

Les transporteurs de peptides de Staphylococcus aureus

Aurélia Hiron

▶ **To cite this version:**

Aurélia Hiron. Les transporteurs de peptides de Staphylococcus aureus. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2007. English. NNT : . pastel-00003802

HAL Id: pastel-00003802
https://pastel.hal.science/pastel-00003802

Submitted on 5 Jun 2008

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.

N°/__/__/__/__/__/__/__/__/__/__/

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech)

Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

Aurélia HIRON

le 19 décembre 2007

Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*

Directeur de thèse : ***Vincent JUILLARD***

Codirecteur de thèse : ***Elise BOREZEE-DURANT***

Travail réalisé à l' INRA, UR888 Bactéries Lactiques et pathogènes Opportunistes,

78350 Jouy en Josas

Devant le jury :

M. Claude GAILLARDIN …….**Président**

Mme Danièle ATLAN.....**Rapporteur**

M. Yves LE LOIR …….....**Rapporteur**

Mme Sylviane DERZELLE.....**Examinateur**

M. Patrick TRIEU-CUOT ……...**Examinateur**

M. Vincent JUILLARD ……..**Directeur de thèse**

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech) est un Grand Etablissement dépendant du Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, composé de l'INA PG, de l'ENGREF et de l'ENSIA (décret n° 2006-1592 du 13 décembre 2006)

REMERCIEMENTS

Cette thèse a été réalisée au sein de l'Unité des Bactéries Lactiques et pathogènes Opportunistes (UBLO la bien nommée) à l'INRA de Jouy-en-Josas. Je tiens d'abord à remercier Alexandra Gruss, plus connue sous le nom de Sandy, de m'y avoir accueilli durant ces années.

Merci vivement à l'ensemble des membres du jury, Mme Danièle Atlan, M. Yves Le Loir, Mme Sylviane Derzelle, M. Patrick Trieu-Cuot et M. Claude Gaillardin, pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

J'ai bénéficié au cours de ces années de l'encadrement de Vincent Juillard et Elise Durant au sein de l'équipe du labo 13.

Merci à toi Vincent, grand chef, à qui je dois en premier lieu, d'avoir eu l'opportunité de faire mes premiers pas dans le monde de la recherche. Merci pour ta disponibilité. Aussi loin que je me souvienne, tu n'a jamais répondu non à mon éternelle question : t'aurais du temps pour qu'on discute ? Et ça, même ces derniers temps où cette question était pour ainsi dire journalière ! Tu m'as apporté tes conseils, le recul qui me faisait défaut, et surtout ta confiance ainsi qu'une liberté de décision. Nos conversations ont toujours été un plaisir et tu as toujours été attentif à mon avis. Et ça je sais que c'est pas donné à tous les thésards… Tout en ayant la gentillesse de ne même pas te moquer de moi quand je revenais en disant que finalement, t'avais raison ! Je suis très heureuse d'avoir pu bénéficier de ton encadrement et merci pour tout ce que cela m'apportera pour la suite. Merci aussi pour ton soutien dans mes choix personnels. Tout plein de bonnes choses à toi et ta famille. Prends bien soin de Pan-Pan, je t'assure elle (car oui c'est une fille !) est pas si c.. que tu le pense, c'est juste un lapin ne lui en demande pas trop.

Un très grand merci à Elise, pour le super duo que nous avons formé pendant ces 3 ans et des poussières. Je n'oublierai jamais tout ce que je te dois… Tout d'abord scientifiquement, n'oublions pas qu'en arrivant au labo je savais à peine couler une boite et que je suis maintenant presque docteur ! Je pense que je serais longtemps nostalgique des Opp et du staphylocoque. En arriver à regretter cette bactérie, faut le faire ! Pour avoir réussi, toujours avec bienveillance, à me former, partager le bureau et nos tiroirs de congélo et supporter ma conception assez personnelle du rangement, je te décerne la médaille de la patience. Merci pour les nombreuses discussions scientifiques (ou pas !), tes conseils et ton soutien inconditionnel, les dîners, les fois où tu m'as sauvé la mise (je pense notamment à un prêt de pantalon, à une discussion sur l'angine virale et à des verres de vin discrètement échangés…) et pour encore tout un tas de choses que je ne citerais pas ici. Beaucoup de bonheur à toute la famille Durant. Et puis ne pense pas te débarrasser de moi comme ça, je vais encore avoir besoin de tes conseils (surtout que je m'engage dans une nouvelle aventure dans laquelle tu as de l'expérience : élever un garçon !). Encore quelques soirées en perspective…

Mes plus vifs remerciements aux deux autres « membres historiques » du labo 13, Jean-Christophe et Flo. Merci donc à l'autre homme de l'équipe, Biquet - Chouchou adoré pour les intimes. Ta bonne humeur, ton soutien, les apéros du vendredi soir, et même, je l'avoue, tes blagues (plus ou moins fines…) ont beaucoup contribué à l'ambiance chaleureuse du labo et me manqueront. Je n'oublierai pas les grands moments de confidence et de fous rires que nous avons eu (et promis, je ne cherchais pas à te piéger !). Sache que tu resteras le seul avec qui j'accepte de partager MPL, et ça c'est pas la plus grande marque de confiance qu'on puisse faire ?
Merci à Flo, technicienne de choc, et reine du surnom. Bébé, La Poup, Simplet, Baloo… y'en a des pas faciles à assumer mais bon, je sais qu'au fond ils sont affectueux ! Partenaires de bavardage de la pause café, de Sudoku (malheureusement pour ton classement), nous avons également admirablement fait face à plusieurs tentatives d'abandon de la part du reste de l'équipe pendant

les semaines sans chef/entre filles. J'aurais toujours une pensée pour toi quand fleurira mon joli laurier rose (t'inquiète, je le bichonne) et te souhaite plein de belles choses pour la suite (courage, les crises d'adolescence ça a une fin, enfin normalement…).

Pour finir avec le labo 13, je tiens à remercier l'ensemble des stagiaires/thésards/chercheurs que j'ai eu plaisir à côtoyer. A la dernière Virginie, je souhaite plein de réussite pour sa thèse. Et une bonne collaboration avec la 205, j'espère qu'elle sera gentille avec toi. Une pensée amicale pour, dans l'ordre chronologique décroissant, Célia (y'a quelque chose de changé chez toi…), Reda (Mr scotché au portable), Gloria, Claire 1 (la timide audacieuse) et 2, Théo (égoutière amatrice), Walid et Nadia.

Une mention spéciale pour Patrick Régent, binôme d'un jour, binôme pour toujours. Superman du bricolage toujours prêt à rendre service, qui a sauvé plusieurs de nos étagères de situations périlleuses (BA13=spie queue de cochon, je n'oublierai pas !) et nous a évité quelquefois de rentrer en stop. Merci donc pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

Je remercie bien évidemment toutes les personnes d'UBLO. Plus particulièrement, merci à l'équipe de Philippe G. qui m'a accueillie dans son labo quelques temps et spécialement à Béné qui m'a initiée aux secrets des gels 2D. Merci également à Daoud, Mr « Ca va gros bide ? » et conseiller musical en chef. A Philippe P. pour avoir résolu en un temps record mes problèmes existentiels d'ordinateur. A Manon, conseillère de choix en PCRq, et Aida, compagne de suivis de croissance, je souhaite un bonne chance pour la suite de leur thèse. Je souhaite une bonne continuation à Delphine (et garde le moral !), à Maryse qui trouvera la thèse de sa vie, à Olivier S. le dieu des compétentes. Merci à Pascale, Isabelle et Saulius, invités occasionnels des apéros, pour leurs conseils éclairés. A Olivier H. discret voisin de labo et à la un peu moins discrète mais toujours prête à rendre service Sylviane. N'oublions pas l'ensemble de l'équipe laverie/prépa et spécialement Caro à qui j'ai donné pas mal de travail en salle patho. Merci encore à ces gens et à tous ceux que je n'ai pas cité (qui je l'espère, me le pardonneront).

J'ai également eu la chance au cours de cette thèse de travailler avec plusieurs personnes. Merci à Alain Guillot (PAPSS Jouy en Josas) pour les analyses MALDI, la LC-MS/MS et le temps consacré à la grande quête des peptides. La banque des petits gènes a été construite avec l'aide de Pierre Nicolas et Philippe Bessieres (MIG Jouy en Josas) que je remercie vivement. Merci à Samira Makzhami et Claudia Bevilacqua de la plateforme PICT pour m'avoir formée en PCRq. Je remercie également José Entenza et Philippe Moreillon (Université de Lausanne) pour les tests de virulence sur les rats et leur accueil lors de notre passage en Suisse. Pour les tests de virulence sur les souris, merci à Alain Charbit et Ihari Dubail (UMR570 institut Necker, Paris).

Ces trois ans m'ont également permis de rencontrer THE groupe de thésards et plus si affinité, avec qui j'ai vécu des moments inoubliables : à Pat (et sa « colloc » Luce), roi de l'humour classe et des poissons d'avril foireux, à qui je dois bien des fous rires. A Nico le petit dernier (et sa moitié Cécile), grand fan du jeu de mot (qui va te dire que t'es pas drôle quand tu seras à Toulouse ?), nos conversations de haut niveau philosophique me manqueront. A Fabien, squatteur de salle café et de petite soeur qui tentent ensemble l'aventure du grand nord. Autour de ce noyau dur, il y a aussi Aurélie à la spontanéité étonnante, Anne-Claire fidèle partenaire de piscine et de potins, Sandra et Guillaume les canadiens convertis et Tat première fan éternelle.

Durant mes premiers mois à l'INRA j'ai habité les fameuses chambres d'étudiant du centre. J'ai une pensée pour toutes les personnes avec qui j'ai cohabité dans une ambiance chaleureuse et cosmopolite : à Amel l'algérienne entremetteuse, à Gaber mon papa égyptien, à

Osvaldo et Felipe les chiliens musiciens, à Jean-Guy mélange Argento-canadien, à Manos cuisinier indien, à Borjita confident d'Espagne favori....

Je remercie du fond du cœur tous mes proches. En premier mes parents qui m'ont apporté tout leur soutien au cours de mes études sans fin (cette fois, c'est terminé !) et dans ma vie en général. A ma sœur et mon beauf (déjà cités dans une autre catégorie...) pour leur aide de proximité qui se fait maintenant à distance. A mes grands parents /oncles /tantes qui m'entourent au quotidien.

Enfin un énorme merci à Eric, véritable soleil (du sud !) de ma vie et futur papa au top qui m'entoure de son amour, de son soutien et de sa patience tous les jours. Et à ma petite force intérieure qui m'apporte tant de bonheur et de sérénité, ce petit garçon déjà si sage. A mes deux petits hommes je dédie cette thèse.

NOMENCLATURE DES ACIDES AMINES

A	alanine	Ala
C	cystéine	Cys
D	acide aspartique	Asp
E	acide glutamique	Glu
F	phénylalanine	Phe
G	glycine	Gly
H	histidine	His
I	isoleucine	Ile
K	lysine	Lys
L	leucine	Leu
M	méthionine	Met
N	asparagine	Asn
P	proline	Pro
Q	glutamine	Gln
R	arginine	Arg
S	serine	Ser
T	thréonine	Thr
V	valine	Val
W	tryptophane	Trp
Y	tyrosine	Tyr

TABLE DES MATIERES

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 6

I. Les transporteurs de peptides bactériens : présentation 7

A. Les transporteurs de peptides à force proton-motrice (PTR) 8

B. Les ABC-transporteurs de peptides bactériens Opp 9

1) Présentation générale des ABC-transporteurs 9

2) Structure des protéines du système Opp 11

a. La protéine de liaison au substrat OppA 11

b. Les protéines transmembranaires OppB et OppC 13

c. Les protéines ATPasiques OppD et OppF 14

3) Le mécanisme de transport 15

4) La spécificité de substrat des ABC transporteurs de peptides 17

5) Les systèmes Opp : une organisation génétique variable 18

a. *oppA* : un gène transcrit en large excès 18

b. Plusieurs protéines de fixation et plusieurs transporteurs 19

II. Les différentes fonctions des transporteurs de peptides bactériens 22

A. Les transporteurs de peptides et leur rôle dans la nutrition 22

1) Les transporteurs d'oligopeptides sont essentiels à la croissance de *L. lactis* dans le lait 22

2) La régulation des gènes codant les transporteurs de peptides de *L. lactis* par les acides aminés à chaîne latérale ramifiée 24

3) Les transporteurs de peptides de *L. lactis* : un rôle dans la perception de l'environnement 25

B. Les transporteurs de peptides et leur rôle dans la communication intercellulaire 27

1) Les différents modes de communication bactériens 27

a. Les N-acyl homoserine lactones (AHL) 28

b. Les phéromones peptidiques 28

2) La conjugaison chez *Enterococcus faecalis* 30

a. La conjugaison bactérienne 30

b. Le transfert du plasmide pCF10 par conjugaison : une histoire de communication 31

c. Le transport des peptides de signalisation par le système Opp 32

3) Sporulation et compétence chez *Bacillus subtilis* 34

a. Mécanismes généraux de la sporulation et de la compétence 35

b. La régulation de la sporulation et de la compétence par des peptides signaux 36

c. Le système Opp de *B. subtilis* : un transporteur multifonctionnel. Et le système App ? 39

4) L'induction des gènes de virulence de *Bacillus thuringiensis* 40

a. La virulence de *B. thuringiensis* 40

b. L'activation de PlcR par un peptide signal 41

c. Un système Opp spécifique ? ... 42
5) Conclusion ... 43
C. Les transporteurs de peptides : les mécanismes non élucidés ... 44
1) *Streptococcus pneumoniae* : trois protéines de fixation des peptides et trois phénotypes associés ... 44
a. Un rôle dans la régulation de la compétence ... 45
b. Un rôle dans l'adhérence des bactéries aux cellules eucaryotes ... 46
c. Un rôle dans la colonisation *in vivo* ... 47
2) *Streptococcus agalactiae* : une multiplicité de perméases mais seules deux d'entre elles sont associées à la virulence ... 48
a. De multiples transporteurs de peptides et des spécificités en partie redondantes ... 48
b. DpsA : une perméase impliquée dans la croissance en liquide amniotique ... 49
c. Un système Opp impliqué dans l'adhérence ... 49
3) *Streptococcus pyogenes* : un rôle majeur d' Opp et Dpp sur la sécrétion de facteurs de virulence ... 50
a. Opp et Dpp sont impliqués dans le sécrétion de facteurs de virulence ... 51
b. Opp joue un rôle dans la virulence de *S. pyogenes in vivo* ... 52
4) Rôle des transporteurs de peptides dans la survie et la virulence de *Listeria monocytogenes* ... 54
a. Les transporteurs de peptides de *L. monocytogenes* : un atout pour la croissance en environnement hostile ... 54
b. Les transporteurs de peptides de *L. monocytogenes* et leur impact lors de l'infection ... 56
D. Conclusion et perspectives ... 57
III. Les transporteurs de peptides de S. aureus, quels enjeux ? ... ***59***
A. *S. aureus* : un problème clinique, sanitaire et économique majeur ... 59
1) Le pouvoir pathogène de *S. aureus* et les maladies humaines associées ... 59
a. La colonisation de l'hôte ... 60
b. L'infection de l'hôte : destruction des tissus et multiplication bactérienne ... 60
c. L'échappement aux défenses de l'hôte ... 61
2) Impact sanitaire et économique de *S. aureus* sur les animaux d'élevage et l'industrie agroalimentaire ... 62
a. Les mammites à *S. aureus* ... 62
b. Les contaminations alimentaires ... 63
3) Vers une impasse thérapeutique ? ... 64
B. Quels rôles potentiels pour les transporteurs de peptides de *S. aureus* ? ... 66
1) Les transporteurs de peptides dans la nutrition et la survie de *S. aureus* ... 66
2) D'autres fonctions possibles ? ... 68
C. Conclusion ... 70
RESULTATS ... 71
I. Présentation des transporteurs de peptides de S. aureus : une multiplicité de systèmes présentant de nombreuses particularités ... ***73***

A. Analyse structurale des protéines ... 73
B. Des transporteurs conservés entre les souches mais différents les uns des autres ... 74
C. Les transporteurs de peptides de *S. aureus* au sein du monde bactérien ... 76
D. Analyse transcriptionnelle des opérons *opp* ... 77
E. Conclusion ... 78

II. Les transporteurs de peptides de S. aureus et leur rôle dans la nutrition azotée 79

A. Seuls deux transporteurs de peptides ont un rôle nutritionnel lors de la croissance de *S. aureus* dans le lait ... 79
1) La croissance de *S. aureus* RN6390 et de ses différents mutants de transport dans le lait ... 79
2) Mesure de l'expression des différents systèmes Opp lors de la croissance dans le lait ... 81
3) Un phénotype lié à la nutrition azotée ... 82
B. Un rôle dans la régulation de la biosynthèse des protéases ... 83
1) Le mutant *opp3-* présente une baisse d'activité protéolytique globale ... 83
2) Une dérégulation de la synthèse des protéases Ssp et Aur ... 84
3) Quel mécanisme ? ... 85
C. Spécificité de substrat des transporteurs de peptides de *S. aureus* ... 87
1) Détermination de l'auxotrophie de la souche RN6390 ... 88
2) Etude de la spécificité de substrat ... 89
D. L'expression d'Opp3 est modulée par les sources azotées du milieu ... 91
E. Conclusion et perspectives ... 93
1) La croissance de *S. aureus* dans le lait : vers un modèle de nutrition azotée ... 93
2) Perspectives ... 94

III. Les systèmes Opp de S. aureus : un rôle dans le transport de phéromones ? ... 96

A. La banque des petits gènes de *S. aureus* ... 96
B. Identification de peptides codés par des petits gènes et secrétés par *S. aureus* ... 98
1) Détection dans le surnageant de 5 peptides issus de la transcription de petits gènes ... 98
2) Environnement génétique ... 99
3) Conservation au sein des souches de *S. aureus* et du monde bactérien ... 100
4) Quelle(s) fonction(s) ? ... 101
a. Les peptides 4 et 5 : certainement des hémolysines ... 101
b. Les peptides 1, 2 et 3 : plusieurs hypothèses ... 102

C. Comparaison des surnageants de culture de la souche sauvage et des différents mutants de transport ... 104

IV. Discussion générale *106*

MATERIEL ET METHODE 116

I. Microbiologie : souches et conditions de culture *117*

A. Souches utilisées et conditions de stockage 117

B. Conditions de culture et suivis de croissance 117

II. Construction des mutants de délétion *118*

A. Préparation des cellules compétentes de *S. aureus* et protocole d'électroporation 118

B. Extraction de l'ADN génomique de *S. aureus* 119

C. Clonage dans le vecteur pMAD 119

D. Recombinaison homologue 120

E. Vérification des mutants par Southern Blot 121

III. Traitement de l'ARN *122*

A. Extraction des ARN totaux de *S. aureus* 122

B. Transcription inverse (RT) 123

C. PCR semi-quantitative (Limited Dilution -PCR) 124

D. PCR quantitative en temps réel 124

IV. Préparation, détection et tests fonctionnels des protéines *126*

A. Extraction des protéines cytoplasmiques de *S. aureus* et analyses par Western Blot. 126

B. Immunocoloration et microscopie à épifluorescence 127

C. Mesure de l'activité protéolytique des surnageants de culture de *S. aureus* 128

V. Biochimie *128*

A. Analyse des surnageants de culture de *S. aureus* par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC). 128

B. Analyse des surnageants de culture de *S. aureus* par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) 130

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 131

ANNEXES 147

ANNEXE I : Liste des gènes figurant dans la banque des petits gènes de *S. aureus* NCTC8325. 148

ANNEXE I I : Article Hiron *et al.* 2007 155

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les transporteurs de peptides bactériens : présentation

Les procaryotes possèdent une membrane plasmique, qui forme avec la paroi une véritable frontière entre le milieu extérieur et la cellule permettant le maintien de son intégrité, que les nutriments doivent franchir pour être utilisés dans le cytoplasme. La traversée de cette barrière dépend des caractéristiques de la molécule à transporter telles que sa taille, sa solubilité, sa charge électrique, mais également de sa concentration relative dans le milieu intra- et extracellulaire. Ainsi, pour certaines petites molécules (eau, ions, gaz…), ce passage peut se faire sans transfert d'énergie, et suivant un gradient électrochimique décroissant, soit par diffusion passive au travers de la bicouche lipidique pour les molécules lipophiles ou au travers de pores, soit par diffusion facilitée au travers de canaux (Fig.1). Ce mode de transport est souvent lent, peu sélectif mais surtout interdit le passage d'une molécule contre son gradient ce qui, par exemple, rend impossible l'accumulation de nutriments. L'entrée de toute particule suivant un gradient de concentration croissant nécessite donc la présence de systèmes couplant le transport à une énergie métabolique. Un mode de transport actif est dit primaire lorsqu'une réaction chimique exergonique (le plus souvent l'hydrolyse d'ATP) est couplée au passage du substrat, et secondaire lorsqu'un soluté est pompé (contre, donc, son gradient électrochimique) en utilisant un gradient de concentration ionique mis en place par une pompe primaire. Dans ce dernier cas, le passage de la substance peut se faire dans le même sens que celui de l'ion, on parle alors de symport, ou dans le sens contraire, on parle alors d'antiport (Fig.1).

Le transport de peptides est un processus particulièrement important chez tous les êtres vivants, en premier lieu en participant à la nutrition de la cellule, mais aussi en exerçant différentes fonctions, comme la transduction de signaux (cf chapitre suivant). Chez les bactéries, les peptides du milieu extérieur sont transportés de manière active à travers la membrane cytoplasmique par des systèmes spécifiques. Il existe deux grands groupes de transporteurs de peptides bactériens, classés suivant la source d'énergie qu'ils utilisent. On distingue donc d'une part les transporteurs à force proton-motrice (pmf) qui utilisent un gradient de protons comme force motrice (transport actif secondaire), et d'autre part les transporteurs de type ATP-Binding Cassette (ABC-transporteurs) qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP (transport actif primaire). Ce premier chapitre consiste en une présentation générale de la structure et du fonctionnement de ces deux types de transporteurs de peptides bactériens.

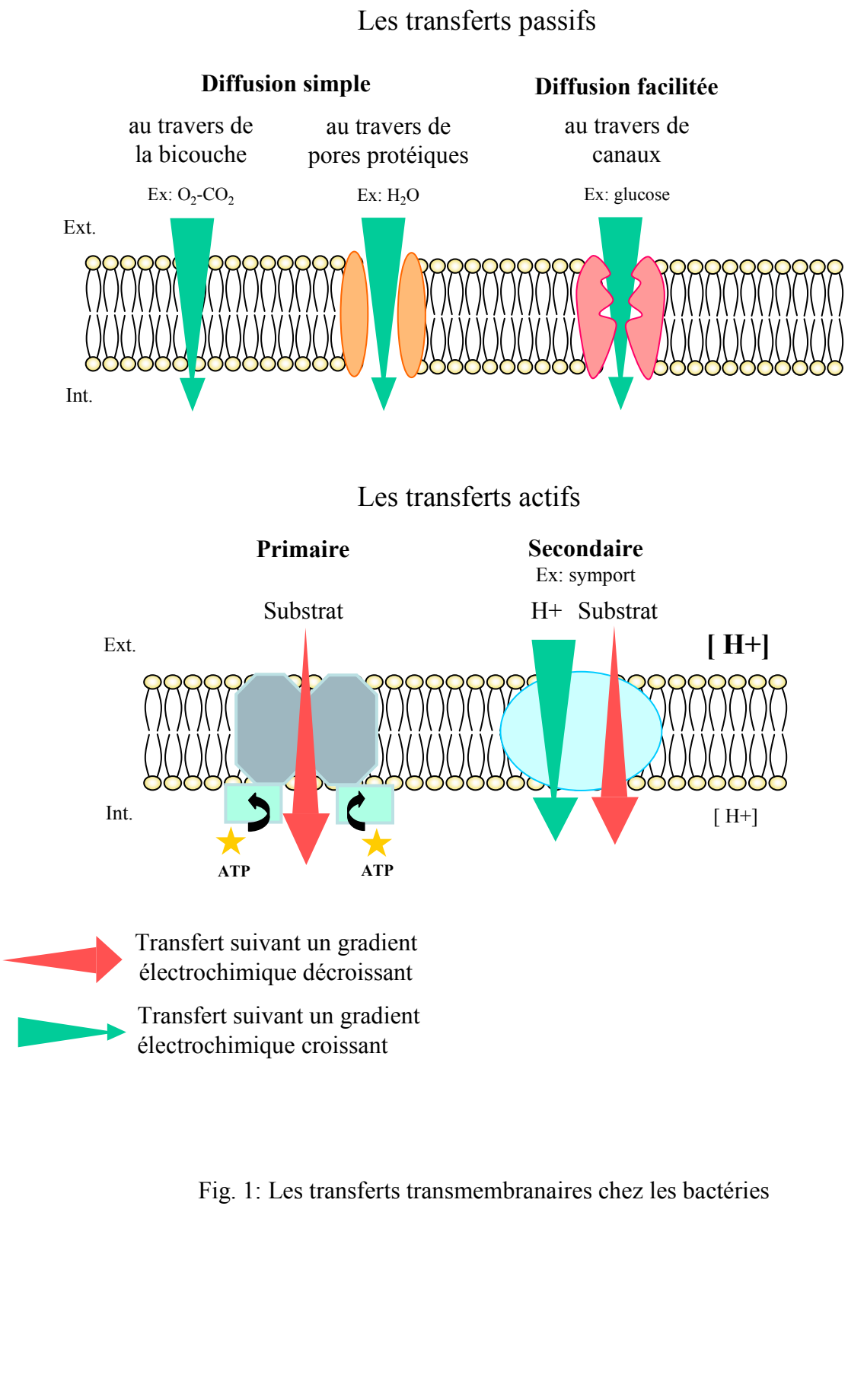


Fig. 1: Les transferts transmembranaires chez les bactéries

Notons qu'il existe également un autre type de transporteur permettant l'import de tripeptides, le système Tpp, décrit notamment chez *Escherichia coli* et *Salmonella thyphimurium* (Gibson *et al.* 1984). Sa caractérisation incomplète n'ayant pas permis de le classer au sein d'une famille particulière, sa structure ne sera pas développée ici.

A. Les transporteurs de peptides à force proton-motrice (PTR)

Les transporteurs appartenant à la famille PTR (peptide transport) sont présents dans l'ensemble du règne vivant. Cette famille regroupe majoritairement des transporteurs prenant en charge des peptides mais il a été également décrit au sein de cette famille un transporteur de nitrate (Lin *et al*. 2000) et de dicarboxylate (Jeong *et al*. 2004). Les transporteurs PTR sont tous dépendants de la force proton motrice comme source d'énergie. L'alignement de nombreuses séquences de ces systèmes, eucaryotes et procaryotes, a permis d'en dégager une structure commune (Steiner *et al.* 1995). Ce sont des transporteurs formés d'une seule protéine constituée de 12 segments transmembranaires contenant au sein du 4ème ou du 5ème segment le motif signature FING (FYxxINxGSL) propre à cette famille (Fig.2). Ce motif caractéristique apparaît comme particulièrement important pour l'activité des systèmes PTR puisqu'une mutation dans la tyrosine conservée du motif chez le transporteur de peptides PTR humain hPepT1 abolit totalement le transport (Yeung *et al.* 1998). Son rôle précis dans le mécanisme de transport n'a cependant pas encore été élucidé.

Chez les bactéries, la seule représentante de la famille PTR caractérisée est la protéine DtpT (Di-tri-peptide Transporter). Cette protéine a été décrite essentiellement chez *L. lactis*, chez qui elle permet le transport d'une large variété de di- et tripeptides, avec une meilleure affinité pour les dipeptides hydrophobes, en symport avec des protons dont le nombre pourrait varier selon la charge du substrat (Hagting *et al.* 1994). Les analyses de prédiction informatique proposent un modèle topologique qui révèle notamment la présence de larges boucles cytoplasmiques et extracellulaires entre les segments hydrophobes (Fig.2) (Hagting *et al.* 1997). Si le mécanisme de translocation des peptides par DtpT n'a pas été étudié, certains transporteurs d'acides aminés également dépendants de la pmf, et de structures comparables à DtpT, sont mieux connus. Nous prendrons pour exemple la perméase à acides aminés à chaîne latérale ramifiée, comme la leucine, de *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* qui permet le passage de l'acide aminé en symport avec un proton. Le mécanisme de transport se découpe en plusieurs étapes ordonnées (Driessen *et al*. 1987) (Fig.3). La première étape est la fixation

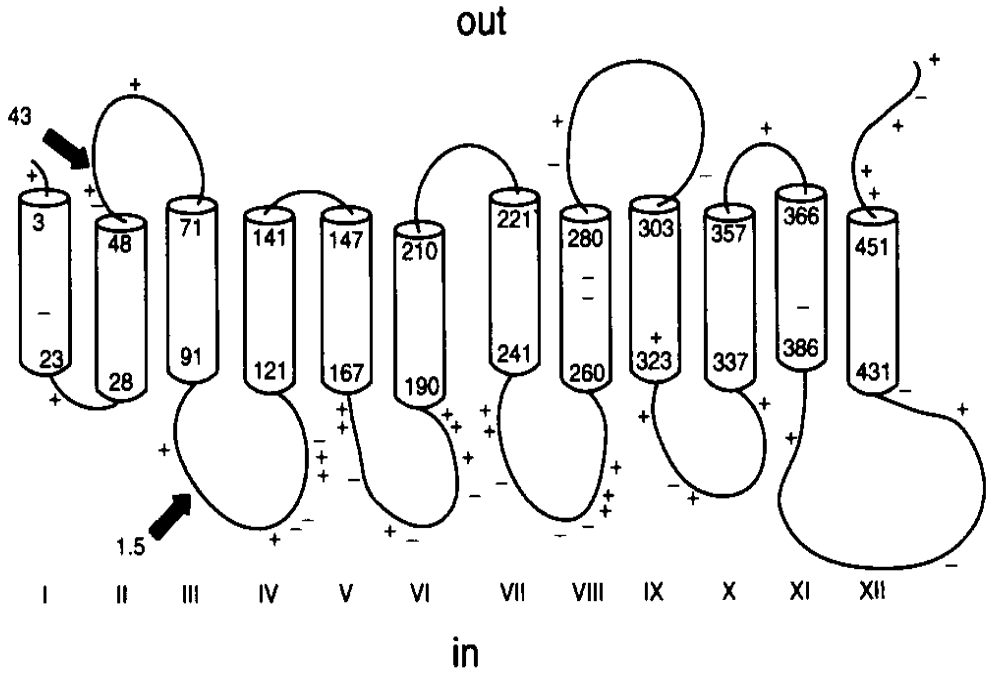


Fig. 2: Modèle topologique du transporteur DtpT de *L. lactis* . Les cylindres représentent les 12 segments transmembranaires.

d'après Hagting *et al*. 1994

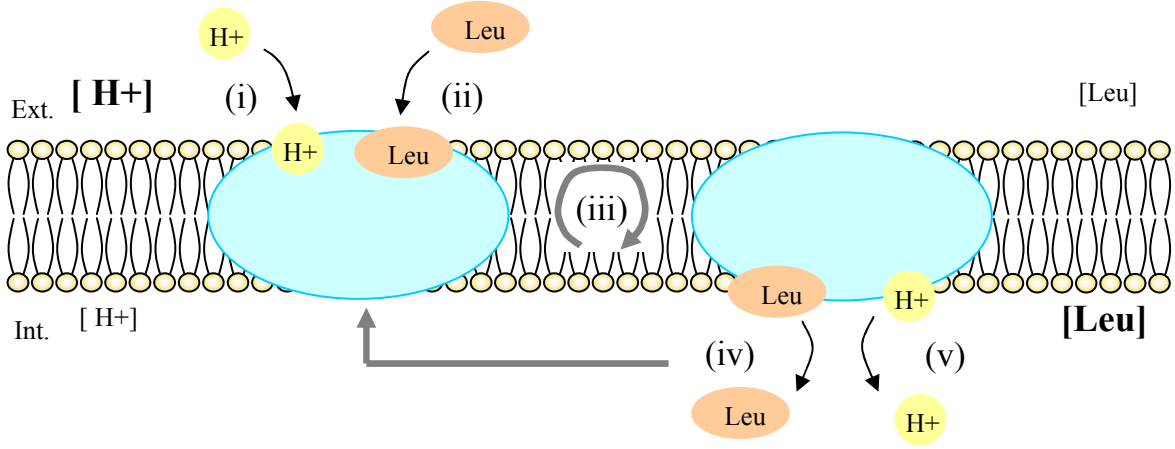


Fig. 3: Modèle du cycle de transport de la leucine par un transporteur dépendant de la force proton motrice. Pour les différentes étapes, se référer au texte.

d'après Driessen *et al*. 1987

d'un proton à la partie extracellulaire de la perméase qui une fois protonée, fixe la leucine de manière spécifique. Le complexe perméase-proton-leucine alors formé inverse sa topologie ce qui permet la libération de l'acide aminé dans le cytoplasme. Une fois l'acide aminé libéré, la perméase se réoriente vers le milieu extracellulaire.
Le passage d'une étape à l'autre est réversible et dépend essentiellement de deux composantes : la différence de pH et la différence de potentiel $\Delta\Psi$ (différence de concentration en charge électrique) entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Leur résultante définit le sens du transport et conditionne sa vitesse. *In vitro*, le transport peut se faire de manière bidirectionnelle, import ou efflux. Cependant, il est très probable que dans les conditions physiologiques, le transporteur fonctionne très majoritairement dans le sens de l'import sauf dans des cas exceptionnels où, par exemple, la concentration en acides aminés branchés à l'intérieur de la cellule serait saturante, rendant sa libération intracellulaire plus défavorable que le passage d'un proton contre son gradient.

Enfin, que ce soit pour la perméase à acide aminé ou pour la protéine DtpT, les sites de fixation du proton et de l'acide aminé ou du peptide sont inconnus.

La protéine DtpT a été également mise en évidence chez d'autres bactéries, notamment chez *Lactobacillus helveticus* (Nakajima *et al.* 1997) et *Listeria monocytogenes* (Wouters *et al.* 2005) pour lesquelles un rôle dans l'import des di et tripeptides a été montré. Cependant, très peu d'études sont disponibles sur les transporteurs bactériens appartenant à cette famille. En effet, la plupart des systèmes d'import de peptides ayant été caractérisés appartiennent au deuxième groupe, celui des ABC-transporteurs, qui sont de loin, les plus répandus au sein du monde bactérien.

B. Les ABC-transporteurs de peptides bactériens Opp

1) Présentation générale des ABC-transporteurs

Les systèmes de transport de type ABC, également appelés « traffic ATPases », constituent l'une des plus vastes familles de protéines retrouvée dans tout le règne vivant. Le terme ABC-transporteur regroupe un ensemble de systèmes de transport phylogénétiquement proches et remarquablement bien conservés dans leur organisation. Ils sont caractérisés par leur structure comprenant au moins quatre domaines : deux domaines hydrophobes formant

un canal de translocation et deux domaines hydrophiles impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP, source d'énergie du transport.

Ces transporteurs peuvent importer ou exporter une variabilité considérable de substrats allant des ions aux macromolécules (Tableau 1). De par la grande variété de molécules prises en charge, les systèmes ABC peuvent exercer de nombreuses fonctions physiologiques chez les eucaryotes et les procaryotes, les plaçant au cœur d'enjeux médicaux et économiques importants. Ils permettent notamment le transport de nutriments, la transduction de signaux, l'export de facteurs de virulence et sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques de nombreux agents pathogènes. Chez les humains, des mutations dans certains de ces systèmes peuvent notamment être à l'origine de nombreuses maladies génétiques graves (mucoviscidose, hypoglycémie hyperinsulinique persistante …). Une dérégulation de l'expression de plusieurs ABC-transporteurs est également responsable de la résistance de cellules cancéreuses aux drogues cytotoxiques (Mourez *et al.* 2000) (Tableau 1).

On distingue parmi les ABC transporteurs deux grandes classes : d'une part les systèmes dédiés à l'export que l'on retrouve chez les procaryotes et les eucaryotes et d'autre part les systèmes dédiés à l'import, présents uniquement chez les procaryotes. Ces derniers possèdent une protéine de fixation spécifique qui est responsable de la capture du substrat. Chez les bactéries à Gram négatif, elle est secrétée dans le périplasme (Neu et Heppel, 1965) alors que chez les bactéries à Gram positif et les Archae, elle est transloquée vers la face externe de la cellule par la voie générale de sécrétion Sec, son peptide signal est clivé, pour être ensuite ancrée à la face externe de la membrane. Cet ancrage est permis soit par la présence d'une extension N-terminale lipidique hydrophobe (Gilson *et al.* 1988 ; Sutcliffe et Russel 1995) soit par un fragment transmembranaire N-terminal chez les Archae uniquement (Fig.4). Dans ces différentes configurations, la protéine de fixation peut avoir une mobilité relative, qui est cependant limitée par la consistance gélifiée du périplasme chez les bactéries à Gram négatif, et par l'association avec la membrane cytoplasmique chez les bactéries à Gram positif. Enfin, elle peut être fusionnée à l'extrémité N- ou C- terminale des protéines transmembranaires du système. Ce dernier cas reste cependant exceptionnel et n'a été décrit que pour des transporteurs de glycine / bétaine ou de glutamate / glutamine (van der Heide et Poolman 2002).

Nom et sens du transport	Organisme	Substrat	Implications	Référence
$MalFGK_2E$ Import	*E. coli*	Maltose	Nutrition	Boos et Shuman 1998
SitABCD Import	*S. thyphimurium*	Fer	Nutrition durant l'infection	Janakiraman et Slauch 2000
Opp Import	*B. cereus*	Peptides	Communication et induction de la virulence	Gominet *et al.* 2001
CFTR Efflux	Humain	Ion chlorure	Mucoviscidose si mutation dans ce transporteur	Riordan *et al.* 1989
P-glycoprotéine Efflux	Humain	Composés hydrophobes	Rejet de drogues anticancéreuses	Schinkel 1997
HlyB Efflux	*S. aureus*	Haemolysine A	Virulence	Holland *et al.* 1990
MsrA Efflux	*S. aureus*	Lactones	Résistance à l'erythromycine	Reynolds *et al.* 2003

Tableau 1 : Exemples de la diversité de substrats pris en charge et de fonctions exercées par des ABC-transporteurs

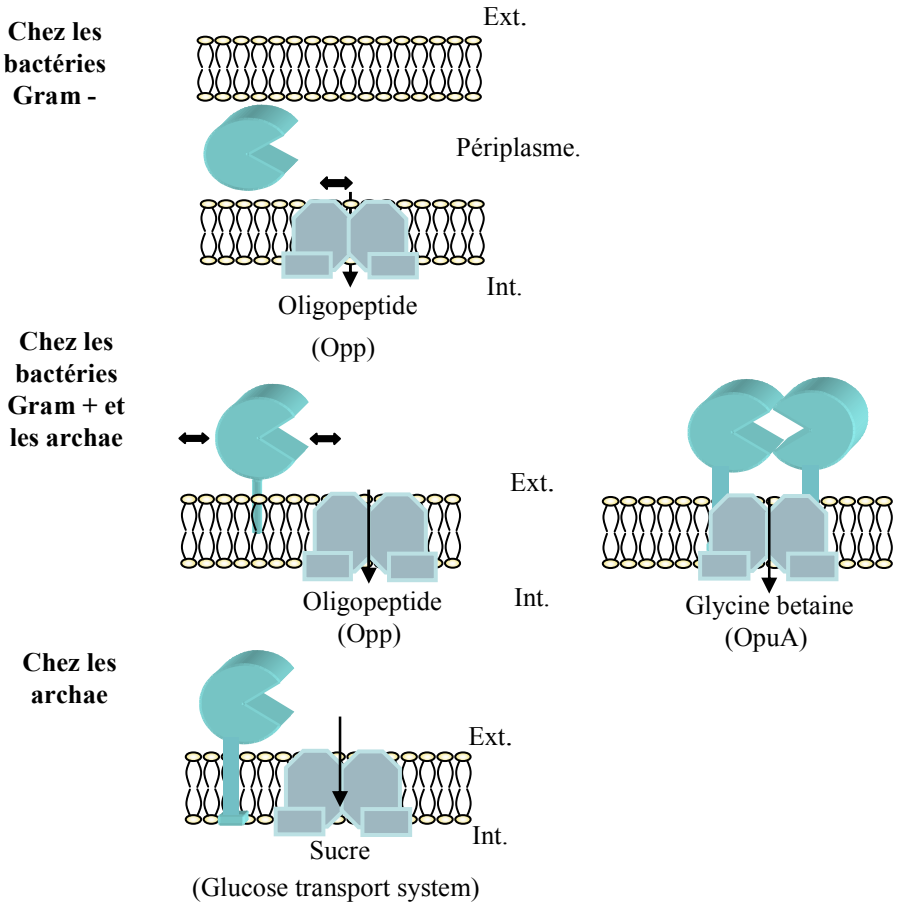


Fig.4 : Les différentes organisations de la protéine de fixation du substrat

d'après Detmers *et al.* 2001

On peut également noter l'existence d'une troisième classe au sein des systèmes ABC, regroupant des systèmes encore mal caractérisés qui ne seraient pas liés au transport mais à des processus cellulaires tels que la réparation de l'ADN ou la régulation de certains gènes (Bouige *et al.* 2002).

Dans la partie qui suit nous nous intéresserons à un groupe très particulier au sein de la famille des ABC-transporteurs, les systèmes d'import de peptides bactériens. Ces systèmes généralement appelés Opp pour Oligo-Peptide-Perméase importent les peptides du milieu extérieur vers l'intérieur de la cellule avec une grande affinité. Nous développerons la structure et le mécanisme de transport des Opp, dont l'organisation présente les caractéristiques générales des transporteurs de type ABC : ce sont en effet des systèmes à plusieurs composantes constitués en général de deux domaines transmembranaires (OppB et OppC) formant un canal au travers de la membrane cytoplasmique, de deux domaines impliqués dans l'hydrolyse de l'ATP (OppD et OppF) source d'énergie du transport et d'une (ou plusieurs) protéine(s) de fixation (OppA) qui va (vont) capturer le substrat.

2) Structure des protéines du système Opp

a. La protéine de liaison au substrat OppA

Au sein de toutes les protéines de fixation bactériennes, les protéines OppA appartiennent au groupe des protéines de fixation des peptides et du nickel. Cette classification a été obtenue en effectuant l'alignement de plus de 50 protéines de fixation bactériennes transportant divers substrats, qui a permis de mettre en évidence l'existence de 8 groupes distincts (Tam et Saier 1993). Les protéines de fixation des peptides et du nickel partagent une séquence conservée (LIVM)AX_2(WI)X_{1ou2}(SN)(KE)DX_4T(FY)X(LIV)RX_3K, permettant de les différencier des autres, cependant aucun élément dans leur séquence ne permet de les distinguer entre elles .

La structure des protéines de fixation des peptides a été révélée par deux études cristallographiques, tout d'abord sur la protéine OppA de *Salmonella thyphimurium* ($OppA_{st}$), bactérie à Gram négatif (Tame *et al.* 1994 et 1995*)*, et ensuite sur la protéine AppA de *Bacillus subtilis* ($AppA_{bs}$) (Levdikov *et al.* 2005), bactérie à Gram positif, dont on a montré expérimentalement qu'elles transportent des peptides (Goodell et Higgins 1987 ; Koide et

Hoch 1994). Les protéines $OppA_{st}$ et $AppA_{bs}$ ont une structure proche, elles sont constituées de deux domaines principaux (domaine I et domaine III) reliés entre eux par deux segments, formant ainsi des lobes flexibles qui peuvent s'ouvrir et se fermer et qui vont englober le peptide à transporter (Fig.5). Elles possèdent également un domaine supplémentaire (domaine II) dont la fonction est inconnue. La présence de ce dernier domaine est atypique au sein de la famille des ABC transporteurs puisqu'on ne le retrouve que chez les protéines de fixation de peptides et les protéines de fixation du nickel. Il est notamment responsable de la taille plus imposante de ces dernières par rapport aux autres protéines de fixation (Levdikov *et al.* 2005).

Les protéines OppA de *S. thyphimurium* et AppA de *B. subtilis* ont été cristallisées respectivement en complexe avec un tri- ou tetrapeptide et un nonapeptide ce qui a permis de mettre en évidence les interactions entre ces protéines et leur substrat. Ainsi, dans les deux modèles, le peptide est complètement englobé dans la large poche aqueuse formée par les deux lobes selon un mécanisme de type « Venus's-flytrap » (Sack *et al.* 1989) (Fig.5). Cependant, ce modèle n'est pas général. Ainsi, l'étude de Detmers et collaborateurs en 1998 montre que la protéine OppA de *Lactococcus lactis* peut fixer des peptides allant jusqu'à 35 résidus, et il est peu vraisemblable que de tels peptides puissent être totalement englobés au sein d'OppA étant donné leur taille. En effet, il a été montré en utilisant des peptides fluorescents que seuls les 6 premiers acides aminés sont enfouis dans la protéine de fixation alors que les résidus restants interagissent avec sa surface externe, stabilisant ainsi le complexe formé (Lanfermeijer *et al.* 2000).

Les études cristallographiques révèlent également que, au sein de la cavité formée par OppA, le peptide est lié à la protéine *via* des molécules d'eau ou *via* certains résidus d'acides aminés qui la tapissent, par des liaisons hydrogènes ou ioniques. Les acides aminés impliqués dans le mécanisme de fixation au substrat ont été identifiés dans les deux cas. Pour $OppA_{st}$ trois résidus jouent un rôle particulièrement important : l'Asp 445 qui se lie à l'extrémité N-terminale du peptide, et l'Arg 439 et l'His 397 qui se lient respectivement aux groupements carboxyles du tri- et du tetrapeptide (Tames *et al* 1994 et 1995*)*. Pour $AppA_{bs}$ liée à un nonapeptide les résidus impliqués sont, entre autres, l'Asp177 liée à l'extrémité N-terminale du peptide et la Tyr 510 qui se lie à son extrémité C-terminale (Levdikov *et al.* 2005). Cependant si l'on compare les séquences de diverses protéines de fixation bactériennes dont il a été montré expérimentalement qu'elles pouvaient transporter des peptides, on peut remarquer que, même s'il existe des zones bien conservées entre les protéines, les résidus

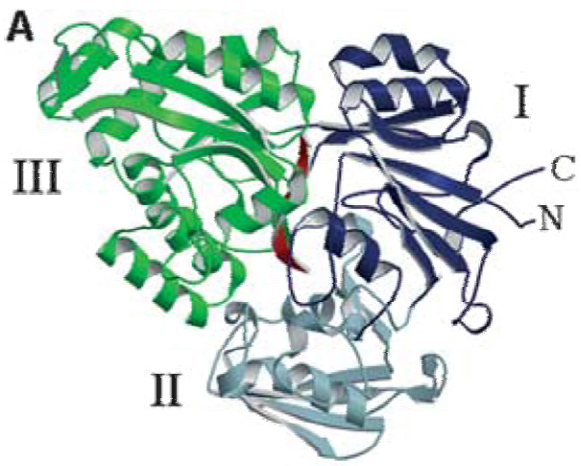


Fig. 5: Structure d'AppA liée à un peptide: en bleu foncé et en vert les domaines I et III formant les lobes flexibles, en bleu clair le domaine I et en rouge le peptide.

d'après Levdikov *et al.* 2005

impliqués dans la fixation des peptides et mis en évidence dans les deux expériences ne sont pas conservés (Fig.6). Seule l'Asp 445 est conservée chez 7 protéines de fixation sur 9, mais on ne la retrouve ni chez OppA de *L. lactis*, ni chez AppA de *B. subtilis.* Les règles de fixation des peptides issues de ces études ne sont donc pas généralisables à l'ensemble des protéines de fixation OppA. Ainsi à l'heure actuelle, il n'est pas possible, par simple analyse de séquence, de déterminer la nature du substrat d'une protéine de fixation.

Enfin, il est vraisemblable de penser que les protéines de fixation OppA possèdent à leur surface, des sites d'interaction avec les domaines transmembranaires OppB et OppC. Ceci a en effet été montré concernant l'ABC-transporteur d'histidine de *S. thyphimurium*. Cette perméase est constituée d'une protéine de fixation HisJ formée de deux lobes flexibles, équivalents aux domaines I et III des systèmes Opp, de deux protéines transmembranaires HisQ, HisM et de deux copies de la protéine ATPasique HisP. Dans ce système, la protéine His J interagit avec le complexe transmembranaire (Prossnitz *et al.* 1988) et cette interaction, indispensable au transport, implique des résidus n'intervenant pas dans la fixation du substrat, situés à la surface de chacun des deux lobes d'HisJ (Liu *et al.* 1999). Ces études n'ayant cependant jamais été réalisées sur un système Opp, aucun site d'interaction potentiel n'a été jusqu'alors identifié sur les protéines OppA. On pourrait également imaginer que les résidus permettant l'interaction protéine de fixation / protéines transmembranaire soient propres à chaque ABC-transporteur, ce qui permettrait à une protéine de liaison de reconnaître spécifiquement « son » translocon et impliquerait de ce fait l'absence de séquence consensus caractérisant ce site de liaison.

b. Les protéines transmembranaires OppB et OppC

Le domaine transmembranaire formant le canal de translocation des systèmes Opp au travers duquel le peptide va pouvoir traverser la membrane cytoplasmique, est formé de deux protéines hydrophobes OppB et OppC. Elles sont constituées d'un ensemble d'hélices α qui traversent la membrane cytoplasmique à plusieurs reprises. De manière générale, on trouve 6 hélices α par protéine, c'est-à-dire 12 hélices par transporteur (Fig.7) mais leur nombre peut varier de 5 à 11 hélices par protéine selon le système ABC considéré (Biemans-Oldehinkel *et al.* 2006). Les domaines transmembranaires possèdent également plusieurs boucles extracellulaires ou cytoplasmiques (Fig.8). Parmi les boucles cytoplasmiques, une, située généralement entre l'hélice 5 et 6, contient un segment hydrophile conservé, le motif EAA,

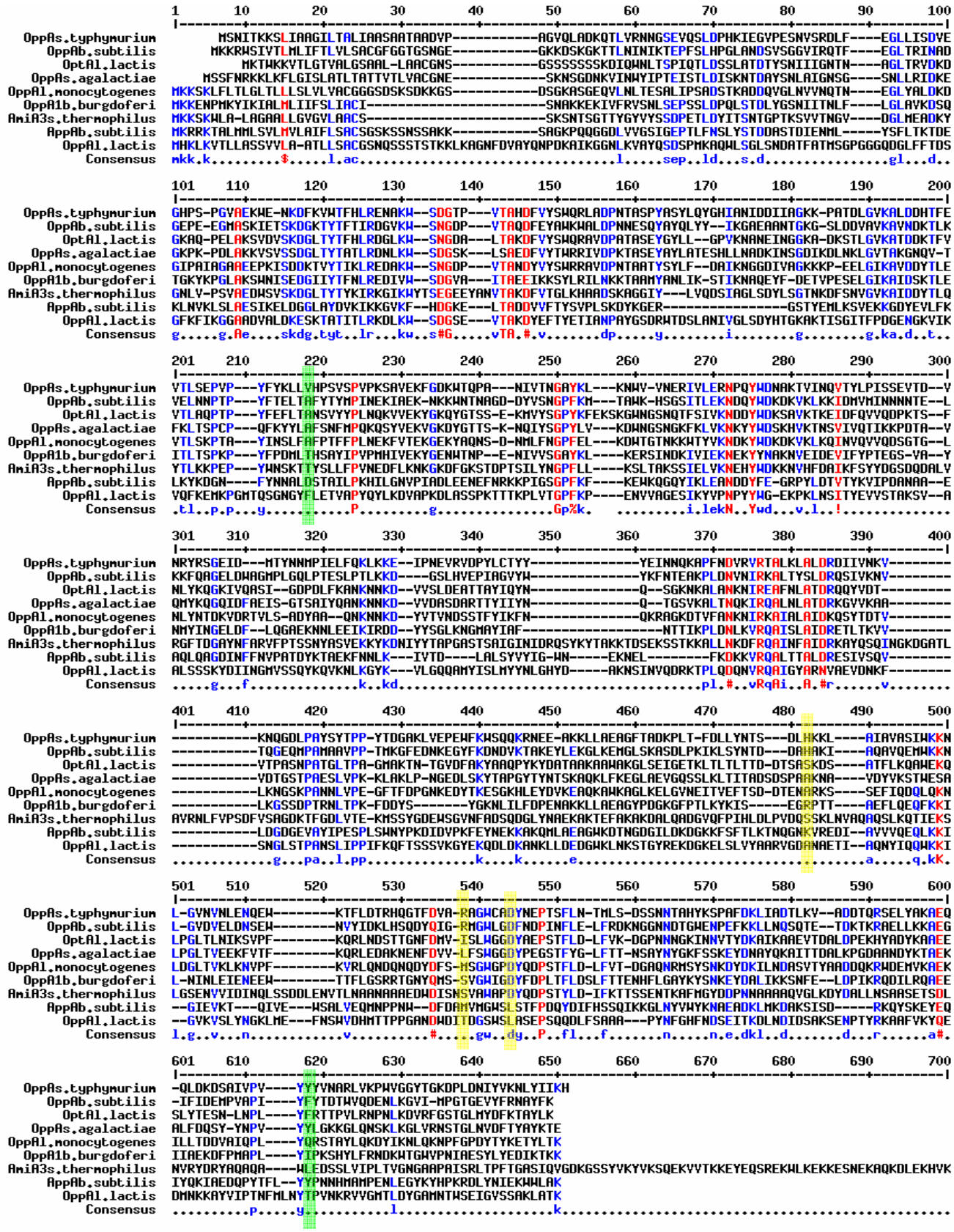


Fig. 6 : Alignement des séquences de protéines de fixation de divers systèmes Opp.
Les résidus surlignés en jaune et vert sont respectivement impliqués dans l'interaction avec le peptide chez *S. thyphimurium* ou chez *B. subtilis.*

Programme Multialin http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html

également appelé L-loop. Ce motif est caractéristique des systèmes d'import et est absent des ABC transporteurs dédiés à l'efflux (Saurin *et al.* 1994). Le rôle de ces résidus spécifiques n'est toutefois pas connu.

Les protéines du translocon ne forment pas seulement un passage au travers de la membrane, ce sont également des protéines « relais » entre les différents constituants du système puisqu'elles constituent d'une part, un site d'amarrage spécifique pour la protéine de fixation et permettent d'autre part, de conduire un signal d'induction aux protéines ATPasiques. Ces caractéristiques ont été étudiées essentiellement chez la perméase à histidine de *S. thyphimurium* à partir de transporteurs complets purifiés et reconstitués dans des protéoliposomes. Des mesures d'hydrolyse de l'ATP ont montré que la protéine de fixation du substrat HisJ interagit avec les protéines transmembranaires HisQM qui transmettent alors le signal aux protéines ATPasique HisP (Liu *et al.* 1999). La transduction de ce signal est indispensable à l'induction de la fixation puis de l'hydrolyse de l'ATP. La région des protéines transmembranaires impliquée dans l'interaction avec la protéine de fixation du substrat n'a pas été déterminée mais les études suggèrent que ces dernières pourraient « sentir » la distance ou l'angle de rotation entre les deux lobes de la protéine de fixation. Cette distance étant une conséquence directe de la nature du substrat fixé, cela permettrait d'y adapter le message envoyé aux protéines ATPasiques (Liu *et al.* 1999). Il faut cependant noter, une fois encore, que ces études n'ont pas été effectuées sur les transporteurs Opp et que l'on ne peut donc pas assurer, même si tous les ABC transporteurs ont des structures relativement bien conservées, que les résultats mis en évidence concernant le transport de l'histidine sont transposables à celui des peptides.

c. Les protéines ATPasiques OppD et OppF

Les protéines ATPasiques OppD et OppF, appartenant à la large famille des protéines « ATP-Binding Cassettes », vont fournir l'énergie nécessaire au transport en couplant le passage des peptides à la fixation puis l'hydrolyse de l'ATP. Elles sont liées de façon permanente aux protéines transmembranaires sous forme de dimère. De nombreuses études cristallographiques sur des ATPases purifiées de divers ABC-transporteurs ont permis de connaître précisément leur structure. Une protéine ATPasique d'ABC-transporteur est formée de deux domaines : un domaine RecA-like et un domaine hélical, ce dernier étant spécifique des ABC-transporteurs, reliés entre eux par une boucle flexible (Q-Loop) (Fig.8a). Au sein du

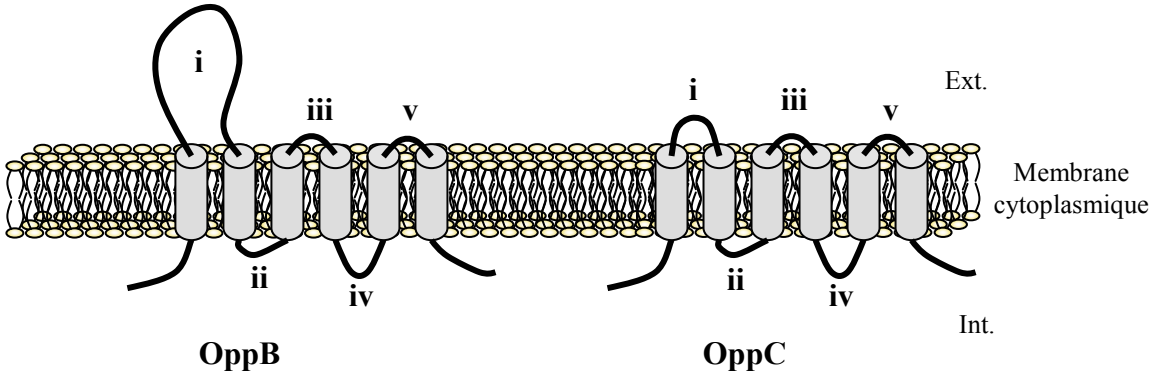


Fig.7: Structure des protéines membranaires d'un ABC transporteur.
Chaque protéine est constituée de 6 segments hydrophobes traversant la membrane, de boucles extracellulaires (i, iii,v) et cytoplasmiques (ii,iv).
L'association des deux protéines constitue le canal de translocation

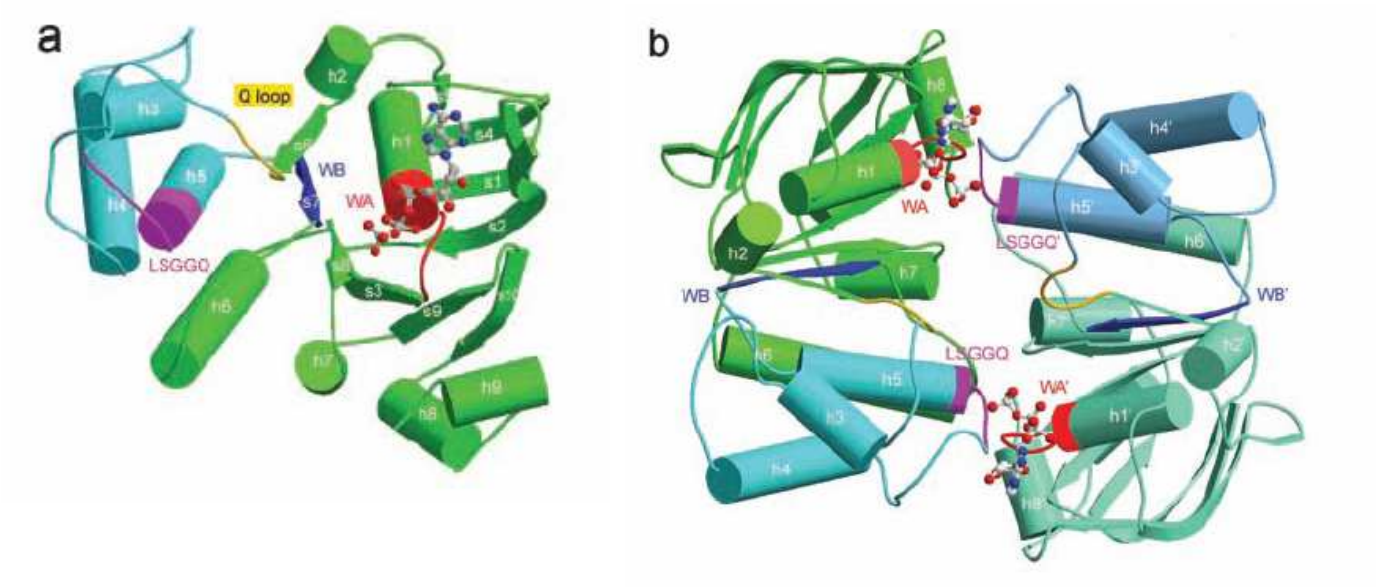


Fig.8 : Structure des protéines ATPasique de l'ABC transporteur de maltose MalK
a. Représentation d'un monomère lié à un ATP.
b. Représentation de l'association des protéines en dimère, liées l'une à l'autre par l'ATP qu'elles ont fixé
Le domaine RecA-like est représenté en vert, le domaine helicoidal en bleu et la boucle reliant les deux (Q loop) en jaune . Les motifs conservés Walker A (WA), Walker B (WB) et LSGGQ (L loop) sont indiqués. L'ATP est representé par des atomes bleus (N) et rouges (O)

Davidson et Chen, 2004

domaine RecA-like, se trouvent deux domaines conservés, le motif Walker A, aussi appelé P-loop et le motif Walker B qui participent à la fixation de l'ATP. Un troisième domaine, également impliqué dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP, le motif LSGGQ, représente la signature caractéristique des ATPases des ABC-transporteurs. Ces trois domaines conservés sont essentiels à l'activité de la perméase puisque des mutations ponctuelles dans ces motifs altèrent ou inhibent le transport (Hung *et al.* 1998 ; Schmees *et al.*1999).

Des études biochimiques sur l'ABC transporteur de maltose d'*Escherichia coli* suggèrent qu'un motif LSGGQ d'une protéine ATPasique se lie avec l'ATP fixé par l'autre protéine du système (Fig.8b) et donc que, pour être physiologiquement actives, les ATPases doivent agir de manière coopérative sous forme de dimère. Le site catalytique est alors formé par deux ATP « pris en sandwich » entre les deux ATPases (Davidson et Chen 2004). Ce modèle implique que, pour être fonctionnel, un ABC-transporteur doit posséder deux ATPases, ce qui est le cas de la grande majorité de ces systèmes. Cependant il existe au moins une exception, concernant le système Opp de *Mycobacterium bovis* qui, bien que fonctionnel (Green *et al.* 2000) ne possède qu'une ATPase, ce qui pose la question de la transposition du modèle à tous les ABC-transporteurs.

Enfin, le nombre supposé d'ATP hydrolysé par transport varie selon les études considérées et demeure sujet à débat. Pour les transporteurs de peptides en particulier, aucune étude sur le nombre d'ATP hydrolysé pour le transport d'un peptide n'a été effectuée. On peut supposer de plus, que l'énergie nécessaire pour le transport soit variable selon le peptide considéré (taille, hydrophobicité…).

3) Le mécanisme de transport

L'ensemble des données réunies par les nombreuses études structurales et fonctionnelles de différents ABC-transporteurs dédiés à l'import a permis de proposer un mécanisme de transport commun en plusieurs étapes (Fig.9):

(i) Capture du substrat par la protéine de fixation.

Il a été montré pour le système Opp de *L. lactis* que l'affinité du translocon pour la forme d'OppA liée au substrat est bien plus importante que pour la forme non liée (Doeven *et al*. 2004), même si ce n'est pas le cas chez tous les ABC-transporteurs. La fixation d'un peptide induit donc des changements conformationnels de la protéine OppA, qui favoriseraient son interaction avec les protéines transmembranaires.

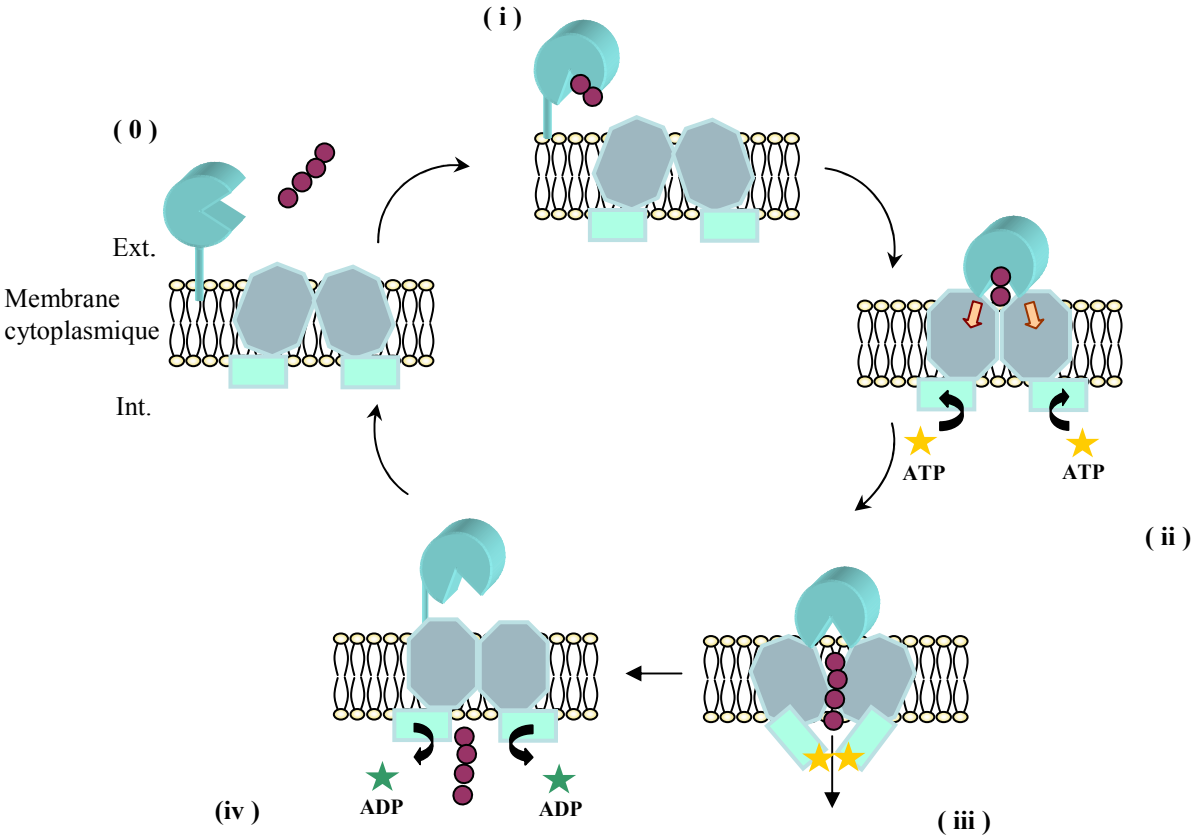


Fig.9: Modèle de transport d'un substrat par un ABC transporteur

(i) Capture du substrat et changement de conformation de la protéine de fixation

(ii) Interaction entre la protéine de fixation et les protéines transmembranaires et transmission d'un signal des protéines transmembranaires vers les protéines ATPasiques qui vont fixer l'ATP de manière coopérative.

(iii) Changement de conformation des protéines transmembranaires et libération du substrat dans le translocon

(iv) L'hydrolyse et la libération de l'ATP induit le retour du translocon à sa conformation initiale. Le substrat est transloqué vers le cytoplasme et la protéine de fixation libérée du complexe transmembranaire

(ii) Interaction entre la protéine de fixation et les protéines transmembranaires et transmission d'un signal aux ATPases qui vont fixer l'ATP de manière coopérative. Il a été proposé par Austermuhle et ses collaborateurs en 2004, à partir d'études sur le transporteur de maltose d'*E. coli*, que l'association protéine de fixation / protéines transmembranaires serait à ce stade particulièrement instable et que le passage à l'étape suivante permettrait d'atteindre un état de transition beaucoup plus favorable.

(iii) La fixation de l'ATP entraîne un changement conformationnel du dimère ATPases/ protéines transmembranaires qui vont alors s'ouvrir vers le milieu extracellulaire. Pour atteindre un état de transition stable avec les protéines transmembranaires dans leur nouvelle conformation, la protéine de fixation perd sa forte affinité pour le substrat. Celui-ci est alors libéré dans le translocon auquel il serait lié par un domaine spécifique. Si les deux étapes précédentes sont réversibles, à partir de ce moment le peptide ne pourra pas retourner dans le milieu extracellulaire.

(iv) L'hydrolyse de l'ATP dissocie le dimère formé par les ATPases ce qui induit le retour du translocon à sa conformation initiale. Le substrat est alors transloqué vers le cytoplasme et la protéine de fixation libérée du complexe transmembranaire.

D'autres modèles ont été également proposés. Par exemple, celui tiré de l'étude du transporteur de la vitamine B_{12} de *E. coli* (Locher *et al.* 2002) suggère que la fixation de l'ATP induise non pas l'ouverture des protéines transmembranaires vers le milieu extracellulaire mais plutôt sa fermeture vers le cytoplasme (Fig.10). Aucune donnée ne permet à ce jour d'exclure l'un ou l'autre des modèles. On peut également imaginer que le mécanisme de translocation puisse être différent selon les transporteurs ABC considérés, même si la bonne conservation de séquence et de structure au sein de cette famille tend à privilégier l'hypothèse d'un mécanisme commun.

Quoi qu'il en soit, plusieurs étapes du mécanisme de transport sont encore mal connues et plusieurs questions restent posées : Comment la protéine de fixation et les protéines transmembranaires interagissent-elles ? Quelle est la nature de leur liaison ? Quel signal est envoyé par les protéines transmembranaires pour induire la fixation de l'ATP ? S'il l'est, comment le substrat est-il lié aux protéines du translocon ? Combien de molécules d'ATP sont hydrolysées par substrat transporté ? Enfin on peut se demander s'il existe une unique réponse à chacune de ces questions pour l'ensemble des ABC-transporteurs.

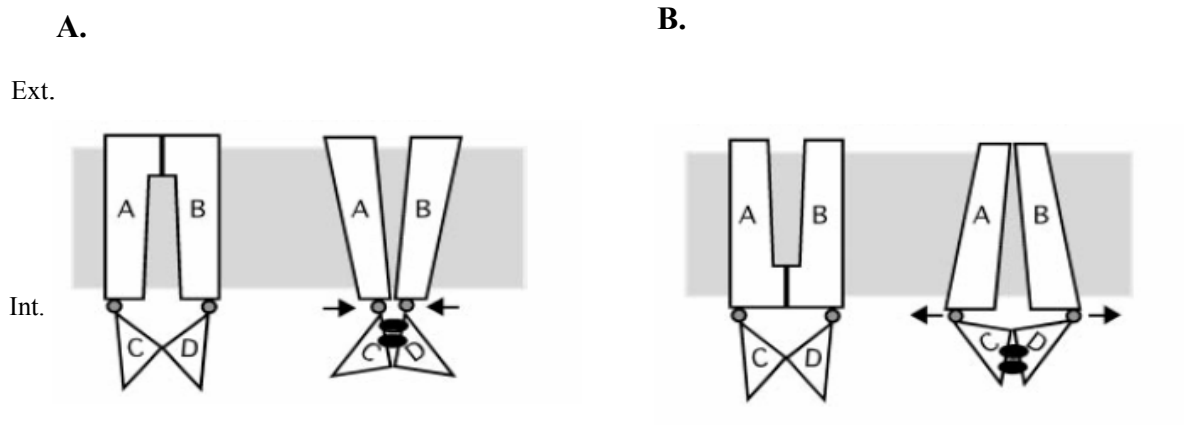


Fig.10 : A: Modèle issu de l'étude du transporteur de maltose de *E. coli*
La fixation de l'ATP induit l'ouverture du canal transmembranaire vers le milieu extérieur
B: Modèle issu de l'étude du transporteur de la vitamine B12 de *E. coli.*
La fixation de l'ATP induit la fermeture du canal vers le milieu extérieur.
Les protéines notées A et B correspondent au domaine transmembranaire et les protéines C et D aux ATPases. Les molécules d'ATP sont représentées par les ronds noirs.

Davidson et Chen 2004

4) La spécificité de substrat des ABC transporteurs de peptides

De nombreuses études ont été effectuées sur les transporteurs de peptides de différentes bactéries afin de déterminer la nature des peptides pris en charge par un système donné. Dans la majorité des cas, ces études sont basées sur la capacité de la bactérie à croître dans un milieu dont un acide aminé essentiel n'est apporté que sous forme de peptide. Ainsi, si par exemple, une souche sauvage X croit dans un milieu contenant un peptide donné alors que son mutant *opp*- est incapable de s'y développer, on peut en déduire que le transporteur est responsable de l'import de ce peptide ce qui permet ainsi de déterminer sa spécificité de substrat. Une première limite de cette approche est qu'elle n'est par nature, qu'applicable aux transporteurs exerçant une fonction nutritionnelle. Or d'autres fonctions peuvent être assurées par ces systèmes (cf chapitre II), et dans ce cas, les peptides transportés ne seront pas identifiés. Ces études ont néanmoins conduit à classer les ABC transporteurs de peptides en deux sous-groupes selon la taille des peptides qu'ils transportent :

- Les transporteurs qui prennent en charge uniquement les peptides très courts, di- et tripeptides, qui sont généralement appelés Dpp (Di-Peptide Perméase). Ces systèmes ont été caractérisés expérimentalement chez plusieurs bactéries (Tableau 2).
- Les transporteurs qui prennent en charge les oligopeptides, de taille supérieure ou égale à 4 résidus d'acides aminés et qui dans ce cas sont le plus souvent appelés Opp (Oligo-Peptide Permease). Au sein des Opp, on retrouve à nouveau deux types de transporteurs, ceux qui ont une spécificité assez restreinte, c'est-à-dire qu'ils transportent des peptides allant de 5 à 9 acides aminés et ceux qui peuvent transporter des peptides beaucoup plus grands, allant jusqu'à 35 résidus (Tableau 2). Il est à noter toutefois qu'aucun essai de croissance n'a été effectué avec des peptides de plus de 5 et 6 acides aminé respectivement chez *E. coli* et *S. agalactiae* et que dans la plupart de ces études, le nombre de peptides testés reste très limité. On ne peut exclure de plus que, dans le cas où une souche ne peut se développer avec un peptide donné, celui-ci soit transporté mais trop peu efficacement pour permettre la croissance. Une autre précision importante est que l'on ne peut pas tester tous les peptides possibles, et qu'il est donc difficile de donner une limite supérieure ou inférieure absolue quant à la taille des peptides transportés. La spécificité de substrat annoncée reste donc dans les limites de la condition de croissance testée et des peptides utilisés.

En dehors de la taille, d'autres paramètres concernant le peptide sont à prendre en compte concernant la spécificité de substrat d'un transporteur, notamment sa charge globale.

Organisme	Nom	Spécificité	Référence
Streptococcus agalactiae	Dpp	Dipeptides	Samen *et al*. 2004
Streptococcus pyogenes	Dpp	Dipeptide	Podbielski et Leonard 1998
E. coli	Dpp	Di-, tripeptides	Abouhamad et Manson 1994
Bacillus subtilis	DciA	Dipeptides	Mathiopoulos *et al*. 1991
L. lactis	Dpp / DtpP / Opt(S)	Dipeptides	Lamarque *et al.* soumis
Streptococcus pneumoniae	Ami	2-7*	Alloing *et al*. 1994
Streptococcus agalactiae	Opp	2-6*	Samen *et al*. 2004
Listeria monocytogenes	Opp	3-8	Verheul *et al*. 1998; Borezée *et al*. 2000
E. coli	Opp	2-5*	Alves et Payne 1980
Streptococcus gordonii	Hpp	5-7	Jenkinson *et al.* 1996
L. lactis	Opt(A)	3-6	Lamarque *et al.* soumis
B. subtilis	Opp	3-5*	Koide et Hoch 1994; Picon et van Wely 2001
B. subtilis	App	4-9*	Koide et Hoch 1994; Levdikov *et al*. 2005
Streptococcus thermophilus	Ami	3-23	Garault *et al.* 2002
L. lactis	Opp	4-35	Doeven *et al*. 2004

Tableau 2: La spécificité de substrat des ABC-transporteurs bactériens, quelques exemples. Les étoiles indiquent qu'aucun ou très peu de peptides de taille supérieure à la limite annoncée n'ont été testés dans l'étude correspondante.

De tels critères n'ont été étudiés que chez *L. lactis*, pour laquelle il a été montré que le système Opp transportait préférentiellement des peptides basiques hydrophobes de taille moléculaire comprise entre 600 et 1100 Da (Juillard *et al.* 1998).

Les transporteurs de peptides présentent donc des spécificités de substrat pouvant être très différentes. D'une manière générale il est considéré que la spécificité de substrat d'un transporteur est déterminée exclusivement par celle de la protéine de fixation. Se pose alors la question de savoir pourquoi des protéines de fixation, ayant des structures bien conservées ne prennent pas en charge les mêmes peptides. Deux hypothèses sont envisageables : les différences de spécificité de substrat sont liées aux différences de séquence des protéines de fixation et / ou elles peuvent être dues à des différences d'affinité au niveau de la liaison éventuelle au translocon. Cependant on peut dire que les mécanismes et les déterminants de la spécificité de substrat d'un transporteur d'oligopeptides sont encore mal connus. Sans donnée expérimentale il n'est donc à ce jour pas possible de discriminer avec certitude entre un système Dpp et un système Opp (ni même de savoir si le transporteur prend en charge des peptides ou du nickel).

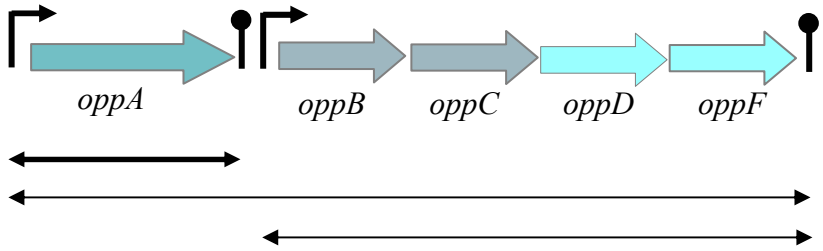
5) Les systèmes Opp : une organisation génétique variable

Le système Opp bactérien « modèle » est constitué des cinq protéines décrites précédemment, dont les gènes sont codés en opéron dans l'ordre *oppABCDF*. On peut observer cependant de nombreuses particularités dans l'organisation génétique de ces systèmes selon les bactéries considérées. Par exemple, l'ordre des gènes de l'opéron peut varier et/ou les gènes codant pour le système Opp peuvent être co-transcrits avec d'autres gènes. Ainsi, le système *opp* de *L. lactis* est dans l'ordre *oppDFBCA* et est transcrit en opéron avec le gène *pepO*, codant une endopeptidase (Fig. 11). Dans le paragraphe qui suit, nous verrons l'organisation génétique de différents opérons *opp* du monde bactérien.

a. *oppA* : un gène transcrit en large excès

Chez de nombreuses bactéries, même si un transcrit de l'opéron *opp* entier est détecté, un transcrit du gène *oppA* seul est également produit. Dans le cas par exemple de *Listeria monocytogenes*, la présence d'un terminateur juste après le gène *oppA*, premier gène de

Listeria monocytogenes



Lactococcus lactis

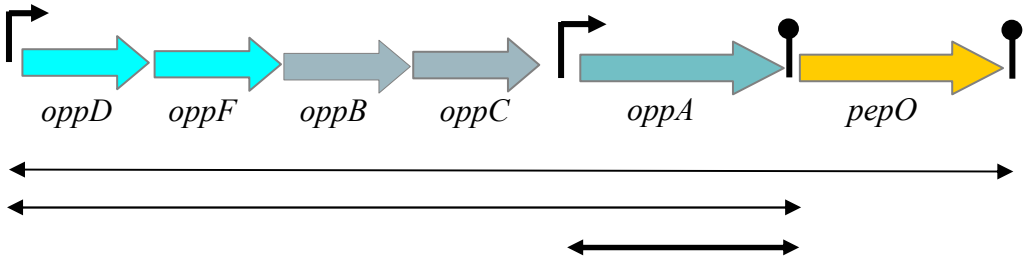


Fig.11 : Organisation génétique des systèmes Opp de *L. lactis* et *L. monocytogenes:* une transcription d'*oppA* indépendante .
Les doubles flèches représentent les différents transcrits ayant été obtenus expérimentalement, celles en gras indiquent une plus forte transcription du gène souligné dans les différentes conditions testées.

d'après Borézee *et al.* 2000 et Guedon *et al.* 2001a

l'opéron *oppABCDF*, explique une transcription très majoritaire de la protéine de fixation seule par rapport à celle de l'opéron entier lors de la croissance en milieu riche (Borezee *et al.* 2000) (Fig. 11). Chez *L. lactis* entre autres, le gène codant la protéine de fixation se trouve à la fin de l'opéron et possède son propre promoteur, ce qui conduit là aussi à une plus forte transcription d'*oppA* par rapport au reste de l'opéron dans les conditions testées (Tynkkynen *et al.* 1993 ; Guédon *et al.* 2001a) (Fig.11).

On peut supposer que l'abondance relative de protéines de fixation par rapport au reste du translocon vise à améliorer le transport d'une part en augmentant la probabilité de fixer un substrat et d'autre part en augmentant l'efficacité du transporteur puisque lorsqu'une (ou plusieurs) protéine(s) de fixation est engagée avec le translocon, les autres continuent à fixer leur substrat. Cette seconde hypothèse repose cependant sur le fait que l'étape de fixation serait limitante dans le processus de transport. Or Picon et ses collaborateurs ont montré en 2000 chez *L. lactis* qu'en augmentant de huit fois l'expression d'OppA, la capacité à lier un peptide était très augmentée mais que le transport global du peptide n'était que modérément amélioré (environ 40%). L'excès de protéines de fixation ne permettrait donc d'améliorer le transport que jusqu'à un seuil, atteint rapidement, et à partir duquel on arrive à la saturation du translocon.

b. Plusieurs protéines de fixation et plusieurs transporteurs

Si pour tous les systèmes Opp bactériens caractérisés on trouve un gène codant une protéine de fixation en opéron avec les autres gènes du système, il est fréquent de trouver également dans le génome une ou plusieurs copies indépendantes de gène *oppA* supplémentaire fonctionnant avec le même transporteur. Les analyses d'expression et de la spécificité de substrat des différentes copies d'OppA chez plusieurs bactéries ont permis de mieux appréhender les raisons d'une telle multiplicité.

Un des cas les plus extrêmes en terme de nombre de protéines de fixation de peptides se trouve chez la bactérie *Borrelia burgdoferi*, bactérie pathogène à Gram négatif transmise à l'homme par l'intermédiaire de tiques vectrices et responsable de la maladie de Lyme. Elle possède en effet, trois gènes *oppA* en opéron et deux gènes *oppA* indépendants portés sur un plasmide (Bono *et al.* 1998) (Fig. 12). Les cinq protéines de fixation codées par ces gènes sont fonctionnelles, présentent des pourcentages d'identité protéique élevés variant de 44 à 64% (Tableau 3) et ont des spécificités de substrat en partie recouvrantes mais avec des

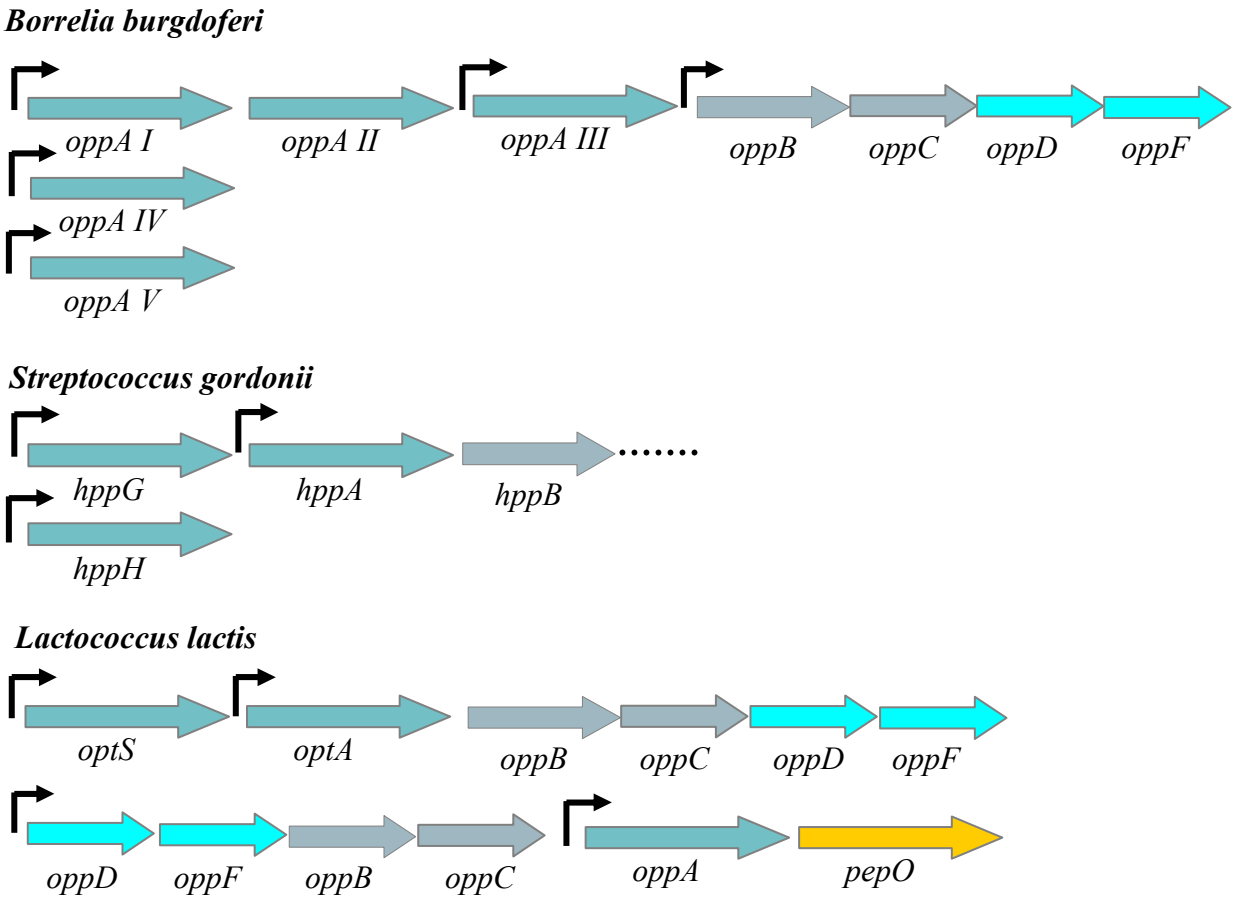


Fig.12 : Plusieurs protéines de fixation pour un même transporteur, quelques exemples.
Les flèches indiquent la présence d'un promoteur.

d'après Monnet 2003

Borrelia burgdoferi

	OppAI	OppAII	OppAIII	OppAIV	OppAV
OppAI	100				
OppAII	56	100			
OppAIII	52	60	100		
OppAIV	54	64	59	100	
OppAV	44	51	50	52	100

Streptococcus gordonii

	HppA
HppG	68
HppH	65

Lactococcus lactis

	OppA	OptA	OpptS
OppA	100		
OptA	34	100	
OptS	37	52.5	100

Tableau 3 : Pourcentages d'identité protéique entre les différentes copies d'OppA d'une même espèce bactérienne

d'après Bono *et al.* 1998; Monnet 2003; Lamarque *et al.* 2004

préférences distinctes (Lin *et al.* 2001 ; Wang *et al.* 2002). Une étude de l'expression de ces cinq OppA a permis de montrer qu'elles sont transcrites sous l'action de leur promoteur propre et qu'elles répondent différemment selon les conditions environnementales (Wang *et al.* 2002). Ainsi, l'expression des gènes *oppAI* et *oppAIV* est induite par des concentrations croissantes en ammonium, alors que des changements de température affectent plus particulièrement l'expression d'*oppAV*. De même, l'expression des 5 protéines de fixation est régulée différemment selon l'hôte considéré c'est-à-dire souris et tiques nourris ou non. Deux régulateurs transcriptionnels ont été identifiés (un homologue du régulateur BosR/Fur et EbcF) contrôlant respectivement l'expression d'*oppAIV* et *oppAV* mais pas des autres protéines de fixation. Cela confirme que les gènes codant ces protéines sont régulés indépendamment (Medrano *et al.* 2007). L'ensemble de ces résultats permet donc de mettre en évidence des régulations différentes des 5 copies d'*oppA* qui ne sont donc pas induites dans les mêmes conditions. La multiplicité de ces protéines de fixation pourrait ainsi être un des facteurs visant à améliorer les capacités d'adaptation de *B. burgdoferi* face aux changements environnementaux, favorisant ainsi son développement dans différentes niches.

Un autre exemple de multiplicité de protéine de fixation est le système Hpp de *Streptococcus gordonii* dont le génome possède deux exemplaires de gène codant une protéine de fixation des peptides, *hppG* et *hppA* en amont de l'opéron, plus une copie supplémentaire *hppH* située ailleurs sur le chromosome (Jenkinson *et al.* 1996) (Fig.12). Là encore les séquences codant les protéines sont proches (plus de 60% d'identité protéique). Il a été montré que HppA et HppH sont essentielles au transport des oligopeptides, contrairement à HppG. Les auteurs suggèrent alors que, même si les deux protéines HppA et HppH peuvent fixer indépendamment les peptides, la formation d'un complexe de l'une avec l'autre et/ou avec les protéines transmembranaires est indispensable au transport. Dans ce cas, l'association d'au moins deux protéines affines différentes serait nécessaire pour constituer une architecture globale du système permettant un transport efficace.

Enfin, nous prendrons pour dernier exemple *L. lactis* qui possède deux systèmes ABC de transport d'oligopeptides : Opp et Opt, ce dernier ayant deux gènes codant les protéines de fixation *optA* et *optS* transcrits d'une part en opéron *optSABCDF* mais aussi indépendamment, sous l'action de leur propre promoteur (Lamarque *et al*. 2004) (Fig.12). Si les deux protéines de fixation d'Opt sont relativement proches (52.5% d'identité protéique), elles sont cependant très différentes de la protéine OppA (Tableau 3). L'étude de la spécificité de substrat des 3

protéines de fixation de peptides de *L. lactis* révèle des différences très importantes. En effet, OppA de *L. lactis* présente une spécificité très large, atypique au sein des systèmes Opp, puisqu'elle peut transporter des peptides allant de 4 à 35 acides aminés (Doeven *et al*. 2004). La spécificité d'OptA est quant à elle beaucoup plus restreinte, puisqu'elle transporte des peptides de 3 à 6 acides aminés parmi lesquels on peut observer un recouvrement de spécificité avec OppA (Lamarque *et al*. 2004). Enfin, la protéine OptS ne serait impliquée que dans le transport de certains dipeptides (Lamarque *et al*. soumis). Se pose alors la question de l'intérêt pour la bactérie de multiplier à la fois les systèmes et les protéines de fixation. En effet, même si chez les souches de laboratoire étudiées, MG1363 et IL1403, des mutations conduisent respectivement à la non-fonctionnalité d'Opt et d'Opp, d'autres souches de *L. lactis* expriment les deux systèmes alors que l'analyse du transport des peptides suggère un large recouvrement de leur spécificité (Lamarque *et al*. 2004). La présence d'OptS est d'autant plus intrigante étant donné sa spécificité très réduite et la présence chez cette bactérie d'un système DtpT qui prend également en charge des di et tripeptides. Pourquoi la cellule possède-t-elle plusieurs systèmes, qui peuvent apparaître comme redondants et dont la synthèse est coûteuse en énergie ?

L'ensemble des exemples développés met donc en évidence une multiplicité, au sein d'une même souche, des systèmes Opp et/ou des protéines de fixation OppA. Si la régulation différentielle des copies de ces transporteurs pourrait constituer un moyen d'adaptation à des niches spécifiques, la question de l'intérêt de cette multiplicité reste posée, notamment lorsque l'on observe un recouvrement de spécificité. L'étude des fonctions de ces systèmes d'import qui sera développée dans le prochain chapitre va permettre de répondre en partie à cette question. Nous verrons en effet que les transporteurs de peptides peuvent exercer des rôles variés dans la vie cellulaire.

II. Les différentes fonctions des transporteurs de peptides bactériens

La plus évidente des fonctions que l'on peut attribuer aux transporteurs de peptides bactériens est de fournir de manière directe des nutriments azotés à la cellule et donc de participer à la croissance. En plus de cette fonction essentielle, les transporteurs de peptides peuvent jouer d'autres rôles dans la vie cellulaire. En effet, certains peptides internalisés sont perçus par la cellule comme des signaux impliqués, soit dans la perception de l'environnement, soit dans des phénomènes de communication intercellulaire (*quorum sensing*). L'objet du chapitre suivant est d'illustrer, par différents exemples, l'ensemble des fonctions exercées par les transporteurs de peptides.

A. Les transporteurs de peptides et leur rôle dans la nutrition

De nombreuses bactéries sont auxotrophes pour certains acides aminés. Leur croissance nécessite donc de trouver une source d'azote dans leur environnement. Parmi les systèmes permettant cet approvisionnement, les transporteurs de peptides jouent un rôle particulièrement important. Leur fonction nutritionnelle a été très bien étudiée chez les bactéries lactiques, notamment chez *L. lactis* qui sera l'exemple développé dans cette partie et sur lequel nous nous appuierons pour appréhender d'une manière plus générale le rôle des systèmes Opp dans la nutrition au sein du monde bactérien.

1) Les transporteurs d'oligopeptides sont essentiels à la croissance de *L. lactis* dans le lait

L. lactis est une bactérie lactique d'intérêt technologique puisque son développement a un rôle direct sur l'acidification du lait, étape indispensable à la fabrication des fromages. Tout comme les bactéries lactiques en général, elle est exigeante d'un point de vue nutritionnel car auxotrophe pour de nombreux acides aminés (Chopin 1993). La concentration en acides aminés et peptides libres du lait est faible et insuffisante pour le développement optimal de cette bactérie. La principale source d'azote du lait disponible est constituée des caséines qui représentent 80% des protéines totales. Leur utilisation par *L. lactis* nécessite l'action coordonnée d'un ensemble de protéines formant un véritable réseau coopératif dédié à la nutrition azotée (système protéolytique) (Fig. 13).

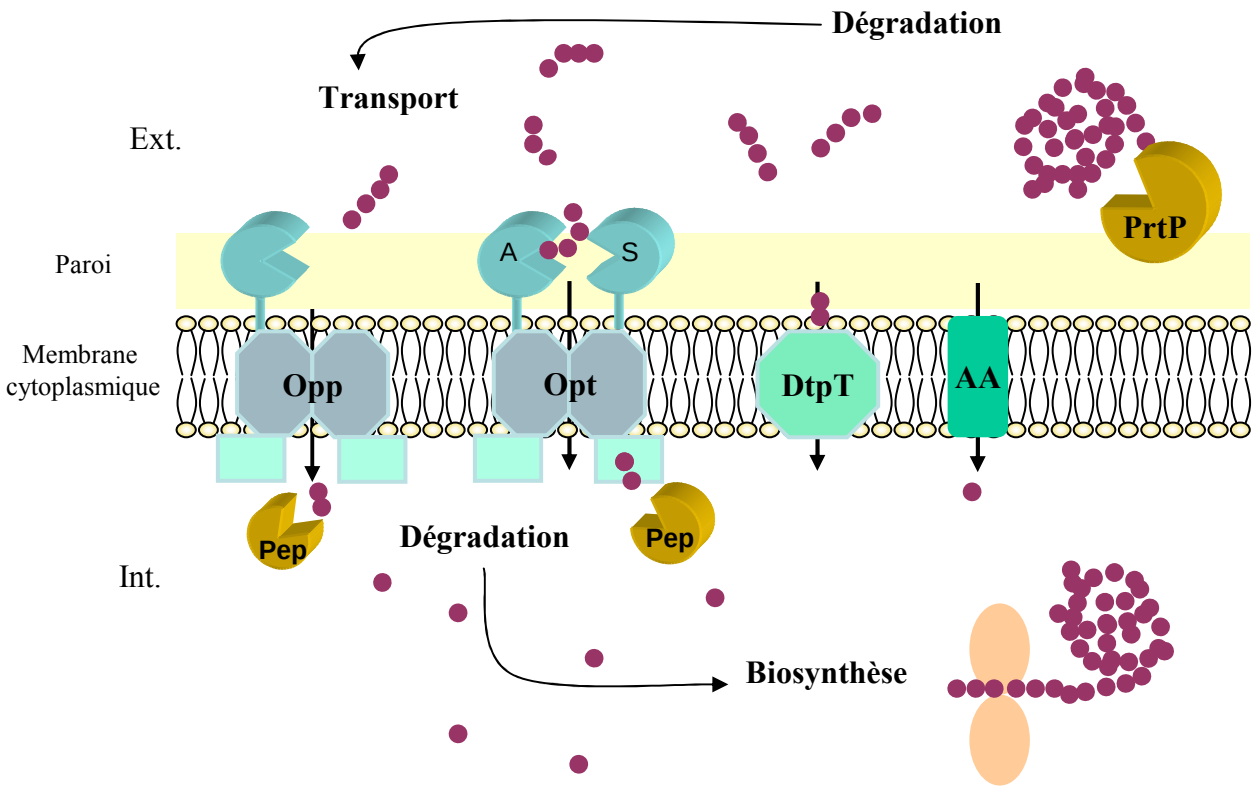


Fig. 13: Le système protéolytique de *L. lactis*.

d'après Kunji *et al.* 1995

- Les caséines sont tout d'abord hydrolysées par la protéase de paroi PrtP, générant ainsi plus d'une centaine d'oligopeptides dont la taille varie de 4 à au moins 30 acides aminés (Juillard *et al.* 1995b). Le gène codant cette protéase est portée sur un plasmide. Or les souches de laboratoire MG1363 et IL1403, qui ont été curées, en sont dépourvues. Dans les études présentées ci-dessous, un plasmide portant le gène *prtP* a été introduit dans ces souches et du glucose a été ajouté au lait pour qu'elles s'y développent.
- Pour internaliser ces peptides *L. lactis* dispose de plusieurs systèmes de transport : un système à force proton motrice, DtpT et des systèmes de type ABC, Opp et/ou Opt selon les souches (Tableau 4). Des mutants de délétion des différents transporteurs ont été obtenus dans les souches MG1363 et IL1403, et leur croissance dans le lait analysée pour déterminer leur impact respectif. Les résultats montrent que le mutant de transport des di- et tripeptides *dtpT*- obtenu chez MG1363 n'est pas affecté dans la croissance en lait (Kunji *et al.* 1995), ce qui peut s'expliquer par le fait que la concentration en peptides libres dans ce milieu est faible et que l'hydrolyse des caséines ne génère pas ou très peu de di- et tripeptides (Juillard *et al.* 1995b). En revanche, le mutant *opp*- de la souche MG1363 et le mutant *opt*- de la souche IL1403 sont très affectés lors de leur croissance dans le lait (Fig.14) (Juillard *et al.* 1995a ; Lamarque *et al*. 2004). Concernant le système Opt qui possède deux protéines de fixation, il a été montré plus précisément que seule OptA était impliquée dans la croissance, un mutant OptS ayant le même comportement que la souche sauvage. Ces résultats indiquent que les oligopeptides constituent la source principale de nutriments azotés dans le lait et mettent en évidence la fonction nutritive exercée par les transporteurs d'oligopeptides Opp et Opt pour le développement de la bactérie dans ce milieu.
- Les peptides internalisés sont ensuite immédiatement hydrolysés en acides aminés par un ensemble de peptidases intracellulaires (au moins 13), qui seront alors utilisés par la cellule.

Ces résultats mettent tout d'abord en évidence le rôle central au sein du réseau protéolytique des transporteurs d'oligopeptides Opp et Opt pour la croissance de la bactérie dans le lait. Des études sur la spécificité de substrat de ces deux transporteurs ont montré que Opp est capable d'importer des peptides de 4 à 35 résidus (Doeven *et al.* 2004) et Opt (par OptA) de 3 à 6 résidus (Lamarque *et al.* soumis), tous deux sans exigence stricte vis-à-vis de la séquence peptidique. La spécificité de substrat large de ces systèmes est cohérente avec la fonction qu'ils exercent : pour être le plus efficace possible, un transporteur à vocation nutritionnelle doit pouvoir prendre en charge un grand nombre de peptides. Dans le cas

Souche	Transporteurs de peptides
MG1363	DtpT+, Opp+, Opt-
IL1403	DtpT+, Opp-, Opt+
SK11,Wg2,ML3	DtpT+, Opp+, Opt+

Tableau 4 : Equipement en transporteurs de peptides fonctionnels de différentes souches de *L. lactis*

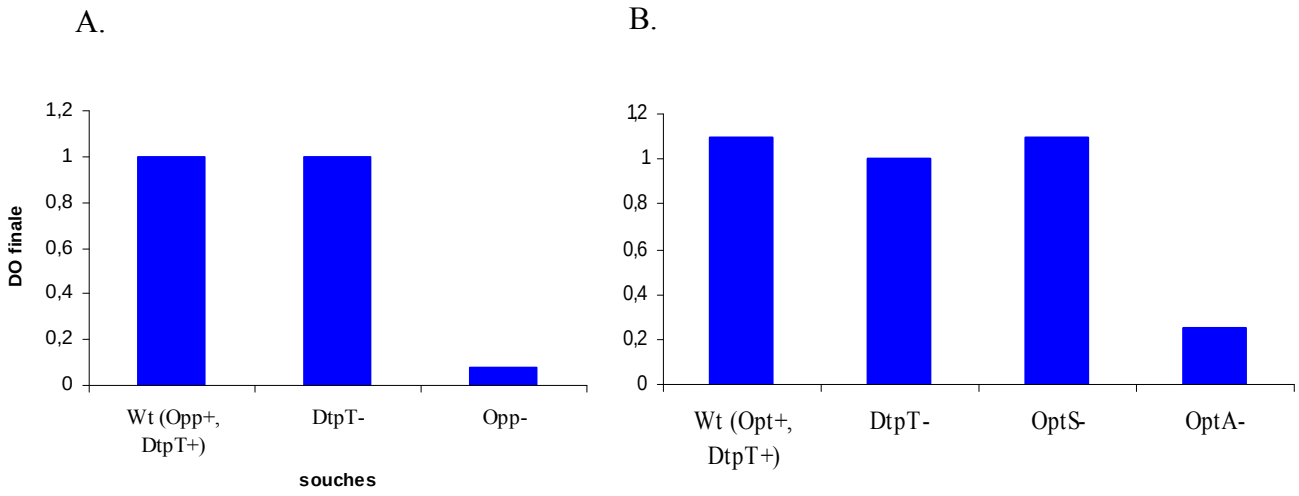


Fig.14: Croissance en lait de *L. lactis* et des différents mutants de transport

A. DO finale obtenue après 24h de croissance en lait par la souche de *L.lactis* MG1363 et de ses différents mutants de transport
B. DO finale obtenue après 24h de croissance en lait par la souche de *L.lactis* IL1403 et de ses différents mutants de transport

d'après Kunji et al. 1995; Lamarque *et al.* soumis

particulier de *L. lactis*, chacun des systèmes Opp et Opt est essentiel à la croissance optimale des souches IL1403 et MG1363 étudiées ici, qui ne possèdent que l'un ou l'autre des transporteurs. Cependant pour d'autres souches de *L. lactis*, les deux transporteurs sont fonctionnels, ce qui amène à s'interroger sur l'intérêt qu'a la bactérie à synthétiser deux systèmes ayant des spécificités en grande partie recouvrantes et potentiellement la même fonction. Une explication possible serait qu'Opp et Opt soient induits de manière différentielle, par exemple en fonction de la phase de croissance, ou des conditions environnementales, ce qui pourrait constituer un facteur d'adaptation de la bactérie à différentes niches écologiques.

A l'issue de ces études, une autre question se pose sur les transporteurs de peptides de *L. lactis* : quel est le rôle d'OptS ? En effet, la présence ou non de cette protéine de fixation n'a aucun impact apparent sur la croissance de la bactérie. Des expériences de transport de peptides ont révélé de plus une spécificité de substrat très restreinte se limitant à certains dipeptides (Lamarque *et al.* soumis). Cette protéine de fixation exercerait donc vraisemblablement un autre rôle que l'import de peptides à vocation nutritionnelle mais lequel ? L'étude de la régulation des gènes du système protéolytique a permis d'apporter des éléments de réponse à cette question.

2) La régulation des gènes codant les transporteurs de peptides de *L. lactis* par les acides aminés à chaîne latérale ramifiée

Des travaux sur la régulation du système protéolytique de *L. lactis* ont permis de montrer que l'expression des gènes de plusieurs peptidases (*pepX*, *pepN*, *pepC*), de la protéase de paroi *prtP* ainsi que de l'opéron *opp-pepO* de *L. lactis* MG1363 était dépendante du contenu en peptides du milieu de culture (Guédon *et al.* 2001a et b). Plus précisément, ces gènes sont réprimés par des dipeptides contenant des acides aminés à chaîne latérale ramifiée (valine, isoleucine et leucine). Pour exercer leur effet répresseur, ces dipeptides doivent être au préalable internalisés et hydrolysés par des peptidases intracellulaires puisqu'un mutant *pepQ*-, incapable de dégrader les dipeptides de type X-Pro, ne présente plus de signal de répression en présence des peptides Leu-Pro et Val-Pro (Guédon *et al.* 2001b). L'élément responsable de la répression des différents gènes du système protéolytique répond donc au pool intracellulaire d'acides aminés à chaîne latérale ramifiée plutôt qu'aux peptides eux-mêmes. Le régulateur transcriptionnel impliqué est CodY, protéine conservée chez de

nombreuses espèces bactériennes à Gram positif (Sonenshein 2005). La protéine CodY possède un motif de fixation à l'ADN hélice-tour-hélice dans sa région C-terminale, et des expériences de gel retard ont montré qu'elle interagissait directement avec la région promotrice de l'opéron *opp-pepO* pour exercer son action répressive (den Hengst *et al.* 2005a). La séquence de fixation de CodY est un palindrome de 15 acides aminés (AATTTTCNGAAAATT) localisé à proximité des boites -10 et -35 des promoteurs des gènes régulés, et notamment en amont des opérons *opt* et *opp* (den Hengst *et al.* 2005b; Guédon *et al.* 2005). Des analyses transcriptomiques du mutant *codY*- de *L. lactis* ont montré que ce régulateur agissait sur l'expression de nombreux gènes, principalement impliqués dans le transport et le métabolisme des acides aminés (den Hengst *et al.* 2005b; Guédon *et al.* 2005). Le régulon CodY permet donc d'adapter la synthèse de nombreuses protéines en fonction de la disponibilité en nutriments azotés. Dans ce contexte, la fixation d'acides aminés à chaîne latérale ramifiée sur CodY serait perçue comme un indicateur d'une concentration en acides aminés suffisante pour la croissance, induisant la répression des gènes du régulon dont l'activité n'est plus requise (Fig.15).

Il est intéressant de constater que les systèmes Opp et Opt sont tous deux régulés par CodY. L'hypothèse d'une induction différentielle de ces systèmes pour expliquer la présence de ces deux transporteurs distincts, énoncée auparavant, semble donc difficilement envisageable. On ne peut toutefois exclure la possibilité que d'autres régulateurs soient également impliqués dans le contrôle de ces gènes.

3) Les transporteurs de peptides de *L. lactis* : un rôle dans la perception de l'environnement

Si le régulateur CodY est activé par le pool d'acides aminés branchés libres du milieu, on peut se demander alors quel est l'impact des différents transporteurs de peptides de la bactérie sur ce phénomène. L'activité répressive des sources azotées du milieu sur différents gènes du régulon a été mesurée dans les mutants de transport de la souche IL1403. Dans un premier temps, le promoteur du gène *oppD*, qui a été montré comme étant régulé par CodY, a été fusionné à un rapporteur (le gène codant pour la glucuronidase) et son expression a été mesurée dans les mutants *optA*, *optS* et *dtpT* lors de la croissance en milieu chimiquement défini avec ou sans peptides (apportés sous forme de peptone) (Fig.16A) (Lamarque *et al.* soumis). Les résultats confirment tout d'abord que l'expression du promoteur *p-oppD* est

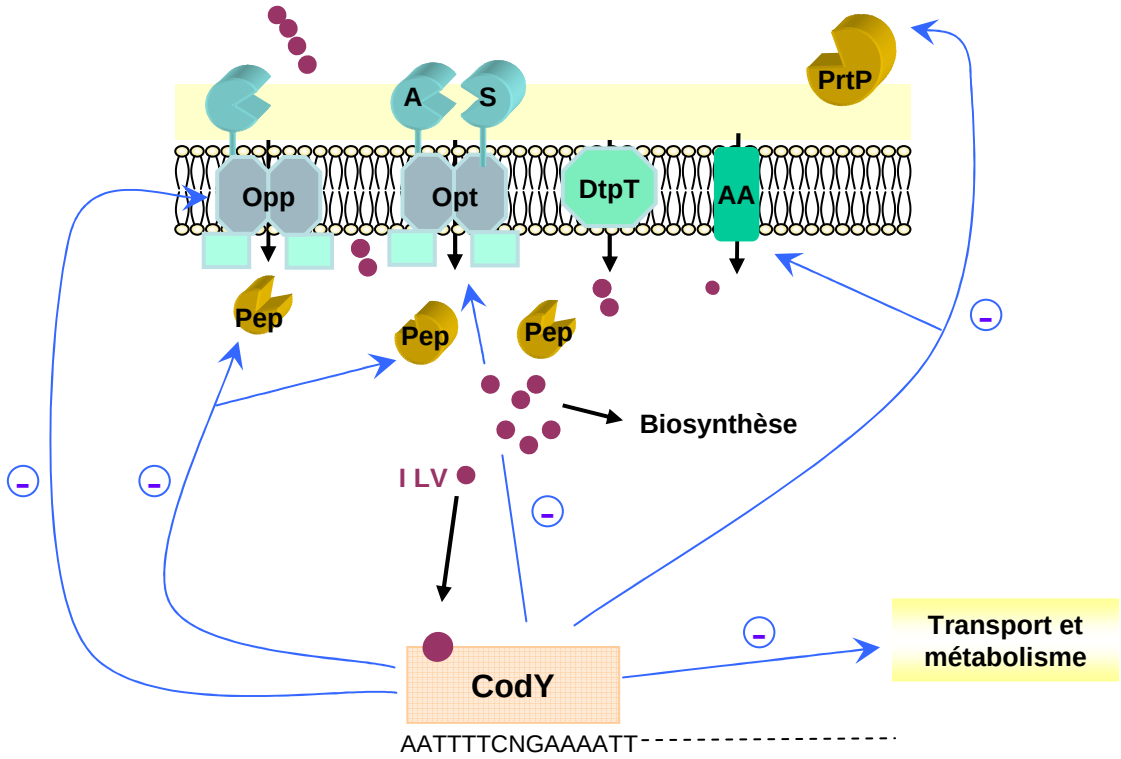


Fig.15 : La régulation du système protéolytique de *L. lactis*.
Les peptides entrent dans la cellule par les différents transporteurs : Opp, Opt, DtpT avant d'être clivés par des peptidases (Pep). Les acides aminés à chaine latérale ramifiée générés (ILV) ainsi que ceux directement importés par le transporteur d'acides aminés libres (AA), vont se fixer sur le régulateur CodY qui va alors réprimer les gènes de son régulon.

d'après Guédon *et al.* 2001b

réprimée par les peptides et montrent que cette répression est essentiellement liée à CodY (Fig.16A). Les peptides impliqués dans cette répression empruntent majoritairement le transporteur DtpT mais aussi, dans une moindre mesure, OptA. Dans ce milieu, le transporteur de di- et tripeptides est donc une voie particulièrement importante pour l'entrée de peptides impliqués dans des phénomènes de régulation. Une mesure similaire a été effectuée lors de la croissance de la bactérie dans le lait (Fig. 16B). Dans ce milieu, si la participation de DtpT dans la régulation est confirmée, il a été également montré l'implication de la protéine de fixation OptS, qui n'avait été jusqu'ici associée à aucune fonction, dans la régulation du promoteur d'*oppD*. Un modèle global de régulation émerge alors de ces résultats dans lequel DtpT et Opt, principalement *via* OptS, permettraient l'entrée de peptides « de signalisation » pouvant agir sur CodY et induire la répression des différents acteurs du système protéolytique. OptS, à l'inverse de DtpT présenterait une spécificité de substrat adaptée au lait, puisque son inactivation est sans effet sur l'activité du promoteur d'*oppD* lorsque la souche est cultivée en milieu défini avec peptides (cf Fig.16A) (Lamarque *et al.* soumis).

Les transporteurs de peptides peuvent donc jouer chez *L. lactis* un double rôle dans la nutrition azotée. Ils permettent d'une part l'import de peptides qui vont être dégradés et être directement utilisés pour le métabolisme de la cellule, mais aussi, l'import de peptides de signalisation impliqués dans la perception de l'environnement puis dans le mécanisme de régulation du système protéolytique. Pourquoi les peptides passant spécifiquement par DtpT et OptS ont-ils un effet répresseur plus important que ceux entrant par les autres transporteurs ? Sont-ils particulièrement riches en acides aminés branchés ou encore très efficacement transportés ? Les réponses à ces questions restent encore à déterminer. De plus, il apparaît ici de manière intéressante que les deux transporteurs majoritairement impliqués dans la perception de l'environnement n'ont qu'un rôle minime dans le transport de peptides à vocation nutritive, et vice versa (les mutants *dtpT*- et *optS*- ne sont pas affectés lors de la croissance dans le lait mais ont un effet sur la régulation alors que le mutant *optA*- est très affecté dans sa croissance en lait mais n'a que très peu d'effet sur la régulation), suggérant une spécialisation des systèmes de transport et/ou des protéines de fixation. Il serait cependant intéressant, pour compléter ce modèle de reproduire les expériences précédentes dans une souche contenant également un système Opp fonctionnel.

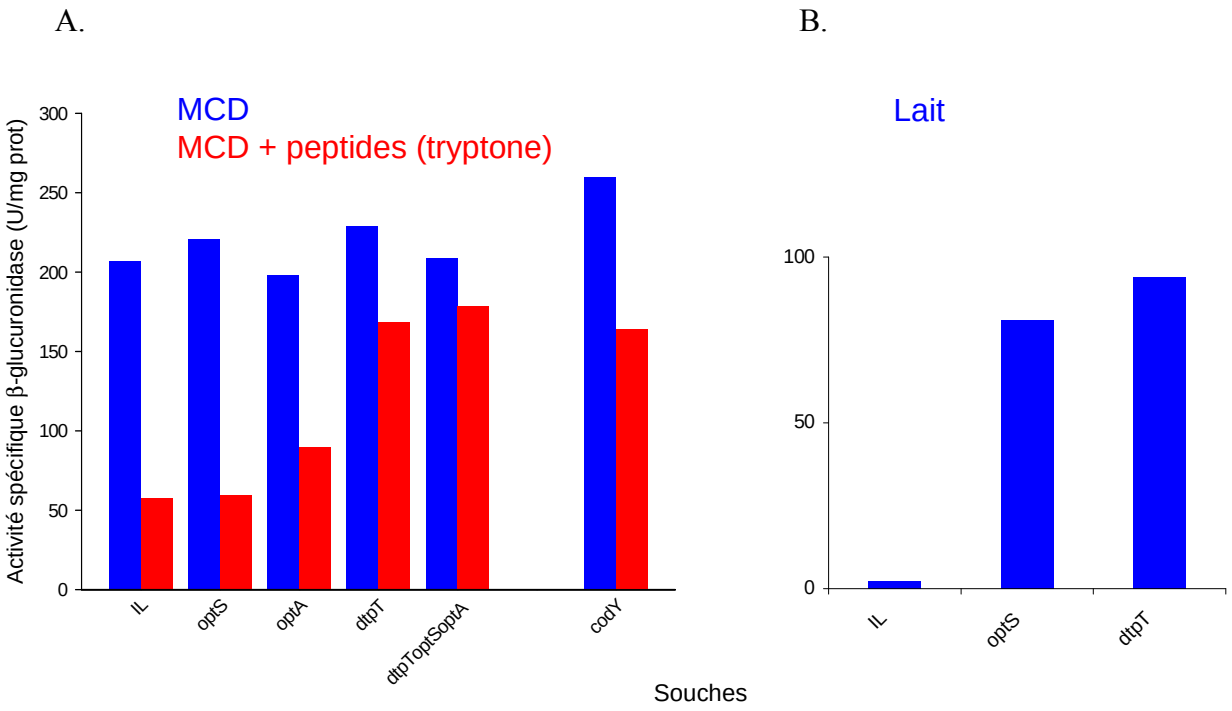


Fig. 16: Activité de la *ß*-glucuronidase (fusion transcriptionelle *p-oppD* avec le gène codant la *ß*-glucuronidase) pendant la croissance de *L. lactis*.

• A. Expression de *p-oppD* évaluée *via* l'activité de la *ß*-glucuronidase de *L. lactis* pendant la croissance en MCD enrichi ou non en peptides. Chez la souche sauvage IL1403, l'ajout de peptides réprime fortement l'expression du promoteur. Cette répression est levée dans le mutant de transport *dtpT* et dans une moindre mesure dans le mutant *optA*.
• B. Expression de *p-oppD* évaluée *via* l'activité de la *ß*-glucuronidase de *L. lactis* pendant la croissance en lait. Les mutants *optS* et *dtpT* ont une activité *ß*-glucuronidase bien supérieure à celle mesurée chez la souche sauvage, suggérant que les transporteurs correspondants importent des peptides répresseurs.

d'après Lamarque *et al*. soumis

Si, chez *L. lactis*, l'importance des transporteurs de peptides, aussi bien pour l'import de peptides à vocation nutritionnelle que pour la régulation du système protéolytique, est particulièrement bien documentée, le rôle des systèmes Opp dans la nutrition et leur régulation ont été également décrits chez d'autres espèces bactériennes. Chez la bactérie à Gram négatif *E. coli* K-12 par exemple, le système Opp est le principal fournisseur de peptides pour la nutrition (Hiles et Higgins 1986). L'étude de l'expression de ce transporteur a montré que celui-ci était induit en présence de leucine et d'alanine (Andrews et Short 1986) par le biais du régulateur transcriptionnel pléiotrope Lrp qui contrôle l'expression d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme azoté (Calvo et Matthews 1994). On peut alors concevoir le mécanisme suivant : (i) les transporteurs de peptides permettent l'entrée de peptides contenant de la leucine ou de la valine, (ii) ces acides aminés vont activer le régulateur Lrp, (iii) Lrp stimule l'expression d'*opp* ce qui va augmenter le transport de peptides, etc… Le régulateur Lrp et le régulateur CodY décrit chez *L. lactis* exercent des effets opposés sur la synthèse d'Opp, puisque l'un la stimule et l'autre la réprime. Cependant ces mécanismes présentent des points communs dans la mesure où, le transporteur Opp a une fonction importante de nutrition et se situe au centre d'un réseau de régulation dépendant des sources azotées du milieu, même si les gènes appartenant à ce réseau sont différents dans les deux cas.

B. Les transporteurs de peptides et leur rôle dans la communication intercellulaire

1) Les différents modes de communication bactériens

Si pendant longtemps les bactéries ont été considérées comme des organismes unicellulaires indépendants, ces dernières années, les preuves qu'une grande partie des espèces bactériennes peuvent développer un comportement de « groupe » se sont multipliées. Ainsi il a été montré que les bactéries peuvent communiquer entre elles afin de coordonner leurs activités, capacité que l'on pensait auparavant restreinte aux organismes pluricellulaires. Cette communication repose sur la synthèse et la diffusion de petites molécules qui peuvent être perçues soit par d'autres organismes soit par une bactérie de la même espèce. Dans le cas d'une communication intra-espèce, les molécules constituant le signal sont alors appelées autoinducteurs. Souvent, ces signaux permettent à la cellule d'évaluer la densité bactérienne

dans une niche spécifique. En effet, plus la concentration cellulaire est élevée, plus la concentration en autoinducteurs augmente, jusqu'à atteindre un seuil à partir duquel la bactérie pourra percevoir le signal et adapter une réponse spécifique. On parle alors de *quorum sensing,* terme cependant fréquemment utilisé pour désigner la communication intercellulaire en général (comprenant également des phénomènes ne nécessitant pas de hautes densités de population). Les mécanismes contrôlés par *quorum sensing* sont nombreux, et de manière générale, liés à des comportements qui ne sont efficaces que lorsqu'ils sont engagés simultanément par de nombreuses cellules comme la sécrétion de facteurs de virulence ou de bactériocines, la formation de biofilms, la conjugaison, la sporulation ou encore la bioluminescence (Miller et Bassler 2001).

Les molécules de signalisation utilisées pour la communication bactérienne peuvent être divisées en deux classes principales selon leur nature.

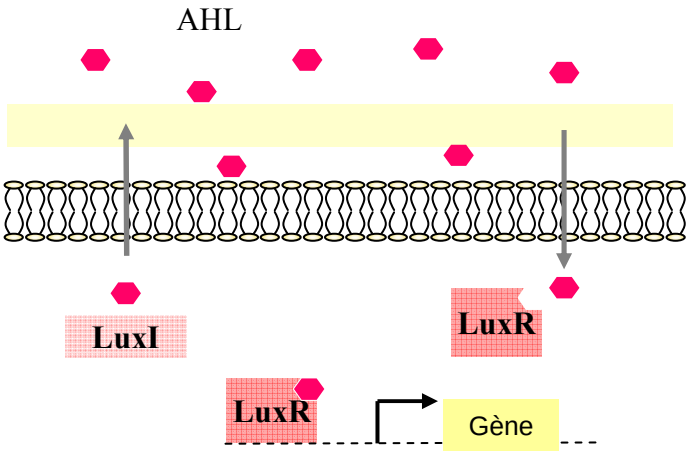
a. Les N-acyl homoserine lactones (AHL)

Les AHL sont des molécules de communication exclusivement décrites chez les bactéries à Gram négatif. Elles sont synthétisées par des enzymes spécifiques de type LuxI puis sécrétées dans le milieu. Elles sont ensuite réinternalisées par diffusion passive puis une fois une concentration seuil atteinte, fixées par une protéine de type LuxR. Ce régulateur acquiert alors sa forme active, lui permettant de se fixer aux promoteurs de gènes cibles, dont son propre promoteur, et d'en activer la transcription (Fig.17A). Le système type LuxI/R a été identifié chez de nombreuses espèces bactériennes et son implication a été montrée dans divers phénomènes, notamment dans la production de facteurs de virulence chez *Pseudomonas aeruginosa*, l'induction de la bioluminescence chez *Vibrio fischeri*, l'initiation de la conjugaison chez *Agrobacterium tumefaciens*… (Miller et Bassler 2001, Henke et Bassler 2004).

b. Les phéromones peptidiques

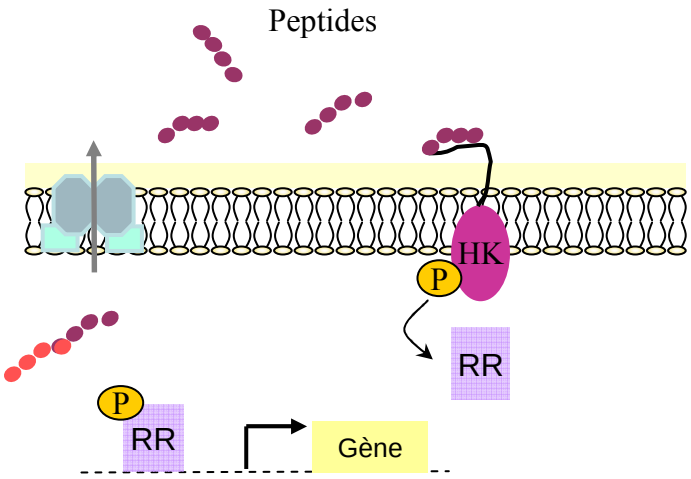
Les phéromones peptidiques sont des oligopeptides généralement courts, pouvant avoir subi ou non des modifications post-traductionnelles (Dunny et Leonard 1997) et utilisés comme signal de communication chez les bactéries à Gram positif. Ces peptides peuvent être subdivisés en deux sous-classes, ceux qui agissent de manière extracellulaire et ceux qui

A.



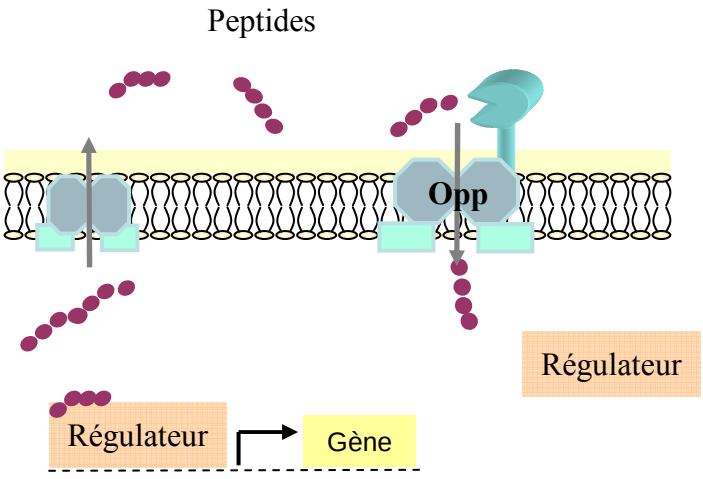
Le système LuxI/R des bactéries à Gram négatif : la molécule signal AHL est synthétisée par la protéine de type LuxI puis sécrétée par diffusion passive. La molécule est ensuite réinternalisée puis une fois la concentration intracellulaire en AHL suffisante, elle est fixée par une protéine de type LuxR qui va moduler la transcritpion des gènes cibles

B.



La communication *via* des peptides à mode d'action extracellulaire des bactéries à Gram positif: le peptide de signalisation est synthétisé sous forme de précurseur puis sécrété. Après maturation il est alors detecté par un récepteur à histidine kinase (HK) qui s'autophosphoryle. Le groupement phophate est ensuite transmis à un régulateur de réponse (RR) qui va alors moduler la transcription des gènes cibles.

C.



La communication *via* des peptides à mode d'action intracellulaire des bactéries à Gram positif: le peptide signal est synthétisé sous forme de précurseur puis sécrété. Après maturation il est pris en charge par l'ABC-transporteur de peptides Opp et réinternalisé. Une fois à l'intérieur de la cellule, le peptide est immédiatement pris en charge par un régulateur qui va moduler la transcription des gènes cibles.

Fig.17 : Les principales voies de communication bactérienne

doivent être internalisés (Lazazzera 2001). Les mécanismes permettant la détection et le relais de ces signaux sont radicalement différents selon la sous-classe considérée (Fig.17B et C):

(i) Les peptides à mode d'action extracellulaire sont synthétisés sous forme de précurseur puis sécrétés dans le milieu, généralement *via* un ABC-transporteur. Ils présentent souvent des modifications comme par exemple l'ajout d'un groupement isoprenyl (phéromone ComX de *Bacillus subtilis*, Magnuson *et al*. 1994) ou d'un pont thio-lactone (phéromone AIP des *Staphylococcus ssp,* Otto *et al*. 1998). Ces signaux, lorsqu'ils atteignent la concentration requise, sont détectés par un récepteur membranaire à histidine kinase, qui grâce au contact avec la phéromone va s'autophosphoryler et transmettre son groupement phosphate à un régulateur de réponse. L'ensemble des deux protéines, histidine kinase et régulateur de réponse, forme ce que l'on appelle un système à deux composantes. Enfin, le régulateur de réponse phosphorylé va contrôler la transcription des gènes cibles et donc induire la réponse de la cellule (Fig.17B). Si la communication *via* des peptides est exclusivement décrite chez les bactéries à Gram positif, on peut cependant retrouver le mode de transmission d'un signal par un système à deux composantes chez quelques bactéries à Gram négatif. Par exemple, *Vibrio harveyi* possède un système de communication hybride puisque les deux molécules signal synthétisées, AI-1 qui est une AHL (similaire à celles utilisées par le système LuxI/R) et AI-2 qui est un furanosyl borate diester (autre classe d'autoinducteurs qui ne sera pas décrite ici), sont toutes deux prises en charge par des systèmes à deux composantes distincts qui transmettent alors le signal à une protéine réceptrice commune (Miller et Bassler 2001). Cette voie de communication qui induit le phénomène de luminescence de cette bactérie a été également décrite chez d'autres espèces notamment chez *Shigella flexneri* pour laquelle elle provoque l'induction de facteurs de virulence (Gonzalez et Keshavan 2006).

(ii) Les peptides à mode d'action intracellulaire sont de petite taille et non modifiés. Ils sont synthétisés par la cellule, sécrétés sous forme de précurseur, et contrairement à la classe de peptides signaux précédente, ils doivent être réinternalisés après maturation pour se fixer sur un récepteur cytoplasmique qui régule alors l'expression des gènes cibles (Fig.17C). Ce sont dans ces voies de communication qu'interviennent les systèmes de transport Opp puisqu'ils sont nécessaires au transport de la phéromone vers l'intérieur de la cellule. Or nous avons vu précédemment qu'une fonction majeure de ces systèmes était de fournir des nutriments azotés à la cellule, et de ce fait qu'ils sont généralement capables de transporter une large gamme de peptides. Comment les peptides de communication sont-ils « reconnus » au sein de peptides nutritionnels ? Y'a t'il des systèmes Opp spécifiques d'une part de la

nutrition et d'autre part de la communication, ou au contraire un même transporteur pour plusieurs fonctions ? Dans ce dernier cas, a-t-on compétition entre les différents peptides ou de fortes différences d'affinité qui permettraient d'importer préférentiellement une phéromone ?

Dans la partie qui suit nous développerons 3 exemples de communication *via* des peptides à mode d'action intracellulaire chez des bactéries différentes, *E. faecalis, B. subtilis* et *Bacillus thuringiensis*, en insistant particulièrement sur le rôle des transporteurs de peptides. Pour chacun de ces exemples, de nombreuses études ont permis de révéler chaque étape du mécanisme de communication qui conduit à l'induction de phénomènes distincts chez les 3 bactéries (respectivement la conjugaison, la sporulation et la compétence, l'induction de facteurs de virulence). L'étude de ces mécanismes permettra d'illustrer les différentes réponses apportées par les bactéries aux questions posées précédemment.

2) La conjugaison chez *Enterococcus faecalis*

a. La conjugaison bactérienne

La conjugaison est un phénomène permettant le transfert unidirectionnel d'ADN plasmidique (ou d'éléments conjugatifs intégrés dans le chromosome) d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse. Ce mécanisme nécessite un contact étroit entre les deux cellules et permet une dissémination rapide et efficace de l'information génétique au sein d'une population bactérienne. Chez les bactéries à Gram négatif, le transfert d'ADN se fait généralement *via* des structures de type pilus alors que chez les bactéries à Gram positif, le contact est permis par des protéines de surface de type adhésines ou facteurs d'agrégation (Fig.18).

Ici nous nous intéresserons plus particulièrement au mécanisme de conjugaison de la bactérie à Gram positif *Enterococcus faecalis*, commensale du tube digestif, notamment de l'humain. Cette bactérie peut provoquer diverses infections (infections urinaires, bactériémies, endocardites…) développées principalement en milieu hospitalier par des personnes immunodéprimées. L'une des difficultés du traitement vient de la forte prévalence de souches d'entérocoques multirésistantes aux antibiotiques. Les gènes leur conférant cette résistance sont portés par des plasmides dont la dissémination repose essentiellement sur la conjugaison. La plupart des mécanismes de transfert plasmidique décrits chez cette bactérie sont

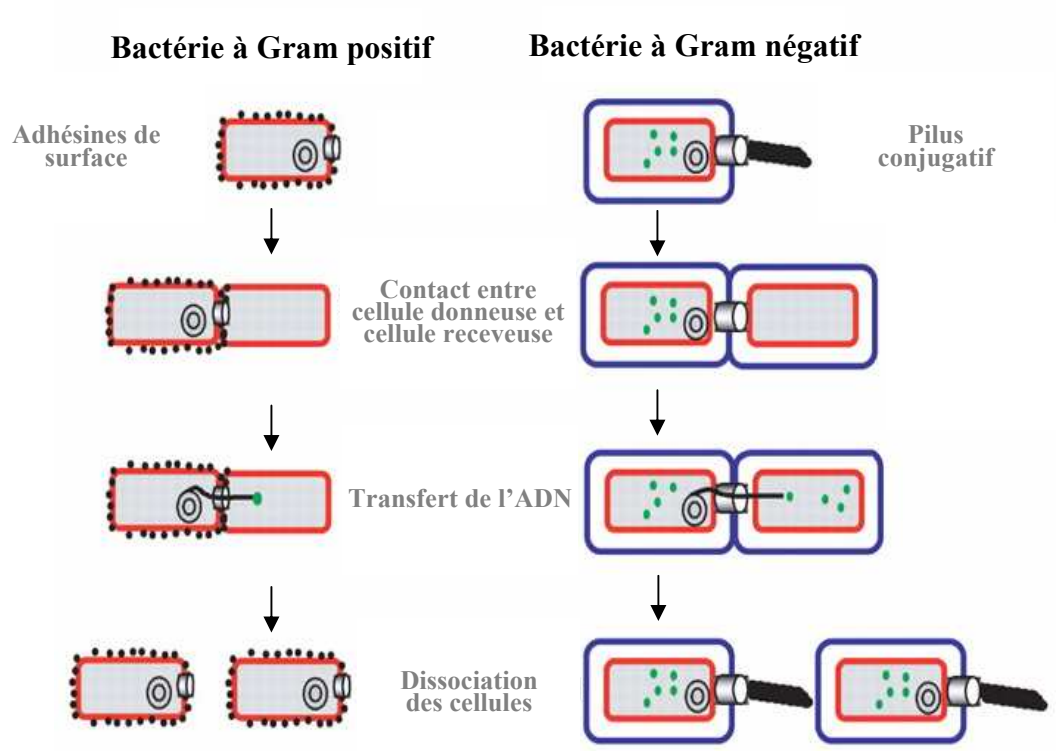


Fig.18 : Comparaison des mécanismes de conjugaison des bactéries à Gram positif (à gauche) et des bactéries à Gram négatif (à droite).
Les adhésines de surface ou les pili conjugatifs permettent d'établir un contact étroit entre bactéries, nécessaire au transfert de l'ADN.

d'après Chen *et al*. 2005

déclenchés par communication intercellulaire *via* des phéromones peptidiques (Clewell *et al.* 2002). Parmi eux, le transfert du plasmide pCF10, portant les gènes de résistance à la tétracycline a été particulièrement bien étudié et sera l'exemple développé dans cette partie.

b. Le transfert du plasmide pCF10 par conjugaison : une histoire de communication

Les nombreuses études portant sur le transfert conjugatif du plasmide pCF10 d' *E. faecalis* ont montré qu'il était provoqué par un phénomène de communication intercellulaire entre les bactéries donneuses et les bactéries receveuses (Fig.19):

- La phéromone impliquée, cCF10, est synthétisée à partir du gène *ccfa* codant pour une lipoprotéine (Antiporta et Dunny 2002). Cette phéromone, qui est un peptide non modifié de 7 acides aminés (Leu-Val-Phe-Leu-Val-Thr-Val) est contenue dans le peptide signal de la lipoprotéine, qui est clivé par la protéase membranaire Eep lors de la sécrétion puis libéré dans le surnageant (An *et al.* 1999). Le gène *ccfa* étant un gène chromosomique, la phéromone est produite par toutes les bactéries, donneuses et receveuses.
- La phéromone cCf10 appartient à la classe des peptides à mode d'action intracellulaire c'est-à-dire qu'elle est tout d'abord internalisée par un transporteur (PrgZ/Opp) pour ensuite être fixée par un récepteur intracellulaire. Ce récepteur, appelé PrgX, est codé par un gène se trouvant sur le plasmide pCF10, si bien que seules les bactéries donneuses vont réagir à la phéromone. La protéine PrgX contrôle l'expression des différents gènes plasmidiques de la machinerie de conjugaison (l'opéron *prgQ*) en exerçant sur eux une régulation négative. Il a été proposé que la fixation de la phéromone cCF10 sur PrgX déstabilise la structure en tétramère de ce régulateur, ce qui lève la répression et permet l'expression de *prgQ* (Shi *et al.* 2005).
- L'expression de l'opéron *prgQ* contenant les différents gènes de la machinerie de conjugaison permet à la cellule donneuse de rentrer en contact avec la cellule receveuse pour lui transmettre le plasmide pCF10.

Ce mode de communication diffère sensiblement des systèmes « classiques » de *quorum sensing.* En effet, *E. faecalis* utilise une molécule de signalisation codée par un gène présent sur le chromosome alors que les gènes codant la machinerie de transport et de détection sont portés sur un plasmide indépendant. Ainsi la communication ne se fait pas au sein d'une population homogène mais entre deux types de cellules, d'une part celles

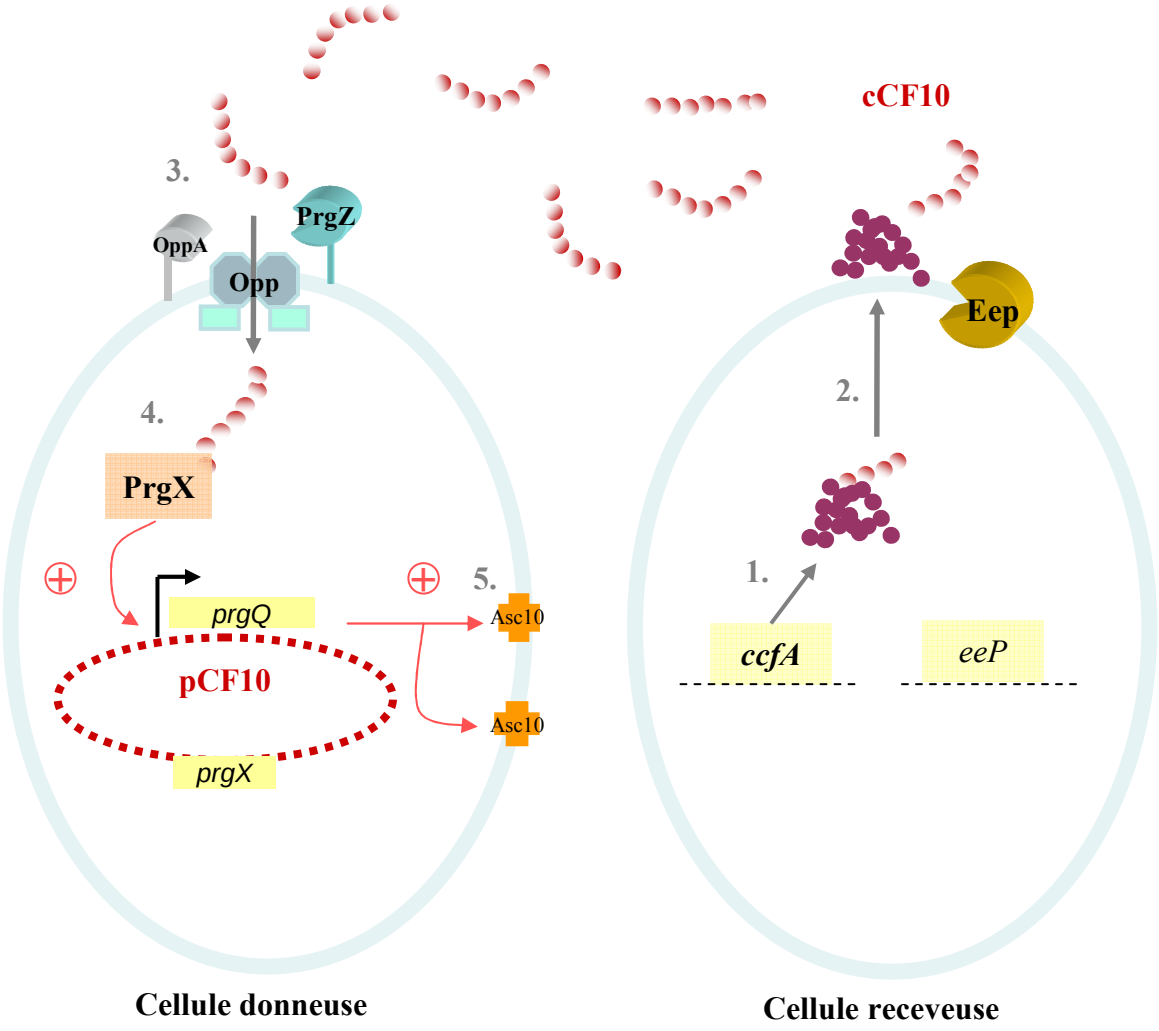


Fig.19 : Mécanisme d'induction du transfert du plasmide pCF10 d' *E. faecalis.*

1. La lipoprotéine à partir de laquelle est libérée la phéromone cCF10 est synthétisée par le gène chromosomique *ccfA*
2. Au cours de son exportation, le peptide signal de la préprolipoprotéine contenant cCF10 est clivé puis maturé par Eep. Ces étapes conduisent à la libération de la phéromone mature dans le surnageant.
3. Internalisation de cCF10 par une bactérie donneuse par le transporteur PrgZ/Opp
4. Fixation du peptide signal sur le récepteur PrgX, ce qui va lever la répression des gènes de conjugaison
5. Synthèse des protéines de conjugaison dont les facteurs d'agrégation (Asc10) et transfert du plasmide à la bactérie receveuse

Pour simplifier le schéma, la production de cCF10 par la cellule donneuse n'est pas représentée ainsi que les mécanismes empêchant l'autoinduction qui sont présentés dans la figure suivante.

d'après Shi *et al.* 2005

possédant le plasmide et d'autre part celles ne le possédant pas. Tel quel, le mécanisme présenté ci-dessus pose un problème important. En effet, puisque toutes les cellules synthétisent la phéromone, comment la bactérie possédant le plasmide évite-t-elle une autoinduction qui entraînerait le déclenchement inutile de tous les mécanismes de conjugaison en absence de cellule réceptrice ? Pour pallier ce problème, la bactérie dispose de plusieurs systèmes. Premièrement, il a été montré que la protéine membranaire PrgY, dont le gène est porté sur le plasmide pCf10, jouait un rôle important pour empêcher le phénomène d'autoinduction (Buttaro *et al*. 2000 ; Chandler *et al*. 2005). Si le mode d'action de cette protéine reste encore mal compris, les auteurs proposent que PrgY puisse séquestrer ou inactiver la phéromone dès que celle-ci est libérée de la membrane (Fig.20). Un deuxième système permet ensuite de neutraliser les phéromones résiduelles qui auraient pu échapper à PrgY. En effet, en parallèle de la phéromone cCf10, une cellule contenant le plasmide pCF10 sécrète un peptide de 7 acides aminés (Ala-Ile-Thr-Leu-Ile-Phe-Ile) appelé peptide inhibiteur (iCF10). Tout comme cCF10, le peptide inhibiteur iCF10 peut se lier au récepteur intracellulaire PrgX mais sa fixation provoque une réponse inverse en favorisant la répression des gènes de conjugaison (Kozlowicz *et al.* 2006) (Fig.20). Au final, la régulation du transfert de pCF10 est dépendante d'un équilibre entre la quantité de peptide de signalisation cCF10 et la quantité de peptide inhibiteur iCF10. Si la bactérie donneuse est isolée ou en présence d'autres bactéries portant le plasmide, la balance penche du coté du peptide inhibiteur ce qui permet à la bactérie d'éviter le déclenchement d'un processus de conjugaison qui serait inutile. Par contre, lorsque la bactérie donneuse est en présence de bactéries sans plasmide, la concentration en peptide de signalisation augmente, favorise cCF10, ce qui entraîne le déclenchement des mécanismes de transfert.

Le mécanisme permettant l'induction de la conjugaison chez *E. faecalis* est donc un phénomène complexe, finement régulé qui illustre parfaitement l'intérêt pour la bactérie de posséder des systèmes de communication intercellulaire : ne déclencher le processus qu'en présence de bactéries receveuses. Dans la partie suivante nous détaillerons plus précisément une étape clé de ce mécanisme, celle de l'entrée de la phéromone dans la cellule.

c. Le transport des peptides de signalisation par le système Opp

Le système déclenchant la conjugaison d'*E. faecalis* exposé précédemment est directement dépendant de l'internalisation de la phéromone extracellulaire cCF10. Or il a été

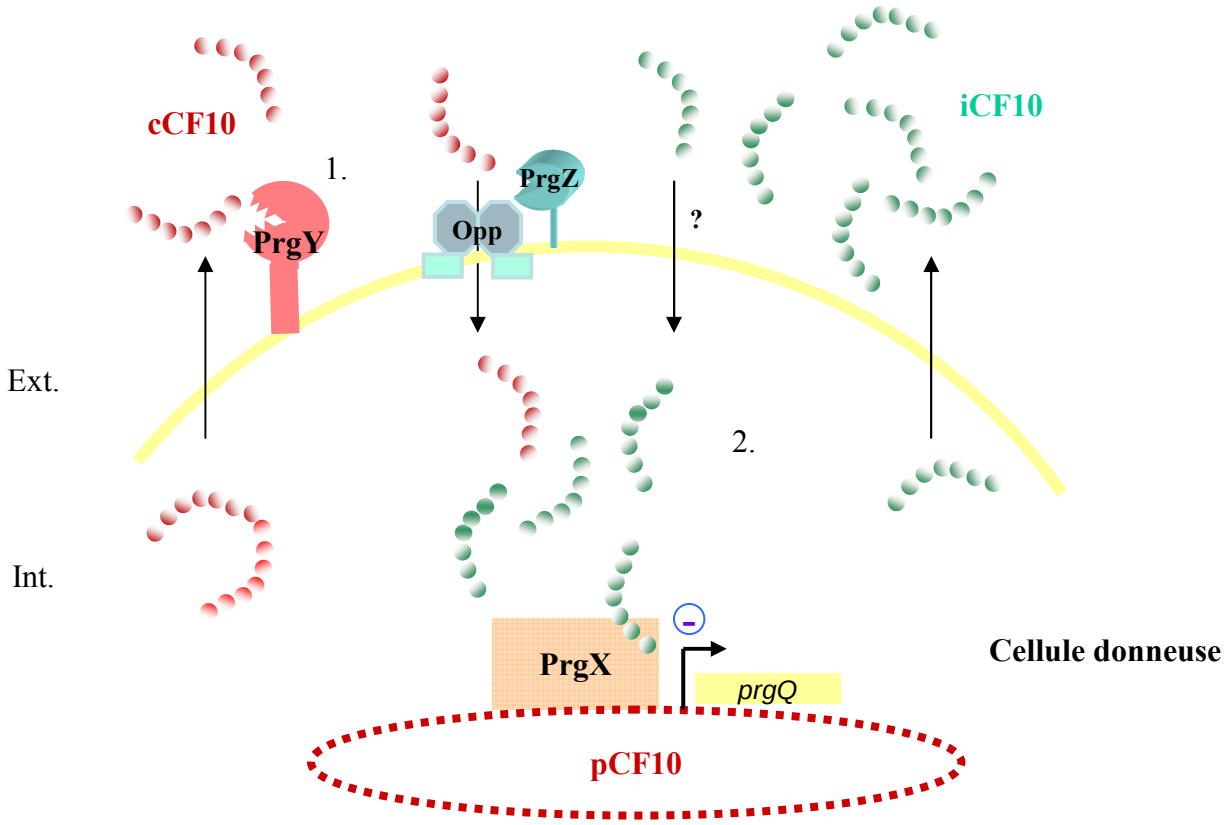


Fig.20 : Mécanismes empêchant l'autoinduction des phénomènes de conjugaison pour le transfert du plasmide pCF10 d' *E. faecalis*.

1. La protéine membranaire PrgY séquestre le peptide activateur cCF10 dès sa libération dans le milieu extracellulaire.

2. Le peptide inhibiteur iCF10 empêche la fixation sur PrgX des peptides cCF10 ayant pu échapper à PrgY par compétition et réprime les gènes de conjugaison

La cellule ne déclenchera le transfert de pCF10 que lorsque cCF10 sera en large excès par rapport à iCF10 c'est à dire en présence de cellules receveuses ne synthétisant ni PrgY ni iCF10.

d'après Kozlowicz *et al.* 2006

montré qu'une très faible concentration de peptide signal, 10^{-12} M, suffisait à enclencher le processus de transfert (Mori *et al.* 1988). La bactérie est donc capable d'internaliser la phéromone cCF10 de manière très efficace et spécifique. L'analyse génomique d'une souche d'*E. faecalis* contenant pCF10 a permis d'identifier plusieurs protéines potentiellement impliquées dans ce transport. En effet, *E. faecalis* possède un opéron codant un système de transport d'oligopeptides *opp* complet (*oppABCDF*) et un gène *prgZ* porté par pCF10 codant une protéine de fixation supplémentaire. Il a été montré que l'inactivation du gène *prgZ*, de même que l'inactivation d'*oppD*, provoquait une baisse drastique de la réponse de la cellule à des concentrations en phéromone cCF10 synthétique allant de 10^{-11} et 10^{-12} M (Leonard *et al.* 1996). Le peptide cCF10 est donc capté par la protéine de fixation PrgZ qui recrute alors le translocon du système Opp pour l'internaliser. Cependant une réponse résiduelle à cCF10 des cellules dans un mutant *prgZ-* (non observée dans un double mutant *prgZ-, oppD-*) suggère qu'une autre protéine de fixation, certainement OppA, pourrait également transporter la phéromone mais avec une efficacité moins importante. cCF10 pourrait donc avoir deux voies d'entrée : par PrgZ, qui fixe la phéromone avec une grande affinité et, si la concentration en phéromone est suffisante ($>5.10^{-11}$M), par OppA. Cependant, comme la concentration en cCF10 secrétées par les bactéries dans les surnageants de culture est de l'ordre de 2.10^{-11}M et qu'il y a certainement de nombreux peptides compétiteurs dans l'environnement, il est probable que dans des conditions naturelles, OppA n'ait aucun effet sur la conjugaison et que ce phénomène soit totalement aboli dans un mutant *prgZ-* (Leonard *et al.* 1996).

Outre son rôle dans l'internalisation de la phéromone cCF10, il a été proposé que PrgZ puisse interagir avec le peptide iCF10, qui entrerait en compétition avec cCF10 pour l'entrée dans la cellule. Ce phénomène contribuerait à l'effet inhibiteur d'iCF10 (Dunny et Leonard 1997). Cependant, les études récentes de Fixen et de ses collaborateurs en 2007, montrent que l'effet inhibiteur de iCF10 n'est pas atténué dans un mutant *prgZ-*, ce qui suggère l'absence de rôle de PrgZ dans le mode d'action de ce peptide qui serait internalisé par un autre transporteur. Le site majeur de compétition entre la phéromone et l'inhibiteur serait donc plus vraisemblablement le récepteur intracellulaire PrgX.

Des études sur l'interaction entre PrgZ et cCF10 ont montré que l'extrémité N-terminale du peptide était essentielle à sa fixation par la protéine (Leonard *et al*. 1996). De plus, les substitutions des résidus 3 (Thr→Ser) et 6 (Phe→Tyr) de la phéromone conduit à une moins grande efficacité de transport du peptide ainsi modifié (Fixen *et al.* 2007). Ces résultats, en plus du fait que le peptide iCF10 ne soit apparemment pas transporté par PrgZ, ne vont pas dans le sens d'une protéine de spécificité large même si une étude complète de

spécificité de substrat serait nécessaire pour confirmer cette hypothèse. On peut donc supposer que cette protéine de fixation a une spécificité de substrat restreinte, adaptée au transport efficace de la phéromone.

Aucune donnée supplémentaire concernant OppA et sa spécificité de substrat n'est disponible à ce jour. Cette protéine de fixation pourrait avoir un rôle nutritionnel, contrairement à PrgZ qui, par sa spécificité restreinte, ne peut probablement pas jouer cette fonction.

La stratégie développée par *E. faecalis* pour transporter efficacement à la fois les peptides nutritionnels permettant la croissance et un peptide signal spécifique à la communication intercellulaire serait donc de synthétiser deux protéines de fixation dédiées chacune dans leur fonction mais utilisant le même translocon. Le rôle nutritionnel d'OppA, en opposition à PrgZ, reste cependant à démontrer pour confirmer cette hypothèse. La protéine OppA de la souche d'*E. faecalis* séquencée et PrgZ présentent 43% d'identité protéique (Fig.21). Quelle(s) partie(s) de ces protéines est responsable de leur différence de spécificité de substrat et de fonction ? Aucune donnée ne permet à ce jour de répondre à ces questions.

Il est important de noter qu' *E. faecalis* utilise le même type de processus que celui détaillé auparavant pour le transfert d'autres plasmides que pCF10. Par exemple, le transfert du plasmide pAD1 qui confère la résistance aux UV et code une hémolysine / bactériocine, est effectué *via* des analogues aux déterminants du transfert de pCF10 (Tableau 5) : un peptide phéromone cAD1 de 8 acides aminés (Leu-Phe-Ser-Leu-Val-Leu-Ala-Gly), une protéine de fixation du peptide ayant une forte affinité pour cAD1, la protéine TraC (présentant 75% d'identité protéique avec PrgZ), un peptide inhibiteur iAD1…(Lazazerra 2001). Bien que présentant des fonctionnements très similaires, il est intéressant de constater qu'aucune induction croisée pour le transfert de ces deux plasmides n'est détectable, soulignant la haute spécificité de ces mécanismes (Clewell *et al.* 2002).

3) Sporulation et compétence chez *Bacillus subtilis*

La sporulation et la compétence sont des processus physiologiques bien distincts. Cependant ces phénomènes empruntent chez *B. subtilis* des voies de régulation comparables, *via* des peptides signaux. Ces réseaux de régulation présentent de plus des interconnections, c'est pourquoi il seront présentés en parallèle.

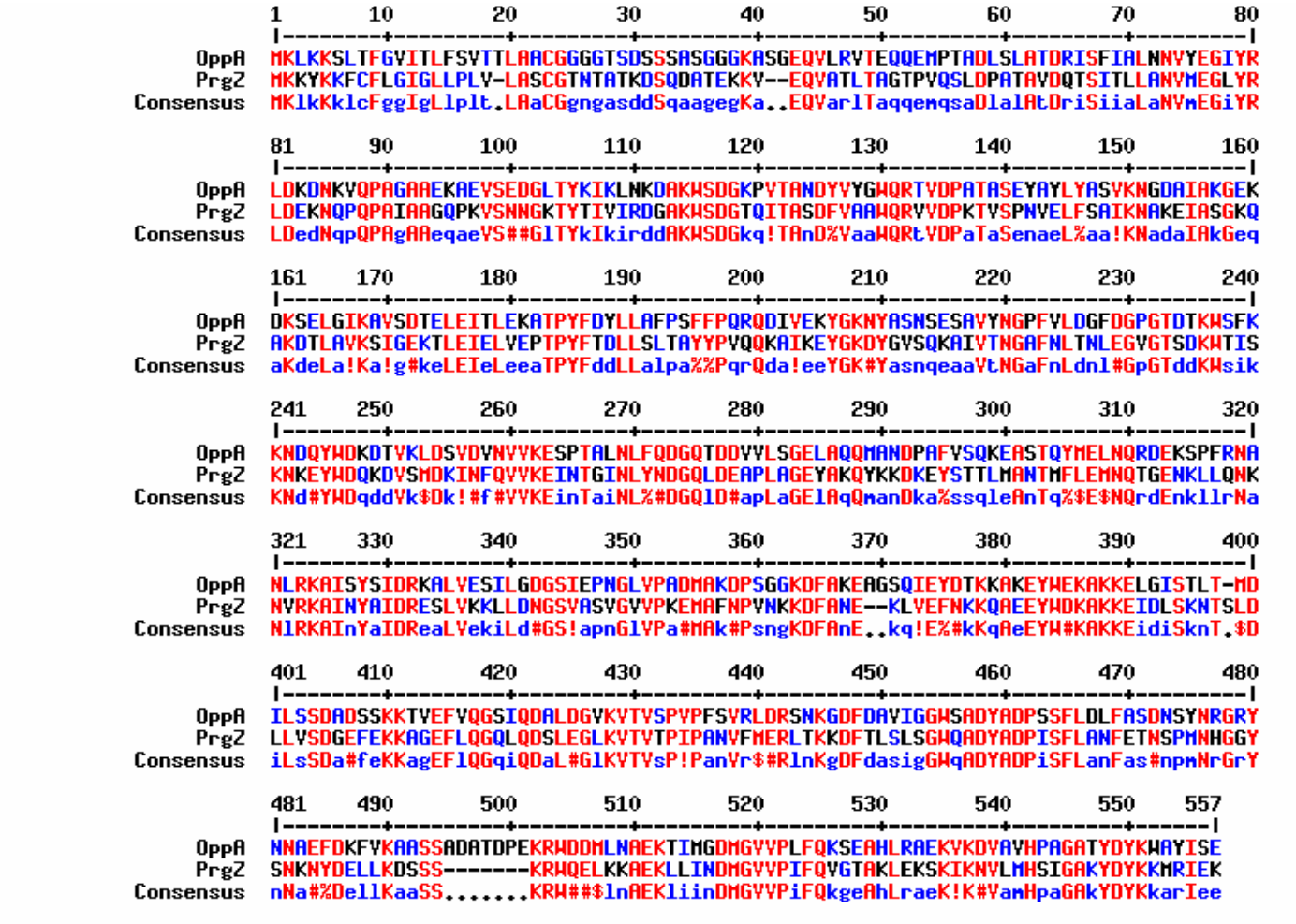


Fig.21 :Alignement des séquences des protéines de fixation OppA et PrgZ de *E. faecalis*.

Programme Multialin http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html

Fonction	Déterminant pour pCF10	Déterminant pour pAD1
Phéromone	cCF10	cAD1
Protéine de fixation du peptide	PrgZ	TraC
Régulateur négatif	PrgX	TraA
Peptide inhibiteur	iCF10	iAD1
Protéine “séquestrant” la phéromone	PrgY	TraB
Facteur d’agrégation	Asc10	Asa1

Tableau 5: Les principaux déterminants de la conjugaison des plasmides pC10 et pAD1 de *E. faecalis.*

d’après Lazazzera 2001

a. Mécanismes généraux de la sporulation et de la compétence

La sporulation est un phénomène de différenciation déclenché par l'épuisement du milieu en substrat nutritif ou par un environnement défavorable, qui implique le passage d'une bactérie de la forme végétative à la forme sporulée. La spore diffère de la cellule végétative par sa forme, sa structure, son équipement enzymatique et surtout par sa résistance à différents agents physiques et chimiques (résistance à la chaleur, aux radiations, aux hautes pressions, aux antibiotiques et aux désinfectants). De plus, leur longévité peut être importante (elle pourrait atteindre plusieurs milliers d'années pour certaines espèces de *Bacillus*). C'est donc un stade de « survie » permettant la mise à l'abri du génome face à des conditions extrêmes. Chez *B. subtilis*, bactérie de l'environnement à Gram positif, le processus se déroule en plusieurs étapes contrôlées par un ensemble de régulateurs transcriptionnels (facteurs σ) qui conditionnent le passage d'une étape à l'autre (Fig.22) (Stragier et Losick 1990). Placée dans des conditions favorables (eau, glucose, acides aminés) la spore va ensuite donner naissance à une nouvelle cellule végétative.

Une bactérie est dite compétente lorsqu'elle se trouve dans un état physiologique lui permettant de subir une transformation génétique, c'est-à-dire d'incorporer de l'ADN exogène. La compétence naturelle, par opposition à la compétence artificielle obtenue par traitement chimique ou enzymatique, est un état génétiquement programmé qui n'a été observé que chez une quarantaine d'espèces bactériennes : par exemple *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. et *B. subtilis* pour les bactéries à Gram positif, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria* spp., et *Acinetobacter* spp pour les bactéries à Gram négatif. On ne peut cependant pas exclure que la transformation naturelle soit un phénomène répandu mais difficile à mettre en évidence expérimentalement (Claverys et Martin 2003). Ce mécanisme permet à la bactérie réceptrice d'augmenter la diversité de son potentiel génétique et serait en partie responsable de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques chez certains pathogènes. D'autres fonctions de la transformation ont été également décrites telles que la réparation des lésions de l'ADN par l'incorporation d'ADN potentiellement homologue, ou l'incorporation de sources nucléotidiques à vocation nutritionnelle (Solomon et Grossman 1996).

Chez *B. subtilis*, l'internalisation de l'ADN exogène nécessite la mise en place d'une machinerie de transport constituée de nombreuses protéines (Fig.23) : la protéine ComGC qui permet l'accès de l'ADN à la protéine de fixation ComEA qui le transmet alors à une nucléase

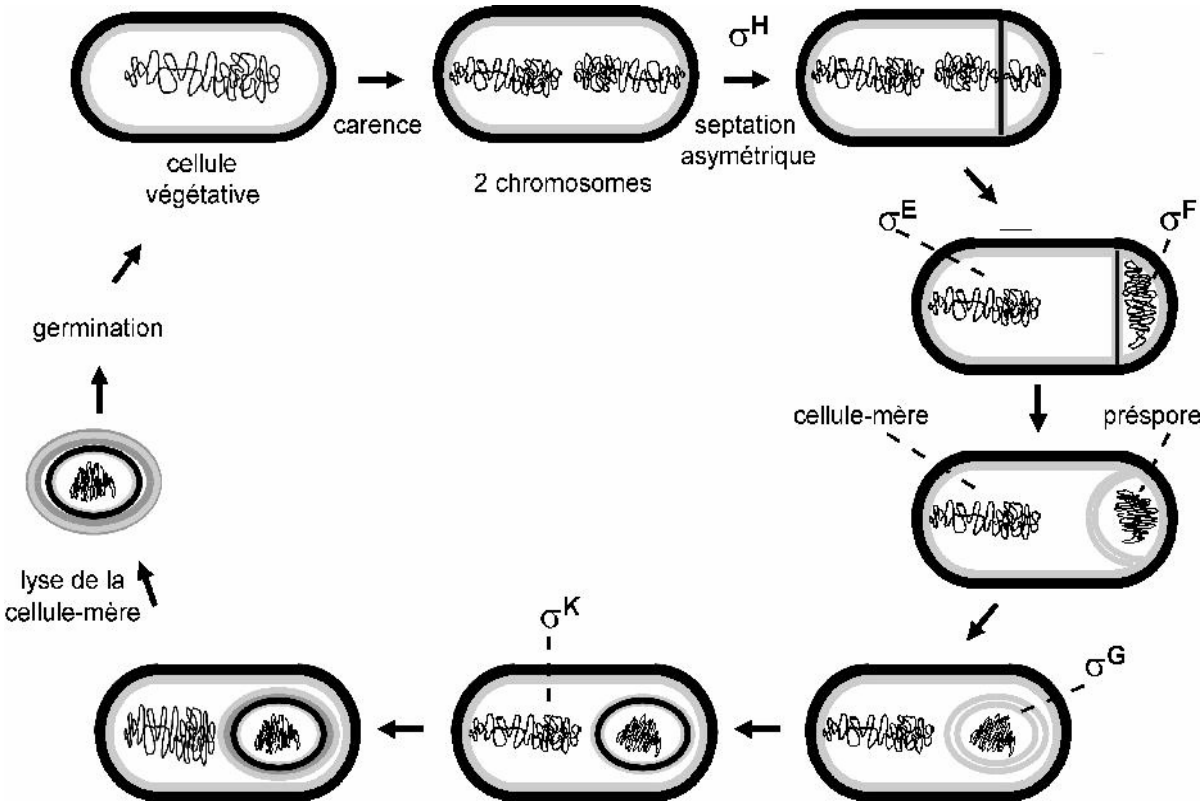


Fig.22 : Les étapes physiologiques de la sporulation chez *B. subtilis*

http://www.ibpc.fr/UPR9073/psfr.html

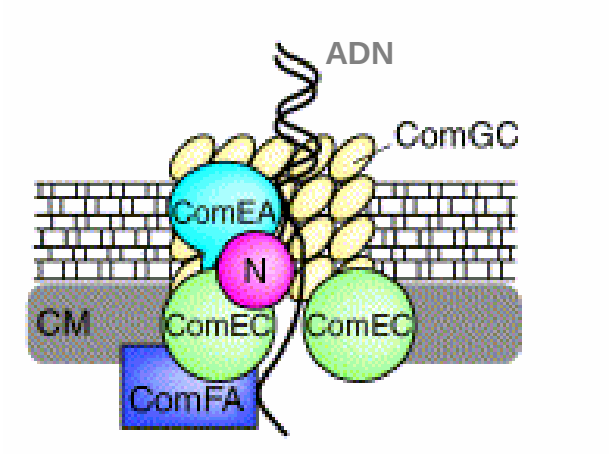


Fig.23 : La machinerie d'internalisation d'ADN exogène de *B. subtilis*

CM: membrane cytoplasmique

N: nucléase

Claverys et Martin 2003

qui le dégrade partiellement pour donner un ADN simple brin. Cet ADN est ensuite transféré dans le cytosol par la translocase ComFA (ATP dépendante) au travers d'un canal membranaire aqueux formé par les protéines ComEC. L'ensemble de la synthèse de ces protéines est finement contrôlé par différents facteurs, principalement par le régulateur ComK, qui lui-même est activé par le facteur transcriptionnel ComA (Claverys et Martin 2003).

b. La régulation de la sporulation et de la compétence par des peptides signaux

(i) La régulation de la sporulation

L'initiation de la transcription des premiers gènes de la sporulation est induite par le facteur de transcription Spo0A. Pour exercer son rôle d'inducteur, cette protéine doit être phosphorylée. Cette phosphorylation est effectuée *via* plusieurs protéines « relais » : au moins par 4 protéines kinases (KinA,B,C,D) (Jiang *et al.* 2000), par le régulateur de réponse Spo0F, et par la phosphotransférase Spo0B (Perego *et al.* 1994) (Fig.24). Plusieurs régulateurs exercent une fonction répressive sur les différents acteurs de cette cascade de phosphorylation, favorisant ainsi la forme végétative. Tout d'abord la phosphatase Spo0E, dont le système de régulation est inconnu et qui empêche la phosphorylation de Spo0A (Ohlsen *et al.* 1994). Au moins trois autres phosphatases vont agir sur Spo0F, les protéines RapA, RapB et RapE dont l'activité est contrôlée respectivement par les peptides PhrA, PhrC (aussi appelée CSF pour Competence and Sporulation stimulating Factor) et PhrE (Perego 1997 ; Jiang *et al*. 2000) (Fig.24). Les gènes *phr* codent des protéines d'une quarantaine d'acides aminés portant un peptide signal d'exportation par la machinerie Sec. Les protéines Phr sécrétées sont alors clivées par des peptidases non identifiées pour donner un pentapeptide de séquence ARNQT pour PhrA, ERGMT pour PhrC et SRNVT pour PhrE (Stephenson *et al.* 2003). Ces pentapeptides, une fois réinternalisés, vont exercer une fonction répressive spécifique de mécanisme inconnu sur les protéines Rap. En inhibant l'activité de ces phosphatases, les peptides Phr favorisent donc le déclenchement du processus de sporulation (Fig.24).

La réinternalisation des peptides Phr par le système de transport Opp (également appelé spo0K chez *B. subtilis*) a été établie par différentes approches :

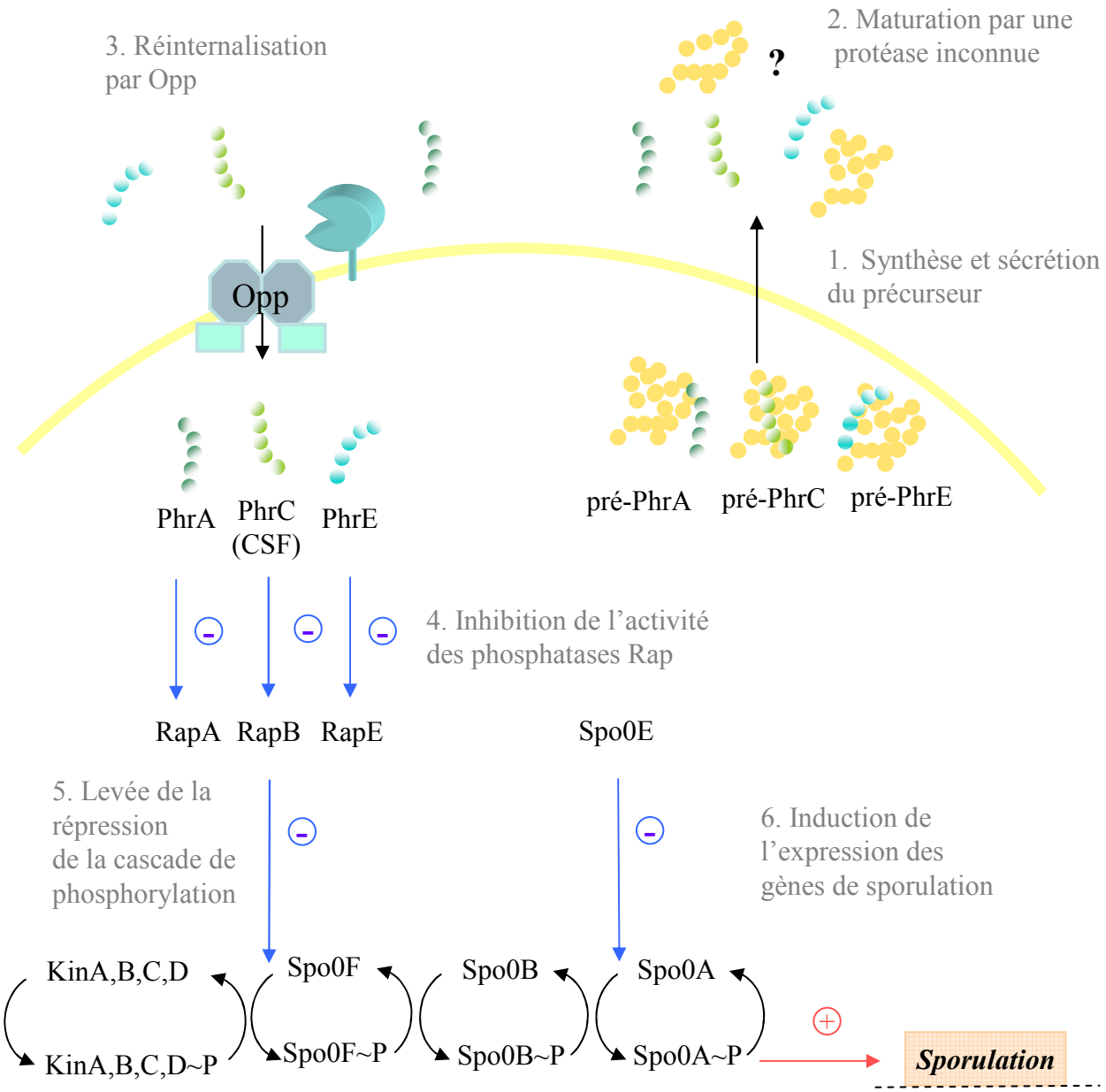


Fig.24 : Mécanisme de régulation de la sporulation chez *B. subtilis*. Les flèches bleues indiquent une inhibition de l'activité des protéines cibles. La flèche rouge indique une induction de la transcription des gènes cibles.

d'après Perego et Hoch 1996 ; Jiang *et al*. 2000

- Tout d'abord la sporulation d'un mutant *opp*- est très affectée (Perego *et al.* 1991 ; Rudner *et al.* 1991). Ce défaut de sporulation est complémenté par l'inactivation supplémentaire de RapA et RapB, indiquant qu'Opp joue un rôle dans l'inhibition des phosphatases (Perego et Hoch 1996).
- D'autre part la mise en contact de cellules *phrA*-, incapables de sporuler, avec le surnageant d'un mutant *opp*- permet de restaurer la sporulation, contrairement à la mise en contact avec le surnageant d'une souche sauvage. Ce résultat indique que le peptide PhrA s'accumule dans le surnageant d'un mutant *opp*- alors qu'il est réinternalisé lorsque le transporteur de peptides est présent (Perego et Hoch 1996).
- Enfin il a été montré qu'un mutant *phrC*- était capable d'internaliser un peptide PhrC synthétique marqué radioactivement à des concentrations extracellulaires pouvant descendre jusqu'à 2 nM alors qu'aucune radioactivité intracellulaire n'a pu être détectée chez des mutants *opp*- même à des concentrations en peptides plus élevées (10 nM). Cette expérience montre clairement que la phéromone PhrC est internalisée exclusivement par le transporteur Opp (Solomon *et al.* 1996).

L'induction de la sporulation chez *B. subtilis* est donc un phénomène complexe, contrôlé par un système d'export de plusieurs peptides de signalisation réimportés par un même transporteur Opp. Ce mode de fonctionnement est également impliqué dans la régulation d'un autre phénomène, la compétence.

(ii) La régulation de la compétence

L'induction de l'expression des gènes de la compétence est provoquée par le régulateur transcriptionnel ComK. Celui-ci ne peut adopter une conformation active qu'en présence de la protéine ComS (Claverys *et al*. 2006) transcrite au sein de l'opéron *srfA* dont l'expression est contrôlée par le régulateur de réponse ComA (Roggiani et Dubnau 1993) (Fig.25). Pour induire la transcription de *comS*, ComA doit être phosphorylée. Sa phosphorylation est soumise à deux types de régulation impliquant des phéromones :

- ComX est une phéromone de 10 acides aminés, synthétisée dans un premier temps sous forme de précurseur inactif, clivée, modifiée par isoprenylation d'un résidu tryptophane conservé (Ansaldi *et al.* 2002) puis exportée dans le milieu extracellulaire. La formation d'une phéromone active nécessite de plus la présence de la protéine ComQ dont la fonction n'a pas été établie (Magnuson *et al.* 1994). Comme toutes les phéromones peptidiques ayant subi des modifications post-traductionnelle connues, ComX présente un mode d'action

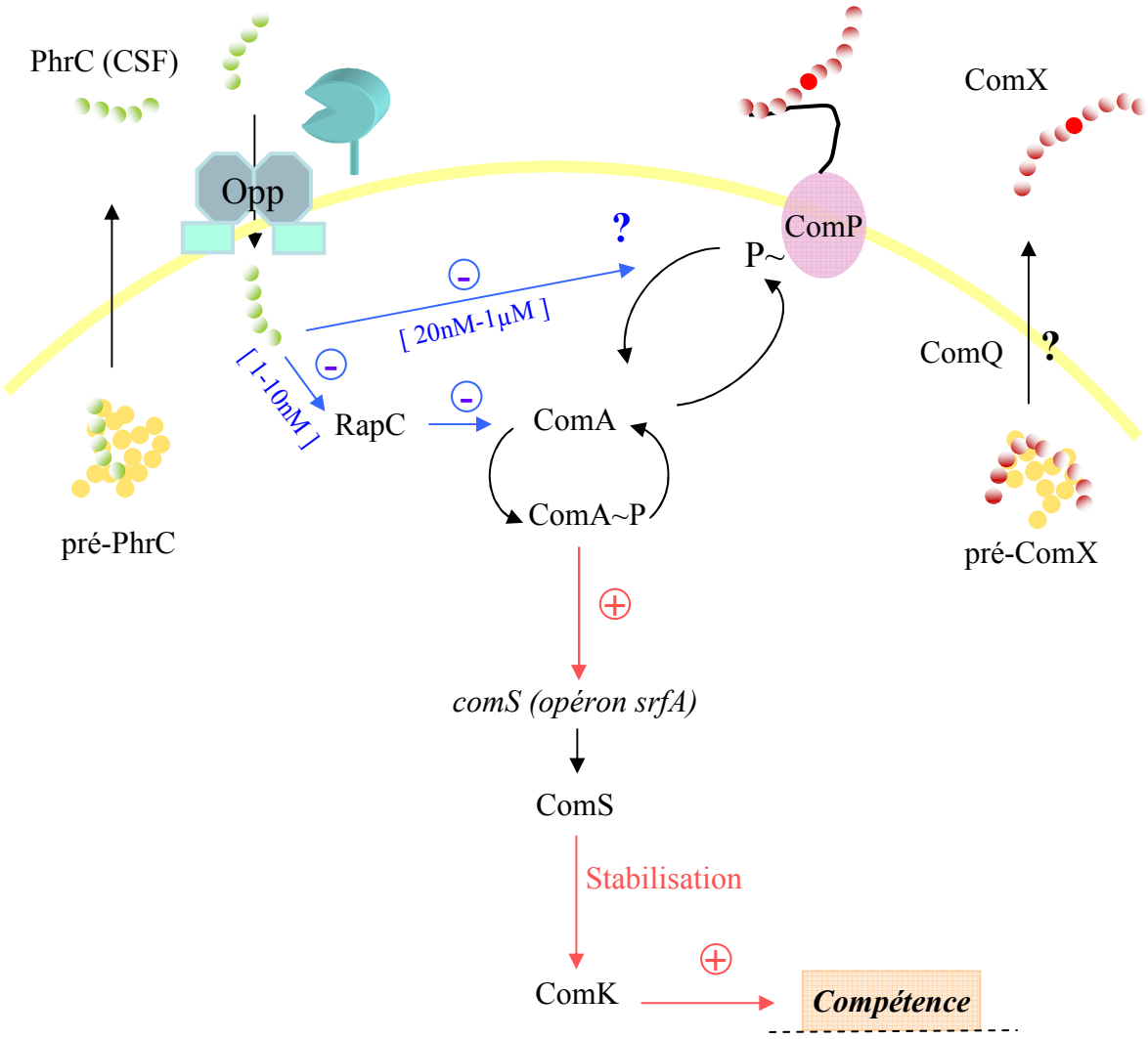


Fig.25 : Mécanisme de régulation de l'expression des gènes de la compétence chez *B. subtilis*. Les flèches bleues indiquent une inhibition de l'activité des protéines cibles. Les chiffres bleus entre crochets indiquent une concentration en phéromone.
Les flèches rouges indiquent une induction de l'activité / de la transcription des protéines / des gènes cibles.

d'après Solomon *et al.* 1996

extracellulaire. Elle est en effet détectée par le récepteur membranaire à histidine kinase ComP qui, au contact de la phéromone s'autophosphoryle et transmet son groupement phosphate au régulateur de réponse ComA (Fig.25). Cette voie de régulation conduit alors à l'activation du phénomène de compétence.

- PhrC (CSF) est un pentapeptide dont la synthèse a été décrite précédemment. En effet, ce peptide a une double fonction puisqu'il intervient à la fois dans la régulation de la sporulation et dans celle de la compétence. L'activité de cette phéromone va dépendre de sa concentration extracellulaire. En effet, à faible concentration (1-10nM) PhrC stimule la phosphorylation de ComA en inhibant l'activité de la phosphatase RapC (Fig.25). A plus forte concentration (20nM-1µM), elle inhibe la phosphorylation de ComA par un mécanisme inconnu, probablement en interagissant avec ComP (Lazarezza *et al.* 1997). L'activité stimulatrice observée à faible concentration n'est alors plus perceptible, la cascade de phosphorylation étant interrompue en amont. C'est également à forte concentration que cette phéromone a un rôle dans la stimulation de la sporulation en inhibant la phosphatase RapB (voir ci-dessus). Dans tous les cas, PhrC a une cible intracellulaire et est internalisée par le système Opp.

(iii) Des réseaux interconnectés

L'initiation de la sporulation et de la compétence fait donc intervenir une multitude de peptides signaux ayant, mise à part ComX, toutes des cibles intracellulaires. Bien qu'il ait été montré que les peptides PhrA et PhrC pouvaient être accumulés dans le surnageant de cultures bactériennes saturées (Perego et Hoch 1996 ; Lazazzera *et al.* 1999), leur rôle en tant qu'indicateur de densité bactérienne est controversé. Certains auteurs proposent que ces peptides soient plutôt des signaux permettant de coordonner les processus de sporulation et de compétence que des phéromones de *quorum sensing* (Claverys *et al.* 2006). En effet, il a été montré que les voies de régulation de ces deux phénomènes physiologiques étaient interconnectées, d'une part par l'utilisation de PhrC comme phéromone, mais aussi sur plusieurs points supplémentaires. Par exemple, le régulateur de réponse ComA impliqué dans le déclenchement de la compétence, induit la synthèse de la phosphatase RapA qui empêche le déclenchement de la sporulation (Mueller *et al.* 1992). Les différents liens existant entre ces systèmes permettent d'empêcher le déclenchement concomitant de la sporulation et de la compétence. Les peptides Phr pourraient alors servir de messagers permettant un dialogue entre différents processus physiologiques. Dans ce cas, ces phéromones affecteraient

principalement la cellule qui les produit et ne joueraient pas ou peu de rôle dans la communication intercellulaire.

c. Le système Opp de *B. subtilis* : un transporteur multifonctionnel. Et le système App ?

Nous avons vu précédemment que différents peptides impliqués dans la régulation de la sporulation et de la compétence étaient internalisés par le transporteur Opp. Ce même transporteur a été montré comme étant impliqué dans le transport de peptides à vocation nutritionnelle de 3 à 5 acides aminés sans spécificité particulière de séquence (Koide et Hoch 1994). Chez *B. subtilis*, contrairement à *E. faecalis* qui possèderait une protéine de fixation de peptides dédiée à la nutrition et une dédiée au transport de phéromone, c'est donc le même système qui exerce les deux fonctions. Dans ce cas, dans un milieu riche, les peptides à vocation nutritionnelle entrent-ils en compétition avec les phéromones pour se fixer sur Opp ou le transporteur a-t-il développé une affinité particulière pour les peptides de signalisation ? Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'étudier l'affinité du transporteur pour différents peptides.

Il est de plus, important de noter la présence chez la plupart des souches de *B. subtilis* d'un second ABC-transporteur de peptides, le système App (A Peptide Permease). En effet, les études mentionnées précédemment sur la régulation de la sporulation et de la compétence ont été effectuées sur la souche de laboratoire BS168, qui possède une mutation empêchant la synthèse de ce transporteur. App est un système complet possédant 5 protéines codées par des gènes dans l'ordre *appDFABC* et présentant une identité protéique avec Opp allant de 54.2% entre OppF et AppF à 22% entre OppA et AppA. Koide et Hoch en 1994 ont construit différentes souches possédant un transporteur App fonctionnel. Une étude de spécificité de substrat sur une souche Opp- App+ a permis de déterminer que ce dernier transporteur était capable de transporter des tétra- et des pentapeptides mais pas de tripeptides contrairement à Opp, révélant une spécificité de substrat légèrement différente entre les deux systèmes. Concernant le transport de peptides signaux, il a été montré que App pouvait restaurer la sporulation et la compétence d'un mutant *opp*- (Koide et Hoch, 1994). De plus, la présence des deux transporteurs dans la même souche permet d'augmenter de 50% l'efficacité de la sporulation et de 30% celle de la compétence. Opp et App sont donc capables l'un et l'autre d'assurer la fonction de transporteur de phéromone avec la même efficacité. Dans ce cas, quel

est l'intérêt pour la bactérie de synthétiser deux systèmes distincts plutôt que d'en synthétiser un seul en plus grande quantité ?

Leur spécificité de substrat est à priori assez proche puisqu'elle ne semble différer que sur le transport des tripeptides. Cependant ces études de spécificité sont très incomplètes, notamment pour le transport de peptides de plus de 5 acides aminés. Il a été d'ailleurs montré qu'AppA était capable de fixer un nonapeptide (Levdikov *et al*. 2005). Des études supplémentaires seraient donc nécessaires pour déterminer plus précisément la spécificité de ces transporteurs et déceler d'éventuelles différences entre eux.

Une autre explication serait que les transporteurs sont exprimés, et donc régulés, différemment. En effet il a été montré qu'Opp est exprimé pendant la phase exponentielle et en début de phase stationnaire alors qu'App est exprimé plus tardivement, en phase stationnaire (Koide *et al.* 1999). Cependant les régulateurs à l'origine de ces différences d'expression au cours de la croissance ne sont pas connus et l'avantage que peut tirer *B. subtilis* de la présence de ces deux transporteurs, reste mal compris.

4) L'induction des gènes de virulence de *Bacillus thuringiensis*

a. La virulence de *B. thuringiensis*

B. thuringiensis est une bactérie sporulante à Gram positif, pathogène des insectes. Elle appartient au groupe *B. cereus* qui comprend notamment les espèces *B. cereus*, pathogène alimentaire opportuniste, et *B. anthracis* dont les toxines sont responsables de la maladie du charbon, avec lesquelles elle partage de hauts degrés de similitude de séquence chromosomique. Leurs spécificités respectives (hôte et maladies provoquées) sont essentiellement dues à la présence ou non de gènes plasmidiques (Rasko *et al.* 2005).

Le pouvoir pathogène de *B. thuringiensis* est en partie lié à la production de cristaux protéiques, les toxines Cry, dont les gènes sont portés par des plasmides et qui sont spécifiquement actives contre les larves d'insectes. Outre ces toxines, *B. thuringiensis* produit un certain nombre de facteurs de virulence potentiels tels que des phospholipases (PlcA et PlcB), des entérotoxines et des hémolysines (HblC, Nhe). La transcription des gènes codant ces facteurs est activée par le régulateur pléiotrope PlcR, qui est spécifique du groupe *B. cereus*, et qui va se fixer sur une séquence consensus ($TATGNAN_4TNCATA$), la « PlcR box » située en amont des promoteurs des gènes cibles (Agaisse *et al.* 1999). Au total, une quinzaine de gènes ont été montrés comme appartenant au régulon *plcR*, dont le gène *plcR*

lui-même ce qui implique que ce régulateur est capable de s'autoinduire (Lereclus *et al*. 1996).

b. L'activation de PlcR par un peptide signal

Gominet et ses collaborateurs en 2001 ont montré par mutagenèse insertionnelle aléatoire qu'une perméase Opp était impliquée dans l'induction de l'expression de *plcR* ainsi que dans l'expression des autres gènes de son régulon. Il a alors été suggéré que l'activation de PlcR soit sous la dépendance d'un phénomène de type *quorum sensing* impliquant l'import d'un peptide signal. Le mécanisme complet (Fig. 26) a ensuite été élucidé en 2002 par Slamti et Lereclus qui ont émis l'hypothèse qu'un petit gène, situé juste en amont de *plcR* et codant un peptide de 48 acides aminés possédant un peptide signal de sécrétion, puisse être impliqué dans l'activation de PlcR. Un mutant de ce petit gène présente les mêmes phénotypes qu'un mutant *plcR*- (baisse drastique de l'expression des gènes du régulon *plcR*, atténuation de la virulence contre les insectes). Le peptide codé par ce gène, appelé PapR (Peptide activating PlcR) est donc vraisemblablement impliqué dans l'activation de PlcR. L'ajout dans le surnageant de culture de peptides synthétiques de différentes tailles correspondant à l'extrémité C-terminale du peptide PapR montre qu'il faut au minimum un pentapeptide (LPFEF) pour complémenter les phénotypes de mutants *papR*-. Le peptide PapR subit donc certainement deux modifications après sa synthèse : le clivage de son peptide signal puis une maturation supplémentaire par une protéase extracellulaire non identifiée qui libère un pentapeptide actif (Fig.26). Ce peptide présente un mode d'action intracellulaire puisque la production d'un pentapeptide synthétique à l'intérieur de la cellule complémente également les phénotypes des mutants, ce résultat étant cohérent avec les phénotypes observés chez le mutant *opp*-. Il a également été montré *in vitro* que la présence de PapR à un ratio 1/1 était indispensable pour que la protéine PlcR purifiée se fixe efficacement sur un fragment d'ADN correspondant à la « PlcR box ». Cela montre donc qu'il existe une interaction directe entre PapR et la protéine PlcR, augmentant l'affinité de cette dernière pour sa cible d'ADN, probablement par changement de conformation (Slamti et Lereclus 2002).

L'activation de PlcR est donc permise par un système d'export puis d'import *via* Opp du peptide signal PapR. *In vivo*, PlcR est induit en début de phase stationnaire, c'est-à-dire à haute densité bactérienne (Slamti et Lereclus 2002). On peut donc supposer que pour être réimporté PapR doit atteindre une concentration extracellulaire seuil nécessitant une haute

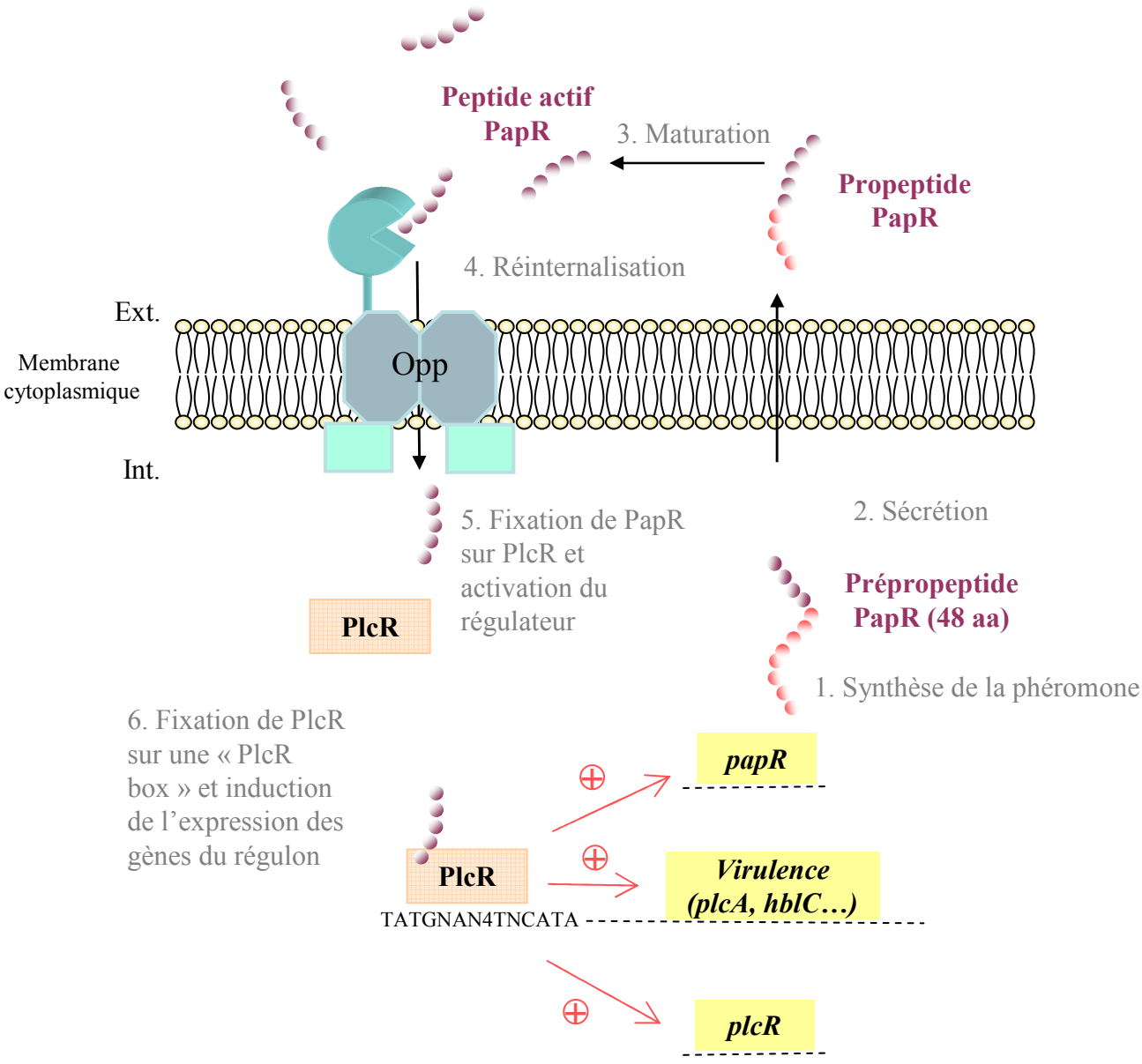


Fig.26 : Mécanisme d'induction de l'expression des gènes du régulon *plcR* de *B. thuringiensis*.

d'après Slamti et Lereclus 2002

densité de population. Ce phénomène s'apparenterait donc bien à du *quorum sensing* au sens strict.

On peut noter de plus que les gènes *plcR* et *papR* sont également présents et fonctionnels chez *B. cereus* et que PlcR régule l'expression des mêmes gènes cibles que *B. thuringiensis*. Il est donc très probable, même si aucune expérience à ce sujet n'a été effectuée sur cette bactérie, que le phénomène de communication par PapR décrit précédemment soit transposable à *B. cereus*. En revanche, une mutation dans le gène *plcR* de *B. anthracis* empêche la synthèse du régulateur transcriptionnel (Slamti et Lereclus 2005).

Des tests d'activation croisés entre phéromones PapR et régulateurs PlcR de plusieurs souches du groupe *B. cereus* ont permis de montrer ainsi qu'il existait une spécificité d'activation selon les souches, déterminée par le premier résidu du pentapeptide (Slamti et Lereclus 2002). Ainsi il existe 4 groupes distincts de phéromone PapR, associés chacun à un régulateur PlcR. Aucune activation croisée entre phéromone et régulateur de groupe différents n'est possible ce qui souligne la grande spécificité de l'interaction entre la phéromone et son régulateur (Slamti et Lereclus 2005).

c. Un système Opp spécifique ?

Le système Opp caractérisé précédemment permet donc l'entrée du peptide PapR. Ce même transporteur semble également impliqué dans un autre phénomène puisque le mutant *opp*- présente un défaut important de sporulation en milieu de laboratoire LB. Cependant ce phénotype semble milieu-dépendant puisque dans un milieu chimiquement défini aucune différence de sporulation n'est observée (Gominet *et al.* 2001). Par analogie avec *B. subtilis*, on peut alors penser que ce système Opp permet l'entrée d'une phéromone type Phr qui agirait sur le régulateur Spo0A, présent également chez *B. thuringiensis*. L'absence de phénotype en milieu chimiquement défini pourrait s'expliquer par exemple, par une expression très faible dans ce milieu du transporteur Opp mis en évidence. Un autre transporteur de peptides prendrait alors le relais et assurerait le transport de la phéromone dans ces conditions.

Il faut noter en effet, que les souches de *B. thuringiensis* séquencées possèdent dans leurs génomes un nombre exceptionnel de transporteurs de peptides Opp putatifs. Ainsi par analyse bioinformatique on peut trouver sur le chromosome 6 opérons *opp* complets (*oppA,B,C,D,F*), 10 gènes codant des OppA putatives indépendantes, plus des gènes codant

des OppA supplémentaires sur plasmide. Devant un nombre si important de transporteurs il est intéressant de constater qu'aucun des autres systèmes ne peut compenser la mutation d'un seul Opp en ce qui concerne l'import du peptide PapR. Cela suggère une spécialisation fonctionnelle de ces systèmes comme chez *E. faecalis*.

Aucune étude n'a été effectuée concernant l'import de peptides nutritionnels. Il serait cependant intéressant de déterminer lequel ou lesquels de ce(s) système(s) est impliqué dans cette fonction. On peut supposer qu'un autre système que celui identifié par le transport de PapR soit impliqué dans la nutrition. Dans ce cas, la multiplication de ces transporteurs chez *B. thuringiensis* pourrait s'expliquer par une spécialisation des Opp, chacun ayant sa fonction propre avec une affinité de substrat adaptée (large pour les transporteurs dédiés à la nutrition, restreinte mais efficace pour les transporteurs de phéromone). Une autre hypothèse pourrait être qu'il y ait une redondance fonctionnelle entre les différents systèmes mais qu'ils présentent des conditions d'expression et des régulations spécifiques à chacun. Finalement la réalité se place peut être entre les deux : des groupes de systèmes ou de protéines de fixation spécialisés dans une fonction précise mais ayant au sein du groupe des conditions d'expression différentes.

5) Conclusion

Les mécanismes d'induction de la conjugaison chez *E. faecalis*, d'induction de la sporulation et de la compétence chez *B. subtilis* et de la régulation des gènes de virulence de *B. thuringiensis* illustrent l'importance des systèmes Opp dans le transport de peptides de signalisation. Or les gènes codant les différents composants nécessaires à cette forme de communication (peptides sécrétés, protéases extracellulaires, transporteurs de peptides) sont largement répandus au sein des génomes bactériens. On peut alors penser que ces phénomènes de communication peuvent se dérouler également chez d'autres bactéries à Gram positif. Plusieurs études mettent d'ailleurs en relation les transporteurs de peptides avec les phénomènes décrits précédemment. Ainsi, il a été montré que le système Opp était indispensable à la formation de spores matures chez *Streptomyces coelicolor* (Nodwell *et al*. 1996) et que ce phénotype est lié à la présence dans le surnageant d'un facteur sécrété, probablement un oligopeptide (Nodwell et Losick 1998). Bien que la phéromone n'ait pu être isolée, ni le mécanisme totalement élucidé, il semble très réaliste de penser que chez cette

bactérie également, la sporulation soit contrôlée par un peptide de signalisation réimporté par Opp comme chez *B. subtilis*.

Dans la partie qui suit nous verrons que chez plusieurs bactéries pathogènes, les transporteurs de peptides ont été montrés comme impliqués dans la synthèse de facteurs de virulence ou dans la survie de la bactérie lors de l'infection. Cependant, au contraire des exemples développés précédemment, aucun mécanisme n'a été mis en évidence pour expliquer le rôle des transporteurs de peptides dans les différents phénomènes. C'est pour cela que ces exemples seront traités dans un paragraphe à part. Pour chaque étude, les différentes hypothèses pouvant expliquer la relation entre les transporteurs de peptides et les phénotypes qui y sont associés seront discutées.

C. Les transporteurs de peptides : les mécanismes non élucidés

1) *Streptococcus pneumoniae* : trois protéines de fixation des peptides et trois phénotypes associés

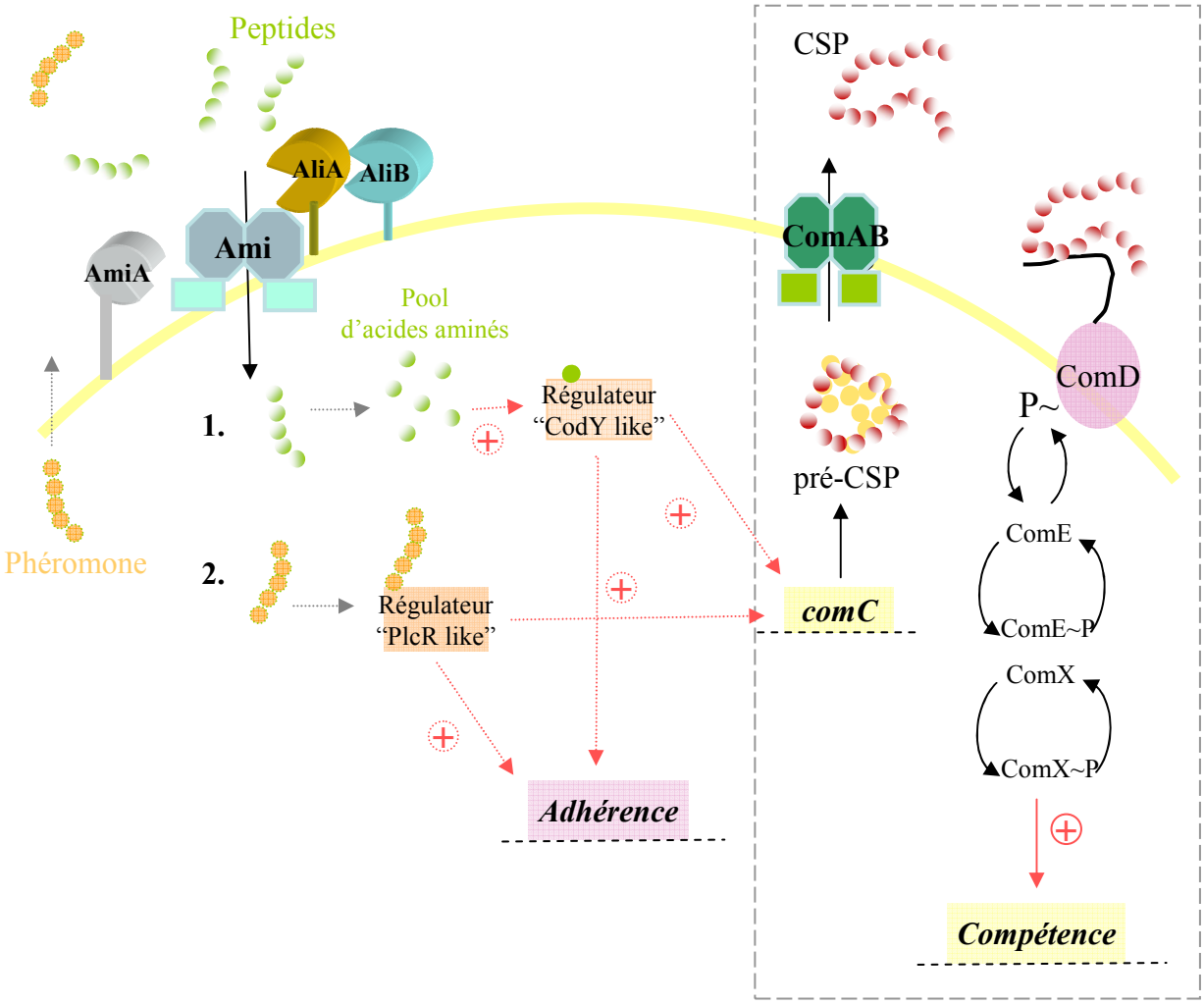
Streptococcus pneumoniae (couramment appelé pneumocoque) est une bactérie à Gram positif et un important agent pathogène humain. C'est en effet la cause la plus commune de méningites bactériennes chez l'adulte et est également fréquemment associé à des cas de pneumonies et d'otites.

Cette bactérie possède dans son génome un opéron *amiA,C,D,E,F*, homologue à *opp*, ainsi que deux gènes codant des protéines de fixation supplémentaires, AliA et AliB présentant plus de 60% d'identité avec AmiA. Des tests de croissance en milieu chimiquement défini dans lequel un acide aminé essentiel n'est apporté que sous forme de peptides a permis de montrer que les trois protéines de fixation étaient fonctionnelles, utilisaient le même translocon AmiCDEF pour transporter les peptides, et présentaient des spécificités de substrat différentes, en partie recouvrantes (Alloing *et al.* 1994). Différents phénotypes ont été ensuite associés à des mutations du système Ami.

a. Un rôle dans la régulation de la compétence

Le lien entre transporteur de peptides et compétence chez *S. pneumoniae* a été établi à partir de plusieurs constatations (i) une insertion dans le gène *aliB* abolit l'induction spontanée de la compétence (Alloing *et al.* 1994), (ii) des mutants *aliA* présentent une baisse drastique d'efficacité de transformation (Pearce *et al.* 1994) et (iii) un triple mutant *amiA,aliA,aliB*- est affecté dans la régulation de son cycle de compétence au cours de la croissance (Alloing *et al.* 1996). L'ensemble de ces résultats indique que le système Ami/Ali joue un rôle dans la régulation de l'induction de la compétence. Or il a été montré que ce phénomène était, chez *S. pneumoniae*, contrôlé par un heptadecapeptide non modifié, secrété dans le surnageant, appelé CSP (Compétence Stimulating Peptide). L'hypothèse d'une internalisation de CSP par le système Ami/Ali a été testée en mesurant l'efficacité de transformation du triple mutant *amiA,aliA,aliB*- en présence de peptides CSP synthétiques. Les résultats montrent qu'aucune des protéines de fixation n'est nécessaire à l'induction de la compétence *via* CSP infirmant l'hypothèse proposée (Alloing *et al*. 1996). Le mécanisme d'action de CSP, ensuite élucidé, indique qu'il s'agit une phéromone à mode d'action extracellulaire (et qui n'a donc pas besoin d'être internalisée par un transporteur de peptides) puisqu'elle se fixe sur un système à deux composantes membranaire (ComDE), qui lui-même permet d'activer un régulateur de réponse à l'origine de l'induction des gènes de compétence (Fig.27) (Claverys *et al*. 2006).

Il a été alors proposé par Claverys et ses collaborateurs en 2000, que le système Ami/Ali soit impliqué dans la compétence en tant que « senseur » de l'environnement. En transportant des peptides, le système jouerait sur le pool d'acides aminés intracellulaire qui lui-même contrôlerait un régulateur global, à la manière de CodY chez *L. lactis* ou Lrp chez *E. coli* (cf paragraphe précédent : Les transporteurs de *L. lactis* : un rôle dans la perception de l'environnement) (Fig. 27). Même si un gène codant un régulateur CodY putatif est présent dans le génome de *S. pneumoniae*, ce mécanisme n'a toutefois pas été démontré et d'autres hypothèses peuvent être envisagées. On peut penser notamment que le système Ami/Ali puisse faire entrer une phéromone, différente de CSP mais pouvant également intervenir dans l'induction de la compétence (Fig.27). Ce type de régulation par deux phéromones ayant deux modes d'action distincts a d'ailleurs déjà été décrit concernant l'induction de la compétence par *B. subtilis* (la phéromone à mode d'action extracellulaire ComX et celle à mode d'action intracellulaire PhrC, cf paragraphe précédent : Sporulation et compétence chez *B. subtilis*).



Différentes hypothèses pouvant expliquer le rôle du transporteur de peptides Ami/Ali dans la compétence et l'adhérence aux cellules eucaryotes

Mécanisme d'induction de la compétence par CSP

Fig.27 : La régulation de la compétence et de l'adhérence aux cellules eucaryotes *via* le transporteur de peptides Ami chez *S. pneumoniae*, deux voies envisageables.

Hypothèse 1: Les peptides du milieu sont importés par le transporteur Ami/Ali, dégradés en acides aminés, et constituent un pool intracellulaire d'acides aminés. Certains acides aminés agissent alors sur un régulateur pléiotrope type CodY, qui indirectement ou directement va induire les gènes de la compétence ou de l'adhérence (flèches rouges).

Hypothèse 2: Une ou plusieurs phéromone(s) sont produites par la cellule, réimportées par une ou plusieurs des protéines de fixation des peptides AmiA, AliA ou AliB, puis fixées par un récepteur type PlcR, qui indirectement ou directement va induire les gènes de la compétence ou de l'adhérence.

d'après Claverys *et al.* 2000

b. Un rôle dans l'adhérence des bactéries aux cellules eucaryotes

Un autre phénotype associé au système Ami/Ali de *S. pneumoniae* concerne l'adhérence aux cellules épithéliales eucaryotes. En effet, lors d'une expérience de mutagenèse insertionnelle aléatoire, il a été mis en évidence qu'une interruption dans les gènes *amiC*, *amiA* et *aliA* entraînait une forte diminution (entre 50 et 60 %) de la capacité des bactéries à adhérer aux pneumocytes et aux cellules épithéliales pulmonaires humaines (Cundell *et al.* 1995). Or il a été montré que des récepteurs glycoconjugués eucaryotes contenant soit du *N*-acetyl-D-galactosamine ß1-3 galactose (GalNAcß1-3Gal) soit du *N*-acetyl-D-galactosamine ß1-4 galactose (GalNAcß1-4Gal) étaient impliqués dans la liaison entre les cellules eucaryotes utilisées précédemment et *S. pneumoniae.* Des tests d'adhérence sur ces récepteurs purifiés et immobilisés ont permis de préciser le rôle de chacune des protéines de liaison aux peptides : AliA et AmiA ne sont respectivement impliquées que dans un seul type de liaison, au GalNAcß1-3Gal et au GalNAcß1-4Gal. Ces deux protéines de fixation des peptides auraient donc des fonctions distinctes et complémentaires dans le phénomène d'adhésion de la bactérie aux cellules eucaryotes (Cundell *et al.* 1995).

Pour expliquer la relation transporteur de peptides / adhérence, on peut d'abord imaginer que les protéines de fixation AmiA et AliA, qui sont des lipoprotéines de surface, soient capables de se lier directement aux récepteurs eucaryotes. Cependant cette hypothèse est peu probable puisque les mêmes phénotypes sont obtenus avec un mutant du gène *amiC*- qui code une protéine du translocon. Il parait donc plus raisonnable de penser que le rôle du transporteur de peptides est indirect, en modulant l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans l'adhérence, comme cela a été montré chez un autre streptocoque. En effet, chez *S. gordonii*, la protéine de fixation des peptides HppA joue un rôle dans la régulation du gène *cshA* codant une protéine de surface ayant un rôle majeur dans l'adhésion aux cellules humaines (McNab et Jenkinson 1998).

La possibilité que le système Ami/Ali joue un rôle indirect dans l'adhésion laisse encore une fois entrevoir plusieurs hypothèses pouvant expliquer ce phénomène (Fig. 27). Comme précédemment, le système Ami/Ali pourrait jouer un rôle en tant que senseur de l'environnement *via* le pool intracellulaire d'acides aminés qui agirait sur un régulateur pléiotrope. Cependant il parait alors difficile d'expliquer comment les deux protéines de fixation AmiA et AliA induisent deux réponses simultanées mais distinctes (adhérence à des

récépteurs différents). L'hypothèse d'une phéromone spécifiquement internalisée par chacune des protéines de fixation et induisant une réponse propre semble alors la plus probable.

c. Un rôle dans la colonisation *in vivo*

L'impact des différentes protéines de fixation, AmiA, AliA et AliB sur la colonisation du nasopharynx par *S. pneumoniae* (première étape de l'infection avant dissémination dans les poumons) et la virulence de la bactérie a été mesuré sur des modèles murins par Kerr et ses collaborateurs en 2004. Dans un premier temps une dose sublétale ($2.5.10^5$ bactéries) de souche sauvage ou du triple mutant *amiA,aliA,aliB-* ont été inoculées par voie intranasale à des souris puis les bactéries ont été dénombrées dans le nasopharynx après 48 heures pour tester leur capacité à coloniser cet organe. Les résultats montrent que le mutant présente une viabilité significativement inférieure à celle de la souche sauvage. Ce test a été ensuite reproduit avec des mutants simples et révèle que les trois protéines de fixation sont impliquées dans la colonisation du nasopharynx avec cependant un effet de la mutation *aliB* moins important que pour les deux autres. Cela montre que le transporteur de peptides a une importance sur le développement de la bactérie *in vivo*, sans que l'on ne sache cependant par quel mécanisme (nutrition azotée, adhésion… ?) ni le rôle précis de chacune des protéines de fixation sur ce phénomène (fonctions redondantes ou spécifiques ?).

Dans un deuxième temps, la virulence des différentes souches a été évaluée en calculant le taux moyen de survie des souris après injection intranasale de 10^6 bactéries. Aucune différence de survie n'a pu être observée entre la souche sauvage et les mutants, et le comptage des bactéries dans divers organes (nasopharynx, poumon, sang) 6, 12 et 24 heures après infection ne donne lui non plus, aucune différence significative. Bien qu'impliqués dans la colonisation, les transporteurs de peptides n'interviennent pas de manière significative dans la virulence et la dissémination de *S. pneumoniae*.

Le système de transport des peptides de *S. pneumoniae* semble donc avoir un rôle dans diverses fonctions. Pour chaque phénotype mis en évidence, il est intéressant de noter que plusieurs protéines de fixation sont impliquées : (i) au moins deux d'entre elles, AliA et AliB, joueraient un rôle dans l'induction de la compétence (ii) AmiA et AliA seraient impliquées dans l'adhérence aux cellules (iii) les trois protéines auraient un impact sur la capacité de la bactérie à coloniser l'hôte *in vivo*.

On peut alors se demander si chaque protéine de fixation au sein de ces phénomènes a un rôle spécifique (transport de phéromone, nutrition azotée, perception de l'environnement) ou si elles présentent une redondance fonctionnelle. Tant qu'aucun mécanisme n'aura été élucidé, qu'aucune phéromone ou régulateur n'auront été identifiés, il paraît difficile d'appréhender le rôle précis de chaque protéine de fixation et les raisons de leur multiplicité.

2) *Streptococcus agalactiae* : une multiplicité de perméases mais seules deux d'entre elles sont associées à la virulence

Streptococcus agalactiae ou streptocoque du groupe B est une bactérie à Gram positif, principalement connue pour son implication dans des mammites bovines à caractère contagieux. Cependant cette bactérie se rencontre également chez l'homme et appartient à la flore normale de l'intestin ou du tractus urogénital féminin. Elle peut cependant développer un caractère pathogène pour les fœtus (contamination ascendante du liquide amniotique) ou les nouveaux-nés chez qui elle peut provoquer des septicémies, des pneumonies ou des méningites.

a. De multiples transporteurs de peptides et des spécificités en partie redondantes

S. agalactiae possède dans son génome plusieurs transporteurs de peptides putatifs : 3 opérons codant des ABC-transporteurs complets, *oppA1BCDF, dppABCDF* et *gbs1573-1577*, un gène codant une protéine de fixation des peptides indépendante *oppA2* et un gène codant un transporteur de di- et tripeptide à force proton-motrice homologue à DtpT, le gène *dpsA* (Samen *et al.* 2004) (Tableau 6). La spécificité de substrat de chacun de ces systèmes a été étudiée par des tests de croissance, sur tous les mutants de transport, en milieu défini supplémenté en peptides de taille variant de 2 à 6 acides aminés comme seule source d'un acide aminé essentiel. Les résultats montrent que seul le système Opp peut prendre en charge les peptides de 3 à 6 acides aminés, que les deux protéines de fixation OppA1 et OppA2 utilisent le même translocon et que dans la limite des peptides testés (c'est-à-dire 3 peptides), leur spécificité de substrat est identique, ces protéines de fixation étant substituables l'une à l'autre. Concernant les dipeptides, ils sont pris en charge par les systèmes Dpp, DpsA et Opp qui présentent tous trois une spécificité redondante puisque dans un milieu supplémenté avec 3 dipeptides différents, seul le triple mutant ne peut plus se développer. Enfin, aucun des

Transporteur	Source d'énergie	Spécificité (taille des peptides pris en charge)	Phénotype associé
Opp (Opp A1 / Opp A2)	ATP	2-6 / 2-6	Adhérence aux cellules épithéliales humaines
Dpp	ATP	Dipeptides	?
Gbs1573-1577	ATP	?	?
DpsA	Force proton-motrice	Dipeptides	Croissance en liquide amniotique

Tableau 6: Les transporteurs de peptides de *S. agalactiae*, description et rôles associés.

d'après Samen *et al.* 2004

peptides testés n'est transporté par le système codé par l'opéron *gbs1573-1577* de manière à permettre le développement de la bactérie (Samen *et al.* 2004) (Tableau 6).

b. DpsA : une perméase impliquée dans la croissance en liquide amniotique

S. agalactiae est une bactérie auxotrophe pour 9 acides aminés et est capable d'infecter le liquide amniotique, milieu contenant de très faible concentrations d'acides aminés libres mais une quantité significative de peptides et protéines. Il est donc probable que pour satisfaire ses besoins en nutriments azotés, la bactérie utilise un ou plusieurs de ses transporteurs de peptides. Pour mesurer l'impact des différents systèmes de transport sur le développement de *S. agalactiae* dans le liquide amniotique, la croissance de la souche sauvage et des simples mutants de transport *dppB*-, *oppB*-, *dpsA*- et du triple mutant *dppB,oppB,dpsA*- a été comparée dans ce milieu (Samen *et al.* 2004). Il s'avère que seul le mutant simple *dpsA*- présente une croissance significativement affectée, à un même niveau que le triple mutant, ce qui montre que seule la perméase utilisant la force proton-motrice a un rôle sur la croissance dans ce milieu. Ce résultat peut paraître surprenant dans la mesure où d'une part, on aurait pu supposer que le transporteur ayant la spécificité de substrat la plus large, c'est-à-dire Opp, soit le plus à même de fournir le plus de nutriments à la bactérie, et d'autre part que l'étude de spécificité de substrat a révélé que DpsA, Dpp et Opp pouvaient prendre en charge les mêmes peptides et se substituer les uns aux autres, alors que ce n'est pas le cas ici. Une explication possible serait que DpsA, contrairement aux autres systèmes de transport, est particulièrement bien exprimée dans le liquide amniotique, et serait donc spécifiquement adaptée à la croissance dans ce milieu. La multiplication des transporteurs, comme chez *B. burgdoferi* (cf chapitre I), serait alors un facteur d'adaptation à des niches écologiques et à des conditions environnementales spécifiques. Une étude d'expression serait toutefois nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

c. Un système Opp impliqué dans l'adhérence

Un autre phénotype testé concernant les transporteurs de peptides de *S. agalactiae* est l'adhérence aux cellules eucaryotes humaines, puisqu'il a été montré chez *S. pneumoniae* que le système de transport de peptides Ami/Ali était impliqué dans ce phénomène (cf paragraphe

précédent). Les résultats révèlent qu'un mutant *oppB-,* contrairement aux mutants *dppB-* et *dpsA-* présente une adhérence aux cellules épithéliales de poumon humain 26% moins importante que la souche sauvage. Ce phénotype a été confirmé *in vitro* par une baisse d'adhérence de ce même mutant aux protéines de fibrinogène et de fibronectine humaines immobilisées et il a été montré que l'expression du gène *fbsA* codant l'adhésine au fibrinogène était réprimée dans un mutant *oppB-* (Samen *et al.* 2004). Malheureusement l'adhésion aux cellules ou l'expression des adhésines chez les simples mutants *oppA1-* et *oppA2-* n'ont pas été testées, ce qui rend impossible de déterminer si une seule ou les deux protéines de fixation sont impliquées dans ce phénotype comme cela a été étudié chez *S. pneumoniae* .

S. agalactiae possède donc plusieurs transporteurs de peptides. Deux d'entre eux, DpsA et Opp, sont impliqués respectivement dans la croissance en liquide amniotique et l'adhérence aux cellules eucaryotes. Les mécanismes liant ces deux systèmes à leur phénotype ne sont pas encore bien connus. Il est probable que DpsA exerce un rôle nutritionnel direct lors de la croissance en liquide amniotique, hypothèse qui pourrait être confirmée par exemple en mesurant la croissance du mutant dans un liquide amniotique supplémenté en acides aminés libres qui, si le défaut de croissance est bien du à un manque de nutriments azotés, sera comparable à celle du sauvage. Concernant le défaut d'adhésion, les hypothèses envisageables sont identiques à celles avancées pour *S. pneumoniae* (cf paragraphe précédent). Enfin, la question du rôle des autres transporteurs Dpp et gbs1573-1577 reste posée. La présence du système Dpp, qui présente apparemment une spécificité de substrat redondante avec Opp et DpsA apparaît comme particulièrement intrigante. Une étude de ses conditions d'expression pourrait aider à comprendre l'intérêt d'une telle multiplication des transporteurs.

3) *Streptococcus pyogenes* : un rôle majeur d' Opp et Dpp sur la sécrétion de facteurs de virulence

Streptococcus pyogenes, également couramment appelé streptocoque du groupe A est une bactérie pathogène majeure pour l'homme. Elle exprime une grande variété de facteurs de

virulence ancrés ou secrétés, et est à l'origine d'affections diverses comme la scarlatine, la méningite, les infections cutanées, certaines angines, l'érysipèle…

S. pyogenes possède dans son génome un opéron *oppA,B,C,D,F* ainsi qu'un opéron *dppA,B,C,D,E*. Chacun de ces transporteurs est fonctionnel et une étude partielle de leur spécificité de substrat a été effectuée par des tests de croissance avec des peptides de 2 à 6 acides aminés (Podbielski et Leonard 1998). Ainsi, il a été mis en évidence qu'un mutant *dpp*- et qu'un mutant *opp*- étaient incapables de se développer dans un milieu contenant respectivement un dipeptide et un hexapeptide comme unique source d'un acide aminé essentiel, ce qui montre que les deux transporteurs ont des spécificités différentes.
Plusieurs études ont par la suite associé ces transporteurs de peptides à la virulence de la bactérie.

a. Opp et Dpp sont impliqués dans le sécrétion de facteurs de virulence

Un des premiers phénotypes associé à Opp chez *S. pyogenes* est une baisse drastique de l'activité protéolytique du mutant *opp*- (réduction de 50% à 70% de la capacité de la bactérie à dégrader la caséine) (Podbielski *et al.* 1996). Or chez cette bactérie l'activité protéolytique est essentiellement due à la protéase à sérine sécrétée SpeB, facteur de virulence majeur (Bisno *et al.* 2003). Il a été ensuite montré par Western-Blot que la production de cette protéase était très affectée chez le mutant *opp*-. A partir de cette constatation, l'expression de différents gènes connus pour leur implication dans la virulence de *S. pyogenes* a été comparée entre une souche sauvage et le mutant *opp*- par RT-PCR semi-quantitative et /ou Northern-Blot (Wang *et al.* 2005). Si la baisse de l'expression de *speB* est confirmée au niveau transcriptionnel, il s'avère également que le transporteur de peptides est impliqué dans l'expression d'autres gènes de virulence : le mutant *opp*- présente en effet une diminution de la transcription du gène *speX* (codant une protéine superantigénique) et du gène *rofA* (codant un régulateur transcriptionnel) ainsi qu'une augmentation de la transcription du gène *speF* (codant une protéine multifonctionnelle ayant entre autres, des activités superantigèniques et nucléases) et des gènes *sagA* et *slo* (codant des protéines hémolytiques). Chez *S. pyogenes*, le transporteur Opp joue donc un rôle complexe dans la régulation de plusieurs facteurs de virulence, provoquant selon le gène considéré, l'induction ou la répression de sa transcription.

Concernant le rôle potentiel de Dpp dans la sécrétion de facteurs de virulence, Podbielski et Leonard ont montré en 1998 par Northern-Blot que tout comme un mutant *opp*-,

un mutant *dpp*- présentait une baisse d'expression du gène *speB* (8 fois moins de transcrits). Les deux transporteurs de peptides semblent donc avoir un rôle similaire concernant la synthèse de cette protéase et il est probable que l'une peut partiellement compenser l'absence de l'autre. Il aurait été cependant intéressant pour appuyer cette hypothèse de mesurer son expression dans un double mutant *opp,dpp*- pour voir si les effets de chacun des transporteurs s'additionnent (expression de *speB* quasiment nulle). A noter également que les autres gènes dont l'expression est influencée par Opp (*speF, rofA, sagA* et *slo*) n'a pas été mesurée dans le mutant *dpp*-.

Chez *S. pyogenes*, Opp et Dpp sont impliqués dans la régulation d'au moins un gène de virulence. Si l'on part de l'hypothèse qu'Opp et Dpp agissent sur l'expression de *speB via* le même mécanisme et sont capables de se compenser l'un l'autre, il semble peu probable que la régulation se fasse par l'entrée d'un peptide phéromone (type PapR chez *B. thuringiensis*). En effet, même si l'étude de leur spécificité de substrat est très incomplète, il semble que les transporteurs ne prennent pas en charge les mêmes peptides. Une autre hypothèse pour expliquer ce phénomène serait alors que les deux perméases, en faisant entrer les peptides, modifient le pool intracellulaire d'acides aminés, qui serait lui-même un signal perçu par un ou plusieurs régulateur(s) transcriptionnel(s).

On pourrait même imaginer un système de régulation à double détente : (i) une des perméases fait entrer une phéromone ou des peptides qui modifient le pool intracellulaire d'acides aminés (ii) cette phéromone ou la modification du pool d'acides aminés déclenche la synthèse d'une autre phéromone (iii) la phéromone est internalisée par l'autre perméase et permet la régulation de *speB*. Ce mode de régulation en deux temps a d'ailleurs déjà été décrit chez *S. thermophilus* (Ibrahim *et al.* 2007). En effet, chez cette bactérie lactique, une phéromone, appelée SHP, est sécrétée puis réinternalisée par Opp pour se lier à un régulateur Rgg. Ce régulateur va ensuite induire la transcription d'un autre peptide de 9 acides aminés, Pep1357, qui sera lui aussi secrété dans l'environnement. Rien n'est connu concernant l'activité de ce deuxième peptide mais on peut supposer qu'il pourrait lui aussi agir en tant que phéromone.

b. Opp joue un rôle dans la virulence de *S. pyogenes in vivo*

Chez *S. pyogenes*, Opp joue un rôle dans la régulation de l'expression de différents gènes de virulence, provoquant selon les cas soit leur répression soit leur induction. Le rôle

potentiel du transporteur sur la virulence de la bactérie *in vivo* a été alors testé sur un modèle murin d'infection par « poche d'air » (Wang *et al.* 2005). 10^9 bactéries de souche sauvage ou de mutant *opp-* ont été injectées dans une poche d'air sous-cutanée et la survie des souris mesurée sur 14 jours. Les résultats obtenus montrent que la souche sauvage provoque 100% de mortalité, contre seulement 8,5% pour la souche *opp-*. Ce transporteur joue donc un rôle majeur dans les capacités de la bactérie à infecter *in vivo* dans ce modèle. Ce phénotype important ne s'explique pas par la seule diminution de l'expression de *speB* montrée auparavant *in vitro* (Podbielski *et al*. 1996) puisqu'un mutant *speB-* dans les mêmes conditions provoque 77,8% de mortalité. Le rôle d'Opp dans la virulence est certainement multifactoriel : régulation de l'expression de plusieurs gènes de virulence, baisse de la capacité de la bactérie à trouver les nutriments nécessaires à son développement… De plus, comme il a été précédemment montré que Dpp avait également un rôle dans l'expression d'au moins un facteur de virulence (Podbielski et Leonard 1998) et qu'il est très probable que ce transporteur soit en partie capable de complémenter l'absence d'Opp, il parait raisonnable de penser qu'un double mutant *opp,dpp-* entrainerait une mortalité encore plus faible qu'un mutant simple.

Les transporteurs de peptides Opp et Dpp apparaissent donc comme particulièrement importants dans la virulence de *S. pyogenes*. Il est curieux de noter que contrairement à ce qu'il a été montré chez d'autres streptocoques pathogènes, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* et *S. gordonii*, le système Opp de *S. pyogenes* n'a aucun rôle sur l'adhérence de la bactérie aux cellules eucaryotes (Podbielski *et al.* 1996). De même, Opp ne semble pas impliqué dans les capacités de *S. pneumoniae* à infecter un modèle murin (seulement dans la colonisation du nasopharynx), alors que la baisse de mortalité d'un mutant *opp-* chez *S. pyogenes* est très marquée. Il est important cependant de souligner de nombreuses différences entre les modèles utilisés dans les deux cas (infection intranasale et infection par poche d'air, 10^6 bactéries injectées contre 10^9 et suivi de la mortalité sur 24 h contre 14 jours, respectivement chez *S. pneumoniae* et *S. pyogenes*) qui peuvent rendre l'interprétation des données difficile et pose la question de la pertinence d'une telle comparaison.

4) Rôle des transporteurs de peptides dans la survie et la virulence de *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes est une bactérie pathogène à Gram positif, responsable du déclenchement de la listériose humaine. La transmission de cette maladie se fait essentiellement par l'alimentation, et est particulièrement grave chez les sujets dont le système immunitaire est perturbé : personnes âgées, femmes enceintes, nouveau-nés, personnes immunodéprimées. Une caractéristique importante de *L. monocytogenes* est sa capacité à se développer dans des environnements dits hostiles, par exemple à des températures avoisinant 0°C, ou dans des aliments à haute teneur en sel. Cela implique notamment que dans un aliment contaminé, même si la population bactérienne est faible au départ, elle est susceptible d'augmenter lors de l'entreposage et de la distribution.

Deux transporteurs de peptides ont été caractérisés chez *L. monocytogenes*, un système OppABCDF et une protéine DtpT dont les spécificités de substrat ont été étudiées (Verheul *et al*. 1995 et 1998; Borezée *et al*. 2000) : elles permettent respectivement le transport de peptides de 3 à 8 acides aminés et des di, tripeptides. L'implication de ces transporteurs dans plusieurs phénomènes a ensuite été montrée.

a. Les transporteurs de peptides de *L. monocytogenes* : un atout pour la croissance en environnement hostile

L. monocytogenes est une espèce bactérienne psychrophile, capable de se développer à des températures basses. Les raisons de cette tolérance importante au froid ne sont pas encore totalement comprises. Plusieurs études ont cependant permis de mettre en avant des hypothèses pouvant expliquer ce phénomène. Parmi elles on peut citer notamment l'induction d'une série de protéines appelées Csps (Cold shock proteins) lors d'une exposition au froid, dont le mode d'action est mal compris mais qui permettraient à la bactérie de survivre à la congélation (Bayles *et al.* 1996). Une autre explication serait que *L. monocytogenes* peut accumuler dans son cytoplasme de petites molécules appelées osmolytes (glycine betaïne, proline, carnitine…) ayant des propriétés cryoprotectrices, mais aussi protectrices vis-à-vis d'une forte pression osmotique, notamment lors de la croissance dans un milieu à haute teneur en sel (Bayles et Wilkinson 2000).

Borezée et ses collaborateurs ont montré en 2000 qu'un mutant *oppA*- était incapable de se développer en milieu riche (BHI) à 5°C contrairement à la souche sauvage, alors que la croissance des deux souches est identique à 37°C. L'étude de l'expression de ce transporteur révèle en outre qu'*oppA* est plus exprimé à basse température qu'à 37°C, ce qui a également été décrit chez *B. subtilis* pour laquelle on observe une induction des systèmes *opp* et *app* lors de la croissance à 15°C (Budde *et al.* 2006). Le système Opp de *L. monocytogenes* est donc un facteur important d'adaptation au froid. Une hypothèse pour expliquer ce phénomène serait qu'Opp, par exemple en internalisant une phéromone, pourrait indirectement contrôler la synthèse des protéines de choc au froid Csps. Cette hypothèse est cependant peu probable dans la mesure où il a été montré que l'expression de deux protéines Csps connues, CspL et CspB, est inchangée dans le mutant *oppA*- (Borezée *et al.* 2000). Une autre explication possible serait qu'Opp permet l'entrée de peptides cryoprotecteurs présents dans le milieu de culture.

Un lien entre transport de peptides, cette fois par la protéine DtpT, et la résistance de *L. monocytogenes* à la pression osmotique (haute concentration en sel) a également été recherché (Wouters *et al.* 2005). Il a été mis en évidence que dans un milieu à haute teneur en sel (10%) supplémenté en dipeptides riches en glycine et en proline (osmolytes potentiels), la souche sauvage se développe mieux qu'un mutant *dtpT*-. Cet effet n'est pas observable sans ajout de dipeptides, ce qui montre que le caractère osmoprotecteur de DtpT est lié à sa capacité à transporter les osmolytes du milieu.

Opp et DtpT ont été respectivement montrés comme impliqués dans la cryorésistance et l'osmorésistance de *L. monocytogenes*. Dans les deux cas, l'hypothèse privilégiée pour expliquer ces phénomènes est que les transporteurs de peptides permettent l'entrée de peptides osmolytes capables de protéger la bactérie des stress environnementaux. Ainsi il semble fort probable concernant la résistance au froid, que dans un milieu contenant un ensemble de peptides riches en glycine et proline, on puisse également observer un effet de DtpT. Et inversement, concernant la résistance au choc osmotique, on peut supposer qu'Opp a également un effet protecteur si l'on ajoute des oligopeptides dans le milieu à la place des dipeptides. Les deux transporteurs de peptides auraient donc un rôle complémentaire et il serait alors intéressant de mesurer l'effet d'un double mutant *opp,dtpT*-. Ces hypothèses restent cependant à tester. On pourrait également élargir ces résultats à d'autres milieux plus « naturels ». En effet, *L. monocytogenes* étant un contaminant alimentaire particulièrement redouté, il serait intéressant de voir si ces phénotypes se retrouvent par exemple lors de la

croissance dans les fromages. En effet la caséine ß, naturellement présente dans le lait et qui est la caséine la mieux clivée par les levains, est très riche en proline. Les fromages sont donc susceptibles de contenir de nombreux peptides riches en proline. Les transporteurs de peptides pourraient alors constituer des cibles particulièrement intéressantes pour empêcher le développement de *L. monocytogenes* dans ce type de denrées « sensibles » à la contamination.

b. Les transporteurs de peptides de *L. monocytogenes* et leur impact lors de l'infection

Le rôle du transporteur Opp de *L. monocytogenes in vivo* a été étudié dans un premier temps sur un modèle murin d'infection par injection en intraveineuse de 8.10^5 bactéries sauvages ou mutantes *oppA*-. Au bout de 14 jours, aucune différence de survie n'a été observée entre les souris infectées par la souche sauvage ou la souche mutante, indiquant que la virulence globale de la bactérie n'est pas affectée. En revanche le dénombrement des bactéries dans différents organes montre une croissance retardée du mutant *oppA*- dans le foie et la rate des animaux infectés (environ 10 et 100 fois plus de bactéries sauvages respectivement dans la rate et le foie que de bactéries *oppA*- au bout de 2 jours). Ce ralentissement du cycle d'infection a également été observé dans un modèle *in vitro* de macrophages issus de mœlle osseuse de souris, dans lesquels le mutant présentait des vitesses d'échappement du compartiment phagosomal puis de croissance intracellulaire ralenties par rapport à celles observées pour la souche sauvage (Borezée *et al.* 2000). En conclusion, le système Opp de *L. monocytogenes* semble favoriser la prolifération bactérienne lors de l'infection sans toutefois jouer un rôle significatif sur la virulence globale de la bactérie à long terme. Les raisons du ralentissement de la vitesse de prolifération dans les organes du mutant *oppA*- ne sont pas connues, mais on peut supposer qu'il est lié à un moins bon approvisionnement en nutriments azotés ou /et une dérégulation de l'expression de certains gènes liée à des phénomènes de type *quorum sensing* ou perception de l'environnement.

L'impact du deuxième transporteur de peptides de *L. monocytogenes*, la protéine DtpT, lors du processus infectieux a été également étudié (Wouters *et al.* 2005). Le modèle utilisé est une infection de souris par injection intraveineuse de 10^3 bactéries (dose sublétale) sauvages ou mutantes *dtpT*- . Le suivi de l'infection a été ensuite effectué par dénombrement de *L. monocytogenes* dans le foie et la rate jusqu'à 5 jours post-injection. Après 4 jours, une différence faible mais significative a pu être observée entre la souche sauvage et le mutant

dans les deux organes (environ 4 et 2 fois plus de bactéries sauvages que de bactéries *dtpT*- respectivement dans la rate et dans le foie). A noter toutefois qu'en raison de la faible dose de bactéries inoculées, les souris ont progressivement éliminé le pathogène (quasiment plus de bactéries dans les organes à 5 jours) et qu'une éventuelle différence de létalité entre les deux souches n'a pas pu être testée. La croissance de la bactérie sauvage et du mutant *dtpT*- a également été suivie par un modèle *in vitro* de macrophages murins mais n'a révélé aucune différence (Wouters *et al.* 2005).

Les transporteurs de peptides Opp et DtpT de *L. monocytogenes* ont tous deux un rôle dans la dissémination de la bactérie dans les organes, avec cependant un effet qui malgré les différences dans le modèle d'infection, semble plus marqué concernant Opp. Cependant leur implication respective n'est pas assez importante pour jouer significativement sur la virulence globale de la bactérie. On peut cependant penser qu'il existe un effet compensatoire entre l'un et l'autre de ces systèmes qui masquerait l'importance globale du transport de peptides lors de l'infection et il serait alors intéressant de tester la virulence d'un double mutant *opp, dtpT*-.

D. Conclusion et perspectives

Les transporteurs de peptides peuvent donc exercer chez les bactéries des rôles variés. Leur première fonction est de fournir à la cellule des nutriments azotés indispensables à sa croissance. Cette fonction apparaît comme particulièrement importante dans des milieux pauvres en acides aminés libres mais riches en peptides ou en protéines. Ainsi il a été montré que les transporteurs de peptides étaient indispensables à la croissance optimale de plusieurs bactéries dans le lait. Si ce phénomène a été étudié chez des bactéries à intérêt technologique comme *L. lactis*, on peut penser que le transport de peptides peut également être important pour le développement de bactéries contaminantes du lait (salmonelles, listérias, entérocoques, staphylocoques…). Si cette hypothèse se vérifie, les transporteurs de peptides pourraient alors être envisagés comme des cibles contre le développement de germes indésirables, en favorisant, par exemple, l'utilisation de souches technologiques compétitrices en terme de spécificité de substrat. De plus, de nombreux autres milieux physiologiques, notamment dans le corps humain, ne contiennent pas (ou en quantité faible) tous les acides aminés sous forme libre, nutriments qui sont toutefois disponibles sous forme de peptides et de protéines en forte concentration (liquide amniotique, urine, plasma sanguin…). On peut alors supposer que lors d'une infection, les transporteurs de peptides de certaines bactéries

pathogènes puissent avoir un rôle important dans le développement bactérien. Ce phénomène, bien que peu étudié et encore non démontré, fait cependant partie des hypothèses privilégiées pour expliquer les phénotypes observés chez des mutants de délétion de transporteurs de peptides dans des modèles *in vivo* : rôle dans la colonisation du nasopharynx par *S. pneumoniae*, dans la virulence de *S. pyogenes*, dans la croissance en liquide amniotique de *S. agalactiae* ou dans la dissémination de *L. monocytogenes* (cf paragraphe précédent).

Une seconde fonction attribuée aux transporteurs de peptides est celle de « senseur » de l'environnement. Par l'entrée de peptides du milieu extérieur, ils modifient le pool intracellulaire d'acides aminés qui lui-même va contrôler l'activité d'un régulateur. Nous avons vu que cela a été décrit chez *L. lactis* avec le régulateur CodY. Or de nombreuses bactéries possèdent des protéines « CodY-like » dans leur génome. Et si chez *L. lactis* ce régulateur contrôle très majoritairement des gènes du métabolisme, il a été montré chez *Clostridium difficile* que CodY contrôlait l'expression de gènes codant, entre autres, des toxines (Dineen *et al.* 2007). L'implication de transporteurs de peptides dans la virulence de certaines bactéries pathogènes par ce mode d'action peut donc être envisagée.

Enfin la dernière fonction principale exercée par les transporteurs de peptides est l'import de peptides de signalisation impliqués dans la communication intercellulaire. Si ce phénomène n'a été démontré que pour un nombre restreint de processus (cf chapitre Les transporteurs de peptides et leur rôle dans la communication intercellulaire), il semble cependant probable que ce phénomène soit beaucoup plus répandu au sein du monde bactérien. Il pourrait notamment expliquer le lien entre transporteur de peptides et synthèse d'adhésines et de protéase établit respectivement chez *S. agalactiae* et *S. pyogenes*. De plus, de récentes études suggèrent l'existence d'une communication via des facteurs diffusibles (lactones et / ou peptides) entre bactéries appartenant à des espèces différentes et même entre bactéries et cellules eucaryotes (Henke et Bassler 2004). Pourquoi dans ce cas ne pas imaginer un rôle des transporteurs de peptides au sein d'un dialogue entre, par exemple, une bactérie pathogène et son hôte ?

Les transporteurs de peptides, de par les diverses fonctions qu'ils exercent, ouvrent donc des perspectives intéressantes, notamment concernant l'étude des bactéries pathogènes. Dans la partie qui suit nous verrons quelles sont les implications potentielles de ces systèmes dans la physiologie et la virulence de *Staphylococcus aureus*, bactérie pathogène majeure de l'homme et des animaux.

III. Les transporteurs de peptides de S. aureus, quels enjeux ?

Staphylococcus aureus, appelé couramment staphylocoque doré en raison de la couleur jaune des colonies qu'il forme sur gélose, est une bactérie sphérique à Gram positif, anaérobie facultative, immobile et formant des amas réguliers à la manière de grappes de raisin (Fig.28). Au sein du genre *Staphylococcus*, il existe trois espèces pathogènes humaines principales : *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*. Parmi elles, *S. aureus* présente le potentiel de pathogénicité le plus important et c'est la seule à produire une coagulase, exoenzyme capable de coaguler le plasma sanguin, ce qui constitue un moyen d'identification rapide et facile.

Le réservoir naturel de *S. aureus* est l'homme et l'animal à sang chaud. Son site de colonisation préférentiel chez les humains se situe au niveau des fosses nasales et de la gorge. Ainsi environ 20% de la population adulte héberge cette bactérie de façon permanente, et 30% de façon intermittente, généralement de manière asymptomatique (Wertheim *et al.* 2005). A partir des sites de portage, *S. aureus* peut coloniser les territoires cutanés, en particulier les zones humides (aisselles, périnée). De plus, ces bactéries particulièrement résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement. Son caractère remarquablement flexible lui permet en effet de survivre ou de se développer dans de nombreuses autres niches (surface inanimée, denrées alimentaires...) ce qui facilite sa dissémination. Du fait de ses bonnes capacités d'adaptation et des nombreux facteurs de virulence qu'elle produit, *S. aureus* pose de graves problèmes médicaux, sanitaires et économiques.

A. *S. aureus* : un problème clinique, sanitaire et économique majeur

1) Le pouvoir pathogène de *S. aureus* et les maladies humaines associées

Une des caractéristiques essentielles de *S. aureus* est qu'elle produit un très grand nombre (> 50) de facteurs de surface ou de protéines sécrétées contribuant à sa pathogénicité (Novick 2003). Dans la partie qui suit, nous décrirons de manière simplifiée, les différentes étapes permettant l'infection et les principaux facteurs de virulence qui y sont associés (liste non exhaustive).

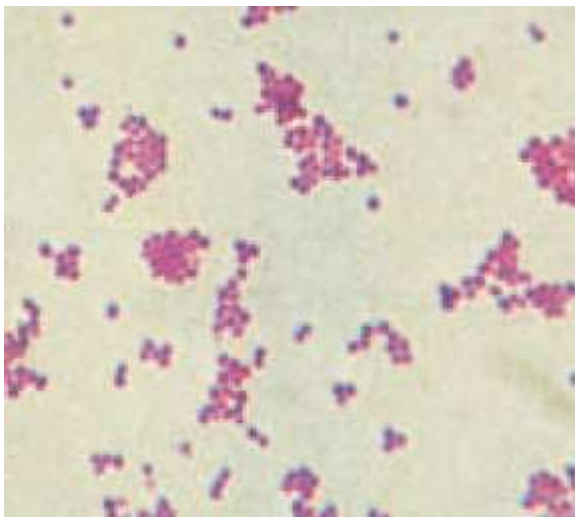


Figure 28: *Staphylococcus aureus*, frottis coloré au Gram (x1500)

Prescott *et al.* 1995

a. La colonisation de l'hôte

L'habitat primaire de *S. aureus* est la peau et les muqueuses humaines et animales. Cette colonisation nécessite en premier lieu que la bactérie adhère aux cellules et aux composants de la matrice extracellulaire de ces tissus. Pour cela *S. aureus* possède un grand nombre de protéines de surface qui ont la capacité de se fixer sur les molécules de l'hôte (ou à des surfaces inertes type cathéters) appelées adhésines. La grande majorité de ces adhésines appartiennent à la famille des MSCRAMM (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule). Parmi les mieux caractérisées on peut citer notamment la protéine de liaison au collagène CNA, les protéines de liaison à la fibronectine FnBPA et FnBPB, les protéines de liaison au fibrinogène (Clumping factor) ClfA et ClfB et la protéine A (ou SpA) qui possède également une activité superantigénique (Clarke et Foster 2006) (Fig. 29).

La colonisation des muqueuses par *S. aureus* est généralement asymptomatique mais permet une dissémination importante de la bactérie notamment *via* les aérosols libérés lors d'un éternuement. Cependant, en cas de lésion de la peau, la bactérie peut provoquer des infections cutanées mais aussi atteindre d'autres tissus.

b. L'infection de l'hôte : destruction des tissus et multiplication bactérienne

S. aureus secrète de nombreuses enzymes lui permettant de dégrader les différents tissus humains, favorisant l'extension du foyer infectieux (Fig. 29). Par exemple, les protéases SspA, SSpB, ScpA, Aur, l'élastase et la hyaluronidase sont capables de dégrader le tissu conjonctif (Arvidson 2000). Parallèlement, la bactérie produit plusieurs toxines ayant pour cible les membranes cellulaires. Elles provoquent en effet la formation de canaux membranaires laissant passer les ions ce qui provoque la lyse de la cellule ciblée. Parmi elles on peut citer les hémolysines α, ß, δ et γ ainsi que la leucocidines LukE-D et la toxine PVL (Panton-Valentine Leukocidin) capable de détruire les leucocytes et associée à la survenue de la pneumonie nécrosante (Dinges *et al.* 2000).

L'ensemble de ces facteurs, favorisant la prolifération bactérienne et la destruction des tissus, induisent une réponse inflammatoire ce qui peut provoquer des infections suppuratives qui généralement, chez un individu sain, restent localisées et sont rapidement enrayées. Ainsi les infections à *S. aureus* les plus fréquentes sont des infections cutanéo-

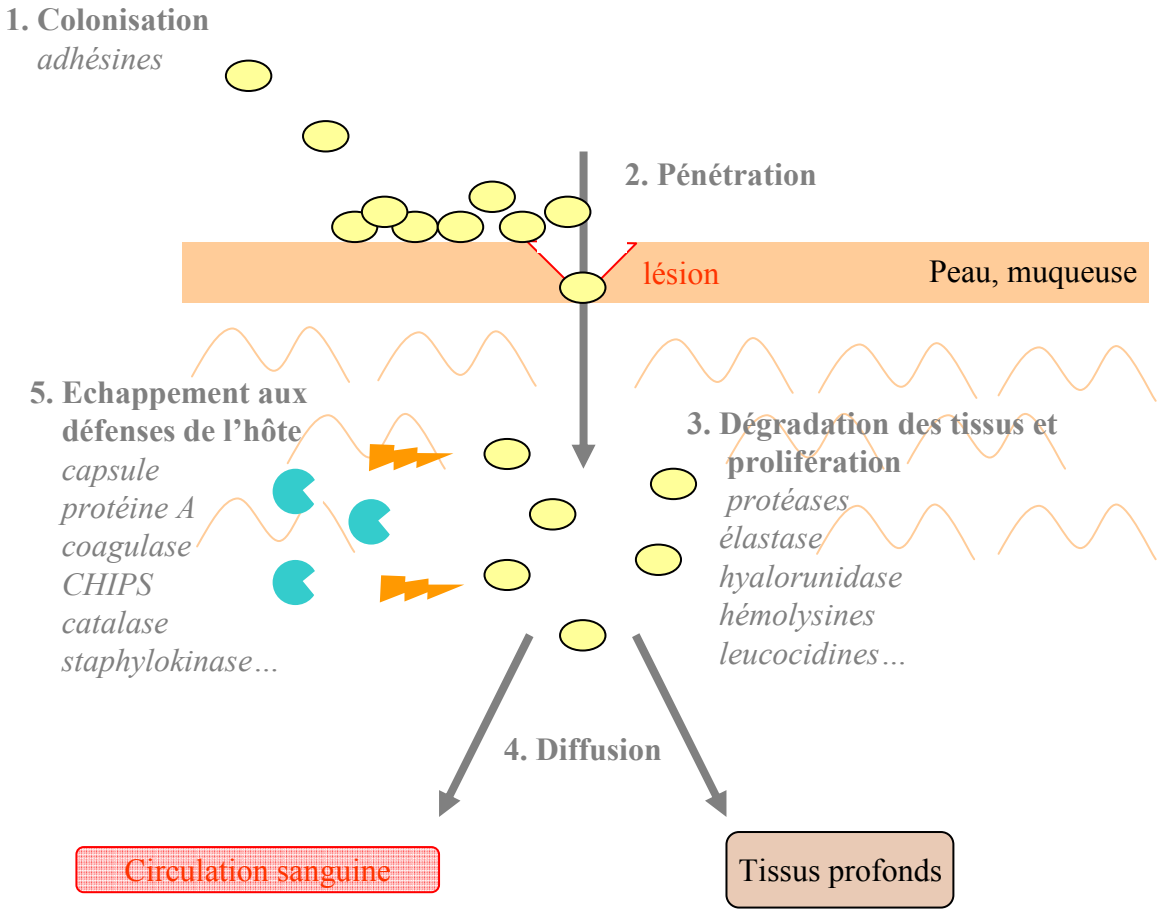


Figure 29: Les différentes étapes d'une infection à *Staphylococcus aureus* et les principaux facteurs de virulence associés.

muqueuses (Fig.30) telles que les folliculites, l'impétigo, les furoncles, les panaris… Cependant chez les personnes fragiles, immunodéprimées ou en cas de lésions importantes (brûlures, acte chirurgical…) le germe peut diffuser dans le sang (risque de septicémie) et atteindre des tissus profonds, provoquant des infections suppuratives beaucoup plus graves, pouvant être létales, telles que l'endocardite, la méningite ou l'ostéomyélite (Fig.30).

En plus des toxines de dégradation des tissus citées précédemment, certaines souches produisent également des toxines à l'origine de syndromes spécifiques (Fig.30). Ainsi la toxine TSST-1 provoque le syndrome de choc toxique staphylococcique (fièvre, hypotension, desquamation…), létal dans 10% des cas. Les exfoliatines ETA et ETB sont quant à elles impliquées dans le syndrome d'exfoliation généralisée (syndrome de la peau ébouillantée). Enfin *S. aureus* peut également produire de nombreuses entérotoxines thermorésistantes (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO) pouvant provoquer, lorsqu'elles sont ingérées, des intoxications alimentaires violentes mais brèves avec une évolution le plus souvent favorable même en absence de traitement. Ces toxines entériques n'agissent pas directement sur les cellules de la muqueuse intestinale, leur pouvoir émétique, encore mal caractérisé, reposerait plutôt sur leur activité superantigènique et neurotoxique (Le Loir *et al.* 2003).

c. L'échappement aux défenses de l'hôte

Tout au long du processus d'infection, que ce soit pour coloniser les fosses nasales ou pour disséminer vers d'autres tissus, *S. aureus* doit échapper aux défenses immunitaires de l'hôte pour survivre. La bactérie produit dans ce but de nombreux facteurs (Nizet 2007 pour revue) (Fig.29) lui permettant entre autres:

(i) d'échapper à la phagocytose. C'est l'un des rôles de la capsule polysaccharidique, produite par la grande majorité des souches cliniques, qui éloignerait par encombrement stérique les protéines du système du complément. La protéine A. permet quant à elle de neutraliser les anticorps de l'hôte en se liant à leur partie fixe. *S. aureus* produit également des protéines CHIPS (CHemotaxis Inhibitory Protein of Staphylococci) qui se lient à certains récepteurs des leucocytes et freinent leur recrutement vers le site d'infection. Enfin, la coagulase provoque la polymérisation du fibrinogène en fibrine et la formation d'un caillot protégeant la bactérie des cellules immunitaires.

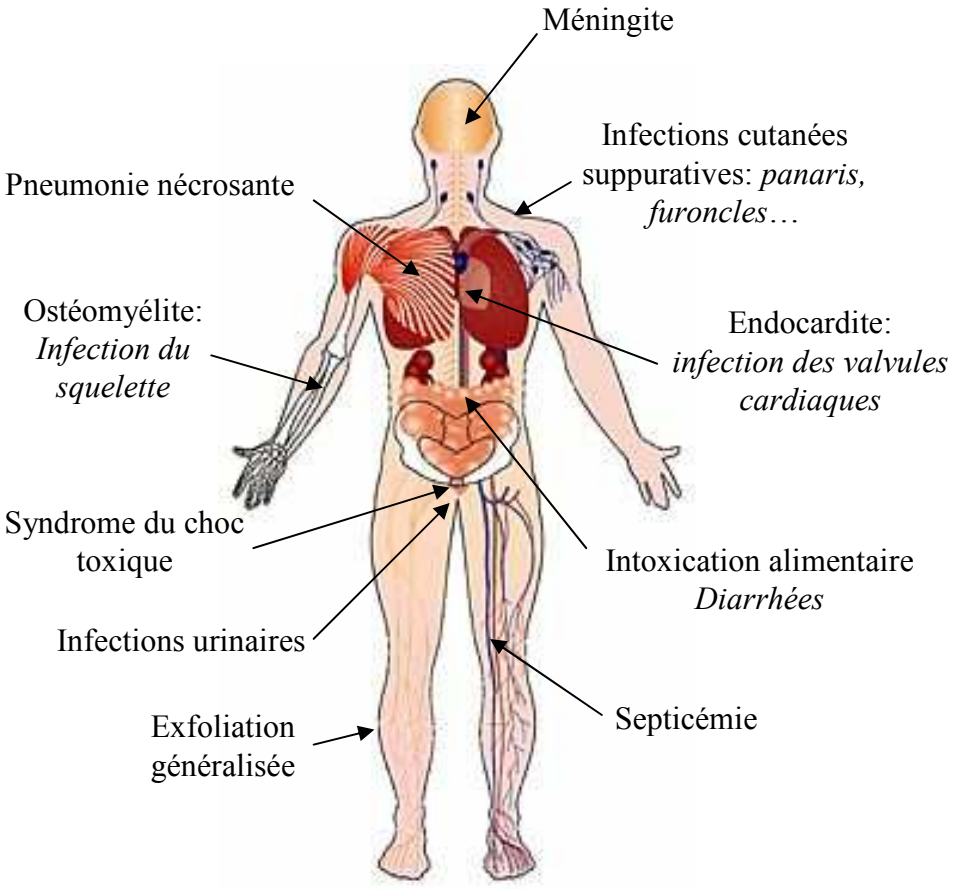


Figure 30: Les principales maladies humaines pouvant être provoquées par une infection à *S. aureus*.

d'après Wertheim *et al*. 2005

(ii) de survivre à l'intérieur des phagocytes. Une catalase, une superoxyde dismutase et un pigment caroténoïde lui permettent notamment de résister au stress oxydant mis en place à l'intérieur du phagosome pour détruire les bactéries.

(iii) de résister aux peptides antimicrobiens (cathelicidines et défensines) produits par l'hôte. Pour cela *S. aureus* présente des modifications (ajout de charges positives) dans la composition de sa paroi ce qui gène l'action des peptides, eux-mêmes chargés positivement. Elle produit de plus la protéase Aur qui clive directement certaines cathelicidines et une staphylokinase capable d'inactiver certaines défensines.

La pathogénie de *S. aureus* est donc un phénomène complexe, faisant intervenir une multitude de facteurs de virulence. C'est l'action coordonnée de l'ensemble de ces facteurs qui explique le fort pouvoir pathogène de cette bactérie et la multitude de maladies humaines associées. D'un point de vue épidémiologique, il s'avère que l'incidence des infections staphylococciques, qui sont principalement développées lors d'un séjour à l'hôpital, est en constante augmentation. Ceci est notamment en rapport avec le nombre croissant de personnes immunodéprimés mais aussi avec la multiplication des procédures invasives qui lèsent la barrière cutanéo-muqueuse (interventions chirurgicales, pose de cathéters ou de sondes, implantation de prothèses…) (www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/staphylo.html). Ainsi, *S. aureus* a le triste privilège d'être au premier rang des germes responsables d'infections nosocomiales en France entre 2001 et 2005 (responsable de 16% des infections nosocomiales déclarées), et présente le deuxième taux de létalité le plus élevé (25% de décès), ce qui en fait un problème de santé publique particulièrement important (Coignard *et al*. 2006).

2) Impact sanitaire et économique de *S. aureus* sur les animaux d'élevage et l'industrie agroalimentaire

a. Les mammites à *S. aureus*

S. aureus est un agent pathogène majeur de l'Homme mais également des mammifères, notamment des animaux d'élevage, bovins, ovins et caprins, chez qui elle provoque, entre autres, des infections de la glande mammaire. La mammite est la principale pathologie rencontrée en élevage laitier, et se manifeste par une réduction de la quantité et de qualité du lait (il devient plus pauvre en calcium, phosphore, protéines et matières grasses,

mais plus riche en sodium et chlore). Dans les cas les plus graves (mammites cliniques), elle peut provoquer une nécrose de la glande mammaire et entraîner une baisse irréversible de la quantité de lait produite (Hortet et Seegers 1998).

La mesure de l'impact économique réel des mammites sur les filières du lait nécessite la prise en compte de nombreux facteurs (Seegers *et al.* 2003) : baisse de la quantité et de la qualité du lait produit donc baisse des prix à la vente, coût des contrôles sanitaires à effectuer (comptage des cellules somatiques du lait), coût du vétérinaire et des traitements, mortalité / euthanasie du bétail infecté... Ainsi il a été estimé qu'au cours de l'année 1995, pour l'ensemble du Royaume-Uni, le coût total dû à l'incidence des mammites bovines s'élevait à environ 121 millions de livres (Seegers *et al.* 2003). Ajoutons à cela que ces infections touchent également les ovins et les caprins, ce qui n'est pas pris en compte dans ces estimations.

En France, *S. aureus* est avec *S. agalactiae* et *Streptococcus uberis*, l'une des principales causes de ce type d'infection puisqu'elle est responsable de 15 à 20% des mammites cliniques et de 20 à 40% des mammites subcliniques. Cette bactérie représente un problème d'autant plus important que c'est l'un des germes les plus contagieux et les plus difficiles à éliminer, notamment par la forte prévalence de souches résistantes aux antibiotiques (cf paragraphe suivant). La lutte contre *S. aureus* est donc une priorité dans les élevages laitiers à cause des coûts économiques importants et des problèmes sanitaires dont elle est responsable.

b. Les contaminations alimentaires

Par sa production d'entérotoxines thermorésistantes (non éliminables par pasteurisation), *S. aureus* se place au deuxième rang des bactéries responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en France entre 1996 et 2005, après les salmonelles (Delmas *et al.* 2006). Lors de ces TIAC, les aliments les plus fréquemment mis en cause étaient le lait et les produits laitiers (17% des cas) suivis par les viandes (12%) et les produits de charcuterie (12%). La prévalence des produits laitiers en tant que source de contamination pour les cas de TIAC provoquées par *S. aureus* est un problème typiquement français. Il est lié en effet à la grande diversité de fromages et de procédés qui existe dans ce pays.

Les sources possibles de contamination alimentaire à *S. aureus* sont multiples. En premier lieu, les bactéries peuvent venir des matières premières (notamment du lait issu de

mammites). Dans ce cas, si la contamination est assez importante, les toxines qui sont particulièrement résistantes vont persister dans le produit quelque soit le procédé de fabrication utilisé même si les bactéries sont éliminées. Une deuxième source de contamination est le personnel. En effet, *S. aureus* est une bactérie fréquemment retrouvée dans les muqueuses et sur la peau, ainsi toute manipulation humaine peut entraîner la contamination du produit. Enfin *S. aureus* peut venir des installations (cuves ou tuyaux mal nettoyés) dans lesquelles elle peut former des biofilms très résistants. Sa capacité à survivre et à se multiplier dans des environnements variés voire hostiles, et la résistance des toxines qu'il produit font de *S. aureus* un contaminant particulièrement difficile à éviter et des normes sanitaires très strictes sont nécessaire pour contrôler son développement.

Face à ce problème, les normes européennes imposent aux industriels, notamment dans le secteur des produits laitiers, un contrôle fréquent de la présence éventuelle de staphylocoques dans leurs produits. Si le dénombrement révèlent une contamination (par exemple il est considéré qu'un fromage frais est contaminé si l'on détecte plus de 100 ufc par gramme de produit et plus de 10000 ufc/g pour les fromages au lait cru), une recherche de toxines (dosage immunologique ELISA) doit être réalisée. Enfin, si les recherches de toxines sont positives, l'industriel doit détruire les denrées contaminées par incinération. L'ensemble de ces mesures (mesures sanitaires, contrôles journaliers et destruction des denrées contaminées) représente un coût économique très important pour l'ensemble du secteur agroalimentaire.

S. aureus est donc d'une part un problème clinique majeur en médecine humaine mais représente aussi un enjeu sanitaire et économique très important dans la filière agroalimentaire. Les problèmes posés par ce pathogène sont aujourd'hui d'autant plus accentués que les moyens disponibles pour enrayer sa propagation se trouvent de plus en plus limités.

3) Vers une impasse thérapeutique ?

Comme toutes les infections bactériennes, celles à *S. aureus* sont traitées par des antibiotiques qui ont été massivement utilisés, d'une part pour traiter les infections humaines, mais aussi à titre préventif ou curatif chez les animaux d'élevage pour notamment lutter contre les mammites. Cependant ce mode de thérapie trouve ses limites dans le fait que *S.*

aureus est l'un des microorganismes pathogènes offrant le plus de résistance aux antibiotiques. Cette bactérie acquiert en effet des mécanismes de défense au fur et à mesure que se développent de nouveaux traitements (Fig.31). Elle fut ainsi la première bactérie à présenter une résistance à la pénicilline (production d'enzymes, pénicillinases ou ß-lactamases, capables d'hydrolyser l'antibiotique), dès 1947, soit cinq ans après le début de la production de masse de cet antibiotique. La méthicilline devint alors le traitement de choix mais un premier SARM (*Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méthicilline) a été découvert en 1961 en Grande-Bretagne. La résistance à cet antibiotique est due à l'acquisition d'une PBP (Penicillin Binding Protein), la PBP2a, qui confère aux souches de *S. aureus* une résistance généralisée à toutes les ß-lactamines (Tenover 2006). Les SARM se sont ensuite considérablement développées. Ainsi en France en 2006, 52% des souches de *S. aureus* isolées d'infection nosocomiales étaient résistantes à la méthicilline (conférence de Mr Thiolet INVS, 2007) et une émergence récente d'infections à SARM acquises dans la communauté, c'est-à-dire hors hôpital sur des personnes ne faisant pas partie des classes à risque, apparaît comme particulièrement inquiétante. Parallèlement à la résistance à la méthicilline, *S. aureus* a développé des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones (acquisition d'un système ABC d'efflux des quinolones), antibiotiques également largement utilisés dans les années 80 (Hooper 2002). La vancomycine est alors l'antibiotique qui est utilisé, notamment pour son efficacité contre le SARM. Cependant un VRSA (Vancomycine Resistant *Staphylococcus aureus*), également résistant à tous les antibiotiques glycopeptidiques, a été identifié en 2002 aux Etats-Unis et a été trouvé depuis dans des hôpitaux en Angleterre et en France. Cette résistance est cette fois due à l'acquisition du gène *vanA* (porté à l'origine sur un plasmide d'*E. faecalis*), dont l'expression entraîne une altération du site de fixation du glycopeptide (Tenover 2006). La vancomycine étant un des derniers remparts actuels contre des infections à *S. aureus* multirésistantes, une impasse thérapeutique est à craindre.

De nouveaux antibiotiques sont aujourd'hui à l'essai (Drew 2007) mais l'émergence concomitante de mécanismes de résistance est à prévoir. Pour freiner ce phénomène, des mesures doivent être rapidement prises. En effet, on estime que dans tous les cas énoncés précédemment l'acquisition de la résistance aux antibiotiques par la bactérie est favorisée (si ce n'est provoquée) par une utilisation massive et non adaptée des antibiotiques en médecine humaine mais aussi vétérinaire. En France, la prise de conscience collective de cet effet est récente. Plusieurs lois pour lutter contre l'utilisation abusive d'antibiotiques ont été votées ces

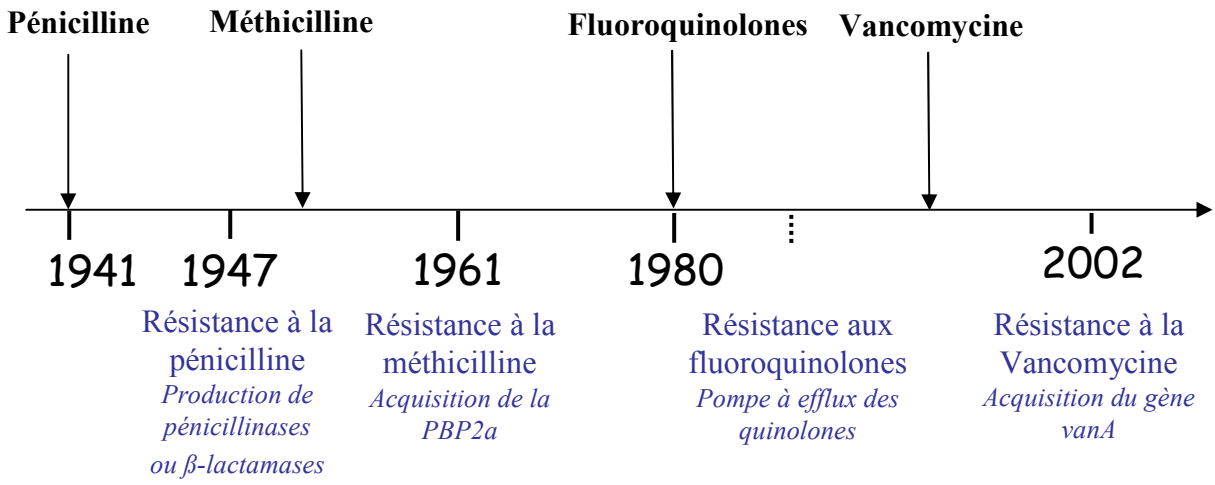


Figure 31: La résistance aux antibiotiques de *S. aureus*, une course entre apparition des traitements et apparition des résistances.

En haut de l'échelle de temps figurent les dates de développement de l'utilisation des antibiotiques, en bas de l'échelle, les dates d'apparition des premieres souches de *S. aureus* résistantes et en italique les mécanismes mis en jeu.

dernières années comme par exemple, l'interdiction de l'utilisation d'antibiotiques comme facteurs de croissance dans les aliments pour animaux depuis le 1er janvier 2006. Mais il semble utopique de penser que l'ensemble des mesures prises suffiront à empêcher les résistances bactériennes, et des voies alternatives à l'antibiothérapie pour lutter contre *S. aureus* sont aujourd'hui activement recherchées.

Parmi les alternatives aux antibiotiques, celle de la vaccination *via* des vaccins cellulaires (bactéries tuées) ou des vaccins protéiques (anticorps dirigés contre des composants capsulaires ou des protéines de surface spécifiques) est particulièrement étudiée pour prévenir les infections humaines ou animales (Projan *et al.* 2006). Cependant encore aucun vaccin efficace n'est à ce jour disponible. Il apparaît donc comme particulièrement urgent de développer les recherches sur le fonctionnement de *S. aureus* pour à terme, identifier de nouvelles cibles contre cette bactérie. Dans ce contexte les transporteurs de peptides constituent une voie de recherche particulièrement intéressante.

B. Quels rôles potentiels pour les transporteurs de peptides de *S. aureus* ?

A ce jour, aucune étude fonctionnelle n'est disponible concernant les transporteurs de peptides putatifs de *S. aureus*. Dans cette partie nous nous attacherons à expliquer quelles pourraient être les implications de ces systèmes dans le développement et la virulence de cette bactérie et les perspectives qu'elles peuvent ouvrir.

1) Les transporteurs de peptides dans la nutrition et la survie de *S. aureus*

Nous avons vu précédemment que chez certaines bactéries les transporteurs de peptides jouent un rôle particulièrement important en tant qu'importateurs de peptides à vocation nutritionnelle. Cette fonction est essentielle pour le développement bactérien dans des milieux pauvres en acides aminés libres comme le lait où les nutriments azotés disponibles se trouvent essentiellement sous forme de peptides issus de la dégradation enzymatique des protéines. Chez *S. aureus*, il semble très probable qu'au moins un transporteur de peptides exerce une fonction nutritionnelle pour les raisons suivantes :

(i) La bactérie est auxotrophe pour plusieurs acides aminés.

Il a été montré par Rudin *et al*. en 1974 que la souche de *S. aureus* NCTC8325 (souche parentale de la souche de laboratoire RN6390) était totalement incapable de se développer en milieu défini sans apport externe de 3 acides aminés (cystéine, arginine et proline) et avait besoin de 5 acides aminés supplémentaires pour avoir une croissance correcte. Même si l'auxotrophie peut varier d'une souche à l'autre (par exemple, les souches produisant la toxine TSTT-1 sont auxotrophes pour le tryptophane, Chu *et al.* 1988), il apparaît que *S. aureus* a besoin de puiser des sources azotées dans le milieu de culture pour se développer.

(ii) La bactérie est capable de se développer dans des milieux pauvres en acides aminés libres.

Par exemple, *S. aureus* est capable de se développer très facilement dans le lait. Elle peut dans ce milieu atteindre des concentrations cellulaires très importantes (environ 10^9 cfu/ml en dans du lait stérile) (Sharer *et al*. 2003) en culture simple. Or les concentrations en acides aminés libres du lait (Tableau 7) semblent largement insuffisantes pour constituer la seule source de nutriments azotés nécessaires à cette croissance. *S. aureus* doit donc très probablement utiliser les autres sources disponibles, constituées très majoritairement de protéines. L'utilisation des protéines comme source azotée implique d'une part de pouvoir les dégrader en peptides et d'autre part de pouvoir transporter ces peptides dans la cellule.

(iii) La bactérie possède plusieurs protéases extracellulaires, pouvant potentiellement générer un grand nombre de peptides nutritionnels.

10 protéases extracellulaires ont été caractérisées chez *S. aureus*, les protéases à serine SspA (appelée V8) et SplA, B, C, D, E, et F, les protéases à cystéine ScpA et SspB (staphopain A et staphopain B), et enfin la metalloprotéase Aur. D'un point de vue génétique les gènes *sspA* et *sspB* sont codés en opéron (Rice *et al.* 2001) ainsi que les six gènes codant les protéines Spl (Reed *et al*. 2001). L'opéron *ssp*, et les gènes *aur* et *scpA* présentent un pic d'expression en fin de phase exponentielle lorsque les bactéries sont cultivées en milieu riche et sont sous le contrôle de nombreux régulateurs (Agr, SarA, MgrA, Rot, SaR, SarS…) (Shaw *et al.* 2004, Oscarsson *et al.* 2006). Ces régulateurs n'ont pas tous le même impact sur chacune des protéases, ce qui implique qu'elles peuvent également être produites de manière indépendante, notamment en fonction des conditions environnementales (Oscarsson *et al.* 2006).

Acide aminé	Concentration dans le lait (mg/L)
Acide aspartique	2,5
Thréonine	1,1
Sérine	1,1
Acide glutamique	44,7
Proline	Nd
Glycine	6,5
Alanine	3,2
Cystéine	Nd
Valine	2,1
Méthionine	0,7
Isoleucine	0,6
Leucine	0,8
Tyrosine	2,5
Phénylalanine	2,6
Histidine	4,8
Lysine	5,8
Arginine	4,9
Méthionine	0,7

Tableau 7 : Les acides aminés libres du lait

Nd = non détecté

d'après Juillard *et al.* 1995a

Les protéases extracellulaires de *S. aureus* ont été étudiées essentiellement pour leur rôle potentiel dans la virulence (Tableau 8) mais aucune donnée n'est disponible concernant leur impact sur la nutrition azotée de la bactérie lors de l'infection de l'hôte ou dans d'autres milieux physiologiques. Les protéases SspA, Aur et SplC, contrairement à SspB, sont capables de dégrader la caséine *in vitro* (Tableau 8) (Rice *et al.* 2001 ; Popowicz *et al.* 2006 ; Karlsson *et al.* 2001) mais leur impact « *in vivo* » sur la croissance dans le lait n'est pas connu. Cependant il semble probable qu'avec ses 10 protéases sécrétées, *S. aureus* soit capable de dégrader les protéines de ce milieu pour libérer des peptides nécessaires à sa croissance de la souche aux vues de ces capacités de croissance en lait.

S. aureus est auxotrophe pour plusieurs acides aminés, peut se développer dans des milieux pauvres en acides aminés et possède, à priori, les enzymes nécessaires à la libération de nombreux peptides. Il semble alors très probable que cette bactérie possède également un système d'import de peptides, qui reste à caractériser, lui permettant de subvenir à ses besoins en nutriments azotés. Ce transporteur aurait son importance notamment lors de la croissance bactérienne dans le lait mais peut être aussi dans d'autres milieux physiologiques, rencontrés par exemple lors de l'infection de l'hôte (plasma, urine, sérum…).

D'autre part, nous avons vu précédemment que chez *L. monocytogenes* les transporteurs de peptides permettent l'entrée d'osmolytes favorisant la croissance de la bactérie à basse température et dans des milieux à forte pression osmotique. *S. aureus* présente également une bonne tolérance vis-à-vis des stress environnementaux (Clements et Foster 1999). Elle peut notamment se développer entre 10 et 45°C (température optimale 37°C) et dans des milieux présentant des concentrations en sel allant jusqu'à 15%. L'implication d'un transporteur de peptides dans la cryorésistance et l'osmorésistance de *S. aureus* peut donc être également envisagée.

2) D'autres fonctions possibles ?

Chez plusieurs bactéries il a été montré que les transporteurs de peptides étaient impliqués dans la régulation de phénomènes (compétence, virulence…) soit *via* l'import de phéromones spécifiques, soit en jouant sur le pool intracellulaire d'acides aminés.

Protéase	Activité *in vitro*	Rôle dans la virulence	Références
SspA (V8)	Caséinase Gélatinase	Dégradation des facteurs de liaison à la fibronectine (FnBPs) et de la protéine A.	Rice *et al.* 2001 Karlsson *et al*. 2001
SspB (Staphopain B)	Gélatinase	Atténuation modérée de la virulence dans un modèle d'abcès murin Clivage de la fibronectine et du fibrinogène. Dissémination ?	Rice *et al.* 2001 Shaw *et al.* 2004 Massimi *et al.* 2002
ScpA	Elastinase	Invasion et destruction des tissus de l'hôte ?	Potempa *et al.* 1988
Aur	Gélatinase Caséinase	Dégradation de la protéine de liaison au fibrinogène ClfB. Dissémination ?	Shaw *et a!.* 2004 Karlsson *et al.* 2001 McAleese *et al.* 2001
SplC	Gélatinase Caséinase	?	Popowicz *et al.* 2006

Tableau 8 : Activités des protéases extracellulaires de *S. aureus*.

Chez *S. aureus* l'existence d'une phéromone appelée AIP (Auto-Inducing Peptide) composée de 7 à 9 acides aminés avec un cycle thiolactone, a déjà été mise en évidence : elle contrôle en effet l'un des principaux systèmes de régulation de la virulence, le régulateur global Agr (Novick 2003). Bien que ne nécessitant pas l'import du peptide de signalisation (Fig. 32), ce phénomène montre que cette bactérie utilise des processus de type *quorum sensing* pour contrôler l'expression de ses gènes.
Mis à part le système Agr, de nombreux autres régulateurs ont été caractérisés chez *S. aureus* (Tableau 9). L'ensemble de ces régulateurs forme un réseau coordonné étroitement lié (nombreuses régulations croisées) permettant notamment à la cellule de s'adapter à son environnement. Les stimuli extracellulaires mis en jeu ainsi que la façon dont le signal est relayé à ces régulateurs sont loin d'être tous identifiés. Pourquoi ne pas imaginer qu'un ou plusieurs de ces régulateurs (ou d'autres parmi ceux n'ayant pas été caractérisés) puissent répondre à une phéromone à voie d'action intracellulaire ou au pool intracellulaire d'acides aminés et de ce fait, faire intervenir un transporteur de peptides ?

L'une ou l'autre de ces possibilités pourrait expliquer le lien potentiel entre transporteurs de peptides et virulence de *S. aureus* établi par 3 études distinctes (Mei *et al*. 1997 ; Coulter *et al.* 1998 ; Begun *et al.* 2005). Chacune visait à identifier les gènes de virulence de *S. aureus* par STM (Signature Tagged Mutagenesis) en suivant la croissance d'un pool de mutants dans un ou plusieurs modèles d'infection : bactériémie chez la souris pour la première étude, abcès, plaie et bactériémie chez la souris pour la seconde et létalité chez le nématode *Caenorhabditis elegans* pour la dernière. Dans les trois études, l'identification des mutants présentant une atténuation de la pathogénécité a permis de caractériser une oligopeptide perméase Opp putative (qui se révélera être Opp2) (Mei *et al*. 1997), trois transporteurs de peptides putatifs (Opp1, Opp2 et DtpT) (Coulter *et al.* 1998) et un Opp putatif (Opp2) (Begun *et al.* 2005) comme participant à la virulence de *S. aureus* dans les modèles étudiés. Des tests de virulence, cette fois sur les mutants isolés, ont ensuite permis de confirmer les résultats obtenus (Tableau 10). A noter cependant qu'une autre étude a repris le mutant *opp2*- obtenu par l'équipe de Coulter en 1998 et a testé sa virulence dans un modèle d'endocardite de lapin (Bayer *et al.* 1999). Les résultats ne montrent aucune différence entre la souche sauvage et le mutant. Les phénotypes obtenus en virulence semblent donc, chez *S. aureus*, très dépendants du modèle utilisé.

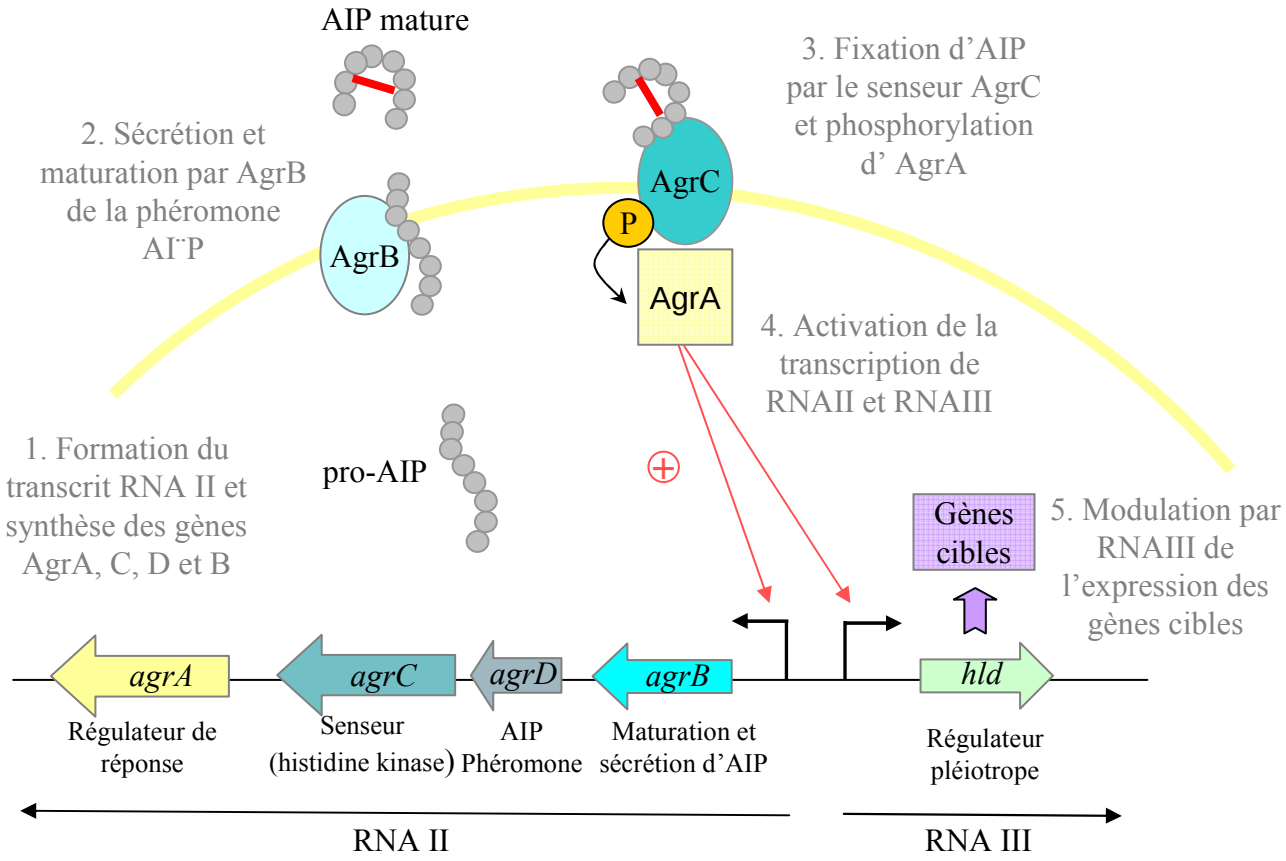


Figure 32: Organisation du système de régulation Agr de *S. aureus*

AIP = Auto Inducing Peptide

d'après Harraghy *et al.* 2007

Régulateur	Stimuli environnementaux	Relai du stimulus	Régulon
Agr	Densité bactérienne, [AIP]	Système à 2 composants	Nombreux gènes codant des protéines extracellulaires et cytoplasmique
Sae	pH, NaCl , antibiotiques	Système à 2 composants	Nombreux gènes codant des protéines extracellulaires
ArlRS	?	Système à 2 composants	Gènes impliquées dans l'autolyse et régulation
SrrAB	O_2	Système à 2 composants	Gènes du métabolisme énergétique
σ^B	Stress environnementaux, éthanol, acide salicylique	Protéine intracellulaire RsbU, ?	Gènes codant des protéines extracellulaires, des protéines de stress, régulateurs
SarA	Stress environnementaux, ?	σ^B, ?	Système Agr, nombreux gènes codant des protéines extracellulaires
SarS	Stress environnementaux, ?	σ^B , ?	Gènes codant des protéines de surface
SarT	Densité bactérienne, ?	Agr, ?	Gènes codant des protéines sécrétées
SarR	?	?	SarA
SarU	?	?	Agr
Rot	Densité bactérienne, ?	Agr, ?	Gènes codant des protéines sécrétées

Tableau 9 : Les principaux régulateurs de *S. aureus*.

d'après Novick 2003

Trois transporteurs de peptides putatifs pourraient donc jouer un rôle dans la virulence de *S. aureus* dans différents modèles d'infection animaux. Cependant ces systèmes n'ont pas été caractérisés (transportent-ils des peptides ?) et aucune fonction ne leur a été attribuée (rôle dans la nutrition, dans la transduction de signaux…?). Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre le lien entre ces transporteurs et les phénotypes mis en évidence.

C. Conclusion

L'étude des transporteurs de peptides de *S. aureus* ouvre donc plusieurs perspectives intéressantes. Elle permettrait d'une part d'identifier le ou les systèmes impliqués dans la nutrition azotée, et qui de ce fait, participent au développement de la bactérie dans le lait dont cette bactérie est un des principaux contaminants. Une fois ce ou ces transporteurs caractérisés, une stratégie de compétition nutritionnelle avec des bactéries lactiques ayant une spécificité de substrat comparable pourrait être envisagée. D'autre part, chez certaines bactéries pathogènes, les transporteurs de peptides ont un rôle dans la régulation de facteurs de virulence ou dans l'adaptation aux changements environnementaux. Un lien entre transporteurs de peptides putatifs et virulence de *S. aureus* ayant déjà été établi, cette voie d'étude parait particulièrement prometteuse puisqu'elle pourrait permettre d'élucider de nouveaux mécanismes liés à la pathogénicité de la bactérie, et pourquoi pas permettre, à long terme, d'identifier de nouvelles cibles de lutte.

Etude	Modèle d'infection	Résultats obtenus	Conclusion
Mei *et al.* 1997	DL50 pour souche sauvage et mutant *opp2*- isolé, injection IP sur souris	DL50 Wt = $2,5.10^5$ ufc DL50 *opp2*- = $2,6.10^8$ ufc	Effet important d'Opp2 sur la virulence de *S. aureus*
Coulter *et al.* 1998	Dénombrement dans abcès de souris, injection des mutants isolés.	Wt = 6,6 log ufc *opp1*- = 5,79 log ufc *opp2*- = 6,17 log ufc *dtpT*- = 5,43 log ufc	Effet significatif d'Opp1 et DtpT sur la croissance de *S. aureus* dans un abcès
	Dénombrement sur plaie cutanée de souris, injection des mutants isolés.	Wt = 6,56 log ufc *opp1*- = 5,75 log ufc *opp2*- = 5,57 log ufc *dtpT*- = 5,53 log ufc	Effet significatif d'Opp1, d'Opp2 et de DtpT sur la croissance de *S. aureus* sur une plaie
	DL50 pour souche sauvage et mutants isolés, injection sur souris.	DL50 Wt = 5,53 log ufc DL50 *opp1*- = 6,3 log ufc DL50 *opp2*- = 6,41 log ufc DL50 *dtpT*- = 7,01 log ufc	Effet important de DtpT, et plus modéré d'Opp1 et 2 sur la virulence de *S. aureus*
Begun *et al.* 2005	Test de létalité sur le nématode *C. elegans*	Létalité à 39 h : Wt = 70% *opp2*- = 30% Létalité à 43 h: Wt = 100% *opp2*- = 60%	Effet significatif de d'Opp2 sur la virulence de *S. aureus* sur le nématode

Tableau 10 : Identification des transporteurs de peptides putatifs Opp1, Opp2 et DtpT de *S. aureus* en tant que facteurs de virulence dans des modèles *in vivo*.

Injection IP = injection intrapéritonéale

DL50 = dose létale à 50%

ufc= unités formant colonies

d'après Mei *et al.* 1997; Coulter *et al.* 1998; Begun *et al.* 2005

RESULTATS

L'étude bibliographique sur les transporteurs de peptides bactériens et les fonctions qu'ils exercent dans la vie cellulaire a mis en évidence l'ubiquité de ces systèmes. Ils exercent en effet des rôles variés dans la vie cellulaire. Ils participent à la nutrition azotée, fonction particulièrement étudiée concernant le développement des bactéries lactiques dans le lait, mais aussi à l'import de phéromones de communication intercellulaire, qui contrôlent notamment le déclenchement de la virulence de certaines bactéries pathogènes.

S. aureus est une bactérie pathogène majeure de l'Homme, se plaçant en France et aux Etats-Unis comme le premier germe responsable d'infections nosocomiales. *S. aureus* est de plus, l'une des principales causes des mammites animales, posant des problèmes sanitaires et économiques très importants chez les éleveurs. Enfin, cette bactérie est une des premières causes d'intoxications alimentaires collectives en tant, notamment, que contaminant des produits laitiers. L'ensemble des problèmes posés par *S. aureus* est d'autant plus accentué que cette bactérie présente une résistance accrue aux antibiotiques, qui laisse craindre une impasse thérapeutique proche. Développer les recherches sur la physiologie et la pathogénécité de *S. aureus* semble donc particulièrement important, pour pouvoir à terme identifier de nouvelles thérapies.

Dans ce contexte, les transporteurs de peptides apparaissent comme des cibles particulièrement intéressantes en tant que verrous potentiels de la croissance de *S. aureus* dans différents milieux (notamment le lait), ou en tant qu'acteurs potentiels de la virulence de la bactérie (des études ont en effet identifiés trois transporteurs de peptides putatifs comme des facteurs de virulence potentiels).

L'identification et la caractérisation systématique et fonctionnelle de l'ensemble des transporteurs de peptides de *S. aureus* a constitué mon travail de thèse. La première partie des mes résultats consiste en une présentation de la structure et de l'organisation des transporteurs identifiés. Nous verrons en effet que cette bactérie possède 4 ABC-transporteurs Opp très bien conservés entre les souches mais présentant chacun de nombreuses particularités, et une protéine de transport des di- et tripeptides DtpT. Dans les parties qui suivent, nous nous attacherons à l'étude des fonctions de ces différents transporteurs, qui a été permise grâce à l'obtention de mutants de délétion simples et multiples. La première fonction abordée est celle de la nutrition azotée. Nous verrons notamment que seuls deux transporteurs de peptides sont impliqués dans ce phénomène. L'étude de l'implication de ces systèmes dans le transport de peptides phéromones fera ensuite l'objet de la dernière partie de ce chapitre.

I. Présentation des transporteurs de peptides de S. aureus : une multiplicité de systèmes présentant de nombreuses particularités.

L'identification de l'ensemble des transporteurs de peptides putatifs de *S. aureus* a été effectuée par analyse de séquence sur les génomes de 12 souches (les souches JH1, JH9, NCTC8325, N315, Mu50, COL, MRSA252, MSSA476, MW2, USA300, RF122 et Newman). Parmi les transporteurs de peptides mis en évidence lors de cette analyse, deux opérons *opp1ABCDF* et *opp2BCDF* ainsi qu'un gène *dtpT* avaient été décrits auparavant par l'équipe de Coulter en 1998. Par homologie de séquence avec l'opéron *opp1*, deux opérons *opp* adjacents supplémentaires, *opp3ADFBC* et *opp4ADFBC*, ainsi qu'un gène *opp5A* indépendant ont été identifiés (Fig. 33). La structure et l'organisation de ces différents systèmes a alors été étudiée.

A. Analyse structurale des protéines

Nous avons vu dans l'introduction bibliographique que les protéines constitutives des systèmes Opp et les protéines DtpT présentaient plusieurs motifs caractéristiques. Ceux-ci ont été recherchés dans les séquences des transporteurs de peptides de *S. aureus* ayant été identifiés.

Tout d'abord, la protéine DtpT de *S. aureus* présente une structure tout à fait représentative de sa famille, puisqu'elle possède 12 segments transmembranaires et contient au sein du 4ème segment le motif signature des transporteurs de peptides à force proton-motrice PTR (le motif FING).

La structure de l'ensemble des protéines des systèmes Opp putatifs de *S. aureus* a ensuite été examinée. Les protéines de fixation de substrat, c'est-à-dire Opp1A, Opp3A, Opp4A et Opp5A possèdent toutes une extension N-terminale lipidique hydrophobe, caractéristique des lipoprotéines. Le motif consensus permettant de distinguer les protéines de fixation des peptides et du nickel des autres (Tam et Saier 1993), est parfaitement conservé chez Opp1A alors que l'on peut observer la substitution d'un acide aminé chez Opp3A et Opp5A, et deux substitutions chez Opp4A (Fig. 34).

D'autre part, à partir de données cristallographiques sur la protéine de fixation OppA de *S. thyphimurium*, il a été montré que l'acide aminé Asp 445 était impliqué dans la liaison au

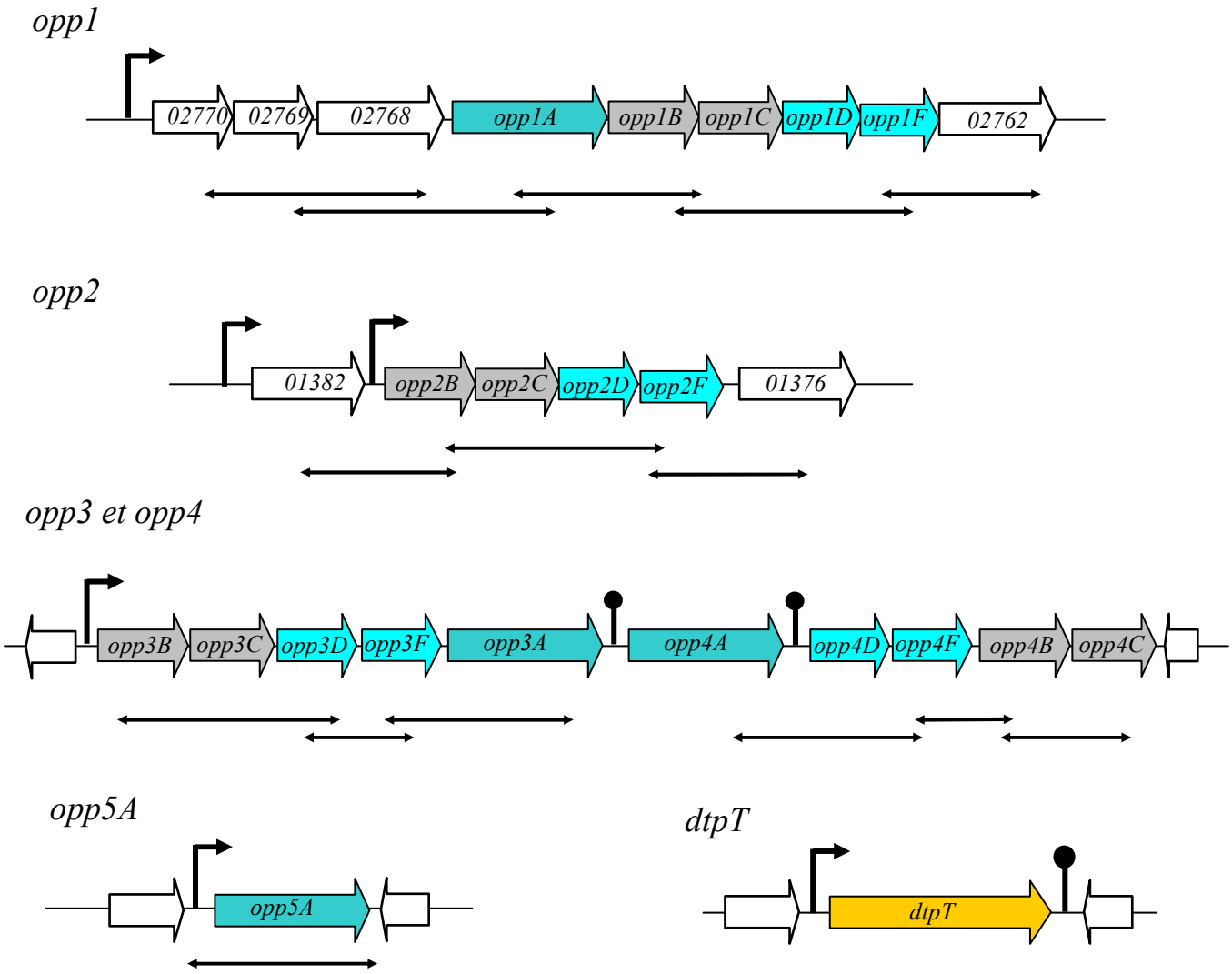


Fig.33 : Organisation génétique des transporteurs de peptides putatifs de *S. aureus.*

Les doubles flèches représentent les différents transcrits ayant été obtenus expérimentalement.

Les numéros indiqués dans les gènes co-transcrits avec les opérons *opp* correspondent à leur numéro de référence NCBI dans la souche NCTC8325 (les faire précéder de SAOUHSC_ pour recherche).

Les promoteurs et les terminateurs putatifs ont été identifiés grâce aux programmes de prédiction BPROM (http://www.softberry.com) et RNA secondary structure prediction (http://www.genebee.msu.su).

substrat. L'alignement des séquences d'un ensemble de protéines de fixation des peptides ayant été caractérisées montre que ce résidu est assez bien conservé au sein de cette famille protéique. Chez *S. aureus*, il s'avère que seule la protéine Opp3A possède cet acide aminé.

Concernant les protéines transmembranaires, toutes les OppB de *S. aureus* possèdent 6 hélices α, constituant les fragments transmembranaires de la protéine, sauf Opp4B de la souche MRSA252 qui n'en contient que 4, ce qui est lié à une délétion au niveau de la partie C-terminale de la séquence. Les protéines OppC contiennent quant à elles 5 fragments transmembranaires, sauf encore une fois celle du système Opp4 qui en contient 6 chez toutes les souches. Les protéines transmembranaires de *S. aureus* présentent donc une structure classique d'ABC-transporteur (Biemans-Oldehinkel *et al.* 2006), avec 11 ou 12 hélices par translocon.

Enfin toutes les protéines OppD et F des quatre systèmes possèdent les domaines conservés de fixation de l'ATP Walker A et Walker B ainsi que le motif LSSGQ, signature caractéristique des ATPases des ABC-transporteurs.

B. Des transporteurs conservés entre les souches mais différents les uns des autres

Les opérons *opp1,2,3,4* ainsi que les gènes *opp5A* et *dtpT* de *S. aureus* sont très bien conservés entre les différentes souches, présentant des pourcentages d'identité nucléotidique environnant 99%. L'opéron *opp4* fait exception, puisque son gène *opp4A* est interrompu par un transposon dans la souche MRSA252 (la plus divergente des souches cliniques humaines, Holden *et al.* 2004) et que *opp4B* est tronqué. Chez la souche RF122 (la seule souche issue de mammite bovine, Herron et *al.* 2002) l'opéron *opp4* entier est absent.

On peut noter de plus, dans cette dernière souche, la présence d'un autre opéron *opp*, situé à 169 paires de bases en aval d'*opp3*. Cet opéron présente une organisation génétique et une séquence nucléotidique très proches de celles d'*opp3* si bien que l'on peut penser à une duplication de ce dernier. Néanmoins, deux codons stop sont présents dans le gène *oppA* de ce système, conduisant à la production d'une protéine non fonctionnelle.

Enfin, la souche USA300 (SARM), hautement virulente et à l'origine d'infections communautaires (Diep *et al.* 2006) contient un cinquième opéron *oppABCDF*. Cet opéron ne présente pas d'homologie particulière avec *opp1, 2, 3* et *4* (environ 25% d'identité nucléotidique). Il est, avec le gène *arc* codant une protéine du métabolisme de l'arginine,

Séquence consensus:

[AG]-x(6,7)-[DNEG]-x(2)-[STAIVE]-[LIVMFYWA]-x-[LIVMFY]-x- [LIVM]-[KR]-[KRHDE]-[GDN]-[LIVMA]-[KNGSP]-[FW]

Opp-1A	A-(KKWDVSE)-D-(GK)-T-Y-(T)-F-(H)-L-R-D-D-V-K-F
Opp-3A	A-(FPEKSK)- D-(GK)-T-L-(K)-V-(K)-L-R-**S**-D-A-K-W
Opp-4A	A-(SWKDIE)- **P**-(AK)-**K**-I-(E)-F-(K)-I-K-K-G-I-K-W
Opp-5A	**L**-(VKSYHQP)-N-(DT)-T-L-(D)-I-(E)-L-K-D-N-I-K-F

Fig.34 : Recherche du motif signature de la famille des protéines de fixation des peptides et du nickel chez les protéines OppA putatives de *S. aureus* NCTC8325. Les résidus non conservés sont indiqués en gras.

contenu au sein d'un élément génétique mobile, appelé ACME, qui est absent des autres souches. Il a été suggéré qu'Opp et Arc puissent favoriser le développement et la survie de la bactérie lors de l'infection et participer ainsi au caractère hautement pathogène de cette souche.

Si les transporteurs sont plutôt bien conservés entre les souches, en revanche, dans une même souche (nous avons pris comme référence les séquences de la souche NCTC8325), on peut observer de nombreuses particularités selon le système Opp considéré.

Tout d'abord, les opérons sont différents en terme d'organisation génétique (Fig.33). Une telle variabilité dans l'ordre des gènes est fréquente au sein des opérons *opp* bactériens. En revanche, le cas de l'opéron *opp2* est bien particulier puisqu'il ne possède pas de gène codant pour une protéine OppA. Cette absence peut avoir plusieurs explications. Tout d'abord ce système pourrait marcher dans le sens de l'export, et n'a donc pas besoin de protéine de fixation du substrat. Cependant Opp2, sur la base de sa séquence, est prédit par le programme ABSCISSE (http://www.pasteur.fr/recherche/unites/pmtg/abc/ database) comme un système d'import. Dans ce cas, le translocon *opp2BCDF* doit recruter une ou plusieurs des quatre protéines de fixation présentes dans le génome. Cette configuration serait alors inédite dans le monde bactérien car, si il est courant qu'un translocon utilise une protéine de fixation codée indépendamment dans le génome, au moins une autre copie d'un gène *oppA* est également présente dans l'opéron.

Le cas de la protéine Opp5A apparaît également assez particulier. En effet, chez de nombreuses bactéries, les protéines de fixation des peptides isolées utilisent un translocon codé indépendamment sur le génome. Elles partagent dans ce cas un fort degré d'homologie avec la protéine *oppA* codée au sein de l'opéron correspondant (de 49 à 97% d'identité protéique). Chez *S. aureus*, la protéine isolée Opp5A ne présente pas d'homologie particulièrement forte avec Opp1A, 3A ou 4A (respectivement 26, 30 et 29 % d'identité protéique) (Tableau 11 C). Les données de séquence ne permettent donc pas de prédire avec quel translocon cette protéine de fixation pourrait fonctionner. Peut être utilise t-elle alors le translocon « orphelin » *opp2BCDF* ?

Enfin, en terme de pourcentage d'identité protéique, on peut également observer une conservation assez faible entre chaque système (Tableaux 11 A, B et C). Globalement, les protéines des différents systèmes sont assez éloignées (31% d'identité en moyenne) mis à part

A.

protéines	identité protéique (%)
OppA 1, 3, 4	27
OppB 1, 2, 3, 4	35
OppC 1, 2, 3, 4	27
OppD 1, 2, 3, 4	33
OppF 1, 2, 3, 4	33

B.

protéines	identité protéique (%)
OppA 3, 4	31
OppB 3, 4	42
OppC 3, 4	32
OppD 3, 4	43
OppF 3, 4	50

C.

	Opp1A	Opp3A	Opp4A	Opp5A
Opp1A		27,5	29	26
Opp3A			28,5	30
Opp4A				29

Tableau 11 : A. Pourcentages d'identité entre les protéines des quatre opérons *opp*.
B. Pourcentages d'identité entre les protéines des systèmes Opp3 et Opp4
C. Pourcentages d'identité entre l'ensemble des protéines de fixation du substrat OppA.

Ces chiffres ont été obtenus en effectuant des alignements de séquences protéiques de la souche de *S. aureus* NCTC 8325 par le logiciel d'alignements multiples AliBee (http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html)

les protéines des deux systèmes adjacents Opp3 et Opp4, qui sont plus proches avec 40 % d'identité en moyenne. On pourrait alors supposer qu'un de ces systèmes soit une duplication de l'autre, bien que l'ordre des gènes ne soit pas conservé (Fig.33).

C. Les transporteurs de peptides de *S. aureus* au sein du monde bactérien

Des homologues aux différents systèmes de transport des peptides putatifs de *S. aureus* (toujours en prenant comme référence la souche NCTC8325) ont été recherchés chez un ensemble de bactéries à Gram positif (Tableau 12).

Tout d'abord, la protéine DtpT est, en général, bien conservée parmi les bactéries, avec des pourcentages d'identité particulièrement élevés parmi les espèces du genre *Staphylococcus*.

La conservation des différents systèmes Opp est par contre beaucoup plus hétérogène. Par exemple chez *S. epidermidis*, la seconde espèce d'importance clinique au sein du genre *Staphylococcus*, on peut retrouver tous les Opp, avec de très forts pourcentages d'identité sauf Opp4 dont les régions amont et aval sont pourtant bien conservées. Cette absence est d'autant plus intéressante que c'est également le seul système qui n'est pas conservé dans toutes les souches de *S. aureus*. Ces observations peuvent suggérer que ce système est en train de se perdre au cours de l'évolution ou qu'il est impliqué dans des processus biologiques très particuliers, spécifiques à certaines souches.

Si l'on étend la recherche aux autres espèces bactériennes, on remarque ensuite que seul Opp3 est retrouvé chez de nombreuses souches avec de hauts pourcentages d'identité (Tableau 12). Le fait que ce système soit aussi bien conservé au sein du monde bactérien (bactéries pathogènes ou non) peut laisser penser qu'il exerce une fonction générale nutritionnelle, comme cela l'a d'ailleurs été montré pour certains de ses homologues (chez *L. lactis* notamment).

A noter également le cas particulier de *Bacillus halodurans*, seule bactérie présentant une bonne conservation du système Opp1 ainsi que de ses régions adjacentes. La particularité de cette bactérie est de pouvoir pousser dans des environnements alcalins. De même qu' Opp est impliqué dans la résistance au froid et à la pression osmotique chez *L. monocytogenes*, pourquoi ne pas imaginer que chez *B. halodurans* et *S. aureus*, Opp1 participe à la résistance au stress alcalin ?

Protéine *	*S. epi*	*S. haemo*	*S. sapro*	*B. halo*	*B. thurin*	*L. mono*	*S. agal*	*L. lactis*
DtpT	83	79	73		32	46	48	41
1A	82			54				
1B/C	80			54				
1D/F	68			47				
2B/C	68		59					
2D/F	57		48					
3A	66	68	61		42	40	39	35
3B/C	87	89	85		58	54	51	45
3D/F	85	88	86		66	65	66	59
4A				32				
4B/C				42				
4D/F				53				
5A	57		61					

Tableau 12 : Comparaison (pourcentages d'identité) entre les protéines Opp de *S. aureus* NCTC 8325 et celles d'autres bactéries à Gram positif. Les identités inférieures à 30% ne sont pas prises en compte.

* Les valeurs indiquées pour les protéines OppB/C et oppD/F correspondent aux moyennes des pourcentages d'identité obtenus individuellement avec chaque protéine.

S. epi: *Staphylococcus epidermidis*; *S. haemo*: *Staphylococcus haemolyticus*; *S. sapro*: *Staphylococcus saprophyticus*; *B. halo*: *Bacillus halodurans*; *B. thurin*: *Bacillus thuringiensis*; *L. mono*: *Listeria monocytogenes*; *S. agal*: *Streptococcus agalactiae*; *L. lactis*: *Lactococcus lactis*.

L'ensemble de ces données ont été obtenues en utilisant le programme de comparaison de séquences FASTA (http://fasta.bioch.virginia.edu/fasta/fasta_list.html)

D. Analyse transcriptionnelle des opérons *opp*

Afin de déterminer l'organisation génétique de l'ensemble des systèmes de transport des peptides putatifs de *S. aureus*, une recherche de promoteurs et de terminateurs putatifs respectivement en amont et en aval des gènes d'intérêt a été entreprise (http://www.softberry.com; http://www.genebee.msu.su). Il est intéressant de noter qu'aucun promoteur putatif n'a pu être mis en évidence en amont d'Opp1A et en amont d'Opp4A (Fig. 33). De même aucun terminateur n'est présent en aval d'Opp1 et d'Opp2 alors que des gènes contigus codés dans le même sens sont présents. Il parait donc possible que plusieurs des opérons *opp* soient co-transcrits avec d'autres gènes. Pour tester cette hypothèse, une analyse transcriptionnelle des opérons *opp* et des régions adjacentes a été effectuée par RT-PCR sur des ARN collectés à partir d'une culture en milieu chimiquement défini (MCD) de *S. aureus* RN6390 (souche de laboratoire dérivée de la souche NCTC8325). Les résultats nous ont permis de montrer en premier lieu, que l'ensemble des gènes des quatre systèmes Opp ainsi que le gène *opp5A* sont exprimés dans ces conditions de culture. En utilisant des amorces chevauchantes, l'organisation transcriptionnelle de chaque système a été ensuite étudiée en tenant compte des gènes adjacents (Fig.33).

Concernant le système Opp1, les amplifications obtenues suggèrent une organisation en opéron des gènes *opp1ABCDF* avec quatre autres gènes. Le premier code une diaminopimelate epimerase, enzyme impliquée dans la biosynthèse de la lysine et du peptidoglycane (SAOUHSC_02770), un autre codant une protéine transmembranaire putative de la famille des transporteurs MFS (Major Facilator Superfamily) (SAOUHSC_02762) et enfin les deux derniers codant des protéines de fonction inconnue (SAOUHSC_02768 et SAOUHSC_02769). Le système Opp2 est lui aussi transcrit avec d'autres gènes, un en amont SAOUHSC_01376, malgré la présence d'un promoteur putatif juste devant *opp2B*, et un autre en aval, SAOUHSC_01382. Ces deux gènes codent des protéines de fonction inconnue.

Enfin, il s'avère que les systèmes Opp3 et Opp4 sont transcrits indépendamment dans la mesure où aucun transcrit n'a pu être détecté entre *opp3A* et *opp4A*, ce qui est cohérent avec la présence d'un terminateur putatif en aval d'*opp3A*. Concernant Opp4, les résultats indiquent une organisation polycistronique des gènes *opp4ABCDF* malgré la présence d'un terminateur putatif en aval d'*opp4A*. Cependant on peut tout à fait supposer qu'il y ait en fait deux transcrits : un du gène *opp4A* seul et de l'opéron entier comme c'est le cas chez d'autres opérons *opp* bactériens.

Chez les procaryotes, il est fréquent que des gènes co-transcrits aient un lien fonctionnel. Ici, la protéine SAOUHSC_02770, co-transcrite avec *opp1* est annotée comme potentiellement impliquée dans la synthèse du peptidoglycane. L'association en opéron de ce gène et des gènes codant le transporteur de peptides Opp1 pourrait se révéler cohérente dans la mesure où il a été suggéré chez *E. coli* que Opp serait impliqué dans le renouvellement du peptidoglycane (Park *et al.* 1998).

E. Conclusion

L'ensemble des analyses bioinformatiques et transcriptionnelles effectuées nous ont donc permis de mettre en évidence, au sein des transporteurs de peptides de *S. aureus* des différences importantes en terme de structure, de conservation et d'organisation. Si Opp3 apparaît comme le système le plus « classique » et le mieux conservé dans le monde bactérien, au contraire, Opp1, Opp2 et Opp4 présentent plusieurs particularités. Ces différences sont-elles liées à des différences de fonction ? Pourquoi une telle multiplicité de transporteurs ? Les données obtenues, bien que permettant de poser des hypothèses, ne permettent pas de répondre à ces questions.

Pour aborder la question du rôle de chaque transporteur de peptides de *S. aureus*, des mutants de délétion, simples et multiples, ont été construits dans la souche RN6390, en utilisant une stratégie de construction par double recombinaison homologue sans insertion de gène de résistance à un antibiotique (cf matériel et méthode). Nous avons ainsi obtenu l'ensemble des souches listées dans le tableau 13. Une partie de ces mutants a ensuite permis de tester l'implication de chacun des transporteurs de peptides dans différentes fonctions de la vie cellulaire. Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la fonction la plus générale des transporteurs de peptides, la nutrition azotée.

Nom	Délétion	Gène(s) délété(s)
opp1-	simple	opéron *opp1ABCDF*
opp2-	simple	opéron *opp2BCDF*
opp3-	simple	opéron *opp3BCDFA*
opp4-	simple	opéron *opp4ADFBC*
opp5A-	simple	gène *opp5A*
dtpT-	simple	gène *dtpT*
opp1,3-	double	opéron *opp1ABCDF* et opéron *opp3BCDFA*
opp2,4-	double	opéron *opp2BCDF* et opéron *opp4ADFBC*
opp1,4-	double	opéron *opp1ABCDF* et opéron *opp4ADFBC*
opp2,5A-	double	opéron *opp2BCDF* et gène *opp5A*
opp3,dtpT-	double	opéron *opp3BCDFA* et gène *dtpT*
opp1,3,4-	triple	opéron *opp1ABCDF*, opéron *opp3BCDFA* et opéron *opp4ADFBC*
opp1,2,3-	triple	opéron *opp1ABCDF*, opéron *opp2BCDF* et opéron *opp3BCDFA*
opp1,2,3,4-	quadruple	opéron *opp1ABCDF*, opéron *opp2BCDF,* opéron *opp3BCDFA* et opéron *opp4ADFBC*
opp1,2,3,4,dtpT-	quintuple	opéron *opp1ABCDF*, opéron *opp2BCDF,* opéron *opp3BCDFA,* opéron *opp4ADFBC* et gène *dtpT*

Tableau 13 : Liste des mutants de délétion construits à partir de la souche de *S. aureus* RN6390.

II. Les transporteurs de peptides de S. aureus et leur rôle dans la nutrition azotée

Une des premières fonctions des transporteurs de peptides est de fournir à la cellule les nutriments azotés dont elle a besoin pour se développer. On sait notamment que chez *L. lactis* MG1363, le système Opp est indispensable à la croissance dans le lait, milieu naturellement pauvre en acides aminés libres. Dans la mesure où *S. aureus* est également capable de s'y développer et en est un des principaux contaminants, le lait apparaît comme un milieu approprié pour tester l'impact des différents transporteurs de peptides sur la nutrition azotée.

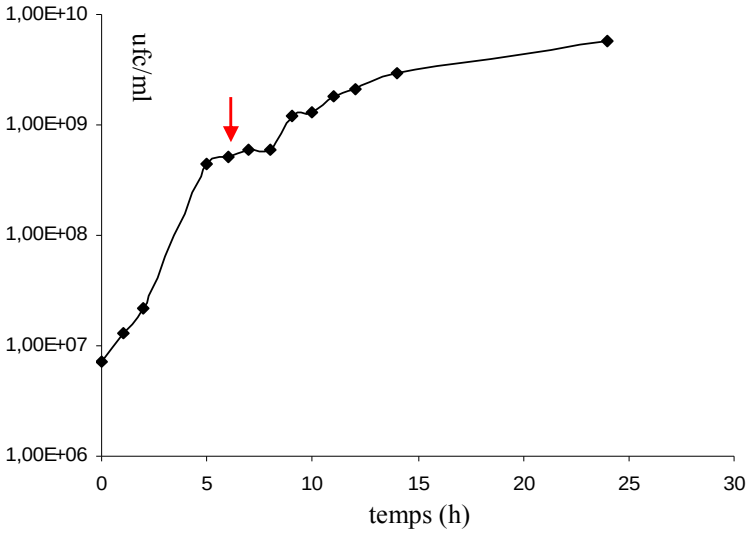
A. Seuls deux transporteurs de peptides ont un rôle nutritionnel lors de la croissance de *S. aureus* dans le lait

1) La croissance de *S. aureus* RN6390 et de ses différents mutants de transport dans le lait

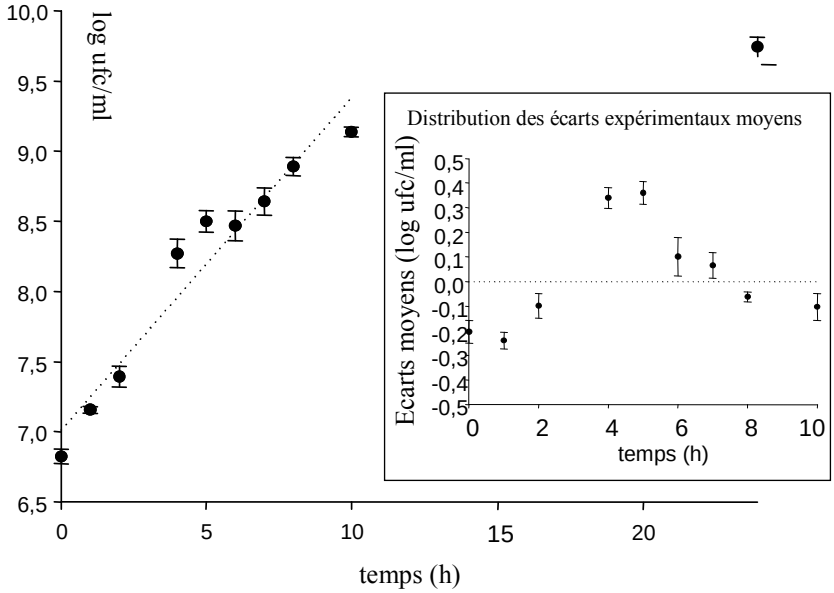
Dans un premier temps, le comportement de la souche sauvage lors de la croissance dans le lait a été étudié. Une analyse de régression sur les courbes obtenues lors de 7 expériences indépendantes nous permet d'affirmer que *S. aureus* RN6390 a une courbe de croissance diauxique dans le lait (Fig. 35). Elle commence en effet par une première phase exponentielle (taux de croissance μ=1.35 h^{-1} ± 0,03) qui lui permet d'atteindre une population d'environ 5.10^8 ufc / ml. On peut observer ensuite une courte phase de transition d'environ 3 heures, au cours de laquelle la croissance bactérienne s'arrête. Enfin, la reprise d'une deuxième phase exponentielle (taux de croissance μ=0.60 h^{-1} ± 0,04) lui permet d'atteindre une population finale d'environ 5.10^9 ufc / ml.

Ce type de croissance bactérienne diauxique dans le lait, n'est pas un cas propre à *S. aureus* puisqu'il a déjà été observé avec la bactérie lactique *S. thermophilus* (Letort *et al.* 2002). A noter également que pendant la phase de transition intermédiaire, se produit la coagulation du lait (Fig. 35). Ce phénomène correspond à la déstructuration des micelles de caséine ce qui entraîne leur précipitation, soit du fait de l'acidification du milieu, soit par hydrolyse enzymatique. Ici aucune baisse significative de pH n'étant observée au cours de la

1. Suivi de la croissance de la souche de *S. aureus* RN6390 dans le lait. La flèche rouge indique le moment où la coagulation du lait est observée.
Expérience répétée 7 fois



2. Construction de la courbe moyenne de croissance.
Hypothèse: la croissance se fait en une seule phase exponentielle.
Calcul de la droite de régression linéaire puis analyse de la distribution des écarts expérimentaux moyens → écarts forts et répartition non aléatoire.
Hypothèse non satisfaisante



3. Hypothèse: la croissance se fait en deux phases exponentielles distinctes. Calcul de la droite de régression linéaire puis analyse de la distribution des écarts expérimentaux moyens → écarts faibles répartis de façon aléatoire autour de 0.
Hypothèse validée, croissance diauxique

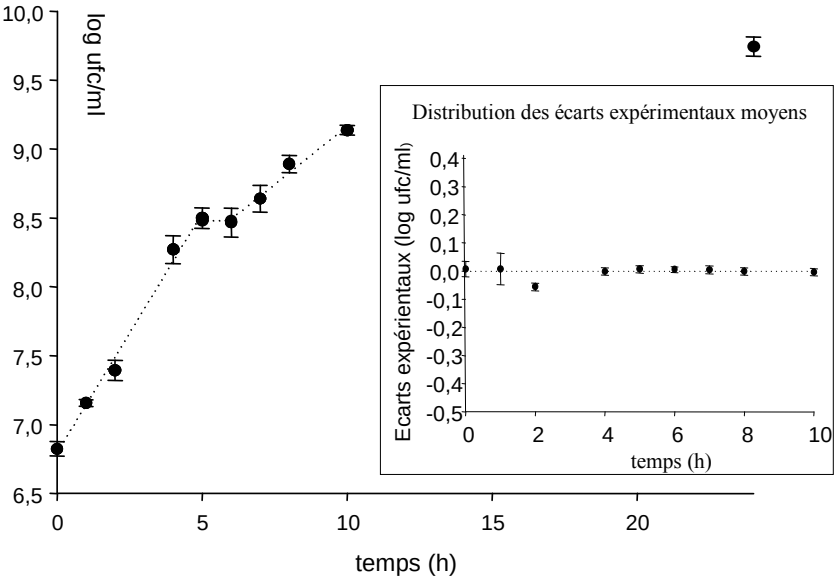


Fig. 35: Analyse de la croissance de *S. aureus* RN6390 dans le lait.
Validation de l'hypothèse d'une croissance diauxique

croissance, la coagulation du lait ne peut être provoquée que par l'activité protéolytique des enzymes sécrétées par *S. aureus*.

Pour mesurer l'impact des différents transporteurs sur le développement de la bactérie dans le lait, la croissance de la souche sauvage y a été comparée à celle des mutants simples *opp*-. Aucune différence n'a été observée entre la souche sauvage et les souches *opp1-, opp2-* et *opp4-*. En revanche, la croissance du mutant *opp3-* est affectée (Fig. 36). En effet, ce mutant présente une première phase de croissance exponentielle (taux de croissance μ=1.06 h^{-1} ± 0,08) pendant laquelle il pousse légèrement moins vite que la souche sauvage (réduction du taux de croissance de l'ordre de 20%). Bien que faible, cette différence est néanmoins hautement significative sur le plan statistique (p = 0,003). La phase stationnaire intermédiaire du mutant *opp3-*, qui survient, comme chez la souche sauvage à un population d'environ 5.10^8 ufc / ml, est par contre beaucoup plus longue (environ le double de celle de la souche sauvage). C'est également pendant cette phase que la coagulation du lait se produit, avec un décalage d'environ 1,5 heures par rapport à la souche sauvage. Une reprise de la croissance lors d'une deuxième phase exponentielle est ensuite observée. Elle permet à la bactérie d'atteindre une population finale d'environ 3.10^9 cfu/ml, légèrement inférieure à celle atteinte par la souche sauvage.

Parmi les quatre systèmes ABC de transport des peptides putatifs, seul Opp3 semble jouer un rôle sur le développement de *S. aureus* dans le lait. Nous avons ensuite testé l'impact de la protéine de transport de di- et tripeptides putative DtpT dans ce phénomène. Pour cela, le suivi de croissance du mutant *dtpT-* ainsi que de différentes combinaisons *opp, dtpT-* a été réalisé. Si les mutants *dtpT-* et *opp1,2,4,dtpT-* présentent une croissance comparable à celle de la souche sauvage, le double mutant *opp3, dtpT-* est très fortement affecté (Fig. 36). On observe en effet, que sa croissance se déroule en une seule phase exponentielle qui ne lui permet d'atteindre qu'une population finale d'environ $3{,}5.10^8$ ufc /ml. Cette densité bactérienne est similaire à celle atteinte par la souche sauvage et le mutant *opp3-* au moment de la phase stationnaire intermédiaire. Chez ce double mutant, on note également que la coagulation du lait se fait très tardivement avec un décalage d'environ 5,5 heures par rapport à celle de la souche sauvage.

Le système Opp3 est donc indispensable à une croissance optimale de *S. aureus* dans le lait. Son absence peut toutefois être en partie compensée par la protéine DtpT. En effet, bien que le simple mutant *dtpT-* présente une croissance similaire à celle de la souche

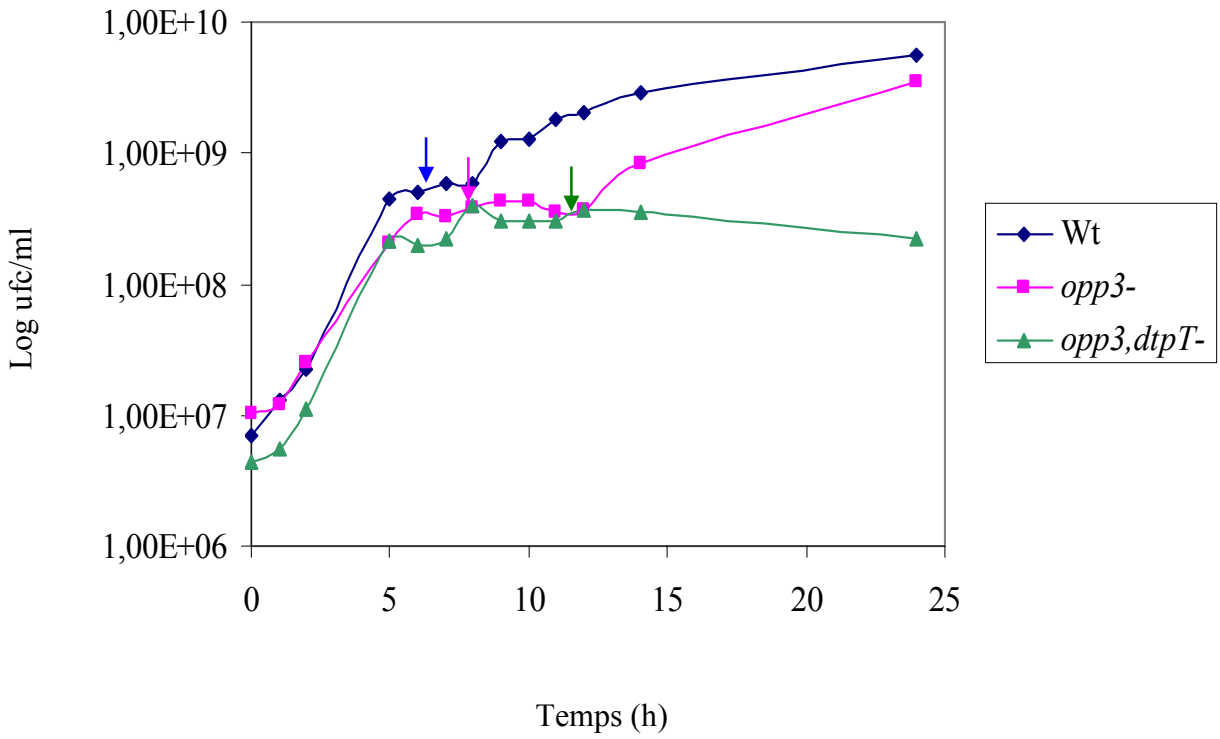


Fig. 36 : Courbes de croissance dans le lait de la souche sauvage RN6390 et de ses mutants isogéniques *opp3*- et *opp3,dtpT*-.

Les flèches indiquent le moment de la coagulation du lait, qui est observée à t + 6h, t + 7,5 h et à t + 11,5 h respectivement chez la souche sauvage, le mutant *opp3*- et le mutant *opp3,dtpT*-.

sauvage, la protéine de transport des di- et tripeptides a toutefois un impact important dans un contexte *opp3-*.

Les autres systèmes Opp n'ont, en revanche, aucun rôle apparent sur le développement de la bactérie dans le lait dans la mesure où le quadruple mutant *opp1,2,4,dtpT-* et le quintuple mutant *opp1,2,3,4,dtpT-* ont une courbe de croissance comparable, respectivement à celle de la souche sauvage, et à celle du mutant *opp3, dtpT-*. Cette absence de rôle pourrait notamment s'expliquer par le simple fait que, dans le lait, ces transporteurs ne sont pas (ou pas assez) exprimés. L'expression de l'ensemble des transporteurs Opp de *S. aureus* lors de la croissance dans ce milieu a alors été mesurée pour éclaircir ce point.

2) Mesure de l'expression des différents systèmes Opp lors de la croissance dans le lait

L'expression des transporteurs de peptides putatifs de *S. aureus* RN6390 a été suivie en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance dans le lait. Les mesures ont été effectuées sur deux niveaux (Fig.37). D'une part au niveau protéique par Western-Blot, ce qui n'a pu être effectué que pour les protéines Opp1A, Opp3A et Opp4A contre lesquels nous disposions d'anticorps polyclonaux spécifiques. Et d'autre part au niveau transcriptionnel, en mesurant l'expression des gènes *opp1A*, *opp2B*, *opp3A*, *opp4A* et *opp5A*, par RT-PCR semi-quantitative. Cette deuxième approche a permis de confirmer les résultats obtenus au niveau protéique et d'étendre l'étude à l'ensemble des transporteurs.

Il a ainsi été observé que tous les systèmes *opp* sont exprimés lors de la croissance dans le lait, au moins au niveau transcriptionnel. Cependant, leur niveau d'expression est très variable (Fig.37). En effet, les protéines Opp1A et Opp3A sont fortement produites tout au long de la croissance, ce qui est corrélé à une forte expression des gènes *opp1A* et *opp3A*, comparable à celle d'*opp2B*. En revanche la présence de la protéine Opp4A n'a pu être détectée par Western-Blot ce que l'on peut expliquer par un très faible niveau de transcription du gène *opp4A*. Enfin, le gène *opp5A* présente un niveau de transcription intermédiaire.

De cette analyse il apparaît clairement, au moins concernant les systèmes Opp1, Opp2 et la protéine Opp5A, que l'absence de rôle significatif sur la croissance de *S. aureus* dans le lait n'est, dans ces conditions de culture, pas liée à une trop faible expression des gènes les codant. Ces transporteurs n'interviendraient donc pas dans l'approvisionnement en nutriments. Le cas du système Opp4 est plus discutable car le gène *opp4A* est très faiblement

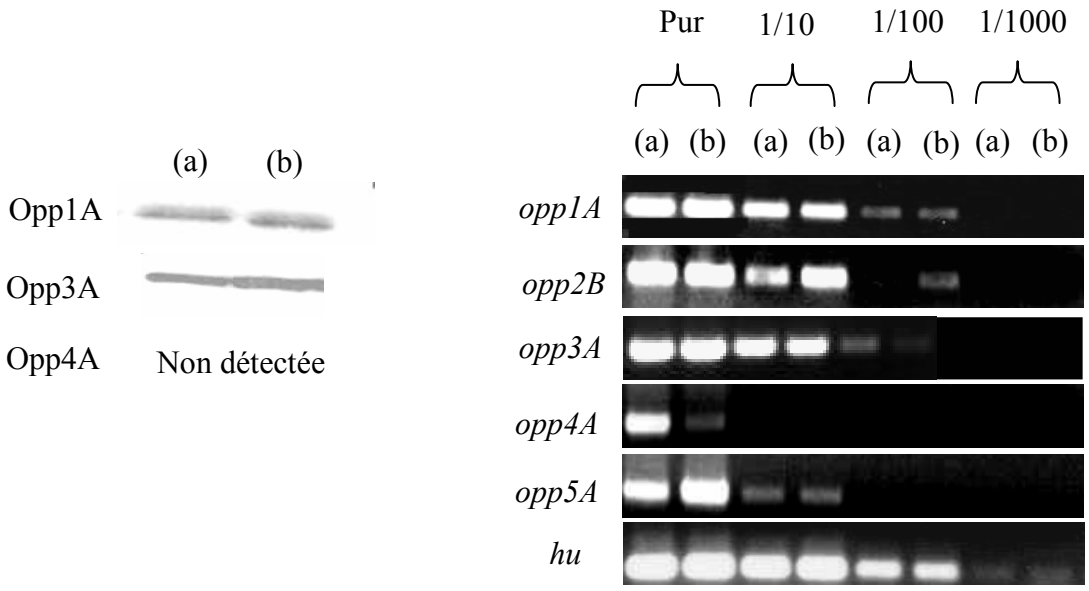


Fig. 37 : Expression des différents systèmes Opp lors de la croissance dans le lait.

A gauche figurent les résultats obtenus par Western-Blot pour les protéines Opp1A, 3A et 4A avec des anticorps spécifiques. Les protéines Opp1A et Opp3A ont été détectées à leur taille attendue de 57,7 et 59,2 kD respectivement.

A droite figure l'analyse de l'expression des gènes *opp1A*, *opp2B*, *opp3A* et *opp5A*. Les ADN complémentaires ont été plusieurs fois dilués d'un facteur 10 afin de pouvoir quantifier et comparer les niveaux de transcription de chaque gène. Les transcrits du gène *hu* ont été utilisés comme contrôle interne.

Les protéines et les ARNm ont été extraits lors de la première phase exponentielle (a) et lors de la phase stationnaire (b) de croissance.

transcrit et la protéine Opp4A non détectée. Il est donc possible que ce système puisse participer à la nutrition azotée dans des conditions environnementales différentes.

3) Un phénotype lié à la nutrition azotée

Les mutants *opp3*- et *opp3,dtpT*- présentent un défaut de croissance dans le lait par rapport à la souche sauvage. L'hypothèse la plus directe pour expliquer ce phénotype est que ces deux transporteurs de peptides participent à la nutrition azotée de la bactérie. En leur absence, *S. aureus* ne disposerait pas d'assez d'acides aminés pour se développer normalement. On ne peut exclure cependant, qu'un autre phénomène, plus indirect, puisse également participer à ce défaut de croissance. Pour vérifier cela, les deux mutants ont été cultivés dans du lait auquel ont été ajoutés 18 acides aminés à des concentrations correspondant à celles utilisées dans le MCD de Taylor et Holland (1989). Dans ces conditions, la bactérie dispose de tous les acides aminés dont elle a besoin sous forme libre et en excès. Les résultats montrent que dans ce milieu, la souche sauvage et les mutants *opp3*- et *opp3,dtpT*- ont des courbes de croissance quasiment identiques (Fig. 38). Les trois souches présentent en effet une croissance rapide, en une seule phase exponentielle (taux de croissance $\mu \approx 1.7\ h^{-1}$), leur permettant d'atteindre une population finale équivalente d'environ 5.10^9 ufc/ml. La coagulation du lait a eu lieu dans les trois cas, après 5,5 heures de culture.

Plusieurs observations intéressantes peuvent être tirées de cette expérience. Tout d'abord, l'ajout d'acides aminés permet aux mutants *opp3*- et *opp3,dtpT*- de compenser entièrement leur défaut de croissance observé en lait, ce qui montre que la disponibilité en nutriments azotés en est la seule cause. On peut voir également dans ces conditions, que contrairement à ce qui est observé lors d'une culture dans du lait seul, la croissance n'est pas diauxique (Fig. 38). Cela indique qu'en lait, l'arrêt momentané du développement de la bactérie lors de la phase stationnaire intermédiaire résulte d'une carence en un, ou plusieurs acide(s) aminé(s). Chez la souche sauvage, cet ou ces acides aminés peuvent être apportés rapidement, certainement sous forme d'oligopeptides. Chez le mutant *opp3*-, la présence de la protéine DtpT, permet un approvisionnement, cependant plus tardif de la bactérie alors que le double mutant *opp3dtpT* s'arrête de croître.

Un point important reste cependant à éclaircir à l'issue de cette étude. En effet, nous avons vu précédemment que les mutants *opp3*- et *opp3,dtpT*- coagulaient le lait plus

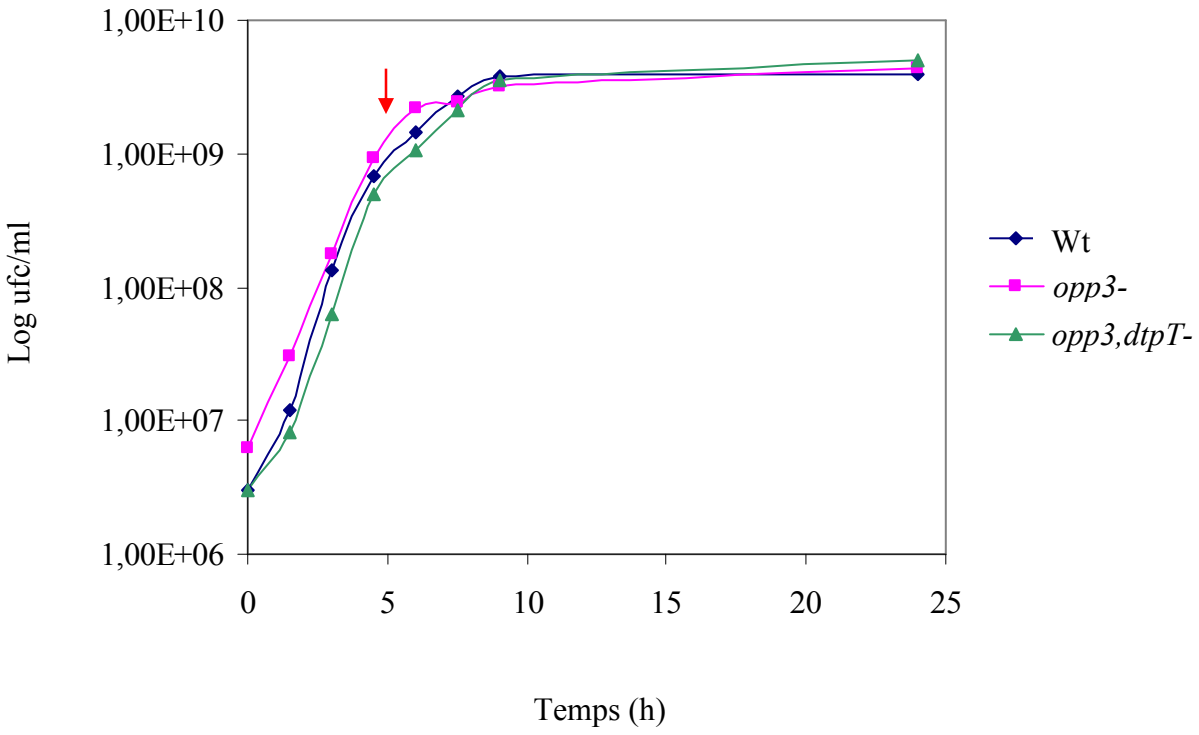


Fig. 38 : Courbes de croissance de la souche sauvage RN6390 et des mutants *opp3*- et *opp3,dtpT*- dans du lait supplémenté en acides aminés libres.
La flèche rouge indique le moment auquel a été observée la coagulation du lait pour les trois souches (environ à t+5,5 h).

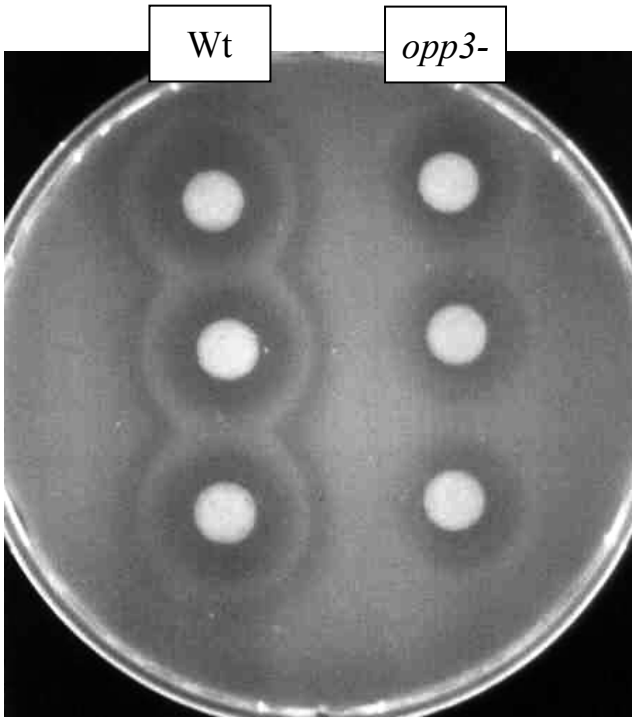
tardivement que la souche sauvage (Fig.36). On sait que cette coagulation est due à l'activité protéolytique des enzymes sécrétées par *S. aureus*. Or au moment auquel la souche sauvage coagule le lait, les mutants ne présentent pas de différence significative en terme de population bactérienne, le retard de coagulation n'est donc pas imputable à un déficit de population. On peut donc se demander si, en plus de ne pas pouvoir transporter les peptides nutritionnels, les mutants de transport ne présenteraient pas également une baisse de la synthèse et/ou de l'activité d'une ou de plusieurs de leurs protéases.

B. Un rôle dans la régulation de la biosynthèse des protéases

1) Le mutant *opp3*- présente une baisse d'activité protéolytique globale

Pour vérifier un éventuel dérèglement de la biosynthèse des protéases, nous avons dans un premier temps, comparé l'activité protéolytique globale de la bactérie sauvage et du mutant *opp3*- lors de la croissance dans le lait. Pour cela, des surnageants de culture de ces deux souches ont été récoltés à différents temps (à t+5, t+6 et t+9 heures) s'étalant sur l'ensemble de la phase stationnaire intermédiaire de la souche sauvage. Après avoir vérifié par dénombrement que les deux souches avaient un niveau de population équivalent au moment du prélèvement, un même volume de surnageant de culture a été déposé sur une boite d'agar contenant de la gélatine à 3 %. L'activité protéolytique des surnageants issus des deux souches est alors évaluée par la taille du halo transparent se formant autour de la zone de dépôt (Fig.39). Les résultats montrent une différence nette de la taille du halo formé par le surnageant de la souche sauvage par rapport à celui formé par le surnageant du mutant *opp3*-, à partir du temps t + 6 heures. Il apparaît donc que pendant la phase de latence intermédiaire, à niveau de population comparable, l'activité des protéases extracellulaires est nettement plus faible chez un mutant *opp3*- que chez la souche sauvage. Cette différence d'activité protéolytique entre les deux souches explique probablement le temps de décalage de la coagulation du lait.

S. aureus produit 10 protéases extracellulaires : les protéases à sérine SspA (appelée V8) et SplA, B, C, D, E, et F, les protéases à cystéine ScpA et SspB (staphopain A et staphopain B), et enfin la métalloprotéase Aur. Toutes ces enzymes ont une activité gélatinase et peuvent donc, en théorie, être impliquées dans la différence de protéolyse observée



temps	Taille du halo Wt	Taille du halo *opp3-*
t + 5	-	-
t + 6	3.9 cm	2.5 cm
t + 9	3.6 cm	2 cm

Fig. 39 : Comparaison de l'activité protéolytique globale des surnageants de culture.
La photo montre l'activité des surnageants prélevés à un temps t + 6 heures lors de la croissance en lait de la souche sauvage RN6390 (à gauche) et du mutant *opp3-* (à droite). 50 µl de surnageant de chaque culture ont été déposés sur une boite d'agarose contenant 3% de gélatine. Chaque dépôt a été effectué en triple. Les halos de protéolyse observés par transparence ont été mesurés pour comparer l'activité protéolytique globale des surnageants de culture des deux souches.
La même expérience a été effectuée aux temps t + 5 et t + 9 heures de culture. Le tableau montre la moyenne des mesures en mm des halos de protéolyse formés par la souche sauvage et la souche *opp3-* sur l'ensemble des temps de la croissance étudiés.

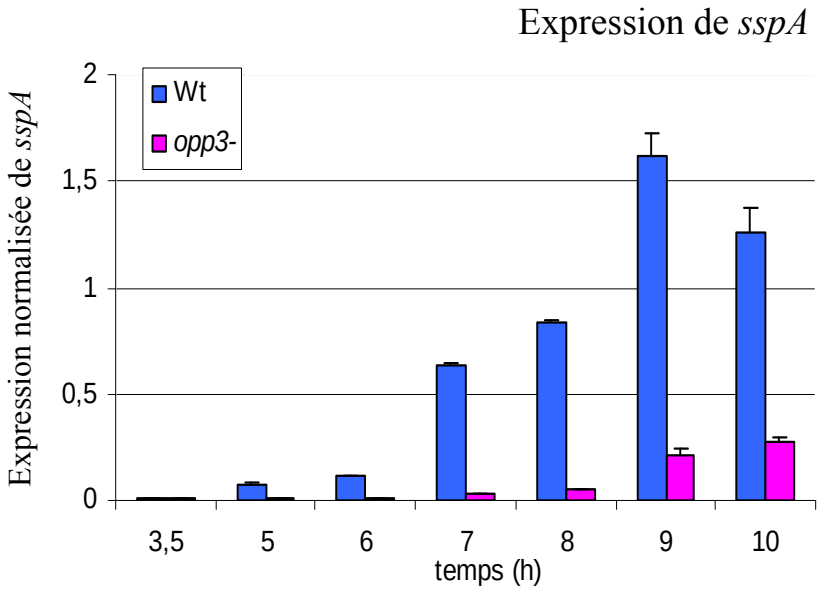
précédemment. Pour déterminer plus précisément laquelle ou lesquelles de ces protéases sont liées à la baisse d'activité protéolytique globale chez le mutant *opp3-,* nous avons comparé le niveau d'expression de leur gène par RT-PCR quantitative en temps réel.

2) Une dérégulation de la synthèse des protéases Ssp et Aur

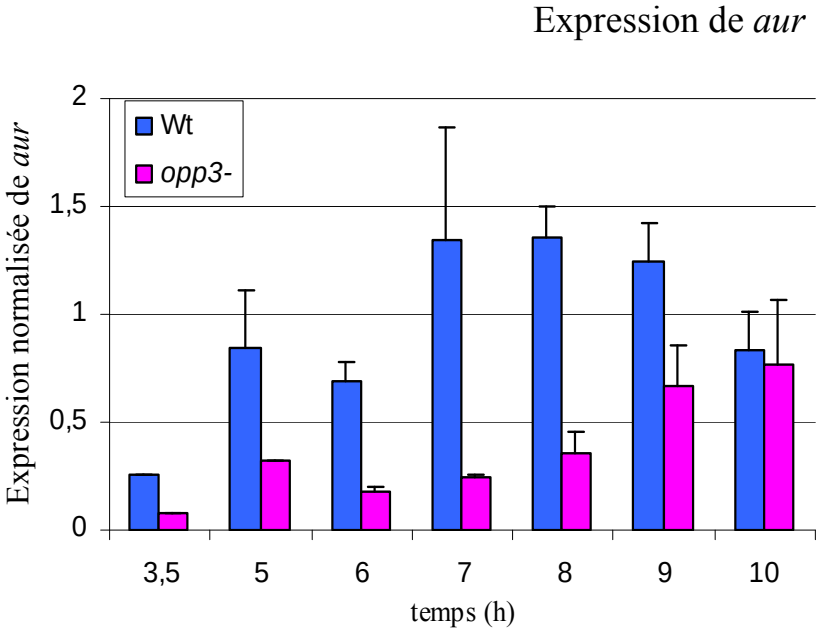
Les ARN utilisés pour les expériences de RT-PCR quantitative en temps réel ont été extraits tout au long de la croissance dans le lait de la souche sauvage et du mutant *opp3-* (à t+3.5, t+5, t+6, t+7, t+8, t+9 et t+10 heures de culture). Les 6 protéines Spl étant codées en opéron ainsi que les deux protéines Ssp, pour étudier les niveaux de transcription de l'ensemble des protéases extracellulaires de *S. aureus*, nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes *splA*, *sspA*, *aur* et *scpA*. Les résultats obtenus sont exprimés en expression relative du gène codant chaque protéase par rapport à l'expression d'un gène de référence *gyrB*. Les rapports d'expression obtenus chez la souche sauvage ont été comparés à ceux obtenus chez la souche *opp3-*. Sur la base des données bibliographiques, n'ont été considérés comme significatifs que les différences d'expression supérieures à un facteur trois.

Ainsi, sur l'ensemble des temps de croissance étudiés, aucune différence significative d'expression des gènes *splA* et *scpA* entre la souche sauvage et le mutant n'a été observée. En revanche, on peut voir qu'à différents temps de croissance, les gènes *sspA* et *aur* sont bien moins exprimés chez le mutant *opp3-* que chez la souche sauvage (Fig. 40). En effet, dès 5 heures de croissance dans le lait, on peut voir que la souche sauvage induit l'expression du gène *sspA* alors que chez le mutant *opp3-*, cette induction ne semble commencer qu'après 7 heures de culture et son amplitude est bien moins forte. Ainsi chez la souche sauvage, à un temps donné, on peut avoir jusqu'à plus de 20 fois plus de transcrits *sspA* que chez le mutant *opp3-*. Nous avons également, pour confirmer ces observations, étudié l'expression du gène *sspB* et obtenu des résultats équivalents.

Les différences d'expression observées pour le gène *aur* sont moins importantes que celles obtenues avec *sspA* mais sont toutefois significatives à trois temps de croissance successifs (Fig. 40). Il ressort de cette analyse que les protéases SspA, SspB et Aur sont globalement moins exprimées chez un mutant *opp3-* que dans une souche sauvage au cours de la croissance de la bactérie dans le lait. Cette différence d'expression explique sans doute la différence d'activité protéolytique globale qui avait été mise en évidence précédemment.



Temps (h)	Rapport d' expression (Wt/*opp3*-)	Ecart type
3,5	2,2	± 0,12
5	**5,7**	± 0,96
6	**11**	± 0,98
7	**23,2**	± 2,55
8	**15,2**	± 0,37
9	**8,6**	± 1,53
10	**4,7**	± 0,07



Temps (h)	Rapport d' expression (Wt/*opp3*-)	Ecart type
3,5	3	± 0
5	2,7	± 0,74
6	**3,8**	± 0,16
7	**5,6**	± 1,73
8	**3,8**	± 1,43
9	1,9	± 0,28
10	1,1	± 0,19

Fig. 40 : Mesure de l'expression des gènes codant des protéases extracellulaires de *S. aureus* lors de la croissance dans le lait de la souche sauvage et du mutant *opp3*-.

Les résultats présentés sous forme de diagramme représentent l'expression des gènes *sspA* ou *aur* normalisée à celle du gène de référence *gyrB* chez la souche sauvage et chez le mutant *opp3*-.

Les résultats sous forme de tableaux indiquent les rapports d'expression des gènes d'intérêt entre la souche sauvage et le mutant *opp3*-. Les chiffres indiqués en gras sont les rapports d'expression supérieurs à 3 à partir desquels nous avons considéré qu'il y avait une différence significative.

Les écarts type ont été calculés à partir des résultats obtenus sur au moins deux expériences indépendantes.

3) Quel mécanisme ?

La présence d'Opp3 a donc une influence significative sur l'expression de trois protéases extracellulaires de *S. aureus* lors de la croissance dans le lait. Chez certaines bactéries, des liens entre transporteur Opp et régulation de la biosynthèse des protéases ont déjà été établis.

Chez *L. lactis*, l'activité protéolytique (liée à la protéase de paroi PrtP) d'un mutant *opp*- est significativement plus élevée que dans une souche sauvage (Kunji *et al.* 1995). Ce phénomène serait vraisemblablement dû au régulateur CodY (Guédon *et al.* 2001a et b) *via* le mécanisme suivant : absence de transporteurs de peptides donc moins d'acides aminés intracellulaires, donc levée de la répression du système protéolytique par CodY, donc induction de l'expression du gène *prtP*. Chez *S. aureus* un régulateur CodY putatif est également présent dans le génome. Ce régulateur serait chez cette bactérie, impliqué dans la formation de biofilms (Tu Quoc *et al.* 2007). Cependant, le rôle de CodY de *S. aureus* n'a pas été caractérisé et son implication potentielle dans la régulation du système protéolytique n'a pas été étudiée. Si l'on considère que la dérégulation des gènes *ssp* et *aur* mise en évidence ici, pourrait être liée à CodY, il faut souligner une différence fondamentale avec ce qui est observé chez *L. lactis*. En effet, on observe chez *S. aureus* une baisse de l'expression des gènes codant les protéases dans le mutant *opp3*- et non pas une induction, ce qui pose la question de la pertinence de la transposition du modèle de *L. lactis* à *S. aureus*. Il a été toutefois montré chez *B. subtilis* que CodY, bien que connu essentiellement en tant que répresseur, pouvait également directement activer quelques gènes (Shivers *et al.* 2006). Un mécanisme comparable pourrait donc être envisagé chez *S. aureus*.

Ce lien entre Opp et la régulation des protéases établit chez *S. aureus* pourrait également se rapprocher de ce qui est observé chez *E. coli*. En effet, il a été montré chez cette bactérie, que le régulateur pléiotrope Lrp, dont l'activité est dépendante de la concentration intracellulaire de leucine et d'alanine (Andrews et Short 1986), induisait la transcription d'un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme azoté (Calvo et Matthews 1994). Aucun homologue au régulateur Lrp n'a cependant été identifié chez *S. aureus*.

Enfin, une situation comparable a, de même, été mise en évidence chez le pathogène *S. pyogenes*. Chez cette bactérie, on peut en effet observer une baisse importante de la transcription du gène codant la protéase à serine SpeB dans un mutant *opp*- et dans un mutant *dpp*- (Podbielski *et al.* 1996 ; Podbielski et Leonard 1998). Les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène sont toutefois malheureusement inconnus.

Quelles hypothèses peut-on alors formuler pour tenter d'expliquer le lien chez *S. aureus*, entre Opp3 et la régulation des gènes *ssp* et *aur* ?

Les protéines Ssp et Aur étant des facteurs de virulence potentiels, leur régulation a déjà été largement étudiée. Ainsi il a déjà été montré que leur synthèse était contrôlée par une multitude de régulateurs transcriptionnels étroitement liés les uns aux autres (Fig.41). Les facteurs environnementaux jouant sur l'activité de ces régulateurs sont loin d'être tous identifiés et la plupart des mécanismes mis en jeu sont inconnus. On peut donc très bien supposer que Opp3 puisse, par le biais des peptides qu'il importe, jouer sur l'activité d'un ou de plusieurs de ces régulateurs (ou encore sur l'activité d'un régulateur qui n'aurait pas été caractérisé). Dans ce cas, deux modes de fonctionnement peuvent être envisagés :

- On peut supposer dans un premier temps que le transporteur Opp3 importe un peptide phéromone spécifique, type PapR de *B. thuringiensis* (Slamti et Lereclus 2002), se liant directement à un régulateur donné. Ce régulateur provoquerait alors l'induction de la transcription des gènes codant les protéases Ssp et Aur. Ce type de régulation étant généralement déclenché par la densité de population bactérienne, on parle alors de *quorum sensing.* Dans un contexte *opp3*-, la phéromone ne pouvant plus être importée, s'accumulerait dans le milieu extracellulaire, ce qui expliquerait pourquoi l'expression des gènes codant les protéases n'est pas induite.

- La deuxième hypothèse serait que *S. aureus* possède un régulateur transcriptionnel dont l'activité est conditionnée par le pool intracellulaire d'acides aminés (régulation type CodY ou Lrp). Dans ce genre de mécanisme, un acide aminé ou une famille d'acides aminés spécifique, influe sur le régulateur soit de manière directe en s'y liant, soit *via* une protéine relais. Par ce biais, la teneur en acide aminé contrôle la transcription de l'ensemble des gènes du régulon. Le système Opp3 ayant dans ce milieu, par l'import des peptides nutritionnels, une influence directe sur le pool intracellulaire d'acides aminés, cela expliquerait la dérégulation des gènes codant les protéases, observée chez le mutant *opp3*-.

Une observation peut nous permettre de favoriser une de ces hypothèses. En effet, on sait que lorsqu'elles sont cultivées en lait auquel ont été ajoutés tous les acides aminés sous forme libre, la souche sauvage et les mutant *opp3*- et *opp3,dtpT*- coagulent le lait au même moment (Fig. 36). Cela semble indiquer que dans ce milieu, l'activité protéolytique des trois souches est comparable. Or les bactéries atteignent une densité de population supérieure à celle obtenue en lait. Si l'on se place dans l'hypothèse que l'induction des protéases est

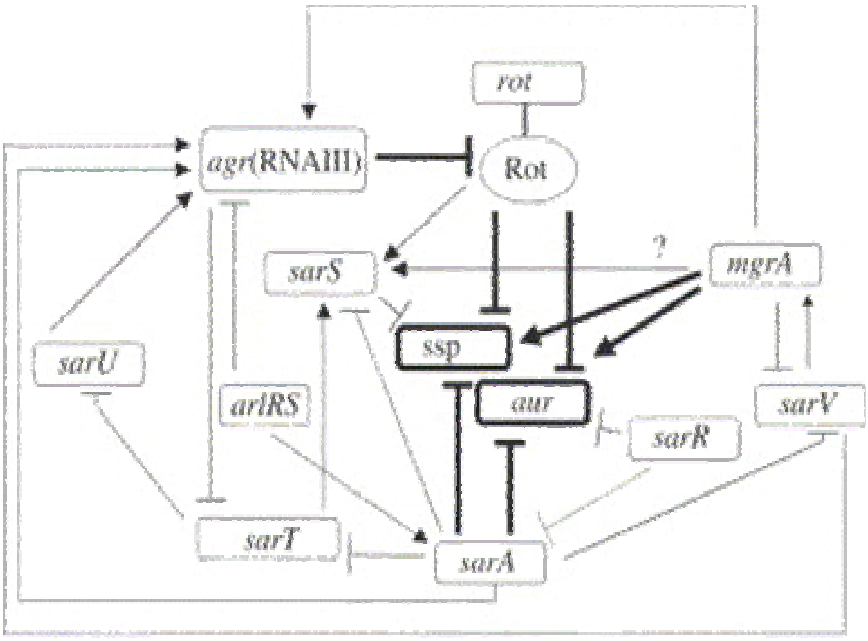


Fig.41: Représentation schématique du réseau de régulateurs contrôlant l'expression des protéases Ssp et Aur dans la souche de *S. aureus* NCTC8325 (souche parentale de la RN6390).
Les flèches indiquent une activation de la transcription alors que les barres indiquent une répression.

d'après Oscarsson *et al*. 2006

provoquée par l'import d'une phéromone, il est alors difficile d'expliquer pourquoi l'ajout d'acides aminés dans le lait modifie le comportement du mutant *opp3*- . En revanche, si l'on se place dans l'hypothèse de la régulation des gènes codant les protéases par le pool intracellulaire d'acides aminés, l'explication parait plus simple. En effet, l'ajout d'acides aminés libres et en excès dans le lait a certainement pour conséquence de masquer l'impact des peptides sur le pool intracellulaire d'acides aminés. Le système Opp3 qui n'a dans ce milieu, plus d'effet détectable sur la croissance de la bactérie, n'aurait également plus de rôle significatif sur la régulation des gènes codant les protéases. Il faudrait néanmoins, pour vérifier cette hypothèse d'une part vérifier que l'expression d'*opp3* est la même en lait qu'en lait supplémenté, et d'autre part, comparer dans ces deux milieux l'expression des gènes *ssp* et *aur*.

Néanmoins, aux vues des phénotypes observés, l'hypothèse de la régulation par le pool intracellulaire d'acides aminés semble plus vraisemblable. Il serait alors intéressant de déterminer plus précisément quel(s) acide(s) aminé(s) est (sont) perçu(s) par le régulateur potentiel impliqué dans ce phénomène. Pour cela on pourrait ajouter dans le lait les différents acides aminés un à un sous forme libre et tester leur influence sur l'activité protéolytique de la bactérie. Une fois cet ou ces acides aminés identifiés, ils pourront être éventuellement utilisés pour remonter au régulateur impliqué (puce à ADN sur des bactéries cultivées en milieu contenant cet acide aminé, *versus* culture dans un milieu ne le contenant pas, ou peu s'il est essentiel).

Le système Opp3 tient donc une place centrale dans la fonction de nutrition azotée. Il joue un double rôle en permettant d'une part l'import de peptides nutritionnels mais aussi en participant à la régulation de l'expression des protéases extracellulaires. Il serait maintenant particulièrement intéressant afin de confirmer certaines hypothèses et compléter l'étude de ce transporteur, de déterminer sa spécificité de substrat.

C. Spécificité de substrat des transporteurs de peptides de *S. aureus*

La majorité des études sur la spécificité de substrat des transporteurs de peptides sont basées sur la capacité de la bactérie à croître dans un milieu dont un acide aminé essentiel n'est apporté que sous forme de peptide. Or les acides aminés essentiels à la croissance de *S. aureus* RN6390 ne sont pas connus. Nous avons donc débuté l'analyse de spécificité de substrat par la détermination de l'auxotrophie de notre souche d'étude.

1) Détermination de l'auxotrophie de la souche RN6390

Pour déterminer l'auxotrophie de la souche RN6390, nous avons testé la croissance de cette bactérie dans un milieu chimiquement défini complet (MC), auquel ont été omis tour à tour chacun des 18 acides aminé constitutifs. Le taux de croissance (μ_{max}) et la DO finale de chaque courbe de croissance ont été calculés et rapportés à ceux obtenus lors de la croissance en MC (Tableau 14**)**. A partir de ces résultats, les acides aminés ont été classés en trois catégories :

- Les acides aminés essentiels, c'est à dire ceux sans lesquels la bactérie ne se développe pas ou très peu (μ_{max} et/ou DO finale inférieure ou égale à 25% de celle obtenue en MC);
- Les acides aminés efficacement synthétisés par la bactérie (μ_{max} et/ou DO finale supérieure ou égale à 70% de celle obtenue en MC);
- Les acides aminés utiles qui favorisent la croissance de la souche (μ_{max} et/ou DO comprise entre 25 et 70% de celle obtenue en MC).

Ce classement permet de distinguer deux acides aminés essentiels (Leu et Glu) et 10 acides aminés utiles (Tableau 14).

A partir de cette étude, nous avons également voulu développer un milieu chimiquement défini minimum (MM) ne contenant que les acides aminés nécessaires pour assurer une croissance correcte de notre souche (et permettant notamment d'effectuer des extractions de protéines et d'ARN). Si l'on ne fournit à la bactérie que les deux acides aminés essentiels, la croissance s'avère très lente et insuffisante. D'un autre coté, la totalité des acides aminés utiles n'est pas nécessaire pour obtenir une croissance satisfaisante. Afin de les sélectionner et obtenir ainsi un milieu suffisamment éloigné du MC, les acides aminés utiles ont été regroupés en familles d'acides aminés de structure similaire (acides aminés soufrés, cycliques, chargés positivement et non chargés). La croissance de la bactérie dans plusieurs milieux contenant les acides aminés essentiels et les différentes combinaisons de familles d'acides aminés utiles a été testée. Les résultats de ces analyses nous ont permis de développer un MM contenant 9 acides aminés (Glu, Leu, Cys, Met, Gly, Val, Thr, Arg et Lys) permettant une croissance de la bactérie satisfaisante (jusqu'à une population finale $\approx 7.10^8$cfu/ml).

aa retiré	DO finale (%)	µ max (%)	Classification
-	**100,00**	**100,00**	
Glu	20	31	Essentiel
Leu	44	24	Essentiel
Cys	65	88	Utile
Tyr	86	69	Utile
Phe	62	32	Utile
Val	37	26	Utile
Thr	89	49	Utile
Arg	44	42	Utile
His	67	74	Utile
Lys	60	57	Utile
Met	82	64	Utile
Gly	57	44	Utile
Ile	92	123	Synthétisé
Ser	94	122	Synthétisé
Pro	85	98	Synthétisé
Asp	101	92	Synthétisé
Ala	71	143	Synthétisé
Trp	94	107	Synthétisé

Tableau 14 : Classification des acides aminés (aa) en fonction de leur impact sur la croissance de la bactérie (DO finale et taux de croissance µmax).
Les chiffres sont indiqués en pourcentages de DO finale ou de taux croissance obtenus lors de la croissance en milieu complet.
Trois classes d'aa ont été obtenus: essentiels, utiles et efficacement synthétisés par la cellule.

2) Etude de la spécificité de substrat

L'étude de l'auxotrophie de la souche RN6390 a révélé que la bactérie était incapable de se développer en absence de Glu et de Leu. Pour l'étude de la spécificité de substrat des transporteurs de peptides de *S. aureus*, nous avons donc utilisé un MC dans lequel l'acide aminé Glu était fourni uniquement sous forme de peptide.

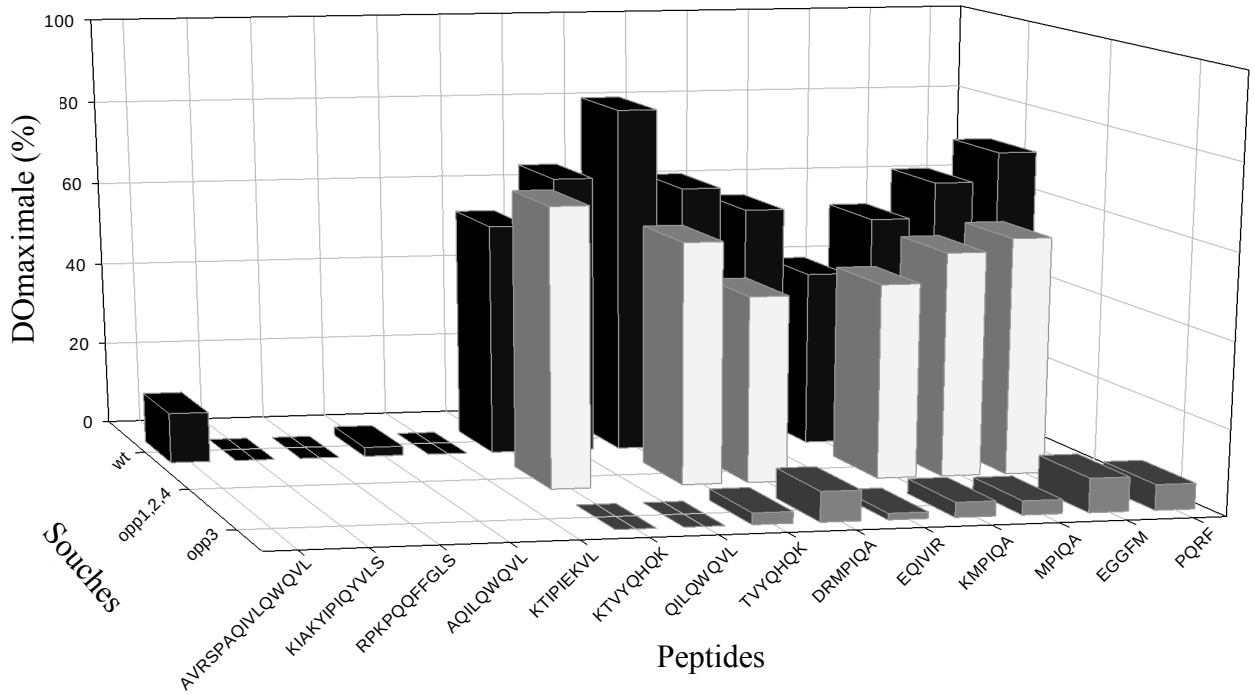
Nous avons vérifié dans un premier temps, qu'en absence de Glu, aucune des souches (sauvage et les différents mutants) n'était capable de se développer. La croissance de la bactérie a alors été testée dans ce milieu auquel étaient ajoutés un à un, différents peptides de taille allant de 2 à 15 acides aminés. Chez la souche RN6390, l'ajout de peptides de 2 à 8 acides aminés permet à la bactérie de se développer, ce qui indique qu'elle est capable d'utiliser ces peptides en tant que source de nutriments azotés. En revanche, pour tous les peptides de taille supérieure ou égale à 9 acides aminés, aucune croissance n'a pu être détectée (Fig.42A). La bactérie semble donc incapable de prendre en charge les peptides de grande taille.

Si l'on s'intéresse à la croissance des différents mutants de transport, on peut observer que l'absence du système Opp3 rend la bactérie incapable d'utiliser en tant que source nutritionnelle l'ensemble des oligopeptides de longueur allant de 4 à 8 acides aminés (Fig.42A). En revanche, la délétion simple ou combinée des trois systèmes Opp1, Opp2 et Opp4 n'affecte pas le développement de la bactérie en présence de ces mêmes peptides.

Concernant l'utilisation des dipeptides, on peut voir, dans la limite des peptides testés, que la mutation simple de DtpT suffit à abolir la croissance (Fig. 42B). Ce transporteur serait donc le seul impliqué dans le transport de dipeptides à vocation nutritionnelle. L'utilisation des tripeptides s'avère plus complexe dans la mesure où le peptide Pro-His-Glu est exclusivement pris en charge par Opp3, alors que Gly-Gly-Gln l'est exclusivement par DtpT et Ser-Glu-Gly par les deux transporteurs à la fois puisque seul le double mutant *opp3, dtpT-* est incapable de l'utiliser (Fig. 42B). Nous avons également vérifié que les mutants *opp1,2,4,dtpT-* et *opp1,2,3,4dtpT-* se comportaient en présence de di- et tripeptides respectivement de la même manière que les mutants *dtpT-* et *opp3,dtpT-*.

De cette étude il ressort donc qu'Opp3 transporte des peptides de 3 à 8 acides aminés, DtpT des di- et tripeptides. Ces deux transporteurs présentent en outre, un recouvrement de spécificité concernant le transport de certains tripeptides. Parmi les peptides testés, aucun n'est pris en charge par Opp1, Opp2 ou Opp4. La nature du substrat pris en charge par ces

A.



B.

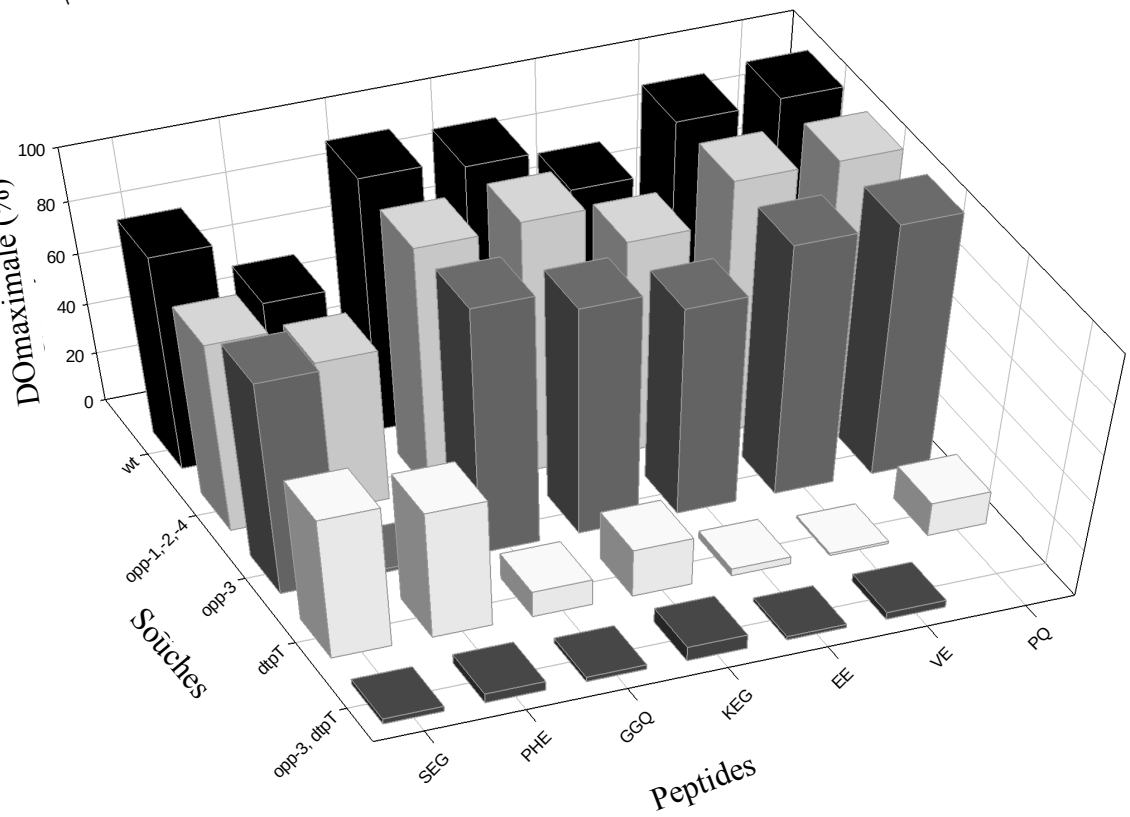


Fig.42 : Utilisation par la souche sauvage RN6390 et différents mutants *opp*- et *dtpT*- de: A. oligopeptides de 4 à 15 résidus B. di- et tripeptides

Les DO indiquées représentent le pourcentage de population finale (DO_{600nm}) atteint lors de la croissance dans un milieu contenant un peptide, par rapport à celui atteint en MC.

La croissance en présence des peptides QILQWQWL, EQVIR et PQRF n'a pas été testée pour le mutant *opp1,2,4*-.

systèmes n'a pas pu être identifiée. Cependant le nombre de peptides utilisés dans l'étude est limité, ils contiennent tous de la Glu ce qui peut induire un biais, et l'on ne peut de plus exclure que ces transporteurs puissent prendre en charge certains peptides mais pas assez efficacement pour suffire au développement de la bactérie. Pour confirmer les résultats obtenus précédemment et contourner en partie ces biais, la souche *dtpT*- ainsi que différentes combinaisons de mutants *opp, dtpT*- ont été cultivés en MM dans lequel a été ajouté un large panel de peptides issus d'une digestion pancréatique de caséines. Dans ce milieu, toutes les souches se développent de manière équivalente puisqu'il contient également une grande quantité d'acides aminés libres. Nous avons également vérifié par RT-PCR que les quatre opérons *opp* étaient exprimés dans ces conditions. L'évolution du contenu peptidique de ce milieu après croissance des différentes souches a ensuite été analysé par RP-HPLC. Cette expérience avait pour but de détecter, parmi un grand nombre de peptides, ceux qui seraient transportés par un des systèmes Opp1, Opp2 ou Opp4 sans pour autant avoir un impact significatif sur la croissance de la bactérie. Il s'avère qu'aucune différence entre l'utilisation de peptides de la souche *dtpT*- et celle de la souche *opp1,2,4,dtpT*- n'a pu être mise en évidence. Les chromatogrammes obtenus pour ces deux souches étaient en effet rigoureusement superposables. Seule la souche *opp3,dtpT-,* comme l'on pouvait s'y attendre, présente des différences significatives de contenu peptidique en fin de croissance. On peut en effet observer chez ce mutant, la présence de pics supplémentaires ou de pics plus importants que chez la souche *dtpT*-. Ces pics correspondent sans doute à une accumulation des peptides normalement transportés par Opp3 dans ces conditions (Fig.43).

Nous n'avons donc pu mettre en évidence aucun peptide pris en charge par un des systèmes Opp1, 2 et 4. Deux hypothèses peuvent être alors envisagées concernant leur spécificité, soit ils transportent un autre substrat, soit ils transportent des peptides très spécifiques, type phéromone par exemple.

En conclusion on peut dire qu'Opp3 est le système ABC dédié à la fonction de nutrition azotée. Son impact sur le développement de la bactérie dans le lait peut être relié au grand nombre de peptides qu'il peut prendre en charge, sans spécificité particulière au niveau de la séquence. Pour compléter la caractérisation de ce système nous nous sommes par la suite intéressés à la manière dont son expression est régulée. Il a été montré en effet chez différentes espèces bactériennes, que l'expression de ce type de transporteurs est contrôlée par des facteurs environnementaux et notamment par les sources azotées du milieu de culture

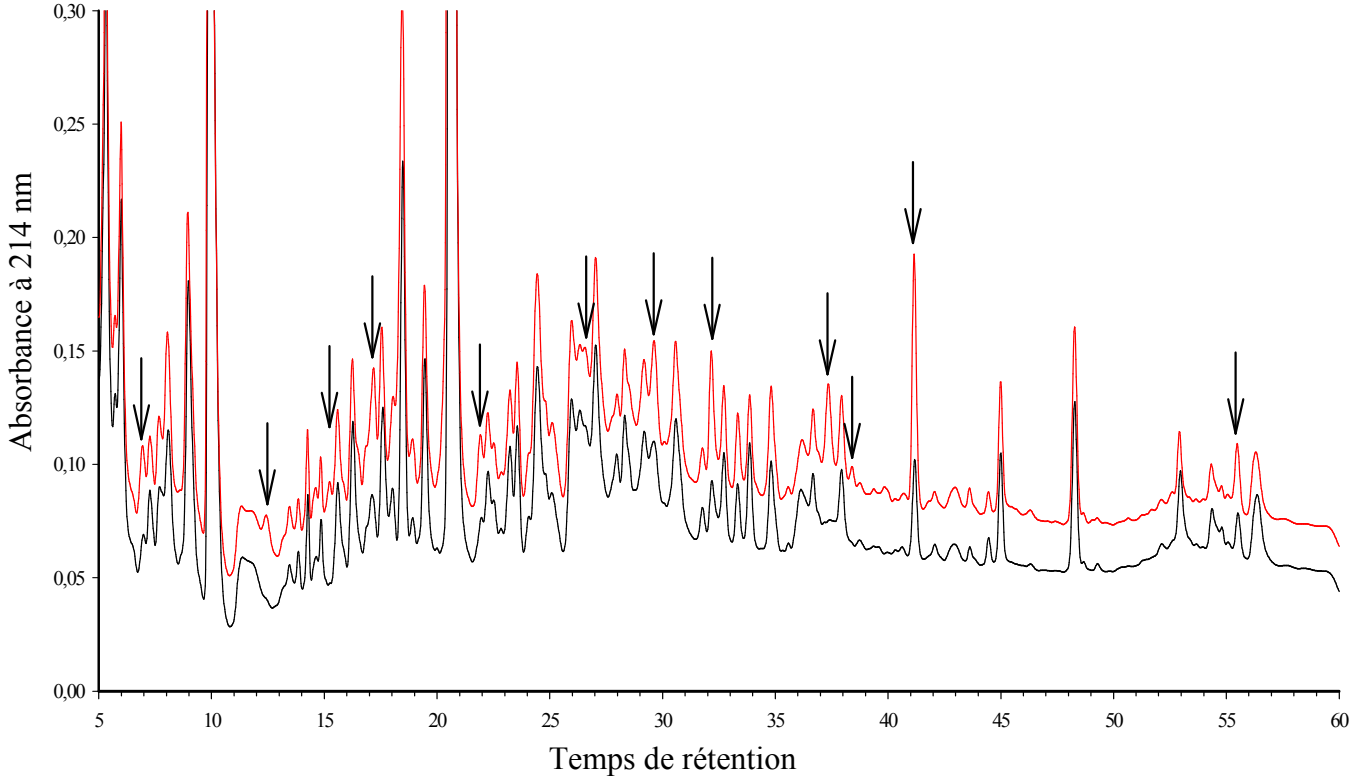


Fig. 43 : Contenu peptidique des surnageants de culture des souches de *S. aureus dtpT-* (en noir) et *opp3,dtpT-* (en rouge).
Les surnageants ont été prélevés en phase stationnaire de croissance en milieu minimum (MM) contenant 1% d'extrait de digestion pancréatique de caséine. Leur contenu peptidique a été analysé par RP-HPLC.
Les flèches noires indiquent les pics uniquement détectés ou présents en plus grande quantité chez le mutant *opp3, dtpT-*.

(Monnet 2003). Nous avons alors testé un possible effet des acides aminés sur l'expression du système Opp3 de *S. aureus*.

D. L'expression d'Opp3 est modulée par les sources azotées du milieu

Afin d'étudier une possible régulation des systèmes Opp de *S. aureus* par les sources azotées du milieu, deux approches complémentaires ont été développées.

Nous avons mesuré la production de la protéine Opp3A par Western-Blot en phase exponentielle de croissance d'une part en MM (milieu minimum) auquel ont été ajoutés un à un les 9 acides aminés Pro, Ala, Ile, Phe, Trp, Tyr, Ser, Asn et His, et d'autre part en MC auquel ont été enlevés un à un ces mêmes acides aminés. Les résultats montrent que la production de la protéine Opp3A est significativement ($P < 0.001$) augmentée (d'environ 6 fois) dans deux conditions: lorsque l'on ajoute de la tyrosine au MM (MM+Tyr) et lorsque l'on retire la phénylalanine au MC (MC-Phe) (Fig. 44A). Pour confirmer les effets de ces acides aminés au niveau transcriptionnel, une analyse des transcrits *opp3A* par RT-PCR semi-quantitative a été effectuée. Il a été ainsi observé qu' *opp3A* est environ 5 fois plus transcrit en MM+Tyr qu'en MM et environ 2,5 fois plus transcrit en MC-Phe qu'en MC (Fig. 44B). Des résultats similaires ont été obtenus en évaluant l'expression du gène *opp3C*, ce qui était attendu du fait de la co-transcription des gènes *opp3BCDFA*. Enfin la surproduction d'Opp3A respectivement en MM+Tyr et en MC-F, par rapport à celle en MM et en MC a été obervée *in situ* sur les bactéries par immunocoloration de la protéine de fixation et observation au microscope à épifluorescence (Fig. 44C).

Nous avons ensuite voulu voir si l'effet de ces acides aminés était spécifique à Opp3 ou si un ou plusieurs des autres systèmes Opp y répondaient de la même manière. Pour cela des mesures d'expression, au niveau protéique par Western-Blot sur Opp1A et Opp4A ainsi qu'au niveau transcriptionnel par RT-PCR semi quantitative sur les gènes *opp1A*, *opp2B*, *opp4A* et *opp5A* ont été effectuées. Aucun effet significatif de la composition en acides aminés du milieu sur l'expression des autres systèmes Opp n'a pu être mis en évidence dans nos conditions. Opp3 est donc le seul système de transport de peptides de *S. aureus* dont l'expression est modulée par les acides aminés du milieu.

Il apparaît donc que les acides aminés Tyr et Phe influent tous deux sur l'expression du système Opp3 mais leur effet respectif est opposé : la Tyr stimule l'expression du

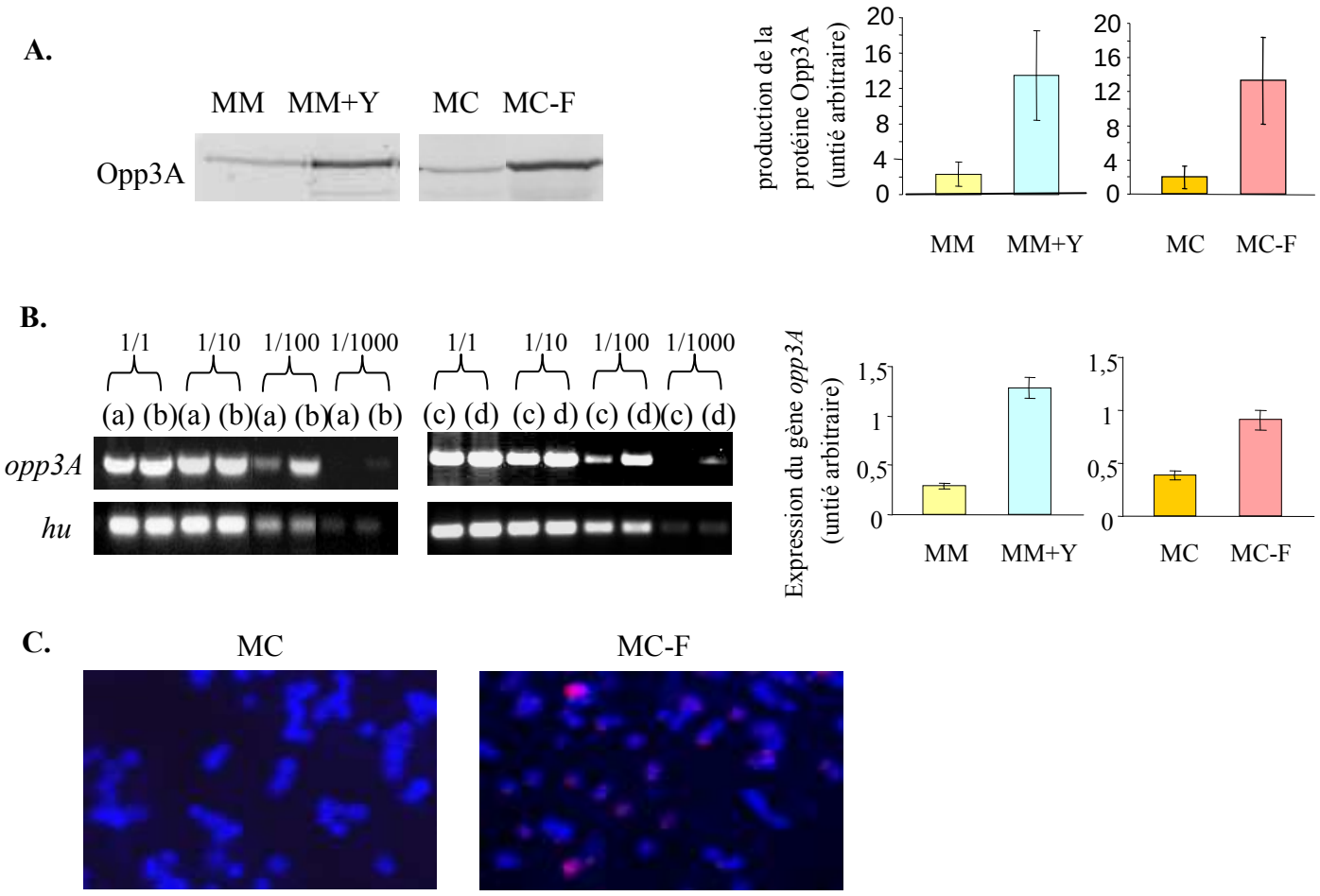


Fig. 44 : Régulation de la biosynthèse de la protéine Opp3A. Pour chaque analyse, les cellules ont été prélevées en phase exponentielle de croissance en milieux chimiquement définis modifiés dans leur composition en acides aminés.

A. Détection de la protéine Opp3A par Western-Blot.
La quantification du signal fluorescent a été effectuée par un logiciel de traitement d'image. Les valeurs ont été calculées à partir de 5 expériences indépendantes.

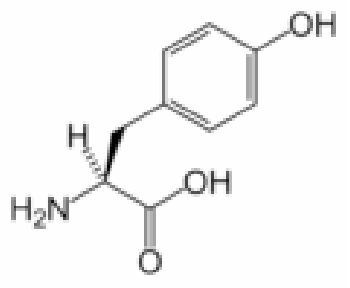
B. Expression du gène *opp3A* évaluée par RT-PCR semi-quantitative. Différentes dilutions d'ADNc ont été utilisées comme matrice pour la quantification des transcrits (1/1, 1/10, 1/100, et 1/1000).
(a): MM, (b): MM+Y, (c): MC, et (d): MC-F
Les transcrits *opp3A* dans les différents milieux à la dilution 1/100 ont été quantifiés et normalisés avec ceux obtenus pour le gène de référence *hu*. Les valeurs ont été calculées sur 3 expériences indépendantes.

C. Observation *in situ* au microscope à épifluorescence. Les cellules entières (en bleu) sont colorées au DAPI et les protéines de fixation Opp3A (en rouge) sont visibles par immunofluorescence.

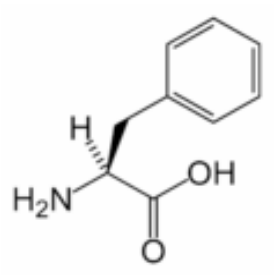
MM:milieu minimum, MM+Y: milieu minimum avec ajout de tyrosine, MC: milieu complet,
MC-F: milieu complet sans phénylalanine

transporteur alors que la Phe la réprime. Ces deux acides aminés ont une structure proche : ils appartiennent, avec le tryptophane, à la famille des acides aminés aromatiques et possèdent un cycle aromatique dans leur chaîne latérale (Fig.45). Une explication possible concernant leur effet antagoniste sur Opp3 serait qu'un seul de ces acides aminés exerce un rôle direct sur la régulation du système alors que l'autre agit en tant que compétiteur. Dans la mesure où l'ajout de Phe au MM ne modifie pas l'expression d'Opp3A, il apparaît plus probable que seule la Tyr soit directement impliquée dans la régulation. L'hypothèse d'une compétition entre les deux acides aminés a été alors testée en ajoutant de la Phe au MM+Tyr, ce qui a pour effet de réduire significativement la stimulation de la production d'Opp3A par la Tyr (Fig. 46). L'action compétitrice de la Phe pourrait alors se situer à deux niveaux : soit elle gêne l'entrée de la Tyr dans la cellule (compétition pour le transport par une même perméase à acides aminés), soit elle gêne la fixation de la Tyr sur une cible intracellulaire. Nous avons alors comparé la production d'Opp3A en MM+Tyr auquel a été ajouté de la Phe soit sous sa forme libre, soit sous forme d'un dipeptide Phe-Val. Les acides aminés et les dipeptides n'étant pas pris en charge par les mêmes systèmes d'import, il ne peut donc pas y avoir de compétition entre les deux sources d'acides aminés à l'entrée dans la cellule. Or l'effet inhibiteur de la Phe apportée sous la forme de dipeptide est du même ordre que celui observé sous la forme d'acide aminé libre (Fig. 46). L'hypothèse d'une compétition entre les deux acides aminés pour une cible intracellulaire (un régulateur transcriptionnel par exemple), semble donc plus probable.

En conclusion, cette étude a permis de mettre en évidence un effet spécifique des acides aromatiques Tyr et Phe sur la synthèse d'Opp3. Le contrôle de la synthèse d'un système Opp par les sources azotées avait déjà décrit chez d'autres bactéries. Par exemple, chez *E. coli* on sait que l'expression d'*opp* est contrôlée par la leucine *via* le régulateur Lrp (Calvo et Matthews 1994). De même chez *L. lactis*, les acides aminés à chaîne latérale ramifiée jouent sur l'expression d'*opp via* un autre régulateur transcriptionnel, CodY (Guédon *et al.* 2001a et b). Néanmoins c'est la première fois qu'il est mis en évidence un contrôle d'*opp* par des acides aminés aromatiques, même s'ils ont déjà été impliqués dans la régulation d'autres gènes. En effet, il a été montré chez *E. coli* que le régulateur transcriptionnel TyrR se liait avec les acides aromatiques, ce qui lui permettait ensuite de se fixer à des séquences d'ADN spécifiques les « TyrR box », situées en amont des gènes dont il contrôle l'expression (Pittard *et al*. 2005). Chez *S. aureus*, la régulation d'*opp3* par TyrR aurait pu être une hypothèse envisageable mais par homologie de séquence, nous n'avons pas pu mettre en

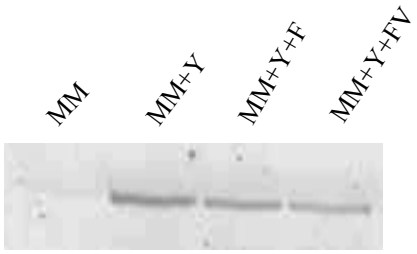


Tyrosine



Phénylalanine

Fig. 45 : Structure des acides aminés aromatiques tyrosine et phénylalanine



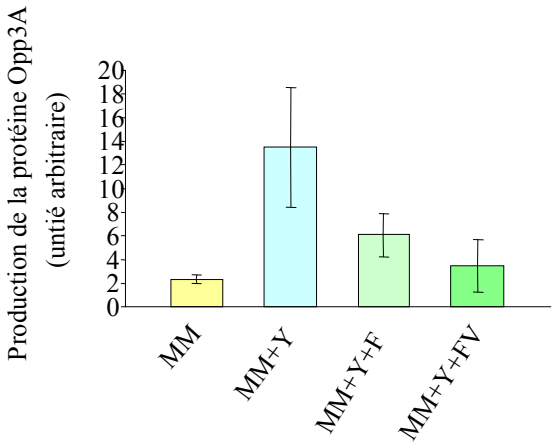


Fig. 46 : Régulation de la biosynthèse de la protéine Opp3A par les acides aminés du milieu de culture.

Détection de la protéine Opp3A par Western-Blot lors de la culture en MM:milieu minimum, MM+Y: milieu minimum avec ajout de tyrosine, MC: milieu complet, MC-F: milieu complet sans phénylalanine, MM+Y+F: milieu minimum avec ajout de tyrosine et de phénylalanine, MM+Y+ FV: milieu minimum avec ajout de tyrosine et du dipeptide Phenylalanine-Valine

La quantification des signaux de fluorescence a été effectuée par un logiciel de traitement d'image. Les valeurs ont été calculées à partir de 3 expériences indépendantes.

.

évidence la présence d'un régulateur TyrR putatif au sein de l'ensemble des génomes séquencés de cette bactérie. On pourrait cependant imaginer qu'il existe chez *S. aureus*, un ensemble de gènes, dont Opp3 ferait partie, contrôlés par la concentration en acides aminés aromatiques de l'environnement *via* un régulateur transcriptionnel qui reste à identifier.

E. Conclusion et perspectives

1) La croissance de *S. aureus* dans le lait : vers un modèle de nutrition azotée

A partir de l'ensemble des résultats que nous avons obtenus, un modèle général de la croissance dans le lait de *S. aureus* peut être construit (Fig.47).

Dans un premier temps, qui correspond à la première phase exponentielle, la bactérie présente une croissance rapide au cours de laquelle *S. aureus* utilise très majoritairement les acides aminés libres du lait comme source de nutriments azotés, puisque toutes les souches (Wt, *opp3*- et *opp3,dtpT*-) sont capables de se développer jusqu'à un niveau de population équivalent. Cependant une faible réduction du taux de croissance des mutants *opp3*- et *opp3, dtpT*- suggère que le transport d'oligopeptides (de 3 à 8 résidus de long), permet d'augmenter la vitesse d'apport d'un ou plusieurs acides aminés aidant au développement de la bactérie.

A la fin de la première phase exponentielle, un ou plusieurs acides aminés essentiels sont épuisés sous forme libre, et toutes les souches présentent un arrêt de leur croissance à une même densité cellulaire. Cette carence en acides aminés est démontrée par le fait que la croissance en diauxie n'est plus observable lorsque l'on ajoute des acides aminés libres dans le lait. Il serait néanmoins intéressant d'identifier plus précisément le ou les acides aminés à l'origine de cette phase stationnaire intermédiaire. L'étude de l'auxotrophie de la souche RN6390 montre que deux acides aminés seulement sont essentiels à la croissance de la bactérie, l'acide glutamique (ou la glutamine) et la leucine. L'acide glutamique sous forme libre étant dans le lait en quantité bien plus importante que la leucine (Tableau 7), il semble raisonnable de penser que cette dernière soit l'acide aminé limitant.

Pendant la phase intermédiaire, la bactérie induit fortement la synthèse de ses protéases extracellulaires qui vont hydrolyser les protéines et coaguler le lait. Cette hydrolyse permet de générer dans un premier temps des oligopeptides de 3 à 8 acides aminés,

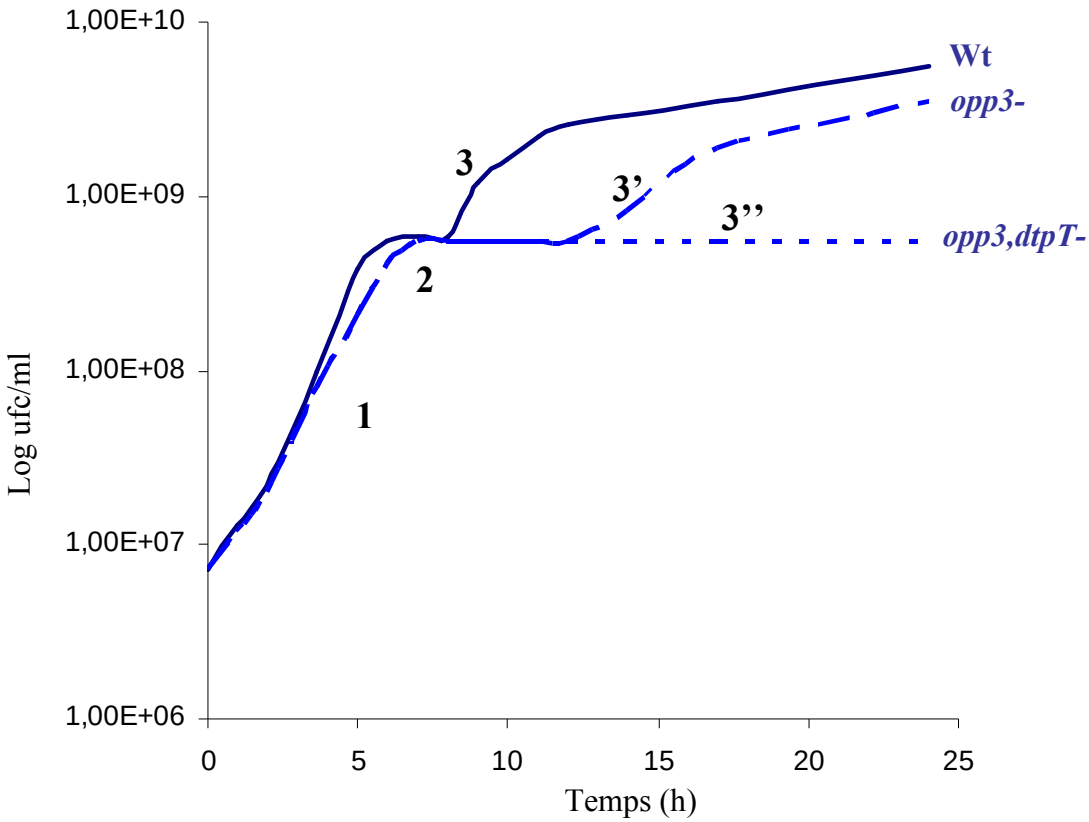


Fig. 47: Modélisation des différentes étapes de la croissance de *S. aureus* RN6390 dans le lait.

1. 1ère phase exponentielle: Utilisation des acides aminés libres du lait en majorité, l'import d'oligopeptides permet néanmoins d'augmenter le taux de croissance

2. Phase stationnaire intermédiaire: Un ou plusieurs acides aminés essentiels sont épuisés sous forme libre. La croissance bactérienne s'arrête le temps que les protéases libèrent des peptides utilisables par la bactérie.

3. 2ème phase exponentielle : Reprise de la croissance grâce à la production de nutriments azotés sous forme de peptides libérés par l'hydrolyse des caséines

3': Le mutant *opp3-* produisant moins de protéases et ne pouvant pas transporter d'oligopeptides, cette souche a une phase stationnaire plus longue, le temps que les protéases libèrent des di- et tripeptides pouvant être pris en charge par DtpT.

3'': Le mutant *opp3,dtpT-* ne peut pas prendre en charge ni les oligopeptides ni les di et tripeptides générés par les protéases. La souche ne reprend pas sa croissance.

transportables par Opp3, puis des di- et tripeptides transportables par DtpT, ce qui permet une reprise de la croissance. Par contre chez le mutant *opp3*-, la phase de latence intermédiaire est beaucoup plus longue d'une part car les protéases extracellulaires sont bien moins exprimées que chez la souche sauvage et d'autre part car il ne peut transporter les oligopeptides libérés. Il lui faut donc, tout en ayant moins de protéases, atteindre un degré d'hydrolyse des protéines du lait plus important, permettant la libération de di- et tripeptides. La prise en charge de ces peptides par DtpT va ensuite permettre au mutant *opp3*- de reprendre sa croissance. En revanche, un double mutant *opp3,dtpT*- n'est plus capable de se développer, ce qui laisse penser que l'hydrolyse des protéines du milieu par les protéases de *S. aureus* ne permet pas la libération sous forme libre de, ou des, acides aminés essentiels qui lui font défaut.

2) Perspectives

L'ensemble des résultats obtenus a permis de caractériser précisément le système Opp3 de *S. aureus*. C'est le seul ABC-transporteur de la bactérie à exercer une fonction nutritionnelle. Il permet l'import de peptides de 3 à 8 acides aminés sans spécificité de séquence apparente et son expression est contrôlée par les sources azotées de l'environnement. Ce transporteur s'avère ainsi être particulièrement important pour la croissance de la bactérie dans le lait. En effet, il exerce dans ce milieu un double rôle : il permet l'import de peptides nutritionnels mais participe également à la régulation des gènes codant les protéases Ssp et Aur. Cette régulation étant certainement indirecte, il serait intéressant d'élucider le mécanisme liant Opp à ce phénomène. Rien n'interdit de supposer que ce régulon contient, en plus de ceux codant pour les protéases, d'autres gènes qu'il faudrait identifier. Ceci pourrait être possible par exemple, en comparant par puce à ADN le transcriptome de la souche sauvage et du mutant *opp3*- dans les conditions où la dérégulation des protéases est observée.

Par la place centrale que tient Opp3 lors du développement de la bactérie dans le lait, ce système apparaît comme une cible potentielle pour contrôler les contaminations à *S. aureus* dans les produits laitiers. Une stratégie envisageable serait de favoriser la compétition pour les nutriments azotés entre *S. aureus* et une bactérie lactique comme par exemple, *L. lactis*. On sait que chez cette bactérie utilisée en technologie laitière, les peptides du lait constituent une source nutritionnelle indispensable à la croissance. Pour optimiser la compétition pour les peptides nutritionnels entre les deux espèces, il faudrait utiliser une souche de *L. lactis* avec

un transporteur d'oligopeptide ayant la spécificité de substrat la plus proche possible de celle d'Opp3, notamment en terme de taille. Pour valider cette stratégie on pourrait dans un premier temps, utiliser une souche modèle de *L. lactis* dans laquelle serait clonée l'opéron *opp3* de *S. aureus*. Ainsi, on pourrait mesurer l'effet respectif de la compétition sur deux espèces se servant des mêmes peptides. Dans un second temps, il faudrait rechercher parmi les souches de *L. lactis* « naturelles » laquelle est la mieux adaptée à cette fonction. Parmis les deux souches de laboratoire MG1363 et IL1403 pour lesquelles la spécificité de substrat des transporteurs de peptides a été caractérisée (4 à 35 acides aminés pour Opp de MG1363 et 3 à 6 acides aminés pour Opt de IL1403), la deuxième parait être un candidat plus intéressant à tester que la deuxième.

Enfin, il serait intéressant de reproduire l'ensemble des résultats obtenus, notamment ceux montrant la dérégulation des protéases dans une autre souche de *S. aureus* que celle utilisée dans l'ensemble de nos études. En effet, RN6390 est une souche de laboratoire ayant subi de nombreuses modifications et présente notamment une mutation dans le gène *rsbU* (Cassat *et al.* 2006). Cette mutation empêche l'expression du régulateur transciptionnel σ_B et perturbe de ce fait les profils d'expression de nombreux gènes. Il faudrait donc vérifier que les phénotypes obtenus avec la souche de laboratoire sont également transposables à d'autres souches. Il serait de plus particulièrement intéressant, dans l'optique de développer une stratégie de lutte contre la contamination par *S. aureus* des produits laitiers, de travailler sur une souche responsable d'intoxication alimentaire produisant des entérotoxines majeures (ce qui n'est pas le cas de la RN6390). En effet, dans la mesure où la mutation d'*opp3* perturbe le développement de la bactérie dans le lait on peut espérer que le profil de sécrétion des toxines soit également affecté.

Tout au long de ce chapitre nous avons étudié le rôle des transporteurs de peptides de *S. aureus* dans la nutrition azotée. Le système Opp3, et dans une moindre mesure la protéine DtpT, s'avèrent être les seuls transporteurs impliqués dans cette fonction essentielle.

Cependant, d'autres fonctions ont été attribuées aux transporteurs Opp dans le monde bactérien. Parmi elles, le transport de peptides de communication peut se révéler comme particulièrement important chez les bactéries pathogènes. L'étude de cette fonction fait l'objet de la partie suivante.

III. Les systèmes Opp de S. aureus : un rôle dans le transport de phéromones ?

Chez certaines bactéries il a été montré que les systèmes Opp interviennent dans des phénomènes de communication intercellulaire *via* l'import de phéromones. Par exemple, *B. thuringiensis* produit le peptide de signalisation PapR à partir d'un petit gène. Ce peptide va être secrété, maturé puis réimporté par Opp. Il va alors activer un régulateur transcriptionnel qui contrôle l'expression des gènes de virulence (Gominet *et al.* 2001).

Pour déterminer si un ou plusieurs des systèmes Opp de *S. aureus* peuvent être impliqués dans un phénomène comparable, nous avons dans un premier temps construit une banque de données listant l'ensemble des petits gènes putatif de *S. aureus*. Cette banque a été utilisée par la suite pour l'analyse de nos résultats.

Deux démarches expérimentales complémentaires ont alors été conduites en parallèle :

(i) Le surnageant de culture de *S. aureus* a été analysé dans le but d'identifier l'ensemble des peptides qui y sont secrétés. Une sélection a ensuite été effectuée pour repérer ceux pouvant être des phéromones potentielles.

(ii) Les surnageants de culture de la souche sauvage et des mutants *opp*- ont été comparés dans le but d'identifier des peptides produits par la bactérie puis réimportés par un système Opp.

A. La banque des petits gènes de *S. aureus*

Dans un génome, pour identifier les séquences codantes, les méthodes courantes prennent en compte un ensemble de critères dits intrinsèques à la séquence. Ils reposent, entre autres, sur l'identification d'un codon d'initiation, la composition nucléotidique de la séquence et la présence d'un site de fixation du ribosome (RBS). L'analyse de l'ensemble de ces critères permet ensuite de définir la probabilité *p* qu'une séquence donnée soit une séquence codante. Si $p=1$, on considère qu'il y a 100% de chances pour que l'on soit en présence d'un gène. Les banques de données génomiques type « GenBank » ou « RefSeq » référencent une séquence en tant que gène putatif si on a $p>0,98\%$ environ et si la protéine codée n'est pas trop petite (25 acides aminés environ). Ces restrictions visent à limiter le nombre de pseudogènes référencés. Cependant, ces banques de données sont doublement mal adaptées à la détection des petits gènes codant des phéromones potentielles dans la mesure où

(i) les phéromones peuvent être issues de peptides courts (ii) la taille restreinte des séquences codant des phéromones putatives limitant les informations disponibles, la probabilité *p* de leur séquence codante peut être plus basse que pour les séquences plus longues (elles peuvent être de ce fait inférieures à 0,98%).

Pour pallier ces problèmes le génome de la souche de *S. aureus* NCTC8325 a été analysé par le programme « BactgeneSHOW » (http://genome.jouy.inra.fr/ssb/SHOW/). Ce programme permet de lister l'ensemble des cadres ouverts de lecture au sein d'un génome, y compris ceux ayant une probabilité faible (*p=0,1*) d'être des séquences codantes, et sans restriction de taille au niveau de la protéine. En ne retenant que les gènes codant des protéines de moins de 60 acides aminés, nous avons obtenu une liste de 415 petits gènes comprenant probablement un nombre important de pseudogènes. Ceci n'est cependant pas gênant dans la mesure où cette banque sera utilisée comme une banque d'interrogation (les pseudogènes non transcrits ne seront pas détectés dans le surnageant). Les gènes codant les peptides de moins de 5 acides aminés ont ensuite été éliminés de la liste puisque pour des raisons techniques, leur produit ne pourra pas être détecté par les analyses effectuées ultérieurement. On obtient au final une banque de donnée, appelée banque des petits gènes de *S. aureus*, comprenant 375 gènes putatifs. Les différentes caractéristiques des peptides potentiellement codés par ces gènes (taille, hydrophobicité, point isoélectrique (pI)) ont été calculées et figurent également sur cette liste (Annexe 1). Si aucune particularité n'a pu être notée concernant le caractère hydrophobe et la taille de ces peptides, il a été observé en revanche que pas ou très peu de peptides avaient un pI neutre. Deux groupes de peptides se distinguent nettement : les peptides acides et les peptides basiques (Fig. 48).

A noter que la banque de données des petits gènes, qui sera utilisée pour identifier les peptides sécrétés dans le surnageant, ne permet d'identifier que les phéromones de type PapR, codées par des petits gènes. La phéromone cCF10, impliquée dans la conjugaison d'*E. faecalis*, correspond à un fragment de la séquence signal de la lipoprotéine CcfA de 348 acides aminés (Antiporta et Dunny 2002). Le gène *ccfA* code de ce fait une protéine bien trop grande pour figurer dans la liste des petits gènes. L'étude de ces phéromones, bien qu'intéressante, est donc écartée par les approches informatiques et biochimiques que nous avons développées. De même, les peptides ayant subi des modifications post-traductionnelles, telles que AIP du système Agr, ne seront pas identifiés. En effet, les modifications post-traductionnelles entraînent un changement de la masse réelle de la phéromone par rapport à sa masse théorique. Ils ne seront donc pas reconnus lors de l'interrogation des banques de

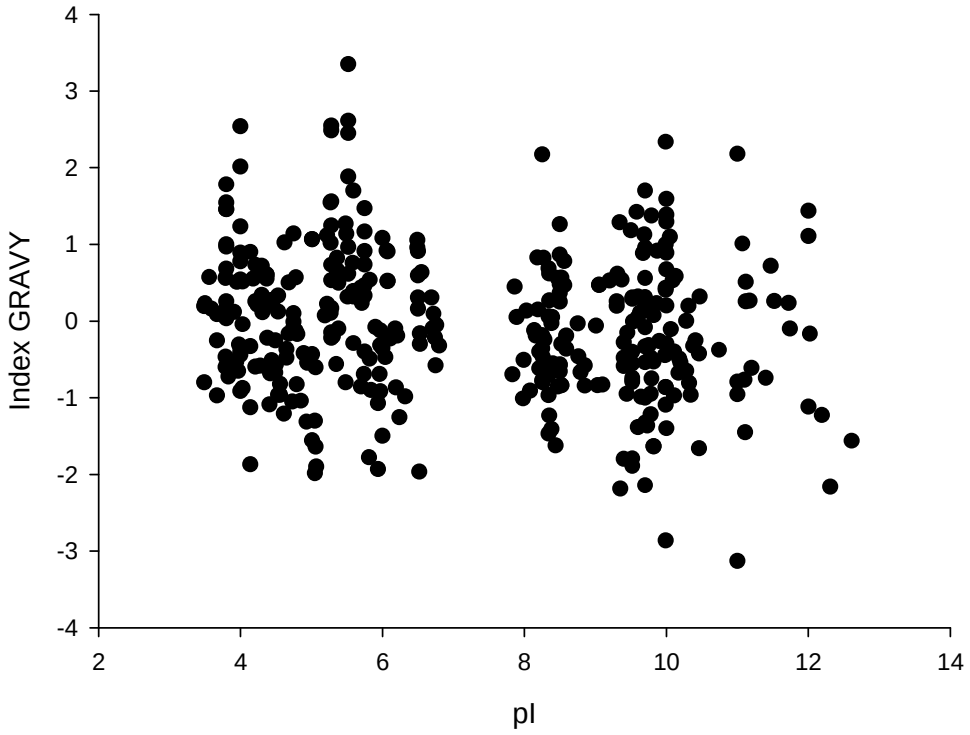


Fig. 48: Répartition de l'hydrophobicité (index GRAVY) des peptides figurant dans la banque des petits gènes de *S. aureus* en fonction de leur point isoélectrique (pI).

L'index GRAVY (GRand AVerage of Hydropathy) permet d'évaluer le caractère hydrophobe d'une protéine. Sur une échelle allant de - 4.5 à + 4.5, plus l'index GRAVY est fort, plus la protéine est hydrophobe. Ces deux paramètres ont été calculés respectivement par les programmes pI-tool (http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool) et ProtParam (http://www.expasy.ch/cgibin/ protparam).

données. L'exclusion de ce type de peptides de signalisation n'est cependant pas un problème dans le cadre de notre étude. En effet, ces peptides modifiés ne sont généralement pas internalisés par un transporteur Opp, leur action mettant en œuvre un système à deux composantes.

B. Identification de peptides codés par des petits gènes et secrétés par *S. aureus*

1) Détection dans le surnageant de 5 peptides issus de la transcription de petits gènes

Pour rechercher des phéromones potentiellement produites par *S. aureus*, nous avons analysé le contenu d'un surnageant de culture de la souche RN6390 par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Cette technique permet de mesurer l'ensemble des masses comprises entre 800 et 2000 Daltons (Da) provenant des composés ionisables de l'échantillon de départ. Cette méthode de détection n'est pas quantitative. Elle est cependant très sensible et permet de détecter des composés présents à de très faibles concentrations.

Les bactéries ont été cultivées en MC sans acides aminés aromatiques, milieu qui ne contient ni peptides ni protéines. Etant donné que les phénomènes de *quorum sensing* se produisent à haute densité cellulaire, nous avons choisi de prélever les surnageants en phase stationnaire de croissance. Les protéines extracellulaires produites par *S. aureus* ont été éliminées par précipitation à l'acide trifluoroacétique, ce qui permet d'isoler les fragments peptidiques contenus dans le surnageant.

L'identification par LC-MS/MS des composés présents dans l'échantillon se fait en deux temps : dans un premier temps la masse intacte de tous les composés est mesurée, puis dans un second temps, chaque composé est fragmenté et la masse de chacun de ces fragments est déterminée. La confrontation de la masse intacte du composé, puis des différentes masses issues de la fragmentation, à une banque de données, peut ensuite permettre de définir le peptide correspondant (voir matériel et méthode).

La confrontation de nos mesures de masse à la banque de données « classique » GenBank de *S. aureus* NCTC8325 montre la présence dans le surnageant de fragments issus de 8 protéines précurseurs: deux peptides de 44 acides aminés annotés comme protéines

hypothétiques que nous appellerons par la suite peptides 4 et 5 (Fig. 49), des hémolysines alpha, beta et delta, d'une protéine ribosomale, de la lipase et de l'antigène A immunodominant. En dehors de la protéine ribosomale, les protéines identifiées sont sécrétées, ce qui montre que nos échantillons sont faiblement contaminés par les protéines intracellulaires issues de cellules lysées. En confrontant ensuite les mesures de masse à la banque des petits gènes, il a été mis en évidence la présence de fragments issus de 3 peptides supplémentaires. Ceux-ci ont été appelés peptides 1, 2 et 3 et font respectivement 20, 21 et 21 acides aminés (Fig. 49). Bien que les gènes les codant soient prédits comme des séquences codantes avec une très forte probabilité (>99%), ils n'étaient cependant pas annotés dans la banque de donnée GenBank en raison de leur petite taille.

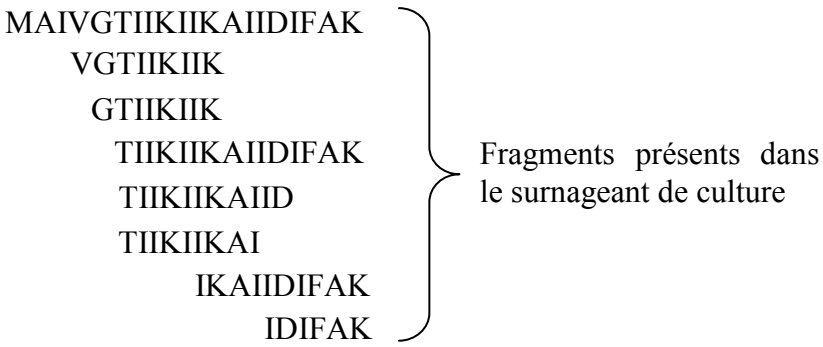
Pour la suite de notre étude, nous nous sommes intéressés uniquement aux peptides 1 à 5. Ils sont en effet détectés dans le surnageant, issus de la transcription d'un petit gène, n'ont jamais été étudiés et pourraient être des phéromones potentielles. L'analyse de leur séquence ne révèle la présence d'aucun motif de sécrétion évident (peptide signal, motif double glycine) et les logiciels ne donnent aucune prédiction de localisation. Cette absence n'est toutefois pas un cas unique dans le cas de peptides sécrétés puisque il a été montré par exemple, que l'auréocine A70 de *S. aureus,* peptide non modifié de 31 acides aminés, est sécrétée *via* un ABC transporteur et ne présente elle non plus, aucun motif de sécrétion connu (Netz *et al.* 2001). Au niveau protéique, on peut voir que les peptides 1, 2 et 3 sont relativement proches (de 43 à 85% d'identité) ainsi que les peptides 4 et 5 (70.5% d'identité).

2) Environnement génétique

La localisation sur le génome ainsi que l'environnement génétique des gènes codant les 5 peptides identifiés dans le surnageant de culture de *S. aureus* ont été examinés. De manière intéressante, les gènes codant ces peptides forment deux groupes distincts.

Les peptides 1 à 3 sont en effet contigus et orientés dans le même sens (Fig. 50). Par un logiciel de prédiction, un promoteur en amont du peptide 3 a été identifié, ainsi qu'un terminateur en aval du peptide 1. Ces données vont dans le sens d'une transcription en opéron des 3 peptides. On peut noter également la présence entre les peptides 1 et 2 d'un cadre ouvert de lecture putatif (*p=0,99862*) codant un peptide hypothétique de 22 acides aminés (Pept. hyp). Ce peptide partage de 23 à 41 % d'identité avec les peptides 1, 2 et 3 (Tableau 15). Il semble très probable que ce peptide soit produit au même titre que les trois autres. Le fait que l'on ne le détecte pas dans le surnageant soulève une limite potentielle de notre méthode. Il

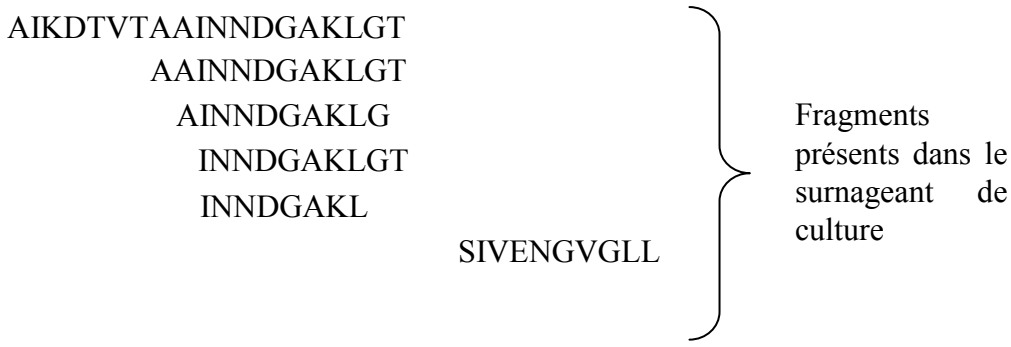
Peptide n°1: MAIVGTIIKIIKAIIDIFAK $p = 0.999675$



Peptide n°2: MGIIAGIIKFIKGLIEKFTGK $p = 0.999977$

Peptide n°3: MGIIAGIIKVIKSLIEQFTGK $p = 0.999989$

Peptide n°4: MEGLFNAIKDTVTAAINNDGAKLGTSIVSIVENGVGLLGKLFGF $p = 1$



Peptide n°5: MTGLAEAIANTVQAAQQHDSVKLGTSIVDIVANGVGLLGKLFGF $p = 1$

Fig. 49: Séquences des peptides identifiés par LC-MS/MS dans le surnageant de culture de *S. aureus*.
La probabilité *p* indiquée correspond à la probabilité que la séquence correspondant au peptide soit un gène.
En dessous des peptides 1 et 4 figurent l'ensemble des fragments d'hydrolyse issus de ces peptides ayant été détectés dans le surnageant.

. .

est possible en effet que ce peptide soit élué en même temps qu'un autre composé beaucoup plus abondant masquant ainsi sa présence ou qu'il soit trop dégradé pour être détecté. En amont des gènes codant ce groupe de peptides, se trouve un gène codant une protéine hypothétique de 42 acides aminés et en aval un gène codant une sous unité de la NADH déshydrogenase.

Les peptides 4 et 5 sont également contigus et codés dans le même sens (Fig. 50). Aucun promoteur n'a été détecté immédiatement en amont du gène codant le peptide 4, mais un terminateur est présent en aval du gène codant le peptide 5. Les deux peptides sont localisés entre un gène codant une protéine hypothétique de 44 acides aminés contenant un motif hélice-tour-hélice de liaison à l'ADN et un gène codant une hydrolase putative de la famille des HAD (dehaloacide dehalogenase). Ces gènes sont orientés dans le même sens que ceux codant les peptides, cependant la présence de terminateurs en aval du gène de la protéine hypothétique et en aval du gène du peptide 5 rend très peu probable l'hypothèse d'une co-transcription de tous ces gènes.

3) Conservation au sein des souches de *S. aureus* et du monde bactérien

L'ensemble des analyses précédentes ont été réalisées à partir des souches RN6390, pour les données expérimentales et NCTC8325 pour les données génomiques. Nous avons alors étudié la conservation des cinq peptides identifiés dans le surnageant chez les 12 souches de *S. aureus* séquencées. Les séquences des peptides 1, 2, 3 et 4 sont conservées à 100% chez l'ensemble des souches de *S. aureus*. En revanche, le gène codant le peptide 5 est absent du génome de MRSA252, la souche d'origine humaine la plus divergente.

Au sein du monde bactérien, aucun homologue des peptides 1 à 3 n'est retrouvé, même chez les espèces proches comme *S. epidermidis*, malgré la conservation des régions adjacentes. Cet ensemble de petits gènes est donc caractéristique de *S. aureus*.

En revanche, les peptides 4 et 5 sont conservés chez les espèces du genre *Staphylococcus* séquencées, c'est-à-dire *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* et *S. saprophyticus*. Des différences d'organisation des gènes codant ces peptides et d'environnement génétique sont toutefois observables (Fig. 51). On remarque tout d'abord que si la région aval du groupe de gènes de *S. aureus* est très bien conservée chez les autres bactéries, la région amont ne l'est pas du tout. On observe également que les gènes codant les homologues des peptides 4 et 5

Identité (%)	Pept. 2	Pept. 3	Pept. hyp
Pept. 1	43	43	23
Pept. 2	-	86	41
Pept. 3		-	32
Pept.hyp			-

Identité (%)	Pept.4
Pept. 5	70.5

Tableau 15 : Pourcentages d'identité entre les séquences des peptides identifiés.
Pept. hyp: peptide hypothétique n'ayant pas été détécté dans le surnageant en LC/MS-MS.
Les calculs ont été faits par le programme LALIGN
(http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

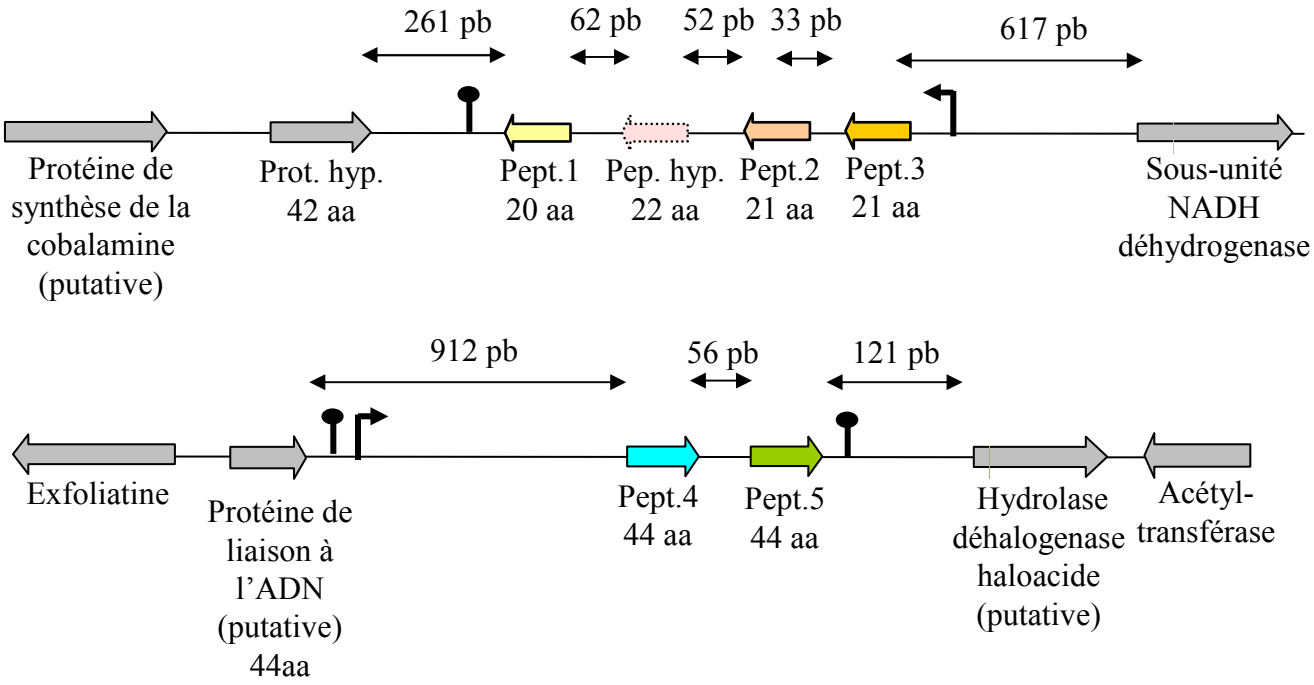


Fig. 50: Organisation des gènes codant les peptides 1 à 5 et environnement génétique.
aa= acides aminés; pb=paires de bases; Prot. hyp= protéine hypothétique; Pept. hyp= peptide hypothétique.
Les promoteurs et les terminateurs putatifs ont été identifiés grâce aux programmes de prédiction BPROM (http://www.softberry.com) et RNA secondary structure prediction (http://www.genebee.msu.su).

sont dupliqués respectivement chez *S. haemolyticus* et *S. epidermidis*. Chez ces deux bactéries, un autre gène codant un peptide proche des peptides 4 et 5 (entre 28 et 54 % d'identité protéique) est également présent, que nous avons appelé peptide 6 (Fig. 51).

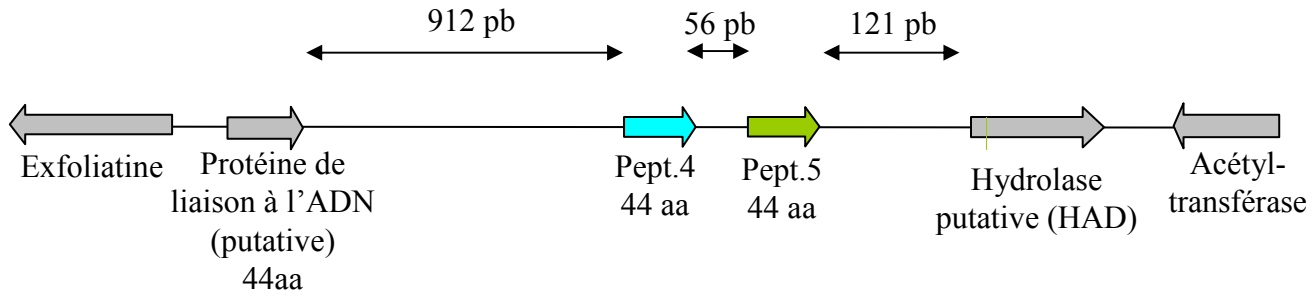
4) Quelle(s) fonction(s) ?

La technique de LC-MS/MS nous a donc permis de mettre en évidence chez *S. aureus* la production dans le surnageant de 5 peptides de petite taille qui n'avaient jusqu'à présent jamais détectés chez cette bactérie. Les trois premiers, qui sont des peptides d'environ 20 acides aminés se révèlent être spécifiques de *S. aureus* alors que les deux autres, constitués 44 acides aminés sont conservés chez les abctéries du genre *Staphylococcus* conservées. La question que l'on se pose alors est : quel est leur rôle ? Différentes hypothèses peuvent être envisagées.

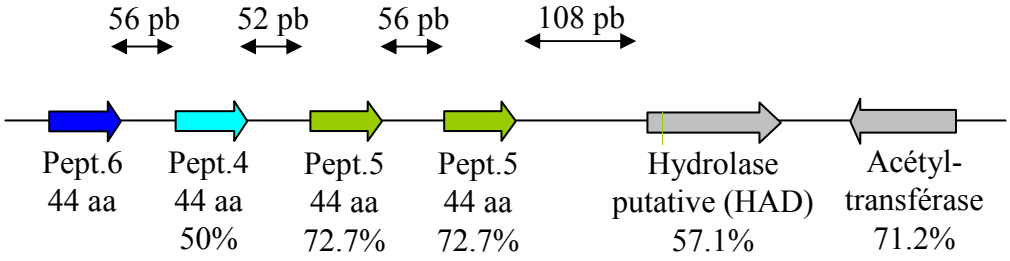
a. Les peptides 4 et 5 : certainement des hémolysines

Bien qu'annotés chez toutes les espèces du genre *Staphylococcus* en tant que protéines hypothétiques ou bactériocines potentielles, les homologues des peptides 4 et 5 de *S. haemolyticus* avaient déjà été caractérisés. En effet, la fraction du surnageant contenant les trois peptides produits par cette bactérie (Fig. 51) a été isolée et purifiée (Beaudet *et al.* 1982). Cette fraction présente une activité hémolytique importante, particulièrement efficace contre les érythrocytes du cheval et de l'homme (Watson *et al*. 1988). Le génome de *S. haemolyticus* n'ayant pas été séquencé au moment de ces études, il a été proposé que ces peptides soient issus des peptides signaux d'une lipoprotéine (Sevigny *et al.* 1992). Nos données montrent que ces peptides sont en fait synthétisés tels quels et que pour deux d'entre eux, les gènes les codant sont dupliqués chez *S. haemolyticus*. De nombreuses questions restent posées concernant ces peptides haemolytiques. Tout d'abord, comment fonctionnent-ils ? Il avait été proposé que l'association des trois peptides de *S. haemolyticus* soit nécessaire pour obtenir une structure active (Watson *et al.* 1988). Les données génomiques montrent que chez *S. haemolyticus* les gènes codant deux de ces peptides sont dupliqués et pas le troisième. Quel intérêt pour la bactérie ? Les trois peptides sont-ils synthétisés dans les mêmes proportions ?
Dans le cas de *S. aureus* et *S. saprophyticus* qui ne synthétisent que deux de ces peptides (Fig. 51), ces hémolysines sont-elles fonctionnelles ? Si non, pourquoi *S. aureus* les produit-il ?

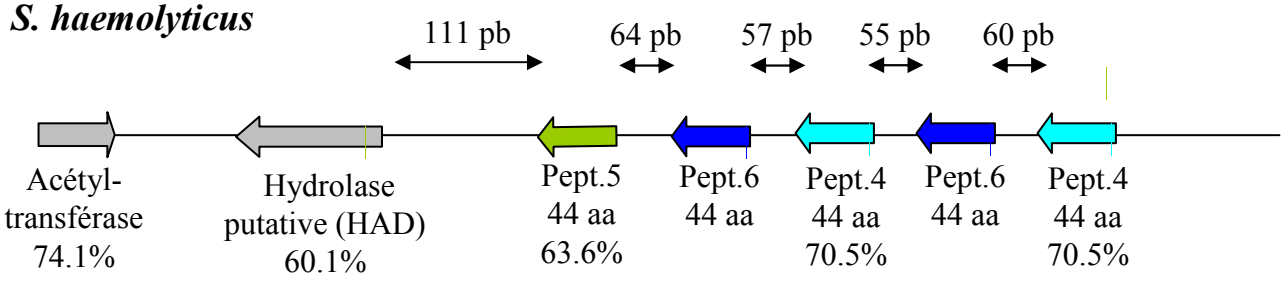
S. aureus



S. epidermidis



S. haemolyticus



S. saprophyticus

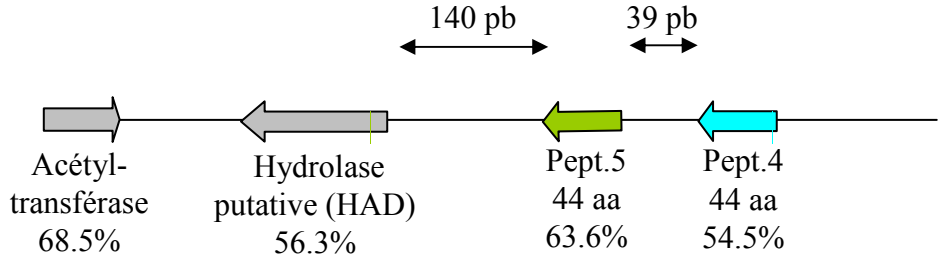


Fig. 51: Conservation des peptides 4 et 5 dans le monde bactérien.

aa= acides aminés; pb= paires de bases.

Les chiffres exprimés en % indiquent les pourcentage d'identité avec les protéines homologues de *S. aureus* NCTC8325.

Les pourcentages d'identité ont été calculés avec le programme LALIGN (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html).

Pour répondre à ces questions, il serait intéressant de comparer l'activité hémolytique d'une souche de *S. aureus* sauvage et d'un mutant de délétion simple et double des peptides 4 et 5.

b. Les peptides 1, 2 et 3 : plusieurs hypothèses

(i) Ces peptides sont des bactériocines.

Les bactériocines sont des peptides ayant une activité inhibitrice envers des bactéries, appartenant généralement à la même niche écologique que la bactérie qui les produit. Il existe 2 grandes classes de bactériocines : les lantibiotiques, caractérisés par la présence d'acides aminés modifiés (lanthionine, β-methyl-lanthionine...) (McAuliffe *et al.* 2001) et les peptides de classe II qui ne sont pas modifiés et donc auxquels les peptides que nous avons identifiés pourraient appartenir. Les peptides antimicrobiens de classe II ont une taille comprise entre 20 et 60 acides aminés environ. Ils sont la plupart du temps cationiques et possèdent généralement un domaine hydrophobe ou amphiphile. Plusieurs bactériocines de classe II ont déjà été caractérisées chez *S. aureus* (Varella Coelho *et al*. 2007). Par exemple, l'Auréocine A70 codée par un gène porté sur un plasmide, inhibe la croissance de nombreuses bactéries à Gram positif, y compris *L. monocytogenes* (Netz *et al.* 2001). Cette bactériocine est constituée de 4 peptides d'une trentaine d'acides aminés codés par des petits gènes en opéron, et sécrétés dans le surnageant sans avoir subi de modification post-traductionnelle. Les peptides formant l'Aureocine A70 ont des séquences proches (entre 37 et 65% d'identité protéique), ont un point isoélectrique (pI) compris entre 9.85 et 10.04 et sont très hydrophobes. Plusieurs de ces caractéristiques sont observables chez les peptides 1 à 3 identifiés dans le surnageant de *S. aureus*: plusieurs peptides de petite taille codés par des petits gènes en opéron et ayant des séquences proches. Le pI de chacun de nos peptides ainsi que leur hydrophobicité ont été calculés (Tableau 16) et l'on peut voir qu'ils répondent bien aux critères des bactériocines puisque leur pI est compris entre 9.7 et 10 et qu'ils sont hydrophobes.

Les peptides 1 à 3, par leur organisation génétique et leurs caractéristiques biochimiques, semblent de bons candidats en tant que bactériocines potentielles. Cependant, les gènes codant des peptides antimicrobiens sont généralement situés à proximité de gènes codant un système d'export (transporteur ABC) et un système d'immunité permettant à la bactérie de se protéger contre la bactériocine qu'elle produit. Ce n'est pas le cas pour les gènes codant les peptides identifiés. Il est cependant possible que les systèmes d'export et d'immunité soient codés indépendamment sur le génome.

Peptide	Pep. 1	Pep. 2	Pep. 3
pI	9.70	10	9.70
Index GRAVY	1.7	0.89	0.95

Tableau 16 : Calcul du point isoelectrique (pI) et du caractère hydrophobe des peptides 1 à 3 identifiés dans le surnageant de *S. aureus*.

L'index GRAVY (GRand AVerage of Hydropathy) permet d'évaluer le caractère hydrophobe d'une protéine. Sur une échelle allant de - 4.5 à + 4.5, plus l'index GRAVY est fort, plus la protéine est hydrophobe. Ces deux paramètres ont été calculés respectivement par les programmes pI-tool (http://www.expasy.ch/cgi-bin/pi_tool) et ProtParam (http://www.expasy.ch/cgibin/protparam).

Pour conclure, des preuves expérimentales sont nécessaires pour évaluer le potentiel antimicrobien de nos peptides. On pourrait commencer par tester le caractère inhibiteur total du surnageant de culture de *S. aureus* RN6390 sur différentes espèces bactériennes. Les résultats pourront être ensuite affinés en vérifiant qu'un mutant de délétion ne produisant plus ces peptides n'inhibe plus la croissance d'une ou plusieurs espèces bactériennes et/ou en testant l'activité antimicrobienne des peptides purifiés.

(ii) Ces peptides sont des phéromones.

Chez *B. thuringiensis*, la phéromone à mode d'action intracellulaire PapR est codée par un petit gène. Elle est tout d'abord synthétisée sous forme d'un propeptide de 48 acides aminés puis subit une maturation extracellulaire pour donner un peptide actif de 5 acides aminés. C'est ce peptide qui pourra ensuite être réimporté par Opp. Si l'on considère que les peptides 1 à 3 sont également des phéromones, il est probable qu'elles aussi sont maturées pour donner un peptide plus court. Or différents fragments de ces peptides ont été retrouvés dans le surnageant (Fig. 49). Parmi ces fragments, certains font moins de 10 acides aminés et pourraient tout à fait correspondre à une phéromone à mode d'action intracellulaire. Cependant ces fragments sont trop nombreux pour être issus d'un seul processus de maturation. Par exemple, 8 fragments issus du peptide 1 ont été identifiés (Fig. 49). Leur présence est certainement liée à une hydrolyse intense des protéines extracellulaires par les protéases. Cette dégradation peut s'expliquer par le temps de croissance tardif auquel les échantillons ont été prélevés. La technique de LC/MS-MS n'étant de plus, pas quantitative, il est impossible de dire lesquels de ces fragments sont majoritaires. Pour pallier ce problème et repérer les fragments pouvant correspondre à un peptide sous forme maturée, il serait nécessaire de recommencer cette expérience à un temps de croissance plus précoce. En étudiant l'expression des gènes codant les peptides au cours de la croissance par RT-PCR quantitative, les prélèvements pourraient être effectués au temps optimal.

Comme pour l'hypothèse des bactériocines, l'environnement génétique ne permet pas d'appuyer l'hypothèse de la phéromone. En effet, dans le cas de PapR, le gène codant le peptide de signalisation se trouve à proximité du gène codant le régulateur transcriptionnel qu'il contrôle. Or aucun régulateur putatif n'a été identifié à proximité des peptides 1 à 5. Une manière indirecte de tester l'hypothèse de la phéromone, serait alors de déterminer si les peptides (ou du moins certains fragments de ces peptides) s'accumulent dans un contexte *opp*-. En effet, au contraire des bactériocines, les phéromones sont réimportées par Opp.

La comparaison des surnageants de culture de la souche sauvage et du mutant *opp1,2,3,4-* est la deuxième démarche que nous avons suivie dans le but d'identifier des peptides de communication potentiels. Le recoupement des résultats obtenus par les deux stratégies pourrait alors permettre d'avancer dans la compréhension du rôle des peptides 1, 2 et 3.

C. Comparaison des surnageants de culture de la souche sauvage et des différents mutants de transport

Si l'on part de l'hypothèse que *S. aureus* produit un peptide de signalisation importé par Opp, dans un mutant de transport *opp-*, ce peptide devrait alors s'accumuler dans le surnageant. Nous avons donc comparé le contenu du surnageant de culture de la souche sauvage avec celui du quadruple mutant *opp1,2,3,4-*. Pour cela, les cultures ont été effectuées en MC sans acides aminés aromatiques qui ne contient ni peptides ni protéines. Les surnageants ont ensuite été analysés par RP-HPLC et les pics ont été détectés d'une part en UV à 214 nm, et d'autre part en fluorescence après dérivation post-colonne des composés élués. Nous avons également analysé dans les mêmes conditions, en tant que témoin négatif, du milieu non ensemencé.

On peut dans un premier temps, observer sur les chromatogrammes des surnageants de la souche sauvage et du mutant *opp1,2,3,4-*, la présence de nombreux pics (Fig. 52). Le chromatogramme du milieu non cultivé étant plat dès que l'on dépasse 8 min de temps d'élution, on peut supposer que les composés détectés sont produits par *S. aureus*. Si les chromatogrammes obtenus avec les deux souches sont globalement similaires, on peut remarquer néanmoins que certains pics sont significativement plus importants chez le quadruple mutant. Il semble donc qu'en absence de transporteurs Opp, certains composés s'accumulent dans le surnageant de culture. Ces résultats ont été effectués sur des prélèvements de surnageant indépendants et l'accumulation des pics indiqués figure 52 a été reproduite.

Pour préciser lequel ou lesquels de ces transporteurs sont impliqués dans ce phénomène, les surnageants des mutants simples *opp1-*, *opp2-*, *opp3-* et *opp4-* ont été analysés dans les mêmes conditions. Les chromatogrammes obtenus montrent que l'accumulation des composés est liée à l'absence d'Opp3 principalement. En effet, les

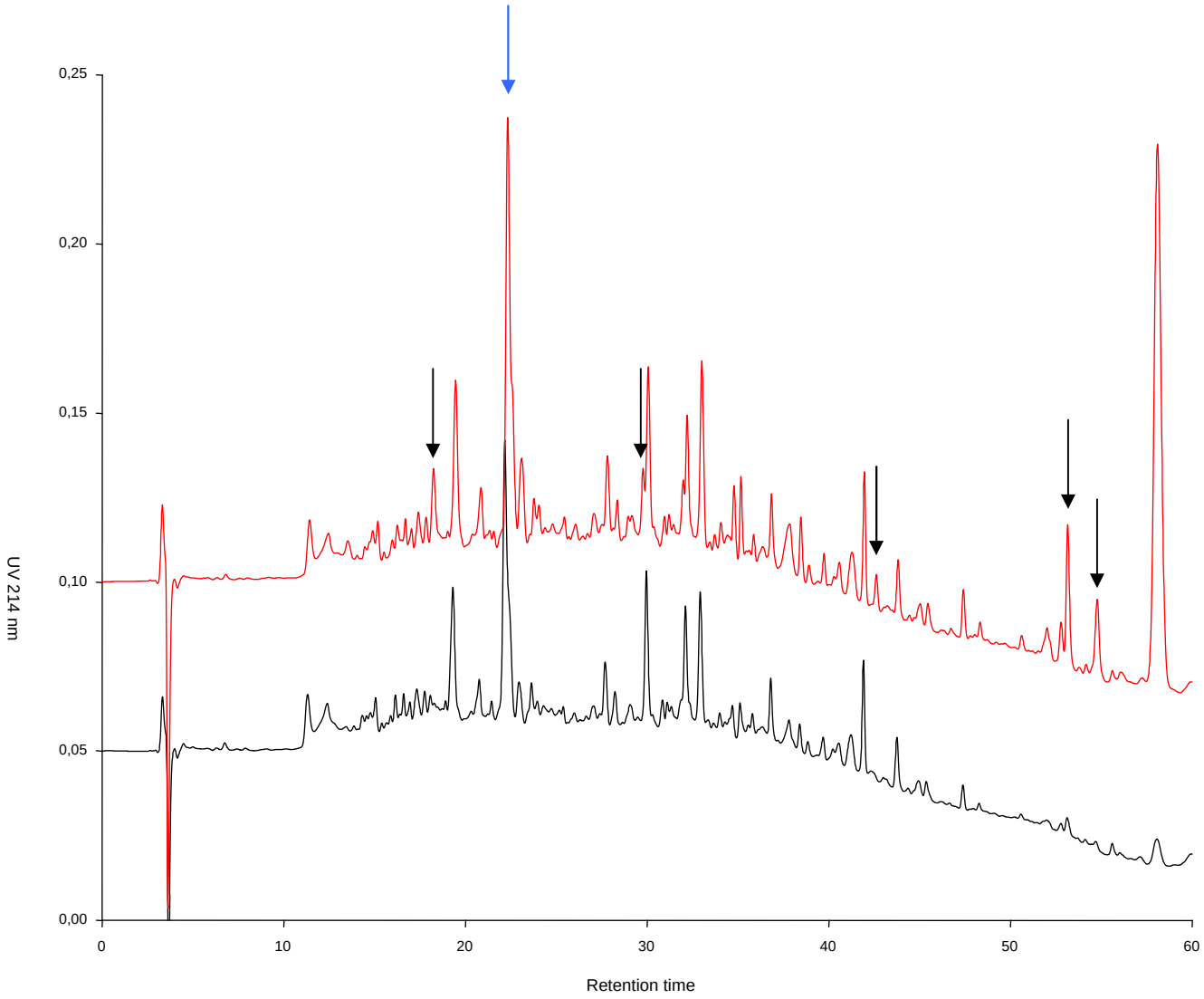


Fig. 52: Comparaison du surnageant de culture de la souche sauvage (en noir) et du mutant *opp1,2,3,4-* (en rouge).

Les surnageants ont été prélevés en début de phase stationnaire à partir d'une culture en milieu chimiquement défini complet ne contenant pas les acides aminés aromatiques.

Le contenu des surnageant (concentré 20 fois) a été analysé par RP-HPLC. Les résultats présentés sont ceux obtenus par détection en UV à 214 nm.

Les flèches indiquent les pics qui sont, de manière reproductible, significativement plus importants chez le quadruple mutant que chez la souche sauvage. La flèche en bleu correspond au pic ayant été prélevé et analysé.

chromatogrammes du mutant *opp3*- et du mutant *opp1,2,3,4*- sont quasiment superposables ainsi que ceux de la souche sauvage et des mutants *opp1*-, *opp2*- et *opp4*-.

Nous avons ainsi montré que l'absence du transporteur Opp3 provoquait l'accumulation dans le surnageant, de composés produits par la bactérie. Pour identifier les composés accumulés, un des pics qui présentait une différence significative de taille entre le chromatogramme de la souche sauvage et du mutant *opp1,2,3,4*- a été prélevé chez les deux souches (Fig.52). Le contenu de ce pic a été analysé par MALDI-TOF. Cette technique permet de travailler dans une gamme de masse plus faible et fournit des mesures de masse plus précises (environ d'un facteur 10) que la technique de LC-MS/MS que nous avons utilisé auparavant. Inappropriée pour l'analyse globale des composés d'un surnageant de culture puisqu'il n'y a pas de séparation préalable des composés, la technique du MALDI-TOF est en revanche mieux adaptée pour la détection de petits peptides dans le cas qui se présente ici.

Les résultats indiquent la présence au sein de ce seul pic, de 21 masses allant d'environ 500 à 880 Da. Ces composés sont retrouvés aussi bien chez le mutant que chez la souche sauvage. Les 21 masses ont ensuite été confrontées aux données de la banque des petits gènes et révèlent que 7 d'entre elles pourraient correspondre au produit de la transcription d'un petit gène. Aucune de ces masses ne correspond aux peptides 1 à 5 précédemment identifiés. Parmi les autres masses présentes dans le pic, une seule a pu être identifiée comme un fragment de dégradation de l'hémolysine alpha. Les 13 autres sont, soit des composés non peptidiques, soit des peptides modifiés puisqu'elles ne présentent aucune correspondance avec les bases de données (GenBank et petits gènes).

A partir de là, nous sommes confrontés à une limite importante de notre technique. Il est en effet, impossible de faire la part des choses entre le composé responsable de la différence de taille du pic observée et les composés « contaminants ». En effet, les résultats de MALDI-TOF ne sont pas quantitatifs. On ne peut donc pas savoir laquelle des masses détectées s'accumule chez le mutant *opp1,2,3,4*-. Ce problème que nous avons rencontré lors de l'analyse d'un seul pic, se posera vraisemblablement de la même manière pour l'analyse des autres pics présentant une différence de taille. Avant de continuer, il parait préférable d'optimiser les techniques de séparation des composés pour travailler sur des pics plus purs. On pourrait notamment soumettre les surnageants à deux étapes de séparations successives. En séparant dans un premier temps les composés sur une colonne échangeuse d'ions on devrait d'une part éliminer de nombreux composés non peptidiques. D'autre part, puisque les peptides putatifs codés par des petits gènes forment deux groupes distincts en fonction de leur pI (Fig. 48), cela permettrait de faire une première séparation des composés et ne travailler

que sur la moitié du matériel peptidique à la fois. Un second passage, cette fois sur colonne en phase inverse, devrait nous permettre d'obtenir des pics beaucoup plus purs. Ces pics pourront être récoltés et les éventuels peptides présents analysés en masse. Puisqu'une masse donnée peut éventuellement correspondre à plusieurs peptides, la séquence précise du peptide contenu dans le pic purifié sera ensuite déterminée par LC-MS/MS ou séquençage d'Edman.

Nous avons donc montré que plusieurs composés, vraisemblablement de nature peptidique, s'accumulaient dans le surnageant dans un contexte *opp3*-. Pour les raisons techniques évoquées plus haut, ils n'ont cependant pas pu être identifiés. Deux hypothèses peuvent toutefois être envisagée concernant la nature de ces composés. Il pourrait s'agir d'une phéromone qui serait réimportée par Opp3. Or on sait que ce transporteur, qui est impliqué dans la nutrition azotée a une spécificité large. On peut se demander alors comment ce transporteur pourrait réimporter efficacement une phéromone, en présence d'un ensemble de peptides à vocation nutritionnelle. La deuxième hypothèse envisageable serait plus cohérente vis-à-vis du rôle nutritif d'Opp3. L'accumulation observée pourrait en effet être due à une absence de recyclage des produits de dégradation des protéines sécrétées. Ainsi, la fonction nutritionnelle d'Opp3 s'exercerait à la fois vis-à-vis des protéines du milieu mais également vis-à-vis de ses propres protéines.

Par cette étude, aucun phénotype n'a été mis en évidence concernant Opp1, 2 et 4. Cependant nous avons pu constater que les chromatogrammes des surnageants ayant été obtenus étaient largement contaminés par du matériel non peptidique qui masque certainement la présence d'autres pics. La nouvelle démarche envisagée, qui devrait pallier ce problème, permettra peut être de mettre à jour des peptides spécifiquement transportés par l'un ou l'autre de ces systèmes.

IV. Discussion générale

S. aureus possède quatre ABC-transporteurs d'oligopeptides, Opp1, Opp2, Opp3 et Opp4 plus une protéine Opp5A codée indépendamment sur le génome. Chacun des systèmes Opp présente une structure caractéristique avec deux protéines transmembranaires, deux protéines ATPasiques et une protéine de fixation du substrat, à l'exception d'Opp2. En effet, ce dernier, bien que classé sur la base de sa séquence en tant que système d'import, ne possède pas de gène codant la protéine de fixation au sein de son opéron. Cette structure est

atypique au sein du monde bactérien mais on peut supposer que ce translocon puisse recruter l'une ou l'autre des protéines OppA codées ailleurs sur le génome.
L'ensemble des opérons *opp* est très bien conservé chez les souches de *S. aureus* séquencées (environ 99% d'identité nucléique), mis à part *opp4* qui est absent ou tronqué chez deux souches. Ils sont, en revanche, assez différents entre eux en terme d'homologie de séquence. Les protéines OppA notamment, ne présentent que 31% d'identité en moyenne. Ces différences au niveau de la séquence révèlent-elles des différences de spécificité de substrat ? Pourquoi la bactérie possède t-elle plusieurs transporteurs de peptides dont la synthèse est coûteuse en énergie ? Ont-ils chacun leur propre fonction ou au contraire des fonctions redondantes ? Pour répondre à ces questions, nous avons construit différents mutants *opp*-, simples et multiples. L'analyse des phénotypes sur différents cribles a alors été abordée.

Opp3 : un transporteur dédié à la fonction nutritionnelle

La première fonction que nous avons abordée est celle de la nutrition azotée. Pour évaluer l'impact des différents systèmes de transport sur cette fonction, nous nous sommes placés dans un milieu naturellement pauvre en acides aminés libres mais riche en peptides et protéines : le lait. Le choix de ce milieu est d'autant plus justifié que *S. aureus* est un contaminant important des produits laitiers. La croissance bactérienne de la souche sauvage et des différents mutants *opp*- dans le lait révèle qu'un seul transporteur, le système Opp3 est impliqué dans la nutrition azotée. Il exerce dans ce milieu un double rôle :

(i) Il fournit à la bactérie, sous forme de peptides de 3 à 8 acides aminés, des sources azotées indispensables à sa croissance optimale. L'absence d'Opp3 peut toutefois pour cette fonction, être partiellement compensée par la protéine de transport des di- et tripeptides DtpT.

(ii) Il agit au niveau de la régulation de certaines protéases extracellulaires lors de la croissance dans le lait. En effet, l'opéron *ssp* et le gène *aur* sont, à densité de population comparable, bien moins exprimés chez le mutant *opp3*- que chez la souche sauvage RN6390. D'après nos observations expérimentales ainsi que les données bibliographiques concernant la régulation de l'expression des protéases chez d'autres bactéries, l'hypothèse qui est privilégiée pour expliquer ce phénomène est qu'Opp3 jouerait un rôle dans la perception de l'environnement. Par l'import de peptides du milieu, il influerait sur le pool intracellulaire d'acides aminés qui lui-même serait perçu par un régulateur. C'est ce régulateur qui participerait au contrôle de *ssp* et *aur*. Cette hypothèse reste cependant à démontrer. Il faudrait d'une part identifier le ou les acide(s) aminé(s) entrant en jeu dans cette régulation (ajout des

acides aminés un à un dans le lait et mesure de leur impact sur la synthèse de protéases) et d'autre part identifier le régulateur impliqué.

Nous avons mis en évidence le rôle du transporteur Opp3 et, dans une moindre mesure, de la protéine DtpT, sur le développement de *S. aureus* dans le lait. On peut alors facilement envisager qu'ils puissent jouer un rôle prépondérant dans d'autres milieux physiologiques, notamment lors de l'infection de l'hôte. Pour tester cette éventualité, la virulence de la souche sauvage a été comparée à celle des mutants *dtpT*- et *opp3,dtpT*-. Le modèle expérimental utilisé est une infection des valves cardiaques de rat selon le protocole décrit par Rigoulay *et al.* (2005). 24 heures après infection, les bactéries ont été dénombrées dans les valves cardiaques et dans la rate de l'animal, ce qui permet à la fois d'évaluer leur capacité à coloniser un organe et leur aptitude à se disséminer. Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les trois souches testées (Tableau 17). Il semble donc que dans ces conditions, les transporteurs de peptides n'ont aucun impact sur le développement de la bactérie. Cette absence de phénotype apparaît comme surprenante dans la mesure où il avait été précédemment montré qu'un mutant de transposition *dtpT*- était atténué dans sa virulence dans des modèles d'abcès et de plaie sur la souris. La dose létale 50% (DL_{50}) de ce mutant était, chez la souris, également bien supérieure à celle de la souche sauvage RN6390 (respectivement 10^7 contre $3{,}5.10^5$ ufc) (Coulter *et al*. 1998). On peut alors se demander si l'absence d'atténuation de la virulence dans notre cas ne pourrait pas être liée au changement de l'hôte (rat/souris) et/ou du modèle d'infection. La DL_{50} de la souche sauvage et du mutant *opp3,dtpT*- a alors été mesurée dans des conditions se rapprochant de celles utilisées par Coulter et ses collaborateurs (injection intrapéritonéale de bactéries à des souris). Les résultats obtenus montrent que la DL_{50} est similaire pour les deux souches (environ 5.10^7 ufc). Les phénotypes de virulence précédemment observés n'ont donc pas été reproduits par nos expériences. Cependant, les mutants utilisés par l'équipe de Coulter étaient des mutants de transposition. Or dans ce type de construction, plusieurs biais, qui n'ont pas été étudiés, peuvent agir sur les phénotypes observés (insertion du transposon ailleurs sur le génome, effet polaire de la transposition). Ces incertitudes ne se présentent pas dans le cas des mutants de délétion que nous avons construit. Des différences dans les conditions d'administration des souches pourraient également expliquer l'important écart obtenu entre les deux études concernant la DL_{50} de la souche sauvage.

Il semble donc que dans les conditions *in vivo* que nous avons testées, *S. aureus* trouve suffisamment d'acides aminés sous forme libre pour infecter l'hôte et se disséminer.

	Valve aortique			Rate	
Souche	Pourcentage de rats infectés	Log_{10} ufc / g d'organe		Pourcentage de rats infectés	Log_{10} ufc / g d'organe
RN6390	6/6 (100%)	8.83 (5.02-9.33)		6/6 (100%)	6.62 (3.71-6.72)
dtpT-	9/9 (100%)	8.71 (5.87-9.43)		9/9 (100%)	6.66 (3.69-6.70)
opp3,dtpT-	10/10 (100%)	8.95 (5.06-9.44)		10/10 (100%)	6.37 (3.19-6.64)

Tableau 17 : Pourcentage de rats infectés et dénombrement bactérien dans la valve aortique et la rate, 24 heures après inoculation de 6.0-6.7 x 10^4 bactéries de la souche sauvage RN6390 et des mutants *dtpT-* et *opp3, dtpT-*.

Les rats ont été infectés en injectant directement les bactéries dans la valve cardiaque par un cathéter.

ufc: unités formant colonies

Toutefois, on sait que *S. aureus* peut provoquer des pathologies très variées. On peut donc faire l'hypothèse que le transport de peptides nutritionnels est important dans certains types d'infection ou pour la colonisation d'organes particuliers. Par exemple, chez *S. pneumoniae*, bien que n'ayant aucun impact sur la DL_{50} ou la dissémination dans les organes, un rôle important d'Opp dans la colonisation des fosses nasales a cependant été observé (Kerr *et al.* 2004). On pourrait supposer que ce soit également le cas chez *S. aureus*. Cette hypothèse paraît d'autant plus intéressante à tester quand on sait que les fosses nasales humaines constituent l'habitat préférentiel de *S. aureus*, et que c'est souvent à partir de là que les bactéries se disséminent sur les autres tissus. De nombreuses possibilités restent donc à envisager avant de conclure que chez cette bactérie, Opp3 et DtpT n'ont pas de rôle significatif *in vivo*.

Une implication dans le transport de phéromones ?

Parallèlement à l'étude de l'impact des transporteurs Opp de *S. aureus* sur la nutrition azotée, nous nous sommes intéressés à leur implication potentielle dans des phénomènes de communication. En effet, chez certaines bactéries, il a été montré qu'Opp constituait la voie d'entrée des phéromones, et participait par ce biais à la régulation de fonctions importantes. Pour tester cette éventualité concernant les quatre systèmes Opp de *S. aureus*, nous avons suivi deux démarches expérimentales en parallèle. L'analyse globale du surnageant de culture de *S. aureus* RN6390 par LC-MS/MS a permis tout d'abord de mettre en évidence que 5 peptides, issus de la transcription de petits gènes, étaient sécrétés par la bactérie. Deux de ces peptides étaient annotés comme protéines hypothétiques alors que les gènes codant les trois autres ne figuraient pas dans les banques de données. C'est donc la première fois qu'ils sont mis en évidence expérimentalement chez *S. aureus*. Les peptides 4 et 5 sont homologues à des peptides hémolytiques caractérisés chez *S. saprophyticus*. Ces peptides sont, chez *S. haemolyticus*, particulièrement actifs contre les érythrocytes humains (Watson *et al*. 1988). Cependant leur mode d'action est à ce jour inconnu. On ne sait s'ils sont actifs indépendamment les uns des autres ou si plusieurs de ces peptides sont nécessaires à l'acquisition d'une forme active. Leur pouvoir hémolytique chez *S. aureus* reste de plus à démontrer. La construction d'un mutant de délétion ne produisant plus les peptides 4 et 5 et/ou la purification de ces peptides pourrait, entre autres, permettre de mieux comprendre le fonctionnement de ces peptides hémolytiques. En tant que facteurs de virulence potentiels, il

serait également intéressant d'étudier leur expression au cours du temps et leur régulation ainsi que leur impact sur la pathogénicité de la bactérie.

Les peptides 1 à 3 sont quant à eux spécifiques de *S. aureus* et les gènes les codant sont parfaitement conservés chez l'ensemble de souches séquencées. Ils ne présentent aucune homologie de séquence avec d'autres peptides étudiés, ni d'environnement génétique caractéristique. D'après l'analyse de leur caractéristiques biochimiques et l'analyse des différents fragments de ces peptides ayant été retrouvés dans le surnageant de culture, deux hypothèses sont envisageables concernant leur rôle. Ces peptides pourraient être des bactériocines mais aussi des phéromones. On ne peut de plus, écarter l'éventualité que ces peptides aient une fonction différente de ce qui a déjà été mis en évidence chez les bactéries. Des données expérimentales supplémentaires sont donc indispensables pour aborder la question de leur impact dans la vie cellulaire. L'étude d'une part, de l'expression des gènes codant ces peptides et d'autre part, des conséquences de leur délétion (tests d'inhibition de la croissance de souches bactériennes et analyses transcriptomiques pour mettre en évidence une éventuelle dérégulation de certains gènes) pourront permettre d'apporter des éléments de réponse.

Il aurait été également intéressant de croiser les résultats obtenus par cette démarche avec ceux obtenus lors de la recherche de peptides produits par la bactérie et réimportés par Opp. Nous avons en effet montré, que certains composés, produits par *S. aureus*, s'accumulaient spécifiquement dans le surnageant d'un mutant *opp3*-. Pour des raisons techniques, ces composés n'ont pas été identifiés pour le moment. Mais si, une fois ces problèmes contournés, nous pouvons montrer qu'un ou plusieurs des peptides identifiés par LC-MS/MS étaient accumulés dans un contexte *opp*-, l'hypothèse de la phéromone serait favorisée.

Nous avons donc mis en évidence que *S. aureus* produisait au moins 5 peptides issus de la transcription de petits gènes. Trois d'entre eux n'étaient pas annotés dans les banques de données usuelles. Bien que l'implication de ce type de peptides dans plusieurs fonctions importantes ait été démontrée, l'annotation des petits gènes les codant reste très incomplète. Dans ce contexte, la banque des petits gènes de *S. aureus* que nous avons développé s'est révélée être un outil particulièrement utile. Elle ouvre en outre plusieurs perspectives. Tout d'abord si nous avons mis en évidence la transcription de 5 petits gènes dans les conditions testées, il apparaît comme quasiment certain que parmi les 375 gènes listés dans la banque, d'autres peptides sont également produits. Pour les identifier, on pourrait par exemple modifier le temps de prélèvement et/ou de milieu de croissance. Une démarche inverse à la

notre pourrait être également intéressante à suivre. En effet, alors que nous avons identifié les peptides contenus dans le surnageant puis recherché s'ils étaient codés par un petit gène, on pourrait commencer par sélectionner des gènes dans la banque pour vérifier ensuite s'ils sont produits. Cette démarche a été suivie chez *S. thermophilus* pour mettre en évidence la production par cette bactérie d'une nouvelle famille de peptides courts et hydrophobes dont les gènes correspondants sont situés juste en amont de régulateurs transcriptionnels (Ibrahim *et al.* 2007). Le point critique de cette approche est la sélection des gènes à étudier puisqu'il est probable qu'un certain nombre de petits gènes présents dans notre banque sont des pseudogènes. Plusieurs critères pourraient alors être pris en compte pour aider à repérer les cibles intéressantes. En plus des caractéristiques intrinsèques de la séquence des petits gènes et des peptides qu'ils codent, il faut examiner différents caractères extrinsèques comme la conservation de ces gènes chez d'autres espèces et leur environnement génétique. Les petits gènes situés à proximité d'un régulateur transcriptionnel putatif seraient notamment particulièrement intéressants à étudier dans le cadre de la recherche des peptides de communication.

Opp2 et Opp5A : un transporteur de nickel

Les études effectuées nous ont permis de caractériser les différents rôles exercés par le système Opp3. Nous n'avons pu attribuer en revanche, aucune fonction ni aux systèmes Opp1, 2 et 4 ni à la protéine Opp5A. Une hypothèse qui peut alors être envisagable est qu'un (ou plusieurs) de ces systèmes prenne en charge non pas des peptides mais du nickel. En effet, sur la base de leur séquence, il est impossible de distinguer les protéines de fixation des peptides de celles qui fixent le nickel. D'ailleurs l'alignement des séquences des différentes protéines OppA putatives de *S. aureus* avec la protéine de fixation du nickel NikA de *E. coli* révèle des pourcentages d'identité non négligeables, notamment avec Opp1A (Tableau 18). Le rôle potentiel des différents systèmes Opp de *S. aureus* dans le transport de nickel a alors été alors testé en parallèle des travaux présentés dans ce mémoire. En première approche, l'activité uréase de la souche sauvage et des différents mutants simples *opp-* (*opp1-*, *opp2-*, *opp3-*, *opp4-* et *opp5A-*) a été comparée. En effet chez *S. aureus*, l'uréase est la seule enzyme connue comme utilisant le nickel en tant que cofacteur. Elle catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammonium et dioxyde de carbone et son activité est facilement mesurable par test colorimétrique. Les résultats montrent lors de la croissance en milieu riche acidifié, une baisse de 80 % de l'activité uréase du mutant *opp2-* par rapport à la souche sauvage et une absence

Identité protéique (%)	Opp1A	Opp3A	Opp4A	Opp5A
NikA	33	20	21	20

Tableau 18 : Pourcentages d'identité protéique entre la protéine de fixation du nickel NikA d'*E. Coli* K12 et des différentes protéines OppA de *S. aureus* NCTC8325.
Les calculs ont été effectués par le programme LALIGN
http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html

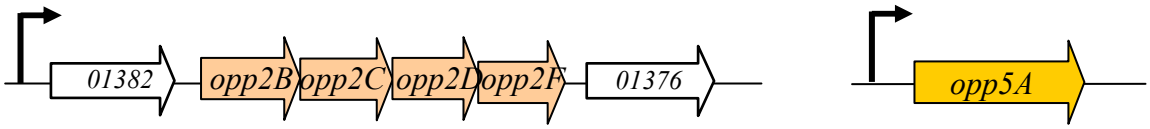
totale de cette activité chez les mutants *opp5A*- et *opp2,5A*-. Cela suggère qu'en absence du translocon Opp2 et /ou de la protéine de fixation Opp5A, la bactérie ne trouve plus le nickel nécessaire au fonctionnement de l'uréase. Il a également été vérifié que le triple mutant *opp1,3,4*- présentait une activité uréase similaire à celle de la souche sauvage, confirmant l'absence de rôle des autres transporteurs Opp dans ce phénomène. Pour démontrer l'implication d'Opp2 et d'Opp5A dans le transport de nickel de manière plus directe, des expériences de transport de nickel radioactif ont été effectuées. Alors que la souche sauvage est capable d'importer du $^{63}NiCl_2$ ajouté dans le milieu, aucun transport n'est détecté chez les mutants *opp2*-, *opp5A*- et *opp2,5A*-. Le transport de nickel est restauré chez les mutants *opp2*- et *opp5A*- complémentés (gènes *opp2* et *opp5A* apportés sur un plasmide).

L'association du translocon Opp2 et de la protéine de fixation Opp5A forme donc un transporteur de nickel. Il est curieux de constater que la protéine de fixation impliquée dans cette fonction n'est pas celle présentant la plus forte identité avec NikA d'*E. coli* (Tableau 18). Cela permet donc de souligner encore une fois que, pour cette famille de protéines, les données de séquence doivent être interprétées avec prudence.

La structure du transporteur formé par Opp2 et Opp5A est originale puisque ces protéines sont codées indépendamment sur le génome. Cette organisation n'avait encore jamais été observée chez d'autres bactéries. Par exemple, chez *S. saprophyticus*, espèce proche de *S. aureus* et uropathogène fréquent, des homologues au système Opp2 et à la protéine Opp5A sont présents mais leurs gènes sont contigus et certainement codés en opéron avec un gène codant un transporteur de l'urée (Fig. 53). Pourquoi les gènes *opp2* et *opp5A* sont-ils, dans le cas très particulier de *S. aureus*, dissociés ? Sont-ils malgré tout soumis aux mêmes régulations ? Il serait intéressant pour répondre à cette question d'étudier l'expression de ces gènes en réponse à différents facteurs environnementaux connus pour réguler la transcription des gènes de transport du nickel chez d'autres bactéries (concentration extracellulaire de nickel, acidité du milieu...).

Quel est l'impact du nickel et donc des transporteurs de nickel sur le développement de la bactérie ? Nous avons vu que la seule protéine présente chez *S. aureus* et connue pour utiliser ce métal comme co-facteur, est l'uréase. Son activité permet notamment à la bactérie de remonter le pH de l'environnement en milieu acide. Le milieu physiologique dans lequel ce mécanisme est particulièrement important est l'urine. Bien que rares (de 0,5 à 6 % des cas), les infections urinaires à *S. aureus* existent et pourraient être à l'origine de bactériémies (Grill et Domb 2004). Le comportement des souches *opp2*- et *opp5A*-dans l'urine humaine a donc été évalué. Après 3 jours de culture dans ce milieu, la souche sauvage a considérablement

S. aureus



S. saprophyticus

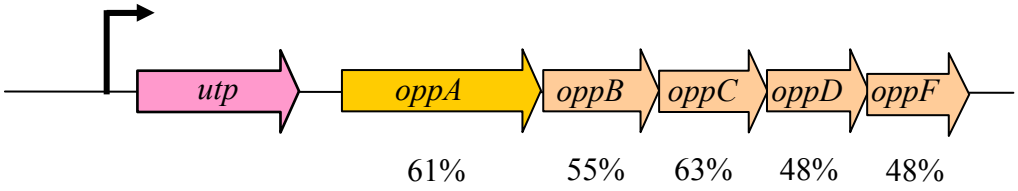


Fig. 53: Comparaison de l'organisation de l'opéron *opp2* et du gène *opp5A* de *S. aureus* avec leurs homologues chez *S. saprophyticus*

Les chiffres exprimés en % indiquent les pourcentage d'identité avec les protéines homologues de *S. aureus* NCTC8325.

Les pourcentages d'identité ont été calculés avec le programme LALIGN

http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html

utp: uréase transporter

.

remonté le pH initial de l'urine (de 5,8 à 8,5) ce qui provoque la formation de nombreux cristaux, ou calculs urinaires, caractéristiques d'une infection du tractus urinaire par des bactéries ayant une activité uréase (Fig.54). Dans les mêmes conditions, les souches *opp2*- et *opp5A*- remontent beaucoup plus faiblement le pH (de 5,8 à 6,5) et ne forment quasiment pas de cristaux. Des dénombrements bactériens ont également été effectués et ne montrent aucune différence significative de croissance entre la souche sauvage et les mutants en urine. Cependant il a été observé la formation de gros agrégats bactériens, indissociables par Ultra-Turax sur les cristaux formés par la souche sauvage. Ces cristaux étant très abondants (formation d'un véritable « culot » observable par sédimentation), et les bactéries s'y agrégeant n'étant pas prises en compte, on peut supposer que ce phénomène conduit à sous-estimer la population bactérienne dans le cas de la souche sauvage.

On peut donc observer, dans un milieu physiologique, une nette différence de comportement entre la souche sauvage et les mutants *opp2*- et *opp5A*-. Il serait maintenant intéressant de mesurer l'impact de ces mutations sur des modèles *in vivo* d'infection urinaire.

Le rôle d'Opp1 et Opp4 : les hypothèses

Nous avons pu attribuer un rôle à deux des quatre transporteurs Opp putatifs de *S. aureus*. Le système Opp3, qui transporte des peptides de 3 à 8 acides aminés a un rôle particulièrement important dans la nutrition azotée. L'association du translocon Opp2 et de la protéine de fixation Opp5A forme un transporteur de nickel de structure originale. Reste donc la question du rôle d'Opp1 et d'Opp4.

Dans les conditions environnementales étudiées (MCD et lait), le système Opp1 est assez fortement exprimé aux niveaux transcriptionnel et protéique. L'absence de phénotype dans les conditions testées n'est donc pas liée à un problème d'expression. Quelle(s) hypothèse(s) peut-on alors formuler concernant la fonction de ce système ? Deux observations nous amènent à nous interroger sur son rôle éventuel dans la résistance aux stress environnementaux :

(i) Tout d'abord l'ensemble de l'opéron contenant *opp1* n'est conservé, au sein du monde bactérien que chez *S. epidermidis* qui est une espèce proche de *S. aureus*, et *B. halodurans*. La caractéristique principale de *B. halodurans* est sa capacité à se développer dans un environnement alcalin (jusqu'à pH=11). La comparaison du génome de cette bactérie avec celui de *B. subtilis*, qui est une espèce proche, révèle que *B. halodurans* possède 8 fois plus de transporteurs de peptides Opp putatifs (dont l'homologue d'Opp1) que *B. subtilis,*

Wt RN6390 *opp2-*

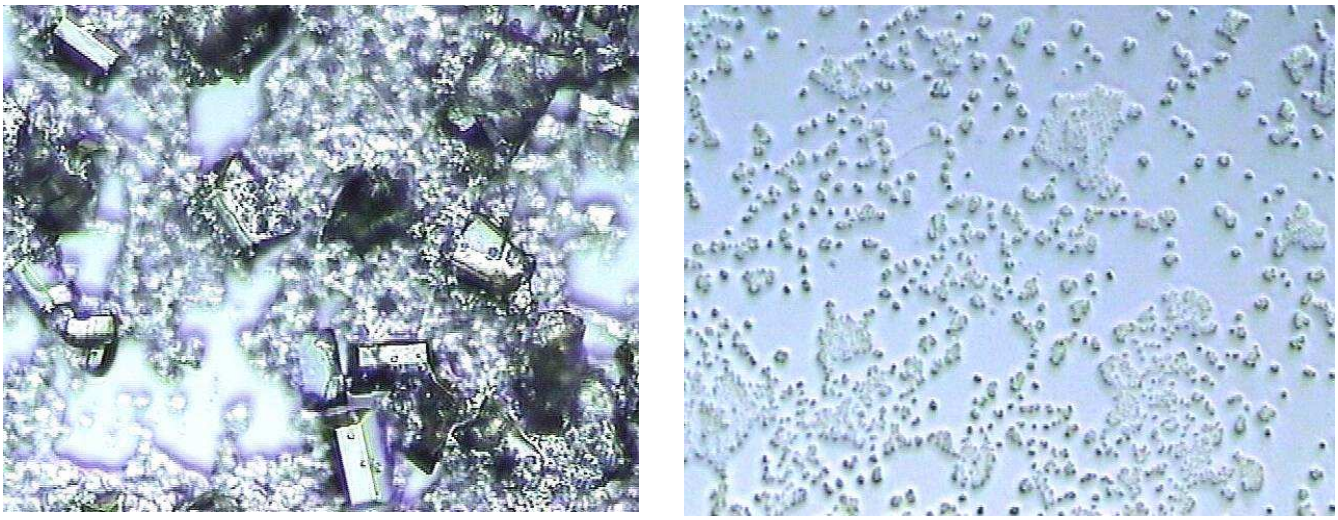


Fig. 54: Observation microscopique (objectif X20) d'échantillons d'urine humaine dans lesquels ont été cultivés pendant 3 jours à 37°C, respectivement la souche sauvage de *S. aureus* RN6390 et le mutant *opp2*-.

d'après E. Durant, non publié

alors qu'aucune différence concernant le nombre des autres ABC transporteurs n'est observée (Takami *et al.* 2000). Il est alors proposé que ces transporteurs participent à la résistance au stress alcalin chez *B. halodurans*. On pourrait ainsi supposer, que chez *S. aureus*, Opp1 puisse également avoir un rôle dans ce phénomène. Il faudrait pour tester cette hypothèse comparer, par exemple, la reprise de la croissance de la souche sauvage et du mutant *opp1*- après un choc alcalin.

(ii) La deuxième observation qui nous amène à supposer qu'Opp1 puisse jouer un rôle dans la résistance aux stress environnementaux est qu'il a été montré que l'ensemble des gènes de l'opéron contenant ce système étaient induits environ 5 fois quand *S. aureus* se trouvait en présence de monoxyde d'azote NO (Richardson *et al*. 2006). Ce composé est produit par les cellules immunitaires pour lutter contre les bactéries pathogènes. La résistance au monoxyde d'azote peut donc s'avérer importante lors d'une infection à *S. aureus*. L'implication potentielle d'Opp1 dans ce phénomène serait donc particulièrement intéressante à tester.

Si Opp1 avait un impact sur la résistance de *S. aureus* à un (ou aux deux) de ces stress, par quel biais pourrait-il agir ? Nous avons montré que l'opéron *opp1* était co-transcrit avec plusieurs gènes et notamment avec une diaminopimelate epimerase putative, enzyme pouvant entrer dans le processus de la synthèse du peptidoglycane. On peut alors supposer qu'Opp1 pourrait être impliqué dans la mise en place du peptidoglycane, ce qui ferait le lien avec la résistance aux stress environnementaux. L'observation en microscopie électronique à transmission (plateforme MIMA2 de Jouy en Josas) de bactéries *opp1*- ne révèle pourtant aucune anomalie visible de la paroi. L'impact d'Opp1 ne serait-il pas alors observable que suite à une exposition au stress (système de réparation de secours ?). D'autres hypothèses peuvent également être envisagées comme l'import par ce transporteur d'une phéromone qui régulerait l'expression de facteurs de réponse aux différents stress.

Que dire maintenant du système Opp4 ? Les gènes codant ce transporteur sont situés juste après ceux codant le système Opp3. La proximité des gènes codant ces deux systèmes, corrélé au fait qu'ils partagent, au sein des systèmes Opp de *S. aureus*, les pourcentages d'identité protéique les plus élevés (Tableau 11) aurait pu laisser penser qu'ils exercent des rôles similaires. Or si nous avons montré le rôle prépondérant d'Opp3 dans la nutrition azotée, aucune fonction n'a pu être attribuée au système Opp4. Cependant l'expression de ce dernier était faible dans l'ensemble des conditions testées et l'on ne peut exclure que l'absence de phénotype en soit une conséquence directe. Une étude récente montre qu'*opp4D* est induit

environ 5 fois lorsque la bactérie est internalisée dans des cellules épithéliales humaines (Garzoni *et al.* 2007) alors que l'ensemble de l'opéron *opp3* est très réprimé (11 fois). L'internalisation et la survie de *S. aureus* dans des cellules non phagocytaires est un phénomène encore mal connu. Il a cependant été montré *in vivo* dans des cellules épithéliales nasales humaines (Clément *et al*. 2005). On peut alors faire l'hypothèse que le système Opp4 n'est suffisamment exprimé et donc n'a un rôle sur la physiologie de la bactérie que dans des conditions environnementales très précises comme lors de l'internalisation dans des cellules eucaryotes. Les résultats obtenus par Gazoni et ses collaborateurs sont toutefois à considérer avec prudence dans la mesure où l'induction n'a été observée que pour *opp4D* et pas pour les autres gènes de l'opéron. Enfin on peut noter que le système Opp4 est le seul des transporteurs de peptides putatifs de *S. aureus* qui n'est pas systématiquement conservé chez toutes les souches. En effet, sur 12 souches de *S. aureus* séquencées, les gènes codant le système Opp4 sont absents ou tronqués chez 2 d'entre elles (MRSA252, la plus divergente des souches cliniques humaines, et RF122, souche issue de mammite bovine). Cette observation renforce l'idée que ce système n'a de rôle que dans des conditions environnementales ou des niches écologiques très spécifiques.

Au début de notre étude concernant les transporteurs Opp de *S. aureus*, nous nous sommes interrogés sur l'intérêt qu'avait la bactérie à synthétiser quatre systèmes distincts. Ont-ils chacun leur propre fonction ou au contraire des fonctions redondantes ? Nous sommes maintenant à même de répondre à cette question. Le transporteur de peptides Opp3 est le seul système ayant une spécificité large, adaptée à son rôle de fournisseur de nutriments azotés. L'association du translocon Opp2 et de la protéine Opp5A forme un transporteur de nickel. Ils devraient de ce fait être renommés NikBCDF et NikA. Opp1 ne présente pas de fonction redondante avec l'un ou l'autre des systèmes caractérisés. En effet, dans la mesure où ce transporteur putatif était exprimé dans l'ensemble des conditions testées, nous pouvons affirmer qu'il ne transporte efficacement ni des peptides à vocation nutritionnelle (peut-être transporte t-il dans ce cas des peptides très spécifiques type phéromone ?) ni du nickel. Le cas d'Opp4 est plus discutable puisqu'étant très faiblement exprimé, on ne peut exclure qu'il soit, par exemple, fonctionnellement redondant avec Opp3 mais produit dans des conditions environnementales différentes. Cependant, on peut dire que globalement, si la bactérie a 4 opérons *opp* putatifs dans son génome, c'est qu'ils exercent chacun un rôle distinct. L'étude de chacun de ces systèmes ouvre alors, à des niveaux différents, de nombreuses perspectives quant à la compréhension de la physiologie de *S. aureus*.

MATERIEL ET METHODE

I. Microbiologie : souches et conditions de culture

A. Souches utilisées et conditions de stockage

La souche bactérienne de *S. aureus* utilisée tout au long de ces études est la RN6390 (Peng *et al.* 1988), dérivée de la souche clinique séquencée NCTC 8325 (Numéros d'accès NCBI: CP000253, NC_007795). Au cours de la construction des différents mutants de délétion, nous avons également utilisé la souche de *S. aureus* non virulente (*agr*-) RN4220 (Peng *et al.* 1988) et les souches d'*E. coli* TG1 et Top10 (Invitrogen). Les souches de *S. aureus* et de *E. coli* étaient stockées à -80°C respectivement en milieu liquide BHI (Brain Heart Infusion) ou en milieu liquide LB (Luria-Bertani), contenant 20% de glycérol (vol/vol). Si nécessaire, des antibiotiques ont été ajoutés au milieu de stockage aux concentrations suivantes : ampicilline 100µg/ml et kanamycine 50µg/ml pour les souches d'*E. coli*, érythromycine 2 µg/ml pour les souches de *S. aureus*.

B. Conditions de culture et suivis de croissance

S. aureus RN6390 a été cultivée à 37°C sous agitation (200 tours /min) dans différents milieux :

- En milieu liquide BHI.

Ce milieu a essentiellement été utilisé pour les précultures. Le suivi de la croissance bactérienne y était effectué par mesure de la densité optique (DO) à 600nm.

- En milieu chimiquement défini (MCD) :

L'ensemble des MCD utilisés ont été adaptés du milieu élaboré par Taylor et Holland en 1989 dans lequel ont été ajoutés de la biotine (0.1 mg l^{-1}) et du panthoténate de calcium (2 mg l^{-1}) (Fig.55). Le MCD contenant les 18 acides aminés sous forme libre dans les concentrations définies par Taylor et Holland a été appelé milieu complet (MC). A partir d'une étude de l'auxotrophie de la bactérie, nous avons élaboré un milieu minimum (MM) contenant 9 acides aminés libres (Glu, Leu, Cys, Met, Gly, Val, Thr, Arg, Lys). Selon les objectifs expérimentaux poursuivis, la composition en acides aminés des milieux a pu être modifiée : omissions au MC, ajout au MM, remplacement d'un acide aminé essentiel par un peptide à la concentration finale de 16mM de Glu /L, ajout de 1% (poids/volume) d'extraits de digestion pancréatique de caséine (Bacto Tryptone, laboratoires Difco).

Acides aminés

Composant	g/L
L-acide aspartique	2,4
L-acide glutamique	2,4
L-proline	2,4
L-arginine	0,36
L-glycine	2,4
L-histidine	0,48
L-lysine HCL	0,6
L-serine	2,4
L-valine	0,48
L-threonine	2,4
L-alanine	2,4
L-isoleucine	0,6
L-leucine	0,6
L-tryptophan	0,06
L-methionine	0,18
L-tyrosine	0,18
L-phenylalanine	0,2
L-cystéine	0,48

Sucre

Composant	Concentration finale (v/v)
Glucose	4 %

Métaux (solution 1)

Composant	g/L
$(NH_4)_2\ SO_4$	6,84
KH_2PO_4	1,34
Na_2HPO_4	5,7
$MgSO_4\ 7H_2O$	0,247

Métaux (solution 2)

Composant	g/L
$CaCl_2\ 2H_2O$	0,005
$CoCl_2\ 6H_2O$	0,0024
$CuSO_4\ 5H_2O$	0,005
$MnSO_4\ 4H_2O$	0,0056
NaCl	0,0058
$ZnCl_2$	0,0034
$FeCl_3\ 6H_2O$	0,027

Vitamines

Composant	g/L
Biotine	0,0001
Panthoténate de calcium	0,002
Acide nicotinique	0,01194
Thiamine HCL	0,0006

Fig. 55 : Composition du milieu chimiquement défini (MCD) utilisé pour la culture de *S. aureus*. Les acides aminés indiqués en gras sont ceux entrant dans la composition du milieu minimum (MM).

d'après Taylor et Holland 1989; Hiron *et al*. 2007

Toutes les précultures pour les différents MCD utilisés ont été effectuées en MC, les bactéries ayant été lavées deux fois en tampon phosphate 50 mM pH 6,8 avant innoculation dans le milieu de culture. Le suivi de croissance en MCD a été réalisé par mesure de la densité optique (DO) à 600nm.

- En lait

Le lait utilisé pour les cultures de *S. aureus* a été reconstitué à partir de poudre de lait écrémé « low heat » NILAC (NIZO, Hede, Pays-Bas) mélangée à de l'eau milliQ stérile (10% poids/ volume). En raison de sa bonne qualité microbiologique (moins de 200 germes par ml de lait reconstitué), le lait utilisé pour les cultures ne subit aucun traitement thermique susceptible de modifier son contenu en acides aminés libres ou en peptides.

Deux précultures successives étaient réalisées avant ensemencement du lait. La première était effectuée dans du BHI pendant environ 8 heures. La deuxième préculture, cette fois en lait autoclavé (110 °C, 10 min), était ensemencée à DO = 0,05 et cultivée pendant 8 heures avant inoculation de la culture en lait avec environ 10^7 cfu/ml (dilution au 1/500ème pour la souche RN6390, au 1/350ème pour la souche *opp3*- et au 1/250ème pour la souche *opp3,dtpT*-).

Pour suivre la croissance bactérienne dans ce milieu, des prélèvements réguliers ont été effectués. Un échantillon de la culture est tout d'abord soumis à l'action d'un Ultra Turrax (IKA WERKE, 20 secondes, force 4) pour casser les amas formés par *S. aureus,* puis dilué plusieurs fois dans de l'eau peptonée. Le dénombrement est ensuite effectué par étalement de 100 µl de différentes dilutions sur milieu gélosé BHI agar. Chaque dénombrement a été effectué en double, sur deux dilutions distinctes.

II. Construction des mutants de délétion

A. Préparation des cellules compétentes de *S. aureus* et protocole d'électroporation

Les souches de *S. aureus* RN6390 et RN4220 ont été rendues compétentes selon le protocole suivant :

Une préculture de la souche en BHI liquide à 37°C sous agitation a été effectuée sur la nuit. 2 ml de cette préculture ont été utilisés pour ensemencer 200 ml de BHI liquide préchauffé à 37°C. Cette culture a été incubée à 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO_{600nm} d'environ

0,4 (maximum 0,7). A partir de cet instant, la culture a été mise dans la glace et les manipulations qui suivent ont été désormais effectuées au froid. La culture a été centrifugée à 3500 rpm pendant 15 min à 4°C, puis le culot bactérien lavé trois fois avec 20 ml de tampon HEPES froid (HEPES 8 mM, saccharose 272 mM, pH 7,4). Après les lavages, le culot a été repris dans 2,5 ml de tampon HEPES puis du glycérol a été ajouté à une concentration finale de 10 %. Les cellules ont été reparties en aliquots de 100 µl, incubées deux heures dans la glace, puis congelées à -80°C.

Pour l'électroporation d'une souche, les cellules compétentes ont été décongelées quelques minutes dans la glace. Au maximum 5 µl d'ADN (selon la concentration) préalablement dialysé ont été ajoutés à 100 µl de cellules, puis le mélange transféré dans une cuvette d'électroporation (Eurogentech). La cuvette a été placée dans l'électroporateur Gene pulser (Bio-Rad) réglé pour un voltage de 2450 V, une résistance de 100 ohms et une capacitance de 25 µF. Après électroporation, 800µl de BHI contenant 0,4% de glucose ont été immédiatement ajoutés. L'ensemble a été incubé 2 heures sous agitation à 30°C avant étalement sur boite BHI agar contenant l'antibiotique approprié.

B. Extraction de l'ADN génomique de *S. aureus*

Les extractions de l'ADN génomique de *S. aureus* RN6390 ont été effectuées avec le kit DNeasy Blood and Tissue Kit II (Qiagen) à partir d' 1 ml de culture en BHI liquide saturée. Une étape préalable a été ajoutée aux procédures données par le fournisseur afin de les adapter à *S. aureus*. En effet, le culot bactérien obtenu par centrifugation de 1 ml de culture a tout d'abord été repris dans une solution de Tris EDTA (TE) contenant de la lysostaphine à une concentration finale de 100 µg/ml puis incubé 1 heure à 37°C (déstructuration de la paroi bactérienne). Le protocole du kit a été ensuite rigoureusement appliqué à partir de l'étape d'ajout de la protéinase K.

C. Clonage dans le vecteur pMAD

L'inactivation des différents transporteurs de peptides de la souche RN6390 a été effectuée par délétion complète soit des opérons *opp1*, *opp2*, *opp3* et *opp4*, soit des gènes *opp5A* et *dtpT* sans insertion de cassette de résistance aux antibiotiques. Pour cela, nous avons dans un premier temps construit une « cassette de recombinaison » par la technique de PCR overlap, comme expliqué Fig. 56. Les amorces utilisées pour la construction des cassettes de

1. Amplification par PCR haute fidélité de la région amont (BoxA) et de la région aval (BoxB) du gène à inactiver.
Oligos externes: ajout d'un site de coupure BamH1.
Oligos internes: ajout d'une séquence complémentaire (environ 16 nucléotides) de l'extrémité de l'autre Box.

2. Formation de la cassette de recombinaison par PCR overlap: hybridation des BoxA et B grâce à leurs extrémités complémentaires puis amplification de la cassette par des amorces externes .

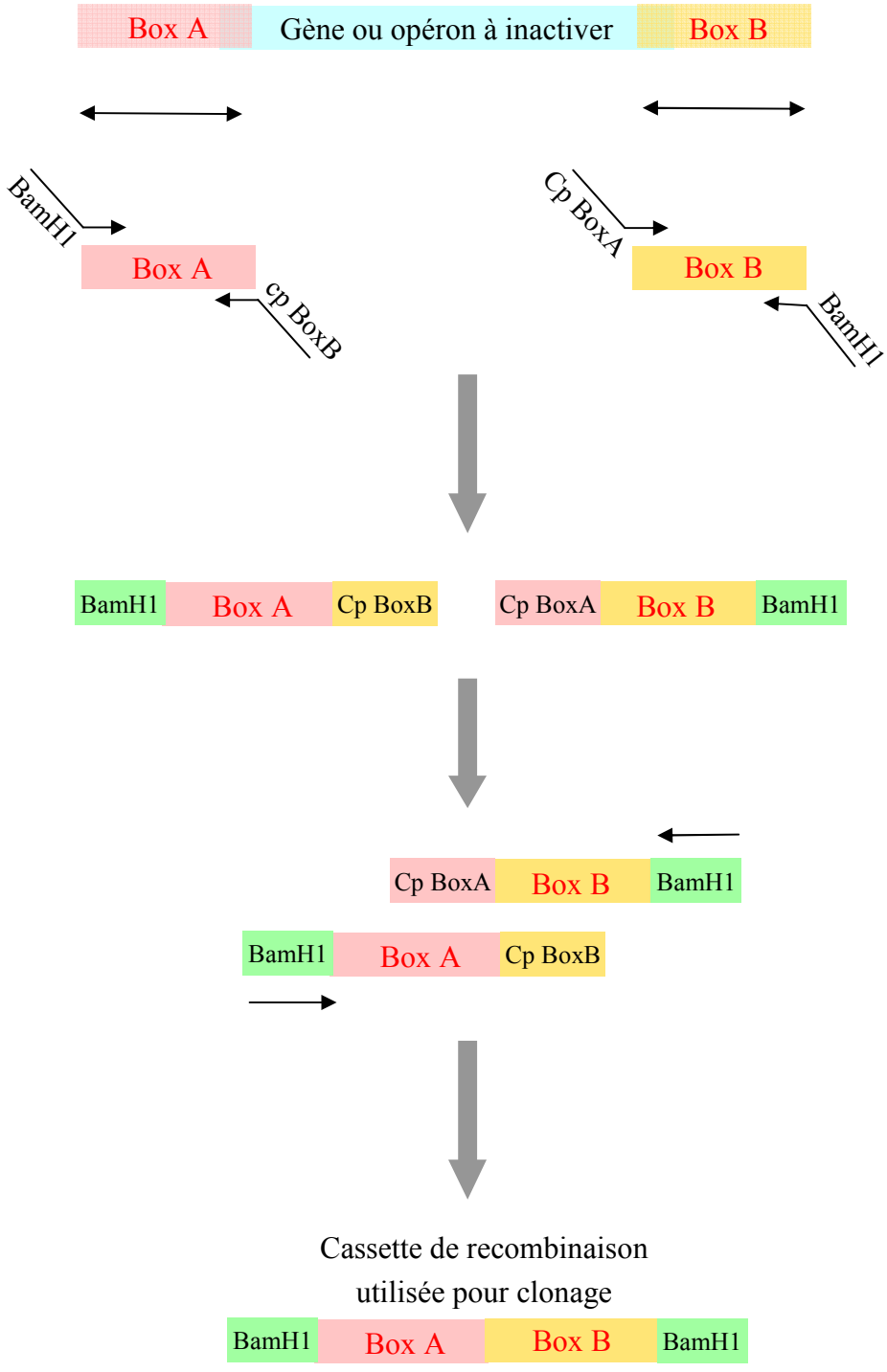


Fig. 56 : Schéma de construction de la cassette de recombinaison utilisée pour l'inactivation des différents systèmes de transport de peptides de *S. aureus*.
Cp Box*:* séquence de 16 nucléotides complémentaires à la Box

tous les transporteurs sont indiquées tableau 19. Toutes les PCR ont été effectuées avec la polymérase haute fidélité Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Les Box A et B ont été amplifiées avec un programme PCR de 5 min 98°C puis 30 cycles de 10 s à 98°C, 30s à 52°C, 1min à 72°C suivis d'un cycle de 10 min à 72°C. Une quantité égale (10-100 ng) de chaque produit d'amplification (BoxA ou BoxB) a ensuite été utilisée comme matrice pour la PCR overlap dont le programme était 30 s à 98°C, puis 5 cycles de 10 s à 98°C, 1 min à 48°C, 2 min à 72°C, 25 cycles de 10 s à 98°C, 30 s à 50°C, 2 min à 72°C suivis de 10 min à 72°C. Le produit de la PCR overlap (BoxAB) a été ensuite découpé sur gel et purifié pour être sous-cloné dans le vecteur pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen). L'insert BoxAB a été extrait du vecteur par digestion avec l'enzyme BamH1 (Fermentas) pendant 2 heures à 37°C. Le produit de digestion a été purifié pour être cloné dans le vecteur navette thermosensible pMAD mesurant environ 9.6 kb (Arnaud *et al*. 2004). Ce plasmide contient des gènes de résistance à l'ampicilline et à l'erythromycine ainsi qu'un gène *bgaB* codant une β-galactosidase thermostable permettant une discrimination blanc/bleu en présence de XGal. La ligature a été réalisée à 16°C sur la nuit par la T4 DNA ligase (New England Biolabs) en présence de 150 ng d'insert et 150 ng de vecteur préalablement digéré par BamH1 et déphosphorylé (30 min à 37°C) par l'enzyme CIAP (Fermentas). Le produit de ligature a été transformé par électroporation dans une souche d'*E. coli* TG1 et les clones étalés sur des boites LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 40 µg/ml de XGal pour discrimination. Deux clones bleus résistants à l'antibiotique ont été sélectionnés et leur plasmide extrait à l'aide du kit Mini Prep Qiaprep Spin (Qiagen). Les inserts ont été séquencés (par MWG Biotech) pour vérifier l'intégrité de la cassette de recombinaison BoxAB.

D. Recombinaison homologue

Le plasmide pMAD contenant la cassette de recombinaison BoxAB a été ensuite introduit dans la souche de *S. aureus* RN4220 par électroporation. Cette souche ne possède pas de système de restriction de l'ADN exogène (elle est donc transformable avec de l'ADN issu d'*E. coli*) et elle est capable de le modifier (méthylation) (Waldron et Lindsay 2006). Cette étape intermédiaire est nécessaire pour que l'ADN soit ensuite accepté par la souche RN6390. Les transformants ont été sélectionnés sur milieu BHI agar contenant 2 µg/ml d'érythromycine (eryR) et 60 µg/ml de XGal à la température permissive de 30°C. Deux clones bleus eryR ont été isolés et leur plasmide extrait par le kit « Mini Prep Quiaprep Spin » (Qiagen). Un de ces plasmides a été introduit dans la souche de *S. aureus* RN6390 par

Opéron/ gène	Amorce	Séquence (5'→ 3')
opp1	BoxA-*opp1-5'*	CGGGATCCCCTGAAGGACCGATAACGATGACAC
	BoxA-*opp1-3'*	CGCAACACGTTGCGCCTCTCCGCCCTGATGCAAGTAACATTGCACTC
	BoxB-*opp1-5'*	GTTACTTGCATCAGGGCGGAGAGGCGCAACGTGTTGCGATTGCGCGTGC
	BoxB-*opp1-3'*	CGGGATCCCCCGCATTCGCGAATCCTAAACTC
opp2	BoxA-*opp2-5'*	CGGGATCCGTCTCCTAAACGATAATGTTACGA
	BoxA-*opp2-3'*	GCCATCCTTAAGAACGCCCCCTCCTTGTGTAAGTTACTAACAC
	BoxB-*opp2-5'*	CTTACACAAGGAGGGGGCGTTCTTAAGGATGGCATGATAGTCG
	BoxB-*opp2-3'*	CGGGATCCGGACCATCAGAAGCATACACACACGC
opp3	BoxA-*opp3-5'*	CGGGATCCGGTCACTTACTTGGTGCAACAGGTGG
	BoxA-*opp3-3'*	ATTTTTTCTTCTTACCTGCCGATTTCTAAATTTCCATTCCCTTC
	BoxB-*opp3-5'*	GGAAATTTAGAAATCGGCAGGTAAGAAGAAAAAATAATATGCTTTG
	BoxB-*opp3-3'*	CGGGATCCGGTCCAGTAATAAATCCTGTTAAG
opp4	BoxA-*opp4-5'*	CGGGATCCGCAAGAGCACACTGGGACAAAGC
	BoxA-*opp4-3'*	GCATCCATATCCACGGCCCCATACATATGCCTCCTACTTTC
	BoxB-*opp4-5'*	AGGCATATGTATGGGGCCGTGGATATGGATGCCACCTGC
	BoxB-*opp4-3'*	CGGGATCCCCTGCTGGTCTATTAACATATCCACC
opp5A	BoxA-*opp5A-5'*	CGGGATCCGATACAAACCATAGCCGGGTAC
	BoxA-*opp5A-3'*	TACATCTCGACTTGATCCTGATAACACTAATACTGCTG
	BoxB-*opp5A-5'*	TATTAGTGTTATCAGGATCAAGTCGAGATGTACCAAAC
	BoxB-*opp5A-3'*	CGGGATCCGCTATTGGTGCAGGGTTCGCAG
dtpT	BoxA-*dtpT-5'*	CGGGATCCAGCATCAAGGTCGTGACTATTTC
	BoxA- *dtpT-3'*	GCGTTAGTTAAGTACCACCTTTCCCAGAACTCTACAAAG
	BoxB- *dtpT-5'*	GAGTTCTGGGAAAGGTGGTACTTAACTAAC GCTTCTGC
	BoxB- *dtpT-3'*	CGGGATCCTGCAGAAATCATTTGTTCACTAGC

Tableau 19 : Couples d'amorces utilisés pour la construction des cassettes de recombinaison.

électroporation. Après sélection des transformants sur boites BHI agar contenant 2 µg/ml d'érythromycine et 60µg/ml de XGal à la température de 30°C, deux clones bleus eryR ont été isolés. Ces clones ont été incubés en culture liquide en BHI à 30°C puis ont subi un choc thermique de 6 heures à 42°C et étalés sur boites BHI agar contenant 2 µg/ml d'érythromycine et 60µg/ml de XGal à la température de 42°C. A cette température, le plasmide ne peut plus se répliquer et seules les bactéries ayant intégré le plasmide dans leur génome par recombinaison homologue peuvent se développer. Deux clones bleus eryR ont été isolés et le bon déroulement du premier événement de recombinaison homologue (simple crossing-over) a été vérifié par extraction de l'ADN génomique et amplification par PCR de la région d'intérêt avec les couples d'amorces, pMAD1/Int.1 et pMAD2/Int.2 (Fig.57). Le deuxième événement de recombinaison conduit à l'élimination de la partie interne aux fragments homologues. Pour favoriser cet événement, les bactéries ayant intégré le plasmide dans leur génome ont été cultivées à 30°C en BHI liquide sans antibiotique et repiquées 3 fois sur 2 jours dans les mêmes conditions. La sélection des clones ayant éliminé le plasmide a été effectuée par étalement sur BHI agar contenant 60 µg/ml de XGal à 42°C. Les clones blancs ont été isolés, et leur absence de résistance à l'érythromycine a été vérifiée. Pour contrôler la délétion du fragment à inactiver, l'ADN génomique de quelques clones sensibles à l'antibiotique a été ensuite extrait, à partir duquel a été effectuée une PCR de contrôle avec les amorces amont et aval (Tableau 20). Si le fragment d'amplification obtenu était à la bonne taille, la mutation a alors été confirmée par Southern-Blot.

E. Vérification des mutants par Southern Blot

Pour effectuer les Southern Blot de vérification, l'ADN génomique (ADNg) de la souche sauvage et des différents mutants *opp*- a été extrait selon le protocole décrit ci-dessus. Ces ADNg ont ensuite été digérés 3 heures à 50°C par l'enzyme de restriction BclI (New England Biolabs), mélangés à du tampon de dépôt (bleu de bromophénol 0,1%, glycérol 40% dilués dans du tampon TAE : tris-acétate 40nM, EDTA 1mM) puis déposés sur un gel de migration (1% d'agarose dilué dans du tampon TAE). Après migration, les fragments d'ADN séparés ont subi une dépurination afin de faciliter leur transfert sur membrane. Pour cela, le gel a été incubé 30 minutes à température ambiante dans une solution de HCl 25mM puis rincé dans de l'eau distillée. Le gel a ensuite été placé 2 fois 20 min dans une solution de

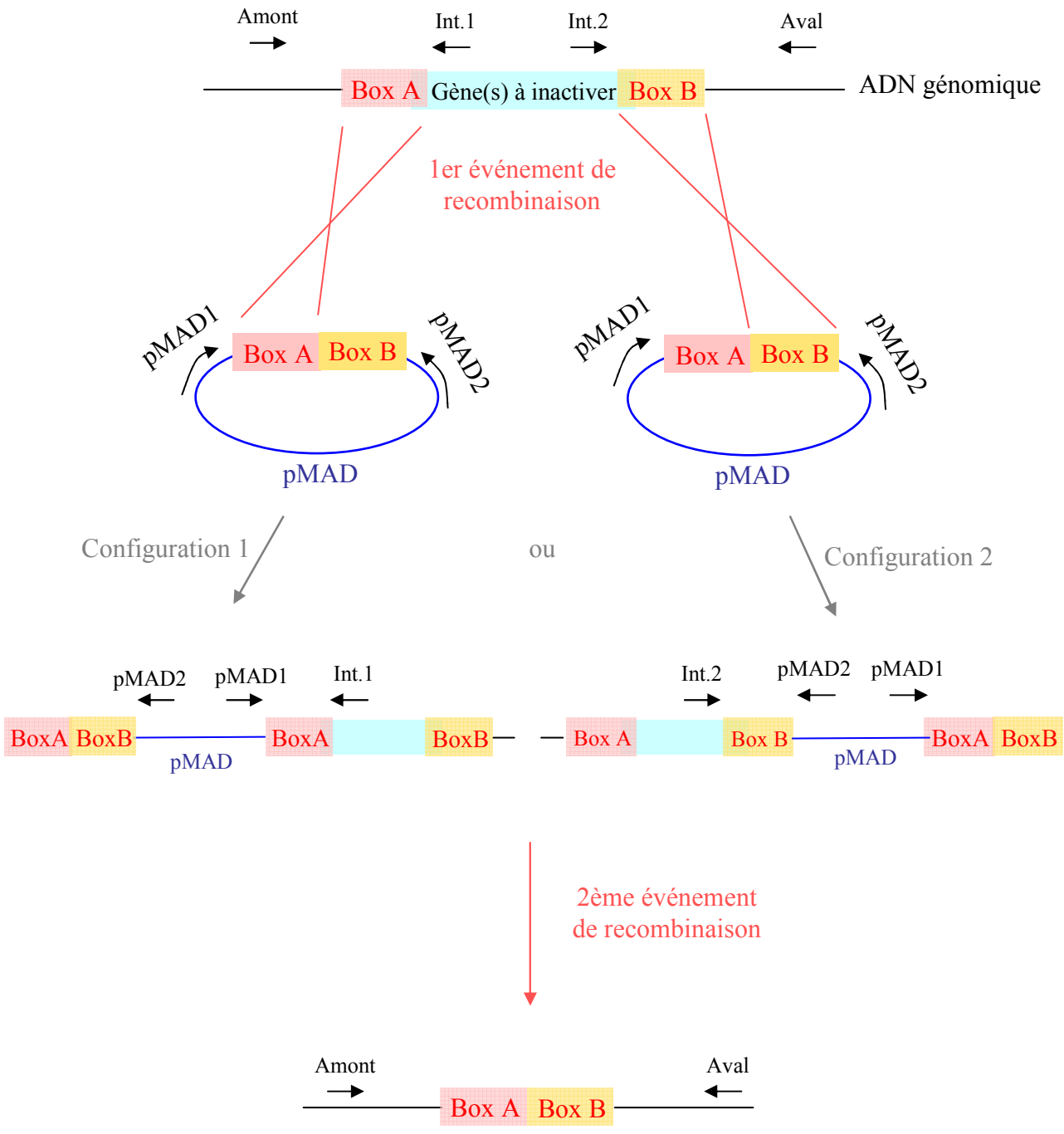


Fig. 57 : Schéma des événements des recombinaisons homologues lors de la construction des mutants de délétion.
pMAD1, pMAD2, Int.1, Int.2, amont et aval sont les amorces utilisées pour vérifier chaque étape de la recombinaison.

dénaturation de l'ADN (NaCl 1,5M, NaOH 0,5M), rincé dans de l'eau distillé puis incubé 2 fois 20 min dans une solution de neutralisation (NaCl 1,5M, TrisHCl 0,5M pH 7). Les ADN ont ensuite été transférés sur membrane de nitrocellulose (NytranN, Schleider et Schuell) par le système de transfert sous vide VacuGene XL (Amersham Biosciences) puis fixés au support par traitement UV (Stratalinker). La membrane a ensuite été placée 2 heures sous agitation à 42°C dans 50 ml d'une solution de pré-hybridation (tampon ECL Gold Hybridization Buffer, Amersham Biosciences). L'hybridation de la membrane a été effectuée suivant les instructions du kit « ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System » (Amersham Biosciences) en présence d'une sonde préparée au préalable. Nous avons utilisé comme sonde de détection, de l'ADN issu de l'amplification par PCR de la BoxA pour les mutants *opp1*-, *opp2*-, *opp3*- et de la BoxB pour le mutant *opp4*-. Les sondes ont été dénaturées 5 min à 100°C, refroidies immédiatement après dans de la glace, puis marquées avec le DNA Labelling Reagent (Amersham Biosciences) avant incubation sur la nuit à 42°C avec la membrane. La membrane a été ensuite lavée deux fois 30 min dans un premier tampon de lavage (Urée 10M, SDS 20%, SSC 0,5X), puis deux fois 5 minutes dans un deuxième tampon de lavage (SSC 2X). Après séchage de la membrane, la sonde a été révélée grâce au kit de détection ECL (Amersham Biosciences). L'enzyme de restriction BclI ainsi que la sonde (BoxA ou BoxB) avaient été choisies de manière à générer des fragments d'ADN détectables ayant des tailles différentes chez la souche sauvage et les mutants de délétion *opp*- à vérifier.

III. Traitement de l'ARN

A. Extraction des ARN totaux de *S. aureus*

L'extraction d'ARN totaux de *S. aureus* RN6390 a été effectuée à partir de prélevements de cultures en MCD ou en lait à différentes phases de croissance. Dans le cas des cultures en lait, le milieu a été clarifié par ajout de deux volumes d'EDTA 50 mM pH7 avant extraction. Chaque prélèvement est dans un premier temps centrifugé (10 min à 6000 rpm à 4°C), le culot bactérien lavé dans du tampon TE à 4°C puis plongé dans l'azote liquide avant stockage à -80°C. Après décongélation les cellules ont été lysées mécaniquement par trois cycles de Fast Prep FP120 (Bio1001 Thermo electron Corporation®) (45 secondes puissance 6,5) dans des tubes à vis contenant 500mg de billes de verre, 500µl de

Opéron/ gène	Amorce	Séquence (5'→ 3')
pMad	pMad1 pMad2	GTTACGTTACACATTAACTAGACAG TGGACAGCATGGCCTGCAACGC
opp1	Int 1 Int.2 Amont Aval	CCAGTACCATCGAACTTTTTAACGCC CACATGATATTCAAGCTGCCACG GTCGTTGAATCGCCACTGCATGC GCCACTACAAATGACGCGATTAC
opp2	Int 1 Int.2 Amont Aval	CCTGATTGGACGATTGAGACCTC GCACACATACCTAAAGATAGCGTG CCCATGTTTCTGAAACAGGAACATC CATGTTACAACATGCTAGTAGTGGC
opp3	Int 1 Int.2 Amont Aval	GTACAGCAAGTACAAAAGATGG GCGCCTAATGGCAAAGATTATG GGTGGTTCTAGAGCAATGCAAGCAGC CGCTAAATCTTTAATTGGTACATCTG
opp4	Int 1 Int.2 Amont Aval	GCGCCTAATGGCAAAGATTATG CGCTAAATCTTTAATTGGTACATCTG GCGCCTAATGGCAAAGATTATG CAGACCAGACAATTAGCAGCG
opp5A	Int 1 Int.2 Amont Aval	TTATCGTTCAATCGTTGTTCGATAATCG CACCACTGTGACGTACCAAGAAGACGGC ATATGGATCGCGTACACTAC GAAGAAACTGGAAAAGCACTCA
dtpT	Int 1 Int.2 Amont Aval	CCTGCATCCATACGTCTATC GGAATGGTGTTCTGGGCTATTC CACATGGCCGTCAACAAGATG GAACAATGAGACCTAAGCCAAC

Tableau 20: Couples d'amorces utilisés pour la vérification des deux évenements de recombinaison.

Phénol/Chloroforme 5 :1 pH 4,7 (Sigma), 30 µl de SDS 10% et 30 µl d'acétate de sodium (NaAc) 3M pH 5,2. Après centrifugation (15 min à 13000 rpm à 4°C), la phase aqueuse a été récupérée puis le matériel non soluble éliminé par traitement avec un volume de Phénol/Chloroforme 5 :1 pH 4,7 puis avec un volume de Chloroforme. Les ARN récupérés dans la phase aqueuse ont ensuite été purifiés en utilisant le kit High Pure RNA Isolation kit (Roche®, Basel). L'ARN a été repris dans 60 µl de tampon d'élution puis a subi un traitement DNase supplémentaire (Dnase I ; Roche) pendant 30 min à 25°C. L'enzyme a été ensuite éliminée par précipitation au Phénol/Chloroforme 5 :1 pH 4,7. L'ARN a été précipité en ajoutant 2 volumes d'éthanol absolu et 1/10 de volume de NaAC 3M pH 5,2 et incubé une heure à -80°C. Après centrifugation (30 min à 13000 rpm à 4°C), le culot d'ARN a été lavé dans de l'éthanol à 70 % froid puis a été repris dans 50 µl d'eau stérile. Afin de vérifier que l'ADN avait bien été éliminé, une PCR de vérification a été effectuée (35 cycles d'amplification) en utilisant 1 µl de chaque échantillon comme matrice. La concentration en ARN des échantillons a été ensuite mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop ND-1000) à 260 et 280 nm. Les extraits ont ensuite été ajustés à la concentration de 0,5µg/ml puis leur pureté évaluée en testant 1 µl d'échantillon au Bioanalyzer (Agilent 2100) sur une Nanopuce (Agilent Technologies). Ce dispositif permet de calculer le RIN (RNA Integrity Number) de l'échantillon d'ARN. Nous avons utilisé uniquement des extraits ayant un RIN compris entre 9 et 10 sur une échelle allant de 0 à10, c'est-à-dire contenant des ARN d'excellente qualité.

B. Transcription inverse (RT)

Dans un premier temps, 2 µg d'ARN totaux ont été dénaturés (5 min à 70°C) puis incubés 10 min à 20°C avec 1 µl de nonanucléotides aléatoires (Random Nonamers; CyScribe cDNA^{TM} Post labelling Kit, Amersham Biosciences®). La synthèse d'ADN complémentaire a été effectuée à 42°C pendant 2 heures par l'enzyme PowerScript Reverse Transcriptase en présence d'1 µl de nucléotides dNTp ultrapurs (Clontech, Takara Bioscience, Inc.) dans les conditions recommandées par le fournisseur. Après la transcription inverse, l'enzyme a été inactivée par traitement thermique (15 min à 70°C). Les banques d'ADNc ainsi obtenues ont été ensuite utilisées comme matrice dans les expériences de PCR semi-quantitative ou de PCR quantitative en temps réel.

C. PCR semi-quantitative (Limited Dilution -PCR)

Pour les expériences de PCR semi quantitative, plusieurs dilutions d'ADNc total (1:1, 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000) ont été utilisées comme matrice d'amplification des gènes d'intérêt. L'efficacité des couples d'amorces utilisés, listés tableau 21, a été comparée sur de l'ADN génomique. 30 cycles de PCR (30 s à 94°C , 30 s à 50°C, et 72°C pendant 1 à 3 min) ont été effectués pour chaque dilution de matrice en utilisant la polymérase « taq Core Kit » (Qbiogene, MP North America).10 µl de chaque tube PCR ont été ensuite déposés sur gel et les quantités de transcrits estimés visuellement en se basant sur le principe que pour une dilution donnée, plus on avait de transcrits du gène d'intérêt dans l'échantillon de départ, plus le signal d'amplification était fort. Nous avons utilisé comme contrôle interne, les transcrits du gène *hu* qui ont été amplifiés en parallèle pour chaque dilution. Si nécessaire, une quantification de l'intensité des signaux d'amplification a été effectuée par le programme Image Quant (version 5.2, Molecular Dynamics). Chaque expérience a été reproduite 3 fois sur au moins 2 extractions d'ARN indépendantes.

D. PCR quantitative en temps réel

- **Principe**

La PCR quantitative permet de quantifier en temps réel les produits de la réaction de PCR. Cette méthode se base sur la détection d'un signal fluorescent qui est produit de façon proportionnelle à l'amplification du produit PCR, cycle après cycle. La détection de l'ADN se fait avec un fluorophore, le SYBR-Green, un agent intercalant très stable qui peut s'insérer dans la chaîne d'ADN uniquement si elle se trouve sous la forme double brin. En solution, le SYBR-Green n'est pas fluorescent lorsqu'il est sous sa forme libre, alors qu'il l'est lorsqu'il est lié a l'ADN. Le taux de fluorescence libéré est alors proportionnel à la quantité de produits PCR générés à chaque cycle. Un système optique couplé au thermocycleur permet de mesurer cette fluorescence à la fin de chaque cycle. Cette variable augmentant selon une loi exponentielle, on obtient une courbe d'amplification de la fluorescence en fonction du nombre de cycle. Le Ct (cycle threshold) correspond au nombre de cycles nécessaires pour obtenir une quantité de fluorescence donnée. A partir du Ct, on peut remonter à la quantité

Gène	Séquence (5'→ 3')
opp1A	GCCTCGTCCATATGTATTTGTGTCTCC CTGCTTGTAAGTATTCTGCTTGTTC
opp2B	GTTTACCAGCGTTCTTTATCGC GCATGACGGTCACTACTTTCT
opp3A	GAATTAGAAAAGCCGGTTCCATATAT GGCGAATTCATGGTACTCGCAT
opp4A	CTTAACAGGATTTATTACTGGACC CTTTTAGGATCTTCTCTAAATCCG
opp5A	CACCACTGTGACGTACCAAGAAGACGG TTATCGTCAATCGTTGTTCGATAATC
hu	AGATTTAATCAATGCAGTTGCAGA GCTTTACCAGCTTTGAATGCT

Tableau 21 : Couples d'amorces utilisées en RT-PCR semi-quantitative pour les analyses d'expression des *opp* dans le lait et l'étude de la régulation des *opp* par les sources azotées du milieu.

d'ADNc de départ (elle même liée à la quantité d'ARNm avant la réaction de transcription inverse).

- **Matériel et conditions de PCR utilisés**

La PCR quantitative a été réalisée sur des plaques 96 puits, scellées par un film plastique pour éviter l'évaporation. Dans chaque puit ont été déposés 15 µl du mélange réactionnel de PCR composé : d'ADNc à une concentration donnée (2ng en général), de 900 nM de chaque amorce (sens et antisens), de 5 µl de SYBER Green Master mix (Applied Biosystems) contenant la polymérase, le substrat, et de l'eau osmosée stérile. L'amplification et la détection des produits spécifiques ont été réalisées en utilisant le thermocycleur ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems). Les conditions d'amplification étaient : 95°C pendant 3 minutes suivi de 40 cycles de 10 secondes à 95°C, 45 secondes à 62°C et 15 secondes à 81°C. L'ajout d'un cycle de dissociation nous a permis de vérifier que l'ensemble de nos amplifications étaient bien spécifiques. Au sein d'une plaque, chaque puit a été déposé en triplicata. Les couples d'amorces (Tableau 22) ont été dessinés par le logiciel Primer Express.

Ces amorces ont tout d'abord été validées par des réactions PCR effectuées sur différentes quantités de matrice de départ (4 dilutions décimales allant de 0,002 ng à 20 ng d'ADNc total). Une droite standard a pu alors être tracée et a permis de calculer l'efficacité E de chaque couple d'amorces par la formule $E= 10^{-1/pente}$. L'efficacité est de 100 % lorsque E=2. Pour la suite de nos expériences, nous n'avons utilisé que des couples d'amorces présentant une efficacité comprise entre 85 et 115 %.

Nous avons utilisé le gène *gyrB* (codant une ADN gyrase) comme gène de référence, choix que nous avons validé en testant la stabilité de son expression dans les différentes conditions expérimentales utilisées. Les résultats présentés sont exprimés sous forme de différence d'expression relative, calculée par la formule $E^{-\Delta Ct}$ (E=efficacité) et normalisée par l'expression relative de *gyrB*. Chaque expérience a été reproduite au moins deux fois sur deux extractions d'ARN indépendantes.

Gène	Amorce	Séquence (5'→ 3')
gyrB	qGyr-1 qGyr-2	ATCGGTGGCGACTTTGATCT CGGCATCAGTCATAATGACGATT
aur	qAur-1 qAur-2	GAAGATGTCTACACACCTGGAAAA AATTGTTCTGGGTTTGACATGCT
sspA	qSspA-3 qSspA-4	ACTTGTGAGTTCTCCAGCAGCAA TGACTGCGTTTGTTGTGGAT
sspB	qSspB-1 qSspB-2	TGTAGGAATTATGATCCTTGCACAA CAACTGCTAGCGCATGTCCTAA
scpA	qScpA-1 qScpA-2	GTGATGAGATTTTTACACCCAAACTTAC TCATCTCTCTTGGCGTTAAACCA
splA	qSplA-1 qSplA-2	GAATCGACAGGAACGATTAACCA GGTTGTGCATACGCATCAAATT

Tableau 22 : Couples d'amorces dessinées par le logiciel Primer Express et utilisées dans les expériences de PCR quantitative en temps réel.

IV. Préparation, détection et tests fonctionnels des protéines

A. Extraction des protéines cytoplasmiques de *S. aureus* et analyses par Western Blot.

L'extraction des protéines cytoplasmiques totales de *S. aureus* RN6390 a été effectuée à partir de prélèvements de cultures en MCD ou en lait à différentes phases de croissance. Dans le cas des cultures en lait, le milieu a été clarifié par ajout de deux volumes d'EDTA 50 mM pH7 avant extraction. Le protocole utilisé a été adapté de celui décrit par Rigoulay *et al.* (2005). Un volume de culture V tel que $V=1/ DO_{600nm}$ a été prélevé puis centrifugé à 8000 rpm à 4°C pendant 10 min. Le culot bactérien a été lavé avec 1 ml de TE stérile puis repris dans 1 ml de TE contenant de l'acide trichloroacétique TCA (10% final). Les échantillons ont été incubés 20 minutes dans la glace puis centrifugés 30 min à 13000 rpm à 4°C. Le culot a été lavé une première fois avec de l'acétone 80% froid, centrifugé 30 min à 13000 rpm à 4°C puis lavé une deuxième fois avec du TE pour éliminer complètement l'acétone. Le culot a ensuite été repris dans 120 µl d'une solution de TE contenant de la lysostaphine à une concentration finale de 100 µg/ml pour hydrolyser le peptidoglycane. Après une incubation de 1 heure 30 à 37°C, la lyse bactérienne a été provoquée par l'ajout de 30 µl de SDS 20%. Chaque échantillon a alors été mis à bouillir 5 minutes à 95°C.

Avant analyse par Western-blot, la concentration en protéines totales de chaque échantillon a été évaluée en utilisant le kit de dosage « DC protein assay » (Bio-Rad®, Hercules) selon les recommandations du fournisseur. Pour chaque extrait, 20 µg de protéines ont alors été chargés sur un gel SDS-PAGE dans du tampon de charge (Tris HCl pH 7,5 300µM, glycérol 50%, bleu de bromophénol 0,05%, SDS 10%, DTT 400mM). Le gel de migration était constitué d'un premier gel dit de concentration (Acrylamide (29/1) 5%, Tris HCl 0.13 M pH 6,8, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 1g/L, TEMED 1g/L) et d'un deuxième gel dit de résolution (Acrylamide (29/1) 12%, Tris HCl 0.38 M pH 8,8, SDS 0,1%, persulfate d'ammonium 1g/L, TEMED 1g/L). Pendant l'électrophorèse, le gel était plongé dans du tampon de migration LAEMLI (Tris HCl 25 mM, Glycine 0,2 M, SDS 0,1%).

Après migration, les protéines ont été electrotransférées (Hoefer Semiphor, Pharmacia Biotech) sur une membrane à faible auto-fluorescence Immobilon-FL (Millipore®, Billerica) préalablement imbibée de tampon de transfert (TrisBase 50 mM, glycine 380 mM, méthanol 20%, SDS 0.01%). Les protéines Opp1A, Opp3A et Opp4A ont été détectées par des

anticorps polyclonaux spécifiques produits chez le cobaye, dilués au 1/10000ème pour Opp1A et Opp3A et au 1/5000ème pour Opp4A dans du tampon TBST (Tris pH 7,5 20 mM, NaCl 0,13M, Tween 0,1%). L'immunodétéction a été effectuée grâce à des anticorps secondaires fluorescents dirigés contre les protéines de cobaye, « Fluor 488 anti-guinea pig IgG » (Invitrogen®, Carlsbad). La révélation a été réalisée par le Fluorimager 595 (Amersham Biosciences®, Buckinghamshire) à une longueur d'onde de 540 nm. Si nécessaire, le signal de fluorescence a été quantifié en utilisant le logiciel d'analyse d'image « Image Quant » version 5.2, Molecular Dynamics). Chaque expérience a été reproduite trois fois à partir d'extractions protéiques indépendantes.

B. Immunocoloration et microscopie à épifluorescence

Les bactéries cultivées dans différents milieux chimiquement définis ont été prélevées pendant la phase exponentielle de croissance. Le culot bactérien a été isolé par centrifugation (5 min à 6000 rpm à 4°C) et rincé deux fois dans du tampon Phosphate Buffer Saline (PBS). Les cellules ont été ensuite fixées avec du paraformaldehyde (PFA) 3% (vol/vol), incubées 3 heures dans la glace, puis rincées deux fois dans du PBS. Le culot a été repris dans un mélange 50% PBS, 50% éthanol absolu, puis stockée à -20°C pendant une semaine au maximum. La suspension cellulaire fixée a été décongelée, lavée dans du PBS et incubée 1 heure à 37°C dans de la lysostaphine 1µg/ml. Après la lyse de la paroi, la solution a été lavée dans du PBS puis le culot bactérien resuspendu dans une solution d'anticorps primaires anti-Opp3A (1/50) dans du PBS et incubé 1 heure à température ambiante. Après hybridation, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBS et resuspendues dans une solution d'anticorps secondaires marqués à la rhodamine (Anti-rabbit Alexa Fluor 555 coupled IgG antibodies; Molecular probes, Eugene, Oregon, USA) dilués au 1/1000 pour une incubation d'une heure à température ambiante à l'abri de la lumière. Après marquage, le culot bactérien a été lavé deux fois dans du PBS et repris dans une solution de PBS + PFA 0,4% (vol/vol) pour éviter l'agrégation des cellules lors du séchage sur lame. 25 µl de cette suspension ont ensuite été étalés sur une lame recouverte de gélatine. Pour obtenir ces lames, des plaques de verres propres ont été immergées dans une solution de KOH 10% dilué dans de l'éthanol 95% pendant 1 heure puis séchées à l'air libre. Les plaques ont ensuite été plongées dans une solution chauffée à 70°C de gélatine (Merck, Darmstadt, Germany) contenant 0,01% de chrome III sulfate de potassium dodécahydraté (Merck, Darmstadt, Germany) et séchées à l'air libre. Les lames sur lesquelles a été étalée la suspension bactérienne sont ensuite rincées

dans de l'eau milliQ pour éliminer les cristaux de PBS puis couvertes d'une goutte d'une solution de support (Citifluor Ltd, London, United Kingdom) contenant 2,5 µg/ml de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma, St-Louis, Mo). Les images ont été visualisées sur microscope à épifluorescence (60 X lens objective, Nikon, Tokyo, Japan) équipé du système d'analyse d'image Visiolab 1000 (Biocom, Les Ulis, France).

C. Mesure de l'activité protéolytique des surnageants de culture de *S. aureus*

Les activités protéolytiques de différentes souches de *S. aureus* lors de la croissance en lait, en BHI ou en MC ont été comparées. Pour cela, les surnageants de culture ont été prélevés à des temps donnés. L'élimination des cellules a été effectuée par centrifugation (10 min à 10000 rpm) puis par passage au travers de filtres 22µm (Millipore) (sauf pour le lait qui ne peut pas être filtré). 50 µl de surnageant de culture ont été déposés sur un disque de cellulose disposé sur un milieu solide constitué de 1,5% d'agar et de 3 % de gélatine. Chaque boite a été alors incubée à 37°C pendant 48 heures. L'activité protéolytique des surnageants issus des deux souches a été évaluée en fonction de la taille du halo transparent s'étant formé autour de la zone de dépôt.

V. Biochimie

A. Analyse des surnageants de culture de *S. aureus* par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (RP-HPLC).

Nous avons suivi le contenu peptidique de surnageants de culture de *S. aureus* dans deux milieux différents. Le premier était un MM supplémenté en d'extraits de digestion pancréatique de caséine (1% vol/vol) (Bacto Tryptone, laboratoires Difco). Différentes souches de *S. aureus* y ont été cultivées et les prélèvements ont été effectués en phase exponentielle de croissance. Le deuxième milieu était un MC auquel ont été enlevés les acides aminés aromatiques. Ces derniers étant hydrophobes et absorbant à 214 nm, gênaient la lecture du chromatogramme. Dans ces conditions, les prélèvements ont été effectués en début de phase stationnaire de croissance.

Quelque soit le milieu de culture, le surnageant a été isolé par centrifugation (10 min à 6000 rpm) et filtré au travers de filtres 22µm (Millipore). Les protéines présentes dans le milieu ont alors été précipitées par ajout de 1% (vol/vol) d'acide trifluoroacétique (TFA) et culot protéique éliminé par centrifugation (20 min à 13000 rpm à 4°C). Les échantillons ont ensuite été purifiés et, si besoin, concentrés 20 fois à l'aide de cartouches phase inverse Sep-Pack C18 (Waters Co.). L'élution a été faite avec 5 ml d'acétonitrile 60 %.

La séparation des peptides s'est faite à 40°C sur une colonne phase inverse RP18 X-Terra (250 × 4.6 mm, Waters) à un débit de 1 ml / min. Cette colonne permet une séparation des composés en fonction de leur hydrophobicité, ainsi plus un pic apparaît tard sur l'échelle de temps, plus ce composé est hydrophobe. L'élution des composés a été effectuée selon un gradient linéaire (de 0% à 60%) des solvants A (TFA 0,115% vol/vol dans eau MilliQ) et B (TFA 0,1% et acétonitrile 60% vol/vol dans eau MilliQ) en 40 minutes. Les composés ont ensuite été révélés par détection UV à une longueur d'onde de 214 nm (ce qui correspond au pic d'absorbance de la liaison peptidique).

Pour les expériences de recherche de peptides de signalisation, la détection UV à 214 nm a été couplée à une détection par fluorescence après dérivation post-colonne à l'*o*-phtalaldéhyde (OPA). L'OPA est un composé qui, dans un tampon de borate de potassium 0,5 M basique (pH 10,4) contenant 0,5 % vol/vol de ß-mercaptoéthanol, se lie principalement aux amines primaires pour former un dérivé isoindole fluorescent. La détection en fluorescence a été effectuée par un détecteur Waters modèle 474, avec des longueurs d'ondes d'excitation et d'émission respectives de 340 et 425 nm. La détection par fluorimétrie ne permet pas de détecter l'ensemble des peptides, mais est en revanche, beaucoup plus spécifique et plus sensible que la détection UV. Ces deux méthodes de détection sont donc complémentaires.

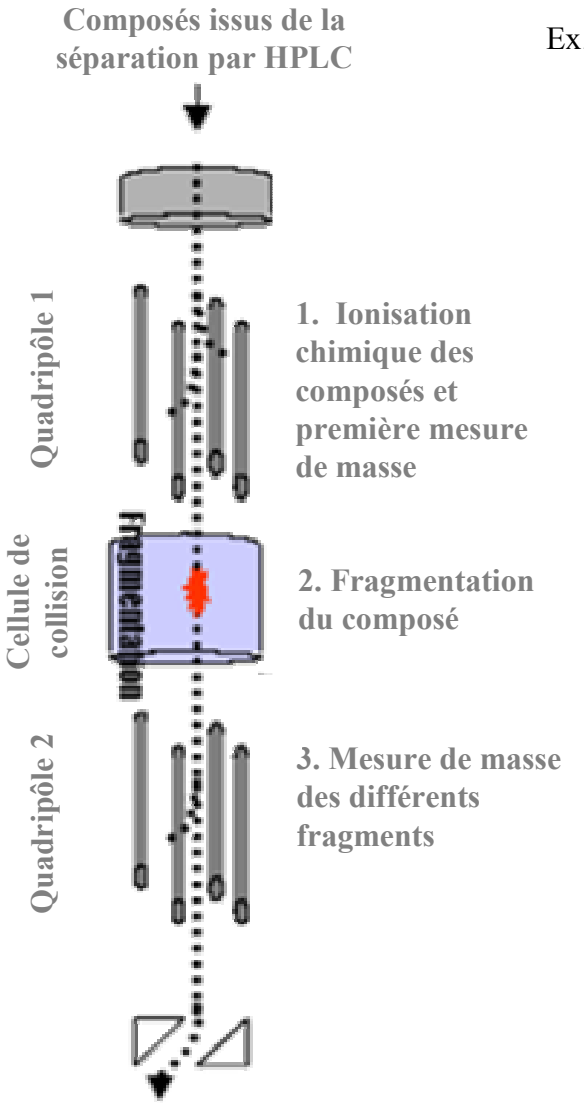
Certains pics, dont la surface variait suivant les souches, ont été collectés en ligne, séchés au speed-vac, et resuspendus dans de l'eau MilliQ. Les composés présents dans ces pics ont été identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight). Ces analyses ont été réalisées par A. Guillot (PAPSS, Biochimie et Structure des Protéines, INRA, Jouy-en-josas).

B. Analyse des surnageants de culture de *S. aureus* par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

.

Les échantillons à analyser ont été prélevés en phase stationnaire de croissance et les cellules ont été éliminées par centrifugation (10 min à 6000 rpm). Le surnageant a été récupéré et 1% (vol/vol) d'acide trifluoroacétique (TFA) a été ajouté pour précipiter les protéines présentes dans le milieu. Après élimination du culot protéique par centrifugation (20 min à 13000 rpm à 4°C), le surnageant a été filtré au travers de filtres 22µm (Millipore).

Les surnageants ainsi obtenus ont alors été analysés par LC-MS/MS. Dans un premier temps, les composés de l'échantillon ont été séparés par chromatographie liquide haute performance suivant le principe décrit dans le paragraphe précédent. A la sortie de la cellule de détection, les composés élués sont directement envoyés dans un détecteur de masse double quadripôle : Ultimate 3000 LC system (Dionex, Voisins le Bretonneux, France) connecté au spectromètre de masse LTQ (Thermo Fischer, USA). Les masses des différents composés ionisables y sont mesurées (Fig. 58). Par analyse des différentes masses obtenues puis confrontation des résultats à des banques de données, la séquence des différents peptides présents dans l'échantillon a été déterminée. Il faut noter que dans ces conditions d'analyse, les peptides ayant subi des modifications post-traductionnelles ne seront pas identifiés.



Ex. Peptide: $H_2N - K - A - V - P - Y - P - Q - OH$

↓

Masse détectée : 803 Da

Correspond à de nombreux peptides

Ex. : $H_2N - K - A - V - P - Y - P - Q - OH$
$H_2N - K - V - A - P - Y - P - Q - OH$
$H_2N - K - A - P - V - Y - P - Q - OH$
…

↓

Détection de la masse des différents fragments générés.

Ex. : $H_2N - K$ + $A - V - P - Y - P - Q - OH$
129 Da + 674Da

$H_2N - K - A$ + $P - V - Y - P - Q - OH$
200Da + 603

…

↓

Par analyse des masses des fragments
→ détermination de la séquence !

Fig. 58 : Principe de la spectrométrie de masse quadripôle.
Exemple de l'identification d'un peptide.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abouhamad, W.N., and Manson, M.D. (1994) The dipeptide permease of *Escherichia coli* closely resembles other bacterial transport systems and shows growth-phase-dependent expression. *Mol Microbiol* **14**: 1077-1092.

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.

Alloing, G., de Philip, P., and Claverys, J.P. (1994) Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. *J Mol Biol* **241**: 44-58.

Alloing, G., Granadel, C., Morrison, D.A., and Claverys, J.P. (1996) Competence pheromone, oligopeptide permease, and induction of competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **21**: 471-478.

Alves, R.A., and Payne, J.W. (1980) The number and nature of the peptide-transport systems of *Escherichia coli*: characterization of specific transport mutants. *Biochem Soc Trans* **8**: 704-705.

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.

Andrews, J.C., and Short, S.A. (1986) *opp-lac* Operon fusions and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* trp-linked oligopeptide permease. *J Bacteriol* **165**: 434-442.

Ansaldi, M., Marolt, D., Stebe, T., Mandic-Mulec, I., and Dubnau, D. (2002) Specific activation of the *Bacillus quorum-sensing* systems by isoprenylated pheromone variants. *Mol Microbiol* **44**: 1561-1573.

Antiporta, M.H., and Dunny, G.M. (2002) *ccfA*, the genetic determinant for the cCF10 peptide pheromone in *Enterococcus faecalis* OG1RF. *J Bacteriol* **184**: 1155-1162.

Arnaud, M., Chastanet, A., and Debarbouille, M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887-6891.

Arvidson, S. (2000). Extracellular enzymes. Gram-positive pathogens, ed. by Fischetti *et al*. Chapter 39: 379-385.

Austermuhle, M.I., Hall, J.A., Klug, C.S., and Davidson, A.L. (2004) Maltose-binding protein is open in the catalytic transition state for ATP hydrolysis during maltose transport. *J Biol Chem* **279**: 28243-28250.

Bayer, A.S., Coulter, S.N., Stover, C.K., and Schwan, W.R. (1999) Impact of the high-affinity proline permease gene (putP) on the virulence of *Staphylococcus aureus* in experimental endocarditis. *Infect Immun* **67**: 740-744.

Bayles, D.O., and Wilkinson, B.J. (2000) Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **30**: 23-27.

Bayles, D.O., Annous, B.A., and Wilkinson, B.J. (1996) Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1116-1119.

Beaudet, R., Bisaillon, J.G., Saheb, S.A., and Sylvestre, M. (1982) Production, purification, and preliminary characterization of a gonococcal growth inhibitor produced by a coagulase-negative *staphylococcus* isolated from the urogenital flora. *Antimicrob Agents Chemother* **22**: 277-283.

Begun, J., Sifri, C.D., Goldman, S., Calderwood, S.B., and Ausubel, F.M. (2005) *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. *Infect Immun* **73**: 872-877.

Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M.K., and Poolman, B. (2006) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* **580**: 1023-1035.

Bisno, A.L., Brito, M.O., and Collins, C.M. (2003) Molecular basis of group A streptococcal virulence. *Lancet Infect Dis* **3**: 191-200.

Bono, J.L., Tilly, K., Stevenson, B., Hogan, D., and Rosa, P. (1998) Oligopeptide permease in *Borrelia burgdorferi*: putative peptide-binding components encoded by both chromosomal and plasmid loci. *Microbiology* **144** (Pt 4): 1033-1044.

Boos, W., and Shuman, H. (1998) Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 204-229.

Borezee, E., Pellegrini, E., and Berche, P. (2000) OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect Immun* **68**: 7069-7077.

Bouige, P., Laurent, D., Piloyan, L., and Dassa, E. (2002) Phylogenetic and functional classification of ATP-binding cassette (ABC) systems. *Curr Protein Pept Sci* **3**: 541-559.

Budde, I., Steil, L., Scharf, C., Volker, U., and Bremer, E. (2006) Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. *Microbiology* **152**: 831-853.

Buttaro, B.A., Antiporta, M.H., and Dunny, G.M. (2000) Cell-associated pheromone peptide (cCF10) production and pheromone inhibition in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **182**: 4926-4933.

Calvo, J.M., and Matthews, R.G. (1994) The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev* **58**: 466-490.

Cassat, J., Dunman, P.M., Murphy, E., Projan, S.J., Beenken, K.E., Palm, K.J., Yang, S.J., Rice, K.C., Bayles, K.W., and Smeltzer, M.S. (2006) Transcriptional profiling of a

Staphylococcus aureus clinical isolate and its isogenic agr and sarA mutants reveals global differences in comparison to the laboratory strain RN6390. *Microbiology* **152**: 3075-3090.
Chandler, J.R., Flynn, A.R., Bryan, E.M., and Dunny, G.M. (2005) Specific control of endogenous cCF10 pheromone by a conserved domain of the pCF10-encoded regulatory protein PrgY in *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **187**: 4830-4843.

Chen, I., Christie, P.J., and Dubnau, D. (2005) The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* **310**: 1456-1460.

Chopin, A. (1993) Organization and regulation of genes for amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**: 21-37.

Chu, M.C., Kreiswirth, B.N., Pattee, P.A., Novick, R.P., Melish, M.E., and James, J.F. (1988) Association of toxic shock toxin-1 determinant with a heterologous insertion at multiple loci in the *Staphylococcus aureus* chromosome. *Infect Immun* **56**: 2702-2708.

Clarke, S.R., and Foster, S.J. (2006) Surface adhesins of Staphylococcus aureus. *Adv Microb Physiol* **51**: 187-224.

Claverys, J.P., and Martin, B. (2003) Bacterial "competence" genes: signatures of active transformation, or only remnants? *Trends Microbiol* **11**: 161-165.

Claverys, J.P., Grossiord, B., and Alloing, G. (2000) Is the Ami-AliA/B oligopeptide permease of *Streptococcus pneumoniae* involved in sensing environmental conditions? *Res Microbiol* **151**: 457-463.

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.

Clement, S., Vaudaux, P., Francois, P., Schrenzel, J., Huggler, E., Kampf, S., Chaponnier, C., Lew, D., and Lacroix, J.S. (2005) Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis. *J Infect Dis* **192**: 1023-1028.

Clements, M.O., and Foster, S.J. (1999) Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* **7**: 458-462.

Clewell, D.B., Francia, M.V., Flannagan, S.E., and An, F.Y. (2002) Enterococcal plasmid transfer: sex pheromones, transfer origins, relaxases, and the *Staphylococcus aureus* issue. *Plasmid* **48**: 193-201.

Coignard, B., Poujol I., Carbonne, A., Bernet, C., Sénéchal, H., Dumartin, C., Raclot, I., Lepoutre, A., Thiolet, JM., Bouraoul, L., Desenclos JC. (2006) Le signalement des infections nosocomiales, France, 2001-2005. BEH n°51-52: 4-8.

Coulter, S.N., Schwan, W.R., Ng, E.Y., Langhorne, M.H., Ritchie, H.D., Westbrock-Wadman, S., Hufnagle, W.O., Folger, K.R., Bayer, A.S., and Stover, C.K. (1998) *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. *Mol Microbiol* **30**: 393-404.

Cundell, D.R., Pearce, B.J., Sandros, J., Naughton, A.M., and Masure, H.R. (1995) Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. *Infect Immun* **63**: 2493-2498.

Davidson, A.L., and Chen, J. (2004) ATP-binding cassette transporters in bacteria. *Annu Rev Biochem* **73**: 241-268.

Delmas, G., Gallay, A., Espié, E., Haegbaert, S., Pihier, N., Weill, FX., De Valk, H., Vaillant V., Desenclos, JC. (2006) Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. BEH n°51-52: 16-20.

den Hengst, C.D., Curley, P., Larsen, R., Buist, G., Nauta, A., van Sinderen, D., Kuipers, O.P., and Kok, J. (2005a) Probing direct interactions between CodY and the *oppD* promoter of Lactococcus lactis. *J Bacteriol* **187**: 512-521.

den Hengst, C.D., van Hijum, S.A., Geurts, J.M., Nauta, A., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2005b) The *Lactococcus lactis* CodY regulon: identification of a conserved cis-regulatory element. *J Biol Chem* **280**: 34332-34342.

Detmers, F.J., Kunji, E.R., Lanfermeijer, F.C., Poolman, B., and Konings, W.N. (1998) Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* **37**: 16671-16679.

Detmers, F.J., Lanfermeijer, F.C., and Poolman, B. (2001) Peptides and ATP binding cassette peptide transporters. *Res Microbiol* **152**: 245-258.

Diep, B.A., Gill, S.R., Chang, R.F., Phan, T.H., Chen, J.H., Davidson, M.G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H.A., Mongodin, E.F., Sensabaugh, G.F., and Perdreau-Remington, F. (2006) Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **367**: 731-739.

Dineen, S.S., Villapakkam, A.C., Nordman, J.T., and Sonenshein, A.L. (2007) Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY. *Mol Microbiol* **66**: 206-219.

Dinges, M.M., Orwin, P.M., and Schlievert, P.M. (2000) Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* **13**: 16-34, table of contents.

Doeven, M.K., Abele, R., Tampe, R., and Poolman, B. (2004) The binding specificity of OppA determines the selectivity of the oligopeptide ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem* **279**: 32301-32307.

Drew, R.H. (2007) Emerging options for treatment of invasive, multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Pharmacotherapy* **27**: 227-249.

Driessen, A.J., de Jong, S., and Konings, W.N. (1987) Transport of branched-chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. *J Bacteriol* **169**: 5193-5200.

Dunny, G.M., and Leonard, B.A. (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **51**: 527-564.

Fixen, K.R., Chandler, J.R., Le, T., Kozlowicz, B.K., Manias, D.A., and Dunny, G.M. (2007) Analysis of the amino acid sequence specificity determinants of the enterococcal cCF10 sex pheromone in interactions with the pheromone-sensing machinery. *J Bacteriol* **189**: 1399-1406.

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

Garzoni, C., Francois, P., Huyghe, A., Couzinet, S., Tapparel, C., Charbonnier, Y., Renzoni, A., Lucchini, S., Lew, D.P., Vaudaux, P., Kelley, W.L., and Schrenzel, J. (2007) A global view of *Staphylococcus aureus* whole genome expression upon internalization in human epithelial cells. *BMC Genomics* **8**: 171.

Gibson, M.M., Price, M., and Higgins, C.F. (1984) Genetic characterization and molecular cloning of the tripeptide permease (tpp) genes of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **160**: 122-130.

Gilson, E., Alloing, G., Schmidt, T., Claverys, J.P., Dudler, R., and Hofnung, M. (1988) Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*. *Embo J* **7**: 3971-3974.

Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M., and Lereclus, D. (2001) Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis plcR* regulon and for virulence. *Mol Microbiol* **40**: 963-975.

Gonzalez, J.E., and Keshavan, N.D. (2006) Messing with bacterial *quorum sensing*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 859-875.

Goodell, E.W., and Higgins, C.F. (1987) Uptake of cell wall peptides by *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**: 3861-3865.

Green, R.M., Seth, A., and Connell, N.D. (2000) A peptide permease mutant of *Mycobacterium bovis* BCG resistant to the toxic peptides glutathione and S-nitrosoglutathione. *Infect Immun* **68**: 429-436.

Grill, A.K., and Domb, S. (2004) Case report: *Staphylococcus aureus* bacteriuria. Important indicator of coexistent bacteremia? *Can Fam Physician* **50**: 879-880.

Guedon, E., Renault, P., Ehrlich, S.D., and Delorme, C. (2001a) Transcriptional pattern of genes coding for the proteolytic system of *Lactococcus lactis* and evidence for coordinated regulation of key enzymes by peptide supply. *J Bacteriol* **183**: 3614-3622.

Guedon, E., Serror, P., Ehrlich, S.D., Renault, P., and Delorme, C. (2001b) Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **40**: 1227-1239.

Guedon, E., Sperandio, B., Pons, N., Ehrlich, S.D., and Renault, P. (2005) Overall control of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis* by CodY, and possible models for CodY regulation in Firmicutes. *Microbiology* **151**: 3895-3909.

Hagting, A., Knol, J., Hasemeier, B., Streutker, M.R., Fang, G., Poolman, B., and Konings, W.N. (1997) Amplified expression, purification and functional reconstitution of the dipeptide and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. *Eur J Biochem* **247**: 581-587.

Hagting, A., Kunji, E.R., Leenhouts, K.J., Poolman, B., and Konings, W.N. (1994) The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J Biol Chem* **269**: 11391-11399.

Harraghy, N., Kerdudou, S., and Herrmann, M. (2007) *Quorum-sensing* systems in staphylococci as therapeutic targets. *Anal Bioanal Chem* **387**: 437-444.

Henke, J.M., and Bassler, B.L. (2004) Bacterial social engagements. *Trends Cell Biol* **14**: 648-656.

Herron, L.L., Chakravarty, R., Dwan, C., Fitzgerald, J.R., Musser, J.M., Retzel, E., and Kapur, V. (2002) Genome sequence survey identifies unique sequences and key virulence genes with unusual rates of amino Acid substitution in bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **70**: 3978-3981.

Hiles, I.D., and Higgins, C.F. (1986) Peptide uptake by *Salmonella typhimurium*. The periplasmic oligopeptide-binding protein. *Eur J Biochem* **158**: 561-567.

Hiron, A., Borezee-Durant, E., Piard, J.C., and Juillard, V. (2007) Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **189**: 5119-5129.

Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabbinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G., and Parkhill, J. (2004) Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 9786-9791.

Holland, I.B., Blight, M.A., and Kenny, B. (1990) The mechanism of secretion of hemolysin and other polypeptides from gram-negative bacteria. *J Bioenerg Biomembr* **22**: 473-491.

Hooper, D.C. (2002) Fluoroquinolone resistance among Gram-positive cocci. *Lancet Infect Dis* **2**: 530-538.

Hortet, P., and Seegers, H. (1998) Loss in milk yield and related composition changes resulting from clinical mastitis in dairy cows. *Prev Vet Med* **37**: 1-20.

Hung, L.W., Wang, I.X., Nikaido, K., Liu, P.Q., Ames, G.F., and Kim, S.H. (1998) Crystal structure of the ATP-binding subunit of an ABC transporter. *Nature* **396**: 703-707.

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

Janakiraman, A., and Slauch, J.M. (2000) The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **35**: 1146-1155.

Jenkinson, H.F., Baker, R.A., and Tannock, G.W. (1996) A binding-lipoprotein-dependent oligopeptide transport system in *Streptococcus gordonii* essential for uptake of hexa- and heptapeptides. *J Bacteriol* **178**: 68-77.

Jeong, J., Suh, S., Guan, C., Tsay, Y.F., Moran, N., Oh, C.J., An, C.S., Demchenko, K.N., Pawlowski, K., and Lee, Y. (2004) A nodule-specific dicarboxylate transporter from alder is a member of the peptide transporter family. *Plant Physiol* **134**: 969-978.

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

Juillard, V., Guillot, A., Le Bars, D., and Gripon, J.C. (1998) Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1230-1236.

Juillard, V., Le Bars, D., Kunji, E.R., Konings, W.N., Gripon, J.C., and Richard, J. (1995a) Oligopeptides are the main source of nitrogen for *Lactococcus lactis* during growth in milk. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3024-3030.

Juillard, V., Laan, H., Kunji, E.R., Jeronimus-Stratingh, C.M., Bruins, A.P., and Konings, W.N. (1995b) The extracellular PI-type proteinase of *Lactococcus lactis* hydrolyzes beta-casein into more than one hundred different oligopeptides. *J Bacteriol* **177**: 3472-3478.

Karlsson, A., Saravia-Otten, P., Tegmark, K., Morfeldt, E., and Arvidson, S. (2001) Decreased amounts of cell wall-associated protein A and fibronectin-binding proteins in *Staphylococcus aureus* sarA mutants due to up-regulation of extracellular proteases. *Infect Immun* **69**: 4742-4748.

Kerr, A.R., Adrian, P.V., Estevao, S., de Groot, R., Alloing, G., Claverys, J.P., Mitchell, T.J., and Hermans, P.W. (2004) The Ami-AliA/AliB permease of *Streptococcus pneumoniae* is involved in nasopharyngeal colonization but not in invasive disease. *Infect Immun* **72**: 3902-3906.

Koide, A., and Hoch, J.A. (1994) Identification of a second oligopeptide transport system in *Bacillus subtilis* and determination of its role in sporulation. *Mol Microbiol* **13**: 417-426.

Koide, A., Perego, M., and Hoch, J.A. (1999) ScoC regulates peptide transport and sporulation initiation in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **181**: 4114-4117.

Kozlowicz, B.K., Shi, K., Gu, Z.Y., Ohlendorf, D.H., Earhart, C.A., and Dunny, G.M. (2006) Molecular basis for control of conjugation by bacterial pheromone and inhibitor peptides. *Mol Microbiol* **62**: 958-969.

Kunji, E.R., Hagting, A., De Vries, C.J., Juillard, V., Haandrikman, A.J., Poolman, B., and Konings, W.N. (1995) Transport of beta-casein-derived peptides by the oligopeptide transport system is a crucial step in the proteolytic pathway of *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* **270**: 1569-1574.

Lamarque, M., Charbonnel, P., Aubel, D., Piard, J.C., Atlan, D., and Juillard, V. (2004) A multifunction ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus *Lactococcus*. *J Bacteriol* **186**: 6492-6500.

Lamarque, M., Aubel, D., Piard, JC., Gilbert C., Juillard, V., and Atlan, D. Revisiting the respective roles of the three *Lactococcus lactis* peptide transport systems in nutrition and signalling. Soumis.

Lanfermeijer, F.C., Detmers, F.J., Konings, W.N., and Poolman, B. (2000) On the binding mechanism of the peptide receptor of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Embo J* **19**: 3649-3656.

Lazazzera, B.A. (2001) The intracellular function of extracellular signaling peptides. *Peptides* **22**: 1519-1527.

Lazazzera, B.A., Kurtser, I.G., McQuade, R.S., and Grossman, A.D. (1999) An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in Bacillus subtilis. *J Bacteriol* **181**: 5193-5200.

Lazazzera, B.A., Solomon, J.M., and Grossman, A.D. (1997) An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell* **89**: 917-925.

Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M. (2003) *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res* **2**: 63-76.

Leonard, B.A., Podbielski, A., Hedberg, P.J., and Dunny, G.M. (1996) *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 260-264.

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., Nardi, M., Garault, P., Monnet, V., and Juillard, V. (2002) Casein utilization by *Streptococcus thermophilus* results in a diauxic growth in milk. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3162-3165.

Levdikov, V.M., Blagova, E.V., Brannigan, J.A., Wright, L., Vagin, A.A., and Wilkinson, A.J. (2005) The structure of the oligopeptide-binding protein, AppA, from *Bacillus subtilis* in complex with a nonapeptide. *J Mol Biol* **345**: 879-892.

Lin, C.M., Koh, S., Stacey, G., Yu, S.M., Lin, T.Y., and Tsay, Y.F. (2000) Cloning and functional characterization of a constitutively expressed nitrate transporter gene, OsNRT1, from rice. *Plant Physiol* **122**: 379-388.

Lin, B., Short, S.A., Eskildsen, M., Klempner, M.S., and Hu, L.T. (2001) Functional testing of putative oligopeptide permease (Opp) proteins of *Borrelia burgdorferi*: a complementation model in *opp(-) Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **1499**: 222-231.

Liu, C.E., Liu, P.Q., Wolf, A., Lin, E., and Ames, G.F. (1999) Both lobes of the soluble receptor of the periplasmic histidine permease, an ABC transporter (traffic ATPase), interact with the membrane-bound complex. Effect of different ligands and consequences for the mechanism of action. *J Biol Chem* **274**: 739-747.

Locher, K.P., Lee, A.T., and Rees, D.C. (2002) The *E. coli* BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* **296**: 1091-1098.

Magnuson, R., Solomon, J., and Grossman, A.D. (1994) Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from B. subtilis. *Cell* **77**: 207-216.

Massimi, I., Park, E., Rice, K., Muller-Esterl, W., Sauder, D., and McGavin, M.J. (2002) Identification of a novel maturation mechanism and restricted substrate specificity for the SspB cysteine protease of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **277**: 41770-41777.

Mathiopoulos, C., Mueller, J.P., Slack, F.J., Murphy, C.G., Patankar, S., Bukusoglu, G., and Sonenshein, A.L. (1991) A *Bacillus subtilis* dipeptide transport system expressed early during sporulation. *Mol Microbiol* **5**: 1903-1913.

McAleese, F.M., Walsh, E.J., Sieprawska, M., Potempa, J., and Foster, T.J. (2001) Loss of clumping factor B fibrinogen binding activity by *Staphylococcus aureus* involves cessation of transcription, shedding and cleavage by metalloprotease. *J Biol Chem* **276**: 29969-29978.

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

McNab, R., and Jenkinson, H.F. (1998) Altered adherence properties of a *Streptococcus gordonii* hppA (oligopeptide permease) mutant result from transcriptional effects on *cshA* adhesin gene expression. *Microbiology* **144 (Pt 1)**: 127-136.

Medrano, M.S., Ding, Y., Wang, X.G., Lu, P., Coburn, J., and Hu, L.T. (2007) Regulators of expression of the oligopeptide permease A proteins of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* **189**: 2653-2659.

Mei, J.M., Nourbakhsh, F., Ford, C.W., and Holden, D.W. (1997) Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. *Mol Microbiol* **26**: 399-407.

Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001) *Quorum sensing* in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 165-199.

Monnet, V. (2003) Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2100-2114.

Mori, M., Sakagami, Y., Ishii, Y., Isogai, A., Kitada, C., Fujino, M., Adsit, J.C., Dunny, G.M., and 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.

Mourez, M., Jéhanno, M., Hofnung, M., and Dassa, E. (2000) Rôle, fonctionnement et structure des transporteurs à ATP binding cassette (ABC). *Médecine/sciences* **16** : 386-394

Mueller, J.P., Bukusoglu, G., and Sonenshein, A.L. (1992) Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* glucose starvation-inducible genes: control of gsiA by the ComP-ComA signal transduction system. *J Bacteriol* **174**: 4361-4373.

Nakajima, H., Hagting, A., Kunji, E.R., Poolman, B., and Konings, W.N. (1997) Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the di- and tripeptide transport protein of *Lactobacillus helveticus*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 2213-2217.

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

Neu, H.C., and Heppel, L.A. (1965) The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J Biol Chem* **240**: 3685-3692.

Nizet, V. (2007) Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol* **120**: 13-22.

Nodwell, J.R., and Losick, R. (1998) Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **180**: 1334-1337.

Nodwell, J.R., McGovern, K., and Losick, R. (1996) An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **22**: 881-893.

Novick, R.P. (2003) Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1429-1449.

Ohlsen, K.L., Grimsley, J.K., and Hoch, J.A. (1994) Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 1756-1760.

Oscarsson, J., Tegmark-Wisell, K., and Arvidson, S. (2006) Coordinated and differential control of aureolysin (*aur*) and serine protease (*sspA*) transcription in *Staphylococcus aureus* by sarA, rot and agr (RNAIII). *Int J Med Microbiol* **296**: 365-380.

Otto, M., Sussmuth, R., Jung, G., and Gotz, F. (1998) Structure of the pheromone peptide of the *Staphylococcus epidermidis* agr system. *FEBS Lett* **424**: 89-94.

Park, J.T., Raychaudhuri, D., Li, H., Normark, S., and Mengin-Lecreulx, D. (1998) MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate. *J Bacteriol* **180**: 1215-1223.

Pearce, B.J., Naughton, A.M., and Masure, H.R. (1994) Peptide permeases modulate transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **12**: 881-892.

Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., and Schlievert, P. (1988) Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **170**: 4365-4372.

Perego, M. (1997) A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8612-8617.

Perego, M., and Hoch, J.A. (1996) Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 1549-1553.

Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K.M., Djavakhishvili, T., Glaser, P., and Hoch, J.A. (1994) Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *B. subtilis*. *Cell* **79**: 1047-1055.

Perego, M., Higgins, C.F., Pearce, S.R., Gallagher, M.P., and Hoch, J.A. (1991) The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol Microbiol* **5**: 173-185.

Picon, A., and van Wely, K. H. M. (2001). Peptide binding to the *Bacillus subtilis* oligopeptide-binding proteins OppA and AppA. *Mol. Biol. Today*, **2**, 21-25.

Picon, A., Kunji, E.R., Lanfermeijer, F.C., Konings, W.N., and Poolman, B. (2000) Specificity mutants of the binding protein of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **182**: 1600-1608.

Pittard, J., Camakaris, H., and Yang, J. (2005) The TyrR regulon. *Mol Microbiol* **55**: 16-26.

Podbielski, A., and Leonard, B.A. (1998) The group A streptococcal dipeptide permease (Dpp) is involved in the uptake of essential amino acids and affects the expression of cysteine protease. *Mol Microbiol* **28**: 1323-1334.

Podbielski, A., Pohl, B., Woischnik, M., Korner, C., Schmidt, K.H., Rozdzinski, E., and Leonard, B.A. (1996) Molecular characterization of group A streptococcal (GAS) oligopeptide permease (opp) and its effect on cysteine protease production. *Mol Microbiol* **21**: 1087-1099.

Popowicz, G.M., Dubin, G., Stec-Niemczyk, J., Czarny, A., Dubin, A., Potempa, J., and Holak, T.A. (2006) Functional and structural characterization of Spl proteases from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol* **358**: 270-279.

Potempa, J., Dubin, A., Korzus, G., and Travis, J. (1988) Degradation of elastin by a cysteine proteinase from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **263**: 2664-2667.

Prescott, Harley & Klein (1995), Microbiologie. Ed. By De Boeck Université (traduction française). p 454.

Projan, S.J., Nesin, M., and Dunman, P.M. (2006) Staphylococcal vaccines and immunotherapy: to dream the impossible dream? *Curr Opin Pharmacol* **6**: 473-479.

Prossnitz, E., Nikaido, K., Ulbrich, S.J., and Ames, G.F. (1988) Formaldehyde and photoactivatable cross-linking of the periplasmic binding protein to a membrane component of the histidine transport system of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **263**: 17917-17920.

Rasko, D.A., Altherr, M.R., Han, C.S., and Ravel, J. (2005) Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 303-329.

Reed, S.B., Wesson, C.A., Liou, L.E., Trumble, W.R., Schlievert, P.M., Bohach, G.A., and Bayles, K.W. (2001) Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* serine protease operon. *Infect Immun* **69**: 1521-1527.

Reynolds, E., Ross, J.I., and Cove, J.H. (2003) Msr(A) and related macrolide/streptogramin resistance determinants: incomplete transporters? *Int J Antimicrob Agents* **22**: 228-236.

Rice, K., Peralta, R., Bast, D., de Azavedo, J., and McGavin, M.J. (2001) Description of staphylococcus serine protease (*ssp*) operon in *Staphylococcus aureus* and nonpolar inactivation of sspA-encoded serine protease. *Infect Immun* **69**: 159-169.

Richardson, A.R., Dunman, P.M., and Fang, F.C. (2006) The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. *Mol Microbiol* **61**: 927-939.

Rigoulay, C., Entenza, J.M., Halpern, D., Widmer, E., Moreillon, P., Poquet, I., and Gruss, A. (2005) Comparative analysis of the roles of HtrA-like surface proteases in two virulent *Staphylococcus aureus* strains. *Infect Immun* **73**: 563-572.

Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.L., and et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066-1073.

Roggiani, M., and Dubnau, D. (1993) ComA, a phosphorylated response regulator protein of *Bacillus subtilis*, binds to the promoter region of srfA. *J Bacteriol* **175**: 3182-3187.

Rudin, L., Sjostrom, J.E., Lindberg, M., and Philipson, L. (1974) Factors affecting competence for transformation in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **118**: 155-164.

Rudner, D.Z., LeDeaux, J.R., Ireton, K., and Grossman, A.D. (1991) The spo0K locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. *J Bacteriol* **173**: 1388-1398.

Sack, J.S., Saper, M.A., and Quiocho, F.A. (1989) Periplasmic binding protein structure and function. Refined X-ray structures of the leucine/isoleucine/valine-binding protein and its complex with leucine. *J Mol Biol* **206**: 171-191.

Samen, U., Gottschalk, B., Eikmanns, B.J., and Reinscheid, D.J. (2004) Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* **186**: 1398-1408.

Saurin, W., Koster, W., and Dassa, E. (1994) Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Mol Microbiol* **12**: 993-1004.

Schinkel, A.H. (1997) The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins. *Semin Cancer Biol* **8**: 161-170.

Schmees, G., Stein, A., Hunke, S., Landmesser, H., and Schneider, E. (1999) Functional consequences of mutations in the conserved 'signature sequence' of the ATP-binding-cassette protein MalK. *Eur J Biochem* **266**: 420-430.

Seegers, H., Fourichon, C., and Beaudeau, F. (2003) Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res* **34**: 475-491.

Sevigny, G., Beaudet, R., McSween, G., Morosoli, R., and Bisaillon, J.G. (1992) Detection and purification of a potential precursor protein or a prohaemolysin produced by *Staphylococcus haemolyticus*. *Microbios* **71**: 203-215.

Sharer, M.V., Su, C., Hegde, N.V., Jayarao, B.M., and Sordillo, L.M. (2003) Differential expression of the lactose transporter gene affects growth of *Staphylococcus aureus* in milk. *J Dairy Sci* **86**: 2373-2381.

Shaw, L., Golonka, E., Potempa, J., and Foster, S.J. (2004) The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **150**: 217-228.

Shi, K., Brown, C.K., Gu, Z.Y., Kozlowicz, 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 U S A* **102**: 18596-18601.

Shivers, R.P., Dineen, S.S., and Sonenshein, A.L. (2006) Positive regulation of *Bacillus subtilis ackA* by CodY and CcpA: establishing a potential hierarchy in carbon flow. *Mol Microbiol* **62**: 811-822.

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.

Slamti, L., and Lereclus, D. (2005) Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR *quorum-sensing* system in the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **187**: 1182-1187.

Solomon, J.M., and Grossman, A.D. (1996) Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria. *Trends Genet* **12**: 150-155.

Solomon, J.M., Lazazzera, B.A., and Grossman, A.D. (1996) Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **10**: 2014-2024.

Sonenshein, A.L. (2005) CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* **8**: 203-207.

Steiner, H.Y., Naider, F., and Becker, J.M. (1995) The PTR family: a new group of peptide transporters. *Mol Microbiol* **16**: 825-834.

Stephenson, S., Mueller, C., Jiang, M., and Perego, M. (2003) Molecular analysis of Phr peptide processing in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**: 4861-4871.

Stragier, P., and Losick, R. (1990) Cascades of sigma factors revisited. *Mol Microbiol* **4**: 1801-1806.

Sutcliffe, I.C., and Russell, R.R. (1995) Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **177**: 1123-1128.

Takami, H., Nakasone, K., Takaki, Y., Maeno, G., Sasaki, R., Masui, N., Fuji, F., Hirama, C., Nakamura, Y., Ogasawara, N., Kuhara, S., and Horikoshi, K. (2000) Complete genome sequence of the alkaliphilic bacterium *Bacillus halodurans* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* **28**: 4317-4331.

Tam, R., and Saier, M.H., Jr. (1993) Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. *Microbiol Rev* **57**: 320-346.

Tame, J.R., Dodson, E.J., Murshudov, G., Higgins, C.F., and Wilkinson, A.J. (1995) The crystal structures of the oligopeptide-binding protein OppA complexed with tripeptide and tetrapeptide ligands. *Structure* **3**: 1395-1406.

Tame, J.R., Murshudov, G.N., Dodson, E.J., Neil, T.K., Dodson, G.G., Higgins, C.F., and Wilkinson, A.J. (1994) The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. *Science* **264**: 1578-1581.

Taylor, D., and Holland, K.T. (1989) Amino acid requirements for the growth and production of some exocellular products of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol* **66**: 319-329.

Tenover, F.C. (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med* **119**: S3-10; discussion S62-70.

Tu Quoc, P.H., Genevaux, P., Pajunen, M., Savilahti, H., Georgopoulos, C., Schrenzel, J., and Kelley, W.L. (2007) Isolation and characterization of biofilm formation-defective mutants of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **75**: 1079-1088.

Tynkkynen, S., Buist, G., Kunji, E., Kok, J., Poolman, B., Venema, G., and Haandrikman, A. (1993) Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **175**: 7523-7532.

van der Heide, T., and Poolman, B. (2002) ABC transporters: one, two or four extracytoplasmic substrate-binding sites? *EMBO Rep* **3**: 938-943.

Varella Coelho, M.L., Santos Nascimento, J.D., Fagundes, P.C., Madureira, D.J., Oliveira, S.S., Vasconcelos de Paiva Brito, M.A., and Freire Bastos Mdo, C. (2007) Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Res Microbiol* **158**: 625-630.

Verheul, A., Hagting, A., Amezaga, M.R., Booth, I.R., Rombouts, F.M., and Abee, T. (1995) A di- and tripeptide transport system can supply *Listeria monocytogenes* Scott A with amino acids essential for growth. *Appl Environ Microbiol* **61**: 226-233.

Verheul, A., Rombouts, F.M., and Abee, T. (1998) Utilization of oligopeptides by *Listeria monocytogenes* Scott A. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1059-1065.

Waldron, D.E., and Lindsay, J.A. (2006) Sau1: a novel lineage-specific type I restriction-modification system that blocks horizontal gene transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *J Bacteriol* **188**: 5578-5585.

Wang, C.H., Lin, C.Y., Luo, Y.H., Tsai, P.J., Lin, Y.S., Lin, M.T., Chuang, W.J., Liu, C.C., and Wu, J.J. (2005) Effects of oligopeptide permease in group A streptococcal infection. *Infect Immun* **73**: 2881-2890.

Wang, X.G., Lin, B., Kidder, J.M., Telford, S., and Hu, L.T. (2002) Effects of environmental changes on expression of the oligopeptide permease (*opp*) genes of *Borrelia burgdorferi*. *J Bacteriol* **184**: 6198-6206.

Watson, D.C., Yaguchi, M., Bisaillon, J.G., Beaudet, R., and Morosoli, R. (1988) The amino acid sequence of a gonococcal growth inhibitor from *Staphylococcus haemolyticus*. *Biochem J* **252**: 87-93.

Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H.A., and Nouwen, J.L. (2005) The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis* **5**: 751-762.

Wouters, J.A., Hain, T., Darji, A., Hufner, E., Wemekamp-Kamphuis, H., Chakraborty, T., and Abee, T. (2005) Identification and characterization of Di- and tripeptide transporter DtpT of *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5771-5778.

Yeung, A.K., Basu, S.K., Wu, S.K., Chu, C., Okamoto, C.T., Hamm-Alvarez, S.F., von Grafenstein, H., Shen, W.C., Kim, K.J., Bolger, M.B., Haworth, I.S., Ann, D.K., and Lee, V.H. (1998) Molecular identification of a role for tyrosine 167 in the function of the human intestinal proton- coupled dipeptide transporter (hPepT1). *Biochem Biophys Res Commun* **250**: 103-107.

ANNEXES

ANNEXE I : Liste des gènes figurant dans la banque des petits gènes de *S. aureus* NCTC8325.

N°	Séquence	Localisation	*P*	n	MW (Da)	pI	GRAVY
1	RLKIEIHDASNQIS	1-45	0,10323	14	1623,8	6,75	-0,579
2	MNQYPRLIIRYKN	14441-14485	0,149422	14	1822,2	10,28	-0,650
3	MFDFYLHYGLDIGRISNG	22362-22418	0,12962	18	2118,3	5,19	0,072
4	MLASVSIRLFR	23801-23836	0,90491	11	1292,6	12,00	1,109
5	MKDKRRQ	24460-24483	0,120581	7	961,1	11,00	-3,129
6	MSRGRNE	25625-25648	0,320749	7	848,9	9,35	-2,186
7	MNRNKLALQAHHM	29589-29630	0,387398	13	1563,8	11,00	-0,792
8	VRSGASFFAGTVYYG	29627-29674	0,303753	15	1581,7	8,56	0,467
9	MADVFASPTCAFIHILSRTAL	29667-29732	0,110056	21	2264,6	6,49	1,057
10	LEGVKWWTLNPRSFNI	34203-34253	0,413089	16	1960,2	8,75	-,0319
11	MVDIKSTFIQYIRYITIIAHIT	34217-34285	0,273848	22	2640,1	8,27	0,823
12	LSTRGLNIWQEMEIGNVSHKVAKRAQIPLIIFK	42281-42382	0,416141	33	3791,5	10,28	0,003
13	MQPFEREV	43764-43790	0,110582	8	1035,1	4,53	-0,963
14	VGAERTKPIDKWSLVKEE	44536-44592	0,362487	18	2085,3	6,32	-0,984
15	MAQSEYEINPGKRE	56235-56279	0,170537	14	1651,8	5,01	-1,557
16	LRCSKNLDIYMERTIYNVKVMAIRFNEGDV	63955-64047	0,150887	30	3592,2	8,16	-0,190
17	MMSPKANMHSSNHQMNQSNKKVLPAAGESMTSSILTASIAALL LVSGLFLAFRRRSTNK	100999-101178	0,999998	59	6376,4	11,74	-0,100
18	MEKLVTSAISFSQLLPI	101262-101315	0,75329	17	1877,2	5,75	0,912
19	MRVGAGPQQREIGFPISTDNASWGGTAK	115385-115471	0,224858	28	2939,2	8,50	-0,579
20	MSSDTNSLAHTKWNCK	115604-115654	0,649494	16	1823,0	7,98	-1,012
21	MILGYND	138866-138889	0,107191	7	824,9	4,30	0,214
22	MQHKYKTKRAPMT	140391-140432	0,332189	13	1619,9	10,46	-1,662
23	MYIGLAWISIAVN	141341-141382	0,53376	13	1450,7	5,27	1,546
24	MNFLF	145382-145399	0,454661	5	670,8	5,28	1,560
25	VLFANFALNLTIIQGGGMSNGAVFLSYF	145788-145874	0,255034	28	2965,4	5,49	1,139
26	MQDAL	147205-147222	0,278727	5	576,6	3,80	0,100
27	MASFKIMTRLK	156980-157015	0,628227	11	1325,6	11,17	0,264
28	MFSSIYLESRL	164121-164156	0,295799	11	1345,5	5,75	0,464
29	MILKFKI	166541-166564	0,252439	7	892,2	10,00	1,386
30	MAKHLKLDMVPSPNLAQYS	180255-180314	0,18547	19	2143,5	8,28	-0,242
31	VKSTKGSEAYGTT	183407-183448	0,325071	13	1328,4	8,47	-0,854
32	LKPVEVEAG	214159-214188	0,177647	9	941	4,53	0,122
33	MVDFG	214227-214244	0,102357	5	567,6	3,80	1,000
34	MKLNQRYVKVFALYFVSIVTANIIVKNNNLIKTLIQTIAGYTVFA VGLKYLTKRKNK	226421-226594	0,977213	57	6564,9	10,47	0,319
35	MATMYEVRSDIVAFIFNVTFEALSSSCTVVSPQIASARQSS	229459-229584	0,700132	41	4445,0	4,68	0,502
36	MKERINMVESMLTFMLGPLRQITDFYMEHLLVSNSIVIAGYFAT GIFKKKKVVN	238168-238332	0,998992	54	6254,5	9,60	0,319
37	MAGPQHKEFRKEILQVMQVGGAQHREIRKEILQVMQVGEGQK	258535-258663	0,735994	42	4843,6	9,52	-0,740
38	MDDYYHALALNREHGRTISC	267461-267523	0,742812	20	2365,6	5,96	-0,690
39	MDEFMVVPIGK	298989-299024	0,19222	11	1265,5	4,37	0,600
40	MITIKKRDDHH	312469-312504	0,131103	11	1393,6	8,38	-1,409
41	VFGEG	323208-323225	0,283984	5	507,5	4,00	0,540
42	VPVFFVAILEIFGIAV	341666-341716	0,493535	16	1734,1	4,00	2,538
43	MIVFEIIFRAGDKSLRLSSVLFGVE	345843-345920	0,138767	25	2827,3	6,06	0,920
44	MVKPAVNSDAMIDRI	347519-347566	0,515971	15	1659,9	5,71	0,233
45	VKPFTFPIAQTNYIIV	347675-347725	0,50087	16	1851,2	8,56	0,781
46	MVQFQIANDMRIGELLAIKRVNINYEDKTLDIDGKVNWITEKRR EHSE	363376-363522	0,991678	48	5731,5	5,74	-0,694
47	MLILHGSFIKGVRTKVTHDD	365247-365309	0,560542	20	2267,6	8,39	0,050
48	MVPEEKGSITLSKEAAIIFAIAKFKPFKNRIKNNPQKTNPFLKLHE NKKS	385923-386075	1,0	50	5725,7	10,17	-0,678
49	MFEMSWFLDLYSYERGRCPL	385825-385887	0,151903	20	2543,9	4,68	-0,165
50	MRTSVLIGIT	386186-386218	0,180482	10	1093,3	9,50	1,180
51	MKRIDE	393771-393791	0,915573	6	790,9	6,00	-1,500
52	MIKFLEKRLILIVARCPFRDMKQCGKHN	394915-395001	0,582557	28	3389,2	10,06	-0,107
53	MLVVEILPLWRLG	399233-399274	0,156384	13	1538,9	5,75	1,469
54	MMNDEDGV	406273-406299	0,607979	8	909,9	3,49	-0,800
55	MAKPSYQLLIEGTIIV	412131-412181	0,679989	17	1913,3	6,50	0,594
56	MSEVNAAINVLLTLTVTRVFQSKRATQFRTWPIYLALDHENH	412193-412321	0,767987	42	4885,6	8,38	-0,029
57	MGIIAGIIKFIKGLIEKFTGK	412829-412894	0,999977	21	2277,8	10,00	0,890
58	MGIIAGIIKVIKSLIEQFTGK	412926-412991	0,999989	21	2259,8	9,70	0,957
59	MAIVGTIIKIIKAIIDIFAK	412583-412645	0,999675	20	2171,8	9,70	1,700
60	MEFVAKLFKFFKDLLGKFLGNN	412709-412777	0,998621	22	2607,1	9,52	0,305

61	MGIAPEVVMWRDVGDIDGVVCGEILAHVYSVEPENLM	420544-420657	0,997913	37	4044,6	3,95	0,508
62	MNTNSEKDWSNIEHEVHSTNPFSYTKIPITTITTLIAPP	428689-428808	0,475686	39	4428,9	5,35	-0,562
63	MIIDNQMPTEDICKYI	444632-444682	0,761387	16	1927,2	4,03	-0,044
64	VINQAHSNSVIIINEYGLDKSETMHVSGFNCV	459344-459442	0,107754	32	3519,9	5,27	0,103
65	MSVLKNKKVD	491933-491965	0,613533	10	1161,4	9,70	-0,540
66	LTVKQGSWLIDENDDTYIE	491695-491754	0,539831	19	2239,4	3,97	-0,653
67	LKSALGRELNYNVLLTDGLTFVINFMYSILVL	517416-517514	0,272739	32	3631,3	6,07	0,906
68	MAKKESFFKGVKSEMEKTSWPTKEELFKYTVIVVSTVIFFLVFFY ALDLGITALKNLLFG	517733-517915	0,999996	60	6932,2	9,05	0,470
69	VRKIPLNCEACGNRNYNVPKQEGSATRLTLKKYCPKCNAHTIHK ESK	517534-517677	0,756139	47	5343,2	9,64	-0,987
70	MSKTQQFYLNSIISYKFY	534634-534690	0,157465	18	2261,6	9,40	-0,278
71	LIYELTVNKLNIKKSPRQYLPWE	537337-537408	0,140592	23	2846,3	9,40	-0,587
72	MQKLIMTKIPFNEAKHGNKLSLQCLLLSIEGDFTYYYI	542889-543005	0,161239	38	4465,3	7,89	0,050
73	LIAMFN	561604-561624	0,104749	6	707,8	5,52	1,883
74	MIIYRQYHHEGAPVYEIITKTFQHVSIKCDDSFSDTEIFKLLSLLQ DDIDHMKVS	569402-569569	0,999653	55	6500,4	5,30	-0,202
75	MVNPYLIFKKQQ	572102-572140	0,139523	12	1508,8	9,70	-0,333
76	VMIYCLKVDALTVRLHN	584907-584960	0,109792	17	1988,4	8,18	0,829
77	MIEIGSIAYLNGGSKKYNHILNQENR	591911-591991	0,844922	26	2963,3	8,21	-0,619
78	LINLGSIGYLNVGS	589647-589691	0,759075	14	1419,6	5,52	0,964
79	MILNRGAILEQGNKTAKVIKSELITNYIMLATLQIKNN	589698-589814	0,266357	38	4259,0	9,82	0,074
80	LYDSSYNIGVFNPIVWTVLAGFVAESV	592084-592167	0,446087	27	2961,3	3,67	0,0881
81	MIEMHVSI	636180-636206	0,214218	8	959,1	5,22	1,118
82	MDIDVNKLLQAFVYFKSFEKLRHNNS	638044-638124	0,303599	26	3157,6	8,21	-0,400
83	MYSMEHNQLGH	659091-659126	0,798647	11	1346,5	5,94	-1,073
84	LVANAPTAKEPLINKLKGDKGIQLVANAPTA	668104-668199	0,484171	31	3156,7	9,53	-0,006
85	MFFGNCNLVILSLTVPNSHMM	669971-670036	0,123184	21	2368,8	6,49	0,957
86	MKGTAF	671793-671813	0,112751	6	653,7	8,50	0,250
87	MPLTNS	702222-702242	0,117992	6	661,7	5,28	-0,150
88	MIKND	721248-721265	0,262711	5	619,7	5,84	-0,900
89	MMVNNIYDG	740131-740160	0,23211	9	1056,2	3,80	0,033
90	VSSNKIQTIIVFNVKVQIQSIFISMIPQYIPRKLYIAEIVYHWVEWI M	747010-747156	0,901443	48	5780,9	9,31	0,615
91	MELSEIKRNIDKYNQDLTQIRGSL	752786-752860	0,973765	24	2865,2	5,97	-0,917
92	MIKNH	762666-762683	0,234052	5	641,7	8,52	-0,840
93	MIKSH	768099-768116	0,13269	5	614,7	8,52	-0,300
94	MEERVISDYELVFEI	788778-788825	0,109005	15	1872,1	3,91	0,120
95	LNNALKQEEATWGNVQGQVSQALMGTGIKDSTARSIGFWVSQ VGQALI	789868-790014	0,855059	48	5103,7	6,18	-0,096
96	LKNKLLVLSLGALCVSQIWESNRASAVVSGEKNPYVSSR	795990-796109	0,994479	39	4217,9	9,63	0,110
97	LVDTGLLFVDGMRRSQASIGTGHIYDD	806756-806839	0,745464	27	2937,2	4,75	-0,011
98	MQVGDGPQQREIGFPISTDNASWGGTTK	811541-811627	0,514509	28	2978,2	4,56	-0,821
99	MGLQLRES	811438-811464	0,419002	8	933,0	5,75	-0,400
100	MWLFVIFSIKMVSIAIFGSQEWLNNAV	823159-823242	0,122837	27	3144,7	5,75	1,167
101	MGIMQFKHGPVI	831071-831109	0,114695	12	1357,6	8,52	0,567
102	MKSKSKQPPNKYVEAFKPYLLTLLYLAIFITLYLIYGSGDTHNNF IYNEF	834107-834259	0,530055	50	5908,8	9,01	-0,062
103	MSSNEGDLI	834249-834278	0,142401	9	965	3,67	-0,256
104	MLQYV	858961-858978	0,358409	5	652,8	5,27	1,020
105	MTFYSLLEYCESAVK	876710-876757	0,187669	15	1784,0	4,53	0,333
106	LGRNDNKMGKIGG	892053-892094	0,160718	13	1359,5	9,99	-1,092
107	MINEVL	914809-914829	0,207164	6	717,8	4,00	1,233
108	MLRTNSVDVF	920977-921009	0,135695	10	1181,3	5,59	0,390
109	MDFEECESKDAI	932948-932986	0,281357	12	1416,5	3,83	-0,725
110	MTVAEVGNIVEFMDGLRGRVEKINDNSVIVDLTIMENFNDLDLP EKTVINHKRYKIVE	941193-941369	1	58	6676,6	4,80	-0,171
111	VISIANALHLMLSFGMFIVTFIGIVVAIINLSNKK	942257-942364	0,811098	35	3788,6	10,00	1,591
112	MALLNTFERKSLL	942219-942260	0,140662	13	1535,8	8,50	0,369
113	MVSAVSMFGRIIIMVIKDMVQQLLENIDHLVVIQELV	943108-943221	0,997197	37	4226,1	4,75	1,141
114	MRQFIKRTVKTILVGYVIKFIRNKLSGKSSHPTDNKHN	950625-950741	0,993006	38	4456,2	11,20	-0,613
115	MILSHLRRLLATIGGFFIL	957560-957619	0,703515	19	2171,7	12,00	1,437
116	MNGDILFECLSFEEQL	960730-960780	0,515513	16	1888,1	3,50	0,231
117	VSLCTQQKLNHELQAKVAVIVKIDGKQSPLFLLVYV	963913-964023	0,53494	36	4023,8	9,05	0,472
118	VSWHQTKMNEDEYVGPCVV	972225-972284	0,618573	19	2221,4	4,65	-0,479
119	MIKNH	977730-977747	0,287622	5	641,7	8,52	-0,840
120	LYLAQQFYIDSS	977903-977941	0,184718	12	1447,6	3,80	0,167
121	MSNENQNKKAAEKAKEVEEKLKDKKEEKTEDINQTKQDIQDTL N	994194-994328	1	44	5162,6	5,05	-1,984
122	MRRAHA	994136-994156	0,965585	6	740,8	12,00	-1,117
123	LQFANFTETGFKRIEFKAWFW	997983-998048	0,127754	21	2667,0	8,59	-0,190
124	MKFTKRRSRSKPWHK	1009488-1009535	0,123246	15	1973,3	12,31	-2,160

125	LRQVQCIICDAKVFIDERTTESKRLKNNPIRTFMCDDCKSRLDTP KQRAQHYPLD	1025649-1025816	0,945376	55	6539,5	8,85	-0,845
126	MIKIKRDYTTIDV	1032264-1032305	0,109464	13	1595,9	8,25	-0,185
127	MGSNAGNMI	1033415-1033444	0,101759	9	894,0	5,28	0,167
128	MAVPKRRTSKTRKNKRRTHFKISVPGMTECPNCGRIQIITPCM	1041899-1042030	0,999663	43	4973,0	11,40	-0,740
129	VVEYKLSHRVCKNCGSYNGEEVAAK	1041996-1042073	0,206534	25	2784,1	7,99	-0,508
130	VTASYSNYLKSFHLFGYLKRFKSERQSVINIKQVYA	1051640-1051750	0,118599	36	4286,9	10,00	-0,294
131	LENVIVDNPIWLNHVDYLVKSVLLKSIKLRFQEVRKFEILVKIMN RIHI	1070194-1070343	0,117135	49	5928,1	9,70	0,310
132	VKRKSNVLTIIKIVTDIVATVLIIRALLNSRKDAK	1071037-1071144	0,965628	35	3903,8	11,12	0,511
133	MFGISSGINFAIT	1077822-1077863	0,505257	13	1357,5	5,28	1,246
134	LSTITKTKIKIFINYFIGILALAFAAYILFK	1085870-1085965	0,781641	31	3536,3	10,00	1,294
135	MEGLFNAIKDTVTAAINNDGAKLGTSIVSIVENGVGLLGKLFGF	1088443-1088577	1	44	4496,2	4,78	0,570
136	MTGLAEAIANTVQAAQQHDSVKLGTSIVDIVANGVGLLGKLFG F	1088634-1088768	1	44	4456,1	5,36	0,607
137	MLHYVIPVLVLLLVFLIGWILIKLIIR	1123870-1123953	0,999877	27	3202,2	9,99	2,337
138	MAFFAV	1161975-1161995	0,83063	6	684,8	5,28	2,550
139	MAVISMKQLLEAGVHFGHQTRRVEPKNEKIYLH	1180820-1180921	1	33	3861,5	9,52	-0,403
140	VLQNGEN	1229302-1229325	0,149684	7	772,8	4,00	-0,914
141	MKRETKQKISFCLSIGIFILVILLLIF	1244528-1244611	0,969164	27	3168,0	9,79	1,374
142	MVKEKERIAKLNFE	1245274-1245318	0,921357	14	1735,0	8,26	-0,800
143	MENNDSNEVAYLLKDGKFTKVYVNQDSVSFVPG	1249800-1249901	0,999926	33	3709,1	4,44	-0,512
144	MLDSQLDGNVTAKELSESFKELVEEFESIEKAKKNSNSKDK	1250222-1250347	0,999998	41	4647,1	4,73	-1,049
145	MIPGVNAPPMHPWCRSTTVPHVGNWRDKFFKEREGKYQVEVK EA	1245423-1245512	0,994234	44	5153,9	9,03	-0,841
146	MTRELRKKLTLYLNIATLILFIINLTRKK	1245423-1245512	0,994234	29	3518,4	11,12	0,255
147	MKEMIKNGKIKIEINCGK	1250709-1250765	0,607745	18	2077,5	9,52	-0,556
148	MKSLEI	1246286-1246306	0,123269	6	719,8	5,75	0,333
149	MFKVNYSILSYYPEYNIAVSWQRLREGKTIKNKI	1248187-1248291	0,998492	34	4153,8	9,78	-0,479
150	MVEEVKTIK	1246798-1246827	0,969621	9	1076,3	5,90	-0,078
151	VDRQP	1246303-1246320	0,465627	5	613,6	5,81	-1,780
152	VRVNVTLACTECGDRNYITTKNKRNNPERIEMKKYCPRLNKYT LHRETK	1271634-1271783	0,999677	49	5899,9	9,78	-1,216
153	MMTTDKPKDADILERVKDILNKKERKK	1274733-1274816	0,999392	27	3244,8	9,60	-1,385
154	VRKSKFAIDRGYFPDMEMASFYNQINKNKYVY	1279048-1279146	0,154687	32	3924,5	9,52	-0,772
155	LMKDSVH	1283796-1283819	0,210151	7	828,9	6,74	-0,214
156	MELSYES	1292089-1292112	0,417795	7	857,9	3,79	-0,600
157	MVSLMLVILHKWTVFIQHLMNILSGGESIIE	1299707-1299802	0,753133	31	3553,3	6,00	1,081
158	MPDALGFFGFYKE	1304038-1304079	0,370484	13	1521,7	4,75	0,100
159	VVPPKLTEYSKYS	1310336-1310377	0,441816	13	1510,7	8,40	-0,554
160	MRLFEK	1336426-1336446	0,215157	6	823,0	8,50	-0,567
161	MTHLTFNGKMIVKIF	1338014-1338061	0,126677	15	1780,2	10,00	0,673
162	MTSDVNV	1341433-1341456	0,137795	7	764,8	3,80	0,257
163	MGGNAL	1363690-1363710	0,16374	6	561,6	5,28	0,533
164	MLHKVKLYQTKYTYYK	1371668-1371718	0,353178	16	2107,5	9,78	-0,950
165	VGPNTEDDEKSAYNNVQVWDGPQQREIGFPISTDNASWGGTTK	1375155-1375286	0,996939	43	4709,9	4,14	-1,126
166	MIIEN	1405082-1405099	0,151609	5	618,7	4,00	0,780
167	MLTQSEMIVVFVLDETINQGINLTAMKYPKSFDMDRVI	1418908-1419024	0,890854	38	4392,1	4,44	0,274
168	MPKPLI	1462619-1462639	0,241119	6	697,9	8,50	0,517
169	VENTEV	1462642-1462662	0,119834	6	689,7	3,79	-0,467
170	MWSPVCELGETKESDKKRTNNND	1462845-1462916	0,999927	23	2681,9	5,06	-1,639
171	LLIVGV	1462760-1462780	0,265916	6	612,8	5,52	3,350
172	MLKLISPTFEDIKTWYQLKEYSKEDIAWYVDMEVIDKEEYAIITG EKYPENLES	1466663-1466827	1	54	6537,4	4,28	-0,583
173	MEQYGWTLTEVRKQPYVKLLEILNEENKEETEEKQSEQKVITGT DLRKLFGS	1479521-1479679	0,999953	52	6187,9	4,85	-1,042
174	VKIIQRILQVRYPANPQNVEVAVNSKSATVSAE	1480618-1480719	0,986337	33	3623,1	9,70	-0,082
175	MQHWKQTGLNPTARKERGVVSFVASMLHHQK	1490822-1490917	0,41065	31	3603,1	11,10	-0,765
176	VVKEILRLLFLLAMYELGKYVTEQVYIMMTANDDVEAPSDFEKI RAEVSW	1493789-1493941	0,999993	50	5868,8	4,44	0,220
177	VQDEQLS	1502201-1502224	0,677727	7	817,8	3,67	-0,971
178	MSDTYKSYLLAVLCFTVLAIVLMPLLYFTTAWSIAGFASIVTFIF YKEYFYEE	1502255-1502416	0,999891	53	6195,3	4,62	1,025
179	MKITNCKIKKETIVYEVLTSGNQPFTYELPKDLSSHNARKYLEFIS QKIDGDKLTKEDSL	1506190-1506372	0,999941	60	6950,9	7,83	-0,695
180	MADKNKKQEATRSNPINKSFEKPGASENLKSTLSEKAKKKD	1506430-1506555	0,999573	41	4578,1	9,82	-1,634
181	MQNKVLRIIIIVMLVSVVLALLLTSIIPIL	1532636-1532728	0,999911	30	3330,3	11,00	2,180
182	MRVNVTLACTECGDRNYITTKNKRNNPERVEMKKFCSRENKQT LHRETK	1564681-1564830	0,999999	49	5872,7	9,73	-1,363
183	LGGTAG	1579334-1579354	0,139636	6	474,5	5,52	0,617
184	MSKTVVRKNESLEDALRRFKRSVSKSGTIQEVRKREFYEKPSVK RKKKSEAARKRKFK	1587820-1587996	1	58	6972,1	11,11	-1,452

185	LTTSVNVTKIELNSYKDE	1628179-1628235	0,148304	18	2054,2	4,94	-0,544
186	MKKTLYNVINKLSESMYP	1635407-1635463	0,195273	18	2159,5	9,40	-0,478
187	MSFMDKAKDAVEKFKNSDNEQVKNVKDKINEYTGSNNEEKKE NEDKEK	1635663-1635809	1	48	5655,1	5,07	-1,898
188	MADESKFDQFKGNVKETVGNVTDNKELEKEGQQDKATGKAKE VVENAKNKITDAIDKLKK	1635849-1636031	1	60	6682,4	6,24	-1,255
189	MRDAVRDVLDNTTLKYLAEYVDTSEDLDGYMFYI	1636131-1636235	0,990135	34	4036,4	3,98	-0,306
190	MKSKAVKRTLNVLSGFIKCTLIKSNDDYN	1642538-1642627	0,55133	29	3287,8	9,75	-0,317
191	MFFKPMRVATRIFVPCAVSGCARAFSFAFKIMIYRAKLSGRI	1642407-1642535	0,297592	42	4789,9	11,47	0,717
192	LQKYVKVVIIDIEFYN	1642759-1642809	0,103304	16	1984,3	6,07	0,519
193	MRSGIKKDETNSVSSFLSYK	1652274-1652336	0,237497	20	2277,5	9,52	-0,795
194	MAEQSKQKQANEQQKAQNLFARWRQLQNSNSESSNDTNK	1661240-1661359	0,999558	39	4566,9	9,52	-1,890
195	MIEVDRINDVSCV	1662698-1662739	0,279934	13	1492,7	4,03	0,515
196	VVPPIFKKDD	1668368-1668400	0,333919	10	1157,3	6,11	-0,230
197	MIFTEGSPQSILAERD	1668528-1668578	0,879391	16	1794,0	4,38	-0,219
198	MYMKIKSGLEE	1750253-1750288	0,755348	11	1328,6	6,04	-0,473
199	MTKITKIVE	1759644-1759673	0,2152	9	1062,3	8,35	0,267
200	MNNVILNTFDLKE	1771621-1771662	0,325935	13	1550,7	4,75	-0,085
201	MLIIDKDNVAYL	1802054-1802092	0,126364	12	1407,6	4,21	0,733
202	MNSDIIVAQHPIIQK	1813920-1813967	0,852032	15	1707,0	6,50	0,160
203	MKRGVRMGTIKL	1821682-1821720	0,122459	12	1389,7	12,02	-0,167
204	MFNAISTDFFK	1826321-1826356	0,684192	11	1320,5	5,59	0,382
205	MAYFD	1829095-1829112	0,115012	5	645,7	4,30	0,340
206	MDRLKYSLKVGILALLLFCTLNYLVPMQSNAFSIIIYSAIFAVLL MLLVYIFLGILKK	1831289-1831465	0,996316	58	6614,2	9,58	1,422
207	MTRERRSFSSEFKLQMVRLYKNGKPRNEIIREYDFTPSTFVNGGY KM	1832463-1832606	0,999878	47	5709,5	10,11	-0,974
208	MDKATSKHGYIQSPR	1832411-1832458	0,853274	15	1718,9	9,70	-1,327
209	VMLIFVHIIAPVISGCAIAFFSYWLSRRNTK	1832809-1832904	0,999829	31	3554,3	10,05	1,097
210	MFSCLTSDIERISPI	1833074-1833121	0,1417	15	1712,0	4,37	0,553
211	LRLEYENHKARYY	1852878-1852919	0,155077	13	1754,9	8,44	-1,623
212	MEKVLDLDVQVKANNNSNDSAGDERITSHSLCTPGCAKTGSFN SFCC	1857745-1857888	0,999997	47	5008,5	4,89	-0,419
213	LEKVLDLDVQVKGNNNTNDSAGDERITSHLFCSFGCEKTGSFNS FCC	1858625-1858768	0,204842	47	5144,6	4,65	-0,368
214	MFKKKC	1860909-1860929	0,836787	6	784,0	9,79	-0,750
215	LDGVGVGATPLDNV	1866350-1866394	0,968941	14	1326,4	3,56	0,571
216	LFDLKRESGDW	1874334-1874369	0,956322	11	1365,5	4,56	-0,964
217	MSKDKDPKLNYHEEENSMVTDFEDLKELGKEMEQISDQNDQEK NSEEDSQ	1890657-1890809	1	50	5936,2	4,14	-1,870
218	MIGNIIGKHSDINFKKYK	1914934-1914990	0,120028	18	2106,5	9,82	-0,528
219	MIVQTRRILLHDV	1917417-1917458	0,126045	13	1593,9	9,37	0,538
220	MNEQQTIEQIKARLNKFIEDIDHVNPDEVRVEDIDEWIGLLDQLE EKVKLVSK	1922968-1923129	1	53	6305,1	4,42	-0,681
221	MNSVKLKQPVSIYNDPWEVKFIYI	1923353-1923427	0,80188	24	2912,4	8,14	-0,121
222	MTEQMYLILFLLSLPLLLFIGRKTHFYCLDKKNGRR	1924070-1924180	0,644326	36	4373,3	9,86	0,231
223	LLVVWG	1923594-1923614	0,17653	6	685,8	5,52	2,450
224	MLDIIKTLLEHQVLAVLIIPEVLKQLREWHLGYLDRKPNNKD	1924251-1924379	0,997933	42	5006,9	6,71	-0,095
225	MKMIYPTFKDIKTFYVWGYYKNEQIKWYVDKGLIDKEEYALIT GEKYPETKDEKSQV	1930526-1930699	0,999998	57	6994,0	6,19	-0,868
226	MDSKGGKHE	1934806-1934835	0,165303	9	988,0	6,52	-1,967
227	MSNTDKYLRDIARELKGIRKELQKRNETVIIDANLDSLRSAVLA DKEKSKYNEPLF	1945991-1946161	1	56	6538,4	9,10	-0,832
228	MMWLIIAIILLVILLFGVMLQAEQLKGDVKVKEREIEILRSRLRHF ED	1951119-1951265	1	48	5721,0	6,55	0,635
229	VVKEILRLLFLLAMYELGKYVTEQVYIMMTANDDVEAPSDFAK LSDQSDLMRAEVSE	1951266-1951439	0,999995	57	6530,5	4,31	0,116
230	MVGGMKSE	1959976-1960002	0,180242	8	538,0	5,97	-0,125
231	MSNIYKSYLVAVLCFTVLAIVLMPFLYFTTAWSIAGFASIATFIFY KEYFYEE	1960656-1960817	0,999981	53	6198,3	5,01	1,066
232	MKITNCKIKKETIVYEVLTSGNQPFTYELPKDLSSHNARKYLEFIS QKIDGDKLN	1964181-1964348	0,99961	55	6391,3	8,79	-0,665
233	MTELILEYLVKKYVEEEYRK	1964396-1964458	0,101566	20	2577,0	5,06	-0,605
234	MKHVFKGQIRD	1968933-1968968	0,155251	11	1358,6	9,99	-0,864
235	MTKNTIISLENEKTQINDSENESSDLRKAK	1982201-1982293	0,500059	30	3437,7	5,05	-1,303
236	LIADLDAIEGLFISIEVKLLLTLFIVHVNGKNINFINALALIILRQTV	1988119-1988265	0,130144	48	5316,4	5,48	1,269
237	MQKYILNGSL	2001721-2001753	0,184004	10	1166,4	8,34	0,060
238	MKFKVNENETIADCLSRMKMQGYMPVKRIEKPVFQEQKDGTVE VSHQEIVFVGKKIQ	2004154-2004327	0,999994	57	6671,8	8,85	-0,581
239	LNVVAVNFKWSFELYMLKVENRAMNRVHNNIYNFNHNEKGRK KTKIYTQHRKYFKKM	2014701-2014874	0,619552	57	7121,3	10,34	-0,965
240	MWNFIKCVFKFVFSLVAITTLVAGVGVVAFAYIFKKDFEDIERK TKEIISDIESKNN	2018697-2018870	1	57	6564,7	7,86	0,446

241	LKHLTKIFVVLAIILFIIGYYLQATNHESQGIKLLLAAIMFMICAFI SRSNDRRKNSK	2026970-2027146	0,999861	58	6667,0	10,13	0,584
242	MMWWQEGMMTLITGGLLIIFRLWLELKWKNKK	2027389-2027487	0,999973	32	3995,9	10,00	0,200
243	MNVVMTFKFEAWYKQNQTTF	2031520-2031582	0,197853	20	2513,9	8,25	-0,360
244	VKFKTTKECKSNNIFKRSQEINNRESEKGCLWGISMLILLFLLILF GITACSSSIHFIN	2032310-2032489	0,127536	59	6766,0	9,30	0,197
245	MVALLKSLERRRLMITISTMLQFGLFLIALIGLVIKLIELSNKK	2037590-2037724	0,999954	44	5029,3	11,07	1,009
246	LAGFDG	2037557-2037577	0,208536	6	578,6	3,80	0,683
247	MQDNKQGLQANPEYTIHYLSQEIMRLTQENAMLKAYIQENKEN QQCAEEE	2038604-2038756	0,999996	50	5945,5	4,61	-1,208
248	MDAEKVANMPIHFFLDIVESKIETKRTAKSFKDIF	2048745-2048852	0,841918	35	4100,8	6,53	-0,163
249	MAMYEVKKSYTDLEKGQYLKSGKRVEMTVKRAEYVNKKLKE HGVILERVKEE	2051809-2051967	1	52	6192,2	9,44	-0,950
250	MIKQILRLLFLLAMYELGKYVTEQVYIMMTANDDVEAPSDYVF RAEVSE	2059299-2059448	0,998902	49	5748,7	4,45	0,249
251	VRERTKIIYRGWNKEIFILQGKNMNVIGLRQIFDELKRLYEGYKI VVIPIEVDFEIK	2059668-2059841	0,890963	57	6926,2	9,45	-0,151
252	MKKFNVQITYTGMIEEAIEAESLEEAEFEAHDIARMEVPFDCDEF EINVEVEQENE	2060407-2060577	1	56	6571,2	3,94	-0,536
253	MNRLRIIKIALLIVILAEEIRSAKKIKKFTPEDSKGFPDITKDSIKEP K	2065119-2065268	0,926647	49	5636,8	9,90	-0,261
254	METNKKTKKDGI	2066503-2066541	0,154949	12	1392,6	9,52	-1,792
255	MSNIYKSYLVAVLCFTVLAIVLMPFLYFTTAWSIAGFASIATFIFY KEYFYEE	2067887-2068048	0,999976	53	6198,3	5,01	1,066
256	MLQKFRIAKEKNKLKLKLLKHASYCLERSNNPELLRAVAELLK KVN	2069071-2069211	0,99998	46	5421,5	10,18	-0,489
257	MPTQYSMERELFEIKETSITHSDGHTSISKTPKVTGKGQQYFVNK FLGEKQTS	2069455-2069616	0,99837	53	6051,8	8,08	-0,909
258	MIFANSPTKIDVLVVATASANTIFGLSRSIFVSN	2069711-2069815	0,508032	34	3585,1	8,50	0,865
259	MKKAILTLSLIFITYYLTFKYMWIKELKY	2072310-2072399	0,286962	29	3663,5	9,70	0,559
260	LQNKKETIVYEVLTSGNQPFTYELPKDLSSHNARKYLEFISQKLD GDKLTKEDSL	2072469-2072636	0,999888	55	6374,1	5,70	-0,855
261	MADKNKKQEATRSNPINKSFEKPGASENLKSTLSEKAKKKD	2072693-2072818	0,999856	41	4578,1	9,82	-1,634
262	MKITNCKIKKKL	2072455-2072493	0,967962	12	1447,9	10,20	-0,542
263	MDNINKNEKFRVL	2084981-2085022	0,791948	13	1620,8	8,34	-0,969
264	MVLPVFIDSIG	2085207-2085242	0,452717	11	1190,4	3,80	1,782
265	LYEFVILA	2086590-2086616	0,125208	8	967,1	4,00	2,013
266	MAQDIISTIGDLVKWIIDTVNKFTKK	2093504-2093584	0,999996	26	2978,5	8,19	0,150
267	MNTLFNLFFDFITGILKNIGNIAAYSTCDFIMDEVEVPKELTQLHE	2094440-2094580	0,999436	46	5297,1	4,33	0,293
268	MLALND	2103820-2103840	0,136761	6	675,8	4,30	0,717
269	MLNQYTEHQPTTSNIIILLYSLGLER	2111567-2111647	0,987388	26	3048,5	5,38	-0,100
270	VKTFESDETRNVKYNKKQS	2122583-2122642	0,14626	19	2301,5	9,40	-1,800
271	MIRLKILAYFSNN	2128615-2128656	0,293711	13	1582,9	9,99	0,431
272	MLSFSQNRSHSLEQSLKEGYSQMADLNLSLANEAFPIECEACDC NETYLSSNSTNE	2135298-2135468	0,999999	56	6251,7	4,21	-0,596
273	MLIVLLLVVIALVLYLFYALIRSEKF	2144198-2144278	0,997219	26	3053,9	8,25	2,173
274	MKRPEKIQNVVKLLSSLGVNIKKTKSRLDIINTLPASNKVSHELK	2154431-2154568	0,999965	45	5070,0	10,46	-0,424
275	MELSRLDIEVVV	2157517-2157555	0,369959	12	1402,6	4,14	0,900
276	MAEMNCSDPYDLIWLVPT	2162336-2162392	0,557877	18	2098,4	3,49	0,194
277	MYIKDV	2163674-2163694	0,208447	6	767,9	5,59	0,317
278	LIKNH	2167329-2167346	0,205617	5	623,7	8,76	-0,460
279	MECNVYIVCITDK	2185997-2186038	0,404544	13	1530,8	4,37	0,608
280	MDILDDELKFRHLNSGTLYD	2203553-2203615	0,157728	20	2395,6	4,50	-0,570
281	MPLFLQPILKTKLWGGQRLSEFGYQLDNDTTGGMLVCVSTSKW YERDY	2207609-2207755	0,989964	48	5587,4	6,00	-0,352
282	MSDFEMLMVVLTIIGLVLISTQDHKK	2212109-2212189	0,989719	26	2962,6	5,36	0,823
283	MVIVVTPRKD	2212191-2212223	0,976562	10	1157,4	8,50	0,480
284	MAKIGYDRVSTKD	2212816-2212857	0,992825	13	1483,7	8,25	-0,777
285	MFRNLILLIQGNYYIITDC	2224849-2224908	0,143539	19	2303,7	5,58	0,758
286	MIKIDVV	2248335-2248358	0,232282	7	817,0	5,59	1,700
287	VTFSTLKIGNMTNLMMNLYVLITKE	2265535-2265612	0,340384	25	2875,4	8,47	0,560
288	MHTVMIDMVLNETSNYMNVMTVHHVL	2265625-2265705	0,310652	26	3060,6	5,70	0,435
289	LKAKEAIN	2273015-2273041	0,195139	8	886,0	8,59	-0,362
290	LEFGVWFSEFDIWNSEL	2281692-2281745	0,79391	17	2118,3	3,50	0,200
291	MRYIHFSIITLITGIIMHITMYFVPFESRKMPLFMTIIFTI	2282790-2282915	0,920158	41	4968,1	9,69	1,127
292	MVVLIGS	2282604-2282627	0,311802	7	717,9	5,28	2,486
293	MTQELEKELIPKLI	2288229-2288273	0,598189	14	1685,0	4,78	-0,129
294	MNPEI	2290306-2290323	0,159805	5	602,7	4,00	-0,440
295	LKDSIFWKKAFIPVYFIVAMLVFLLFRFYIKTDNFSIYLMSIFLICL GTASIIYNYKTNR	2293182-2293364	0,868888	60	7215,7	9,67	0,885
296	VELESLRELASEATKEDKYQVYDVILAGVK	2296590-2296682	0,122348	30	3396,8	4,49	-0,253
297	MDHLLIVKALMDLEKFYTMNLTICT	2298788-2298865	0,990192	25	2957,6	5,36	0,664

298	MMVLLQVTEQTF	2305586-2305624	0,116582	12	1439,7	4,00	0,892
299	MKVRPSVKPICEKCKVIKRKGKVMVICENPKHKQRQG	2306429-2306542	0,99996	37	4305,3	10,32	-0,808
300	MAKLQITLTRSVIGRPETQRKTVEALGLKKTNSSVVVEDNPAIR GQINKVKHLVTVEEK	2309398-2309577	1	59	6553,6	10,11	-0,400
301	MSLENQLAELKYDYVRLQGDIEKRESLNLDTSALVRQLKDIENE IRNVRAQMQD	2326237-2326401	1	54	6394,2	4,79	-0,826
302	MTSTMERIVNILFNRDDLIKMKKIDNINVKKISITRKLK	2332171-2332290	0,282038	39	4662,6	10,38	-0,326
303	MNNDKHNGKNR	2332262-2332297	0,417219	11	1327,4	9,99	-2,864
304	MQVGERGPNTEGDEKSAYNNVQVGGAPT	2335708-2335794	0,145123	28	2906,0	4,41	-1,089
305	MPDLIEMIVFKVFTSWRGPNTEADRKSAYNNVQVGGAPT	2335823-2335942	0,165594	39	4340,9	5,97	-0,315
306	MVMNQGLEVIDLAMRIVGAKSLEMNRPLQRYYRDMRAGLHNP PMEDAAYTNIAKSITDTF	2349715-2349897	1	60	6858,9	6,53	-0,300
307	MKLLIEQHNINLVTSIH	2392716-2392769	0,179732	17	2003,3	6,69	0,306
308	MIKSIGIYIIFMLFGGILNRLSRIVSNEVTSLIYSLK	2404399-2404512	0,302588	37	4204,1	9,99	1,000
309	MMDTKKNNQPIRMLTARLIDL	2410154-2410219	0,669155	21	2503,0	9,98	-0,448
310	LKERNAIMTDIAQDITNDLNSEDIENVRQVLEVINHRIKTYSNHK	2423442-2423579	0,999969	45	5292,9	5,48	-0,802
311	MIVFAADKMKS	2437659-2437694	0,550693	11	1240,5	8,35	0,618
312	MAQLDLPSR	2447575-2447604	0,151929	9	1030,2	5,59	-0,289
313	MGRFVPDKESGQKN	2454799-2454843	0,185762	14	1592,7	8,34	-1,471
314	MVERYIKVLILYIFTTLLSSISVTSKCVPNKVIRFILRTAIGYSVFA YGLHYFSNLKKNK	2474417-2474599	0,99838	60	6962,4	10,09	0,532
315	LLRSVSDTNLLGQYEKAISISDMIEIVFLMYEV	2477863-2477964	0,554275	33	3791,4	4,18	0,552
316	MKLDLQTARRNLNSPNIKTRKRALKIIKQHKRAK	2484494-2484598	0,999963	34	4069,9	12,19	-1,229
317	MQLLNM	2484696-2484716	0,376798	6	748,9	5,28	0,733
318	LDVKRQLHKPF	2486913-2486948	0,12365	11	1380,6	9,99	-0,864
319	MESEFGNKKGDR	2498409-2498447	0,677581	12	1397,5	5,94	-1,933
320	VYLDVQFIM	2498331-2498360	0,192221	9	1127,3	3,80	1,456
321	MFNLLINIMTSAISGCLVAFFAHWLRTRNNKKGDK	2502610-2502717	0,999742	35	4011,7	10,31	0,197
322	VYLDVQFIM	2502532-2502561	0,164674	9	1127,3	3,80	1,456
323	MNDEDIKI	2524701-2524727	0,214842	8	977,1	4,03	-0,875
324	MMKILKYKDDFVSGGWAVVRL	2524658-2524723	0,130848	21	2456,9	9,52	0,290
325	MSKAYRLYNNIQDDTKQPMAHAVGCFFRCVCHGQHFDVGIPLQ AWE	2524759-2524899	0,398552	46	5327,0	6,80	-0,320
326	MLAKGKGVYNE	2524720-2524755	0,141891	11	1209,4	8,26	-0,473
327	MIDFTASDLGISFNWK	2530877-2530927	0,636029	16	1845,1	4,21	0,256
328	MNIQYLNNFNDKLIKETSI	2533975-2534034	0,514669	19	2298,6	5,82	-0,489
329	MLIRKSENHGSYAVVAKQATVFL	2547692-2547763	0,322835	23	2563,0	9,70	0,209
330	MHIVAMKDI	2548954-2548983	0,136534	9	1057,3	6,50	0,911
331	MKRLENKVAVVTGASTGIGQASAIALAQ	2549769-2549855	1	28	2785,2	9,99	0,407
332	MSQTEYQIKPGNITSNSEETSSISKVSCEI	2556606-2556698	0,79504	30	3291,6	4,49	-0,673
333	MKYKISLAYNLAIIIGSLIILCILISRGYDIYVILIPILTILASLINLFC DIKKHK	2568218-2568388	0,165511	56	6349,9	9,34	1,288
334	MEYNTYLYKIILYIDALKTIYK	2574975-2575043	0,299044	22	2773,3	8,03	0,136
335	VLLSLSEFVNQHGTKS	2589658-2589708	0,139052	16	1758,9	6,72	0,094
336	MPDVRKF	2594828-2594851	0,258745	7	892,0	8,50	-0,657
337	MSENFNVSG	2594815-2594844	0,10263	9	984,0	4,00	-0,400
338	LVLGTVAV	2599767-2599793	0,566763	8	770,9	5,52	2,612
339	MDEYIEWKTVLIARLFFVWYEVAMTTCHWWRL	2611841-2611939	0,385174	32	4137,8	5,51	0,316
340	MLRLSIIFIAFIINTTITYGYTTEGTWVNLLFKSLSLSMIIVFMFYYI RFVIEKKR	2613695-2613865	0,99996	56	6721,1	9,87	0,914
341	LIKKKHLSGSLVPDRCFLIISEEVERFMENAY	2613927-2614025	0,191199	32	3766,4	6,76	-0,053
342	MRSSELKENTLQKAVA	2620806-2620856	0,426579	16	1805,0	8,34	-0,706
343	MIKNETAYQMNELLVIRSAYAK	2620846-2620914	0,917667	22	2587,0	8,19	-0,177
344	MTAEEIAKKGVE	2629697-2629735	0,302027	12	1305,5	5,01	-0,433
345	MANSDFKEKFKSVHRSA	2629980-2630033	0,76459	17	1982,2	9,70	-1,000
346	VVKVSVIINILIFLAIFGYALYTLVKFFKRSKQGKCGTCDINRDCC GTEQHTANHFPGK	2636008-2636187	0,957674	59	6607,8	9,30	0,258
347	MEVIIQNIFAMSQILHEK	2638519-2638575	0,405412	18	2144,5	5,38	0,500
348	MLHNEQGPSIAVGSFYL	2642125-2642178	0,258187	17	1863,1	5,22	0,224
349	MPRFLNNEGFVGDSEIG	2647582-2647635	0,622235	17	1882,0	4,14	-0,329
350	MKGKT	2644973-2644990	0,334253	5	563,7	10,00	-1,400
351	LDFIVLLLKYLSLLSAKWNETSFEAVLSTLDTN	2660451-2660552	0,11522	33	3758,3	4,32	0,606
352	MLTKKVHYLLGAYQHLHIINTIDNIIEDTDNKC	2663330-2663431	0,546883	33	3868,4	6,21	-0,191
353	MKFSKE	2665303-2665323	0,106828	6	768,9	8,35	-1,233
354	MFGTVVFSVEENG	2670323-2670364	0,983311	13	1415,5	3,79	0,562
355	MHLEPPVPNIAKVF	2685309-2685353	0,121584	14	1591,9	6,50	0,307
356	MVRGSISVAVTRGTDRSIFLASIDRGNTFA	2686221-2686313	0,456019	30	3198,6	11,52	0,260
357	MFFLDADIEYPFYD	2694585-2694629	0,110141	14	1785,9	3,59	0,157
358	MIVINKYGNELVIDIK	2697192-2697242	0,242526	16	1862,2	5,82	0,537
359	LTQTTTMMIMHDKNNAIGPRNKR	2702204-2702275	0,384846	23	2672,1	11,00	-0,957
360	VNSLIMKDLSDNDMRFKYEYYNREKDT	2709802-2709885	0,36754	27	3388,7	4,93	-1,315
361	MKKLAVILTLVGGLYFAFKKYQERVNQAPNIEY	2721168-2721269	1	33	3846,5	9,60	0,048

362	LSAERLLGSLKSLQVVDM	2732473-2732529	0,860653	18	1959,3	6,07	0,522
363	LSLTANRSHLLTLILIHSYFASYSMILNHLMNPKC	2761056-2761163	0,505142	35	4016,7	9,20	0,529
364	MTLMCLPNLIDSYF	2762346-2762390	0,999978	14	1661,0	3,80	0,971
365	MTADFFQLIGSLFRILKELFK	2778943-2779008	0,998691	21	2518,0	8,34	0,686
366	MLKTRGGRNQFELTDFVLPRV	2778600-2778665	0,767406	21	2477,9	10,74	-0,376
367	MSAWLSKLFEFIPRIIINLFI	2781106-2781171	0,351769	21	2552,1	8,50	1,262
368	MLINEAE	2802908-2802931	0,542531	7	818,9	4,24	0,214
369	MCAVTVTDV	2803036-2803065	0,481351	9	931,8	3,80	1,544
370	MKFVSYPFCCVYEA	2807115-2807159	0,15656	14	1687,0	5,75	0,736
371	MITVLRHTDFIAQRKAVVSKRPTAFL	2811453-2811533	0,121518	26	2999,6	11,72	0,235
372	MIFSQNLFRRPTPARLTRIEKSLLQAHFRSVNYCQYNFVEHRTLI YVPA	2815207-2815356	0,518311	49	5926,9	10,41	-0,253
373	MMTNT	2815437-2815454	0,144115	5	596,7	5,28	-0,220
374	MVKRTYQPNKRKHSKVHGFRKRMSTKNGRKVLARRRRKGRK VLSA	2821010-2821147	1	45	5433,5	12,61	-1,562
375	KSKKIEQ	2821336-2821359	0,214932	7	860,0	9,70	-2,143

n: nombre de résidus
pI: point isoélectrique
GRAVY: Hydropathie moyenne (indication de l'hydrophobicité moyenne du peptide)

ANNEXE I I : Article Hiron *et al.* 2007

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, July 2007, p. 5119–5129 Vol. 189, No. 14
0021-9193/07/$08.00+0 doi:10.1128/JB.00274-07
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Only One of Four Oligopeptide Transport Systems Mediates Nitrogen Nutrition in *Staphylococcus aureus*▽

Aurelia Hiron,† Elise Borezée-Durant,†* Jean-Christophe Piard, and Vincent Juillard

Unité Bactéries Lactiques et pathogènes Opportunistes, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas cedex, France

Received 19 February 2007/Accepted 1 May 2007

Oligopeptides internalized by oligopeptide permease (Opp) transporters play key roles in bacterial nutrition, signaling, and virulence. To date, two *opp* operons, *opp-1* and *opp-2*, have been identified in *Staphylococcus aureus*. Systematic in silico analysis of 11 different *S. aureus* genomes revealed the existence of two new *opp* operons, *opp-3* and *opp-4*, plus an *opp-5A* gene encoding a putative peptide-binding protein. With the exception of *opp-4*, the *opp* operons were present in all *S. aureus* strains. Within a single strain, the different *opp* operons displayed little sequence similarity and distinct genetic organization. Transcriptional studies showed that *opp-1*, *opp-2*, *opp-3*, and *opp-4* operons were polycistronic and that *opp-5A* is monocistronic. We designed a minimal chemically defined medium for *S. aureus* RN6390 and showed that all *opp* genes were expressed but at different levels. Where tested, OppA protein production paralleled transcriptional profiles. *opp-3*, which encodes proteins most similar to known peptide transport proteins, displayed the highest expression level and was the only transporter to be regulated by specific amino acids, tyrosine and phenylalanine. Defined deletion mutants in one or several peptide permeases were constructed and tested for their capacity to grow in peptide-containing medium. Among the four putative Opp systems, Opp-3 was the only system able to provide oligopeptides for growth, ranging in length from 3 to 8 amino acids. Dipeptides were imported exclusively by DtpT, a proton-driven di- and tripeptide permease. These data provide a first complete inventory of the peptide transport systems *opp* and *dtpT* of *S. aureus*. Among them, the newly identified Opp-3 appears to be the main Opp system supplying the cell with peptides as nutritional sources.

Oligopeptide permeases (Opp) have been identified in numerous gram-negative and -positive bacteria. These transport systems belong to the superfamily of highly conserved ATP-binding cassette transporters (44). Typically, Opp importers comprise a complex of five proteins. The oligopeptide-binding protein OppA is responsible for the capture of peptides from the external medium. OppA is a periplasmic protein in gram-negative bacteria, whereas it is a lipoprotein in gram-positive bacteria. Two integral transmembrane proteins, OppB and OppC, form a channel through the membrane used for peptide translocation. Two membrane-bound cytoplasmic ATP-binding proteins, OppD and OppF, provide energy for peptide transport.

At a genetic level, the five *opp* genes encoding the transporter are usually organized in an operon, *oppABCDF*. However, gene organization can vary, or one of the *opp* genes may be absent (19). Moreover, the number of peptide-binding protein-encoding genes associated with the *opp* operon is variable from one system to another. The *opp* operons of *Listeria monocytogenes* or *Lactococcus lactis* contain a single copy of *oppA* (6, 46), whereas two, three, and five distinct *oppA* genes are associated with the *opp* operons of *Escherichia coli* (34), *Streptococcus thermophilus* (16), and *Borrelia burgdorferi* (24), respectively.

Opp systems are generally regulated at the transcriptional level. Particular intracellular pools of amino acids, e.g., leucine and alanine in *E. coli* (2) or branched-chain amino acids in *L. lactis* (20), regulate *oppA* expression. Environmental changes have also been shown to influence *opp* expression. For example, transcription of *oppA* genes is induced by a temperature down-shift in *L. monocytogenes* (6) and *Bacillus subtilis* (7); expression of the *E. coli opp* operon is up-regulated under anaerobic conditions (2).

A variety of roles have been described for the bacterial Opp systems. The most obvious one is to supply bacteria with essential amino acids, as demonstrated for lactic acid bacteria (15, 25). Duplication of OppA and/or Opp homologues could be explained as a means of increasing peptide transport efficiency and thereby optimizing nutritional function. Besides nutrition, Opp systems might also be involved in various functions such as cell wall turnover in *E. coli* (34) or peptide-mediated signaling in *B. subtilis* and *Enterococcus faecalis* (28). Opp systems also play a role in virulence of some gram-positive pathogenic bacteria by transporting a specific peptide (called a pheromone) that activates a pleiotropic virulence regulon, as demonstrated in the case of *Bacillus thuringiensis* (18, 43), or by stimulating adherence of pathogenic streptococci to human cells (10, 40).

In *Staphylococcus aureus*, two putative oligopeptide transport systems, Opp-1 and Opp-2 were suggested to play a role in different infection models (5, 9, 29). *S. aureus* is a remarkably versatile pathogen, responsible for a broad spectrum of

* Corresponding author. Mailing address: Unité Bactéries Lactiques et pathogènes Opportunistes, Institut National de la Recherche Agronomique, Domaine de Vilvert, 78352 Jouy en Josas cedex, France. Phone: 33 134 652 395. Fax: 33 134 652 065. E-mail: elise.durant@jouy.inra.fr.

† A. H. and E.B.-D. contributed equally to this work.

▽ Published ahead of print on 11 May 2007.

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

TABLE 1. Primers used for deletion of *opp*-like operons and the *dtpT* gene of *S. aureus* RN6390

Operon or gene to delete	Primer name	Sequence (5′→3′)[a]
opp-1	BoxA-*opp1*-5′	CGGGATCCCCTGAAGGACCGATAACGATGACAC
	BoxA-*opp1*-3′	CGCAACACGTTGCGCCTCTCCGCCCTGATGCAAGTAACATTGCACTC
	BoxB-*opp1*-5′	GTTACTTGCATCAGGGCGGAGAGGCGCAACGTGTTGCGATTGCGCGTGC
	BoxB-*opp1*-3′	CGGGATCCCCCGCATTCGCGAATCCTAAACTC
opp-2	BoxA-*opp2*-5′	CGGGATCCGTCTCCTAAACGATAATGTTACGA
	BoxA-*opp2*-3′	GCCATCCTTAAGAACGCCCCCTCCTTGTGTAAGTTACTAACAC
	BoxB-*opp2*-5′	CTTACACAAGGAGGGGGCGTTCTTAAGGATGGCATGATAGTCG
	BoxB-*opp2*-3′	CGGGATCCGGACCATCAGAAGCATACACACACGC
opp-3	BoxA-*opp3*-5′	CGGGATCCGGTCACTTACTTGGTGCAACAGGTGG
	BoxA-*opp3*-3′	ATTTTTTCTTCTTACCTGCCGATTTCTAAATTTCCATTCCCTTC
	BoxB-*opp3*-5′	GGAAATTTAGAAATCGGCAGGTAAGAAGAAAAAATAATATGCTTTG
	BoxB-*opp3*-3′	CGGGATCCGGTCCAGTAATAAATCCTGTTAAG
opp-4	BoxA-*opp4*-5′	CGGGATCCGCAAGAGCACACTGGGACAAAGC
	BoxA-*opp4*-3′	GCATCCATATCCACGGCCCCATACATATGCCTCCTACTTTC
	BoxB-*opp4*-5′	AGGCATATGTATGGGGCCGTGGATATGGATGCCACCTGC
	BoxB-*opp4*-3′	CGGGATCCCCTGCTGGTCTATTAACATATCCACC
dtpT	BoxA-*dtpT*-5′	CGGGATCCAGCATCAAGGTCGTGACTATTTC
	BoxA-*dtpT*-3′	GCGTTAGTTAAGTACCACCTTTCCCAGAACTCTACAAAG
	BoxB-*dtpT*-5′	GAGTTCTGGGAAAGGTGGTACTTAACTAACGCTTCTGC
	BoxB-*dtpT*-3′	CGGGATCCTGCAGAAATCATTTGTTCACTAGC

[a] BamHI restriction sites are underlined.

human diseases ranging from superficial skin abscesses to serious infections such as pneumonia, endocarditis, and severe sepsis. This bacterium is one of the main agents of nosocomial and food-borne infections, suggesting its great potential for adaptation. Numerous studies have focused on the identification of virulence genes in *S. aureus*. However, no detailed analysis of the *opp* genes of *S. aureus* has been carried out. We initiated a systematic analysis of these transporters. Our results indicate that *S. aureus* encodes four distinct putative Opp systems, which differ from one another on the basis of their (i) genetic organization, (ii) amino acid sequence, (iii) regulation of expression, and (iv) physiological roles.

MATERIALS AND METHODS

Bioinformatic procedures. DNA sequence analysis was performed from the genomes of the *S. aureus* strains JH1 and JH9 (unfinished sequences; accession numbers for JH1, NZ_AAPK00000000 and AAPK00000000; accession numbers for JH9, NZ_AAPL00000000 and AAPL00000000,), NCTC8325 (CP000253 and NC_007795), N315 (25), Mu50 (25), COL (17), MRSA252 (22), MSSA476 (22), MW2 (4), USA300 (13), and RF122 (AJ938182 and NC_007622). Percentages of identity between nucleotide or amino acid sequences were determined using the FASTA sequence comparison program (35) and the AliBee-multiple alignment method (33), respectively. Putative promoter sequences were identified using the BPROM prediction of bacterial promoter program (http://www.softberry.com). Putative terminators of transcription were determined using the RNA secondary structure prediction program (http://www.genebee.msu.su).

Bacterial strain and growth conditions. *S. aureus* RN6390 (36), a derivative of the clinical strain NCTC8325, was grown aerobically with shaking at 37°C in chemically defined medium (CDM) (45), supplemented with biotin (0.1 mg liter^{-1}) and calcium panthotenate (2 mg liter^{-1}). Cultures in CDM were performed either in complete CDM (CM), containing 18 amino acids in their free form, or in minimal CDM (MM) containing 9 amino acids (Glu, Leu, Cys, Met, Gly, Val, Thr, Arg, and Lys). MM medium, designed by studying RN6390 auxotrophy, ensured bacterial growth up to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 2. When required, MM was supplemented with 1% (wt/vol) pancreatic enzyme digest of casein (Bacto Tryptone; Difco Laboratories). Cultures in all CDMs were inoculated with cells grown overnight in CM and washed twice in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8). For peptide utilization experiments, CM was depleted of the essential amino acid glutamic acid that was supplied in a peptide at a glutamic acid final concentration of 3.5 mM. All peptides were from a commercial source (Sigma, St. Louis, MO).

Construction of peptide transport mutants in *S. aureus* RN6390. Peptide transport mutants of *S. aureus* RN6390 were obtained by single or successive gene deletions. In a first step, a recombination cassette was cloned in *E. coli* using an overlap PCR technique (12, 30). Briefly, two fragments (called boxes A and B, corresponding to upstream and downstream regions of the fragment to be deleted, respectively) were amplified by PCR from RN6390 chromosomal DNA using external primers that incorporate terminal BamHI restriction sites and internal primers that contain 16 complementary nucleotides between boxes A and B (12, 30). Nucleotide primers used for PCR amplification are listed in Table 1. PCR products were purified by agarose gel electrophoresis, quantified, mixed at equal concentrations, and used as a template for a second round of PCR using only the two external primers (overlap PCR). The hybrid PCR product (joining boxes A and B and termed boxAB), which corresponds to the recombination cassette, was cloned into the pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen), resulting in plasmid pTOPO::boxAB. The BamHI-boxAB fragment was then purified and cloned into the temperature-sensitive shuttle vector pMAD (3). The resulting plasmid pMAD::boxAB was introduced into *S. aureus* RN4220 by electroporation, and erythromycin-resistant transformants were selected at 30°C, the permissive temperature for plasmid replication. *S. aureus* RN6390 was then transformed with pMAD::boxAB purified from RN4220 transformant. Deletion of the chromosomal region was subsequently obtained by double-crossover events as previously described (39). Chromosomal deletions were checked by PCR and Southern blotting of BclI-digested genomic DNA from mutant and wild-type strains with probes specific for boxes A or B.

Production of anti-OppA antibodies. The *opp-1A*, *opp-3A*, and *opp-4A* genes (deprived of signal sequence codons) were amplified by PCR from chromosomal DNA of *S. aureus* RN6390 using the following primers: *opp-1A*, 5′-CACCAATAAAGGTTTAGAGGAGAAAAAAG-3′ and 5′-TTATTTATACTGCATTTCATTGAATGG-3′; *opp-3A*, 5′-CACCAATGACGATGGTATTTATTCAGATAAAGG-3′ and 5′-TTATTTTTTCTTCTTACCTGTTTC-3′; *opp-4A*, 5′-CACCAGCAGTAATAAAGATGAAGGAGTAAAAG-3′ and 5′-CTAAGCTTCTTTAGTTAAATTATATAAAC-3′. Amplification products were cloned in *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen) using the bacterial expression vector pET100/D-TOPO (Invitrogen) containing a His_6 tag.

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

TABLE 2. Oligonucleotide primers used for RT-PCR

Gene or region	Gene(s)[a]	First primer (5′–3′)	Second primer (5′–3′)
Transcriptional analysis			
opp-1 region	SAOUHSC_02770–SAOUHSC_02768	GCCACAAGCCCATCGTGTTG	CTTACCTTCCAGATGTTGATGCG
	SAOUHSC_02769–*opp-1A*	CAGCGGAAGATAAGTGGCAATGTG	CCAGTACCATCGAACTTTTTAACGCC
	opp-1A–opp-1B	GCCTCGTCCATATGTATTTGTGTCTCC	CCTGTTAATCCAGAAGTCGGC
	opp-1B–opp-1F	GATCGTGCGATACGTTCAGT	CACTTTCTTCTTATGCATCGGTTG
	opp-1F–SAOUHSC_02762	GTGGTAGCGGTAAATCGACG	CTACTCGCTGGACGTGGTGTTGGC
opp-2 region	SAOUHSC_01382–*opp-2B*	CGGCTATGAGGGCGCTGAACTTCGC	GCATGACGGTCACTACTTTCTG
	opp-2B–opp-2F	GTTTACCAGCGTTCTTTATCGG	CAGTATTATCAGTTAGACCTCTG
	opp-2F–SAOUHSC_01376	CCTGATTGGACGATTGAGACCTC	GCATCGCGGAGTTCTTCTTCACTCA
opp-3 region	*opp-3B–opp-3D*	TAGGTGTTGCAGCAGCTACTA	CTACGCCTCTCACTGCCTGC
	opp-3D–opp-3F	GAAGTAAATGATTTGCATGTTTCC	CCCCTTTGTATATATCAAACG
	opp-3F–opp-3A	ACGAAGTGAGAGCGATTGAA	GAGGTGCAAAGGTATTAAGTGC
opp-4 region	*opp-4A–opp-4F*	CATTGAAATTGGAACTGATCAAAG	CAACAGCTTTAACGTACTGAG
	opp-4F–opp-4B	GCACATGAATTTTCAGGTGGAC	CCTAAAGTGAATGCAGGTAA
	opp-4B–opp-4C	CCCGTTTCAAGGTTCTGTTG	GAACAAGTCTTGCAATACCTCC
opp-5A	*opp-5A*	ATGCATTCATCTGGCAAAGACTTA	TTATCGTTCAATCGTTGTTCGATAATCG
opp expression analysis			
opp-1A	*opp-1A*	GCCTCGTCCATATGTATTTGTGTCTCC	CTGCTTGTAAGTATTCTGCTTGTTC
opp-2B	*opp-2B*	GTTTACCAGCGTTCTTTATCGC	GCATGACGGTCACTACTTTCT
opp-3A	*opp-3A*	GAATTAGAAAAGCCGGTTCCATATAT	GGCGAATTCATGGTACTCGCAT
opp-4A	*opp-4A*	CTTAACAGGATTTATTACTGGACC	CTTTTAGGATCTTCTCTAAATCCG
opp-4D	*opp-4D*	CCTCATCAATTATCTGGTGG	CAACAGCTTTAACGTACTGAG
opp-5A	*opp-5A*	CACCACTGTGACGTACCAAGAAGACGG	TTATCGTCAATCGTTGTTCGATAATC

[a] For gene pairs, the PCR product begins in the first gene named and ends in the second.

Production of the Opp-1A, Opp-3A, and Opp-4A His_6-tagged proteins was carried out as follows. Cells were grown to an OD_{600} of 0.5 in Luria-Bertani medium containing ampicillin (50 μg ml^{-1}) at 37°C. Expression of *oppA*-His_6 recombinant genes was induced for 2 h with isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (1 mM). Cells were harvested by centrifugation; resuspended (OD_{600} of 50) in 50 mM NaH_2PO_4, 300 mM NaCl, and 10 mM imidazole; and broken using a cell disrupter system (Constant Systems Ltd). Cell debris was removed by centrifugation, and the supernatant was loaded on a His-select nickel affinity resin column (QIAGEN). The His_6-tagged proteins were eluted with an imidazole gradient (20 to 250 mM). Eluted fractions were subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (26) and analyzed by Western blotting using monoclonal anti-polyhistidine antibody (Sigma, St. Louis, MO). The OppA-His_6 containing fractions were dialyzed against 50 mM NaH_2PO_4 and 300 mM NaCl and used for custom antibody production in guinea pigs (Centre de Production Animale, Olivet, France). Antisera were tested for their specificity and efficiency using known amounts of purified OppA-His_6 proteins. All were highly specific and produced signals with comparable intensities when used at the same dilution.

Preparation of *S. aureus* protein extracts and Western blot analyses. Total cell protein extracts were prepared essentially as described previously (39). Briefly, *S. aureus* cells were harvested by centrifugation, precipitated with 10% (vol/vol) trichloroacetic acid, washed in 80% (vol/vol) acetone, incubated for 90 min at 37°C in the presence of lysostaphin (100 μg ml^{-1}), and lysed with 2% (vol/vol) SDS. Protein concentration was evaluated using a detergent-compatible assay (Bio-Rad). For each sample, 20 μg of total cell protein extract was loaded and separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gels and electrotransferred on Immobilon-FL transfer membrane (Millipore). Opp-1A, Opp-3A, and Opp-4A were detected using corresponding polyclonal guinea pig antibodies (dilution, 1:10,000). Immunodetection was carried out with Alexa Fluor 488 anti-guinea pig immunoglobulin G (Invitrogen), followed by visualization (at 540 nm) using a Fluorimager 595 (Amersham Biosciences). Fluorescence signal was quantified using the Image Quant program (version 5.2; Molecular Dynamics). Each experiment was performed three times with independent protein extracts.

RNA isolation and RT-PCR amplification. Total RNA was extracted from *S. aureus* RN6390 grown in CDM. Cells were sedimented by centrifugation and resuspended in 500 μl of cold TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). Cell suspension was transferred to a microcentrifuge tube containing 0.5 g of glass beads (0.1 mm in diameter), 30 μl of 3 M sodium acetate (pH 5.2), 500 μl of water-saturated phenol-chloroform (5:1), and 30 μl of 10% (vol/vol) SDS. Cells were disrupted using a Fast Prep FP120 system (Bio101 Thermo Electron Corp.). After removal of nonsoluble material (centrifugation at 13,000 × *g* for 15 min at 4°C), RNA was extracted with 1 volume of phenol-chloroform (5:1) and washed in 1 volume of chloroform. Total RNA was purified using a High Pure RNA Isolation kit (Roche). RNA concentration was evaluated by measuring the OD_{260}. Extracts were adjusted to 0.5 μg μl^{-1} and tested for DNA contamination by PCR prior to reverse transcription (RT). Annealing of 2 μg of total RNA with random nonamers (CyScribe cDNA Post labeling Kit; Amersham Biosciences) was performed for 10 min at 20°C after denaturation of RNA secondary structures (5 min at 70°C). cDNA synthesis by RT was accomplished at 42°C for 2 h with PowerScript Reverse Transcriptase and Ultrapure deoxynucleoside triphosphate mix (Clontech/Takara Bioscience), followed by enzyme inactivation (15 min at 70°C). For limit dilution (LD) RT-PCR, serial dilutions (1:1, 1:10, 1:100, 1:500, and 1:1000) of cDNA were performed, followed by amplification of each dilution by PCR using the oligonucleotides listed in Table 2. PCR (30 cycles) was performed as follows: 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 1 to 3 min using a *Taq* Core Kit (Qbiogene). Transcripts of the *hu* gene were used as internal controls (15). Results were quantified when needed using Image Quant software. Each experiment was performed three times.

RP-HPLC analyses. Peptide consumption during growth of RN6390 and mutant derivatives was done in MM supplemented with peptides and was evaluated by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Cells were removed from stationary phase culture medium by centrifugation. Supernatant was supplemented with trifluoroacetic acid (1%, vol/vol), centrifuged, and filtered through 0.22-μm-pore-size filters (Millipore). Peptide separation was carried out at 40°C using an RP18 X-Terra column (250 by 4.6 mm; Waters) at a flow rate of 1 ml min^{-1}. Solvent A was 0.115% (vol/vol) trifluoroacetic, and solvent B was 0.1% (vol/vol) trifluoroacetic acid plus 60% (vol/vol) acetonitrile in MilliQ water. A 5-min isocratic phase in solvent A was followed by a linear gradient of solvent B (0 to 60% within 40 min). Eluted peptides were detected by UV detection at the OD_{214}.

RESULTS

***S. aureus* harbors four distinct putative oligopeptide permease systems.** Computational analysis of the 11 available genomic DNA sequences of *S. aureus* strains revealed the presence of four distinct putative *opp* operons (Fig. 1). The *opp-1ABCDF* (genes SAOUHSC_02767 to SAOUHSC_02763) and *opp-2BCDF* (SAOUHSC_01380 to SAOUHSC_01377) operons have already been identified in *S. aureus* RN6390, a

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

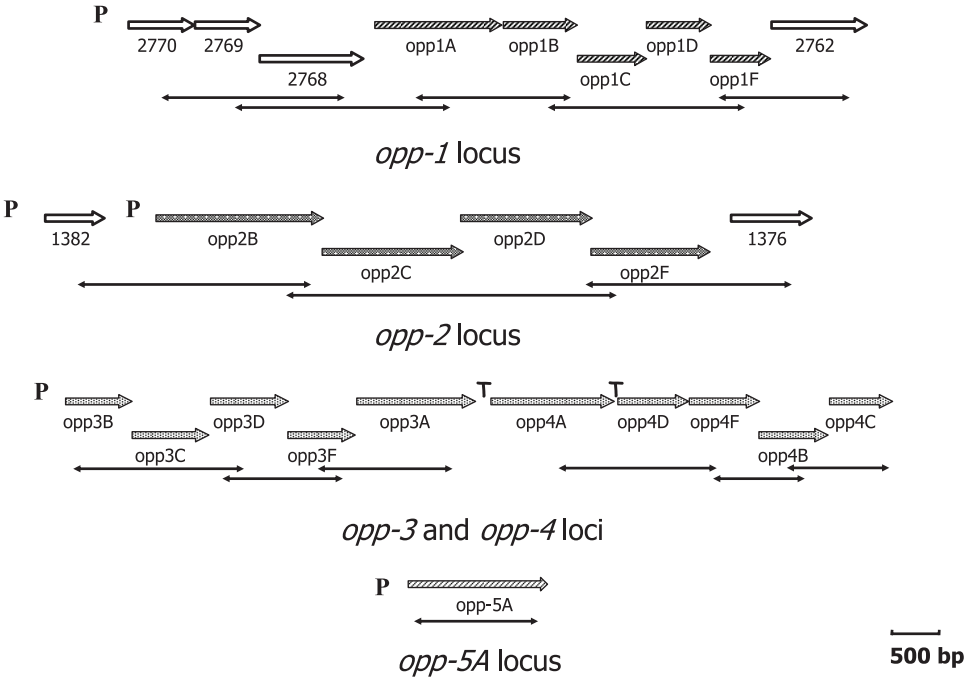


FIG. 1. Genetic and transcriptional organization of the *S. aureus* NCTC8325 *opp* systems. The *opp* genes were designated according to their homology with characterized bacterial *opp* genes. Gene numbers were adapted from the genomic DNA sequence annotation of *S. aureus* NCTC8325 (accession numbers CP000253 and NC_007795). Open reading frames adjacent to the represented loci are present on the opposite strand. Double arrows indicate the amplification products obtained during RT-PCR experiments (see Results). Primers for transcriptional analysis are listed in Table 2. P, putative promoter sequence; T, putative terminator of transcription.

derivative of the NCTC8325 sequenced strain (9). By sequence homology searches using the *opp-1* sequence of NCTC8325, we found two additional adjacent *opp* operons, *opp-3* (genes SAOUHSC_00923 to SAOUHSC_00927) organized as *oppBCDFA*, and *opp-4* (genes SAOUHSC_00928 to SAOUHSC_00932) organized as *oppADFBC* and located 212 bp downstream of *opp-3*. An additional isolated *oppA*-like gene (gene SAOUHSC_00201) encoding a putative oligopeptide binding protein, Opp-5A, was also identified in all strains. Organization of these *opp* systems is poorly conserved from one system to another. This is also the case for their amino acid sequence. For example, four putative OppA proteins of NCTC8325 share about 28% identity (Table 3), while transmembrane proteins, or ATPase proteins, each share between 27 and 35% identity. All the OppA proteins carry the typical signature of bacterial extracellular solute-binding proteins, and all OppD and OppF proteins carry the ABC transporter signature sequence (42, 44).

Each *opp* cluster is highly conserved between strains of *S. aureus*, with identity in most cases greater than 99% at the nucleotide level. One exception is *opp-4*, which is interrupted by a transposase gene in *opp-4A* of *S. aureus* MRSA252 (the most genetically diverse human strain) and absent from strain RF122 (isolated from bovine mastitis). Surprisingly, the RF122 genome appears to have a duplication of the *opp-3* cluster: an *opp* cluster located 169 nucleotides downstream of *opp-3* displays the same genetic organization and encodes proteins closely related to Opp-3 proteins. Nevertheless, two stop codons are present in the *oppA* gene of this additional *opp* cluster, leading to a nonfunctional OppA protein. Finally, one of the 11 sequenced strains of *S. aureus*, USA300 (a highly virulent isolate), contains a fifth *oppABCDF* operon in a novel mobile genetic element termed ACME that is absent from other sequenced *S. aureus* strains (13).

TABLE 3. Identity (%) between the OppA proteins of *S. aureus* NCTC8325

Protein	% Identity with the indicated protein of strain NCTC8325			
	Opp-1A	Opp-3A	Opp-4A	Opp-5A
Opp-1A		27.5	29	26
Opp-3A			28.5	30
Opp-4A				29

A search for homologs of *S. aureus* Opp proteins revealed that *opp-1*, *opp-2*, *opp-3*, and *opp-5A* are highly conserved in *Staphylococcus epidermidis*, the second clinically important staphylococcal species (Table 4). Moreover, Opp-3 is also detected in all other sequenced staphylococcal species, namely *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus saprophyticus*. Interestingly, Opp systems that have been shown to be implicated in bacterial nutrition in *L. lactis*, *L. monocytogenes*, and *Streptococcus agalactiae* are most similar to the *S. aureus* Opp-3 system (6, 27, 40) (Table 4).

All Opp systems are expressed during growth in CDM. Expression of the different *opp* genes of *S. aureus* RN6390 was analyzed in exponential MM cultures by semiquantitative RT-PCR using specific *opp* primers. All *oppA* genes were expressed (Fig. 2A), and similar results were also obtained for the expression of other *opp* genes (data not shown). Their expression

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

TABLE 4. Identity between Opp proteins of *S. aureus* NCTC8325 and those from other gram-positive bacteria

S. aureus Opp protein[a]	% Identity with protein from:							
	S. epidermidis	*S. haemolyticus*	*S. saprophyticus*	*B. halodurans*[b]	*B. thuringiensis*	*L. monocytogenes*	*S. agalactiae*	*L. lactis*[c]
1A	82			54				
1B/C	80			54				
1D/F	68			47				
2B/C	68							
2D/F	57							
3A	66	68	61		42	40	39	35
3B/C	87	89	85		58	54	51	45
3D/F	85	88	86		66	65	66	59
4A				32				
4B/C				42				
4D/F				53				
5A	57		62					

[a] Values indicated for OppB/C and OppD/F correspond to the means of the percent identities of the transmembrane (OppB and OppC) and the ATP-binding (OppD and OppF) proteins. Identities of <30 % were not considered.
[b] *B. halodurans*, *Bacillus halodurans*.
[c] Values are for percent identities between Opp-3 proteins of *S. aureus* and Opt proteins of *L. lactis*.

levels depended on the *opp* system under study. Under our experimental conditions and assuming that messenger stabilities are comparable, the *opp-3A* gene was apparently the most highly expressed *oppA*. To verify these observations, we evaluated the production of the three binding proteins Opp-1A, Opp-3A, and Opp-4A by Western-blot analyses using specific antibodies. The expression level depended on the protein (Fig. 2B), with a predominant production of Opp-3A. These results correlated with the observed levels of *opp-1A*, *opp-3A*, and *opp-4A* transcripts.

We performed further RT-PCR transcriptional analysis on total RNA extracted from *S. aureus* RN6390 cells grown in MM to examine operon expression (Fig. 1). Results indicated that genes SAOUHSC_02770 to SAOUHSC_02762, comprising the *opp-1* genes, are organized in an operon and are transcribed polycistronically. This would be expected from examination of the *opp-1ABCDF* cluster in *S. aureus* NCTC8325 as (i) transcriptional signals upstream and downstream of *opp* genes were not found, and (ii) codirectional ORFs are present upstream and downstream of the *opp* genes (Fig. 1). According to *S. aureus* NCTC8325 genome annotation, SAOUHSC_02770 was referenced as the diaminopimelate epimerase DapF, SAOUHSC_02769 as the Zn-dependent alcohol deshydrogenase AdhP, SAOUHSC_02768 as a conserved hypothetical protein of unknown function, and SAOUHSC_02762 as AraJ, an arabinose efflux permease.

Transcriptional coupling of SAOUHSC_01376 and *opp-2BCDF* was consistent with the absence of a transcriptional terminator downstream of *opp-2F* (Fig. 1). Cotranscription of SAOUHSC_01382 with *opp-2BCDF*, despite a putative promoter sequence upstream of *opp-2B*, presumably results from the absence of a terminator downstream of SAOUHSC_01382.

The *opp-3BCDFA* cluster contained a putative promoter sequence in front of *opp-3B* and a transcriptional terminator downstream of *opp-3A* (-14.6 kcal mol^{-1}). These features are in agreement with a polycistronic transcription of the *opp-3* genes and the lack of evidence for cotranscription of *opp-3* and *opp-4* (no RT-PCR product could be obtained between *opp3A* and *opp4A* genes).

In the case of *opp-4*, RT-PCR results indicated transcriptional coupling of *opp-4ADFBC*, despite the presence of a terminator structure in the noncoding region between *opp-4A* and *opp-4D* (-16.8 kcal mol^{-1}). No consensus promoter was

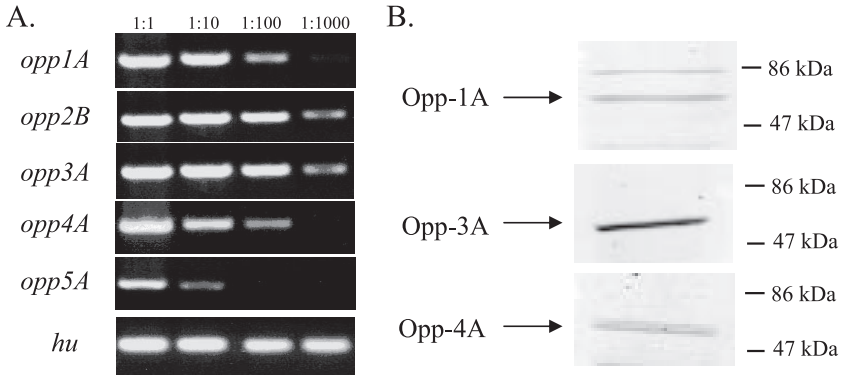


FIG. 2. Expression of *opp* genes and production of OppA proteins in *S. aureus* RN6390 grown in MM. Proteins and RNA were extracted in exponential growth phase (OD_{600} of 0.5). (A) *opp* transcription analyzed by RT-PCR. cDNA dilutions used for transcript quantification were 1:1, 1:10, 1:100, and 1:1,000. *hu* transcript was used as an internal standard. (B) OppA production analyzed by Western blotting. Opp-1A, Opp-3A, and Opp-4A proteins were detected at their expected sizes of 58, 59, and 62 kDa, respectively.

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

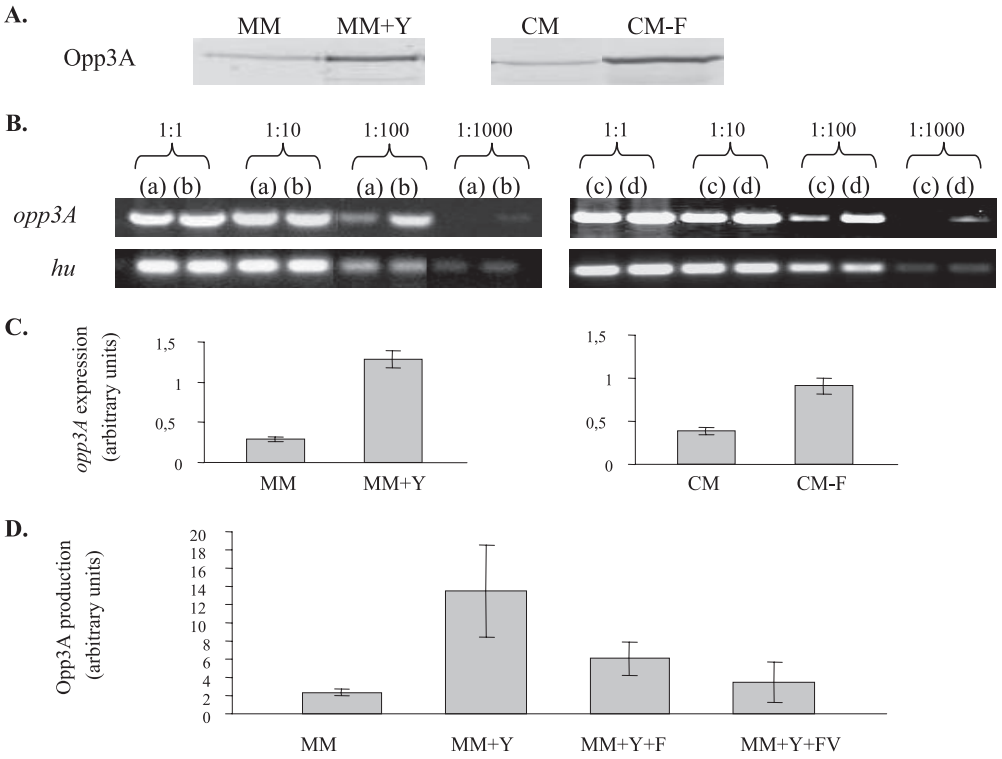


FIG. 3. Regulation of Opp-3A by the amino acid content of the medium. Proteins and RNA were extracted in exponential phase of growth (OD_{600} of 0.5). (A) Opp-3A production analyzed by Western blotting. Opp-3A was detected at the expected size of 59 kDa. MM+Y, MM supplemented with Tyr; CM-F, CM depleted of Phe. (B) *opp-3A* transcription analyzed by RT-PCR. cDNA dilutions used for transcript quantification were 1:1, 1:10, 1:100, and 1:1,000. *hu* transcript was used as an internal standard. a, MM; b, MM+Y; c, CM; d, CM-F. (C) Quantification of *opp-3A* transcripts. Values are the means of three independent experiments with standard deviations. Transcripts were quantified using the 1:100 dilution samples. For each experiment, the amount of *opp-3A* transcript was given as a ratio to that of *hu*. (D) Quantification of Opp-3A production. Proteins were extracted in exponential growth phase in MM (OD_{600} of 0.5). Values are the means of five independent determinations with standard deviations. MM+Y, MM supplemented with Tyr; MM+Y+F, MM supplemented with Tyr and Phe; MM+Y+FV, MM supplemented with Tyr and the dipeptide Phe-Val.

predicted in front of *opp-4A*, which might explain the weak expression levels for *opp-4A*.

No transcriptional terminators were detected in the noncoding regions downstream of clusters containing *opp-1*, *opp-2*, *opp-4*, and *opp-5A*. However, downstream open reading frames were all divergently transcribed, thus circumscribing the *opp* transcriptional units.

Expression of *opp-3* but not other operons is modulated by aromatic amino acids. Previous results revealed that the *S. aureus opp* operons were not equally expressed during growth in CDM, suggesting specific transcriptional regulatory mechanisms. In several bacteria, *opp* expression is known to be regulated by nitrogen sources, including specific amino acids (1, 2, 20). Therefore, the possible effect of free amino acids on production of *S. aureus* Opp transporters was investigated. Two complementary approaches were developed. Oligopeptide-binding protein production was estimated by Western blot experiments in exponential phase cultures, either in MM supplemented with one of the nine nonessential amino acids (Pro, Ala, Ile, Phe, Trp, Tyr, Ser, Asn, and His) or in CM depleted of one of these amino acids. The external amino acid pool affected the protein production of Opp-3A only: addition of Tyr to MM and removal of Phe from CM significantly ($P < 0.001$) increased (about sixfold) Opp-3A production (Fig. 3A).

To ascertain the effects of the amino acids Tyr and Phe, a semiquantitative transcriptional analysis (LD RT-PCR) was performed on all *opp* systems using the primers listed in Table 2. RNA was extracted from mid-exponential cultures in MM supplemented or not with Tyr and in CM depleted or not of Phe. Only expression of *opp-3* was affected by the presence of Tyr in MM or by the removal of Phe from CM (Fig. 3B). Amounts of *opp-3A* mRNA were ~5-fold higher in cells grown in Tyr-supplemented MM than in MM and ~2.5-fold higher in Phe-deprived CM than in CM (Fig. 3C). Similar results were obtained using *opp-3C* primers (data not shown), in agreement with the cotranscription of the *opp-3BCDFA* genes.

These results indicate that Tyr and Phe exert opposite effects on *opp-3* expression. Surprisingly, addition of Phe to MM did not affect the production of Opp-3A (data not shown). A possible explanation is that only Tyr affects *opp-3* expression, whereas Phe acts as a competitor, preventing the action of Tyr. To evaluate this hypothesis, we compared Opp-3A production in MM supplemented with Tyr or with both Tyr and Phe. In the presence of Phe, stimulation of Opp-3A production by Tyr was significantly reduced (Fig. 3D), which therefore supports the hypothesis of a competitive effect of Phe on Tyr induction. Phe might impair Tyr entry into the cell (competition for transport by the same amino acid permease) or prevent its binding to an

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

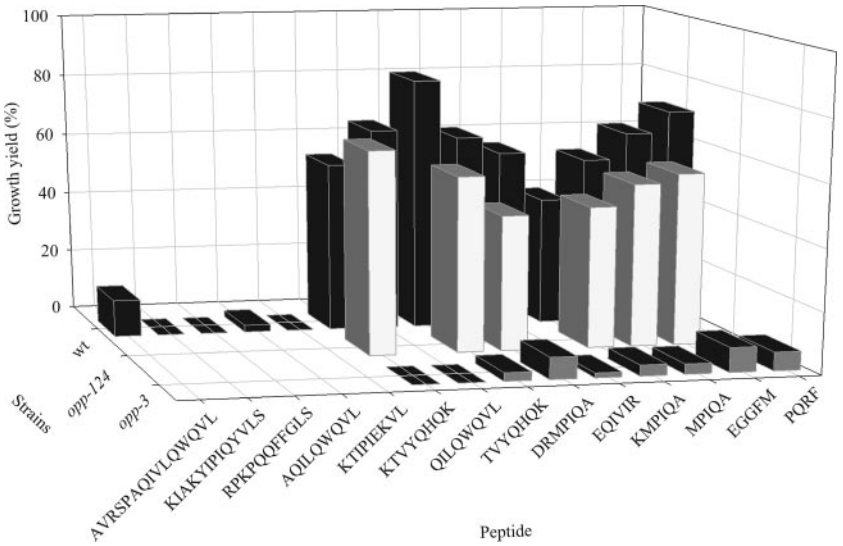


FIG. 4. Peptide utilization by wild-type and *opp* mutant strains of *S. aureus*. Growth yield was calculated as the percentage of population (final OD) reached in peptide-containing medium compared to CM in the stationary phase of growth. QILQWQWL, EQVIR, and PQRF peptides were not tested on the *opp-1 opp-2 opp-4* (*opp-124*) mutant strain. wt, wild type.

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

intracellular target. To further discriminate between these hypotheses, Opp-3A production was compared in MM containing Tyr and supplemented with Phe brought either in its free form or in a dipeptide form. The inhibitory effect of Phe was in the same range under either condition (Fig. 3D), thus favoring the hypothesis that Phe is likely to compete with Tyr for an intracellular target.

Altogether, these results indicate that *opp-3* operon transcription is influenced by the aromatic amino acids Tyr and Phe and suggest that the two amino acids might compete for an intracellular target.

Depletion of Opp-3, but not other Opp proteins, prevents growth of *S. aureus* in peptide-containing CDM. As all Opp systems were expressed during growth in CDM, this medium was suitable to evaluate involvement of Opp systems in nitrogen nutrition. This was estimated by replacing an essential amino acid by a peptide containing the amino acid. As expected, removal of Glu and Gln from the complete CDM prevented growth of *S. aureus* RN6390. Glu (or Gln)-containing peptides from 2 to 8 amino acid residues were able to sustain growth. In contrast, no growth could be detected when medium was supplemented with peptides containing 9 amino acid residues or more (Fig. 4). These results suggest that (i) at least one of the Opp systems was able to fulfill the amino acid requirement of the strain and (ii) *S. aureus* was unable to use peptides larger than octapeptides for nutrient purposes.

To determine which of the systems is involved in nutrient uptake, the different *opp* operons were deleted by double-crossover events, resulting in the *opp-1*, *opp-2*, *opp-3*, and *opp-4* mutant strains. Combinations of deletions were also constructed, and the *opp-1 opp-2 opp-4* triple mutant strain was also obtained. Growth of each mutant was similar to that of the parental strain in complete CDM (data not shown). Deletion of *opp-1*, *opp-2*, or *opp-4* alone or in combination did not affect the ability of *S. aureus* RN6390 to use tested peptides as nutrients, regardless of the peptide length. In contrast, deletion of *opp-3* fully impaired the use of 4-mer to 8-mer peptides as a source of Glu/Gln (Fig. 4).

Interestingly, all dipeptides and most tripeptides were able to sustain growth of the *opp* mutants, regardless of the inactivated system. As a di- or tripeptide permease-like gene (*dtpT*) is present in all *S. aureus* genomes (SAOUHSC_00738 of *S. aureus* NCTC8325), this transporter is very likely involved in di- and tripeptide uptake. To evaluate the respective roles of DtpT and Opp in nutrient di- and tripeptide utilization, *dtpT*, *opp-3 dtpT*, *opp-1 opp-2 opp-4 dtpT*, and *opp-1 opp-2 opp-3 opp-4 dtpT* mutant strains were constructed, and their ability to utilize di- or tripeptides for growth was evaluated. The mutant strain *dtpT* did not grow when Glu/Gln was provided in a dipeptide form, indicating that DtpT only is responsible for the use of dipeptides (Fig. 5). Of the four tripeptides tested, Pro-His-Glu was imported exclusively by Opp-3, Lys-Glu-Gly and Gly-Gly-Gln were used by DtpT only, and Ser-Glu-Gly was imported by both systems, as only the double deletion *opp-3 dtpT* impaired the growth (Fig. 5).

To complete this study with a larger range of peptides, *dtpT* and combined *opp dtpT* mutant strains were grown in MM supplemented with a pancreatic digest of caseins containing a large mix of peptides. All strains grew equally well, as the casein digest also contained a large amount of free amino acids. A control RT-PCR experiment indicated that the four *opp* systems of the wild-type strain were expressed (data not shown). The peptide content of the medium from stationary phase cultures was analyzed by RP-HPLC. No difference in peptide content was detectable between medium from the *dtpT* mutant and *opp-1 opp-2 opp-4 dtpT* mutant strains (data not shown). Chromatograms could be superimposed, suggesting that the peptide contents were qualitatively and quantitatively comparable. In contrast, several peaks were detected in growth medium of the *opp-3 dtpT* mutant (Fig. 6). Moreover, some of the common peaks were present in larger amounts in the *opp-3*

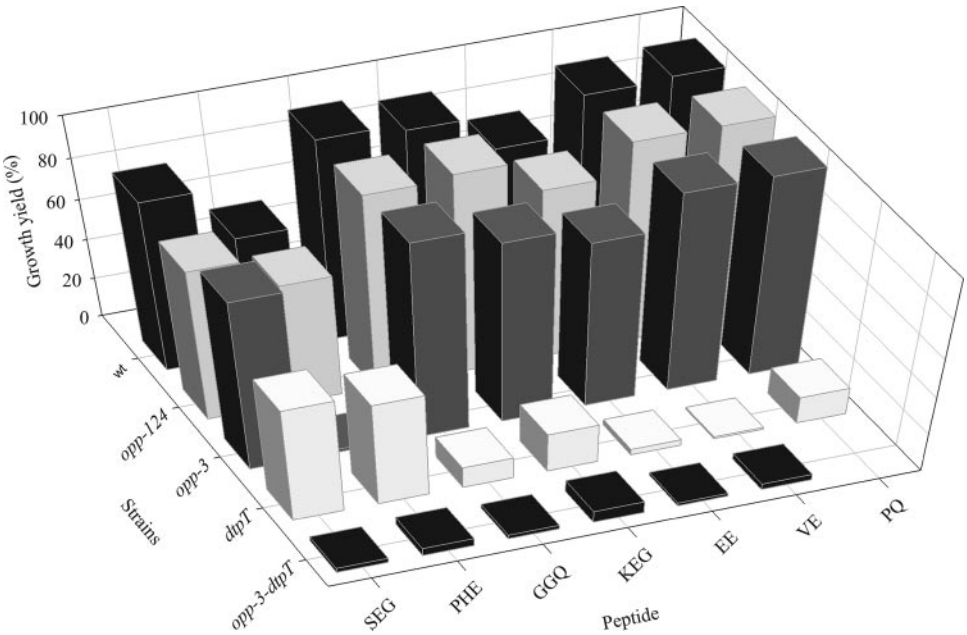


FIG. 5. Di- and tripeptide utilization by *opp-3* and *dtpT* mutants of *S. aureus*. Growth yield was calculated as the percentage of population (final OD) reached in peptide-containing medium compared to CM in the stationary phase of growth. wt, wild type.

dtpT culture medium. This situation most probably corresponded to coeluting peptides, of which one accumulated with the *opp-3 dtpT* mutant only. Similar profiles were obtained with the *opp-1 opp-2 opp-3 opp-4 dtpT* mutant strain (data not shown). Altogether, these results indicate a prevalent role of Opp-3 in oligopeptide utilization during growth of *S. aureus* RN6390. Among the 4 putative Opp systems of *S. aureus*, only Opp3 is involved in nutrition, transporting efficiently tri- to octapeptides with overlapping substrate specificity with DtpT concerning some tripeptides.

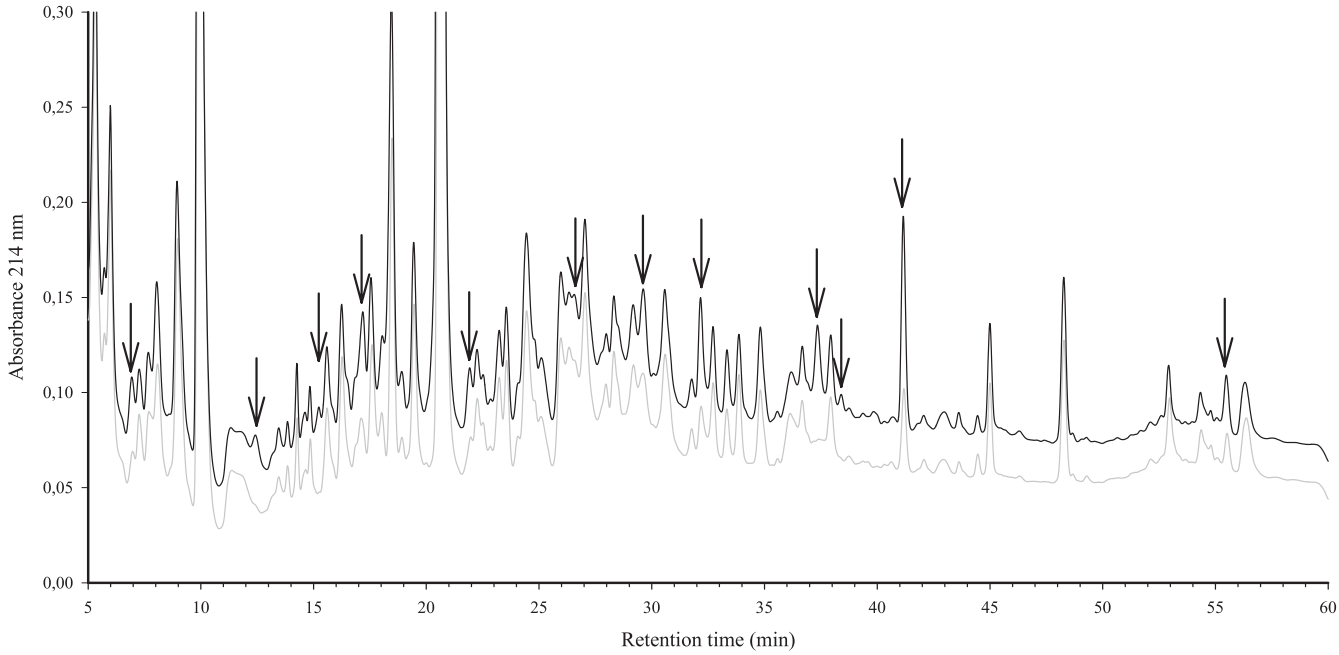


FIG. 6. Peptide content of the growth medium of *S. aureus dtpT* and *opp-3 dtpT* mutants. Cells were grown in CM supplemented with casein-derived peptides to the stationary phase, and peptide content of the external medium was analyzed by RP-HPLC. From bottom to top, the strains are the *dtpT* and *opp-3 dtpT* mutants. Arrows highlight main peaks that were detected at higher levels or only in the culture medium of the *opp-3 dtpT* mutant.

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

DISCUSSION

Genome analysis of 11 *S. aureus* strains revealed the presence of three putative complete Opp systems, Opp-1, Opp-3, and Opp-4, of which two, Opp-3 and Opp-4, are described for the first time. Each of them comprises a peptide-binding protein, two integral membrane proteins, and two ATPases. They all have the signatures of oligopeptide/dipeptide/nickel transport systems. In addition, the 11 sequenced *S. aureus* strains express a particular *opp* operon, *opp-2BCDF*, which lacks the substrate-binding protein. This system could act as an exporter, as export systems usually do not require a substrate-binding component needed for uptake (21). However, as Opp-2 is classified as an importer in the ABCISSE database (41), it is also possible that it recruits one of the four OppA proteins for peptide binding. Several Opp systems recruit peptide-binding protein(s) encoded by isolated genes located in another region of the genome (16, 34). In the case of Opp-2, a candidate partner is encoded by the orphan gene *opp-5A*. This suggestion is not supported by previous studies, as (i) in other cases, at least one *oppA* copy was also present within the operon, which is not observed with *S. aureus opp-2*; (ii) with the exception of the closely related species *S. epidermidis*, the unusual structure of the *opp-2* operon in *S. aureus* has not been reported in other bacterial genomes; and (iii) isolated peptide-binding proteins utilizing an Opp complex share significant homologies with the OppA protein encoded by the *opp* operon (16, 34). This is clearly not the case for Opp-5A, which revealed weak homologies with Opp-1A, Opp-3A, and Opp-4A (26, 30, and 29% identity, respectively). The roles of the atypical Opp-2 system and Opp-5A binding-protein thus remain to be determined.

Within a given strain, the *opp* operons display specific genetic organization and low degrees of sequence similarity. In contrast, each of the *opp* operons is highly conserved in all *S. aureus* strains, with the exception of *opp-4*, which is absent in RF122, altered in MRSA252, and missing from the *S. epidermidis* genome. These features and the low expression level of *opp-4* observed under different conditions suggest that this system might be involved in biological processes specific to certain staphylococci.

S. aureus is predicted to possess four distinct potential Opp systems. This multiplicity raises questions as to whether they have overlapping or distinct functions. One of the demonstrated roles of bacterial Opp systems is to provide peptides as nutrients. This study demonstrates that Opp-3 only is responsible for this nutritional function. Interestingly, Opp-3 is closer to bacterial Opp permeases involved in nutrient uptake than the other staphylococcal Opp systems (Table 1). The best documented nutritional oligopeptide transport system is by far the lactococcal Opp system. It transports peptides from 4 to up to 35 residues with little amino acid sequence specificity (14). Despite a more restricted capability in terms of peptide length (from 3 to 8 residues), the Opt system of *L. lactis* also seems to be characterized by broad substrate specificity (27), a feature that seems to be common to Opp systems involved in bacterial nutrition. From the results presented here, Opp-3 from *S. aureus* is capable of using peptides comprising 3 to 8 amino acid residues having unrelated sequence or biochemical features, which is in agreement with its nutritional function. In terms of preferences for peptide utilization, the staphylococcal Opp-3 system appears closer to Opt from *L. lactis* or Opp from *S. agalactiae* than to Opp or Ami from *L. lactis* and *S. thermophilus*, respectively (14, 16, 27, 40). These results are in concordance with sequence similarities (Table 4).

Opp-3 is the sole Opp system of *S. aureus* ensuring a nutritional function under the tested conditions. It is also the only staphylococcal Opp system whose expression was modulated by amino acids. In bacteria, nitrogen sources are known to regulate *opp* expression (31). For instance, *E. coli* K-12 *opp* expression is regulated by leucine, via the global regulator Lrp (8). Similarly, another global regulator, CodY, represses *L. lactis opp* expression in response to the intracellular pool of branched-chain amino acids (20). Nevertheless, regulation of *opp* genes by aromatic amino acids (as is the case for *S. aureus opp-3*) was not previously described. Aromatic amino acid regulation was previously demonstrated for other genes. The best documented case is the *tyrR* regulon of *E. coli* (37). TyrR is a transcriptional regulator that interacts with aromatic amino acids and binds to a specific DNA sequence. No TyrR homologue was found in the *S. aureus* genomes, thus making a regulatory pathway via TyrR unlikely in *S. aureus*. However, by using the dedicated program iMoMi (for interactive motif mining) (38), a putative regulatory binding motif was detected. It consisted of a 14-nucleotide repeated sequence located at −219 and −236 nucleotides upstream of the *opp-3B* start codon. This putative regulatory sequence was detected upstream of only one other gene among all available *S. aureus* genomes. The gene, SAOUHSC_02729 of *S. aureus* NCTC8325, encodes a putative amino acid transporter whose expression was also induced by Tyr, as revealed by LD RT-PCR analyses (data not shown). These preliminary data suggest a regulatory network implicating aromatic amino acids, oligopeptides, and amino acid transporter(s).

What are the roles of the other Opp systems? Opp-1, Opp-2, and Opp-4 are not involved in nutrient supply of *S. aureus*, at least under our experimental conditions. We cannot exclude the possibility that they can import nutritional peptides under different conditions, especially in the case of Opp-4, which was weakly expressed under all conditions tested. Alternatively, some of them could also be involved in the uptake of substrates other than peptides. Interestingly, Opp-1A is 35% identical to NikA from *E. coli* which has been experimentally shown to transport nickel (11, 32), whereas similarities to confirmed oligopeptide-binding proteins are lower (e.g., 22% with AmiA3 from *S. thermophilus* and 24% with OppA from *L. lactis*). *S. aureus* Opp-1A is also 39% identical to Gbs1577 of *S. agalactiae*, a binding protein of a putative peptide transporter that appeared not to be required for nitrogen nutrition and revealed similarity with Ni^{2+} permeases (40). Transcriptional analysis of the *opp-1* region showed that additional genes were coexpressed with the *opp-1* genes, in correlation with their genomic organization. The corresponding proteins could be linked to the Opp-1 function. One of them (SAOUHSC_02770) encodes a protein homologous to DapF, a central enzyme in the biosynthesis pathways of both lysine and cell wall peptidoglycan in some bacterial species (23, 47). This could make sense as the *E. coli* Opp system has been shown to be involved in peptidoglycan turnover (34). Peptide uptake systems are also involved in other cellular functions, and the Opp-1 and Opp-2 systems have been suggested to play a role in virulence

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

in different animal models (5, 9, 29). Nevertheless, the exact contribution of these systems in the course of infection is unknown and remains to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to A. Gruss and D. Lechardeur for critical reading of the manuscript, N. Pons for technical assistance in computer analysis, and E. Guedon for helpful discussions.

A.H. received a fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

REFERENCES

1. **Andrews, J. C., T. C. Blevins, and S. A. Short.** 1986. Regulation of peptide transport in *Escherichia coli*: induction of the *trp*-linked operon encoding the oligopeptide permease. J. Bacteriol. **165:**428–433.
2. **Andrews, J. C., and S. A. Short.** 1986. *opp-lac* operon fusions and transcriptional regulation of the *Escherichia coli trp*-linked oligopeptide permease. J. Bacteriol. **165:**434–442.
3. **Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille.** 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. Appl. Environ Microbiol. **70:**6887–6891.
4. **Baba, T., F. Takeuchi, M. Kuroda, H. Yuzawa, K. Aoki, A. Oguchi, Y. Nagai, N. Iwama, K. Asano, T. Naimi, H. Kuroda, L. Cui, K. Yamamoto, and K. Hiramatsu.** 2002. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet **359:**1819–1827.
5. **Begun, J., C. D. Sifri, S. Goldman, S. B. Calderwood, and F. M. Ausubel.** 2005. *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. Infect. Immun. **73:**872–877.
6. **Borezee, E., E. Pellegrini, and P. Berche.** 2000. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. Infect. Immun. **68:**7069–7077.
7. **Budde, I., L. Steil, C. Scharf, U. Volker, and E. Bremer.** 2006. Adaptation of *Bacillus subtilis* to growth at low temperature: a combined transcriptomic and proteomic appraisal. Microbiology **152:**831–853.
8. **Calvo, J. M., and R. G. Matthews.** 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. **58:**466–490.
9. **Coulter, S. N., W. R. Schwan, E. Y. Ng, M. H. Langhorne, H. D. Ritchie, S. Westbrock-Wadman, W. O. Hufnagle, K. R. Folger, A. S. Bayer, and C. K. Stover.** 1998. *Staphylococcus aureus* genetic loci impacting growth and survival in multiple infection environments. Mol. Microbiol. **30:**393–404.
10. **Cundell, D. R., B. J. Pearce, J. Sandros, A. M. Naughton, and H. R. Masure.** 1995. Peptide permeases from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eucaryotic cells. Infect. Immun. **63:**2493–2498.
11. **de Pina, K., C. Navarro, L. McWalter, D. H. Boxer, N. C. Price, S. M. Kelly, M. A. Mandrand-Berthelot, and L. F. Wu.** 1995. Purification and characterization of the periplasmic nickel-binding protein NikA of *Escherichia coli* K12. Eur. J. Biochem. **227:**857–865.
12. **Derbise, A., B. Lesic, D. Dacheux, J. M. Ghigo, and E. Carniel.** 2003. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **38:**113–116.
13. **Diep, B. A., S. R. Gill, R. F. Chang, T. H. Phan, J. H. Chen, M. G. Davidson, F. Lin, J. Lin, H. A. Carleton, E. F. Mongodin, G. F. Sensabaugh, and F. Perdreau-Remington.** 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet **367:**731–739.
14. **Doeven, M. K., R. Abele, R. Tampe, and B. Poolman.** 2004. The binding specificity of OppA determines the selectivity of the oligopeptide ATP-binding cassette transporter. J. Biol. Chem. **279:**32301–32307.
15. **Fournier, B., A. Klier, and G. Rapoport.** 2001. The two-component system ArlS-ArlR is a regulator of virulence gene expression in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. **41:**247–261.
16. **Garault, P., D. Le Bars, C. Besset, and V. Monnet.** 2002. Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. J. Biol. Chem. **277:**32–39.
17. **Gill, S. R., D. E. Fouts, G. L. Archer, E. F. Mongodin, R. T. Deboy, J. Ravel, I. T. Paulsen, J. F. Kolonay, L. Brinkac, M. Beanan, R. J. Dodson, S. C. Daugherty, R. Madupu, S. V. Angiuoli, A. S. Durkin, D. H. Haft, J. Vamathevan, H. Khouri, T. Utterback, C. Lee, G. Dimitrov, L. Jiang, H. Qin, J. Weidman, K. Tran, K. Kang, I. R. Hance, K. E. Nelson, and C. M. Fraser.** 2005. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and a biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. J. Bacteriol. **187:**2426–2438.
18. **Gominet, M., L. Slamti, N. Gilois, M. Rose, and D. Lereclus.** 2001. Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence. Mol. Microbiol. **40:**963–975.
19. **Green, R. M., A. Seth, and N. D. Connell.** 2000. A peptide permease mutant of *Mycobacterium bovis* BCG resistant to the toxic peptides glutathione and *S*-nitrosoglutathione. Infect. Immun. **68:**429–436.
20. **Guédon, E., P. Serror, S. D. Ehrlich, P. Renault, and C. Delorme.** 2001. Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. Mol. Microbiol. **40:**1227–1239.
21. **Higgins, C. F.** 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. Res. Microbiol. **152:**205–210.
22. **Holden, M. T., E. J. Feil, J. A. Lindsay, S. J. Peacock, N. P. Day, M. C. Enright, T. J. Foster, C. E. Moore, L. Hurst, R. Atkin, A. Barron, N. Bason, S. D. Bentley, C. Chillingworth, T. Chillingworth, C. Churcher, L. Clark, C. Corton, A. Cronin, J. Doggett, L. Dowd, T. Feltwell, Z. Hance, B. Harris, H. Hauser, S. Holroyd, K. Jagels, K. D. James, N. Lennard, A. Line, R. Mayes, S. Moule, K. Mungall, D. Ormond, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, K. Rutherford, M. Sanders, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, S. Whitehead, B. G. Barrell, B. G. Spratt, and J. Parkhill.** 2004. Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101:**9786–9791.
23. **Koo, C. W., and J. S. Blanchard.** 1999. Chemical mechanism of *Haemophilus influenzae* diaminopimelate epimerase. Biochemistry **38:**4416–4422.
24. **Kornacki, J. A., and D. B. Oliver.** 1998. Lyme disease-causing *Borrelia* species encode multiple lipoproteins homologous to peptide-binding proteins of ABC-type transporters. Infect. Immun. **66:**4115–4122.
25. **Kuroda, M., T. Ohta, I. Uchiyama, T. Baba, H. Yuzawa, I. Kobayashi, L. Cui, A. Oguchi, K. Aoki, Y. Nagai, J. Lian, T. Ito, M. Kanamori, H. Matsumaru, A. Maruyama, H. Murakami, A. Hosoyama, Y. Mizutani-Ui, N. K. Takahashi, T. Sawano, R. Inoue, C. Kaito, K. Sekimizu, H. Hirakawa, S. Kuhara, S. Goto, J. Yabuzaki, M. Kanehisa, A. Yamashita, K. Oshima, K. Furuya, C. Yoshino, T. Shiba, M. Hattori, N. Ogasawara, H. Hayashi, and K. Hiramatsu.** 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet **357:**1225–1240.
26. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227:**680–685.
27. **Lamarque, M., P. Charbonnel, D. Aubel, J. C. Piard, D. Atlan, and V. Juillard.** 2004. A multifunction ABC transporter (Opt) contributes to diversity of peptide uptake specificity within the genus *Lactococcus*. J. Bacteriol. **186:**6492–6500.
28. **Lazazzera, B. A.** 2001. The intracellular function of extracellular signaling peptides. Peptides **22:**1519–1527.
29. **Mei, J. M., F. Nourbakhsh, C. W. Ford, and D. W. Holden.** 1997. Identification of *Staphylococcus aureus* virulence genes in a murine model of bacteraemia using signature-tagged mutagenesis. Mol. Microbiol. **26:**399–407.
30. **Misulovin, Z., X. W. Yang, W. Yu, N. Heintz, and E. Meffre.** 2001. A rapid method for targeted modification and screening of recombinant bacterial artificial chromosome. J. Immunol. Methods **257:**99–105.
31. **Monnet, V.** 2003. Bacterial oligopeptide-binding proteins. Cell Mol. Life Sci. **60:**2100–2114.
32. **Navarro, C., L. F. Wu, and M. A. Mandrand-Berthelot.** 1993. The *nik* operon of *Escherichia coli* encodes a periplasmic binding-protein-dependent transport system for nickel. Mol. Microbiol. **9:**1181–1191.
33. **Nikolaev, V. K., A. M. Leontovich, D. V. A., and L. I. Brodsky.** 1997. The building of multiple alignment using the method of iterative dynamic improvement of the initial "motif" alignment. Biochemistry **62:**578–582.
34. **Park, J. T., D. Raychaudhuri, H. Li, S. Normark, and D. Mengin-Lecreulx.** 1998. MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate. J. Bacteriol. **180:**1215–1223.
35. **Pearson, W. R., and D. J. Lipman.** 1988. Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85:**2444–2448.
36. **Peng, H. L., R. P. Novick, B. Kreiswirth, J. Kornblum, and P. Schlievert.** 1988. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **170:**4365–4372.
37. **Pittard, J., H. Camakaris, and J. Yang.** 2005. The TyrR regulon. Mol. Microbiol. **55:**16–26.
38. **Pons, N., J. M. Batto, S. D. S. D. Ehrlich, and P. Renault.** Development of software facilities to characterize regulatory binding motifs and application to lactic acid bacteria. J. Mol. Microbiol. Biotechnol., in press.
39. **Rigoulay, C., J. M. Entenza, D. Halpern, E. Widmer, P. Moreillon, I. Poquet, and A. Gruss.** 2005. Comparative analysis of the roles of HtrA-like surface proteases in two virulent *Staphylococcus aureus* strains. Infect. Immun. **73:**563–572.
40. **Samen, U., B. Gottschalk, B. J. Eikmanns, and D. J. Reinscheid.** 2004. Relevance of peptide uptake systems to the physiology and virulence of *Streptococcus agalactiae*. J. Bacteriol. **186:**1398–1408.
41. **Saurin, W., M. Hofnung, and E. Dassa.** 1999. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. J. Mol. Evol. **48:**22–41.
42. **Schneider, E., and S. Hunke.** 1998. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. FEMS Microbiol. Rev. **22:**1–20.
43. **Slamti, L., and D. Lereclus.** 2002. A cell-cell signaling peptide activates the

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. EMBO J. **21:**4550–4559.

44. **Tam, R., and M. H. Saier, Jr.** 1993. Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. Microbiol. Rev. **57:**320–346.
45. **Taylor, D., and K. T. Holland.** 1989. Amino acid requirements for the growth and production of some exocellular products of *Staphylococcus aureus*. J. Appl. Bacteriol. **66:**319–329.
46. **Tynkkynen, S., G. Buist, E. Kunji, J. Kok, B. Poolman, G. Venema, and A. Haandrikman.** 1993. Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. J. Bacteriol. **175:**7523–7532.
47. **Usha, V., L. G. Dover, D. L. Roper, A. J. Lloyd, and G. S. Besra.** 2006. Use of a codon alteration strategy in a novel approach to cloning the *Mycobacterium tuberculosis* diaminopimelic acid epimerase. FEMS Microbiol. Lett. **262:**39–47.

Downloaded from jb.asm.org by on January 9, 2008

RESUME

Les transporteurs de peptide sont impliqués chez les bactéries dans différentes fonctions comme la nutrition, la communication intercellulaire et la virulence. Peu de données concernant ces systèmes étaient disponibles chez *S. aureus*, bactérie pathogène majeure. L'analyse systématique de chacun de ses transporteurs constituait mon projet de thèse.

L'analyse des 12 génomes de *S. aureus* séquencés a mis en évidence la présence de 4 opérons *opp* putatifs (*opp1*, *opp2*, *opp3* et *opp4*), d'un gène *opp5A* isolé, codant une protéine de fixation des peptides potentielle et d'une protéine de transport des di- et tripeptides, DtpT. A l'exception d'*opp4*, ces transporteurs sont conservés chez toutes les souches de *S. aureus*. Les systèmes Opp sont, entre eux, assez différents en terme d'homologie de séquence et d'organisation génétique. Afin de déterminer le rôle de chacun de ces transporteurs, des mutants de délétion, simples ou multiples, ont été construits et l'analyse de leurs phénotypes sur plusieurs cribles a été abordée.

Seul Opp3 et DtpT apparaissent comme impliqués dans la nutrition azotée. Ils importent respectivement des peptides de 3 à 8 acides aminés et des di- et tripeptides. Leur présence est nécessaire au développement optimal de la bactérie dans le lait. Dans ce milieu, Opp3 joue également un rôle dans la régulation des protéases extracellulaires Ssp et Aur, par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé.

Chez certaines bactéries, les Opp participent à la communication cellulaire par l'import de phéromones. Pour tester l'existence d'un tel phénomène chez *S. aureus*, nous avons analysé par spectrométrie de masse, le contenu peptidique d'un surnageant après culture de la bactérie en milieu chimiquement défini. Nos résultats ont été confrontés à une banque de données adaptée à la détection des petits gènes. Cinq peptides sécrétés par la bactérie ont été ainsi, pour la première fois, mis en évidence expérimentalement chez *S. aureus*. Leur fonction biologique reste à déterminer.

Enfin, dans la mesure où sur la base de leur séquence, il est impossible de distinguer les protéines de fixation des peptides de celles qui fixent le nickel, un rôle éventuel des systèmes Opp de *S. aureus* dans le transport de ce métal a été testé. Nous avons montré qu'Opp2 et Opp5A assuraient cette fonction.

Nos résultats mettent en avant le rôle d'Opp3 et DtpT dans la nutrition. L'association d'Opp2 et Opp5A formant un transporteur de nickel, seuls les rôles d'Opp1 et Opp4 restent à élucider.

MOTS CLES: *Staphylococcus aureus*, transport, peptides, nutrition azotée, régulation des protéases, phéromone, communication cellulaire, petits gènes, nickel.

SUMMARY

In bacteria, peptides are internalized by dedicated transporters and have been shown to play key roles in nutrition, signalling and virulence. Very few information is available on peptide transporters in *S. aureus*, a major pathogenic bacteria. Then, the systematic analysis of these systems was the main objective of my project.

Systematic *in silico* analysis of 12 different *S. aureus* genomes revealed the existence of (i) four *opp* operons (*opp1*, *opp2*, *opp3* and *opp4*), (ii) one orphan *opp5A* gene encoding a putative peptide-binding protein and (iii) a *dtpT* gene encoding a di- tripeptide permease. With the exception of *opp4*, all systems were present in each *S. aureus* strain. Within a single strain, the different *opp* operons displayed little sequence similarity and distinct genetic organization. To identify both the role and the specificity of these transporters, defined deletion mutants in one or several peptide transporters were constructed.

Results showed that among these systems, only Opp3 and DtpT are involved in nitrogen nutrition. They supply the cell with peptides from 3 to 8 amino acids of length and di- tripeptides, respectively. Their function is required for to the optimal growth of the bacteria in milk. In this medium, in addition to provide peptides as nutrients, Opp3 participates to the regulation of two exocellular proteinase-encoding genes, namely *ssp* and *aur*. The precise mechanism by which this transporter exerts this latter function remains to be elucidated.

Some Gram-positive bacteria use for cell-cell communication short secreted peptides (pheromones), which are imported back by Opp. To evaluate a possible pheromone production by *S. aureus*, the peptide content of the chemically defined medium was analyzed after microbial growth by mass spectrometry. Results were submitted to a data bank specially designed for short genes detection. This approach made it possible to evidence for the production of 5 uncharacterized peptides. Their biological functions have to be investigated.

Finally, as peptide-binding and nickel-binding proteins are not distinguished on the basis of their sequence comparison, we evaluated the ability of one (or several) of the *S. aureus* Opp systems to transport nickel. The involvement of Opp2 and Opp5A in this function was demonstrated.

Our results evidenced for the nutritional role of Opp3 and DtpT. As Opp2 and Opp5A are involved in nickel transport, only the roles of Opp1 and Opp4 remain to be characterized.

KEYWORDS: *Staphylococcus aureus*, peptide, transport, nitrogenous nutrition, protease regulation, pheromone, cell-cell communication, short genes, nickel.