labadie. 2003 Identification of *Listeria monocytogenes* genes involved in salt and alkaline-pH tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3137-3143.
- R. Gardan, O. Duché, S. Leroy-Setrin, the european genome consortium and J. Labadie. 2003. Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:154-161.

TRAVAUX DE RECHERCHE POSTERIEURS A 2002

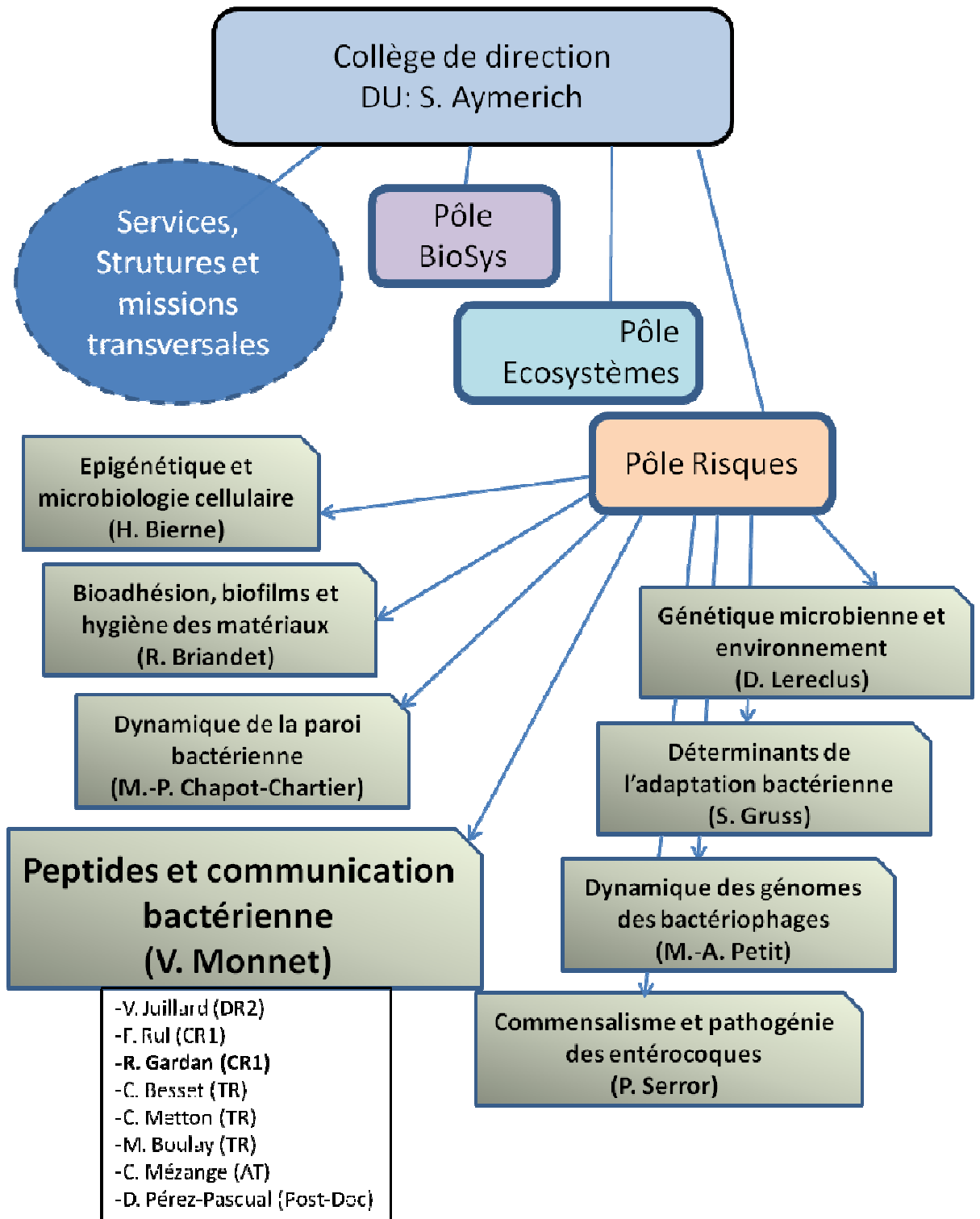


Figure 4. Organigramme de l'institut MICALIS

J'ai intégré l'Unité de Biochimie et Structure des Protéines du Centre de Jouy-en-Josas le 1^{er} septembre 2002. Au sein de cette unité dirigée par Véronique Monnet, j'ai rejoint son équipe dont le projet était alors d'identifier, pour les contrôler, les phénomènes d'interactions et de communication entre bactéries alimentaires qui sous-tendent l'établissement des écosystèmes. Dans ce cadre, un écosystème simple avait été choisi, le yaourt. Ce choix a été justifié par l'importance économique de ce produit, dont la consommation française atteint 21 kg/an /personne. De plus, bien qu'il ne mette en jeu que deux espèces bactériennes, *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, l'utilisation de ces deux ferments dans l'industrie se fait encore de manière empirique et les interactions entre ces bactéries sont mal connues. Ainsi, les industriels de l'industrie laitière cherchent à améliorer les propriétés technologiques des ferments mais aussi à mieux comprendre les interactions mises en jeu, pour mieux les contrôler.

A mon arrivée, un nouveau sujet concernant l'étude du quorum sensing (QS), m'a été confié. Dans un premier temps, nous avons choisi d'étudier le QS chez *S. thermophilus*. Cette bactérie est étudiée au laboratoire depuis de nombreuses années et son séquençage par une équipe du centre était en cours d'achèvement au démarrage de ce projet. De plus, la proximité de cette bactérie avec d'autres streptocoques pathogènes majeurs, en fait aussi un modèle intéressant pour le genre streptocoque. Enfin, au laboratoire, l'étude du transporteur d'oligopeptides Ami, dans le cadre de la thèse de Peggy Garault, suggérait que de tels phénomènes de QS existent chez *S. thermophilus*.

Depuis janvier 2010, l'unité dirigée par Véronique Monnet a été intégrée dans l'Institut MICALIS et s'est transformée en équipe « peptides et communication bactérienne » (Figure 4).

1. Introduction

1.1 Le quorum sensing chez les bactéries Gram-positives

La communication cellulaire de type QS correspond à un mécanisme de contrôle de l'expression de gènes en réponse à une augmentation de la densité cellulaire. Dans un premier temps, une molécule « signal » aussi nommée phéromone est sécrétée. Lorsque sa concentration extracellulaire atteint un certain seuil ou quorum, elle est détectée (sensing), ce qui a pour conséquence l'expression des gènes cibles de ce mécanisme, de manière coordonnée au sein d'une population. Chez les bactéries Gram-positives, les phéromones sont essentiellement de nature peptidique. Deux types de mécanismes peuvent être différenciés en fonction de la localisation de la détection du peptide. Dans le cadre d'un **mécanisme extracellulaire**, ces peptides sont perçus à la face externe des bactéries par des histidine kinases (HK) de systèmes à deux composants. L'interaction peptide/HK entraîne l'autophosphorylation de l'HK puis la phosphorylation du régulateur de réponse associé et enfin la transcription des gènes cibles. Ce type de mécanisme contrôle des fonctions comme le déclenchement de la compétence chez *S. pneumoniae* (Johnston et al, 2014), la production de bactériocines chez les bactéries lactiques ou de facteurs de virulence chez *Staphylococcus aureus* (Thoendel et al, 2011) ou *Enterococcus faecalis* (Nakayama et al, 2006). Au cours du **mécanisme dit intracellulaire**, le peptide phéromone est internalisé par un système de transport d'oligopeptides (Ami ou Opp). Puis, il est détecté par des protéines de la famille RNPP : des phosphatases de la famille Rap ou des régulateurs transcriptionnels (Declerck et al, 2007; Rocha-Estrada et al, 2010). Dans tous les cas, le peptide phéromone contrôle l'activité de ces « détecteurs » (Figure 5).

1.2 Contexte et stratégie

Chez *S. thermophilus*, aucun phénomène de QS n'avait été décrit au démarrage de notre projet. Chez les streptocoques, seuls le développement de la compétence et la production de bactériocines, deux types fonctions contrôlés par des mécanismes de QS extracellulaires avaient été identifiés. De même, chez les ferments lactiques, seule la

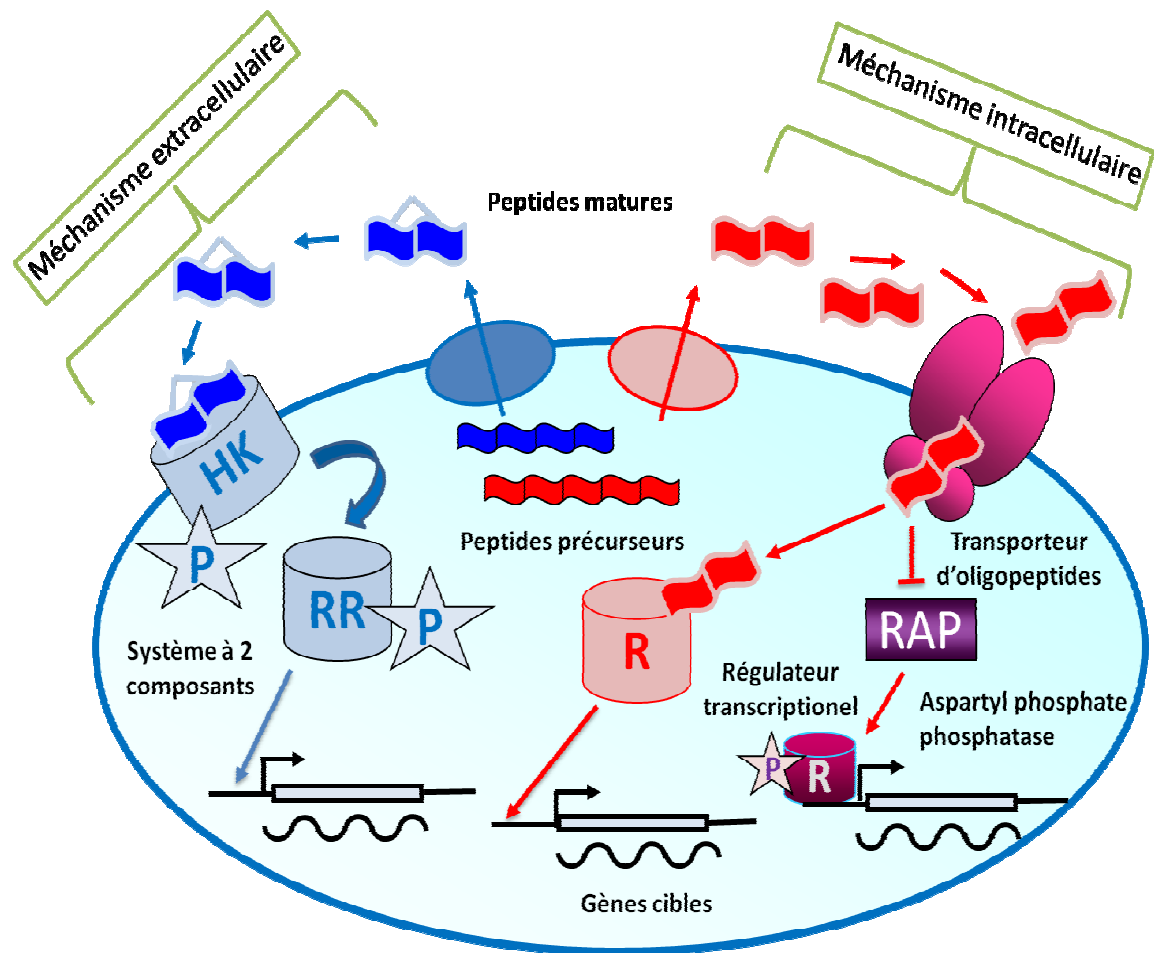


Figure 5. Représentation schématique du quorum sensing chez les bactéries Gram-positives. HK : histidine kinase, RR : régulateur de réponse, R : régulateur, P : phosphate (Monnet et al, 2014).

production de bactériocines par des mécanismes de QS extracellulaires avaient été publiés (Quadri, 2002).

Au laboratoire, Peggy Garault avait observé qu'un mutant inactivé pour le transporteur d'oligopeptides Ami (mutant Δami) a une croissance différente de celle de la souche sauvage dans un milieu chimiquement défini (MCD) sans peptides. Le rôle de ce transporteur dans l'import de peptides nutritionnels en milieu riche ou en lait a été bien décrit (Garault et al, 2002). Le fait qu'il joue aussi un rôle dans un milieu sans peptides sous-tendait qu'il est aussi impliqué dans le transport de peptides produits par la bactérie et donc peut-être dans des phénomènes de QS intracellulaire.

Afin d'identifier de tels mécanismes chez *S. thermophilus*, nous avons construit un projet multidisciplinaire avec Véronique Monnet en collaboration avec l'équipe « Mathématique, Informatique et Génomes » du centre de Jouy-en-Josas. En effet, jusqu'à maintenant les peptides impliqués dans du QS chez les bactéries Gram-positives ont été identifiés et étudiés dans le cadre de l'étude de grandes fonctions physiologiques comme la compétence, la sporulation... Nous avons choisi d'aborder ce thème en utilisant une démarche différente à savoir la recherche systématique de petits peptides synthétisés et sécrétés par *S. thermophilus* puis l'identification de leur fonction et de leur régulation. Pour cela, nous avons choisi deux approches complémentaires. Sachant que la plupart des peptides phéromones sont codés par des petits gènes, nous avons mis en œuvre une approche bioinformatique afin de rechercher dans les génomes, à l'aide d'un logiciel (SHOW) mis au point par Pierre Nicolas et Philippe Bessières, des gènes codant des petits peptides. En effet, il est difficile de détecter correctement ces petites séquences codantes (sCDS) dans les génomes et on constate que les politiques d'annotation des sCDS sont hétérogènes. Les peptides phéromones étant obligatoirement sécrétés afin de jouer leur rôle dans la signalisation, parallèlement, nous avons utilisé une approche biochimique afin de rechercher des peptides synthétisés et sécrétés par *S. thermophilus* dans des surnageants de culture. Peu de temps après la construction de ce projet, Mariam Ibrahim nous a rejoints afin de réaliser sa thèse sur le sujet. Nous avons opté pour un co-encadrement. J'ai supervisé le traitement des données issues de l'analyse bioinformatique puis les expériences de génétique qui ont suivi alors que Véronique Monnet a supervisé l'approche biochimique.

2. Résultats

2.1 Identification d'un nouveau mécanisme de QS spécifique des streptocoques

⇒ Identification exhaustive de petites séquences codantes dans les génomes de streptocoques

Après ré-annotation des 19 génomes séquencés de streptocoques disponibles à l'époque, nous avons détecté, à l'aide de SHOW, les petits gènes (< 180 pb) potentiellement présents dans ces génomes et qui échappent fréquemment aux systèmes d'annotation classiques ou qui ne sont pas retenus par les politiques d'annotation. Les séquences des peptides correspondants ainsi que le contexte génétique des petits gènes ont été comparés entre eux. Ce travail nous a permis d'identifier 789 sCDS ayant un environnement conservé avec un autre CDS de streptocoque ou codant un peptide ayant au moins un équivalent dans une autre espèce. La plupart de ces sCDS sont de fonction inconnue et 31% ne sont pas annotés dans GenBank. Nous avons ensuite analysé en détails les résultats obtenus avec *S. thermophilus* et en avons validé une partie en montrant par RT-PCR quantitative que certains de ces petits gènes sont exprimés et en identifiant un de ces peptides par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Cependant, le principal résultat a été l'identification d'une famille de peptides hydrophobes (Short Hydrophobic Peptides) codés par des gènes en amont de régulateurs transcriptionnels Rgg. Les couples SHP/Rgg sont présents dans tous les génomes de streptocoques pathogènes séquencés en un ou deux exemplaires et particulièrement abondants dans l'espèce *thermophilus* où 8 exemplaires différents sont détectés, chaque souche en contenant au minimum 5 (Figure 6). La similarité des SHPs avec des phéromones décrites chez *E. faecalis*, nous a suggéré l'implication de ces peptides dans des phénomènes de QS.

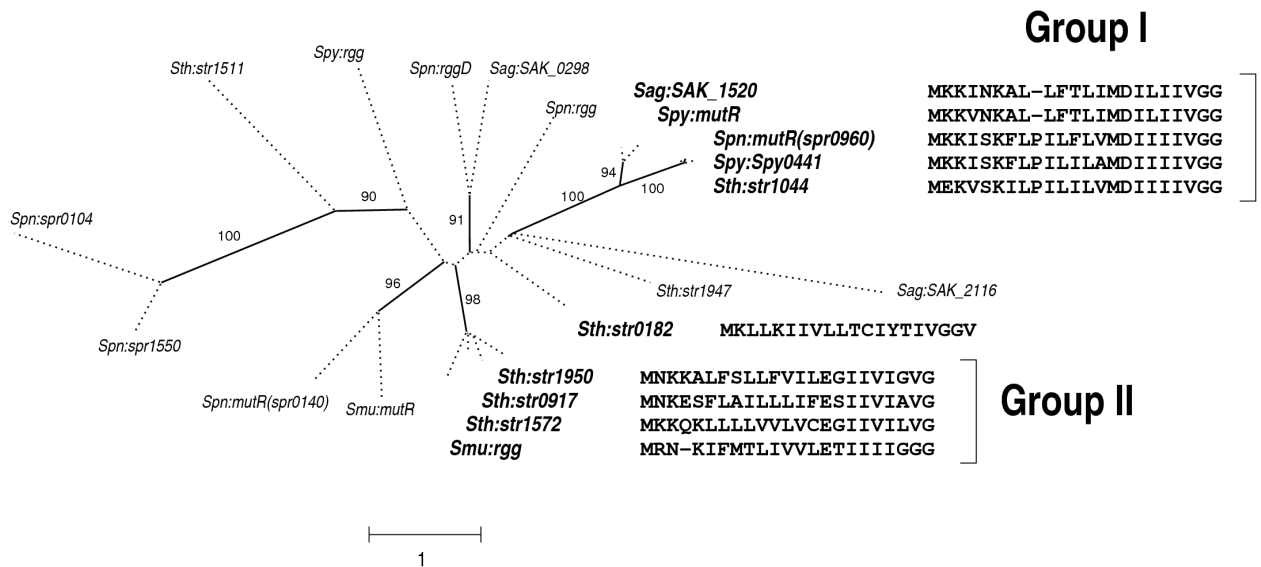


Figure 6. Arbre phylogénétique des régulateurs transcriptionnels Rgg identifiés dans 19 génomes de streptocoques disponibles en 2006. Les régulateurs génétiquement associés à des sCDS codant des petits peptides hydrophobes (dont la séquence en acide aminés est développée) sont indiqués en gras.

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

⇒ Identification de peptides produits par *S. thermophilus*

Au cours de l'approche biochimique, Mariam a identifié 6 peptides à partir des surnageants des 3 souches de *S. thermophilus* séquencée à l'époque, 4 communs aux trois souches et 2 spécifiques de la souche LMD-9.

Tableau 1. Séquence en acide aminés des peptides issus des surnageants de trois souches de *S. thermophilus* et séparés par RP-HPLC.

	Souche ^a	Masse mesurée [M+H] ⁺	Séquençage Edman ^b	Identification ^c
Pic 1	3 souches	1495.6	ALEKIDSTKAYSV	50S ribosomal protein L1 [27-41]
Pic 2	LMD-9	1455.05	AAPEERERGITIN	Elongation factor EF-Tu [55-68]
Pic 3	3 souches	1452.83	SRYTGPSWKQSR	Ribosomal protein S4 [2-13]
Pic 5	LMD-9	989.48	AxGDGyKVM	Pep1357C (peptide) [14-23]
Pic6	3 souches	1135.92	DSARENGLKF	Ribosomal protein L18 [108-118]
Pic 8	3 souches	1348.75	DALRRFKRSVT	Ribosomal protein S21 [10-20]

^ales souches de *S. thermophilus* utilisées sont : CNRZ1066, LMG18311 et LMD-9

^bx et y correspondent à des acides aminés qui n'ont pu être identifiés

^cles nombres entre crochets correspondent à la position du peptide dans la protéine

Un seul de ces peptides, le peptide 1357C, est codé par un petit gène (*ster_1357*). Nous avons entrepris son étude détaillée pour deux raisons. Il présente une modification originale, une cyclisation entre un résidu Lys et un résidu Trp. Son gène est localisé en aval d'un gène codant un régulateur Rgg génétiquement associé à un gène *shp*, *i.e* un des loci les plus intéressants identifiés au cours de notre approche bioinformatique (figure 7).

Ce travail a été amorcé à la fin de la thèse de Mariam et poursuivi dans le cadre de la thèse de Betty Fleuchot que j'ai encadrée et qui a obtenu une bourse ministérielle pour accomplir ce travail.

- M. Ibrahim, 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.* 189:8844-8854.

⇒ Régulateurs transcriptionnels Rgg associés à des petits peptides hydrophobes (SHP) : un nouveau mécanisme de QS chez les streptocoques

Des approches génétiques et biochimiques nous ont permis de confirmer que le SHP est un peptide phéromone. Nous avons montré qu'il est maturé et sécrété dans les surnageants de culture et identifié sa forme mature (collaboration avec Alain Guillot de la plateforme PAPPSO). Nous avons aussi identifié une protéase membranaire (Eep) indispensable à la production du SHP dans le milieu extracellulaire et montré que l'une des deux protéines affines du transporteur d'oligopeptides Ami est majoritairement impliquée dans l'import du SHP. Nous avons validé l'interaction entre le peptide SHP et le régulateur Rgg par « surface plasmon resonance » et entre le régulateur et l'ADN par des expériences de gel retard.

De plus, nous avons montré que l'expression du gène *shp* ne se déclenche qu'à une certaine densité cellulaire, confirmant la notion de mécanisme de QS *sensu stricto*. Le modèle de ce mécanisme est présenté sur la figure 7.

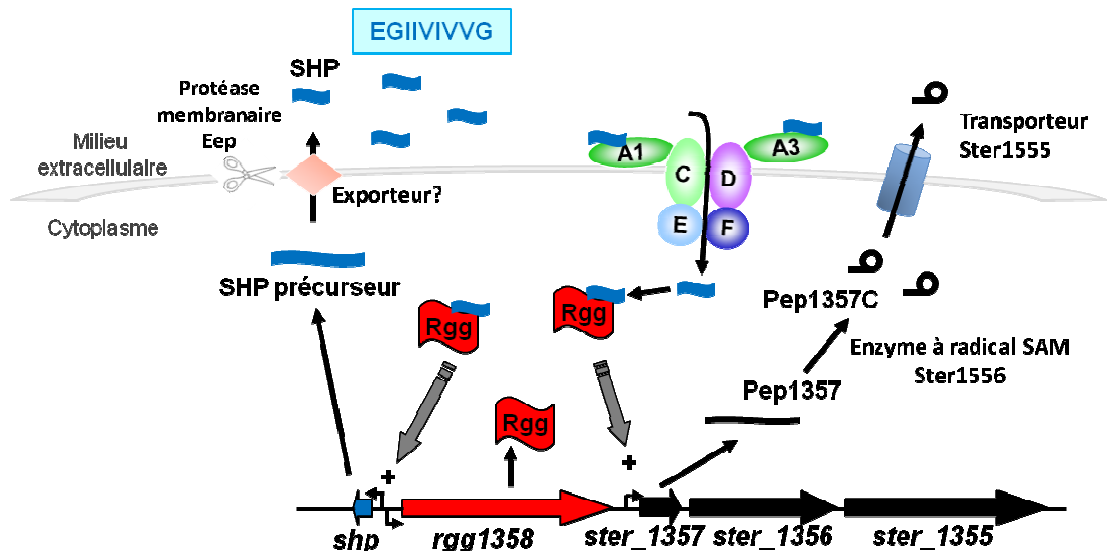


Figure 7. Représentation schématique du mécanisme de QS mettant en jeu le régulateur transcriptionnel Rgg1358 et le peptide hydrophobe SHP1358. Le peptide phéromone SHP est produit sous forme d'un peptide précurseur de 23 acides aminés. Il est sécrété et maturé par la protéase membranaire Eep en un peptide de 9 acides aminés correspondant à la partie C-terminale du peptide. Le peptide est ensuite importé par le transporteur d'oligopeptides Ami. Il est majoritairement capté par la protéine affine AmiA3. Il interagit ensuite avec le régulateur Rgg et le complexe SHP/Rgg se fixe sur l'ADN pour aller activer l'expression des deux cibles du système, les gènes *shp* et *ster_1357*.

• B. Fleuchot, 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.* 80:1102-1119.

⇒ Les régulateurs transcriptionnels Rgg associés à des petits peptides hydrophobes permettent un dialogue entre streptocoques d'espèces différentes

Dans le cadre de la rédaction du papier cité ci-dessus, nous avons réactualisé l'arbre phylogénétique de la figure 6 (Figure 8).

Ce travail nous a permis de confirmer que les loci *shp/rgg* sont spécifiques des streptocoques et présents dans quasi toutes les espèces en au moins un exemplaire. Nous avons aussi pu distinguer 3 groupes (Figure 8). Le système *shp/rgg₁₃₅₈* de *S. thermophilus* appartient au groupe II. Nous avons donc choisi deux systèmes du groupe I dans des streptocoques pathogènes et un du groupe III afin de valider leur fonctionnalité à l'aide d'une approche génétique et d'étudier d'éventuels dialogues croisés. La validation

fonctionnelle a été faite à l'aide d'une approche génétique en transférant tous les loci chez *S. thermophilus*.

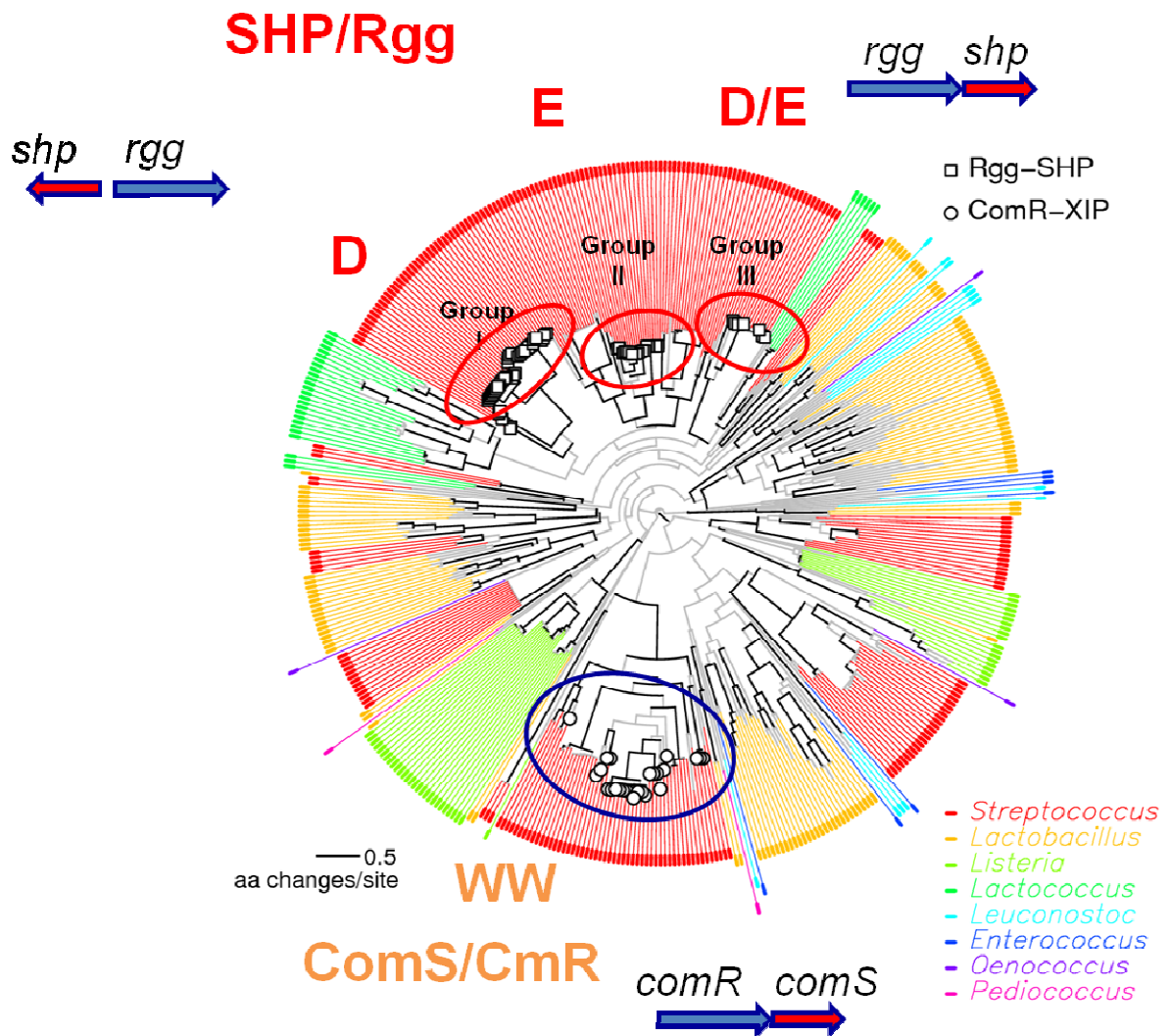


Figure 8. Arbre phylogénétique des régulateurs transcriptionnels Rgg identifiés dans 90 génomes de bactéries Gram-positives disponibles en 2011. Les régulateurs génétiquement associés à des sCDS codant des petits peptides hydrophobes sont indiqués par des carrés. Trois groupes sont distingués en fonction de l'organisation génétique des gènes *rgg* et *shp* et de la présence d'un acide aminés Glu ou Asp conservé dans les SHP. Les Rgg génétiquement associés à des sCDS codant des petits peptides ayant 2 Trp sont indiqués par des ronds (ils seront évoqués ultérieurement dans le texte).

Nous avons aussi identifié toutes les formes matures de ces systèmes avec Alain Guillot. Nous avons enfin utilisé les souches de *S. thermophilus* contenant les différents loci *shp/rgg* pour détecter des dialogues croisés. Les résultats sont présentés sur la figure 9.

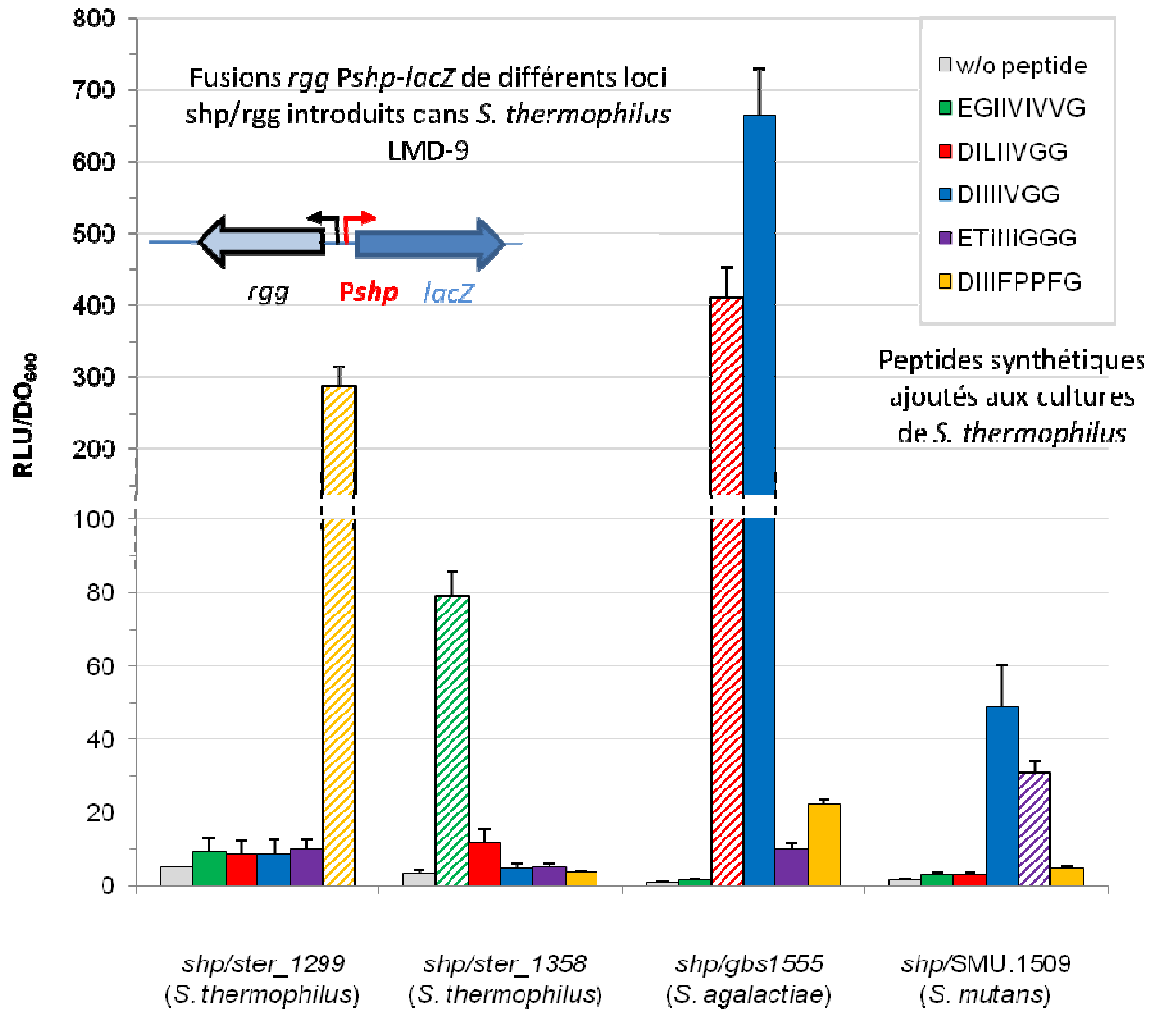


Figure 9. Complémentation fonctionnelle croisée de loci *shp/rgg* avec des SHP synthétiques. Quatre fragments contenant tous un gène *rgg* ainsi qu'un promoteur *shp* fusionné au gène *lacZ* codant la β -galactosidase ont été introduit dans *S. thermophilus*, souche LMD-9. L'origine des quatre loci *shp/rgg* est indiquée en bas de la figure. Les quatre cultures de *S. thermophilus* ont été complémentees avec cinq peptides SHP synthétiques, quatre correspondants aux formes matures des loci étudiés et un supplémentaire correspondant à un SHP mature de *Streptococcus pyogenes* (histogramme bleu) et choisi pour sa très forte similarité avec le SHP mature de *S. agalactiae*. La séquence des peptides est présentée en haut à droite de la figure. Pour chaque locus, le peptide « légitime » est présenté en hachuré.

Nous avons ainsi pu montrer qu'un des peptides SHPs de *S. pyogenes* est capable d'activer le système de *S. agalactiae* et *Streptococcus mutans*.

• B. Fleuchot, A. Guillot, C. Mézange, C. Besset, E. Chambellon, V. Monnet, R. Gardan. Rgg-associated SHP signaling peptides mediate cross-talk in streptococci. *Plos One*, 8:e66042.

En parallèle de ces travaux menés principalement par des étudiantes en thèse, j'ai développé une thématique concernant le déclenchement de la compétence naturelle chez *S. thermophilus* avec l'aide essentiellement de techniciens de notre laboratoire (Colette Besset et Christophe Gitton).

2.2 Contrôle du développement de la compétence naturelle chez *S. thermophilus*

S. thermophilus est un modèle intéressant pour l'étude des systèmes *shp/rgg* car il les a accumulés dans son génome. Cinq sont présents dans chaque souche et chaque souche en possède un répertoire spécifique. L'expérience présentée sur la figure 9 montre, à l'aide des systèmes *shp/rgg1299* et *shp/rgg1358*, l'absence de « cross-talk » entre les 2 systèmes et donc la spécificité de l'interaction entre le SHP et le régulateur Rgg. De manière complémentaire au travail précédent, nous avons cherché des cibles à ces régulateurs Rgg associés à des SHP par une approche globale chez *S. thermophilus*. Pour cela, nous avons comparé le protéome d'une souche sauvage LMD-9 à celui d'un mutant isogénique délété pour l'opéron *ami* (Δami) en utilisant une approche protéomique originale à l'époque, combinant électrophorèse monodimensionnelle et LC-MS/MS. Nous avons fait croître des cellules dans un milieu sans peptides et avons fait l'hypothèse que les protéines sous-exprimées dans le mutant Δami comparées à celles de la souche sauvage pourraient être des cibles potentielles d'une régulation par QS impliquant des peptides réimportés par Ami. Le résultat marquant de ce travail publié en 2009, a été la découverte de la compétence naturelle de *S. thermophilus*. Nous avons identifié une condition de croissance qui permet le déclenchement de la compétence naturelle de la souche LMD-9. Nous avons aussi montré que le transporteur Ami est nécessaire à ce déclenchement. D'autres souches de notre collection ont été testées, elles se sont avérées être peu ou pas du tout compétentes.

Suite à ces premiers résultats, nous avons identifié un régulateur associé à un peptide qui sont indispensables au déclenchement de la compétence chez *S. thermophilus*. Ce régulateur appartient à la famille Rgg. Jusqu'à maintenant, seuls des systèmes à deux composants avaient été identifiés comme régulateur du déclenchement de la compétence chez les streptocoques. Le régulateur et le peptide associé ont été baptisés ComR/ComS par l'équipe de Pascal Hols (Université de Louvain-la-neuve, Belgique) qui a publié ces résultats avant nous. Cependant, nous avons été les premiers à protéger l'utilisation du peptide ComS grâce à une demande de dépôt européen et américain (Gardan & Monnet, 2009).

Le travail sur la compétence a ensuite été poursuivi par l'étude de la vie extracellulaire du peptide. Nous avons identifié la forme mature du peptide (Alain Guillot, PAPPSO) et montré que dans nos conditions expérimentales, il n'est pas relargué dans le milieu extracellulaire mais reste très probablement en surface des cellules. Contrairement au système *shp/rgg*₁₃₅₈, le déclenchement de la compétence ne semble pas inféodé à une certaine densité cellulaire. Quelle que soit la DO d'une culture, la compétence se déclenche toujours environ 90 min après la dilution de la préculture dans un milieu MCD frais. Nous avons étudié en détail le rôle du transporteur Ami dans l'import du peptide et montré que des peptides nutritionnels dans le milieu peuvent entrer en compétition avec le transport de la phéromone. Ce phénomène permet d'expliquer pourquoi l'expression des gènes de compétence est réprimée en milieu riche. Enfin, nous avons montré que la protéase membranaire Eep joue un rôle direct ou indirect dans la production du peptide mature ComS. Ces résultats sont résumés sur le modèle présenté sur la figure 10.

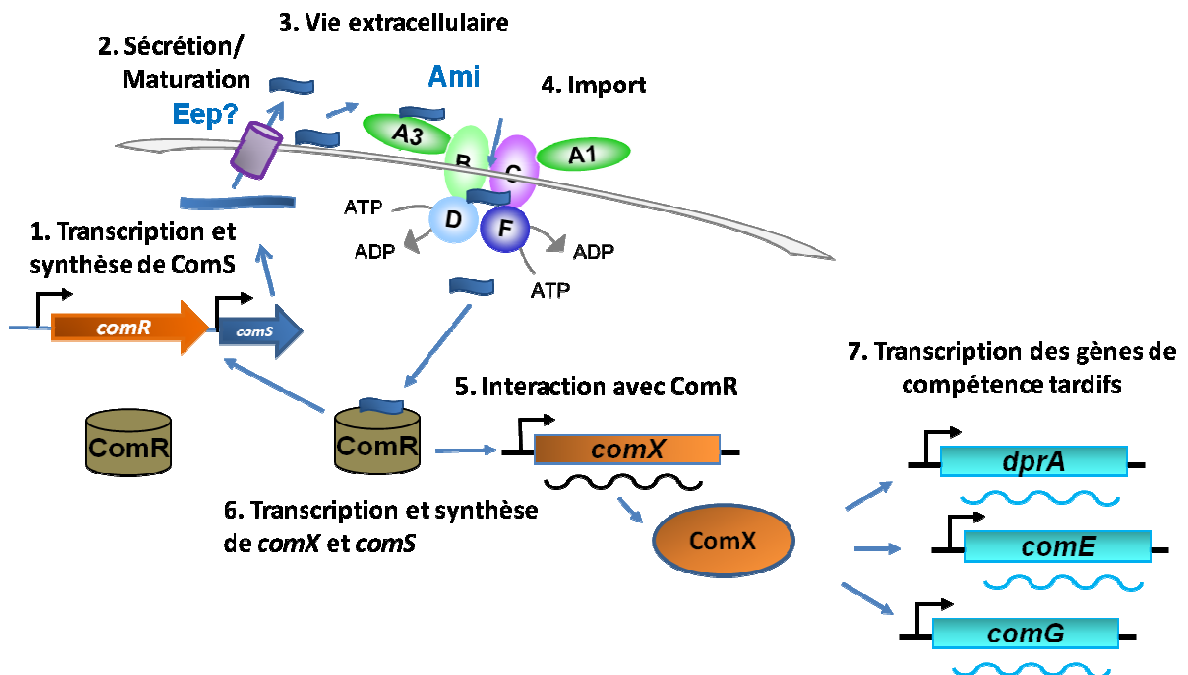


Figure 10. Les différentes étapes du mécanisme ComRS chez *S. thermophilus*.

- R. Gardan, 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.* 191:4647-4655.
- R. Gardan, C. Besset, C. Gitton, A. Guillot, L. Fontaine, P. Hols and Monnet V. 2013. Extracellular life cycle of ComS, the competence-stimulating peptide of *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol.* 19:1845-55.

PROJETS DE RECHERCHE

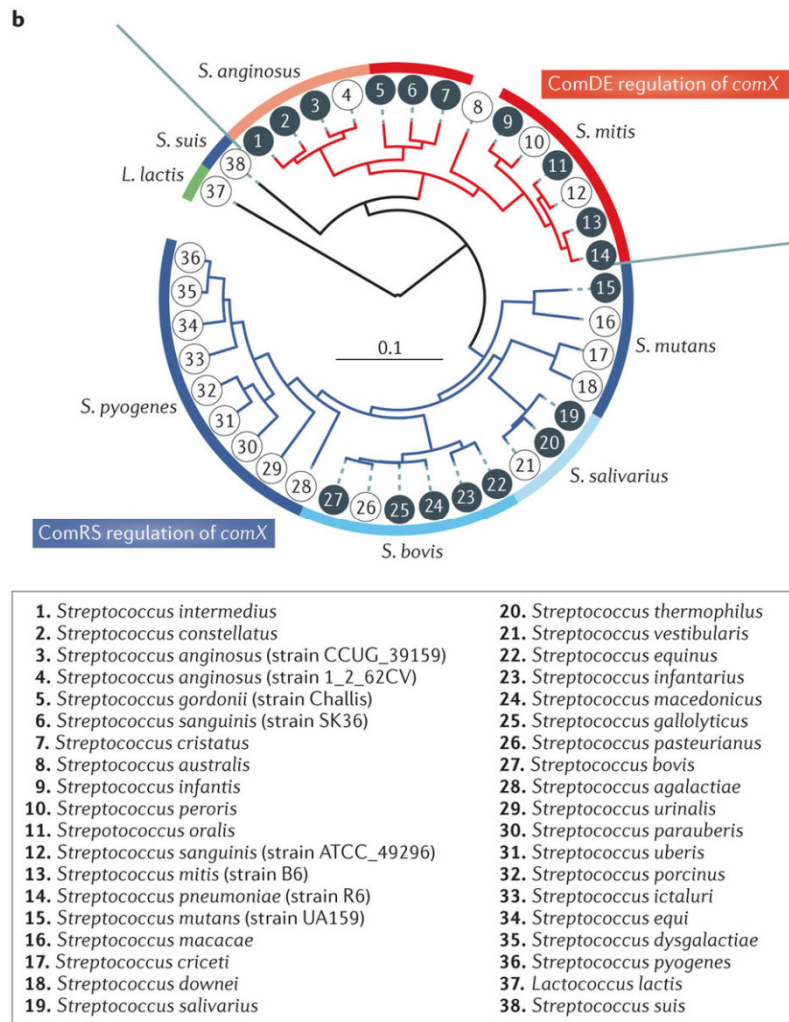


Figure 11. Distribution des systèmes ComCDE et ComRS chez les streptocoques. Les cercles noirs correspondent aux espèces pour lesquelles la transformation naturelle a été démontrée expérimentalement. L'échelle représente la distance phylogénétique (Johnston et al, 2014).

Actuellement, je mène en parallèle 2 axes de recherche très proches. Le premier concerne l'étude de la compétence chez *S. thermophilus*. Il sera décliné en 2 projets qui sont justifiés ci-dessous. Le deuxième axe concerne l'étude d'un mécanisme SHP/Rgg chez un streptocoque pathogène, *S. agalactiae*. En effet, même si *S. thermophilus* est un excellent modèle pour étudier ces mécanismes, il nous a semblé important de les étudier aussi chez les streptocoques pathogènes afin de voir s'ils pouvaient être liés à la virulence. Nous avons choisi *S. agalactiae* pour plusieurs raisons. Il possède un seul système SHP/Rgg du groupe I, groupe pour lequel nous n'avons pas identifié de cibles in silico ; de très nombreux génomes sont disponibles dans GenBank et c'est un streptocoque facilement manipulable dans le cadre de notre institut. De plus, c'est un pathogène humain mais aussi responsable de mammites chez le bovin et de méningites chez le poisson. Le projet N°3 présente cet aspect de ma recherche.

1. Contrôle de la compétence chez *S. thermophilus*

1.1 Les enjeux

J'identifie deux enjeux majeurs sous jacents à l'étude de la compétence chez *S. thermophilus*. Le premier est cognitif. En effet, dans la famille des streptocoques, on distingue maintenant deux grands types de mécanisme qui contrôlent la transcription du gène *comX* et par conséquent celle de tous les gènes de la machinerie de compétence. Le système à trois composants ComCDE et le système ComRS (Figure 11). Le système ComCDE a été identifié il y a environ une vingtaine d'année (Pestova et al, 1996) et plus d'une trentaine de publications concernant directement son étude ont été publiées depuis. L'identification du système ComRS est récente (Fontaine et al, 2010; Gardan et al, 2009; Gardan & Monnet, 2009) et de nombreuses questions concernant ce mécanisme restent en suspens comme nous le verrons ultérieurement. Parmi les mécanismes ComRS, celui de *S. thermophilus* conserve son statut de paradigme. Le deuxième enjeu est appliqué. En effet, *S. thermophilus* est l'une des deux bactéries du levain nécessaire à la fabrication d'un yaourt. En France, la production de yaourt est en constante augmentation depuis les dix dernières années et atteignait 1.6 millions de tonnes en 2012 dont 1/5^{ème} a été exporté

(source CNIEL 2012). Lors de la fabrication des yaourts, des cocktails de souches sont utilisés car une seule souche ne porte pas tous les caractères technologiques requis (acidification rapide, post-acidification lente, texture). Les industriels de la production de levain ont clairement manifestés un intérêt vis-à-vis de l'utilisation de la compétence, afin d'améliorer leurs souches de manière naturelle et de mieux maîtriser leurs levains au cours de leur fabrication et de leur utilisation.

L'objectif principal du projet qui permet de lier ces deux enjeux est le suivant: mieux comprendre la compétence chez *S. thermophilus* pour mieux la contrôler.

1.2 Vie extracellulaire de ComS : sécrétion et maturation (Projet N°1)

Les différentes étapes du mécanisme ComRS ont été présentées sur la figure 10. Nos précédents travaux se sont concentrés sur la vie extracellulaire de ComS. Cependant, la sécrétion et la maturation du peptide sont encore très mal connues. Nous avons maintenant deux gènes candidats, codant un ABC transporteur, pour l'étape de l'export de ComS (Lynn Hancock, Gram+ Meeting, juillet 2013). Nous inactiverons ces gènes afin de confirmer leur implication dans la sécrétion de ComS. Ensuite, nous réévaluerons l'implication de la protéase membranaire Eep dans ce mécanisme. En effet, des résultats récents de peptidomique nous indiquent qu'il existe un lien entre Eep et la maturation de la lipoprotéine AmiA3 de l'oligo-transporteur Ami (Vincent Juillard, communication personnelle). En effet, on ne trouve pas de traces de la lipoprotéine AmiA3 que ce soit dans un peptidome exocellulaire, dans un sécrétome ou dans la fraction protéique associée aux enveloppes du mutant Δeep , alors que des peptides issus de la protéine AmiA3 sont détectés dans ces différents protéomes à partir d'une culture de la souche sauvage. Nous rechercherons la protéine AmiA3 dans la fraction cytoplasmique issue d'une culture du mutant Δeep afin de montrer qu'elle est produite mais n'est pas sécrétée et maturée dans ce mutant. Nous avons montré que c'est AmiA3 qui majoritairement transporte ComS, AmiA1 jouant un rôle secondaire. A l'aide des résultats de protéomique de la souche sauvage, nous essaierons d'évaluer si AmiA3 est plus abondant qu'AmiA1.

Nous savons qu'un mutant Δeep n'exprime plus *comX*. Pour expliquer ce phénotype, nous pouvons maintenant faire plusieurs hypothèses : 1. La maturation du précurseur ComS et/ou l'export sont inactivés dans le mutant ; 2. L'import de ComS via

AmiA3 est perturbé; 3. Maturation, export et import sont perturbés. Pour choisir une de ces hypothèses, nous réaliserons une expérience en dissociant la production de ComS et l'activation de *comX*, en travaillant avec des surnageants de culture et une souche rapportrice contenant une fusion transcriptionnelle *comX-lux*. L'expérience est décrite dans la figure 12 et a déjà été utilisée pour mettre en évidence le rôle de Eep dans la maturation du SHP₁₃₅₈ (Fleuchot et al, 2011).

Une fois l'expérience réalisée, si Eep est impliquée dans la maturation de ComS, nous essayerons d'identifier la localisation du clivage. Il est probable que le clivage se fasse de manière intra-membranaire. Nous essayerons donc de localiser Eep et l'exporteur afin de voir si on observe une co-localisation des 2 systèmes. Si ce n'est pas le cas, nous essayerons de voir si le clivage se fait de manière intra ou extracellulaire. En effet, dans le cas d'une maturation extracellulaire, nous pourrions facilement détecter, par spectrométrie de masse, l'apparition du peptide ComS mature après ajout du précurseur dans le milieu de culture d'une souche $\Delta comS$.

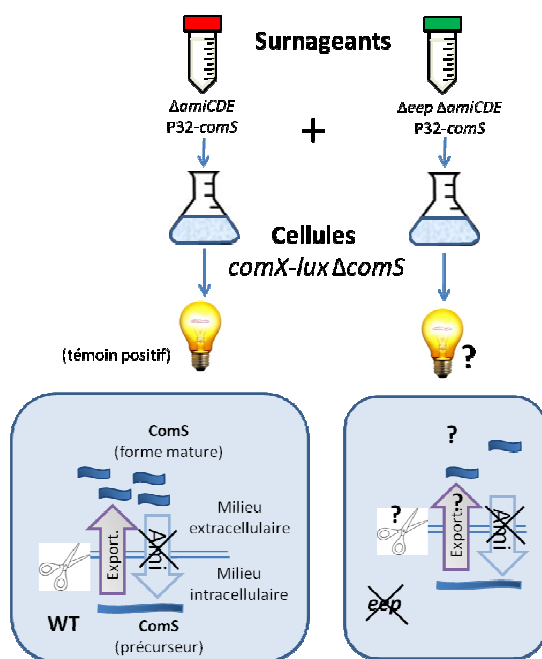


Figure 12. Test du rôle de la protéase membranaire Eep dans la maturation et l'import de ComS. Des cellules « rapportrices » de l'expression de *comX* (*comX-luxAB*) et non productrice de ComS ($\Delta comS$) sont mises en contact avec du surnageant (A) d'une souche surproductrice de ComS (*P32-comS*) mais ne pouvant l'importer ($\Delta amiCDE$) (témoin positif) ou (B) d'une souche qui en plus n'exprime plus Eep (Δeep).

Dans le cas d'une maturation intracellulaire, nous essayerons de détecter la présence des 2 formes, à partir du cytoplasme d'une souche sauvage ou surproductrice de ComS. Cette étape demandera des mises au point qui seront réalisées par la plateforme PAPSSO en collaboration avec Vincent Juillard.

La metalloprotéase à zinc Eep appartient à la famille S2P qui rassemble des protéines participant à la RIP (regulated intramembrane proteolysis). Sa fonction et son mode d'action sont encore mal connus car sa localisation membranaire la rend difficile à étudier. De plus, elle n'intervient jamais seule mais plutôt dans des mécanismes où d'autres protéases interviennent avant ou après son action. Son rôle est cependant pléiotrope chez *Enterococcus faecalis*. Elle intervient dans la production des phéromones en clivant le peptide signal de lipoprotéines libéré par la signal-peptidase II et d'anti-phéromones en clivant des peptides hydrophobes. Elle permet aussi l'activation du facteur σ^V en dégradant l'anti- σ^V associé à la membrane (Varahan et al, 2013). Dans tous les cas, les résultats de notre projet apporteront des données supplémentaires concernant le rôle de la protéase membranaire Eep chez *S. thermophilus*, mais aussi très probablement chez les streptocoques en général. En effet, chez GBS, nous réalisons des expériences similaires concernant la maturation et l'import du SHP. L'ensemble des résultats nous permettra d'entrevoir si la maturation des peptides hydrophobes chez les streptocoques passe majoritairement par Eep et si l'import de ces peptides se fait grâce à une protéine affine elle-même maturée directement ou indirectement par Eep.

Ces expériences sont en cours et réalisées par Coralie Metton, technicienne de laboratoire que j'encadre, nouvellement arrivée et en formation pour la génétique des streptocoques et la protéomique. Elles sont réalisées en collaboration avec Vincent Juillard (équipe ComBac) et Alain Guillot (plateforme PAPPSO). Ce travail n'est pas financé par un projet spécifique mais il nous permet de valoriser des compétences en peptidomique que peu d'équipes internationales partagent.

1.3 Biodiversité de la compétence chez *S. thermophilus* (Projet N°2)

⇒ Contexte

Un des freins à l'utilisation de la compétence chez *S. thermophilus* est la grande variabilité du taux de transformation observée lorsqu'on teste différentes souches de *S. thermophilus*. Le mécanisme ComRS a jusqu'à maintenant été étudié chez la souche LMD-9 mais cette souche est en fait atypique car naturellement très compétente. Les autres

souches de *S. thermophilus* sont peu ou pas compétentes naturellement, mais de manière surprenante, la compétence est restaurée dans un grand nombre de souches par ajout de peptide synthétique mature ComS₁₇₋₂₄. Le séquençage des premiers génomes de *S. thermophilus* a montré qu'ils sont très dégénérés. Suite à l'adaptation de l'ancêtre de *S. thermophilus* au lait, ce streptocoque a perdu la fonctionnalité de nombreux gènes (Hols et al, 2005). Cependant, ceux codant la machinerie de compétence ou transformasome ont été conservés, grâce à une pression de sélection positive qui reste à identifier. En effet, on ne connaît pas le rôle de la transformation chez *S. thermophilus*. Il est aussi probable que dans certaines conditions environnementales, la compétence se déclenche naturellement dans ces souches. Une meilleure compréhension des étapes limitantes de ce mécanisme dans la majorité des souches nous permettrait probablement de mieux manipuler cette compétence et comprendre sa fonction chez *S. thermophilus*.

⇒ Un projet en trois parties

● *Diversité génomique et compétence*

La première partie consistera en une exploration de génomes de *S. thermophilus* afin de voir si une certaine variabilité génétique permet d'expliquer, au moins en partie, la variabilité du taux de transformation. Pour cela, nous commencerons par sélectionner des souches d'origine variée dont les génomes sont disponibles et nous testerons leur compétence en MCD et en lait avec ou sans ajout de peptide synthétique ComS₁₇₋₂₄.

Puis, les régions codantes et promotrices des gènes impliqués dans la compétence *sensu largo* seront étudiées de manière globale et comparées entre elles et à celles de la souche LMD-9. Nous étudierons les gènes codant le transformasome, les gènes *comRS* et *comX* mais aussi les gènes impliqués dans l'export, la maturation et l'import de ComS. Le génotype des souches sera mis en corrélation avec les taux de transformation. Si des variations génétiques intéressantes sont identifiées, nous validerons ces résultats par la mesure de l'expression de gènes clefs de la compétence. Le rôle de certains gènes pourra aussi être validé par complémentation avec le gène équivalent de la souche LMD-9.

Cette première étape nous permettra aussi de choisir quelques souches modèles pour la suite de l'étude.

• *Recherche de conditions naturelles pour le déclenchement de la compétence*

Pour aborder cette question, nous disposons d'un certain nombre de résultats préliminaires concernant deux souches et qui sont résumés sur le tableau 1. Ces résultats nous indiquent que le lait, niche écologique de *S. thermophilus*, est sans doute un milieu favorable à la compétence de certaines souches; les résultats de la première partie du projet devraient nous confirmer cette hypothèse. Si un peptide du lait est capable de déclencher la compétence, il sera intéressant de l'identifier par fractionnement de caséines.

Tableau 1. Analyse semi-quantitative du taux de transformation de différentes souches dans différents milieux.

Souche	LMD-9	LMD-9	LMD-9	LMD-9	LMD-9	LMG	LMG	LMG
	LMD-9	LMD-9	LMD-9	$\Delta comS$	$\Delta comS$	18311	18311	18311
Milieu	MCD	MCD	lait	lait	MCD	MCD	MCD	lait
ComS ₁₋₂₄	∅	1 μM	∅	∅	1 μM	∅	1 μM	∅
Nombre de transformants	+++	+++	+	+/-	∅	+/-	+++	++

Il sera aussi intéressant d'évaluer si la souche LMD-9 très compétente naturellement peut stimuler la compétence de la souche LMG18311, peu compétente, en co-culture, en MCD ou en lait.

Les résultats obtenus avec le peptide précurseur ComS₁₋₂₄ nous indiquent qu'il stimule très fortement la compétence de la souche LMG18311, mais il est incapable de faire une complémentation fonctionnelle de la souche LMD-9 $\Delta comS$. Dans cette dernière souche, le précurseur ne peut pas être maturé en un peptide actif en quantité suffisante pour pallier l'absence du gène *comS*. Dans la souche LMG18311, qui possède le gène *comS*, le cycle de production du peptide semble être amorcé par la production de peptide mature à partir du peptide précurseur en quantité suffisante pour que le cycle puisse être ensuite fonctionnel et déclencher la compétence. Cette hypothèse sera validé à l'aide de différents mutants et par l'étude de la cinétique d'expression de différents gènes. Nous essayerons d'identifier la localisation de la maturation (intra ou extra-cellulaire) ainsi que la peptidase impliquée. En effet, ce mécanisme est peut-être une régulation permettant le contrôle du

déclenchement de la compétence dans certaines souches et dans certaines conditions, comme le lait, qui peut potentiellement contenir un peptide « amorceur ».

Enfin, une des particularités de *S. thermophilus*, comparé à *S. pneumoniae*, est son organisation en longues chaînes au cours de sa croissance en MCD. Les résultats de transformation obtenus avec la souche LMD-9 nous indiquent qu'une partie de la population seulement devient compétente, même en présence de ComS₁₇₋₂₄ synthétique. En effet, nous n'avons jamais obtenu 100% de cellules transformables même après l'ajout en excès de peptide synthétique ComS₁₇₋₂₄. Afin d'examiner si la population est bistable, il serait intéressant de confirmer ces résultats à l'aide d'une fusion *comX-gfp* et cette expérience nous permettrait aussi de voir si toutes les bactéries d'une même chaîne ou seulement certaines, deviennent compétentes.

Nous avons des contacts avec un industriel qui est intéressé par l'utilisation de la transformation pour améliorer certaines de ses souches. Il dispose d'une collection de souches de *S. thermophilus* certainement très différente de la notre, et de nombreux génomes. Nous lui proposerons ce projet dans le cadre d'une thèse CIFRE. Si ce projet est accepté, nous essaierons de trouver un candidat avec une double compétence microbiologie/bio-informatique. Ce projet bénéficiera aussi de l'expertise de notre technicienne Colette Besset qui a réalisé la quasi-totalité des expériences génétiques concernant la thématique compétence.

- *Compétence et évolution*

Pourquoi la compétence a-t-elle été maintenue au cours de l'évolution ? Cette question complexe rejoint l'identification du rôle de la compétence. Cet aspect a été abordé chez *S. pneumoniae* où trois hypothèses ont été formulées. La première « DNA-for-repair » est validée au niveau expérimental par plusieurs expériences. Ainsi par exemple, la mitomycine C, un antibiotique qui cause des lésions de l'ADN est un inducteur de la compétence. Ajouté au fait que *S. pneumoniae* ne possède pas de système SOS, ces observations ont permis à J-P Claverys de proposer la compétence comme un substitut au système SOS (Claverys et al, 2006). La compétence est aussi induite par des antibiotiques qui n'altèrent pas l'ADN. Elle serait donc plus largement un état physiologique qui permettrait une certaine résistance au stress plus par l'induction de protéines comme RecA que par la recombinaison homologue et la transformation proprement dite (Johnston et al,

2014). La deuxième hypothèse concernant l'apport bénéfique de la compétence est « DNA-for-diversity ». Un argument en faveur de cette hypothèse est l'induction de l'expression du gène *dpnA* lors de la compétence. En effet, ce gène code une méthylase atypique puisqu'elle méthyle l'ADN simple brin. Son action a pour effet de protéger l'ADN étranger de la dégradation par des systèmes de restriction-modification, après son internalisation. DpnA favorise l'acquisition de séquences d'ADN hétérologue qui ne peuvent être utilisées pour la maintenance du génome mais peuvent favoriser sa diversification. La troisième et dernière hypothèse, « DNA-for-food » est la moins crédible. En effet, lors de la transformation, l'ADN est internalisé sous forme de simple brin, l'autre brin est dégradé de manière extracellulaire. De plus, l'ADN internalisé est protégé de la dégradation par plusieurs protéines. Enfin, la compétence est induite en début de phase exponentielle, en l'absence de carences nutritionnelles.

Il me paraît intéressant d'aborder l'aspect évolutif de la compétence chez *S. thermophilus* car contrairement à *S. pneumoniae*, *S. thermophilus* possède un système SOS fonctionnel. De plus, l'équipe de P. Hols a montré que non seulement la compétence n'est pas induite par la mitomycine C mais la transformation est réprimée en sa présence (Boutry et al, 2013), dans la souche LMD-9.

Dans le cadre d'une collaboration avec Sylvain Gandon (CNRS, Montpellier), j'ai construit des outils permettant de marquer *S. thermophilus* avec deux marqueurs fluorescents que l'on peut dissocier par cytométrie de flux (Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)). Dans un premier temps, ces outils pourront être utilisés pour comparer des mesures le « fitness » d'une souche sauvage avec des mutants isogéniques non compétents ($\Delta comR$ ou $\Delta comX$) ou compétent mais non transformable ($\Delta comX$). Il sera intéressant d'utiliser une souche sauvage naturellement compétente et une souche non compétente dans des conditions de culture permissives ou non pour la compétence. En parallèle, il sera aussi important de cribler des conditions de stress pouvant induire la compétence.

Ce projet très préliminaire sera inclus dans la demande de renouvellement de financement ERC de Sylvain Gandon, qui analysera les résultats avec des modèles statistiques qu'il a déjà développés.

2. Mécanisme SHP/Rgg chez un streptocoque pathogène (Projet N°3)

⇒ Contexte

S. agalactiae (streptocoque du groupe B ou GBS), est la première cause de septicémies ou méningites néonatales. La transmission de la mère porteuse vers l'enfant se produit *in utero* et surtout lors de la naissance quand le nouveau né aspire du fluide amniotique. Même si l'incidence chute chez les enfants plus âgés, GBS peut être la cause de maladies graves chez ces derniers. GBS a aussi émergé ces dernières années comme un micro-organisme responsable d'infections chez les personnes âgées ou immunodéprimées.

GBS est capable de coloniser la muqueuse vaginale, de franchir les barrières épithéliales, de résister aux défenses immunitaires et dans certains cas d'infecter le système nerveux via le système sanguin. Pour passer toutes ces barrières, différents facteurs de virulences, correspondants essentiellement à des protéines de surface ou sécrétées ont été mises en évidence. Cependant **peu d'informations sont encore disponibles concernant les mécanismes de régulation de ces facteurs de virulence.**

L'un de ces régulateur, RovS, contrôle positivement et négativement l'expression de certains facteurs de virulence (Samen et al, 2006). Récemment, nous avons montré que RovS est un régulateur Rgg associé à un peptide SHP. A l'aide d'une approche génétique, nous avons validé le modèle présenté sur la figure 7. Nous avons montré que l'expression du gène *shp* est contrôlée positivement par SHP et RovS. Nous avons identifié la forme mature du SHP par spectrométrie de masse et montré que le transporteur l'oligopeptide de GBS est impliqué dans le mécanisme. Le rôle de la protéase membranaire Eep est plus complexe et en cours d'étude dans la cadre de la révision d'un papier. A l'aide d'une approche protéomique, nous avons montré que le gène en aval du gène *shp*, *gbs1556*, est aussi une cible du complexe SHP/RovS. Ce gène code une protéine de fonction inconnue. Il est à noter que le locus *rgg1556-shp-rgg* est conservé dans les 300 génomes de GBS disponibles dans GenBank. Grâce à des expériences *in vivo* chez la souris, et l'utilisation de mutants inactivés pour *rgg* ou *gbs1556*, nous avons montré que ces deux gènes sont impliqués dans la persistance de GBS dans le foie. En conclusion, le mécanisme SHP/RovS pourrait s'avérer une cible intéressante pour le design d'antimicrobiens innovants ciblant GBS.

⇒ Objectif et méthodologie

L'objectif du projet est de mieux comprendre la mécanistique du système SHP/RovS, qui contrôle l'expression de gènes codant des facteurs de virulence chez *Streptococcus agalactiae*. Nous cherchons à identifier de nouvelles cibles pour contrôler la virulence de ce streptocoque à l'aide de peptides inhibiteurs.

Pour cela nous :

-identifierons de manière exhaustive les cibles du mécanisme SHP/RovS par une approche transcriptomique. Cette approche nous permettra éventuellement d'identifier de nouvelles cibles du système SHP/Rgg dont nous étudierons le lien avec la virulence ;

-caractériserons le mécanisme moléculaire SHP/Rgg. Le mécanisme SHP/RovS est particulièrement complexe. En effet, il contrôle positivement directement les gènes *shp* et *gbs1556* et indirectement d'autres cibles comme l'opéron *cyl* qui code des protéines responsables de la synthèse d'une hémolysine. Le gène *fbxA* qui code une « fibrinogen binding protein » est lui indirectement contrôlé négativement par RovS. Autant la régulation directe peut être expliquée par une fixation directe de RovS en amont des régions promotrices des cibles, autant la régulation indirecte est pour le moment totalement incomprise. Pour aborder ce problème, nous réaliserons les expériences schématisées sur la figure 13.

En parallèle, une équipe de structuraliste dirigée par Sylvie Nessler (Université Paris 11) spécialisée dans l'étude des régulateurs transcriptionnels RNPPs analysera la structure de l'apo RovS, du complexe binaire RovS/SHP et ternaire RovS/SHP/DNA. Ces résultats nous permettront de voir si les régulateurs Rgg sont des membres authentiques de la famille RNPPs et comment le peptide SHP contrôle l'activité de Rgg. En effet, de manière surprenante, la fixation du SHP sur le Rgg ne semble pas influencer l'affinité de Rgg pour l'ADN. Ils devraient aussi nous permettre d'identifier les bases moléculaires de la spécificité SHP/Rgg. Sur les bases de ces résultats, nous commencerons à tester des peptides potentiellement inhibiteurs/compétiteurs de RovS;

-déterminerons le rôle de RovS et de sa cible Gbs1556 dans la pathogénicité *in vivo* et plus spécifiquement dans le foie. Nous comparerons le comportement de la souche sauvage et des mutants inactivés pour les gènes *rovS*, *shp* et *gbs1556* dans des expériences de biologie cellulaire d'adhésion, d'invasion et de survie dans des hépatocytes. Eventuellement, nos souches seront marquées à l'aide du marqueur fluorescent Gfp. Ce marqueur sera aussi utilisé pour étudier l'expression de *rovS*, *shp* et quelques cibles du

mécanisme Shp/RovS dans les hépatocytes. Enfin, nous utiliserons la technologie IVIS@Lumina, disponible sur une plateforme du centre, pour suivre l'expression des cibles du mécanisme Shp/RovS in vivo dans un modèle murin.

En conclusion, ce projet utilisera des techniques récentes pour l'étude d'un mécanisme qui est largement répandu chez les streptocoques mais dont le lien avec la pathogénie est encore très mal connu. Nous pensons que les résultats obtenus nous permettront de faire un design rationnel de peptides inhibiteurs (quorum quencheurs) de ce mécanisme. Nous ne voyons pas ces nouvelles molécules comme des substituts aux antibiotiques mais plutôt comme des peptides qui permettraient de potentialiser l'effet des antibiotiques. En effet, aucun vaccin n'est encore disponible contre GBS, seuls les antibiotiques sont efficaces mais des résistances commencent à apparaître.

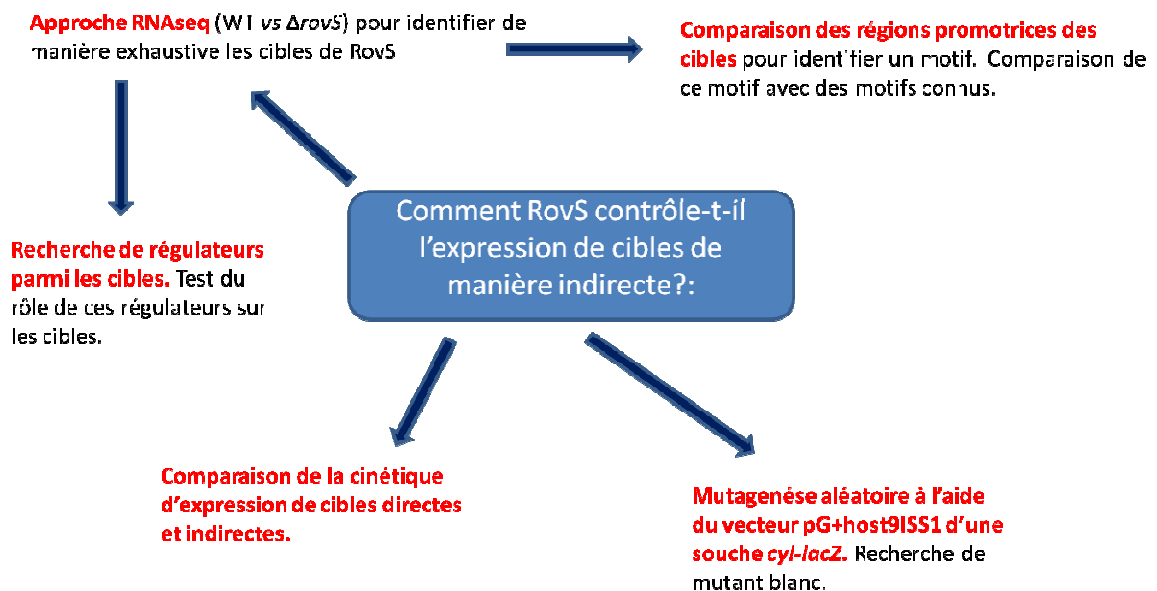


Figure 13. Approche génétique pour identifier le mode d'action de RovS sur certaines cibles indirectes.

Dans le cadre de l'appel d'offre ANR2014, j'ai déposé une pré-proposition qui n'a pas été retenue. Elle a été classée 738/1759 et 551 dossiers ont passé cette première étape de sélection. En tenant compte des résultats que nous avons obtenus depuis avec David Pérez-Pascual (Post-doc Marie-Curie) en collaboration avec Philippe Gaudu et Véronique Monnet, je proposerai un nouveau projet en 2015 en collaboration avec S. Nessler. Nous demanderons un financement pour un post-doc dans ce projet.

3. Conclusion

J'aimerais terminer ce manuscrit sous forme de boîte à questions. Ces questions n'ont pas été abordées clairement dans ce manuscrit car il a fallu y faire des choix, mais il me paraît intéressant de les évoquer. Elles sont d'importance variable, sous-jacentes à certains projets ou pourraient être le point de départ de nouveaux projets.

Les systèmes SHP/Rgg

- Dans quelles conditions naturelles sont-ils fonctionnels ?
- Pourquoi *S. thermophilus*, qui a un génome dégénéré, les a-t-il accumulés ?
- Quelles sont les cibles de ces systèmes, y-a-t-il un lien fonctionnel entre elles ?
- Quel est le lien évolutif entre les systèmes SHP/Rgg au sein des streptocoques ?
- Est-ce que les SHPs permettent un dialogue entre streptocoques dans des environnements naturels ?
- Est-ce que les gènes *rgg*, qui n'ont pas de gène *shp* à proximité, fonctionnent avec des peptides ?
- Existe-t-il d'autres familles Rgg/peptides chez les streptocoques, chez d'autres bactéries Gram-positives ?

La compétence chez *S. thermophilus*

- Quelle est sa fonction ?
- Permet-elle l'acquisition de nouveaux gènes ou est-elle plus un système de réparation de l'ADN ?
- Pourquoi est-elle restée fonctionnelle chez la majorité des souches ?
- Dans quelles conditions naturelles se déclenche-t-elle ?
- Existe-t-il des conditions où le taux de transformation devient très élevé ou correspond-t-elle à un phénomène rare dans la nature
- Est-elle associée à un phénomène de lyse ?
- Quel est son mécanisme de fermeture ?
- Pourquoi ComS reste-t-il à la surface des cellules
- Quel est le lien évolutif entre les systèmes SHP/Rgg et ComS/ComR ?
- Pourquoi existe-t-il deux systèmes des QS différents, ComCDE et ComS/ComR pour contrôler le déclenchement de la compétence chez les streptocoques de manière similaire ?

BIBLIOGRAPHIE

- Boutry C, Delplace B, Clippe A, Fontaine L, Hols P (2013) SOS response activation and competence development are antagonistic mechanisms in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **195**: 696-707
- Claverys JP, Prudhomme M, Martin B (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 451-475
- Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N, Slamti L, Hoh F, Lereclus D, Arold ST (2007) Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18490-18495
- Fleuchot B, Gitton C, Guillot A, Vidic J, Nicolas P, Besset C, Fontaine L, Hols P, Leblond-Bourget N, Monnet V, Gardan R (2011) Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci. *Mol Microbiol* **80**: 1102-1119
- Fontaine L, Boutry C, de Frahan MH, Delplace B, Fremaux C, Horvath P, Boyaval P, Hols P (2010) A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol* **192**: 1444-1454
- Garault P, Le Bars D, Besset C, Monnet V (2002) Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J Biol Chem* **277**: 32-39
- Gardan R, Besset C, Guillot A, Gitton C, Monnet V (2009) The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J Bacteriol* **191**: 4647-4655
- Gardan R, Monnet V. (2009) New competence stimulating peptide. Brevet déposé en Europe et aux US.
- Hols P, Hancy F, Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D, Leblond-Bourget N, Decaris B, Bolotin A, Delorme C, Dusko Ehrlich S, Guédon E, Monnet V, Renault P, Kleerebezem M (2005) New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 435-463
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP (2014) Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* **12**: 181-196
- Monnet C, Juillard V, Gardan R (2014) Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Critical reviews in microbiology (In revision)*
- Nakayama J, Chen S, Oyama N, Nishiguchi K, Azab EA, Tanaka E, Kariyama R, Sonomoto K (2006) Revised model for *Enterococcus faecalis* *fsr* quorum-sensing system:

the small open reading frame *fsrD* encodes the gelatinase biosynthesis-activating pheromone propeptide corresponding to staphylococcal AgrD. *J Bacteriol* **188**: 8321-8326

Pestova EV, Håvarstein LS, Morrison DA (1996) Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* by an auto-induced peptide pheromone and a two-component regulatory system. *Mol Microbiol* **21**: 853-862

Quadri LE (2002) Regulation of antimicrobial peptide production by autoinducer-mediated quorum sensing in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **82**: 133-145

Rocha-Estrada J, Aceves-Diez AE, Guarneros G, de la Torre M (2010) The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 913-923

Samen UM, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ (2006) The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. *Infect Immun* **74**: 5625-5635

Thoendel M, Kavanaugh JS, Flack CE, Horswill AR (2011) Peptide signaling in the staphylococci. *Chem Rev* **111**: 117-151

Varahan S, Iyer VS, Moore WT, Hancock LE (2013) Eep confers lysozyme resistance to *Enterococcus faecalis* via the activation of the extracytoplasmic function sigma factor SigV. *J Bacteriol* **195**: 3125-3134

ANNEXES

Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci

B. Fleuchot,^{1,2} C. Gitton,^{1,2} A. Guillot,^{1,2} J. Vidic,³
P. Nicolas,⁴ C. Besset,^{1,2} L. Fontaine,⁵ P. Hols,⁵
N. Leblond-Bourget,⁶ V. Monnet^{1,2} and R. Gardan^{1,2*}

¹INRA, UMR1319 MICALIS, F-78352 Jouy en Josas, France.

²AgroParistech, UMR MICALIS, F-78352 Jouy en Josas, France.

³INRA, UR892 Virologie Immunologie Moléculaire, F-78352 Jouy en Josas, France.

⁴INRA, UR1077 Mathématique, Informatique et Génome, F-78352 Jouy en Josas, France.

⁵Université catholique de Louvain, Unité de Biochimie et Génétique Moléculaire Bactérienne, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

⁶INRA, UMR1128, IFR110, Nancy-Université, Laboratoire de Génétique et Microbiologie, BP239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Summary

We identified a genetic context encoding a transcriptional regulator of the Rgg family and a small hydrophobic peptide (SHP) in nearly all streptococci and suggested that it may be involved in a new quorum-sensing mechanism, with SHP playing the role of a pheromone. Here, we provide further support for this hypothesis by constructing a phylogenetic tree of the Rgg and Rgg-like proteins from Gram-positive bacteria and by studying the *shp/rgg1358* locus of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. We identified the *shp1358* gene as a target of Rgg1358, and used it to confirm the existence of the steps of a quorum-sensing mechanism including secretion, maturation and reimportation of the pheromone into the cell. We used surface plasmon resonance to demonstrate interaction between the pheromone and the regulatory protein and performed electrophoretic mobility shift assays to assess binding of the transcriptional regulator to the promoter regions of its target genes. The active form of the pheromone was identified by mass spectrometry. Our findings demonstrate that the *shp/rgg1358* locus encodes two components of a

novel quorum-sensing mechanism involving a transcriptional regulator of the Rgg family and a SHP pheromone that is detected and reimported into the cell by the Ami oligopeptide transporter.

Introduction

Quorum-sensing (QS) is a cell–cell communication mechanism in bacteria that controls gene expression via secreted signalling molecules, also called autoinducers or pheromones. Despite differences in the chemical nature of the signalling molecules between Gram-positive and Gram-negative bacteria (Bassler, 2002; Waters and Bassler, 2005; Antunes *et al.*, 2010), QS is triggered by a similar circuit in the two groups. First, the signalling molecule is released into the extracellular environment by active or passive transport; it accumulates in the extracellular environment and once at a threshold concentration is detected by a sensor protein. This sensing leads cells to modulate gene expression in a co-ordinated manner in the bacterial population.

There are two general activation pathways for Gram-positive QS (Williams *et al.*, 2007). The signal molecule, which is a peptide, can be sensed outside the cell by the histidine kinase of a two component system. Detection of the peptide leads to phosphorylation or dephosphorylation of the histidine kinase and then of a specific cytoplasmic transcriptional regulator. This phosphorylation state modifies the ability of the response regulator to bind DNA, modulating its ability to activate or repress the transcription of its target gene(s). This mechanism has been described in detail for many systems, including triggering of competence for natural transformation in *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis* (for reviews see Claverys and Håvarstein, 2002; Claverys *et al.*, 2006) and control of the *agr* locus in *Staphylococcus aureus* inducing the regulation of accessory virulence genes (Novick and Geisinger, 2008). The second activation pathway involves sensing the signalling molecule inside the cell after its internalization by an oligopeptide permease transport system called Opp or Ami, member of the ubiquitous ATP-binding cassette superfamily (ABC transporters) (Linton and Higgins, 2007). Once internalized, the pheromone interacts with a transcriptional regulator or a Rap protein, both belonging to the RNPP family (for Rap,

Accepted 10 March, 2011. *For correspondence. E-mail rozenn.gardan@jouy.inra.fr; Tel. (+33) 1 34 65 27 70; Fax (+33) 1 34 65 21 63.

NprR, PlcR and PrgX), thereby modifying their activity and consequently the expression of their target gene(s) (Declerck *et al.*, 2007; Rocha-Estrada *et al.*, 2010). Three groups of relevant peptides have been described in detail: (i) Rap-associated Phr peptides in *B. subtilis* involved in the control of sporulation, competence, and production of degradative enzymes and antibiotics (Pottathil and Lazazzera, 2003), (ii) peptides involved in the control of plasmid transfer in *Enterococcus faecalis* that interact with PrgX or PrgX-like proteins (Dunny, 2007) and (iii) PlcR-associated PapR peptides involved in triggering virulence of *Cereus* group bacteria (Slamti and Lereclus, 2002; Bouillaut *et al.*, 2008).

Rgg proteins are described as stand-alone transcriptional regulators in low-GC Gram-positive bacteria. They are composed of a N-terminal Helix–Turn–Helix DNA-binding domain belonging to the xenobiotic regulatory element family (PFAM01381) and a conserved C-terminal domain (Rgg-Cterm, TIGR01716). They are involved in several physiological functions such as: (i) expression of glucosyltransferases in *Streptococcus gordonii* (Sulavik *et al.*, 1992; Vickerman and Minick, 2002) and in *Streptococcus oralis* (Fujiwara *et al.*, 2000), (ii) regulation of the gene encoding the secreted cysteine proteinase virulence factor (SpeB) in *Streptococcus pyogenes* (Lyon *et al.*, 1998; Chaussee *et al.*, 1999; Neely *et al.*, 2003; Dmitriev *et al.*, 2006; Loughman and Caparon, 2007), (iii) the stress response in *Lactococcus lactis* (Sanders *et al.*, 1998), *Streptococcus thermophilus* (Fernandez *et al.*, 2006), *S. pyogenes* (Pulliainen *et al.*, 2008) or *S. pneumoniae* (Bortoni *et al.*, 2009), (iv) bacteriocin production in *Streptococcus mutans* (Qi *et al.*, 1999) and *Lactobacillus sakei* (Rawlinson *et al.*, 2002; Skaugen *et al.*, 2002) and (v) regulation of genes involved in the pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* (Chaussee *et al.*, 2002; 2003; Samen *et al.*, 2006). Although some Rgg proteins seem to be associated with a single target gene, they may also serve as global regulators in some organisms (Chaussee *et al.*, 2002; Samen *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2011). In general, the regulatory mechanisms of gene transcription by stand-alone Rgg proteins are complex. Although the environmental stimuli for the expression of some targets of Rgg regulators are known, the signal transduction processes have still to be discovered. Furthermore, most of the Rgg proteins annotated in genomes have not been studied.

We previously identified, by *in silico* analyses, a sub-cluster of Rgg regulators defined by the association of pairs of genes transcribed divergently. These pairs of genes, widespread only in the *Streptococcus* genus, combine a gene encoding a transcriptional regulator of the Rgg family with another gene encoding a small hydrophobic peptide called *shp*. One or two copies of such genetic contexts have been found in nearly all strepto-

cocci genomes, including *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* and *S. agalactiae*, and up to seven copies have been found in *S. thermophilus* (Ibrahim *et al.*, 2007a). We have studied one of these *shp/rgg* loci, named *shp/rgg1358*, in *S. thermophilus* LMD-9 and identified one target gene of the encoded Rgg regulator. This target gene, called *ster_1357*, encodes a secreted cyclic peptide and its expression is positively controlled by Rgg1358 and indirectly by SHP1358 and the Ami oligopeptide transporter (Ibrahim *et al.*, 2007b). These findings led us to investigate whether the Rgg protein and a small hydrophobic peptide (SHP) reimported pheromone are components of a novel QS regulatory system. Recently, another group of signalling peptides, associated with Rgg-like proteins named ComR, has been identified. These peptides are named ComS or XIP and are involved in triggering competence for transformation in *S. thermophilus*, *S. salivarius* and *S. mutans* and probably in other streptococci belonging to the pyogenic and bovis group (Gardan *et al.*, 2009; Fontaine *et al.*, 2010; Mashburn-Warren *et al.*, 2010).

In this study, we started by constructing a phylogenetic tree of the Rgg and Rgg-like proteins found in Gram-positive bacteria to compare the respective distributions of SHP-associated Rgg with the XIP-associated ComR regulators. Then, we tested the function of the *shp/rgg* subcluster as a QS mechanism by studying the *shp/rgg1358* locus of *S. thermophilus* LMD-9. We identified another Rgg1358 target gene (*shp1358*) and used it to confirm the existence of the first steps of a QS mechanism: (i) secretion of the putative SHP pheromone, (ii) maturation of the pheromone, (iii) detection of the pheromone at a cell density threshold and (iv) reimportation of the pheromone into the cell by the Ami oligopeptide transporter. Surface plasmon resonance (SPR) analyses demonstrated that the pheromone interacts with the transcriptional regulator Rgg1358. Electrophoretic mobility shift assays (EMSA) revealed that the Rgg1358 binds to the promoter regions of target genes. Thus, this comprehensive survey of SHP-associated regulators combined with the study of the *shp/rgg1358* locus of *S. thermophilus* LMD-9 provides evidence of a novel QS mechanism: it involves a Rgg transcriptional regulator associated with a SHP pheromone detected and reimported into the cell by the Ami oligopeptide transporter.

Results

SHP-associated Rgg are phylogenetically distinct from the XIP-associated ComR regulators

Using genome sequences for 19 streptococci, we previously identified the SHP-associated Rgg as a subfamily of Rgg regulators (Ibrahim *et al.*, 2007a). Since then,

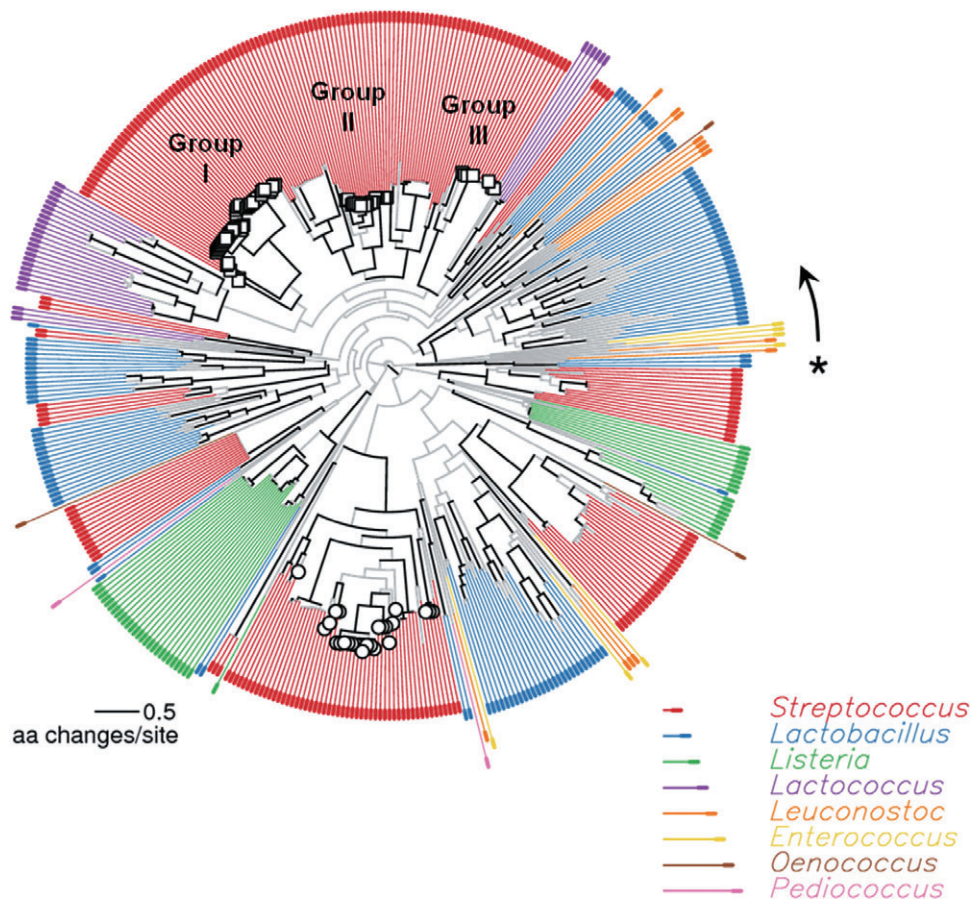


Fig. 1. Distribution of SHP/Rgg and XIP/ComR systems in the repertoire of Rgg and Rgg-like proteins. The evolutionary relationships between the protein sequences of Rgg and Rgg-like proteins are summarized in the phylogenetic tree shown at the centre of the figure. Each leaf corresponds to a Rgg or Rgg-like protein and the presence of SHP (□) and XIP (○) peptides at the corresponding locus is indicated. Internal branches supported by at least 80% of the bootstrap replicates are represented in black, other branches are shown in gray. Genera in which the loci are found are indicated using a different colour and a different radius length for each genus according to the correspondence code reported in the figure. The asterisk and the arrow indicate the first locus and the direction ordering all the loci in Table S1, where details are provided.

numerous genomes have been deposited in the databases. Moreover, another subfamily of Rgg-like regulators, ComR, also working with a peptide, ComS or XIP, imported by an oligopeptide transporter has been discovered (Fontaine *et al.*, 2010; Mashburn-Warren *et al.*, 2010). We therefore updated our list of SHP-associated Rgg and investigated their place in the repertoire of the Rgg and Rgg-like proteins. In particular we compared them with the XIP-associated ComR proteins.

Rgg proteins are only found in the order of *Lactobacillales* and the family *Listeriaceae* for which 90 complete genome sequences are available. We identified 484 sequences corresponding to Rgg proteins *sensu largo*, including all XIP-associated ComR proteins previously identified (Fontaine *et al.*, 2010; Mashburn-Warren *et al.*, 2010). Rgg regulators were found in all the genomes considered except the two *Lactobacillus salivarius* isolates. To map SHP and XIP peptides, the GenBank

CDS annotation was complemented by predicting short CDSs with our software SHOW as described by Ibrahim *et al.* (2007a). Putative CDSs with length between 10 and 50 aa and adjacent to the 484 *rgg* genes were retrieved and screened manually to identify exhaustively all SHP and XIP peptides. The sequence of the 12 SHP (Ibrahim *et al.*, 2007a) and 10 XIP (Mashburn-Warren *et al.*, 2010) identified in complete genome sequences and already published were used to define the selection criteria as described in the *Experimental procedures* section. We recovered 61 SHP and 27 XIP. As a result of some redundancy between strains, only 22 and 12 unique amino acid sequences of SHP and XIP, respectively, were identified; they included 10 new SHP sequences and two new XIP.

The 484 sequences were further used to construct a phylogenetic tree in which SHP-associated Rgg and XIP-associated ComR were highlighted (Fig. 1). The complete list of Rgg and Rgg-like proteins and the sequences and

positions of the SHP and XIP peptides is provided in Table S1. This analysis confirmed that both SHP-associated Rgg and XIP-associated ComR are specific to the streptococci family. Although they share similarities, they form two different branches of the phylogenetic tree indicating that they correspond to two distinct subfamilies of Rgg regulators. Furthermore, the tree distinguished between the two groups of SHP-associated Rgg previously identified, i.e. groups I and II, which again correlated well with the presence of a conserved aspartate or glutamate respectively (Ibrahim *et al.*, 2007a). We found no exception in group I and only one SHP (in six strains of *Streptococcus suis*) with a conserved aspartate associated with a Rgg belonging to group II. In this new phylogenetic tree, the two SHP previously described as unclassified because of the absence of conserved aspartate or glutamate residue clustered with group I Rgg proteins. Finally, detailed examination of the Rgg proteins in close vicinity to the SHP-associated Rgg revealed another group (group III) of seven peptides with amino acid sequences that fulfil the SHP definition but that are encoded by genes overlapping the end of the *rgg* genes in a convergent orientation. One is in *S. thermophilus* strain LMD-9 and the others are from six (of nine studied) strains of *S. pneumoniae*.

To confirm the function of the *shp/rgg* subcluster as a component of a QS mechanism, we investigated the *shp/rgg1358* locus of *S. thermophilus* LMD-9.

The expression of the shp1358 gene is controlled by Rgg1358, SHP1358 and, AmiCDEF in S. thermophilus LMD-9

The *shp/rgg1358* locus of *S. thermophilus* LMD-9 is composed of *shp1358* and *rgg1358*, two genes divergently transcribed with overlapping putative promoters. We studied the expression of the *shp1358* gene suspected to encode a pheromone (Ibrahim *et al.*, 2007b). The production of most such pheromones is auto-regulated, so we constructed a $P_{shp1358}$ -*luxAB* transcriptional fusion and used it to transform the LMD-9 strain and several mutants deleted for the *rgg1358*, *shp1358* or *ami* genes. The luciferase activity of the $P_{shp1358}$ -*luxAB* fusion was 80 RLU/OD₆₀₀ in the LMD-9 strain but only 6 and 3 RLU/OD₆₀₀ in the Δ *rgg1358* and Δ *shp1358* mutants respectively; no activity was detected in the *amiCDE::spec* mutant (Fig. 2A). Therefore, the *shp1358* gene is a target of the Rgg1358 regulator, and the *shp1358* gene product is implicated in its own transcription. The Ami transporter is also involved in the positive control of the transcription of the *shp1358* gene, most probably by an indirect mechanism. The $P_{shp1358}$ -*luxAB* fusion was then used to investigate all steps of the QS mechanism involving SHP1358 and Rgg1358.

The small hydrophobic peptide SHP1358 is the precursor of a secreted pheromone of nine amino acids

In our QS model, SHP1358 is proposed to be the precursor of the pheromone. We tested whether, like other pheromones in these systems, SHP1358 is secreted. Supernatants from cultures of strains producing or not producing the SHP1358 peptide (strain LMD-9 and its Δ *shp1358* mutant, respectively) were mixed with pellets of cells of a strain containing a $P_{shp1358}$ -*luxAB* fusion and deleted for the *shp1358* gene (TIL 1200, named the 'reporter strain' hereafter). The expression of the *shp1358* promoter was then tested (Fig. 2B). The expression of the *shp1358* promoter in the reporter strain was not activated by the supernatant from the Δ *shp1358* mutant, whereas the supernatant from strain LMD-9 induced its activity (55 RLU/OD₆₀₀). This demonstrates functional complementation of the cells of the reporter strain by the supernatant of the LMD-9 strain possibly through secretion of the product of the *shp1358* gene.

To determine the amino acid sequence of the active form of the secreted pheromone, the supernatant from strain LMD-9 was analysed by mass spectrometry (LC-MS/MS) and compared with that from strain Δ *shp1358* (data not shown). Only one mass, not detected in the supernatant of strain Δ *shp1358*, was identical to the mass of a fragment of SHP1358. This mass corresponds to a highly hydrophobic nonapeptide with the amino acid sequence EGIIVVVG. This form is the putative product of a C-terminal cleavage of the 23 amino acid peptide precursor. This sequence was validated by fragmentation followed by an analysis on the LTQ orbitrap (Fig. 3).

A synthetic peptide corresponding to this nine amino acid sequence was produced and added at different concentrations to cultures of the reporter strain. Functional complementation by the synthetic peptide was observed and was correlated with its concentration in the medium (Fig. 2C). These results demonstrate and identify one active secreted peptide, hereafter called SHP1358_(15–23), derived from the SHP1358 precursor.

A critical biomass is required to activate the expression of the shp1358 gene

Quorum-sensing mechanisms involve signalling molecules reaching a threshold concentration to trigger the expression of their target gene(s) (Winzer *et al.*, 2002; Podbielski and Kreikemeyer, 2004; Siehnel *et al.*, 2010), and signalling molecule concentration correlates with cell density. To check whether this applies to the SHP/Rgg1358 system, the expression of the *shp1358* promoter was measured in cultures of strain LMD-9 containing the $P_{shp1358}$ -*luxAB* fusion inoculated at different concentrations (Fig. 2D). In all cultures, irrespective of

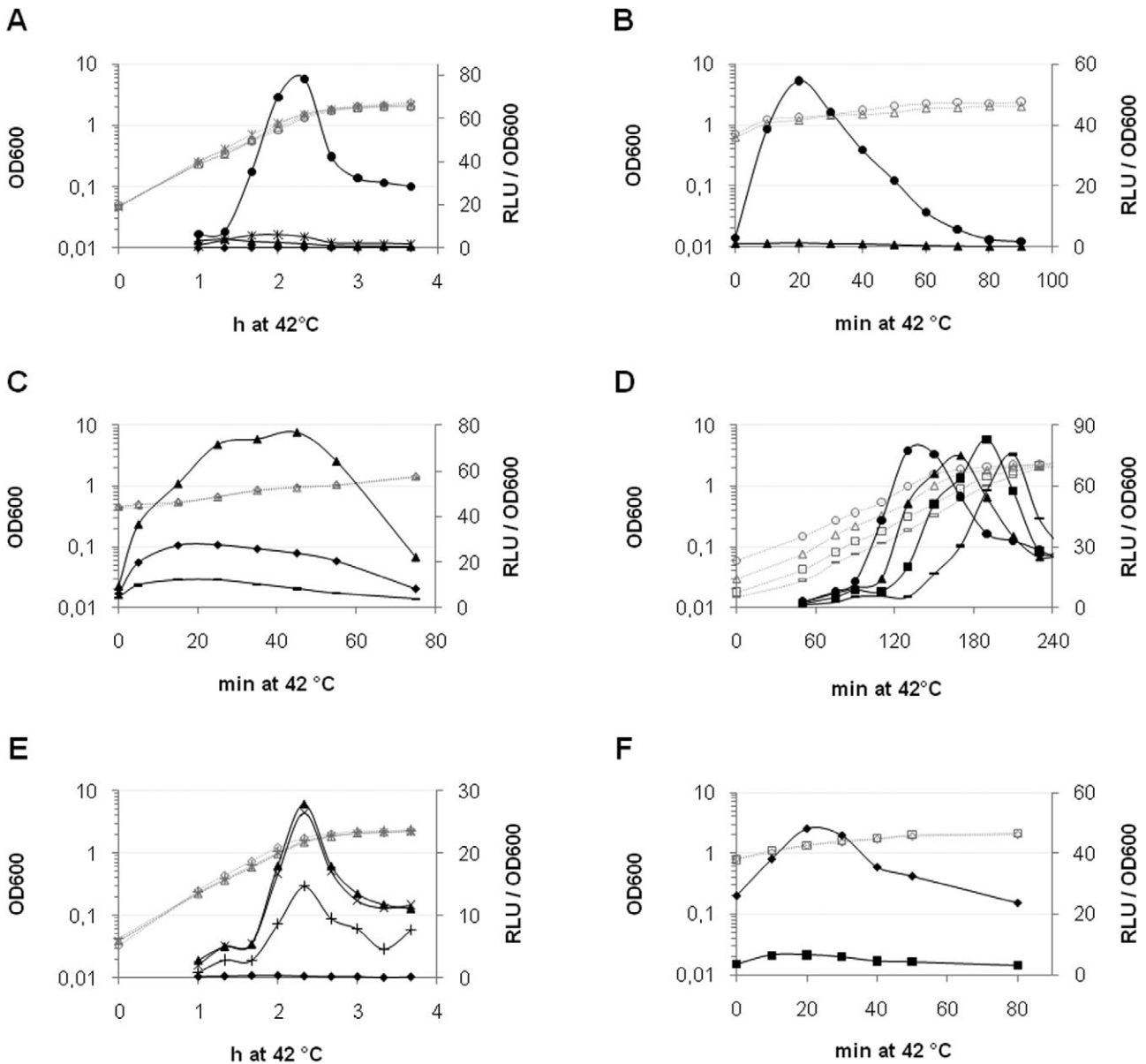


Fig. 2. Growth and luciferase activities of strains containing a $P_{shp1358}$ - $luxAB$ fusion in various genetic background and growth conditions. Growth curves (OD_{600}) are presented in gray and luciferase activities (RLU/OD_{600}) in black. Growth and luciferase activity of strains containing the $shp1358$ - $luxAB$ gene fusion: A, in the LMD-9 (●), $\Delta shp1358$ (▲), $\Delta rgg1358$ (*) and $amiCDE::spec$ (◆) genetic background; B, in the $\Delta shp1358$ genetic background after adding the supernatant from cultures of strain LMD-9 at OD_{600} 0.6 (●) or the $\Delta shp1358$ mutant (▲); C, in the $\Delta shp1358$ genetic background after adding the synthetic SHP1358_(15–23) pheromone at various concentrations: 25 ng ml⁻¹ (-), 250 ng ml⁻¹ (◆) and 2500 ng ml⁻¹ (▲); D, in the LMD-9 background inoculated at various concentrations: OD_{600} 0.012 (-), OD_{600} 0.025 (■), OD_{600} 0.05 (▲) and OD_{600} 0.1 (●); E, in the $\Delta shp1358$ (▲), $\Delta amiA1 \Delta shp1358$ (*), $amiA3::erm \Delta shp1358$ (+) and $\Delta amiA1 amiA3::erm \Delta shp1358$ (◆) genetic background and in cocultures with strain LMD-9 serving as a SHP1358 supplier; F, in the $\Delta shp1358$ genetic background after adding the supernatant from cultures of the Δeep pBV5030::P32- $shp1358$ (◆) or the Δopp pBV5030::P32- $shp1358$ (◆) mutant. Data shown are representative of three independent experiments.

initial cell density, a similar maximum of luciferase activity was observed (approximately 80 RLU/OD_{600}). However, the higher the initial cell density, the earlier the expression of the luciferase activity was triggered and its maximum reached.

To check that this effect was the result of the presence of the SHP1358_(15–23) pheromone at a sufficient concen-

tration, and not of the transition from exponential growth to stationary phase, we inoculated media with strain LMD-9 containing the $P_{shp1358}$ - $luxAB$ fusion at a low cell density and added or did not add synthetic SHP1358_(15–23) at the beginning of the exponential phase. The addition of SHP1358_(15–23) was sufficient to trigger the expression of the $shp1358$ gene, independent of the growth phase of

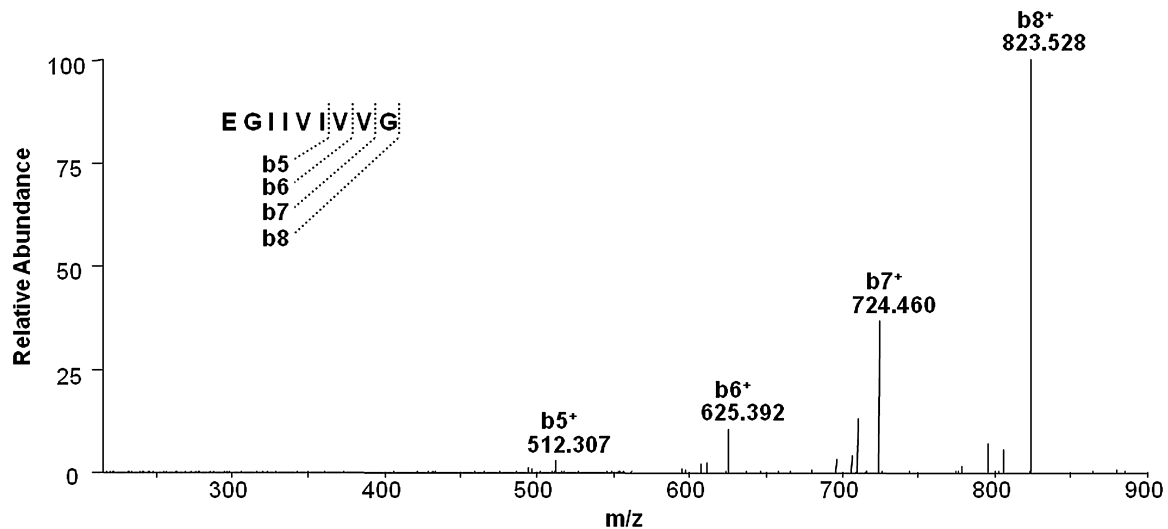


Fig. 3. The product of the *shp1358* gene is the precursor of a 9 amino acid secreted peptide. Fragmentation spectrum of the ion m/z 898.56, leading to the validation of the sequence of the putative mature form of the SHP1358 pheromone detected in the LMD-9 supernatant.

the culture (Fig. S1). These findings are consistent with a QS mechanism.

The lipoprotein AmiA3 detects the SHP1358_(15–23) pheromone before its reimportation by the oligopeptide transporter, AmiCDEF

Oligopeptide permease transporters can be divided in two functional entities: a detection entity composed of oligopeptide binding proteins allowing the capture of the target substrate (AmiA1 and AmiA3 in the strain LMD-9) and a transport entity allowing the import of the substrate into the cell (AmiCDEF in the strain LMD-9). The expression of the *shp1358* gene is abolished in an *amiCDE::spec* mutant and also in a Δ *amiA1* *amiA3::erm* mutant (data not shown). Therefore, it is plausible that the Ami transporter is involved in the reimportation of the SHP1358_(15–23) pheromone into the cell. To confirm this, we introduced the $P_{shp1358}$ -*luxAB* transcriptional fusion into various Δ *ami* mutants, also deleted for the *shp1358* gene: Δ *amiA1* *amiA3::erm* Δ *shp1358* *blp::P_{shp1358}*-*luxAB* to confirm the role of the Ami transporter in the reimportation of the pheromone, Δ *amiA1* Δ *shp1358* *blp::P_{shp1358}*-*luxAB* and *amiA3::erm* Δ *shp1358* *blp::P_{shp1358}*-*luxAB* to study, respectively, the activity of the AmiA3 and AmiA1 oligopeptide binding proteins. The reporter strain, TIL 1200, was also used as a positive control of luciferase activity. These four strains were then cocultivated with strain LMD-9, providing SHP1358_(15–23) to the medium, and luciferase activity was followed (Fig. 2E). The luciferase activity of the positive coculture control increased to 28 RLU/OD₆₀₀ whereas there was no detectable activity in the LMD-9/ Δ *amiA1* *amiA3::erm* Δ *shp1358* *blp::P_{shp1358}*-*luxAB* coculture. Therefore, the SHP1358_(15–23) pheromone provided by the LMD-9

strain was not sensed or imported by the cells lacking the oligopeptide binding proteins of the Ami transport system, but was by the *ami* wild type. Two different levels of luciferase activity were obtained for the cocultures of LMD-9 with single oligopeptide binding protein mutants. The luciferase activity of the LMD-9/ Δ *amiA1* Δ *shp1358* *blp::P_{shp1358}*-*luxAB* coculture was similar to that of the LMD-9/reporter strain coculture. The activity of the LMD-9/*amiA3::erm* Δ *shp1358* *blp::P_{shp1358}*-*luxAB* coculture was half that of the positive control coculture. Therefore, detection of the SHP1358_(15–23) pheromone mainly requires the AmiA3 oligopeptide binding protein.

The membrane peptidase Eep is involved in the SHP1358 maturation process

The Eep protease plays a key role in the maturation of various pheromones and anti-pheromones of *E. faecalis* (An *et al.*, 1999) and *S. gordonii* (Vickerman *et al.*, 2010). The presence of an *eep*-like gene in the *S. thermophilus* LMD-9 genome and some similarities between the anti-pheromone of *E. faecalis* and the SHP1358 pheromone (sequences of approximately 23 amino acids, presence of lysine in the N-terminal part and high hydrophobicity) led us to investigate the involvement of this protease in the SHP1358 maturation process. Eep proteases also contribute to the cleavage of the peptide signal of some lipoproteins (An and Clewell, 2002; Denham *et al.*, 2008). As the oligopeptide binding proteins of the Ami transporter are lipoproteins, we hypothesized that they may be matured by the Eep protease and therefore tested their functionality in a Δ *eep* mutant. The toxicity of the aminopterin peptide for the Δ *eep* strain was compared with that for the wild-type strain and the Δ *amiCDE* strain. The tox-

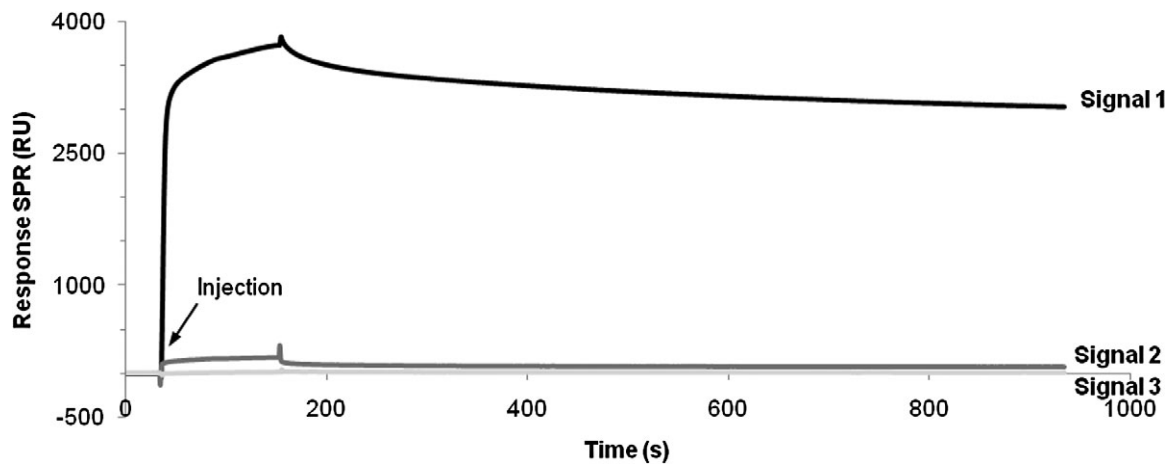


Fig. 4. Interaction profile between the His-tagged Rgg1358 protein and the SHP1358_(15–23) pheromone. Sensorgram of immobilized SHP1358_(15–23) pheromone and the regulatory protein Rgg1358 (signal 1) obtained after injection of 5 μM of the purified His-tagged Rgg1358 protein over 2 min, at a flow of 25 $\mu\text{l min}^{-1}$ in 20 mM HBS. Two controls were performed in the same conditions to test the interaction of the purified His-tagged Rgg1358 protein with immobilized ComS peptide of *S. thermophilus* (signal 2), and the interaction of bovine serum albumin with the immobilized SHP1358_(15–23) pheromone (signal 3). The sensorgrams observed were corrected by subtracting the results with the reference surface (ethanolamine).

icity of the aminopterin peptide for the Δeep strain was intermediate between that for strain LMD-9 (sensitive) and the *ami* mutant (resistant) (data not shown), suggesting that the functionality of the Ami transporter is probably partially impaired in the Δeep mutant. Consequently, a ΔamiCDE mutant, rather than the wild-type strain, was used as a positive control for the following experiment. A replicative plasmid containing the *shp1358* gene under the control of a constitutive promoter was introduced into the Δeep and ΔamiCDE strains, leading to strains TIL 1206 and TIL 1213 respectively. The effects of culture supernatants from both these strains were then tested on reporter strain (TIL 1200) cell pellets (Fig. 2F). The luciferase activity of the reporter strain was tenfold lower with supernatant from TIL 1206 than with supernatant from TIL 1213, indicating that the extracellular concentration of the pheromone is lower in TIL 1206 cultures than in TIL 1213 cultures. The endopeptidase Eep is therefore involved in the SHP1358 maturation process.

The SHP1358_(15–23) pheromone interacts with the Rgg1358 regulatory protein

We used SPR analyses to investigate whether the SHP1358_(15–23) pheromone binds the regulatory protein Rgg1358. The interaction between chip-immobilized SHP1358_(15–23) (898 Da) and purified His-tagged Rgg1358 protein (at 5 μM) gave a high SPR signal response corresponding to approximately 3700 RU (Fig. 4, signal 1), under the flow condition tested. Moreover, very little dissociation was observed, suggesting a high affinity between these two partners. In contrast, when purified

Rgg1358 protein was injected over another immobilized small hydrophobic peptide (IAILPYFAGCL, ComS of *S. thermophilus* LMD-9) in similar conditions, no signal response was obtained (Fig. 4, signal 2). The specificity of the binding was confirmed by replacing the regulatory protein Rgg1358 by BSA (Fig. 4, signal 3). These SPR analyses demonstrate that SHP1358_(15–23) and Rgg1358 specifically interact with each other.

Rgg1358 binds the promoter regions of shp1358 and ster_1357 genes

Electrophoretic mobility shift assays were carried out to test for interactions between the Rgg1358 regulatory protein and DNA fragments of promoter regions of the two known target genes, *shp1358* and *ster_1357*. To design relevant DNA probes, we mapped the transcriptional start site of both genes and identified putative -10 promoter sequences (Fig. 5A). A conserved motif – GCAWATATGGGAATA – of 15 nt was found 25 nt upstream from the -10 motif of the *shp1358* and *ster_1357* genes. This motif differs from that described for PlcR, PrgX and ComR regulators (Fig. 5B). DNA probes centred on the conserved motif were amplified by PCR. Nine pg of each labelled probe was mixed with purified recombinant His-tagged Rgg1358 protein and analysed by EMSA. The recombinant Rgg1358 protein bound specifically to the *shp1358* and *ster_1357* probes and the intensity of the shift increased with increasing concentration of the Rgg1358 (data not shown). In parallel, the binding to these two probes of the Rgg1358 protein mixed with the SHP1358_(15–23) pheromone was also tested. In this case,

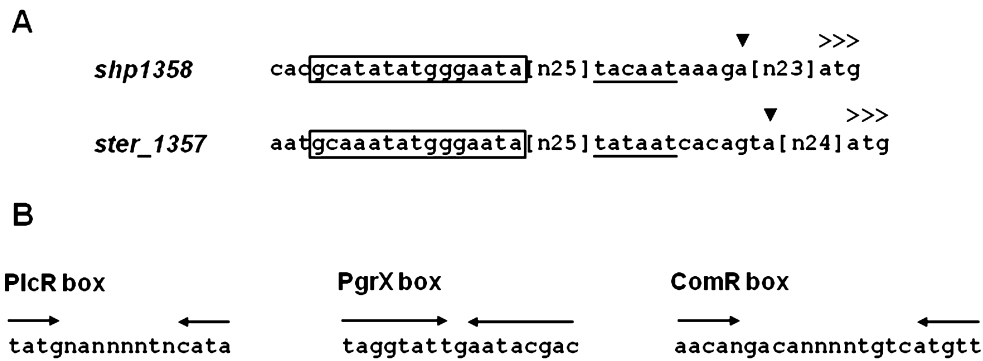


Fig. 5. Comparison of the DNA-binding site of the RNPP and RNPP-like proteins.

A, Nucleotide sequences of promoter regions of the genes *shp1358* and *ster_1357* of *S. thermophilus* strain LMD-9. Transcriptional start sites are indicated with ▼ symbol and the start codon with >>>. The putative binding site for the Rgg1358 protein is boxed and putative –10 sequences are underlined. B, DNA-binding sites for PlcR (Lereclus *et al.*, 1996; Agaisse *et al.*, 1999), PrgX (Bae *et al.*, 2002) and ComR (Mashburn-Warren *et al.*, 2010) transcriptional regulators.

to prevent peptide-dependent binding being missed because of a possible excess of Rgg1358 protein, an intermediate Rgg1358 protein concentration (at 70 nM) was used; this concentration did not allow a complete shift of the *shp1358* and *ster_1357* probes (Fig. 6A, lanes 1 and 2). The experiments were performed as described above in the presence of 27.8 nM, 278 nM and 2.78 μ M, of the synthetic SHP1358_(15–23) pheromone (corresponding to 25, 250 and 2500 ng ml^{–1}, respectively). DNA shifts were observed for the *shp1358* and *ster_1357* probes (Fig. 6A, lanes 3 to 5) but the presence of the pheromone did not appear to influence the binding of the Rgg1358 protein to DNA. For all experiments, the *ldh* probe was used as negative control (Fig. 6A, lanes 6 and 7). These experiments show that Rgg1358 binds sequences found in the *shp1358* and *ster_1357* gene promoters and that the presence of the pheromone does not seem to be required for binding. To confirm this novel result, a P_{rgg1358}-*luxAB* fusion was constructed and used to transform strain LMD-9 and mutants deleted for the *rgg1358* or *shp1358* genes. The maximal expression of the *rgg1358* promoter was the same in the wild-type strain background and the Δ *shp1358* mutant (70 RLU/OD₆₀₀) but was twofold higher in the Δ *rgg1358* mutant (130 RLU/OD₆₀₀) (Fig. 6B). This indicates that the Rgg1358 protein is a repressor for the transcription of its own gene with or without the SHP1358_(15–23) pheromone. This repressor effect is most probably direct. Indeed, the DNA-binding motif recognized by the Rgg1358 protein in the promoter region of the *shp1358* gene is located 16 nt upstream from the ATG of the *rgg1358* gene and consequently in its promoter region. These findings are in good agreement with the EMSA results and suggest that the Rgg1358 protein does not require the presence of pheromone to bind DNA.

Discussion

Here, we demonstrate the existence of, and describe, a QS mechanism involving a Rgg transcriptional regulator encoded by the *rgg1358* gene and a small hydrophobic peptide called SHP1358 (summarized in Fig. 7). We show that the triggering of the mechanism is biomass-dependent and relies on the presence, in the extracellular medium, of the mature form of the *shp1358* gene product, SHP1358_(15–23), which is released by a C-terminal cleavage of the SHP1358 precursor. SHP1358_(15–23) is most probably the pheromone of this QS mechanism. However, we can not completely exclude the possibility that it is an intermediate precursor to a more active species, or that there are other minor derivatives involved. The maturation of the SHP1358 precursor involves the transmembrane endopeptidase Eep. The capture of the pheromone from the extracellular medium appears to be performed mainly by one of the two oligopeptide binding proteins of the AmiCDEF oligopeptide transporter, AmiA3. Following the reimportation of SHP1358_(15–23), it interacts with the regulatory protein Rgg1358. This interaction probably changes the Rgg1358 protein to an activated state, resulting in, at least, upregulation of the expression of the genes *shp1358* and *ster_1357*. The effect of the interaction remains unclear, but we suggest that it may involve a change of either conformation or oligomerization. At a low cell density, the Rgg1358 regulator may already be bound to its recognition sequences upstream from the promoters of the genes *shp1358* and *ster_1357* but in an inactive form.

Further study of two steps of this mechanism would be particularly interesting. First, the secretion mechanism responsible for the export of SHP pheromones is unknown. As the SHP sequences are similar to signal sequences, it is difficult to predict whether or not they use

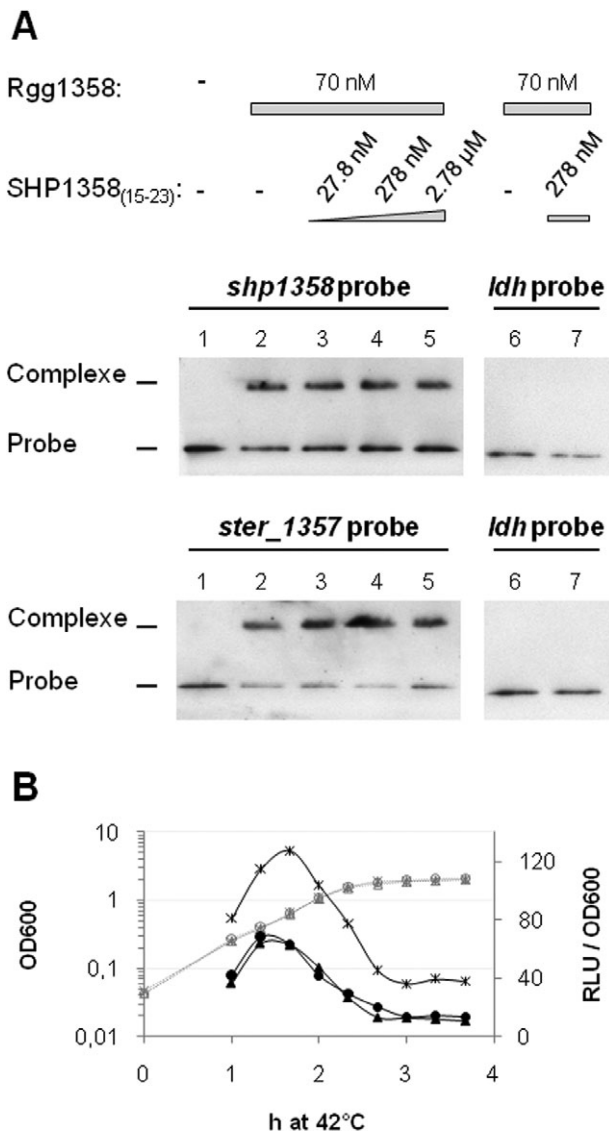


Fig. 6. Analysis of the Rgg1358 binding to DNA. **A.** DNA binding of the His-tagged Rgg1358 protein to promoter regions of the two target genes of the SHP/Rgg1358 system, *ster_1357* and *shp1358*, with or without the addition of the synthetic SHP1358₍₁₅₋₂₃₎ pheromone. The *ldh* probe is an *ldh* promoter fragment used as a negative control. **B.** Growth and luciferase activity of strains containing the *rgg1358-luxAB* gene fusion in the LMD-9 (●), Δ *shp1358* (▲) and Δ *rgg1358* (*) genetic backgrounds. Growth curves (OD₆₀₀) are presented in gray and luciferase activities (RLU/OD₆₀₀) in black. Data shown are representative of three independent experiments.

the Sec machinery, need specific transporter(s) or insert into the cytoplasmic membrane to be exported. Second, the details of the roles of the two oligopeptide binding proteins are unclear. The oligopeptide binding protein AmiA3 is also the major actor for the capture and the sensing of the signalling peptide ComS (Gardan *et al.*, 2009; Fontaine *et al.*, 2010). The *amiA1* gene is the first gene of the *ami* operon whereas the *amiA3* gene is tran-

scribed independently, and is separated from the *ami* operon by an insertion sequence. It would be of interest to determine if AmiA1 is more dedicated to nutritional function and if AmiA3 is largely responsible for the transport of pheromones into the cell as a result of a higher affinity for these hydrophobic peptides; alternatively, the presence of larger amounts of AmiA3 may be responsible for its dominant role.

This QS mechanism, involving a signalling peptide that is detected in the intracellular medium and imported by an oligopeptide transporter, has similarities with those described for the peptide-associated transcriptional regulators of the RNPP family. This family includes the PapR/PlcR and the NprX/NprR activators and the cCF10-iCF10/PrgX repressor (Declerck *et al.*, 2007). Only the QS mechanisms involving PlcR and PrgX have been studied in detail: the role of the peptide in the control of the activation state of their cognate regulator has been revealed by structural studies (Shi *et al.*, 2005; Declerck *et al.*, 2007). PSI-BLAST analyses indicate amino acid sequence similarities between various Rgg proteins (MutR of *S. mutans* and RggD of *S. gordonii*) and the transcriptional regulators PlcR and PrgX, throughout the protein (Declerck *et al.*, 2007). Like PlcR and PrgX, Rgg proteins have a Helix–Turn–Helix domain of the xenobiotic regulatory element family, which allows their binding to DNA (Neely *et al.*, 2003; Vickerman *et al.*, 2003; Rawlinson *et al.*, 2005; Samen *et al.*, 2006). We demonstrate such binding in this study. Rgg-associated peptides, like the anti-pheromone peptides from *E. faecalis*, resemble signal sequences and, like the pheromone and anti-pheromones, SHP1358 is matured by the endopeptidase Eep (An *et al.*, 1999; An and Clewell, 2002). Rgg-associated peptides are not similar to the PapR peptide, which is longer and in which the presence of a pro-peptide leader upstream from the mature form of the peptide indicates that it is probably exported and matured by the Sec machinery. A common feature of the RNPP regulators is the presence of tetratricopeptide repeat (TPR) domains in their C-terminal part that are involved in protein/protein or protein/peptide interactions (Goebel and Yanagida, 1991). TPRpred software (Karpenahalli *et al.*, 2007) failed to identify such domains in the Rgg proteins. However, the TPR domains of the PrgX repressor were only discovered after structural analysis (Shi *et al.*, 2005). Consequently, structural analyses, involving for example crystallography experiments, are required to determine whether or not the Rgg regulatory proteins contain TPR domains. We therefore propose that the SHP-associated Rgg are new members of the RNPP family. Indeed, SHP/Rgg systems have also some specific features. By searching the complete genome sequences of streptococci, we retrieved 68 SHP representing 28 different amino acid sequences. Among the various peptides asso-

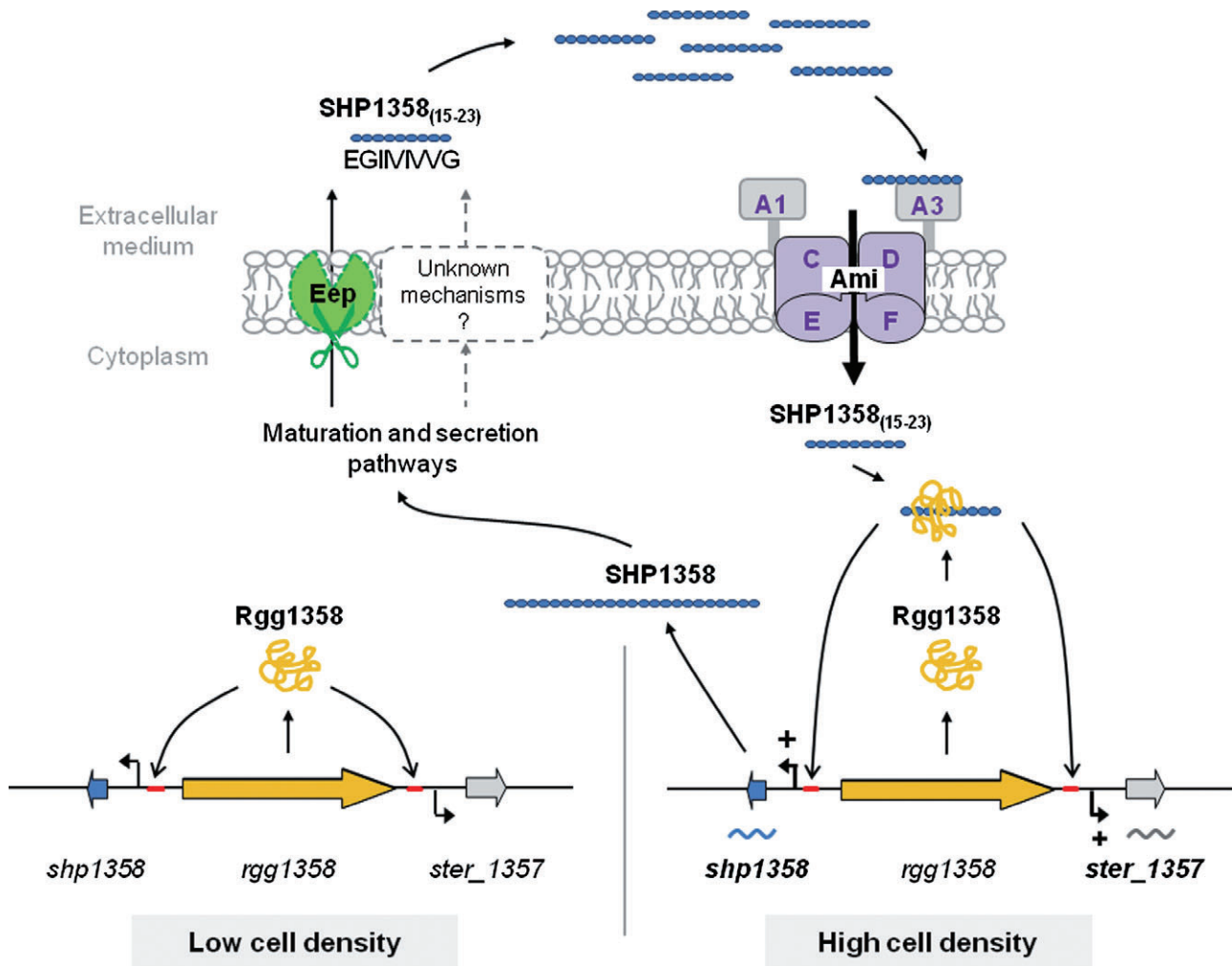


Fig. 7. Schematic representation of the SHP/Rgg1358 quorum-sensing mechanism of *S. thermophilus* LMD-9. The quorum-sensing signal is encoded by the *shp1358* gene. The pheromone, a small hydrophobic peptide called SHP1358₍₁₅₋₂₃₎ (EGIIIVVVG), is produced by C-terminal cleavage of a 23 amino acid peptide precursor, a process that involves the endopeptidase Eep localized in the membrane. At high cell density, the secreted SHP1358₍₁₅₋₂₃₎ is sensed by the lipoprotein AmiA3 and reimported into the cell by the AmiCDEF transporter. Intracellular SHP1358₍₁₅₋₂₃₎ then interacts with the regulatory protein Rgg1358. The effect of the interaction is unknown but binding of the SHP1358₍₁₅₋₂₃₎/Rgg1358 complex to the promoter region of the two target genes, *shp1358* and *ster_1357*, leads to the activation of their transcription. At low cell density, we hypothesize that the SHP1358₍₁₅₋₂₃₎ is present in a negligible amount and the Rgg1358 protein is bound alone to the promoter region of *shp1358* and *ster_1357* in an inactivated state that does not allow their transcription.

ciated with regulators of the RNPP family, SHPs constitute the largest group. They have one conserved aspartate or glutamate residue in their C-terminal part, possibly important for the maturation step and nearly always a conserved glycine residue at the end of their sequence. The DNA recognition sequence also seems to be specific with no similarities to the inverted repeat sequences recognized by PlcR or PrgX (Fig. 5B). Similar sequences have been found upstream from 80 % of *shp* genes belonging in *S. thermophilus* and other streptococci (e.g. B. Fleuchot, unpublished) and has the particularity of not being palindromic. Finally, our *in vitro* and genetic experiments demonstrate that SHP1358₍₁₅₋₂₃₎ interacts with the transcriptional regulator Rgg1358 but that it is probably not

necessary for the binding of the Rgg1358 protein to DNA. In *B. cereus*, PapR pheromone binding to the PlcR activator leads to its multimerization, which is essential for its binding to the PlcR box and therefore for the regulation of the PlcR regulon (Slamti and Lereclus, 2002; Declerck *et al.*, 2007). In *E. faecalis*, the situation is more complex. Indeed, although PrgX is able to bind DNA without the absence of its associated pheromones (Bae *et al.*, 2002), their interaction is essential to regulate the expression of the target genes. The binding of the cCF10 sex pheromone to the PrgX repressor modifies its tetrameric conformation to become two dimers with less affinity for DNA, leading to the opening of a DNA loop and allowing access of the RNA polymerase to the target *prgQ* promoter. In

contrast, the binding of iCF10 neutralizes the cCF10 pheromone activity and favours the return to the tetrameric form of PrgX (Shi *et al.*, 2005; Dunny, 2007). Further experiments are needed to determine if the SHP1358_(15–23) pheromone influences the oligomerization state of the Rgg1358 protein, and if this is the cause of the activation of the Rgg1358 regulator, independently of its binding capacity. However, these results indicate that this QS mechanism involving Rgg regulators differs from those described for PlcR and PrgX.

The regulation of competence in *S. thermophilus* LMD-9 is controlled by a Rgg-like protein (ComR) associated with a hydrophobic pheromone (ComS) reimported into the cell by the Ami oligopeptide transporter (Gardan *et al.*, 2009; Fontaine *et al.*, 2010). Mashburn-Warren *et al.* (2010) showed that *comS/comR* orthologues are also present in the genomes of *S. mutans* and in pyogenic and bovis streptococci. Moreover, they found results in *S. mutans* similar to those in *S. thermophilus*: (i) a deletion of *comR*, *comS* or of subunits of the oligopeptide transporter abolish transformability, (ii) ComR controls the transcription of the gene encoding the alternative sigma factor, SigX, itself involved in the control of the transcription of the genes encoding the DNA uptake and recombination machinery and (iii) extracellular addition of a synthetic peptide derived from the ComS precursor induces development of competence. The *comS* orthologues encode peptides, named XIP, which are 17 to 32 amino acids long and contain a conserved double-tryptophan in their C-terminal part (except in the case of *S. thermophilus*). The ComR regulators have similarity with both Rgg and PlcR proteins, and their predicted structures have similarities with the crystal structure of PlcR. These various observations led the authors to propose that XIP-associated ComR regulators are new members of the RNPP family. Although we agree with this, we think that SHP/Rgg and XIP/ComR pairs are distinct branches of the RNPP family for the following reasons: first, our phylogenetic analysis of the Rgg and Rgg-like proteins clearly shows that SHP-associated Rgg and XIP-associated ComR cluster in different parts of the tree and that the two families of SHP and XIP peptides differ in terms of their amino acid sequences and their conserved amino acids; second, their predicted DNA recognition sequences are not similar; and finally, the *shp* and *rgg* genes are in all cases transcribed in opposite directions whereas the *comS* genes all map downstream from the *comR* genes and in the same orientation. This last point has an incidence on the SHP/Rgg mechanism. Where the *shp* gene is located upstream from the *rgg* gene and divergently transcribed, Rgg can simultaneously be the repressor of its own gene and the activator of the *shp* gene. This potentially prevents the system from becoming

over-active or overexpressed. For the new SHP/Rgg group described in this study (group III, in which the *shp* gene is downstream from the *rgg* gene and convergently transcribed), the 3' ends of the two genes always overlap. This genetic configuration may also have consequences for the regulation of the system.

To facilitate discrimination between these small ComS/XIP hydrophobic peptides and the SHP we describe herein, we propose to restrict the use of the acronym SHP to small hydrophobic peptides with a conserved aspartate or glutamate residue about nine amino acids before the C-ter end of the sequence, encoded by a gene that is not transcribed in the same orientation as the *rgg* gene.

Another important issue is the range of physiological functions controlled by these systems. The discovery of 68 SHP/Rgg systems suggests a QS mechanism that is widespread in the streptococci family. Unlike XIP/ComR systems that all seem to control the transcription of at least the *sigX* gene and consequently the triggering of the competence state in different species of streptococci, the targets controlled by the SHP/Rgg systems are not obvious. For the SHP/Rgg1358 QS mechanism described here, one target, *ster_1357*, encoding a cyclic secreted peptide called Pep1357C was identified. This gene, mapping downstream from the *rgg1358* gene, is followed by two genes encoding a protein belonging to the S-adenosylmethionine radical enzyme family and an efflux transporter; it has been suggested that the proteins encoded by these two genes are responsible for the maturation and the secretion of Pep1357C outside the cell (Ibrahim *et al.*, 2007b). A nearly identical locus including the *shp/rgg* genes has been found in a recently sequenced *Streptococcus mitis* strain (SK564). We found a small number of homologous genes i.e. encoding a peptide, a S-adenosylmethionine radical enzyme and an exporter downstream from SHP-associated Rgg, in various streptococci species. Four similar genetic structures in *B. subtilis* and more recently in *Bacillus thuringiensis* have been studied. None of them are close to genes encoding Rgg proteins (Zheng *et al.*, 2000; Brede *et al.*, 2004; Butcher *et al.*, 2007; Rea *et al.*, 2010). All these loci encode modified peptides with antimicrobial activities. We therefore tested Pep1357C for bactericidal and bacteriostatic activity against several strains and species but no bacterial growth inhibition or killing effects were detected in the conditions tested.

Finally, it would also be interesting to explore other pathways linked to this QS mechanism. For example, *shp/rgg* loci are present in multicopy in streptococci, so it would be interesting to test for cross-activation within cells, or between strains or species. Any such interspecies interaction would be highly relevant to the study of various natural ecosystems, particularly for example the

human oral microbiome where several species of streptococci live together (Dewhirst *et al.*, 2010). Another level of complexity is brought by the presence of other RNPP systems in the same strain. Elucidating how the bacteria manage this plethoric repertoire of peptides and how it could be manipulated would be potentially valuable.

Experimental procedures

Phylogenetic analysis of the Rgg family

A preliminary PSI-BLAST search, against the non-redundant NCBI database, detected protein sequences with statistically significant similarity to Rgg regulators only in the order of *Lactobacillales* and the family *Listeriaceae*. We thus conducted a comparative analysis of the Rgg and Rgg-like repertoire in the genomes belonging to these two taxonomic groups. The analysis included a total of 90 complete genome sequences corresponding to all the sequenced isolates available in Genome Reviews release 125 (05-OCT-2010). This list includes representatives of eight genera: *Streptococcus* (48 genome sequences), *Lactobacillus* (22), *Listeria* (9), *Lactococcus* (5), *Leuconostoc* (3), *Enterococcus* (1), *Oenococcus* (1) and *Pediococcus* (1). Three prey representative of the three types of SHP/Rgg systems described in Ibrahim *et al.* (2007a) (*stu.0182* in *S. thermophilus* LMG18311, *smu.1509* in *S. mutans* UA159 and *gbs1555* in *S. agalactiae* NEM316) were used to retrieve an exhaustive list of Rgg and Rgg-like proteins. Hits accounting for a least 80% of the length of one prey were collected after three iterations with PSI-BLAST (*E*-value ≤ 0.001). The sequences were aligned with muscle (default parameters) and a maximum-likelihood phylogenetic tree was constructed with phym1 (JTT model of protein evolution, gamma distributed rate of evolution, 4 discrete categories of sites). The statistical support for each branch was quantified by analysing 200 bootstrap replicates. The tree was drawn in R using the library 'ape' (Paradis *et al.*, 2004). Rgg-associated SHP or XIP peptides were recovered as follows. First, all hydrophobic peptides with basic residues (lysine and more rarely arginine) at the N-terminus were selected. Then, peptides with a glutamate or an aspartate at their C-terminus and encoded by a gene upstream from the *rgg* gene and divergently transcribed were considered to be SHP. Peptides with a double tryptophan motif and encoded by a gene downstream from the *rgg* gene and in the same orientation were considered to be XIP.

Bacterial strains and growth conditions

The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. *S. thermophilus* strains were grown at 28°C or 42°C in M17 medium (Difco) supplemented with 10 g l⁻¹ lactose (M17lac) or in a chemically defined medium (CDM) without shaking, under atmospheric air and with a ratio of air space to liquid of approximately 90% (Letort and Juillard, 2001). *Escherichia coli* strains were grown at 30°C or 37°C in Luria-Bertani (LB) broth with shaking (Sambrook & Russell, 2001). Agar (1.5%) was added to the media as appropriate. When required, antibiotics were added to the media at the following final

concentrations: erythromycin, 200 µg ml⁻¹ for *E. coli* or 5 µg ml⁻¹ for *S. thermophilus*, kanamycin, 30 µg ml⁻¹ for *E. coli* or 1 mg ml⁻¹ for *S. thermophilus* and spectinomycin, 100 µg ml⁻¹ for *S. thermophilus*. The optical density at 600 nm of the cultures was measured with a Uvikon 931 spectrophotometer (Kontron).

DNA manipulation and sequencing

Standard methods were used for DNA purification, restriction digestion, PCR, ligation and sequencing. *E. coli* TG1 or TG1 *repA*⁺ strains were used as hosts for cloning experiments. The oligonucleotides used for PCR are listed in Table 2. *S. thermophilus* was transformed using natural competent cells or electrocompetent cells (Ibrahim *et al.*, 2007b). The 5' tag-RACE method described by Fouquier d'Hérouel *et al.* (2011) was used to determine the transcriptional start site of the genes *ster_1357* and *shp1358* with oligonucleotides *shp1358*-tag and *ster_1357*-tag.

Plasmid and strain constructions

The plasmids used are listed in Table 3. Plasmid pGICB004, which allows the integration of transcriptional fusions to the *luxAB* reporter genes at the *blp* locus in *S. thermophilus*, was constructed in two steps. First, a 0.95 kb fragment including the *blpR* promoter sequence, the *blpR* ORF and the first 96 bp of *blpH* was amplified by PCR with primers UPINSLUX1 and UPINSLUX2, digested with PshAI and SpeI, and ligated upstream from *luxAB* into similarly digested pJIM4900. Next, a 1.05 kb fragment located downstream from *blpX* was amplified by PCR with primers DNINSLUX1 and DNINSLUX2, digested with Sall and PvuII, and inserted downstream from *luxAB* between the Sall and PvuII sites of the plasmid obtained in the first step. Plasmid pGICB004::P_{*shp1358*} and pGICB004::P_{*rgg1358*} were constructed as follows. The *shp1358* and *rgg1358* promoter were amplified by PCR with oligonucleotides Pshp1358-EcoRI/Pshp1358-SpeI and Prgg1358-EcoRI/Prgg1358-SpeI, respectively, digested with restriction enzymes SpeI/EcoRI and ligated between the same restriction sites of pGICB004. Integration and excision of these plasmids in strains LMD-9, TIL 778 (Δ *shp1358*), TIL 775 (Δ *rgg1358*) and TIL 1198 (Δ *amiA1*) (Garault *et al.*, 2000 for experimental procedure) led to the construction of strains TIL 1165 (*blp*::P_{*shp1358*}-*luxAB*) and TIL 1164 (*blp*::P_{*rgg1358*}-*luxAB*), TIL 1200 (Δ *shp1358 blp*::P_{*shp1358*}-*luxAB*) and TIL 1208 (Δ *shp1358 blp*::P_{*rgg1358*}-*luxAB*), TIL 1169 (Δ *rgg1358 blp*::P_{*shp1358*}-*luxAB*) and TIL 1168 (Δ *rgg1358 blp*::P_{*rgg1358*}-*luxAB*) and TIL 1204 (Δ *amiA1 blp*::P_{*shp1358*}-*luxAB*). Competent cells of strain TIL 1204 were transformed with pG⁺host9::updown.*shp1358*. Integration and excision of the plasmid gave strain TIL 1303 (Δ *amiA1 \Delta**shp1358 blp*::P_{*shp1358*}-*luxAB*). The SHP1358 peptide was overproduced by inserting the *shp1358* gene into pBV5030 downstream from the P32 promoter. The *shp1358* gene was amplified by PCR with oligonucleotides *shp1358*-NcoI and *shp1358*-PstI. The resulting fragment was digested with restriction enzymes NcoI/PstI and inserted into pBV5030::P₃₂-*ster_1357* digested with the same enzymes. The resulting plasmid pBV5030::P₃₂-*shp1358* allowed the overproduction of a modified SHP1358 peptide containing a

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Bacterial strain and genotypes	Resistance ^a	Description ^b	Source or reference
<i>Streptococcus thermophilus</i>			
LMD-9		Wild type	Makarova <i>et al.</i> (2006)
TIL 773		Δeep	This study
TIL 775		$\Delta rgg1358$	Ibrahim <i>et al.</i> (2007b)
TIL 778		$\Delta shp1358$	Ibrahim <i>et al.</i> (2007b)
TIL 883		$\Delta amiCDE$	Ibrahim <i>et al.</i> (2007b)
TIL 1164		$blp::P_{rgg1358}-luxAB$	pGICB004::P _{rgg1358} → LMD-9 This study
TIL 1165		$blp::P_{shp1358}-luxAB$	pGICB004::P _{shp1358} → LMD-9 This study
TIL 1168		$\Delta rgg1358 blp::P_{rgg1358}-luxAB$	pGICB004::P _{rgg1358} → TIL 775 This study
TIL 1169		$\Delta rgg1358 blp::P_{shp1358}-luxAB$	pGICB004::P _{shp1358} → TIL 775 This study
TIL 1197	Erm	$amiA3::erm$	Gardan <i>et al.</i> (2009)
TIL 1198		$\Delta amiA1$	Gardan <i>et al.</i> (2009)
TIL 1199	Erm	$\Delta amiA1 amiA3::erm$	Gardan <i>et al.</i> (2009)
TIL 1200		$\Delta shp1358 blp::P_{shp1358}-luxAB$	pGICB004::P _{shp1358} → TIL 778 This study
TIL 1202	Spec	$amiCDE::spec$	PCR fragment $amiCDE::spec$ → LMD-9 This study
TIL 1203	Spec	$amiCDE::spec blp::P_{shp1358}-luxAB$	TIL 1202 DNA → TIL 1165 This study
TIL 1204		$\Delta amiA1 blp::P_{shp1358}-luxAB$	pGICB004::P _{shp1358} → TIL 1198 This study
TIL 1206	Erm	$\Delta eep pBV5030::P32-shp1358$	pBV5030::P32- <i>shp1358</i> → TIL 773 This study
TIL 1208		$\Delta shp1358 blp::P_{rgg1358}-luxAB$	pGICB004::P _{rgg1358} → TIL 778 This study
TIL 1213	Erm	$\Delta amiCDE pBV5030::P32-shp1358$	pBV5030::P32- <i>shp1358</i> → TIL 883 This study
TIL 1303		$\Delta amiA1 \Delta shp1358 blp::P_{shp1358}-luxAB$	pG ⁺ host9::updown. <i>shp1358</i> → TIL 1204 This study
TIL 1304	Erm	$amiA3::erm \Delta shp1358 blp::P_{shp1358}-luxAB$	TIL 1197 DNA → TIL 1200 This study
TIL 1305	Erm	$\Delta amiA1 amiA3::erm \Delta shp1358 blp::P_{shp1358}-luxAB$	TIL 1199 DNA → TIL 1200 This study
<i>Escherichia coli</i>			
TG1		$supE hsd\Delta5 thi \Delta(lac-proAB) F[traD36 proAB^+ lac^{\rho} lacZ\Delta M15]$	Gasson, 1983
TG1 <i>repA</i> ⁺	Km	TG1 derivative with <i>repA</i> gene integrated into the chromosome	Pierre Renault ^c
Rosetta	Cm	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm pRARE</i>	Novagen
TIL 1318	Km	$pET28a::Rgg1358$	This study

a. Erm, Spec, Km, Cm indicate resistance to erythromycin, spectinomycin, kanamycin and chloramphenicol respectively.

b. Arrows indicate construction by natural transformation or electroporation with chromosomal DNA or plasmid; 'updown' followed by the name of a gene indicates that the fragments upstream and downstream from the gene were inserted into pG⁺host9 to construct in frame deletions of the gene by double cross-over event (Garault *et al.*, 2000).

c. INRA, Jouy-en-Josas, France.

glycine residue between the methionine at position 1 and lysine at position 2 of the wild-type sequence. Strain TIL 1202 (*amiCDE::spec*) was constructed using the overlapping PCR method. Briefly, the spectinomycin cassette (*spec*) was amplified by PCR with oligonucleotides *Spec-R* and *Spec-F2* and the pAT28 as the template (Trieu-Cuot *et al.*, 1990); it was fused by PCR to the beginning of the *amiC* gene (upstream fragment) and the end of the *amiE* gene and the *amiF* gene (downstream fragment). Oligonucleotides used for the amplification of the upstream fragment were *amiCDE_up-F* and *amiCDE_up-R* and for the downstream fragment *amiCDE_down-F* and *amiCDE_down-R*. The resulting 3 kb fragment was used to transform LMD-9 cells. Strains TIL 1304 (*amiA3::erm Δshp1358 blp::P_{shp1358}-luxAB*) and TIL 1305 (*ΔamiA1 amiA3::erm Δshp1358 blp::P_{shp1358}-luxAB*) were constructed as follows. Cells of strain TIL 1200 were transformed with chromosomal DNA from strains TIL 1197 (*amiA3::erm*) and TIL 1199 (*ΔamiA1 amiA3::erm*) respectively. A similar procedure was used to construct strain TIL 1203 (*amiCDE::spec blp::P_{shp1358}-luxAB*): TIL 1165 was transformed with chromosomal DNA from strain TIL 1202. Strain TIL 773 (*Δeep*) was constructed by deleting an internal fragment of the gene by a double cross-over event using pG⁺host9. Briefly,

oligonucleotides *eep-XhoI* with *eep-EcoRI*A and *eep-EcoRI*B with *eep-SpeI* were used to amplify upstream and downstream fragments of the *eep* gene. These two fragments were double digested with restriction enzymes *XhoI* with *EcoRI* and *EcoRI* with *SpeI*, respectively, and ligated between the *XhoI* and *SpeI* restriction sites of pG⁺host9. The resulting plasmid was used to transform electrocompetent cells of strain LMD-9. Integration and excision of the plasmid led to the in-frame deletion of the *eep* gene. Strains TIL 1206 (*Δeep pBV5030::P32-shp1358*) and TIL 1213 (*ΔamiCDE pBV5030::P32-shp1358*) were constructed by electrotransformation of strains TIL 773 and TIL 883, respectively, with pBV5030::P32-*shp1358*. Plasmid pET28a::Rgg1358 was constructed to allow the expression and the purification of the N-terminus His-tagged Rgg1358 protein in *E. coli* as follows. The *rgg1358* gene was amplified by PCR with oligonucleotides Rgg1358-NdeI and Rgg1358-XhoI. The resulting 882 bp fragment was digested with restriction enzymes NdeI/XhoI and ligated into in the expression vector pET28a digested with the same restriction enzymes. The resulting plasmid was used to transform *E. coli* strain Rosetta to obtain TIL 1318 (*E. coli* Rosetta pET28a::Rgg1358). All constructions were verified by PCR and validated by sequencing.

Table 2. Primers used in this study.

Primer	Sequence (5' → 3') ^{a,b}
Mutants and plasmids constructions	
UPINSLUX1	AAGACCACAGTCCAGACGAATCTTCTGTCCCA
UPINSLUX2	CGACTAGTGTATCCAGTCTCTAAAATTCAG
DNINSLUX1	AAGTCGACTTCCACTGTCTTGGCTATATC
DNINSLUX2	AACAGCTGCGTGTCAAAGCTACTGTAGTC
Pshp1358-EcoRI	GAAGAATTCTGCTTTTTTCATGTGATAAT
Pshp1358-SpeI	AACTACTAGTAGACGTTGATATACCAGC
Prgg1358-EcoRI	GAAGAATTCAATTTTTTCATACTACACCTCC
Prgg1358-SpeI	ACCTACTAGTCGACGATAACGATAATGCC
shp1358-NcoI	CCACCATGGGTAAAAAGCAAATTTTACTAAC
shp1358-PstI	CCTGCTGCAGAATACAGAACTAAATCC
Spec-R	GAAAAATTCTATAGAACTTCTCTCAATTAGGTC
Spec-F2	TACAGATTAATAATTATTCTTTATTATACAGATC
amiCDE_up-F	CGGCTTTGACCTACACG
amiCDE_up-R	GAAAAATTCTATAGAACTTCTCTCAATTAGGCTAAGGCGATGGTTGGTAGTC
amiCDE_down-F	TACAGATTAATAATTATTCTTTATTATACAGATCTGAGGAAAAAGCACCAC
amiCDE_down-R	AAGTGACCTGGGCGTAC
eep-XhoI	GAAGAATTCTTAAAAAAGTCCTAGTAAGTGC
eep-EcoRI	CTCCTCGAGTACCTTTATCGTGATCC
eep-EcoRIB	GAAGAATTCTTAGAAACAAGAAATGAAAGG
eep-speI	AACTACTAGTTTGAGTCACAACCTTAG
Rgg1358-NdeI	CCACCACATATGAAAAATTTGGAG
Rgg1358-XhoI	CCGCTCGAGCTACTAACTACTAGCTAAAA
5' tag-RACE	
shp1358-tag	ACGATAACGATAATGCCTTCAAATACGA
ster_1357-tag	ATCACTCCCAGCCGTACCTTTTGCCATC
EMSA	
EMSA-shpF	CTTTATTGTATGATATGATG
EMSA-shpR	CTCTCGATTCTCGAAAC
EMSA-ster_1357F	CTTATGAAGGACATTTAG
EMSA-ster_1357R	TGATACTGTGATTATATTTTC
EMSA-ldhF	ACGCTTCACTTAATAATTC
EMSA-ldhR	TGGTCTAAACATCTCCTTA

a. Restriction enzyme recognition sequences are underlined.

b. Complementary sequences of the spectinomycin cassette are underlined with dashes.

Table 3. Plasmids used in this study.

Plasmid	Description ^a	Source or reference
pG ⁺ host9::updown. <i>shp1358</i>	Erm, Ts plasmid for <i>shp1358</i> gene replacement by double cross-over integration.	Ibrahim <i>et al.</i> (2007b)
pJIM4900	Erm, Ts derivative of pG ⁺ host9 containing the <i>luxAB</i> genes of <i>Photobacterium luminescens</i> and a transcriptional terminator.	E. Guédon ^b (e.g. unpublished)
pGICB004	Erm, pJIM4900 with a 0.95 kb insert containing two fragments upstream and downstream respectively from the <i>luxAB</i> gene and allowing the integration of the plasmid by double cross-over event at the <i>blp</i> locus of <i>S. thermophilus</i> .	This study
pGICB004::P _{<i>shp1358</i>}	Erm, Derivative of pGICB004 used to introduce a P _{<i>shp1358</i>} - <i>luxAB</i> transcriptional fusion at the <i>blp</i> locus.	This study
pGICB004::P _{<i>rgg1358</i>}	Erm, Derivative of pGICB004 used to introduce a P _{<i>rgg1358</i>} - <i>luxAB</i> transcriptional fusion at the <i>blp</i> locus.	This study
pBV5030	Erm, Replicative plasmid in <i>E. coli</i> and Gram positive bacteria.	Bojovic <i>et al.</i> (1991)
pBV5030::P ₃₂ - <i>ster_1357</i>	Erm, Derivative of pBV5030 allowing the overexpression of the <i>ster_1357</i> gene of <i>S. thermophilus</i> LMD-9.	Gardan (e.g. unpublished)
pBV5030::P ₃₂ - <i>shp1358</i>	Erm, Derivative of pBV5030::P ₃₂ - <i>ster_1357</i> allowing the overexpression of the <i>shp1358</i> gene of <i>S. thermophilus</i> LMD-9.	This study
pET28a	Km, vector for production of His tagged proteins	Novagen
pET28a::Rgg1358	A derivative of pET28a used to overproduce Rgg1358	This study

a. Erm and Km indicate resistance to erythromycin and kanamycin respectively; Ts indicates that the plasmid encodes a thermosensitive RepA protein.

b. INRA, Jouy-en-Josas, France.

Luciferase assays

Cells were grown overnight at 42°C in CDM. These cultures were then diluted in 50 ml of CDM to a final OD₆₀₀ of 0.05 and incubated at 42°C, except for the experiments reported in Fig. 2D where cultures were diluted to a final OD₆₀₀ of 0.012, 0.025, 0.05 or 0.1. Aliquots of 1 ml of the culture were sampled at regular intervals until the culture reached stationary phase and analysed as follows: OD₆₀₀ was measured, then 10 µl of a 0.1% nonyl-aldehyde solution was added and the luminescence was measured with a Luminoskan TL (Labsystems). Results are reported in Relative Luminescent Units divided by the OD₆₀₀ (RLU/OD₆₀₀). For cocultures, each culture was diluted to an OD₆₀₀ of 0.025 and results are expressed as luminescence divided by the total OD₆₀₀. For experiments involving mixing supernatants of one strain with cell pellets of another strain containing a *luxAB* reporter fusion, both supernatants and pellets were harvested by centrifugation (5000 *g* for 10 min at RT) of equal volumes of cultures at OD₆₀₀ 0.6. Finally, the synthetic peptide EGIIVIVVG, stored in lyophilized form and freshly prepared in DMSO, was added to cultures with an OD₆₀₀ of 0.5.

LC-MS/MS

Supernatants from cultures of strains LMD-9 and TIL 778 were recovered by centrifugation. Aliquots of 10 µl of ultra-filtered supernatant (0.22 µM, Millipore) were loaded on a Pepmap C18 column (length 150 mm, 75 µm ID, 100 Å; Dionex, Voisin-le-Bretonneux) and analysed on-line by mass spectrometry on a LTQ-Orbitrap Discovery apparatus (Thermo Fischer, San Jose). First, only ion current of *m/z* corresponding to all possible C-terminal amino acid sequences produced by the cleavage of the SHP1358 sequence were sought in the supernatant of strain LMD-9. Next, we checked that these masses, detected in the LMD-9 supernatant, were not present in the supernatant of the Δ *shp1358* mutant and that they were eluted from the Pepmap C18 column with a retention time compatible with the hydrophobicity of the putative amino acid sequence. Then, the ion with mass that fulfilled these conditions was fragmented and analysed on the Orbitrap mass analyser, to identify accurately the sequence of the corresponding peptide. Finally, the absence of the mature form of this peptide from the Δ *shp1358* supernatant was confirmed after fragmentation on LTQ by monitoring the current of the *b*₇ ions daughter (724.46 *m/z*) in the Orbitrap mass analyser.

Production and purification of Rgg1358

A preculture of TIL 1318 was diluted in 500 ml of LB with kanamycin to an OD₆₀₀ of 0.05 and incubated at 37°C with shaking. At OD₆₀₀ 0.5, recombinant protein production was induced by adding IPTG at a final concentration of 1 mM and the incubation continued for 4 h at 30°C. Cells were harvested by centrifugation (5000 *g* for 10 min at 4°C), rinsed and resuspended in disrupter buffer (20 mM Tris HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 10% v/v glycerol and 10 mM

imidazole) to obtain a OD₆₀₀ of 100 ml⁻¹. Cells were disrupted at 2.0 kbars with a Basic Z Cell Disruption System (Constant Systems). The soluble fraction was collected by centrifugation (5000 *g* for 20 min at 4°C) and production of the recombinant His-tagged Rgg1358 protein checked by SDS-PAGE. The product was then purified with the QIAexpressionist kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions with the following modification: elution was carried out with an imidazole concentration gradient from 100 mM to 250 mM.

SPR analysis

Real-time binding kinetics experiments were conducted on a BIAcore 3000 apparatus (GE Healthcare Europe). The synthetic peptide EGIIVIVVG was immobilized on a CM5 sensor chip using amine-coupling chemistry. For this, the surface of the chip was activated for 7 min with a mixture of 0.05 M NHS and 0.2 M EDC (Amine coupling kit, Biacore, GE Healthcare). The synthetic pheromone (37 µM, in sodium acetate buffer, pH 5.0) was then covalently linked to the surface giving up to 2000 resonance units (RU). Ethanolamine (1 M, pH 8.5) was injected for 7 min to block the remaining activated groups. The purified Rgg1358 protein (5 µM) was injected over 2 min, at flow of 25 µl min⁻¹ in 20 mM HBS (pH 7.4) to allow binding to the immobilized SHP1358₍₁₅₋₂₃₎ pheromone; dissociation was recorded for 12 min after the end of injections. The surface was regenerated by injecting glycine buffer (pH 2.0) for 2 min. The sensorgram observed in a cell immobilizing pheromone was corrected by subtracting the response observed in a cell immobilizing only ethanolamine (reference surface). Two sets of control experiments were performed to check the specificity of binding: (i) BSA was injected over the immobilized SHP1358₍₁₅₋₂₃₎, and (ii) Rgg1358 was injected over a chip surface with the control peptide, IAILPYFAGCL, covalently immobilized (purchased from eurogentec). All measurements were performed at 25°C. Sensorgrams were analysed using BIAevaluation Software.

EMSA

DNA probes of approximately 110 bp of the *shp1358* and *ster_1357* promoter regions were amplified by PCR with oligonucleotides EMSA-shpF with EMSA-shpR and EMSA-ster_1357F with EMSA-ster_1357R respectively. The *ldh* promoter region was amplified with oligonucleotides EMSA-ldhF and EMSA-ldhR as a control. DNA probes were 3' end labelled and gel shift reactions carried out by using the DIG GEL Shift Kit, 2nd Generation (Roche), according to the manufacturer's instructions. The DNA binding reactions, coupling probes to the Rgg1358 protein with or without the synthetic peptide EGIIVIVVG (purchased from eurogentec), involved incubation for 30 min at 42°C. Samples were then loaded on a 4–16% native polyacrylamide gels (nativePAGE 4–16% Bis-Tris Gel, Invitrogen) and subjected to 70 V for approximately 2 h in 1 × TBE buffer. The labelled probe/protein complexes were transferred to a positively charged nylon membrane (GE Healthcare Amersham Hybond – N⁺) by electro-blotting for 30 min in a Mini Trans-Blot Cell (Biorad) in 0.5 × TBE buffer. DNA complexes were detected by chemiluminescence on X-ray film (Amersham Hyperfilm ECL) according to the manufacturer's instructions.

Acknowledgements

This study was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and the Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (MENRT). The 'Plateforme d'Analyse Protéomique Paris Sud-Ouest' (PAPPSO, Alain Guillot) received the financial support from the Ile de France regional council and from CEMAGREF. Work in the group of P. Hols was financially supported by FNRS. L. Fontaine is postdoctoral researcher at FNRS. P. Hols is research associate at FNRS. We thank L. Topisirovic for plasmid pBV5030. We thank F. Rul, V. Juillard and P. Serror for their critical reading of the manuscript, E. Chambellon and M. Cote for their technical assistance, and E. Bruneau for her technical advice. Finally, we are grateful to F. Repoila for helpful advice concerning his 5' tag-RACE method.

References

- Agaisse, H., Gominet, M., Okstad, O.A., Kolsto, A.B., and Lereclus, D. (1999) PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* **32**: 1043–1053.
- An, F.Y., and Clewell, D.B. (2002) Identification of the cAD1 sex pheromone precursor in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **184**: 1880–1887.
- An, F.Y., Sulavik, M.C., and Clewell, D.B. (1999) Identification and characterization of a determinant (*eep*) on the *Enterococcus faecalis* chromosome that is involved in production of the peptide sex pheromone cAD1. *J Bacteriol* **181**: 5915–5921.
- Antunes, L.C., Ferreira, R.B., Buckner, M.M., and Finlay, B.B. (2010) Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* **156**: 2271–2282.
- Bae, T., Kozłowicz, B., and Dunny, G.M. (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**: 995–1007.
- Bassler, B.L. (2002) Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell* **109**: 421–424.
- Bojovic, B., Djordjevic, G., and Topisirovic, L. (1991) Improved vector for promoter screening in lactococci. *Appl Environ Microbiol* **57**: 385–388.
- Bortoni, M.E., Terra, V.S., Hinds, J., Andrew, P.W., and Yesilkaya, H. (2009) The pneumococcal response to oxidative stress includes a role for Rgg. *Microbiology* **155**: 4123–4134.
- Bouillaut, L., Perchat, S., Arold, S., Zorrilla, S., Slamti, L., Henry, C., *et al.* (2008) Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic Acids Res* **36**: 3791–3801.
- Brede, D.A., Faye, T., Johnsborg, O., Ødegård, I., Nes, I.F., and Holo, H. (2004) Molecular and genetic characterization of propionin F, a bacteriocin from *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 7303–7310.
- Butcher, B.G., Lin, Y.P., and Helmann, J.D. (2007) The *yyd-FGHJ* operon of *Bacillus subtilis* encodes a peptide that induces the LiaRS two-component system. *J Bacteriol* **189**: 8616–8625.
- Chaussee, M.S., Ajdic, D., and Ferretti, J.J. (1999) The *rgg* gene of *Streptococcus pyogenes* NZ131 positively influences extracellular SPE B production. *Infect Immun* **67**: 1715–1722.
- Chaussee, M.S., Sylva, G.L., Sturdevant, D.E., Smoot, L.M., Graham, M.R., Watson, R.O., and Musser, J.M. (2002) Rgg influences the expression of multiple regulatory loci to coregulate virulence factor expression in *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **70**: 762–770.
- Chaussee, M.S., Somerville, G.A., Reitzer, L., and Musser, J.M. (2003) Rgg coordinates virulence factor synthesis and metabolism in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **185**: 6016–6024.
- Claverys, J.P., and Håvarstein, L.S. (2002) Extracellular-peptide control of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Biosci* **7**: 1798–1814.
- Claverys, J.P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006) Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **60**: 451–475.
- Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F., *et al.* (2007) Structure of PlcR: insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 18490–18495.
- Denham, E.L., Ward, P.N., and Leigh, J.A. (2008) Lipoprotein signal peptides are processed by Lsp and Eep of *Streptococcus uberis*. *J Bacteriol* **190**: 4641–4647.
- Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J., Paster, B.J., Tanner, A.C., Yu, W.H., *et al.* (2010) The human oral microbiome. *J Bacteriol* **192**: 5002–5017.
- Dmitriev, A.V., McDowell, E.J., Kappeler, K.V., Chaussee, M.A., Rieck, L.D., and Chaussee, M.S. (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**: 7230–7241.
- Dunny, G.M. (2007) The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1185–1193.
- Fernandez, A., Borges, F., Gintz, B., Decaris, B., and Leblond-Bourget, N. (2006) The *rggC* locus, with a frameshift mutation, is involved in oxidative stress response by *Streptococcus thermophilus*. *Arch Microbiol* **186**: 161–169.
- Fontaine, L., Boutry, C., Henry de Frahan, M., Delplace, B., Fremaux, C., Horvath, P., *et al.* (2010) A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol* **192**: 1444–1454.
- Fouquier d'Hérouel, A., Wessner, F., Halpern, D., Ly-Vu, J., Kennedy, S.P., Serror, P., *et al.* (2011) A simple and efficient method to search for selected primary transcripts: non-coding and antisense RNAs in the human pathogen *Enterococcus faecalis*. *Nucleic Acids Res* (in press).
- Fujiwara, T., Hoshino, T., Ooshima, T., Sobue, S., and Hamada, S. (2000) Purification, characterization, and molecular analysis of the gene encoding glucosyltransferase from *Streptococcus oralis*. *Infect Immun* **68**: 2475–2483.
- Garault, P., Letort, C., Juillard, V., and Monnet, V. (2000)

- Branched-chain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5128–5133.
- Gardan, R., Besset, C., Guillot, A., Gitton, C., and Monnet, V. (2009) The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J Bacteriol* **191**: 4647–4655.
- Gasson, M.J. (1983) Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *J Bacteriol* **154**: 1–9.
- Goebel, M., and Yanagida, M. (1991) The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem Sci* **16**: 173–177.
- Ibrahim, M., Nicolas, P., Bessières, P., Bolotin, A., Monnet, V., and Gardan, R. (2007a) A genome-wide survey of short coding sequences in streptococci. *Microbiology* **153**: 3631–3644.
- Ibrahim, M., Guillot, A., Wessner, F., Algaron, F., Besset, C., Courtin, P., et al. (2007b) Control of the transcription of a short gene encoding a cyclic peptide in *Streptococcus thermophilus*: a new quorum-sensing system? *J Bacteriol* **189**: 8844–8854.
- Karpenahalli, M.R., Lupas, A.N., and Söding, J. (2007) TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics* **8**: 2.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salamitou, S., and Sanchis, V. (1996) Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J Bacteriol* **178**: 2749–2756.
- Letort, C., and Juillard, V. (2001) Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J Appl Microbiol* **91**: 1023–1029.
- Linton, K.J., and Higgins, C.F. (2007) Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflugers Arch* **453**: 555–567.
- Loughman, J.A., and Caparon, M.G. (2007) Contribution of invariant residues to the function of Rgg family transcription regulators. *J Bacteriol* **189**: 650–655.
- Lyon, W.R., Gibson, C.M., and Caparon, M.G. (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**: 6263–6275.
- Makarova, K., Slevarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., et al. (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 15611–15616.
- Mashburn-Warren, L., Morrison, D.A., and Federle, M.J. (2010) A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Mol Microbiol* **78**: 589–606.
- Neely, M.N., Lyon, W.R., Runft, D.L., and Caparon, M. (2003) Role of RopB in growth phase expression of the SpeB cysteine protease of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **185**: 5166–5174.
- Novick, R.P., and Geisinger, E. (2008) Quorum sensing in staphylococci. *Annu Rev Genet* **42**: 541–564.
- Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. (2004) APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* **20**: 289–290.
- Podbielski, A., and Kreikemeyer, B. (2004) Cell density – dependent regulation: basic principles and effects on the virulence of Gram-positive cocci. *Int J Infect Dis* **8**: 81–95.
- Pottathil, M., and Lazazzera, B.A. (2003) The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front Biosci* **8**: 32–45.
- Pulliaainen, A.T., Hytönen, J., Haataja, S., and Finne, J. (2008) Deficiency of the Rgg regulator promotes H₂O₂ resistance, AhpCF-mediated H₂O₂ decomposition, and virulence in *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **190**: 3225–3235.
- Qi, F., Chen, P., and Caufield, P.W. (1999) Functional analyses of the promoters in the lantibiotic mutacin II biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* **65**: 652–658.
- Rawlinson, E.L., Nes, I.F., and Skaugen, M. (2002) LasX, a transcriptional regulator of the lactocin S biosynthetic genes in *Lactobacillus sakei* L45, acts both as an activator and a repressor. *Biochimie* **84**: 559–567.
- Rawlinson, E.L., Nes, I.F., and Skaugen, M. (2005) Identification of the DNA-binding site of the Rgg-like regulator LasX within the lactocin S promoter region. *Microbiology* **151**: 813–823.
- Rea, M.C., Sit, C.S., Clayton, E., O'Connor, P.M., Whittall, R.M., Zheng, J., et al. (2010) Thuricin CD, a posttranslationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 9352–9357.
- Rocha-Estrada, J., Aceves-Diez, A.E., Guarneros, G., and de la Torre, M. (2010) The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 913–923.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) Molecular cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Samen, U.M., Eikmanns, B.J., and Reinscheid, D.J. (2006) The transcriptional regulator RovS controls the attachment of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells and the expression of virulence genes. *Infect Immun* **74**: 5625–5635.
- Sanders, J.W., Leenhouts, K., Burghoorn, J., Brands, J.R., Venema, G., and Kok, J. (1998) A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol Microbiol* **27**: 299–310.
- Shi, K., Brown, C.K., Gu, Z.Y., Kozlowski, B.K., Dunny, G.M., Ohlendorf, D.H., and Earhart, C.A. (2005) Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgX/pheromone complexes and regulation of conjugation in *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 18596–18601.
- Siehnell, R., Traxler, B., An, D.D., Parsek, M.R., Schaefer, A.L., and Singh, P.K. (2010) A unique regulator controls the activation threshold of quorum-regulated genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 7916–7921.
- Skaugen, M., Andersen, E.L., Christie, V.H., and Nes, I.F. (2002) Identification, characterization, and expression of a second, bicistronic, operon involved in the production of lactocin S in *Lactobacillus sakei* L45. *Appl Environ Microbiol* **68**: 720–727.
- Slamti, L., and Lereclus, D. (2002) A cell-cell signaling

- peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J* **21**: 4550–4559.
- Sulavik, M.C., Tardif, G., and Clewell, D.B. (1992) Identification of a gene, *rgg*, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of *Streptococcus gordonii* Challis. *J Bacteriol* **174**: 3577–3586.
- Trieu-Cuot, P., Carlier, C., Poyart-Salmeron, C., and Courvalin, P. (1990) A pair of mobilizable shuttle vectors conferring resistance to spectinomycin for molecular cloning in *Escherichia coli* and in gram-positive bacteria. *Nucleic Acids Res* **18**: 4296.
- Vickerman, M.M., and Minick, P.E. (2002) Genetic analysis of the *rgg-gtfG* junctional region and its role in *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase activity. *Infect Immun* **70**: 1703–1714.
- Vickerman, M.M., Wang, M., and Baker, L.J. (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**: 399–406.
- Vickerman, M.M., Flannagan, S.E., Jesionowski, A.M., Brosard, K.A., Clewell, D.B., and Sedgley, C.M. (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**: 2535–2545.
- Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319–346.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., and Cámara, M. (2007) Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1119–1134.
- Winzer, K., Hardie, K.R., and Williams, P. (2002) Bacterial cell-to-cell communication: sorry, can't talk now – gone to lunch! *Curr Opin Microbiol* **5**: 216–222.
- Zheng, G., Hehn, R., and Zuber, P. (2000) Mutational analysis of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis*: identification of genes required for subtilosin production and immunity. *J Bacteriol* **182**: 3266–3273.
- Zheng, F., Ji, H., Cao, M., Wang, C., Feng, Y., Li, M., *et al.* (2011) Contribution of the Rgg transcription regulator to metabolism and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect Immun* **79**: 1319–1328.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Extracellular Life Cycle of ComS, the Competence-Stimulating Peptide of *Streptococcus thermophilus*

Rozenn Gardan, Colette Besset, Christophe Gitton, Alain Guillot, Laetitia Fontaine, Pascal Hols and Véronique Monnet

J. Bacteriol. 2013, 195(8):1845. DOI: 10.1128/JB.02196-12.
Published Ahead of Print 8 February 2013.

Updated information and services can be found at:
<http://jb.asm.org/content/195/8/1845>

SUPPLEMENTAL MATERIAL

These include:

[Supplemental material](#)

REFERENCES

This article cites 32 articles, 20 of which can be accessed free at: <http://jb.asm.org/content/195/8/1845#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Extracellular Life Cycle of ComS, the Competence-Stimulating Peptide of *Streptococcus thermophilus*

Rozenn Gardan,^{a,b} Colette Besset,^{a,b} Christophe Gitton,^{a,b} Alain Guillot,^{a,b} Laetitia Fontaine,^c Pascal Hols,^c Véronique Monnet^{a,b}

INRA, UMR1319 MICALIS, Jouy en Josas, France^a; AgroParistech, UMR1319 MICALIS, Jouy en Josas, France^b; Université Catholique de Louvain, Institut des Sciences de la Vie, Biochimie et Génétique Moléculaire Bactérienne, Louvain-la-Neuve, Belgium^c

In streptococci, ComX is the alternative sigma factor controlling the transcription of the genes encoding the genetic transformation machinery. In *Streptococcus thermophilus*, *comX* transcription is controlled by a complex consisting of a transcriptional regulator of the Rgg family, ComR, and a signaling peptide, ComS, which controls ComR activity. Following its initial production, ComS is processed, secreted, and imported back into the cell by the Ami oligopeptide transporter. We characterized these steps and the partners interacting with ComS during its extracellular circuit in more detail. We identified the mature form of ComS and demonstrated the involvement of the membrane protease Eep in ComS processing. We found that ComS was secreted but probably not released into the extracellular medium. Natural competence was first discovered in a chemically defined medium without peptides. We show here that the presence of a high concentration of nutritional peptides in the medium prevents the triggering of competence. In milk, the ecological niche of *S. thermophilus*, competence was found to be functional, suggesting that the concentration of nutritional peptides was too low to interfere with ComR activation. The kinetics of expression of the *comS*, *comR*, and *comX* genes and of a late competence gene, *dprA*, in cultures inoculated at different initial densities revealed that the activation mechanism of ComR by ComS is more a timing device than a quorum-sensing mechanism *sensu stricto*. We concluded that the ComS extracellular circuit facilitates tight control over the triggering of competence in *S. thermophilus*.

Natural competence for transformation is a physiological state allowing bacteria to bind, take up, and integrate exogenous DNA in their genomes by homologous recombination. The triggering of competence is tightly controlled in Gram-positive bacteria and has been studied extensively in *Streptococcus pneumoniae* (for reviews, see references 1 to 3). In this bacterium, a signaling heptadecapeptide, the competence-stimulating peptide (CSP), encoded by the *comC* gene, is secreted and processed by an ABC transporter, ComAB. Extracellular CSP is detected by a two-component system. The membrane-embedded histidine kinase, ComD, is thought to undergo autophosphorylation in response to CSP, subsequently phosphorylating its cognate response regulator, ComE, which then activates the transcription of the early CSP-induced genes, including *comCDE*, *comAB*, and *comX*. ComX, which is also known as SigX, is an alternative competence-specific sigma factor required for expression of the late CSP-induced genes, which encode components of the DNA uptake machinery. This regulation of the early steps of the cascade, up to the transcription of *comX*, occurs in streptococci from the mitis and anginosus groups. Sequencing studies have highlighted an absence of early competence genes in other streptococci, despite the presence of late competence genes and the *comX* gene in their genomes (4). Recent discoveries that *S. thermophilus* is competent in a chemical medium lacking peptides and that the Ami oligopeptide transporter is essential for the expression of *comX* have constituted the first step toward the deciphering of an alternative mechanism (5). This mechanism is based on a signaling peptide, ComS, and a transcriptional regulator of the Rgg family, ComR. ComS is thought to be processed, secreted, and imported back into the cell by Ami. There, it activates ComR, which then binds to the *comX* promoter, thereby controlling the transcription of this gene, in both *S. thermophilus* and *S. salivarius* (6). This mechanism has also been shown to occur in *S. mutans*, whose genome also

encodes a ComCDE system, and probably also operates in the streptococci of the pyogenic and bovis groups, which have orthologs of *comR* and *comS* in their genomes. Based on the sequences of ComS peptides, the ComS-ComR systems of streptococci of the salivarius group were named type I, and those of the mutans, pyogenic, and bovis groups were named type II. Mature ComS peptides are also known as *sigX*-inducing peptides (XIP) (7).

Two type II ComS-ComR systems, those of *S. mutans* and *S. pyogenes*, were recently studied in more detail. The amino acid sequence of the XIP of *S. mutans* has been determined. This heptapeptide (ComS₁₁₋₁₇) is released by C-terminal cleavage of the ComS propeptide, in a process that does not involve the Eep membrane protease (8). The development of competence in *S. mutans* was studied in a medium lacking nutritional peptides, and this state was found to be triggered at a high cell density. XIP is released into the extracellular medium at concentrations equivalent to 1 μ M ComS₁₁₋₁₇ (9). For *S. pyogenes*, despite the presence of the genes required for transformation in the genome and the control of *comX* transcription by ComR and ComS, the bacterium has been found to remain noncompetent under the many laboratory conditions tested (10).

We focused on the initial steps—production of the mature

Received 11 December 2012 Accepted 1 February 2013

Published ahead of print 8 February 2013

Address correspondence to Rozenn Gardan, rozenn.gardan@jouy.inra.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JB.02196-12>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.02196-12

TABLE 1 Bacterial strains used in this study

Strain	Relevant property ^a	Description ^b	Reference or source
<i>S. thermophilus</i> strains			
LMD-9	Wild type		32
CB001	<i>blp::P_{comX}-luxAB</i>		6
LF121	<i>blp::P_{comS}-luxAB</i>		35
LF123	<i>blp::P_{comR}-luxAB</i>		35
TIL773	Δ <i>leep</i>		14
TIL1179	pBV5030::P32	pBV5030::P32 \rightarrow LMD-9	This study
TIL1199	Δ <i>amiA1 amiA3::erm</i>		5
TIL1202	Δ <i>amiCDE::spec</i>		14
TIL1209	<i>comS::spec</i>	<i>comS::spec</i> PCR fragment \rightarrow LMD-9	This study
TIL1307	pBV5030::P32- <i>comS</i>	pBV5030::P32- <i>comS</i> \rightarrow LMD-9	This study
TIL1311	<i>blp::P_{comX}-luxAB aphA3</i>	pGICB004a::P _{comX} \rightarrow LMD-9	This study
TIL1314	<i>blp::P_{comX}-luxAB aphA3 comS::spec</i>	TIL1209 DNA \rightarrow TIL1311	This study
TIL1329	pBV5030::P32- <i>comS</i> Δ <i>amiCDE::spec</i>	TIL1202 DNA \rightarrow TIL1307	This study
TIL1349	<i>blp::P_{dprA}-luxAB aphA3</i>	pGICB004a::P _{dprA} \rightarrow LMD-9	This study
TIL1371	<i>blp::comX-luxAB aphA3</i> Δ <i>leep</i>	TIL1311 DNA \rightarrow TIL773	This study
TIL1391	<i>blp::P_{comX}-luxAB comS::spec</i>	TIL 1209 DNA \rightarrow CB001	This study
TIL1392	<i>blp::P_{comX}-luxAB comS::spec amiA3::erm</i>	TIL1199 DNA \rightarrow TIL1391	This study
TIL1393	<i>blp::P_{comX}-luxAB comS::spec</i> Δ <i>amiA1 amiA3::erm</i>	TIL1199 DNA \rightarrow TIL1391	This study
TIL1394	<i>blp::P_{comX}-luxAB comS::spec</i> Δ <i>amiA1</i>	pG ⁺ host9::updown. <i>amiA1</i> \rightarrow TIL1391	This study
TIL1404	<i>comS::erm</i>	PCR fragment <i>comS::erm</i> \rightarrow LMD-9	This study
TIL1405	<i>blp::P_{comX}-luxAB comS::erm</i>	TIL1404 DNA \rightarrow CB001	This study
<i>E. coli</i> strain			
TG1 <i>repA</i> ⁺	TG1 derivative with <i>repA</i> gene integrated into the chromosome		P. Renault, INRA, Jouy-en-Josas, France

^a *erm*, *aphA3*, and *spec* indicate resistance to erythromycin, kanamycin, and spectinomycin, respectively.

^b Arrows indicate construction by transformation with chromosomal DNA or plasmid.

type I ComS, its extracellular circuit, and its uptake via the Ami oligopeptide transport system—to validate the proposed model in *S. thermophilus* and to decipher its workings further. We found that the type I and II ComS-ComR mechanisms are similar but not identical. The slight differences observed resulted in significant discrepancies, particularly in terms of the kinetics of competence in laboratory media.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains used are listed in Table 1. *S. thermophilus* strains were grown at 28 or 37°C in M17 medium (Difco) supplemented with 10 g liter⁻¹ lactose (M17lac), a chemically defined medium (CDM) (11), or reconstituted Nilac low-heat skim milk (Nizo, Ede, Netherlands), without shaking, under a normal air atmosphere. *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in Luria-Bertani broth, with shaking (12). Agar (1.5%) was added to the media as appropriate. When required, antibiotics were added to the media at the following final concentrations: erythromycin, 200 μ g ml⁻¹ for *E. coli* and 5 μ g ml⁻¹ for *S. thermophilus*; kanamycin, 1 mg ml⁻¹ for *S. thermophilus*; and spectinomycin, 100 μ g ml⁻¹ for *S. thermophilus*. The optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of each culture was measured with a Uvikon 931 (Kontron) spectrophotometer or a microplate reader (Infinite M200 spectroluminometer; Tecan).

Natural transformation of *S. thermophilus* LMD-9 in milk. Cells of *S. thermophilus* strain LMD-9 were grown overnight at 42°C in Nilac milk. The OD₄₈₀ of the culture was measured after clarification of milk by 10-fold dilution in 5 mM EDTA (pH 12). The culture was then diluted in milk to an OD₄₈₀ of 0.05. One hour after dilution, 100 μ l of the culture was

mixed with 1 μ g of plasmid DNA (pG⁺host9), with or without 1 μ M ComS₁₇₋₂₄, and incubated for 2 h at 28°C. The culture was then serially diluted and spread on M17lac plates with erythromycin. For calculation of the transformation rate (i.e., the number of antibiotic-resistant transformants per ml divided by the number of viable CFU per ml), we also spread cells on M17lac plates without antibiotic. All these experiments were carried out at least three times.

DNA manipulation and sequencing. Standard methods were used for DNA purification, restriction digestion, PCR, ligation, and sequencing. The *E. coli* TG1 *repA*⁺ strain was used as the host for cloning experiments. The plasmids used are listed in Table 2, and the oligonucleotides used for PCR are listed in Table S1 in the supplemental material. Naturally competent (5) or electrocompetent (13) *S. thermophilus* cells were used for transformation.

Construction of strains containing *luxAB* reporters. We used derivatives of the plasmid pGICB004a (B. Fleuchot, unpublished data) to easily integrate, by natural transformation and double-crossover events, transcriptional fusions between the promoter of *comX* or *dprA* and the *luxAB* reporter genes at the *blp* locus in *S. thermophilus* LMD-9. We constructed pGICB004a::P_{comX} as follows. The *comX* promoter was amplified by PCR with oligonucleotides PcomX-EcoRI and PcomX-SpeI, and the resulting fragment was digested with the SpeI and EcoRI restriction enzymes and ligated between the corresponding restriction sites of pGICB004a. Strain TIL1311 (*blp::P_{comX}-luxAB aphA3*) was obtained by natural transformation of strain LMD-9 with pGICB004a::P_{comX} linearized with the restriction enzyme ScaI. The same strategy was used to obtain strain TIL1349 (*blp::P_{dprA}-luxAB aphA3*), with plasmid pGICB004a::P_{dprA} constructed with oligonucleotides PdprA-EcoRI and PdprA-SpeI. Strain TIL1371

TABLE 2 Plasmids used in this study

Plasmid	Relevant properties ^a	Reference or source
pG ⁺ host9	Erm Ts	33
pG ⁺ host9::updown. <i>amiA1</i>	Erm; derivative of pG ⁺ host9 used for <i>amiA1</i> gene replacement by double-crossover integration	5
pGICB004	Erm Ts; allows the integration of transcriptional fusions to the <i>luxAB</i> reporter genes at the <i>blp</i> locus	14
pGICB004a	Erm; derivative of pGICB004 containing the <i>aphA3</i> gene downstream from the <i>luxB</i> gene	B. Fleuchot, INRA, Jouy-en-Josas, France, unpublished data
pGICB004a::P _{comX}	Erm; derivative of pGICB004a used to introduce a P _{comX} - <i>luxAB</i> transcriptional fusion at the <i>blp</i> locus	This study
pGICB004a::P _{dprA}	Erm; derivative of pGICB004a used to introduce a P _{dprA} - <i>luxAB</i> transcriptional fusion at the <i>blp</i> locus	This study
pBV5030	Erm; replicative plasmid in <i>E. coli</i> and Gram-positive bacteria	34
pBV5030::P ₃₂	Erm; derivative of pBV5030 containing the constitutive promoter P32 of <i>Lactococcus lactis</i>	This study
pBV5030::P _{32-ster1357}	Erm; derivative of pBV5030 allowing overexpression of the <i>ster1357</i> gene of <i>S. thermophilus</i> LMD-9	14
pBV5030::P _{32-comS}	Erm; derivative of pBV5030 allowing overexpression of the <i>comS</i> gene of <i>S. thermophilus</i> LMD-9	This study

^a Erm, resistance to erythromycin; Ts, the plasmid encodes a thermosensitive RepA protein.

(*blp*::P_{comX}-*luxAB aphA3 Δeep*) was obtained by the natural transformation, in the presence of ComS₁₇₋₂₄, of strain TIL773 (*Δeep*) with chromosomal DNA from strain TIL1311.

Construction of ComS-overproducing strains. We used pBV5030::P32-*comS*, a derivative of the plasmid pBV5030::P32-*ster1357*, to overproduce a ComS peptide containing a glycine residue between the methionine at position 1 and the lysine at position 2 in the wild-type sequence. The *comS* gene was amplified by PCR with oligonucleotides ComS-NcoI and ComS-PstI. The resulting fragment was digested with the NcoI and PstI restriction enzymes and inserted into pBV5030::P32-*ster1357* digested with the same enzymes. The resulting plasmid was then introduced by transformation into strain LMD-9, generating strain TIL1307. Strain TIL1307 was transformed with chromosomal DNA of strain TIL1202 (*ΔamiCDE::spec*), generating strain TIL1329 (pBV5030::P32-*comS ΔamiCDE::spec*). We constructed pBV5030::P32 from pBV5030::P32-*ster1357* by digestion with the NcoI and PstI restriction enzymes, treatment with T4 DNA polymerase, and self-ligation. Strain TIL1179 was constructed by transforming strain LMD-9 with pBV5030::P32 and was used as a negative control in the experiments.

Construction of mutant strains. Deletion of genes was performed by using either the overlapping PCR method or the thermosensitive plasmid pG⁺host9, as follows. We used the overlapping PCR method to replace the *comS* gene with the spectinomycin (*spec*) or erythromycin (*erm*) resistance cassette. Briefly, the spectinomycin resistance cassette (*spec*) was amplified by PCR (14) and fused, by PCR, to fragments located upstream and downstream of the *comS* gene. The oligonucleotides used for amplification of the upstream fragment were comS-uF and comS-uRspec, and those used for the downstream fragment were comS-dFspec and comS-dR. The resulting PCR fragment was used to transform naturally competent LMD-9 cells to generate strain TIL1209 (*comS::spec*). The erythromycin resistance cassette was amplified by PCR (5), and the oligonucleotides used for amplification of fragments upstream and downstream of *comS* were comS-uF plus comS-uRerm and comS-dFerm plus comS-dR, respectively. The resulting PCR fragment was used to transform naturally competent LMD-9 cells to generate strain TIL1404 (*comS::erm*). Both *comS* deletions were then introduced into different strains by natural transformation. Chromosomal DNA from strain TIL1209 was used to transform strain TIL1311 to generate strain TIL1314 (*blp*::P_{comX}-*luxAB aphA3 comS::spec*). Chromosomal DNA from strain TIL1404 was used to transform strain CB001 to generate strain TIL1405 (*blp*::P_{comX}-*luxAB comS::erm*). Chromosomal DNA from strain TIL1209 (*comS::spec*) was used to transform naturally competent cells of strain CB001 (*blp*::P_{comX}-

luxAB) to generate strain TIL1391 (*blp*::P_{comX}-*luxAB comS::spec*). We used a pG⁺host9 plasmid containing flanking regions of the *amiA1* gene (pG⁺host9::updown.*amiA1*) to delete the *amiA1* gene from strain TIL1391 by integration and excision of the plasmid as previously described (5), generating strain TIL1394 (*blp*::P_{comX}-*luxAB comS::spec ΔamiA1*). Finally, chromosomal DNA from strain TIL1199 (*ΔamiA1 amiA3::erm*) was used to transform naturally competent cells of strain TIL1391 in the presence of the synthetic peptide ComS₁₇₋₂₄, generating strains TIL1392 (*blp*::P_{comX}-*luxAB comS::spec amiA3::erm*) and TIL1393 (*blp*::P_{comX}-*luxAB comS::spec ΔamiA1 amiA3::erm*), which could be distinguished by PCR. All constructs were checked by PCR and sequencing.

Luciferase assays. Cells were grown in CDM overnight at 37°C. The monocultures were then diluted to a final OD₆₀₀ of 0.05 in all experiments except those reported in Fig. 7, in which case the cultures were diluted to various initial OD₆₀₀ values. In coculture experiments, each individual culture was diluted in CDM to an OD₆₀₀ of 0.025. Cell supernatant or CDM was used as the dilution medium, sometimes with the addition of other compounds (tryptone or Casamino Acids). Unless otherwise specified, ComS₁₄₋₂₄ or ComS₁₇₋₂₄ was added 50 min after the dilution of the cultures, to a final concentration of 0.05 or 1 μM, depending on the experiment. We transferred 250-μl aliquots of these diluted cultures to the wells of a sterile covered white microplate with a transparent bottom (Greiner). The OD₆₀₀ and luminescence (expressed in relative light units [RLU]) of the cultures were monitored at 37°C as previously described (6).

Liquid chromatography-tandem MS (LC-MS/MS). The supernatants of strains TIL1329 (pBV5030::P32-*comS ΔamiCDE*) and TIL1209 (*comS::spec*) were recovered by centrifugation from 80-ml cultures in CDM when the OD₆₀₀ reached 1. They were subjected to ultrafiltration through Amicon devices (Centriplus YM-10 [10-kDa cutoff]; Millipore), and the peptides present in the ultrafiltrates were concentrated by solid-phase extraction (Sep-Pak Plus C₁₈ cartridges; Waters) after washing with 4 ml of 0.1% trifluoroacetic acid and 30% acetonitrile and elution in 2 ml of 40% acetonitrile. The eluted fractions were dried further and resuspended in 50 μl of 0.1% trifluoroacetic acid and 2% acetonitrile. We then loaded 5-μl aliquots of the fractions onto a Pepmap C₁₈ column (150-mm length by 75-μm internal diameter [ID] by 100 Å; Dionex, Voisins-le-Bretonneux, France) for analysis by online mass spectrometry (MS) on an LTQ-Orbitrap Discovery apparatus (Thermo Fischer, San Jose, CA). We initially analyzed only the *m/z* ion current corresponding to all possible C-terminal amino acid sequences produced by the cleavage of the ComS precursor in the supernatant from strain TIL1329. We checked that these

masses were not present in the supernatant from strain TIL1209 and that they were eluted from the Pepmap C₁₈ column with a retention time compatible with the hydrophobicity of their putative amino acid sequences. We then fragmented the ions with a mass satisfying these conditions and analyzed them on the Orbitrap mass analyzer. However, peptide ion fragmentation was found to be impossible due to the weakness of the mass spectrometry signals. We therefore alkylated the culture supernatants with iodoacetamide to strengthen the signal. NaOH and iodoacetamide were added to the supernatant at final concentrations of 25 mM and 20 mM, respectively, and the mixture was stored in the dark for 30 min. Samples were then enriched in peptides and run on a Pepmap C₁₈ column as described above, but with the following modification: 50 µl of formic acid was added to adjust the pH to 6.5 after the ultrafiltration step. The masses of the alkylated form of the ions previously identified were determined, and these ions were fragmented and analyzed on an Orbitrap mass analyzer with a PAPPSSO platform (INRA, Jouy-en-Josas, France).

RESULTS

Location and identification of the secreted form of ComS. The addition of the ComS_{17–24} synthetic peptide (LPYFAGCL) to CDM induces the expression of *comX* in a strain lacking the *comS* gene, demonstrating that ComS is the precursor of a competence-stimulating peptide in *S. thermophilus* LMD-9 (6). However, the natural form(s) of the secreted peptide has yet to be identified. To check if the competence-stimulating peptide was released into the external medium or not, we collected the supernatant from strain LMD-9 at various time points and mixed it with cells of a reporter strain containing a P_{*comX*}-*luxAB* fusion but lacking the *comS* gene (TIL1405). Unexpectedly, we detected no luciferase activity with supernatant samples collected 30, 60, 90, or 120 min after the start of LMD-9 strain growth. This observation suggested that the mature form of ComS did not accumulate in the supernatant in sufficient amounts to induce the activity of the *comX* promoter of the reporter strain. We thus constructed a replicative plasmid containing the *comS* gene under the control of a strong constitutive promoter, which we then introduced into strain LMD-9 and a Δ *amiCDE* mutant impaired in peptide import, generating strains TIL1307 and TIL1329, respectively. The supernatants of these two strains and that of the control strain TIL1179, which naturally produces ComS, were collected after 90 min of growth. The level of expression of *comX* was 35 and 90 times higher than that observed in the presence of the control strain supernatant when the cells of the reporter strain (TIL1405) were grown in the presence of supernatants from strains TIL1307 and TIL1329, respectively (Fig. 1). These results indicate that in a ComS-overproducing context, ComS becomes detectable in supernatants, and we learned from this experiment that the Ami system plays a significant role in the disappearance of ComS from the medium. These results also suggest that under natural conditions of expression, ComS is either (i) secreted and rapidly reimported or (ii) secreted but kept at the bacterial surface before its reimport. In both cases, we cannot exclude the possibility that part of ComS was released into the supernatant but in too small amounts to trigger competence. We tested these hypotheses with cocultures of the reporter strain TIL1405 and strain TIL1179, which naturally produces ComS, or one of the two overproducing strains, i.e., TIL1307 and TIL1329. Under these conditions, contact between the cells of the reporter strain and each of the ComS-producing strains tested was possible, and ComS sensing occurred. Coculture with strain TIL1179 resulted in levels of *comX* expression that were 135 times higher than those in a monoculture of strain TIL1405, and induction

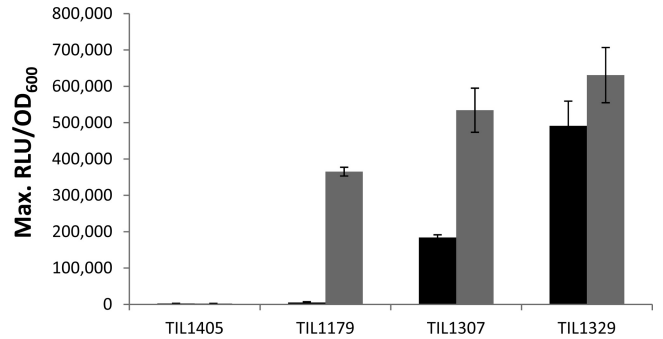


FIG 1 Detection of ComS in the extracellular space. The graph shows the maximum relative luciferase activities of strain TIL1405 (bip::P_{*comX*}-*luxAB* *comS*::*erm*) cultured with the supernatants of strains TIL1405, TIL1179 (pBV5030::P32), TIL1307 (pBV5030::P32-*comS*), and TIL1329 (pBV5030::P32-*comS* Δ *amiCDE*::*spec*) (black bars) or cocultured with these four strains (gray bars). All cultures were performed in CDM. The means for three independent experiments are presented, and error bars indicate standard deviations.

reached levels of 200- and 230-fold with strains TIL1307 and TIL1329, respectively (Fig. 1), confirming the overproduction of ComS in these two strains and the role of the transporter Ami in the rapid import of ComS. These results demonstrate that even under conditions of natural production of ComS, the peptide is produced in amounts sufficient to induce competence but is not released freely into the external medium. Our results also indicate that a ComS peptide produced by one bacterium can be sensed by another one, indicating that all pheromones are not immediately reimported by the producer bacteria. This pheromone exchange needs bacterial proximity and does not occur via supernatant.

We determined the amino acid sequence of the natural secreted form(s) of ComS by analyzing the supernatant of the ComS-overproducing strain TIL1329 by LC-MS/MS and comparing the results obtained with those for the ComS-nonproducing strain TIL1209. The C-terminal Leu residue of ComS is known to be essential for ComS activity (6). We therefore looked for unmodified peptides derived from the C-terminal cleavage of ComS that were present in the TIL1329 supernatant but absent from the TIL1209 supernatant. Three masses, corresponding to peptides ComS_{14–24}, ComS_{15–24}, and ComS_{16–24}, met these criteria (Fig. 2A). At this stage, peptide ion fragmentation was not possible because the mass spectrometry signals were too weak. These signals were strengthened by alkylating the supernatants of both strains with iodoacetamide. As expected, masses corresponding to alkylated forms of the three peptides were detected only in the supernatant from the overproducing strain, with the expected shift in high-pressure liquid chromatography (HPLC) retention times (Fig. 2A). Alkylation strengthened the ComS_{14–24} peptide sufficiently for its fragmentation and the validation of its sequence (Fig. 2B). It was not possible to validate the sequences of ComS_{15–24} and ComS_{16–24} because their mass spectrometry signals were too weak. We therefore validated the undecapeptide ComS_{14–24} (IAILPYFAGCL) as a natural mature competence pheromone in *S. thermophilus* LMD-9 and confirmed that this fragment contained a free cysteine residue (Fig. 2A). As cysteine residues are known to be highly reactive, we checked the capacity of a synthetic ComS_{14–24} peptide that had been alkylated with iodoacetamide at the cysteine to complement a *comS* deletion mu-

A	Sequences	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	Δm (ppm)	Retention time (min)	Structure validation
		Theoretical	Experimental			
Natural peptides	IAILPYFAGCL	1180.6410	1180.6434	2.0	45.8	
	AILPYFAGCL	1067.5572	1067.5594	2.1	42.6	
	ILPYFAGCL	996.5197	996.5223	2.6	40.6	
Alkylated peptides	IAILPYFAGC*L	1237.6610	1237.6649	3.1	43.0	Yes
	AILPYFAGC*L	1124.5772	1124.5808	3.2	39.7	
	ILPYFAGC*L	1053.5397	1053.5437	3.8	37.7	

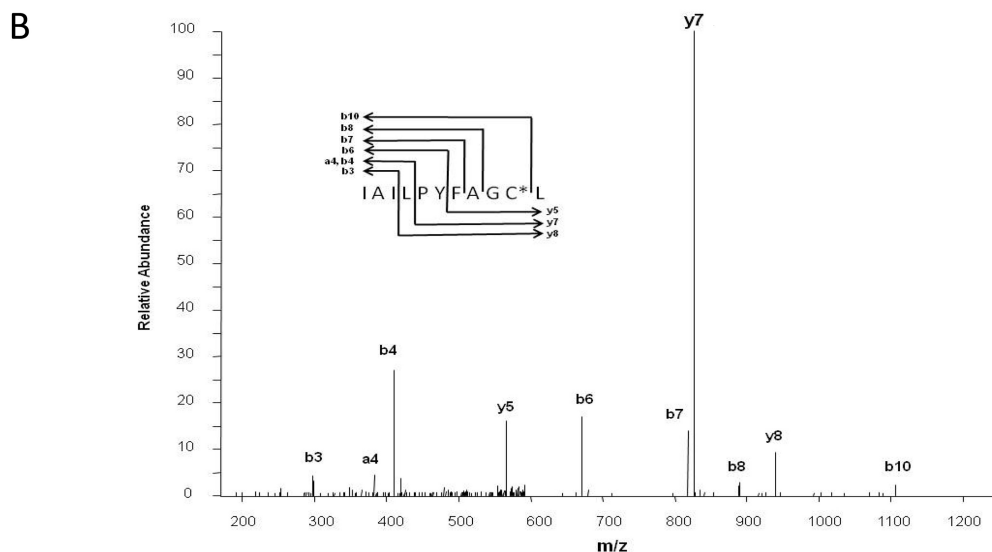


FIG 2 Identification of the mature forms of ComS in the supernatant of a ComS-overproducing strain with impaired peptide import (TIL1329). (A) Features of peptides corresponding to fragments of the ComS precursor detected with an Orbitrap mass analyzer. (B) Fragmentation spectrum of the alkylated ion m/z 1,237.66 analyzed in a linear ion trap. The stars indicate the alkylation of the cysteine residue.

tant and observed that the mutant was not transformable and that such a peptide was not active any more (data not shown). We compared the activities of the synthetic peptides ComS_{14–24} and ComS_{17–24} by using the reporter strain TIL1314 (*blp::P_{comX}-luxAB aphA3 comS::spec*). In CDM, no significant difference was observed between ComS_{14–24} and ComS_{17–24} when these two peptides were added at a nonsaturating concentration of 0.05 μ M (6; also data not shown).

The membrane protease Eep is involved in the processing of ComS. The Eep (enhanced expression of pheromone) protease is involved in the processing of several pheromones in *Enterococcus faecalis* (15), *S. thermophilus* (14), and *S. pyogenes* (16). We investigated its possible involvement in the processing of proComS by constructing a strain containing a *P_{comX}-luxAB* reporter fusion from which the *eep* gene was deleted (TIL1371). No significant luciferase activity was detected with this strain in CDM. However, the addition of the ComS_{17–24} peptide to the growth medium restored luciferase activity to levels slightly lower than that obtained with the *P_{comX}-luxAB* Δ *comS* strain (TIL1314) grown with ComS_{17–24} in CDM (Fig. 3), and for an extended period. We therefore concluded that the endoprotease Eep is involved at least in the processing of the ComS propeptide.

The AmiA3 OBP is more important than AmiA1 in the import of ComS. The last step of the extracellular circuit of ComS is its capture by the oligopeptide binding proteins (OBPs) of the Ami oligopeptide transporter. There are two OBPs in LMD-9: AmiA1 and AmiA3. We have already shown that an *amiA3* dele-

tion mutation results in a 98% loss of transformability, whereas an *amiA1* deletion mutation results in the loss of only 50% transformability, indicating that AmiA3 predominates in the control of competence during culture in CDM (5). However, in this experi-

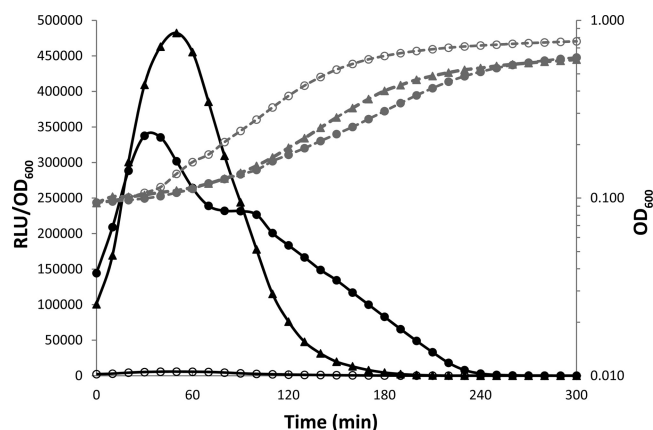


FIG 3 Role of the Eep membrane protease in ComS processing. The graph shows the growth (OD_{600} ; gray) and relative luciferase activities (RLU/OD_{600} ; black) in CDM of a strain containing a *P_{comX}-luxAB* fusion in a Δ *eep* background (TIL1371), without (open circles) or with (closed circles) 1 μ M ComS_{17–24}, and of a strain containing a *comX-luxAB* fusion in a Δ *comS* background (TIL1314), with 1 μ M ComS_{17–24} (closed triangles). The data shown are representative of three independent experiments.

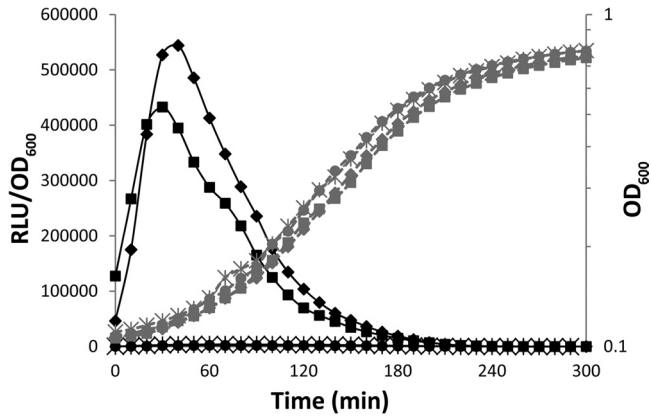


FIG 4 Roles of the AmiA1 and AmiA3 oligopeptide binding proteins in the import of ComS₁₇₋₂₄. The graph shows the growth (OD₆₀₀; gray symbols) and relative luciferase activities (RLU/OD₆₀₀; black symbols) in CDM supplemented with 0.05 μM ComS₁₇₋₂₄ of strains containing a *comX-luxAB* fusion in a Δ comS background (TIL1391; squares) or a deletion of *amiA1* (TIL1394; diamonds), *amiA3* (TIL1392; stars), or both *amiA1* and *amiA3* (TIL1393; circles). The data shown are representative of three independent experiments.

ment, ComS was produced naturally, and the rate of transformability was controlled by pheromone import and the positive-feedback loop controlling the transcription of the corresponding gene. We assessed the role of each OBP in the import of ComS in more detail, by deleting either *amiA1* or *amiA3* from a ComS-nonproducing strain containing a *P_{comX}-luxAB* reporter fusion and adding synthetic ComS₁₇₋₂₄ at a nonsaturating concentration of 0.05 μM, to the culture medium. Relative luciferase activity was much weaker in the *amiA3* deletion mutant (TIL1392) than in the *amiA1* deletion mutant (TIL1394), confirming the greater importance of AmiA3 than that of AmiA1 in the import of ComS₁₇₋₂₄ during growth in CDM (Fig. 4). In the presence of both OBPs (TIL1391), luciferase activity levels were similar to those obtained with strain TIL1394, and as expected, no luciferase activity was detected if both OBPs were deleted (TIL1393).

Peptides in the growth medium prevent the triggering of competence. We have shown that *comX* expression is lower in M17lac than in CDM, by a factor of 200, resulting in an absence of transformants during growth in M17lac (5). M17 is a peptide-rich medium. We therefore hypothesized that the presence of high concentrations of peptides might prevent the triggering of competence. Tryptone, a tryptic digestion product of caseins, is one of the sources of the peptides in M17, in which its concentration is 5 g liter⁻¹. We cultured a strain containing the *P_{comX}-luxAB* reporter fusion (CB001) in CDM supplemented with tryptone at concentrations of 0.1 to 5 g liter⁻¹ and measured the maximum levels of relative luciferase activity. These levels were compared with those obtained in CDM to determine repression levels. We observed 97% repression of *comX* expression in CDM supplemented with 5 g liter⁻¹ tryptone (Fig. 5A). A similar level of repression was observed in CDM supplemented with 0.5 g liter⁻¹ tryptone, and the concentration of tryptone had to be lowered to 0.2 g liter⁻¹ to achieve a significant decrease in the inhibitory effect. We performed a similar experiment with Casamino Acids, an acid hydrolysate of caseins consisting mostly of amino acids. In the presence of 10 g liter⁻¹ Casamino Acids, the expression of *comX* was repressed by only 28%, with no repression detected at a Casamino Acids concentration of 0.5 g liter⁻¹ (Fig. 5B). These

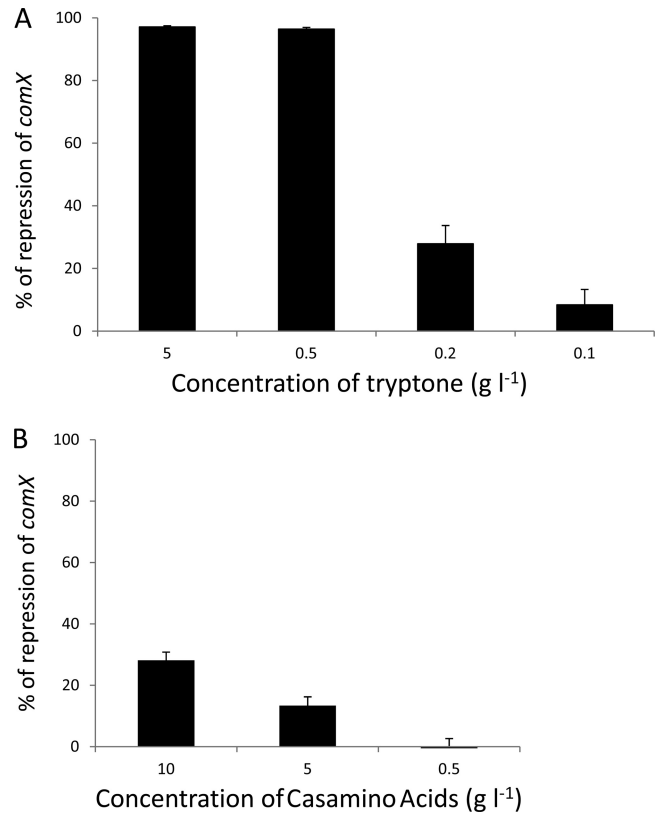


FIG 5 Inhibitory effect of tryptone or Casamino Acids in CDM on the expression of *comX*. The maximum level of relative luciferase activity of strain CB001 (*blp::P_{comX}-luxAB*) was measured in CDM supplemented with either tryptone or Casamino Acids and compared with that obtained in unsupplemented CDM to determine the percent repression of *comX* expression by tryptone (A) or Casamino Acids (B). The means for three independent experiments are presented, and error bars indicate standard deviations.

findings confirm that the presence of tryptone and, more precisely, of peptides in M17 is sufficient to account for the inhibition of transformation observed in this medium.

The competence of *S. thermophilus* has been studied only in laboratory media such as M17 and CDM. However, *S. thermophilus* is a streptococcus adapted to milk, which is believed to be its ecological niche (17). The peptide concentration of milk has been estimated to be about 0.05 g liter⁻¹ (18). The results obtained with tryptone-complemented CDM suggest that this concentration is compatible with the triggering of competence in *S. thermophilus*. We thus assessed the rate of transformation with plasmid DNA of the strain LMD-9 in milk. We found it to be $6.6 \times 10^{-4} \mu\text{g}^{-1}$ of DNA, increasing to $1.4 \times 10^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ of DNA when ComS was added to the milk at a final concentration of 1 μM. This observation confirms that the peptide content of milk is not high enough to prevent the triggering of competence.

The ComS-ComR complex is more a timing device than a quorum-sensing (QS) system. The triggering of *comX* expression occurs 90 min after the start of the culture of strain CB001 (*blp::P_{comX}-luxAB*), a naturally ComS-producing strain (6). To check if the cells were resistant to the presence of ComS during the beginning of the exponential growth phase, we performed a set of experiments in which ComS₁₇₋₂₄ was added at different time points to cultures of the same strain, TIL1391 (*blp::P_{comX}-luxAB comS::*

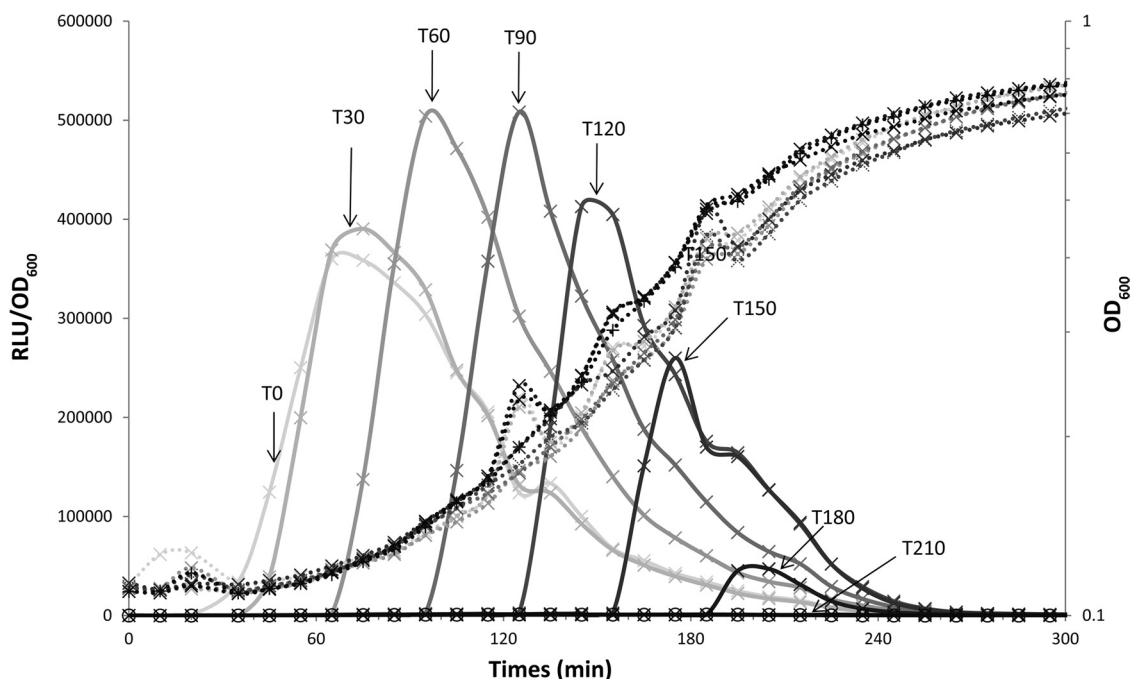


FIG 6 Expression of *comX* in a ComS-nonproducing strain is triggered by the presence of the ComS_{17–24} pheromone in the culture medium during the exponential growth phase. The graph shows the growth (OD_{600} ; dotted lines) and relative luciferase activities (RLU/OD_{600} ; solid lines) of the LMD-9 strain containing a P_{comX} -*luxAB* fusion in a $\Delta comS$ background (TIL1391) after (×) or in the absence of (○) the addition of the synthetic ComS_{17–24} pheromone 0, 30, 90, 120, 150, 180, and 210 min after culture inoculation at an OD_{600} of 0.05. The time at which ComS_{17–24} was added (from T0 to T210) is represented on a gray scale. The data shown are representative of three independent experiments.

spec), inoculated at the same time and from the same preculture. ComS_{17–24} was added at the beginning of the culture (T0) and then every 30 min during the exponential growth phase, to a non-saturating concentration of 0.05 μ M. The addition of the ComS_{17–24} peptide at T0 triggered the expression of *comX* 30 min later (Fig. 6). The addition of ComS_{17–24} between 30 and 180 min after the start of the culture (between T30 and T180) was followed by *comX* expression, which was first detected about 10 min after addition of the peptide. At the end of the exponential growth phase (T210), no *comX* expression was detected, probably due to the limitation of luciferase measurement at low pH and/or when the cofactor FMNH₂ is limiting (19). Levels of *comX* expression were maximal after the addition of ComS_{17–24} at T60 and T90. Thus, cells can respond to ComS early or at any point during growth, indicating that bacteria are ready to become competent at any time. The addition of ComS at the beginning of growth triggered the expression of *comX* approximately 50 min sooner than that under natural conditions of ComS synthesis (Fig. 7A).

QS mechanisms combine cell-cell signaling and the measurement of population density through the detection of a signal following its passive accumulation during growth (2). We investigated whether the timing of competence depended on quorum cell density by measuring *comX* expression in cultures of the CB001 strain ($blp::P_{comX}$ -*luxAB*) inoculated at various initial concentrations. Because no peptide was added to the cultures, P_{comX} activation was controlled by the production of ComS by strain CB001. We observed that the expression of *comX* was triggered independently of the initial OD_{600} of the culture and always occurred 80 to 100 min after inoculation, except in the culture inoculated with the highest initial density of cells, in which no *comX* expression was detected (Fig. 7A). Similar results were obtained

with strain TIL1349 ($blp::P_{dprA}$ -*luxAB*) and strain LF121 ($blp::P_{comS}$ -*luxAB*), in which we measured expression of the late competence gene *dprA* and the *comS* gene, respectively (Fig. 7B and C). In all cases, the maximum level of gene expression was not correlated with initial inoculum, as similar values were obtained with all the initial densities tested. We also performed similar experiments to investigate *comR* expression with strain LF123. In this case, expression was triggered immediately. We also observed a clear correlation between the level of inoculum and gene expression: the larger the inoculum, the higher was the level of *comR* expression (Fig. 7D). Conversely, the inoculum level and time course of expression were inversely correlated, with larger inoculum being associated with shorter durations of *comR* expression.

DISCUSSION

The ComS-associated ComR regulator belongs to an ever-expanding family of regulators involved in cell-cell communication, such as quorum-sensing mechanisms, and in interacting with intracellular signaling peptides. This family seems to be restricted to Gram-positive bacteria and includes the SHP-associated Rgg proteins in streptococci and the regulators of the RNPP family: the PlcR and NprR activators of bacilli, the PrgX repressor of *Enterococcus faecalis*, and the Rap phosphatases of bacilli (20). To date, only a few mature forms of signaling peptides from this family—cCF10, PhrC, PapR, SHP1358, and the XIP of *S. mutans*, a type II ComS pheromone—have been found in the extracellular medium (8, 14, 21–23) (see Table S2 in the supplemental material). We describe here the early steps of the extracellular circuit of another member of this family of signaling peptides, ComS from *S. thermophilus*, a type I ComS pheromone.

We first identified the active form of ComS in the extracellular

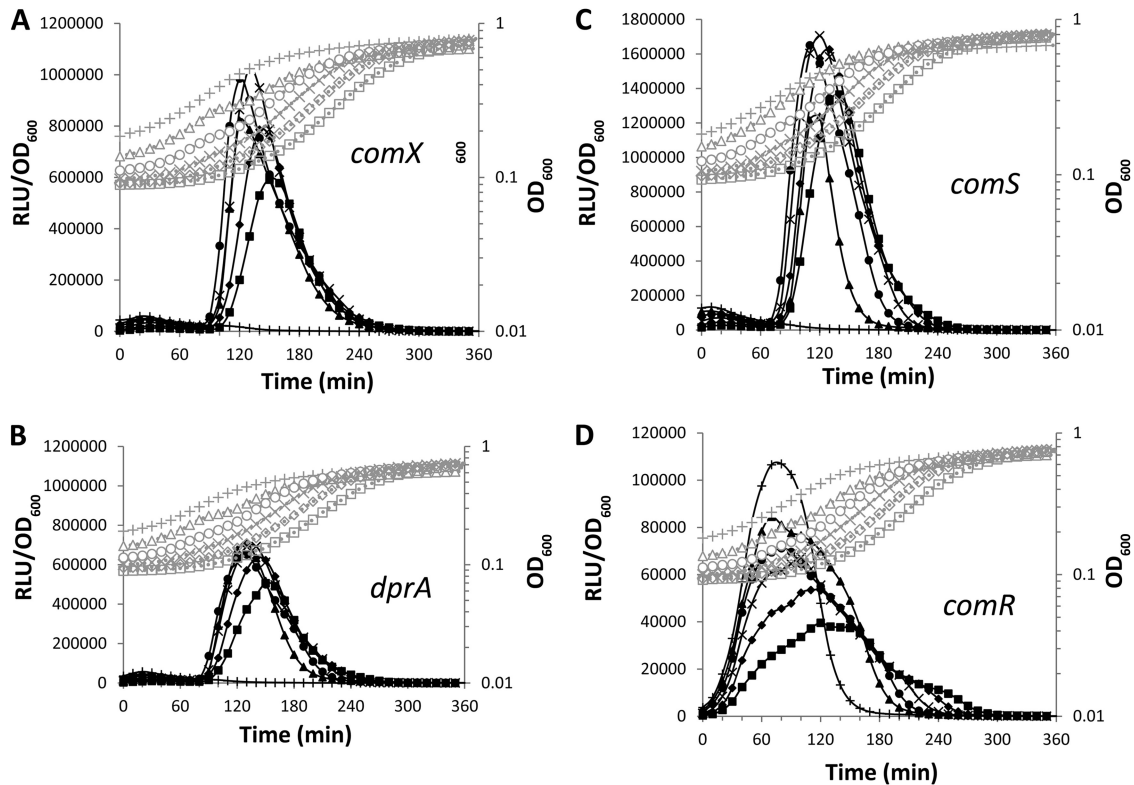


FIG 7 Effect of initial cell density on the expression of *com* genes. The graphs show the growth (OD_{600} ; gray lines and symbols) and relative luciferase activities (RLU/OD_{600} ; black lines and symbols) in CDM of strains containing a P_{comX} -*luxAB* fusion (CB001) (A), a P_{comS} -*luxAB* fusion (LF121) (B), a P_{dprA} -*luxAB* fusion (TIL1349) (C), or a P_{comR} -*luxAB* fusion (LF123) (D), with inoculation at various concentrations, i.e., OD_{600} values of 0.012 (squares), 0.025 (diamonds), 0.05 (X's), 0.1 (circles), 0.2 (triangles), and 0.4 (+ symbols). The data shown are representative of three independent experiments.

medium of a ComS-overproducing strain. Mature ComS, i.e., ComS_{14–24}, is an undecapeptide and is thus longer than the synthetic peptides identified as active in a previous study (6). Natural mature ComS is probably unmodified, like previously identified signaling peptides, which bind directly to their effectors (PrgX, PlcR, and Rap phosphatases) (see Table S2 in the supplemental material), although we cannot rule out the possibility of intracellular proteolysis or modifications. Indeed, it is difficult to determine whether ComS_{14–24} is the peptide preferentially interacting with ComR, a precursor of shorter active peptides generated by cleavage with intracellular aminopeptidases, or both. Six intracellular aminopeptidases with general or more specific cleavage specificities are encoded in the *S. thermophilus* genome and could potentially cleave ComS after its import (24). Two shorter forms of ComS_{14–24}, ComS_{15–24} and ComS_{16–24}, which are probably products of ComS_{14–24} degradation, have been detected in the extracellular medium. This observation suggests that ComS_{14–24} is degraded extracellularly by an aminopeptidase that remains to be identified. We also showed that synthetic ComS_{17–24} was as efficient as synthetic ComS_{14–24}. The extracellular mature form of ComS is slightly longer than the other internalized signaling peptides identified in supernatants from Gram-positive bacteria (see Table S2), which are between five and nine amino acids long. However, ComS_{14–24} could clearly be transported by the Ami oligopeptide transporter, which can import peptides of 3 to 23 residues (25). Furthermore, we demonstrated that the thiol of the ComS cysteine residue must remain unmodified for ComS transport or activity. This observation indicates a possible role of the

oxydo-reduction status of the environment in the triggering and regulation of competence.

ComS_{14–24} is generated by C-terminal cleavage of the peptide precursor. The Eep membrane protease plays a direct or indirect role in the processing of proComS and of several pheromones and antipheromones of *E. faecalis* (26, 27), the SHP1358 pheromone of *S. thermophilus* (14), and SHP3 from *S. pyogenes* (16). If Eep cleaves the pheromone precursors, as seems likely, in all cases it would recognize hydrophobic peptides of about 20 amino acids in length, signal peptides, or peptides resembling signal peptides. These characteristics must be sufficient for Eep recognition, because no obvious amino acid signature could be identified by sequence alignment analysis. These features are also probably necessary for peptide secretion. We do not know whether these peptides are secreted via the Sec machinery or via another transporter or whether their hydrophobicity allows them to cross the membrane directly. The processing and secretion steps are probably tightly linked and occur simultaneously in the membrane predicted to contain Eep. Interestingly, Eep is not involved in the processing of ComS from *S. mutans* (8). The ComS peptides of other streptococci, also named XIP, vary in length between 15 and 32 amino acids and are less hydrophobic than SHP signaling peptides. It will be interesting to identify the ComS species processed by Eep for the identification of additional features potentially accounting for the specificity of this protease. It would also be very interesting to identify proteases that can substitute for Eep. The situation seems to be different in bacilli, in which PapR and Phr peptides, working with PlcR and Rap phosphatases, respectively,

have a peptide signal toward the N terminus, in front of the active part of the peptide, suggesting probable secretion via the Sec machinery. It remains unclear how PapR is processed, but PhrC (CSF) in *Bacillus subtilis* is processed by at least three proteases: subtilisin, Epr, and Vpr (28).

We have confirmed that the AmiA3 oligopeptide plays a more important role than that of AmiA1 in the import of ComS. However, it is difficult to determine whether this is due to a higher abundance of AmiA3 than of AmiA1 or to a higher specificity of AmiA3 for ComS. Previous proteomic results obtained by our group (5) indicated that AmiA3 has a higher abundance factor (3.93 ± 0.37) than that of AmiA1 (2.76 ± 0.35) (data not shown), suggesting that AmiA3 is probably more abundant than AmiA1 in CDM. Indeed, the abundance factor is the ratio between the total number of spectra obtained during the protein identification process and the theoretical number of peptides detectable for a given protein by mass spectrometry. In the case of AmiA1 and AmiA3, homologous proteins of the same size, these factors can be compared.

We were unable to detect ComS in the extracellular medium of a strain naturally producing this molecule by mass spectrometry or complementation experiments with supernatants. ComS does not seem to diffuse freely or to accumulate in the medium. However, a nonproducing strain can obtain this molecule from a strain that produces it naturally, as shown by our coculture experiments. In addition, ComS was detected in the supernatant from a ComS-overproducing strain in which Ami-mediated import was impaired. Several hypotheses can be put forward to explain these findings: ComS may remain stuck on the membrane after secretion, or it may rapidly disappear from the cell surface, being captured rapidly by the OBPs of the Ami transporter. These situations allow sensing of ComS by the producer bacteria as well as by bacteria located in the close vicinity of the producers, which is probably relevant in bacterial chains, colonies, or biofilms. Different findings have been reported for *S. mutans*, as type II ComS is released into the medium, in which it accumulates (9). The behavior of type I ComS from *S. thermophilus* is very similar to that reported for the PhrA signaling peptide involved in controlling sporulation in *B. subtilis*. PhrA was detected only with a mutant with impaired oligopeptide transport (Δopp), and complementation experiments were successful with cocultures but not with supernatants. As pointed out by M. Perego, this behavior suggests that PhrA acts in cell-to-cell communication between interacting cells and over a short distance or that it is a more fundamental component of a timing device (29). We addressed this question in our system, by following the triggering of *comX* expression in a ComS-nonproducing strain in response to the addition of synthetic ComS₁₇₋₂₄ during the exponential phase of growth. Our results suggest that cells can respond immediately to the presence of the signal peptide, except at the beginning of the culture (when the cells are used to inoculate fresh medium), probably because some of the components of the cell-to-cell communication machinery must first be synthesized in sufficiently large amounts. The response of the cells to the presence of ComS is transient. Following the dilution of a culture naturally producing ComS and containing a *comX-luxAB* fusion to various initial OD₆₀₀ values, the expression of *comX* was always first detected 90 min after dilution and reached high levels regardless of the OD₆₀₀, except in the least-diluted culture, in which no *comX* expression was detected. Even if we cannot completely exclude that, whatever the

dilution, the ComS concentration remained above the threshold for quorum sensing detection, our findings suggest that the mechanism triggering *comX* expression resembles a timing device much more than a quorum-sensing system. The component that is limiting during the first 90 min remains to be identified. Similar results were obtained with a late competence gene, *dprA*, and *comS*, whose expression seems to be triggered slightly earlier, possibly because the ComR regulator is synthesized in the vicinity of the *comS* promoter. As observed with *comX*, no expression was detected for the three genes in the least-diluted culture (OD₆₀₀ = 0.4). More experiments will be needed to explain this surprising result, but we can hypothesize that at an OD₆₀₀ of 0.4, as the cultures are less diluted, a competence inhibitor (protein or signal) is present, or that the physiological state of the cells is different than in less-diluted cultures. The *comR* gene was expressed immediately from the start of culture, even in the least-diluted culture. In *S. mutans*, the kinetics of competence triggering is completely different, with this state occurring at the end of the exponential phase, at high cell density. Moreover, the addition of synthetic ComS to the medium leads to a linear increase in *comX* expression that continues for up to 4 h (9). In this case, the type II ComS-ComR mechanism appears to match the criteria required for a QS mechanism more closely.

We have demonstrated that the presence of nutritional peptides in CDM at the concentration found in M17 medium inhibits the triggering of competence. A very recent work described similar results for *S. mutans*, in which small peptides from brain heart infusion (BHI) medium or tryptone suppress the XIP response (30). The simplest explanation for this is that the Ami transporter is saturated with the nutritional peptides, which are present at a much higher concentration than that of ComS. This is not the only possible explanation for the complete lack of competence development of *S. thermophilus* in M17lac medium. Indeed, Boutry et al. recently suggested that in this rich medium, MecA sequesters ComX, allowing it to be degraded by the ClpCP complex (31). As milk is thought to be the ecological niche of *S. thermophilus*, we assessed the rate of transformation of strain LMD-9 in this medium. Levels of competence in milk were lower than those in CDM by a factor of only 10. Interestingly, the addition of synthetic ComS₁₇₋₂₄ increased the transformation rate by a factor of only 3 in CDM but by a factor of 200 in milk. Thus, the LMD-9 strain is more competent in the presence of ComS₁₇₋₂₄ in milk than in CDM, suggesting that one of the steps of the development of competence (occurring after the processing of proComS) is limiting in CDM but not in milk. For example, the Ami level may be higher in milk, in which this transporter is essential for growth (25), than in CDM. It will be interesting to study the regulation of competence triggering in this complex medium from both fundamental and applied research viewpoints.

In conclusion, the type I ComS-ComR mechanism of *S. thermophilus* is clearly different from the type II ComS-ComR mechanism of *S. mutans* and the SHP-Rgg1358 QS mechanism of *S. thermophilus* strain LMD-9, although it has several features in common with these other mechanisms. The pheromones differ: the type II ComS of *S. mutans* and SHP1358 are released into the extracellular medium, although SHP1358 is more hydrophobic than type I and type II ComS. The SHP-Rgg1358 mechanism and probably also the type II ComS-ComR mechanism of *S. mutans* act as QS mechanisms, whereas the type I ComS-ComR mechanism of *S. thermophilus* is more likely to correspond to a timing

device. SHP1358 and type I ComS are processed by an Eep-dependent process, whereas type II ComS is not. Thus, the type II ComS-ComR mechanism of *S. mutans* seems to resemble the SHP1358 mechanism of *S. thermophilus* more closely than the type I ComS-ComR mechanism of *S. thermophilus*. This highlights the importance of not extending the conclusions drawn from a single system to all SHP-Rgg mechanisms.

If we compare the mechanisms controlling the expression of *comX* in *S. pneumoniae* and *S. thermophilus*, it is clear that there are differences in the extracellular step. In *S. pneumoniae*, the ComC (or CSP) signal peptide, which is very different from ComS, is detected in the extracellular medium by the ComDE two-component system. However, the kinetics of *comX* expression in both species are strikingly similar, with transient triggering early in the exponential growth phase. The ComCDE and ComS-ComR mechanisms seem to control the timing of *comX* expression rather than acting as a quorum-sensing mechanism for this gene. These similarities are probably linked to a physiological constraint on competence in both streptococci that has yet to be identified.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA). The Plateforme d'Analyse Protéomique Paris Sud-Ouest (PAPPSO; specifically Alain Guillot) received financial support from the Ile-de-France regional council and from ISTREA. The work carried out in the group of P. Hols was financially supported by FNRS.

L. Fontaine is a postdoctoral worker and P. Hols is a research associate at FNRS. We thank V. Juillard and B. Fleuchot for critical readings of the manuscript and M. Coté for technical assistance.

REFERENCES

- Johnsborg O, Håvarstein LS. 2009. Regulation of natural genetic transformation and acquisition of transforming DNA in *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:627–642.
- Claverys JP, Prudhomme M, Martin B. 2006. Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 60:451–475.
- Johnsborg O, Eldholm V, Håvarstein LS. 2007. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res. Microbiol.* 158:767–778.
- Martin B, Quentin Y, Fichant G, Claverys JP. 2006. Independent evolution of competence regulatory cascades in streptococci? *Trends Microbiol.* 14:339–345.
- Gardan R, Besset C, Guillot A, Gitton C, Monnet V. 2009. The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J. Bacteriol.* 191:4647–4655.
- Fontaine L, Boutry C, de Frahan MH, Delplace B, Fremaux C, Horvath P, Boyaval P, Hols P. 2010. A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Bacteriol.* 192:1444–1454.
- Mashburn-Warren L, Morrison DA, Federle MJ. 2010. A novel double-tryptophan peptide pheromone controls competence in *Streptococcus* spp. via an Rgg regulator. *Mol. Microbiol.* 78:589–606.
- Khan R, Rukke HV, Ricomini Filho AP, Fimland G, Arntzen MO, Thiede B, Petersen FC. 2012. Extracellular identification of a processed type II ComR/ComS pheromone of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 194:3781–3788.
- Desai K, Mashburn-Warren L, Federle MJ, Morrison DA. 2012. Development of competence for genetic transformation by *Streptococcus mutans* in a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 194:3774–3780.
- Mashburn-Warren L, Morrison DA, Federle MJ. 2012. The cryptic competence pathway in *Streptococcus pyogenes* is controlled by a peptide pheromone. *J. Bacteriol.* 194:4589–4600.
- Letort C, Juillard V. 2001. Development of a minimal chemically-defined medium for the exponential growth of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 91:1023–1029.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Ibrahim M, Guillot A, Wessner F, Algaron F, Besset C, Courtin P, Gardan R, Monnet V. 2007. Control of the transcription of a short gene encoding a cyclic peptide in *Streptococcus thermophilus*: a new quorum-sensing system? *J. Bacteriol.* 189:8844–8854.
- Fleuchot B, Gitton C, Guillot A, Vidic J, Nicolas P, Besset C, Fontaine L, Hols P, Leblond-Bourget N, Monnet V, Gardan R. 2011. Rgg proteins associated with internalized small hydrophobic peptides: a new quorum-sensing mechanism in streptococci. *Mol. Microbiol.* 80:1102–1119.
- An FY, Sulavik MC, Clewell DB. 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.* 181:5915–5921.
- Chang JC, LaSarre B, Jimenez JC, Aggarwal C, Federle MJ. 2011. Two group A streptococcal peptide pheromones act through opposing Rgg regulators to control biofilm development. *PLoS Pathog.* 7:1–16.
- Delorme C, Bartholini C, Bolotine A, Ehrlich SD, Renault P. 2010. Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:451–460.
- Juillard V, Guillot A, Le Bars D, Gripon J-C. 1998. Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1230–1236.
- Waterfield NR, Le Page RW, Wilson PW, Wells JM. 1995. The isolation of lactococcal promoters and their use in investigating bacterial luciferase synthesis in *Lactococcus lactis*. *Gene* 165:9–15.
- Declerck N, Bouillaud L, Chaix D, Rugani N, Slamti L, Hoh F, Lereclus D, Arold ST. 2007. Structure of PlcR: insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:18490–18495.
- Mori M, Sakagami Y, Ishii Y, Isogai A, Kitada C, Fujino M, Adsit JC, Dunny GM, Suzuki A. 1988. Structure of cCF10, a peptide sex pheromone which induces conjugative transfer of the *Streptococcus faecalis* tetracycline resistance plasmid, pCF10. *J. Biol. Chem.* 263:14574–14578.
- Solomon JM, Lazazzera BA, Grossman AD. 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 10:2014–2024.
- Bouillaud L, Perchat S, Arold S, Zorrilla S, Slamti L, Henry C, Gohar M, Declerck N, Lereclus D. 2008. Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic Acids Res.* 36:3791–3801.
- Rul F, Monnet V. 1997. Presence of additional peptidases in *Streptococcus thermophilus* CNRZ 302 compared to *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol.* 82:695–704.
- Garault P, Le Bars D, Besset C, Monnet V. 2002. Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 277:32–39.
- An FY, Clewell DB. 2002. Identification of the cAD1 sex pheromone precursor in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 184:1880–1887.
- Chandler JR, Dunny GM. 2008. Characterization of the sequence specificity determinants required for processing and control of sex pheromone by the intramembrane protease Eep and the plasmid-encoded protein PrgY. *J. Bacteriol.* 190:1172–1183.
- Lanigan-Gerdes S, Dooley AN, Faull KF, Lazazzera BA. 2007. Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 65:1321–1333.
- Perego M. 1999. Self-signaling by Phr peptides modulates *Bacillus subtilis* development, p 243–258. In Dunny GM, Winans SC (ed), *Cell-cell signaling in bacteria*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Son M, Ahn SJ, Guo Q, Burne RA, Hagen SJ. 2012. Microfluidic study of competence regulation in *Streptococcus mutans*: environmental inputs modulate bimodal and unimodal expression of *comX*. *Mol. Microbiol.* 86:258–272.
- Boutry C, Wahl A, Delplace B, Clippe A, Fontaine L, Hols P. 2012. Adaptor protein MecA is a negative regulator of the expression of late competence genes in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 194:1777–1788.
- 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. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:15611–15616.
33. Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E. 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 175:3628–3635.
34. Bojovic B, Djordjevic G, Topisirovic L. 1991. Improved vector for promoter screening in lactococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:385–388.
35. Fontaine L, Goffin P, Dubout H, Delplace B, Baulard A, Lecat-Guillet N, Chambellon E, Gardan R, Hols P. 4 February 2013. Mechanism of competence activation by the ComRS signalling system in streptococci. *Mol. Microbiol.* [Epub ahead of print.] doi:10.1111/mmi.12157.