



Caractérisation de l'homéostasie et de l'impact de l'hème sur les capacités de virulence et de colonisation de bactéries à GRAM positif

Laetitia Joubert

► To cite this version:

Laetitia Joubert. Caractérisation de l'homéostasie et de l'impact de l'hème sur les capacités de virulence et de colonisation de bactéries à GRAM positif. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2016. Français. NNT: 2016SACLA031 . tel-02441338v2

HAL Id: tel-02441338

<https://pastel.hal.science/tel-02441338v2>

Submitted on 2 Feb 2020

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.

NNT : 2016SACLA031

THÈSE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE À AGROPARISTECH
(L'INSITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT)

ÉCOLE DOCTORALE N°581
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé
Spécialité Microbiologie

Par

Laetitia JOUBERT

Caractérisation de l'homéostasie et de l'impact de l'hème sur les capacités
de virulence et de colonisation de bactéries à GRAM positif

Directrice de thèse : Delphine LECHARDEUR

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 20 décembre 2016

Composition du Jury :

Mme Nielsen-Leroux Christina	Directrice de recherche, INRA, Jouy-en-Josas	Présidente
Mme Poyart Claire	Professeur, Institut Cochin, Paris	Rapporteur
M. Ghigo Jean-Marc	Docteur, Institut Pasteur, Paris	Rapporteur
Mme Dramsi Shaynoor	Docteur, Institut Pasteur, Paris	Examinatrice
M. Dussurget Olivier	Professeur, Institut Pasteur, Paris	Examineur
Mme Lechardeur Delphine	Chargée de recherche, INRA, Jouy-en-Josas	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier Claire POYART et Jean-Marc GHIGO d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse. Merci également à Shaynor DRAMSI, Olivier DUSSURGET et Christina NIELSEN-LEROUX d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Merci également à Alexandra GRUSS pour m'avoir accepté dans son équipe en tant que MOO, puis IE et de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse sous l'encadrement de Delphine.

Merci aussi à Stéphane AYMERICH ainsi qu'au Labex ALIAS pour avoir financé ce projet.

Merci à toute l'équipe MicroAdapt qui a su m'accueillir et avec qui nous avons vécu un déménagement mémorable. Merci aussi aux personnes de passage comme Christophe, Vincent et Jean Baptiste pour tous ces bons moments.

Je tiens à remercier tout particulièrement deux femmes pour qui j'aurai toujours beaucoup de respect et d'admiration. La première m'a tout appris de la vie et a fait de moi la personne que je suis. La seconde m'a tout appris de la vie de laboratoire et a fait de moi la scientifique que je suis. Un grand merci à mes deux « mamans ». A l'une comme à l'autre je tiens à exprimer toute ma gratitude.

Delphine, j'espère que tu t'es reconnu dans le paragraphe précédent. Tu as toujours été présente pour moi, pour mon premier Western Blot comme mes premières injections dans l'obscurité de l'animalerie à 4 h du matin. Tu as aussi été présente jusqu'à la dernière page de ce manuscrit. Je te remercie pour ces 4 années qui ont été les plus formatrices de ma vie.

Merci à toi, mon plus grand supporter qui m'a d'ailleurs supporté tant bien que mal. Tu as tenu tes engagements du 19 juillet, j'espère tenir les miens pour les années à venir.

Merci à toi Célia. De notre première soirée au BHV à la dernière à Toulouse en passant par les centaines d'autres, tu as toujours été là pour moi. La deuxième moitié a quand même été plus dure en ton absence...

Merci à Fabienne, Léa et mes deux témoins préférées Claire et Elise pour avoir fait tout ce chemin pour être présentes à ma soutenance. Vous avez toujours été présentes aux moments importants de ma vie et la soutenance en fait partie.

Une pensée pour Claire, David, Rebecca et Ibaï, même si nous nous sommes éloignés vous avez été présents pour mes premières soirées en tant que « thésarde ».

Merci à Clémentine pour nos soirée Bowka, Zumba Cardio...Nous seules savons qu'il ne pleut jamais les mercredis soir (en revanche le jeudi...).

Merci à tous les « jeunes » Clémentine (encore !), Mounia, Nathalia, Geoffroy, Jeffrey, Simon, Gérald, Jean-Baptiste, Renaud, Laurent, Benjamin, Merci pour les soirées Bowling et laser games plus ou moins arrosées.

Merci à tous les autres, qui ont contribué de près ou de loin à ce projet.

« La souris est un animal qui, tué en quantité
suffisante et dans des conditions contrôlées,
produit une thèse de doctorat »

Woody Allen

Table des matières

Liste des figures	10
Liste des tableaux.....	13
Liste des abréviations.....	14
Partie 1 : Synthèse bibliographique.....	16
A L'hème et les bactéries	17
A.1 L'hème, une molécule indispensable à la vie	17
A.1.1 Structure et fonctions	17
A.1.2 Biosynthèse de l'hème.....	17
A.1.3 Liaison de l'hème aux protéines	19
A.1.4 Toxicité de l'hème	20
A.2 Les sources d'hème pour les bactéries dans leur hôte	20
A.2.1 Le sang	20
A.2.1.1 L'hémoglobine	20
A.2.1.2 Protéines du sang liant l'hème et l'hémoglobine.....	21
A.2.2 Le tractus digestif.....	22
A.2.2.1 L'alimentation.....	22
A.2.2.2 Les micro-saignements intestinaux.....	23
A.2.2.3 L'hème provenant des bactéries du microbiote	23
A.2.3 Les autres sources d'hème	23
A.3 L'acquisition de l'hème chez les bactéries à GRAM positif	23
A.3.1 Libération spontanée de l'hème de l'hémoglobine	24
A.3.2 Digestion protéolytique des hémoprotéines.....	24
A.3.3 Capture des hémoprotéines	25
A.3.3.1 Capture de l'hémopexine par <i>Haemophilus influenzae</i>	25
A.3.3.2 Capture de l'hème, de l'hémoglobine et de l'hémopexine chez <i>Staphylococcus aureus</i>	25
A.4 Contrôle de l'homéostasie de l'hème chez les bactéries à GRAM positif	26

A.4.1 Le transporteur d'efflux HrtBA	26
A.4.1.1 Identification	26
A.4.1.2 Fonction de HrtBA.....	27
A.4.1.3 Régulation de l'expression de HrtBA	27
A.4.1.4 Distribution de HrtR et de HssRS parmi les bactéries à GRAM positif	29
A.4.2 Le système d'efflux de porphyrines (Pef)	30
A.5 Chaperonnes intracellulaires	31
A.5.1 L'alkylhydroperoxyde reductase (AhpC)	31
A.5.2 La déshydrogénase HemW	32
A.6 Utilisation métabolique de l'hème chez les bactéries à GRAM positif	32
A.6. 1 Métabolisme respiratoire	32
A.6.1.1 Fonctionnement de la chaîne respiratoire	33
A.6.1.2 Avantages du métabolisme respiratoire par rapport à la fermentation	34
A.6.1.3 Transport et maturation de l'hème nécessaire pour la Respiration	34
A.6. 2 Les catalases à hème	35
A.6.3 L'hème, une source de fer	35
 B Les bactéries <i>Lactococcus lactis</i>, <i>Streptococcus agalactiae</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	37
B.1 Des bactéries auxotrophes pour l'hème	37
B.1.1 Auxotrophies obligatoires et facultatives.....	38
B.1.2 Auxotrophie partielle.....	38
B.2 <i>Lactococcus lactis</i> : une bactérie alimentaire	39
B.3 <i>Streptococcus agalactiae</i> : une bactérie pathogène opportuniste	40
B.3.1 Généralités	40
B.3.2 Les infections à <i>Streptococcus agalactiae</i>	42
B.3.2.1 Infections humaines	42

B.3.2.2 Infections animales.....	43
B.3.3 Pathogenèse.....	44
B.3.3.1 Adhésion aux épithéliums et endothéliums.....	44
B.3.3.2 La translocation à travers les barrières physiologiques.....	45
B.3.3.3 Protection de la bactérie contre la réponse immunitaire de l'hôte	47
B.4 <i>Enterococcus faecalis</i>: une bactérie commensale de la flore intestinale.....	48
B.4.1 Généralités	48
B.4.2 Pathogenèse.....	50
 Partie 2 : Résultats.....	 52
A Rôle de HrtBA dans l'homéostasie de l'hème chez <i>Lactococcus lactis</i>.....	53
A.1 <i>L. lactis</i> et l'hème	53
A.2 Contexte	53
A.3 Publication 1 : HrtBA et les ménaquinones contrôlent l'homéostasie de l'hème chez <i>Lactococcus lactis</i>	54
A.4 Principales conclusions	101
A.5 Résultats annexes : Accumulation d'hème membranaire et toxicité	101
B Impact de l'hème de l'hôte lors de la virulence de <i>S. agalactiae</i>	103
B.1 <i>S. agalactiae</i> et l'hème	103
B.2 Contexte	103
B.3 Stratégie expérimentale.....	104
B.3.1 La luminescence pour suivre les bactéries dans leur hôte.....	104
B.3.1.1 L'opéron <i>luxABCDE</i> de <i>Photobacterium luminescens</i>	104
B.3.1.2 Suivi de la luminescence <i>in vivo</i> : le système d'acquisition de la luminescence IVIS	105

B.3.2 Visualisation de la luminescence émise par les bactéries	106
B.3.2.1 Visualisation de la luminescence émise par les bactéries <i>in vitro</i>	106
B.3.2.2 Construction d'un outil adapté à la visualisation de la luminescence émise par les bactéries <i>in vivo</i> lors de l'infection ...	106
B.3.1.5 Mise au point des conditions de l'infection et de l'observation.....	107
B.4 Publication 2 : Visualisation du rôle de l'hème de l'hôte sur la virulence de la bactérie auxotrophe <i>Streptococcus agalactiae</i>.	107
B.5 Principales conclusions	136
B.6 Résultats annexes : Import de l'hème	137
C Détection de l'hème par <i>Enterococcus faecalis</i> dans le tractus digestif	140
C.1 <i>E. Faecalis</i> et l'hème	140
C.2 Contexte	140
C.3 Caractérisation du « sensing » de l'hème chez <i>E. faecalis</i>	140
C.4 Stratégie expérimentale pour l'étude du « sensing » de l'hème dans l'intestin	143
C.4.1 Outils génétiques utilisés pour visualiser le « sensing » de l'hème chez <i>E. Faecalis</i> dans le tractus digestif.....	143
C.4.2 Gavage et observation du « sensing » de l'hème chez <i>E. faecalis</i>	143
C.5 Résultats	143
Partie 3 : Discussion et perspectives	146
A Interaction de l'hème avec la membrane de <i>L. Lactis</i>	147
A.1 Les ménaquinones catalysent la réduction de l'hème	147
A.2 Devenir de l'hème réduit	147
B Homéostasie de l'hème	148
B.1 Mécanisme d'export de l'hème par HrtBA	148

B.2 Import de l'hème.....	150
B.2.1 Des transporteurs d'hème chez <i>S. agalactiae</i>	150
B.2.2 Diffusion passive de l'hème à travers les membranes des bactéries à GRAM positif.....	151
C La régulation de HrtBA	152
D Impact de l'hème lors de la virulence chez <i>S. agalactiae</i>	153
D.1 Importance du contrôle de la toxicité de l'hème	153
D.2 Importance du métabolisme respiratoire dans la virulence de <i>S. agalactiae</i>	154
E Perspectives.....	155
E.1 Poursuite des études <i>in vitro</i>	155
E.2 Poursuite des études <i>in vivo</i>	155
E.3 Améliorations possibles.....	156
Bibliographie	157
Annexe.....	187

Liste des figures

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Figure 1. L'hème (type <i>b</i>)	17
Figure 2. Représentation schématique de la voie de biosynthèse de l'hème (type <i>b</i>)	17
Figure 3. Représentation schématique de la liaison de l'hème dans la myoglobine	19
Figure 4. Représentation schématique de la liaison de l'hème dans le cytochrome <i>c</i>	19
Figure 5. Structure de protéines à domaines NEAT	19
Figure 6. Structure cristallographique du domaine NEAT de IsdA	20
Figure 7. Mécanismes de protection contre la toxicité de l'hème (chez les mammifères)	21
Figure 8. Les sources d'hème dans le tractus digestif	22
Figure 9. Capture de l'hème	24
Figure 10. Le système Isd chez <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Figure 11. Régulation du transporteur d'efflux de l'hème chez <i>Lactococcus lactis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i>	27
Figure 12. Structure de la protéine HssS chez <i>S. aureus</i>	28
Figure 13. Conservation de la séquence répétée dans le promoteur de <i>hrtBA</i>	29
Figure 14. Organisation du promoteur de l'opéron <i>hrtBA</i>	29
Figure 15. Séquence palindromique de fixation d'HrtR	29
Figure 16. Le système de contrôle de la toxicité de l'hème Pef chez <i>S. agalactiae</i>	30
Figure 17. Fermentation et respiration aérobie	32
Figure 18. La chaîne respiratoire	33
Figure 19. Structure des ménaquinones	33
Figure 20. La Cytochrome <i>bd</i> oxydase	34
Figure 21. Les différentes oxygénases d'hème	35
Figure 22 Classification de <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	37
Figure 23. Infections néonatales précoce et tardive par <i>Streptococcus agalactiae</i>	42
Figure 24. Mécanismes d'adhérence et d'invasion de <i>S. agalactiae</i>	45
Figure 25. L'opéron <i>cyl</i>	46
Figure 26: Le granadaène	46
Figure 27. Régulation de l'opéron <i>cyl</i>	46
Figure 28: Les différents mécanismes de protection contre le système immunitaire de l'hôte	47

Partie 2 : Résultats

Figure 29. L'hème chez <i>Lactococcus lactis</i>	53
Figure 30. Accumulation d'hème dans les bactéries	53
Figure 31. Modèle décrivant le mécanisme de contrôle de l'homéostasie de l'hème chez <i>L. lactis</i>	54
Figure 32. L'homéostasie de l'hème chez <i>L. lactis</i>	101
Figure 33. Impact de la toxicité de l'hème sur la croissance.....	101
Figure 34. Impact de l'hème sur le stress oxydatif	101
Figure 35. L'hème impacte sur la perméabilisation des membranes.....	102
Figure 36. L'hème chez <i>Streptococcus agalactiae</i>	103
Figure 37. Organisation de l'opéron <i>luxABCDE</i> de <i>Photobacterium luminescens</i>	104
Figure 38. Réaction d'oxydation catalysée par l'opéron <i>lux</i> à l'origine de l'émission de lumière	105
Figure 39. Principe de la détection de la luminescence par le système IVIS	105
Figure 40. Expression de la luminescence au cours de la croissance de <i>S. agalactiae</i> WT transformée par le plasmide pP ₂₃ <i>lux</i>	106
Figure 41. Les 2 stratégies utilisées pour l'étude <i>in vivo</i>	106
Figure 42. Stratégie expérimentale pour la recherche de transporteurs d'hème chez <i>S. agalactiae</i>	137
Figure 43. Spectre UV visible caractéristique d'une liaison protéine-hème	138
Figure 44. L'hème chez <i>Enterococcus faecalis</i>	140
Figure 45. Alignement de HrtB chez différentes bactéries.....	141
Figure 46. La délétion de <i>ef0792-0793</i> (Δ <i>hrtBA</i>) entraîne une hypersensibilité à l'hème	142
Figure 47. Comparaison de l'induction du promoteur de l'opéron <i>ef0792-0793</i> par l'hème entre la souche WT et Δ <i>hrtBA</i>	142
Figure 48. Environnement génétique de HrtBA chez différentes bactéries à GRAM positif.....	143
Figure 49. Séquence promotrice de l'opéron <i>hrtBA</i> chez <i>E. faecalis</i>	143
Figure 50. Détection <i>E. faecalis</i> lors du transit intestinal.....	144
Figure 51. Détection de <i>E. faecalis</i> dans les fécès.....	144
Figure 52. Détection de l'hème par <i>E. faecalis</i> lors du transit intestinal.....	145
Figure 53. Détection de l'hème par <i>E. faecalis</i> dans le système digestif	145
Figure 54. Contenu caecal de souris gavée avec <i>E. faecalis</i>	145
Figure 55. Visualisation des fécès chez <i>E. faecalis</i>	145

Partie 3 : Discussion

Figure 56. Visualisation de l'insertion de molécules de protoporphyrines encapsulées dans des liposomes constitués de 1-palmitoyl-2oleoyl-glycero-3-phosphocholine	147
Figure 57. MacAB de <i>E. coli</i> (A) et HrtB de <i>L. lactis</i> (B) ont des topologies similaires.....	148
Figure 58. Les différents transporteurs d'efflux.....	149
Figure 59. L'hème (type <i>b</i>)	151
Figure 60. Les différents systèmes à deux composants (TCS).....	152
Figure 61. Topologie de HssS chez <i>S. agalactiae</i> (A) et <i>S. aureus</i> (B)	152
Figure 60. Organisation génétique de HrtBA et son système régulateur HssRS chez <i>L. lactis</i> (A), <i>S. aureus</i> (B), <i>S. agalactiae</i> (C) et <i>E. faecalis</i> (D)	153

Liste des Tableaux

Tableau I. Les différents types d'hème	18
Tableau II. Distribution de HssRS et HrtR parmi les bactéries à GRAM positif	30
Tableau III. Répertoire des principales bactéries auxotrophe pour l'hème	38
Tableau IV. Spectres UV-visible en présence d'hème des candidats sélectionnés	139
Tableau V. Identification de protéines orthologues à HrtB et HrtA de <i>S. aureus</i>	141
Tableau VI. Identification de protéines orthologues à HssS et HSSR de <i>S. aureus</i>	142
Tableau VII. Oligonucléotides utilisés pour la construction du plasmide pP _{ef0792} <i>lux</i>	143

Liste des Abréviations

AA	acides aminés
ABCG2	ATP-binding cassette superfamily G member 2
acétyl CoA	acétyl-coenzyme A
ADP	adenosine diphosphate
AhpC	alkylhydroperoxyde reductase 2-Cys peroxiredoxine C
ALA	acide 5-aminolévulinique
Alb	albumine sérique
ATP	adenosine triphosphate
BAH	bactéries auxotrophes pour l'hème
BhuR	Bordetella heme utilization
BibA	immunogenic bacterial adhesin
Bsba	bacterial surface adhesin of GBS
CcmE	cytochrome c maturation
CO	monoxide de carbone
CovR	Control of Virulence regulator
CovS	Control of Virulence sensor
csp	carbohydrates capsulaires
Fe-PPIX	hème
Fsb A	fibrinogen-binding proteins A
GPI	glycosyl-phosphatidyl-inositols
GRAS	generally recognised as safe
GtrA	glutamyl-tRNA reductase
Hb	hémoglobine
HgVa	hypervirulent GBS adhesin
HK	histidine kinase
Hmu	heme utilization
HO	oxygénase d'hème
Hp	haptoglobine
HPH	hydroperoxydase II
HRM	heme-regulatory motif
Hrt	heme regulated transporter
HrtA	heme-regulated transporter ATPase
HrtB	heme-regulated transporter perméase
HrtR	heme-regulated transporter régulator
HssR	heme sensor system Regulator
HssS	heme sensor system Sensor
Hts	Heme transport system
Hx	hémoexine
Isd	iron surface, determinant
KatA	catalase A
kDA	kiloDalton
Lgt	Lipoprotein diacylglycerol transferase

Lmb	laminin binding surface adhesin
LRP1	low density lipoprotein receptor-related protein
MarR	multiple antibiotic resistance regulator
MDR	Multidrug resistance
MK	ménaquinone
MSCRAMM	Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule adhesin of collagen
NEAT	Near-iron Transporter
PAI	pathogenicity Island
PAS	Per-ARNt-Sim
Pef	Porphyrin efflux
PPIX	protoporphyrine IX
Prx	peroxyredoxines
RR	régulateur de réponse
ScpB	streptococcal C5a peptidase
ShR	streptococcal hemoprotein receptor
Srr	serine-rich repeat proteins
ST	Sequence Type
TCS	two component system
TD	tractus digestif
β-H/C	hémolysine β/cytolysine

Partie 1

Synthèse bibliographique

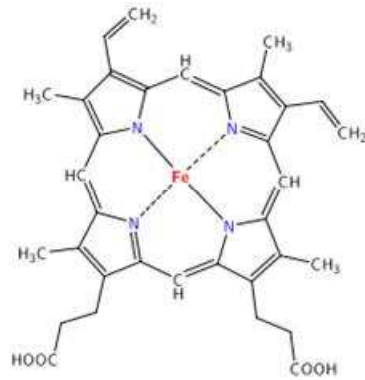


Figure 1. L'hème (type *b*). Au centre de la molécule, l'atome de fer (en rouge) est lié aux quatre atomes d'azote (en bleu) de la porphyrine. La porphyrine est constituée de 4 anneaux pyrroles liés par des ponts méthènes pour former l'anneau tétrapyrrole en noir.

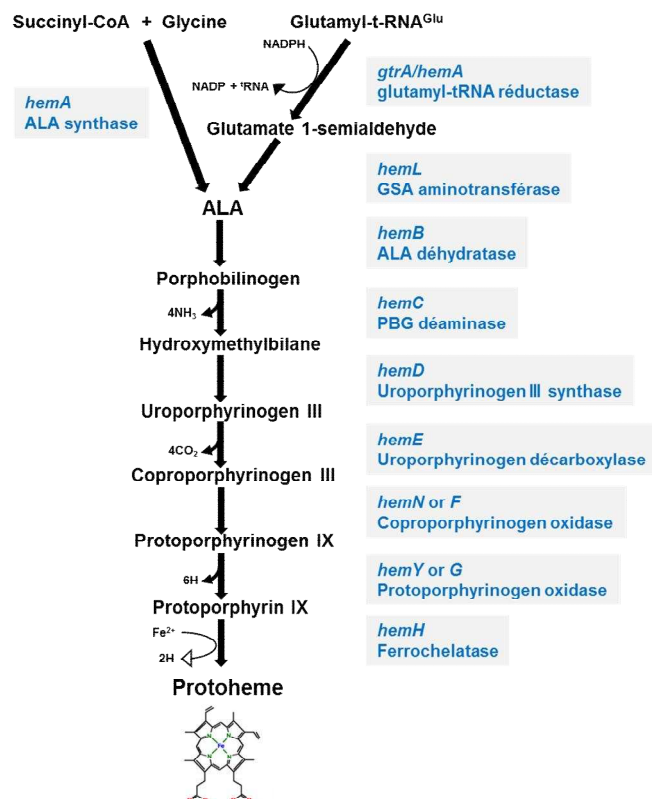


Figure 2. Représentation schématique de la voie de biosynthèse de l'hème (type *b*). En bleu sont indiqués les gènes (en italiques) et enzymes impliquées dans chacune des étapes de la voie de biosynthèse du protohème ou hème *b*.

A L'hème et les bactéries

A.1 L'hème, une molécule indispensable à la vie

A.1.1 Structure et fonctions

L'hème (Fe-PPIX), un atome de fer coordonné à un noyau porphyrinique, est un cofacteur essentiel à de nombreuses fonctions cellulaires aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. L'hème est ainsi la source la plus importante de fer chez les vertébrés (Wandersman and Delepelaire, 2012).

Le noyau porphyrinique de l'hème est composé de la protoporphyrine constitué de 4 anneaux pyrroles liés par des ponts méthènes pour former l'anneau tétrapyrrole (**Figure 1**). L'hème peut exister sous deux états d'oxydo-réduction principaux grâce à la capacité du fer à basculer entre une forme réduite (Fe^{2+}) et une forme oxydée (Fe^{3+}). Le fer sous forme ferrique (Fe^{3+}) est peu soluble, mais l'incorporation du fer dans le noyau porphyrinique facilite la solubilité de ce métal et optimise de 5 à 10 fois son activité catalytique (Stojiljkovic *et al.*, 2001).

L'hème, lié à des protéines a une fonction de cofacteur, dans une multitude de mécanismes cellulaires : i) dans des réactions d'oxydoréduction comme dans la phosphorylation oxydative (cytochromes) (Freedman and Chan, 1984) ou la réponse au stress oxydatif (catalases, peroxydases) (Borisov *et al.*, 2015), ii) dans le transport des gaz diatomiques en particulier l' O_2 (hémoglobine) (Honig *et al.*, 1992). En dehors de sa fonction de cofacteur enzymatique, l'hème a été mis en évidence depuis quelques années en tant molécule « signal », ayant une fonction régulatrice de réponses transcriptionnelles (Faller *et al.*, 2007).

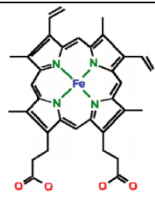
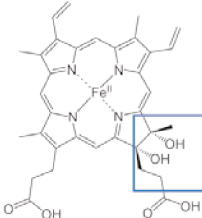
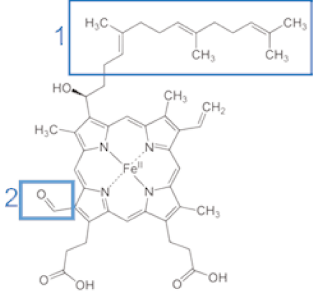
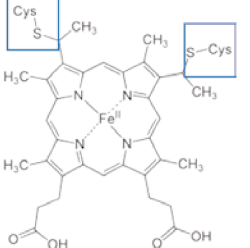
A.1.2 Biosynthèse de l'hème

La biosynthèse de l'hème est très conservée que ce soit chez les procaryotes ou les eucaryotes et est réalisée à partir de l'acide 5-aminolévulinique (ALA) (**Figure 2**). Chez les levures, les mammifères et les α -protéobactéries, ALA est synthétisé à partir de l'association de la succinyl-CoA et de la glycine par l'ALA synthase codée par le gène *hemA*. Chez les plantes, les algues, les archées ainsi que les autres bactéries, ALA est synthétisé à partir du glutamyl-t-RNA^{glu} (**Figure 2**) par la glutamyl-tRNA réductase (GtrA) puis transformé en glutamate-1-semialdéhyde par la glutamate-1-semialdéhyde aminotransférase codée par le gène *hemL* (Frankenberg *et al.*, 2003) (**Figure 2**). Les 3 étapes enzymatiques suivantes

(**Figure 2**) aboutissent à la formation du premier cycle tétrapyrrole, l'uroporphyrinogène III. Celui-ci est la base structurale de différentes classes de tétrapyrroles (Battersby, 2000) à l'origine des porphyrines, mais aussi des chlorines telle que la chlorophylle *a*, et des corrinoïdes telle que la vitamine B12 qui ont tous une structure macrocyclique (Layer *et al.*, 2010). Ce cycle est converti en protoporphyrine IX (PPIX) après 3 autres étapes enzymatiques (**Figure 2**). Enfin, l'étape ultime de la biosynthèse de l'hème consiste en l'incorporation du fer au centre de la protoporphyrine grâce à une ferrochélatase. La synthèse complète de l'hème nécessite 8 molécules d'ALA. Une voie de biosynthèse différente a néanmoins été mise en évidence chez certains firmicutes (Dailey *et al.*, 2015).

L'hème *b* ou protohème est la forme la plus courante mais des modifications, en particulier, des ramifications du noyau porphyrique existent et génèrent d'autres formes d'hème qui sont utilisées par les organismes dans différentes fonctions (**Tableau I**) (Kleingardner and Bren, 2015; Hederstedt, 2012; Vavra *et al.*, 1986).

Tableau I. Les différents types d'hème

Nom	Mécanismes	Modification du protohème	Représentation
Hème <i>b</i>	protohème	/	
Hème <i>d</i>	Spécifique des procaryotes Utilisé pour le fonctionnement de la cytochrome <i>bd</i> oxydase	Ramification en position 6 de la structure et cyclisation formant une lactone	
Hèmes <i>a</i> et <i>o</i>	Cofacteur de la cytochrome <i>c</i> oxydase L'hème <i>o</i> est spécifique des procaryotes et possède une structure très proche de l'hème <i>a</i> utilisé chez <i>E. coli</i>	1-Présence d'une chaîne terpénoïde (hème <i>a</i> et <i>o</i>) 2-Présence d'un groupement aldéhyde (CHO) (hème <i>a</i>).	
Hème <i>c</i>	Cofacteur de la cytochrome <i>c</i> oxydase	Liaisons thioesters avec des cystéines permettant une liaison covalente à des protéines	

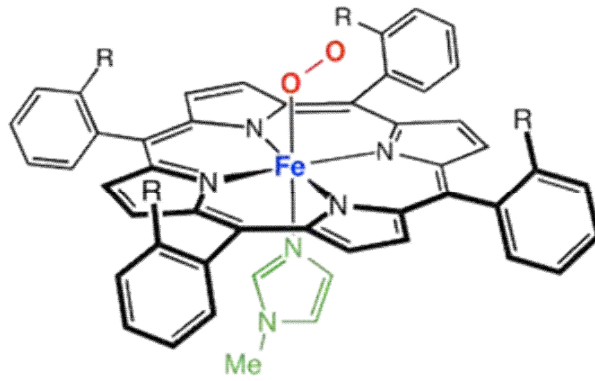


Figure 3. Représentation schématique de la liaison de l'hème dans la myoglobine. Le fer de l'hème (en bleu) est coordonné à la myoglobine par une histidine (en vert). La sixième coordination du fer est la liaison au dioxygène (O_2 , en rouge). Cette liaison est à l'origine de la capacité de transport de l' O_2 de la myo- et de l'hémoglobine.

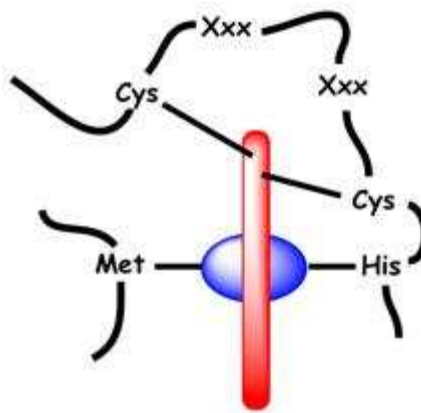


Figure 4. Représentation schématique de la liaison de l'hème dans le cytochrome c. Le fer de l'hème (en bleu) est hexacoordonné au cytochrome par une liaison méthionine/histidine. Le noyau porphyrinique de l'hème (en rouge) est aussi lié par deux liaisons covalentes à deux cystéines du cytochrome.

<http://biochimej.univ-angers.fr/Page2/COURS/Zsuite/5CytochromeC/1CytochromeC.htm>

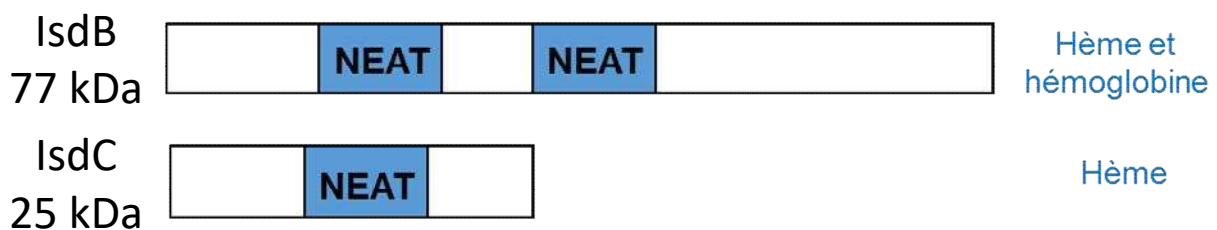


Figure 5. Structure de protéines à domaines NEAT. Les protéines Iron surface déterminant (Isd) sont impliquées dans l'internalisation de l'hème chez *Staphylococcus aureus*. Parmi ces protéines, IsdB possède 2 domaines NEAT permettant une liaison avec l'hème et l'hémoglobine, et IsdC possède 1 domaine NEAT permettant une liaison avec l'hème.

A.1.3 Liaison de l'hème aux protéines

Le fer de l'hème peut se coordonner avec un maximum de 6 atomes. Le cycle protoporphyrine de l'hème utilise 4 de ces liaisons pour coordonner 4 atomes d'azote au fer (**Figure 1**). Le fer peut alors se coordonner par une ou deux liaison(s) supplémentaires à un ou deux acides-aminés (AA) de l'hémoprotéine : on parle de liaison pentacoordonnée ou hexacoordonnée du fer. Lorsque la liaison hème-protéine est pentacoordonnée, la sixième position peut être occupée par un ligand non-protéique de type gaz diatomique tel que le dioxygène dans le cas de l'hémoglobine ou de la myoglobine (**Figure 3**). L'interaction de l'hème par l'intermédiaire du fer n'est pas une liaison covalente et est donc relativement labile. Elle ne met pas en jeu de mécanisme enzymatique. D'autres liaisons faibles vont stabiliser l'interaction telles que des liaisons ioniques mettant en jeu les groupements du noyau porphyrine et des AA chargés de la protéine ainsi que des liaisons de type électrostatique (Van der Waals) (Das and Dey, 2014). Dans le cas de l'hème *c* (**Tableau I**), l'hème est lié par des liaisons covalentes entre les groupes vinyles du cycle porphyrine et deux cystéines de la protéine pour former deux ponts disulfures (**Figure 4**). Le fer de l'hème peut être coordonné par les atomes de N, S, ou O des chaînes latérales des AA, les plus courants étant les histidines, cystéines ou tyrosines. En dehors de ces ligands, la structure de l'hémoprotéine contient une poche constituée par des acides-aminés hydrophobes qui va permettre la liaison avec le noyau porphyrine.

Les domaines protéiques intervenant dans la liaison à l'hème dans les hémoprotéines sont très peu conservés en dehors des « heme-regulatory motif » (HRM) identifiés dans une série d'hémoprotéines eucaryotes et contenant une cystéine (Kühl *et al.*, 2013). Certains domaines structuraux de 100 à 200 AA conservés dans certaines hémoprotéines ont été identifiés comme responsables de la liaison à l'hème. Ce sont les domaines PAS (Per-ARNt-Sim) chez les eucaryotes et les procaryotes (Gonzalez, 2004) et les domaines NEAT (NEAr-iron Transporter) chez les bactéries à GRAM positif (Andrade *et al.*, 2002). Ces domaines sont indispensables à la liaison à l'hème ou à des hémoprotéines comme l'hémoglobine. Par exemple, la protéine FixL chez *Rhizobium* possède un domaine PAS (Sousa *et al.*, 2013) et les protéines Isd (iron surface determinant) chez *Staphylococcus aureus* (**Partie 1 § A.3**) possèdent des domaines NEAT (Muryoi *et al.*, 2008) (**Figure 5**). Certains domaines NEAT sont également impliqués dans l'extraction de l'hème à partir de l'hémoglobine. Le domaine NEAT peut être répété entre 2 et 5 fois dans la protéine (**Figure 5**). Ils constituent des poches

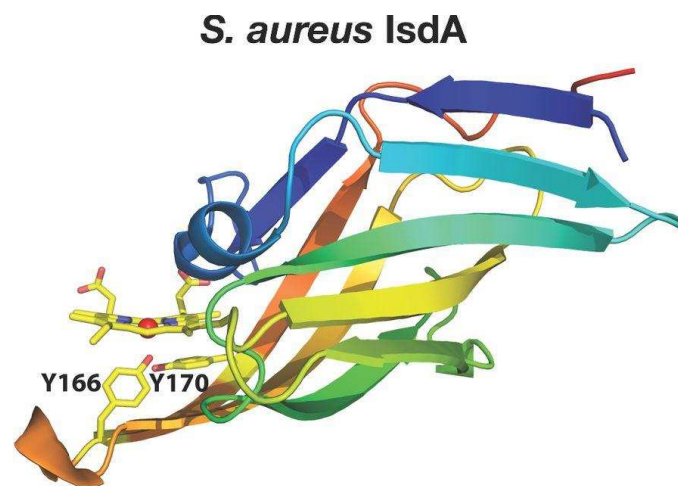


Figure 6. Structure cristallographique du domaine NEAT de IsdA. La structure du domaine NEAT de IsdA de *S. aureus* est composé de 8 feuillets β . Deux tyrosines (Y166 et Y170) constituent les ligands de l'hème (source Sheldon and Henrichs, 2015).

hydrophobiques dont la liaison avec l'hème ou une hémoprotéine se fait via une tyrosine (Wandersman and Delepelaire, 2012) (**Figure 6**).

A.1.4 Toxicité de l'hème

Le fer de l'hème par ses propriétés oxydoréductrices est très réactif et provoque la formation de radicaux libres via la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$). Les radicaux hydroxyles $\cdot\text{OH}$ générés sont des oxydants très puissants qui peuvent réagir avec l'ADN (Imlay and Linn, 1988), les lipides et les protéines (Touati, 2000) entraînant des phénomènes de dégradation à l'origine de la toxicité de l'hème.

A.2 Les sources d'hème pour les bactéries dans leur hôte

L'hème est un cofacteur essentiel à de nombreuses fonctions cellulaires aussi bien pour les procaryotes que pour les eucaryotes. La plupart des organismes dont les bactéries, sont capables de le synthétiser. Chez les procaryotes, un grand nombre de bactéries sont auxotrophes pour cette molécule (**Chapitre C**) et dépendent de leur environnement pour compléter leur besoin en hème. Quel que soit leur besoin en hème (et en fer), la plupart des procaryotes sont capables de récupérer et d'utiliser de l'hème exogène.

A.2.1 Le sang

L'hémoglobine (Hb) des érythrocytes du sang constitue la plus grande réserve d'hème chez les mammifères. La présence d'hème donne sa couleur rouge au sang. Lorsque l'érythrocyte est lysé, l'hème et l'hémoglobine sont pris en charge par diverses protéines comme l'hémopexine (Hx), l'haptoglobine (Hp) ou l'albumine sérique (Alb), et est ensuite dégradé ou recyclé dans le foie.

A.2.1.1 L'hémoglobine

Certains pathogènes ont développé des mécanismes pour récupérer l'hème lié à l'Hb de l'hôte (**Figure 7**). Cette protéine fixe l'oxygène assurant son transport dans l'organisme des vertébrés (Bellelli and Brunori, 2011). L'hémoglobine compose ainsi 98 % d'un globule rouge ce qui correspond à une concentration de 30 à 35 g/ml d'hémoglobine. L'Hb humaine est formée de 2 sous-unités α et 2 sous-unités β . Dans les globules rouges, une réductase maintient l'hème sous forme Fe^{2+} , la forme réduite de l'hème lié à l'Hb permettant sa liaison à l' O_2 .

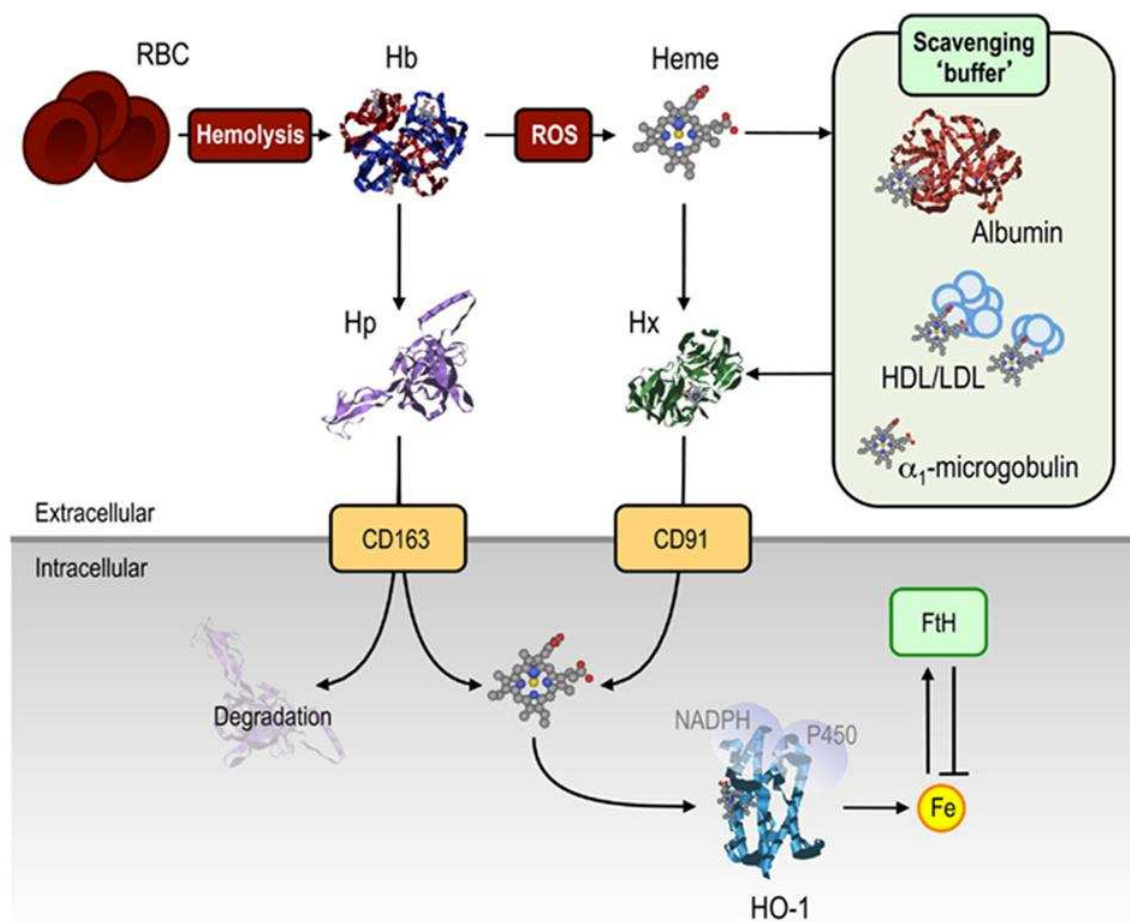


Figure 7. Mécanismes de protection contre la toxicité de l'hème (chez les mammifères). Plusieurs mécanismes sont mis en jeu pour contrôler la toxicité de l'hème et de l'hémoglobine (Hb). Dans des conditions d'hémolyse des érythrocytes (RBC, red blood cell), de l'Hb est libérée dans la circulation où elle peut être piégée par l'haptoglobuline (Hp), évitant ainsi son oxydation et la libération de l'hème. Le complexe Hp/Hb est pris en charge par les macrophages via le récepteur CD163 pour dégradation. Si de l'hème parvient à être libéré, il est reconnu par l'hémopexine (Hx) qui permet son élimination dans les macrophages via le récepteur CD91. Dans les macrophages, l'hème est dégradé par l'oxygénase (HO-1) et le fer pris en charge par la ferritine (FtH). D'autres molécules peuvent neutraliser l'hème en s'y liant, telles que l'albumine, les transporteurs d'acides gras (HDL/LDL) et l' α_1 -microglobuline.

A 2.1.2 Protéines du sang liant l'hème et l'hémoglobine

Chez l'homme, les érythrocytes sont fonctionnels dans le sang pendant 3 mois avant leur dégradation par les macrophages du système sanguin (Franco, 2012). L'Hb est dégradée et l'hème recyclé sans contact avec le milieu extracellulaire. L'hème libre peut provoquer de nombreux dommages dû au stress oxydant engendré par la réaction de Fenton (**Partie 1 § A.1.2.2**). Différentes protéines du plasma peuvent piéger l'hème libre de manière à limiter sa toxicité. Certains pathogènes possèdent des systèmes de détection et capture de l'hème lié à ces différents partenaires dans le plasma. L'haptoglobine piège l'hémoglobine tandis que l'albumine sérique et l'hémopexine piègent l'hème dans le plasma (**Figure 7**).

- L'haptoglobine (Hp) est une glycoprotéine synthétisée dans le foie qui a une forte affinité pour l'hémoglobine dans le sang (Andersen *et al.*, 2012). Le complexe Hp-Hb est ensuite détecté par les récepteurs CD163 présents à la surface des macrophages qui internalisent et dégradent le complexe (Kristiansen *et al.*, 2001) (**Figure 7**). Cette protéine permet ainsi de neutraliser l'Hb et permet ainsi la protection des cellules contre les réactions d'oxydoréduction que peut générer l'Hb libre (Fagoonee *et al.*, 2005).

- L'albumine sérique (Alb) est synthétisée dans le foie et est la protéine la plus abondante dans le plasma. L'albumine sérique humaine est un monomère contenant 3 domaines homologues (I, II et III) chacun composé de 2 sous-domaines (A et B). L'hème se lie dans la cavité hydrophobe du sous-domaine IB (Ascenzi and Fasano, 2009). Hormis l'hème, cette protéine se lie à de nombreuses molécules telles que des acides gras, des acides biliaires, des stéroïdes ou des composés résultant de la dégradation de l'hème comme la bilirubine (**Figure 7**). La capture de l'hème par l'Alb protège le plasma des effets toxiques de l'hème libre. La toxicité de l'hème lié à l'Alb est ainsi diminuée de 50 à 60 % (Grinberg *et al.*, 1999). Le complexe albumine-hème a été décrit comme une source possible d'hème pour des pathogènes comme *S. dysagalactiae* (Egsten *et al.*, 2011) et *Finegodia magma* (De Château and Björck, 1994).

- L'hémopexine est une glycoprotéine présente dans tous les fluides biologiques. Cette protéine possède une des plus fortes affinités pour l'hème ($K_d = 10^{-13}$ M) (Delanghe and Langlois, 2001). L'hémopexine piège l'hème libéré par l'hémoglobine et le transporte vers le foie où il est dégradé. Le complexe hème-hémopexine lie le récepteur spécifique nommé low

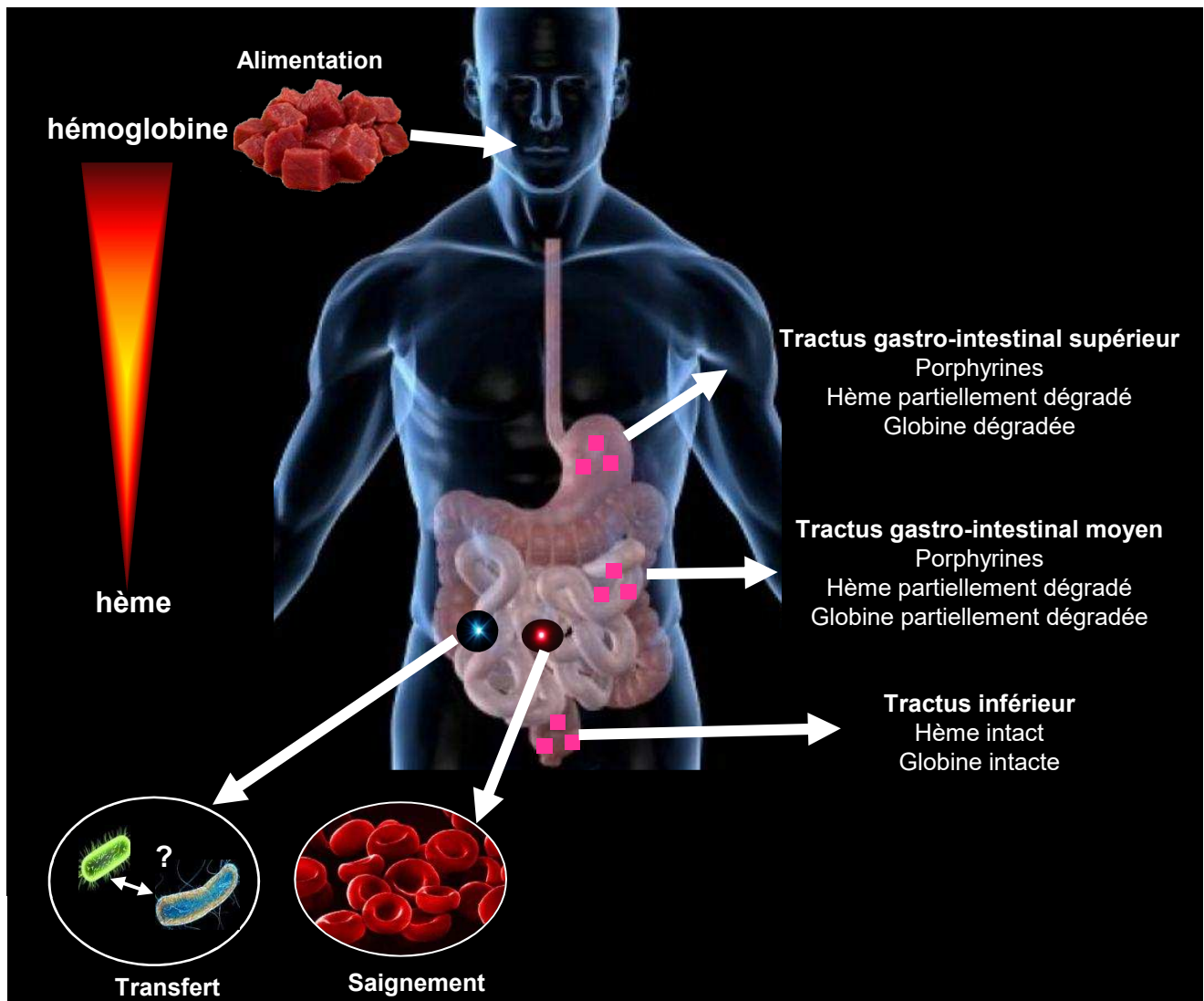


Figure 8. les sources d'hème dans le tractus digestif. L'hème dans le tractus digestif peut provenir de l'alimentation ou de microsaignements intestinaux. Une dernière hypothèse est que l'hème pourrait être apporté par des γ -protéobactéries notamment *E. coli* qui possède la capacité de synthétiser de l'hème.

density lipoprotein receptor-related protein (LRP1) (Tolosano *et al.*, 2010), l'hème est transloqué à la cellule tandis que l'hémopexine retourne dans la circulation. (Smith and McCulloh, 2015) (**Figure 7**). Ce système permet de limiter la toxicité de l'hème libre de 80 à 90% (Grinberg *et al.*, 1999).

- L' α 1-microglobuline est synthétisée dans le foie et circule dans le plasma et les tissus. Elle peut être retrouvée dans le sang à l'état libre ou liée à l'immunoglobuline A. L' α 1-microglobuline possède une poche hydrophobe qui permet la fixation de 2 molécules d'hème (Rutardottir *et al.*, 2016) (**Figure 7**). Une fois l'hème lié à l' α 1-microglobuline, une myeloperoxydase reconnaît le complexe et clive les 4 AA de la partie C-terminale de l' α 1-microglobuline. La protéine ainsi tronquée est activée et initie la dégradation de l'hème (Cederlund *et al.*, 2015).

A.2.2 Le tractus digestif

Le tractus digestif (TD) qui contient le microbiote intestinal est un environnement qui contient de l'hème qui provient en partie de l'alimentation (**Figure 8**). La flore intestinale est majoritairement composée de bactéries auxotrophes pour l'hème. Ainsi, les 2 principales classes sont les *Bacteroidetes* et les *Clostridia* qui ne synthétisent pas l'hème mais en ont un besoin strict (Halpern and Gruss, 2015). L'utilisation de l'hème par les bactéries qui résident de façon pérenne (microbiote) ou transitoire est encore mal connue.

A.2.2.1 L'alimentation

L'alimentation, en particulier, la viande, constitue environ 1/3 des besoins en fer chez l'homme (Bezwoda *et al.*, 1983; Carpenter and Mahoney, 1992). Les enzymes protéolytiques du système digestif libèrent l'hème de l'hémoglobine dans l'intestin durant la digestion (**Figure 8**). L'hème intestinal, est internalisé par les cellules épithéliales du duodénum qui le transfèrent dans le sang. L'absorption intestinale de l'hème est plus efficace que l'absorption du fer libre (West and Oates, 2008). Ainsi, une alimentation riche en viande rouge est une importante source d'hème (Geissler and Singh, 2011). Il a été démontré qu'un tel régime favorise les bactéries à GRAM négatif telles que *Bacteroides thetaiotaomicron* (Ijssennagger *et al.*, 2012) qui ont besoin vital d'hème. A l'inverse, chez les végétariens, *Bacteroidetes* constitue une proportion moindre du microbiote mais néanmoins présente, ce qui semble indiquer qu'il existe d'autres sources d'hème (Zimmer *et al.*, 2012).

A.2.2.2 Les micro-saignements intestinaux

Ces micro-saignements (ou pertes de sang occultes) peuvent, chez un individu sain, être responsables de la perte de 0.5 à 1.5 ml de sang par jour dans le TD (**Figure 8**) (Ahlquist *et al.*, 1985). Dans certains cas comme les cancers colorectaux, ces saignements peuvent devenir importants et la détection de sang dans les selles constitue une technique de dépistage (Park *et al.*, 2010 ; Halpern and Gruss, 2015).

A.2.2.3 L'hème provenant des bactéries du microbiote

Les γ -protéobactéries, en particulier, les entérobactéries comme *Escherichia.coli* constituent le seul groupe synthétisant l'hème dans le microbiote intestinal. Ces bactéries sont parmi les premières à coloniser le tractus digestif des nouveau-nés (Fanaro *et al.*, 2003). Il a été montré *in vitro* qu'*E. coli* cultivée en présence de *B. thetaiotaomicron* pouvait apporter l'hème nécessaire à la survie de cette dernière (**Figure 8**) (Halpern and Gruss, 2015). Ces résultats permettent d'envisager l'hypothèse que dans le TD, *Bacteroides* complémente son besoin en hème, au moins en partie, à partir de *E. coli*, la seule entérobactérie synthétisant l'hème dans les intestins (Halpern and Gruss, 2015).

A.2.3 Les autres sources d'hème

Les végétaux peuvent aussi constituer une source d'hème (West and Oates, 2008). Certains d'entre eux, telles que les légumineuses produisent des nodules dans leurs racines. Ces nodules contiennent des bactéries du genre *Rhizobium* qui ont une relation symbiotique avec la plante. Dans ces nodules, de la leghémoglobine (dont la structure est très proche de l'hémoglobine animale) est synthétisée, qui résulte de cette symbiose : la plante synthétise la partie globine tandis que *Rhizobium* synthétise l'hème qui se lie à la globine. Cette structure permet le transport d'oxygène indispensable aux bactéries *Rhizobium* qui sont aérobies (Brear *et al.*, 2013). De l'hème est aussi présent dans le rumen des vaches, qui est un organe où *Bacteroides ruminicola* peut survivre et se développer malgré son besoin indispensable pour cette molécule (Bryant and Robinson, 1962).

A.3 L'acquisition de l'hème chez les bactéries à GRAM positif

Les mécanismes aboutissant à l'acquisition de l'hème exogène par les bactéries à Gram positif sont encore mal connus à l'exception de certaines bactéries telles que *Staphylococcus aureus*. Chez les trois bactéries utilisées dans ce travail de thèse, *Lactococcus*

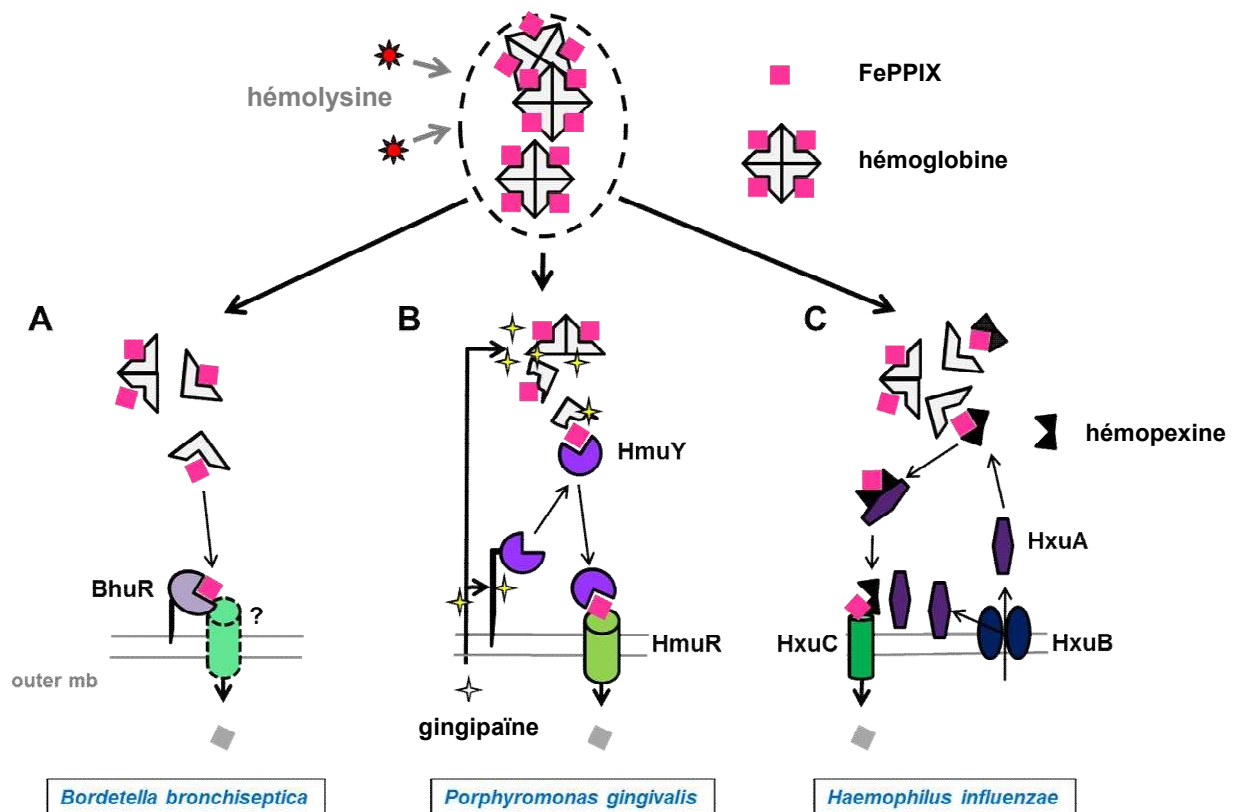


Figure 9. Capture de l'hème. La libération de l'hémoglobine stockée sous forme réduite dans les érythrocyte est contrôlée par l'action des hémolysines bactériennes. Dans l'environnement sanguin, l'hémoglobine oxydée est déstabilisée entraînant la dislocation du tétramère provoquant la diminution de l'affinité de l'hème pour la globine. Les bactéries utilisent différentes stratégies pour récupérer l'hème associé à l'hémoglobine (source Gruss *et al.*, 2012). (A) *Bordetella bronchiseptica* lie l'hème via une lipoprotéine; (B) *Porphyromonas gingivalis* libère des gingipaïnes qui dégradent l'hémoglobine permettant la libération de l'hème qui est ensuite piégé par l'hémophore HmuY et internalisé par HmuR; (C) *Haemophilus influenzae* sécrète la protéine HxuA qui se lie spécifiquement à l'hémopexine chargé en hème. L'hème est ensuite internalisé par HxuC.

lactis, *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis*, ces mécanismes restent à élucider. Les données actuelles montrent que l'acquisition de l'hème exogène fait intervenir des systèmes de reconnaissance (hémophores sécrétés ou de surface) et de transport (lipoprotéines membranaires et transporteurs ABC) présents au niveau de la paroi et de la membrane.

En dehors des conditions de laboratoire, l'hème libre est peu présent sous sa forme libre et majoritairement complexé à des protéines dans l'environnement, tel que, en particulier, l'hémoglobine du sang (**Partie 1 § A.2.1.1**). Pour donner un aperçu global des stratégies mises en place par les bactéries pour acquérir l'hème, différents exemples seront décrits aussi bien chez les bactéries à Gram négatif que chez les bactéries à Gram positif.

A.3.1 Libération spontanée de l'hème de l'hémoglobine

L'hème est lié à l'Hb par une liaison non-covalente (**Partie 1 § A.3.1.2**). L'affinité de l'hème pour l'Hb diminue fortement en dehors de l'environnement des érythrocytes (Hargrove *et al.*, 1996). En effet, dans les érythrocytes, la forte affinité de l'hème pour l'apo-hémoglobine est optimisée par l'environnement réducteur et maintient le fer de l'hème sous forme ferreux (Fe^{2+}) (Hargrove and Olson, 1996). L'hémolyse des érythrocytes, en particulier, par les hémolysines bactériennes, provoque la libération de l'Hb. L'hème de l'Hb s'oxyde spontanément dans le milieu oxydant du sang (Kumar and Bandyopadhyay, 2005). Cette oxydation entraîne une diminution de l'affinité de la liaison compatible avec une dissociation spontanée du complexe dans le milieu sanguin et/ou un transfert de l'hème de l'Hb vers des hémoprotéines telles que l'albumine sérique ou l'hémopexine (par transfert d'affinité) (**Partie 1 § A.2.1.2**) (Ascenzi *et al.*, 2005). Ce phénomène permettrait à la plupart des bactéries qui expriment des récepteurs de l'hème à leur surface de pouvoir lier l'hème (Nobles and Maresso, 2011). Par exemple, *Bordetella bronchiseptica* acquiert l'hème spontanément libéré de l'Hb ou de la myoglobine grâce à la lipoprotéine BhuR (Bordetella heme utilization) (**Figure 9, A**) (Mocny *et al.*, 2007). Des stratégies plus complexes pour piéger l'hème de l'environnement ont néanmoins été mises en évidence chez certaines bactéries.

A.3.2 Digestion protéolytique des hémoprotéines

Porphyromonas gingivalis est une bactérie à GRAM négatif dont le système d'import de l'hème HmuY/HmuR (heme utilization Y et R) a peu d'affinité pour l'hème (K_d de l'ordre du μM) (**Figure 9**). Cette bactérie sécrète des protéases de la famille des trypsines, les gingipaïnes spécifiques des lysines ou des arginines (**Figure 9, B**) (Cutler *et al.*, 1995), capables de dégrader l'Hb, l'Hx, et l'Alb. Partiellement dégradées, les hémoprotéines libèrent

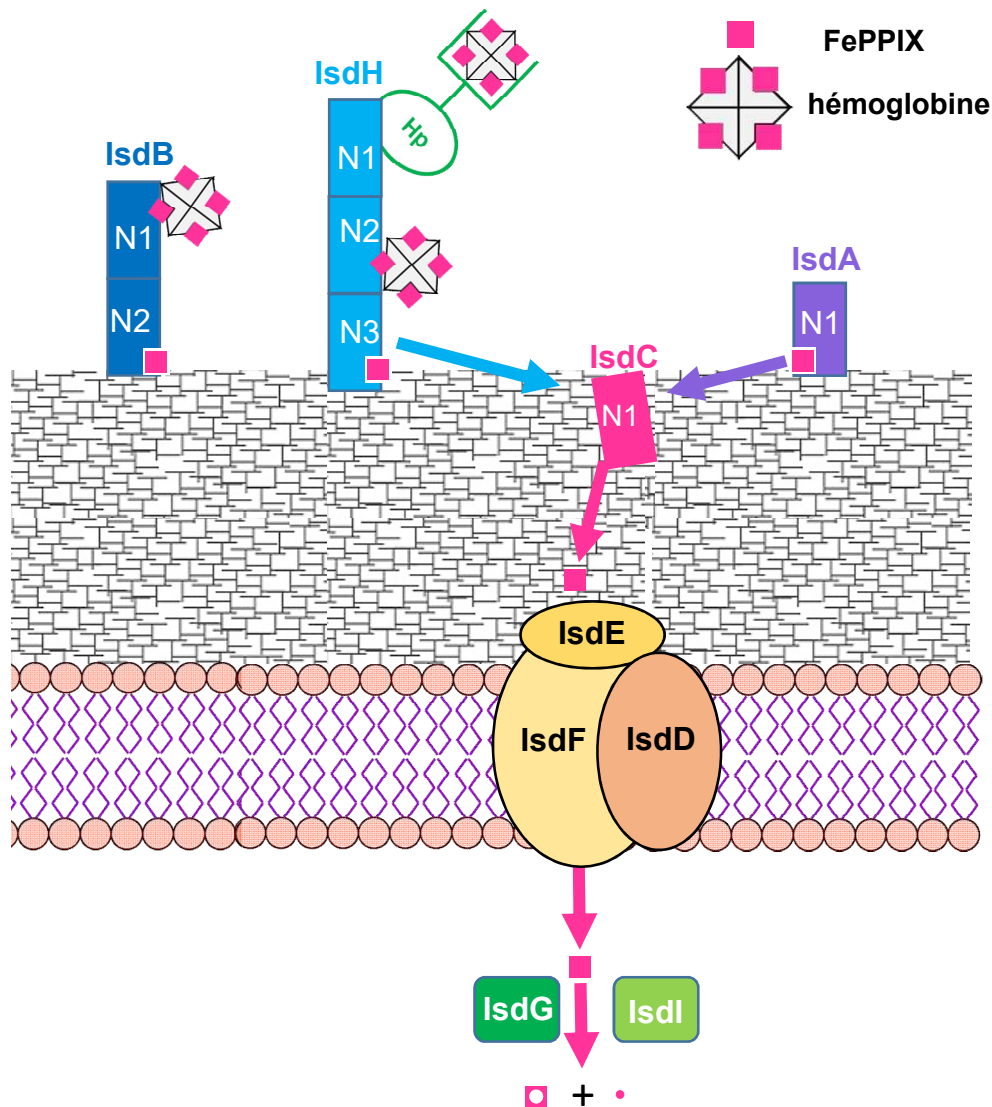


Figure 10. Le système Isd chez *Staphylococcus aureus*. IsdB, H et A sont ancrées à la paroi par la sortase. Ces protéines possèdent respectivement 2, 3 et 1 domaines NEAT (nommés N en blanc) qui permettent la liaison à l'hème, à l'hémoglobine, et à l'haptoglobine (Hp en vert). L'hème est transféré à IsdC (en rose) puis à travers le système de transport IsdDEF. Une fois internalisé, l'hème est dégradé par IsdG et I (en vert) et le fer (●) est séparé de la porphyrine (◻).

l'hème dans le milieu qui peut alors être capturé par l'hémophore HmuY (**Figure 9, B**) (Wójtowicz *et al.*, 2009).

A.3.3 Capture des hémoprotéines

Une autre stratégie mise en évidence chez certaines bactéries est leur capacité à piéger certaines hémoprotéines dont elles vont extraire l'hème par un mécanisme secondaire. Quelques exemples ont été décrits :

A.3.3.1 Capture de l'hémopexine par *Haemophilus influenzae*

Cette bactérie exprime l'opéron *hxuCBA* impliqué dans l'import de l'hème à partir du complexe hème-Hx (**Figure 9, C**). HxuA est sécrété via HxuB et se lie au complexe hème-Hx de l'hôte. La liaison de HxuA entraîne un changement conformationnel de l'hémopexine qui perd sa forte affinité pour l'hème qui peut alors être transféré à HxuC (**Figure 9, C**) (Fournier *et al.*, 2011; Zambolin *et al.*, 2016).

A.3.3.2 Capture de l'hème, de l'hémoglobine et de l'hémopexine chez *Staphylococcus aureus*

S. aureus (Staphylocoque doré) est une bactérie pathogène responsable d'infections très variées, comme par exemple, des intoxications alimentaires, des infections cutanées, des pneumonies, des endocardites (Moet *et al.*, 2007). Cette bactérie synthétise son propre hème mais il a été démontré que l'hème de l'hôte est pourtant sa source préférentielle de fer (Rouault, 2004). *S. aureus* est l'une des rares bactéries à GRAM positif dont le système de capture et d'internalisation de l'hème, le système Isd pour « iron surface determinant » a été décrit de manière extensive dans la littérature (**Figure 10**). Ce système est exprimé en opéron de 9 gènes codant pour 9 protéines impliquées dans la capture de l'hème, son internalisation (**Partie 1 § A.3.2**) et sa dégradation dans le cytoplasme, ainsi que les sortases A et B qui permettent l'ancrage de certaines de ces protéines à la paroi comme les protéines IsdB, H et A (Mazmanian *et al.*, 1999) (**Figure 10**). IsdB est capable de lier l'Hb et l'hème (Pishchany *et al.*, 2014) tandis que IsdH est capable de lier l'Hb, l'Hx ou l'hème seul (Dryla *et al.*, 2003). Ces 2 protéines peuvent extraire l'hème de ces hémoprotéines via un de leur domaine NEAT (**Partie 1 § A.1.3**) et le transférer à IsdA.

Le transport jusqu'à la membrane : IsdC n'a qu'un seul domaine NEAT, il ne peut lier que l'hème apporté directement par IsdB et IsdH ou via IsdA. IsdC est localisé dans la paroi,

ancré à celle-ci par la sortase B. IsdC a pour fonction d'apporter l'hème à IsdE pour son transfert dans le compartiment intracellulaire de la bactérie (Zhu *et al.*, 2008) (**Figure 10**).

L'internalisation de l'hème : IsdE est une lipoprotéine qui transfère l'hème à IsdDF, un transporteur ABC qui permet le passage de la membrane plasmique. Le transfert est permis par un apport d'énergie fourni par l'ATPase IsdD (**Figure 10**).

Devenir de l'hème : Une fois internalisé dans le compartiment intracellulaire de la bactérie, l'hème est dégradé et le fer récupéré par les protéines IsdG et IsdI (Skaar *et al.*, 2004) (**Figure 10**). Ces protéines sont deux hème-oxygénases (**Partie 1 § A.6.3**).

Un mécanisme similaire a été identifié chez *Bacillus cereus* (Daou *et al.*, 2009; Abi-Khalil *et al.*, 2015).

A.4 Contrôle de l'homéostasie de l'hème chez les bactéries à GRAM positif

L'hème étant potentiellement toxique (**Partie 1 § A.1.2.2**), le maintien d'une concentration d'hème intracellulaire à une concentration subtoxique est crucial pour la survie des bactéries, en particulier pour les bactéries à GRAM positif qui sont plus sensibles à la toxicité de l'hème que les bactéries à GRAM négatif (Nitzan *et al.*, 1994). Les bactéries ont développé différentes stratégies pour contrôler la toxicité de l'hème, dont la plus connue consiste en l'efflux de l'excès d'hème. L'expression d'oxygénases peut aussi contribuer à la réduction de la toxicité de l'hème en clivant le noyau porphyrinique permettant le recyclage de l'atome de fer (**Partie 1 § A.6.3**). Deux systèmes de transport membranaire permettant l'export de l'hème ont été mis en évidence à ce jour chez les bactéries à GRAM positif, le système *hrt* (heme-regulated transporter) (Lechardeur *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2007) et le système *pef* (Fernandez *et al.*, 2010). À noter l'existence d'un troisième système chez *Neisseria gonorrhoeae*, une bactérie à GRAM négatif, qui exprime un transporteur d'efflux de molécules hydrophobes *MtrCDE*, qui participe à la résistance à la toxicité générée par l'hème (Hagman *et al.*, 1995).

A.4.1 Le transporteur d'efflux HrtBA

A.4.1.1 Identification

Une étude protéomique à partir de cultures de *Staphylococcus aureus* a permis d'identifier pour la première fois un opéron fortement induit (45x) en présence d'hème ajouté dans le milieu de culture (Friedman *et al.*, 2006). Cet opéron nommé *hrtBA* contient 2 gènes

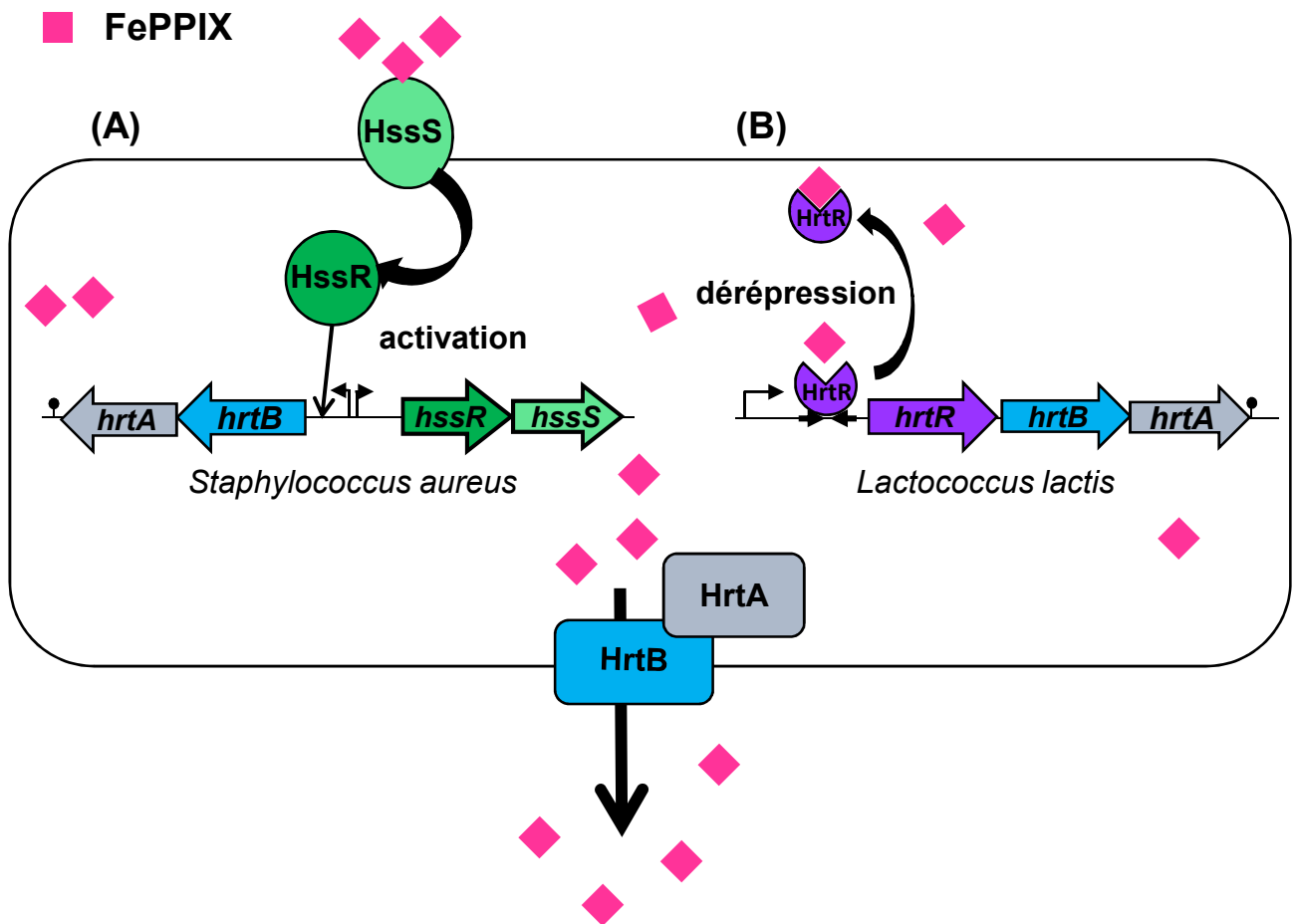


Figure 11. Régulation du transporteur d'efflux de l'hème chez *Lactococcus lactis* et *Staphylococcus aureus*. Deux systèmes d'expression de HrtBA ont été décrits : (A) chez *S. aureus*, un système à deux composants active la transcription d'*hrtAB*; (B) chez *L. lactis*, l'opéron HrtBA est contrôlé par le répresseur transcriptionnel HrtR. Les deux systèmes de régulations sont activés par l'hème.

codant pour une perméase (HrtB) et une ATPase (HrtA) formant un transporteur de la famille ABC (HrtBA) (Friedman *et al.*, 2006; Stauff *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2007).

Chez *Lactococcus lactis*, HrtBA a été mis en évidence dans une étude transcriptomique dans laquelle l'opéron *ygfCBA* est fortement induit (40 x) (Vido *et al.*, 2004; Pedersen *et al.*, 2008). Cet opéron code pour trois protéines : YgfC, YgfB, et YgfA. Les protéines YgfB and YgfA, une perméase et une ATPase, sont des protéines homologues de HrtB and HrtA de *S. aureus* (46% et 29% d'identité respectivement) (Lechardeur *et al.*, 2012). La troisième protéine de cet opéron, YgfC rebaptisée, HrtR, participe à la régulation de la transcription du transporteur (Lechardeur *et al.*, 2012). HrtBA est conservé parmi de nombreuses espèces de bactéries à GRAM positif pathogènes ou non mais l'implication des protéines homologues identifiées n'a été démontré expérimentalement que chez quelques espèces dont *S. aureus* (Stauff *et al.*, 2007), *L. lactis* (Lechardeur *et al.*, 2012), *Staphylococcus epidermidis* (Juarez-Verdayes *et al.*, 2012), *Bacillus anthracis* (Stauff and Skaar, 2009), *Corynebacterium diphtheriae* (Burgos and Schmitt, 2012) et *Corynebacterium glutamicum* (Heyer *et al.*, 2012).

A.4.1.2 Fonction de HrtBA

Une étude génomique a montré que HrtBA est un membre de la famille de transporteurs ABC MacAB qui sont impliqués dans l'export de petites molécules (Kobayashi *et al.*, 2001; Turlin *et al.*, 2014). Bien que HrtBA de *S. aureus* ait été identifié en premier et ait fait l'objet de nombreuses études, la démonstration formelle que HrtBA permettait l'efflux de l'hème et non de molécules toxiques générées par la réactivité du fer de l'hème (comme il a d'abord été supposé) (Friedman *et al.*, 2006), a été démontrée chez *L. lactis* (Lechardeur *et al.*, 2012). HrtB est donc un transporteur d'efflux de l'hème.

A.4.1.3 Régulation de l'expression de HrtBA

A ce jour, deux mécanismes distincts de régulation du promoteur de l'opéron *hrtBA* par l'hème de l'environnement ont été identifiés selon les bactéries, un contrôle par un système à deux composants (TCS, two-component system) ou un régulateur transcriptionnel de la famille TetR (**Figure 11**).

- **Le système de « phosphorelay » à deux composants HssS/HssR.**

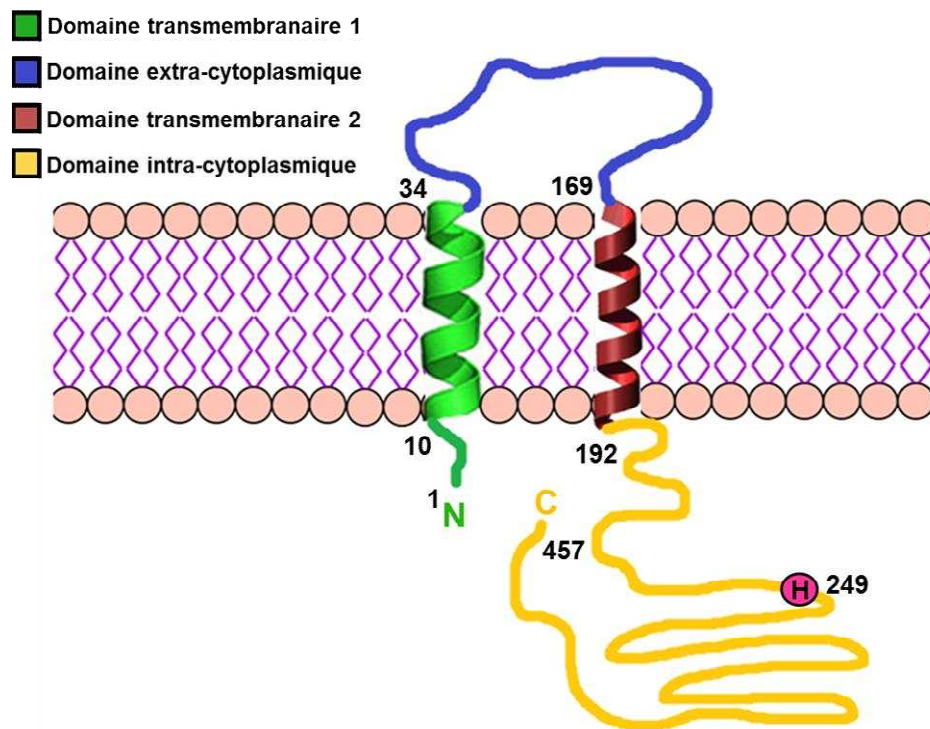


Figure 12. Structure de la protéine HssS chez *S. aureus*. HssS est une protéine membranaire composée d'une courte boucle extracellulaire (en bleu), flanquée de deux domaines transmembranaires (en vert et rouge) prolongés par une région intracytoplasmique (en jaune). En rose, l'histidine 249 s'autophosphoryle à partir d'une molécule d'ATP lorsque le senseur est activé. Cette structure est très conservée parmi les TCS des bactéries pathogènes à GRAM positif (Stauff and Skaar, 2009).

Chez *S. aureus*, l'examen du contexte génomique dans la région locus *hrtBA*, a permis de révéler un locus de deux gènes adjacents à *hrtBA* et codant pour un senseur histidine kinase (HK) et un régulateur de réponse (RR) d'un système à deux composants (Stauff et al., 2007). Les TCS ayant un rôle prépondérant dans l'adaptation des bactéries aux variations physico-chimiques de leur environnement, l'hypothèse a été faite que ce locus pouvait être responsable de la régulation de l'expression de *HrtBA* (Stauff et al., 2007). En effet, la délétion d'une des deux protéines du TCS entraîne une hypersensibilité à l'hème, *HrtBA* n'étant pas exprimé dans ces conditions (Torres et al., 2007). Le locus ainsi impliqué dans la régulation de *hrtBA* a été dénommé *hssRS* (heme sensor system) et code pour les deux protéines du TCS : HssS, une histidine kinase (HK) et HssR, un régulateur de réponse (RR) (Stauff et al., 2007).

HssS est une protéine membranaire de 457 AA (GenBank: AMV80811.1). Elle est composée d'une courte boucle extracellulaire, flanquée de deux domaines transmembranaires prolongés par deux régions intracytoplasmiques. La partie cytoplasmique C terminale est composée de plusieurs domaines conservés (**Figure 12**). Chez les HK dont la phosphorylation entraîne l'activation de RR, le domaine d'autophosphorylation est l'histidine 249 (Stauff and Skaar, 2009). HssS phosphorylée active le domaine effecteur du régulateur de réponse HssR par transfert de phosphorylation (acide aspartique 52) qui peut alors activer l'activité transcriptionnelle de *hrtBA* (**Figure 12**). Des mutants de l'histidine 249 de HssS ou de l'acide aspartique 52 de HssR ne sont plus capables de répondre au signal hème et la réponse adaptative de résistance à la toxicité de l'hème par la transcription de *hrtBA* est bloquée (Stauff et al., 2007). Le mécanisme d'activation transcriptionnelle de *hrtBA* médié par HssR a été élucidé (Stauff et al., 2007) : HssR, une fois phosphorylée par HssS, subit un changement conformationnel qui lui permet de se lier directement au promoteur de l'opéron *hrtBA* sur d'une séquence répétée conservée chez *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *B. cereus*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* (Stauff et al., 2007) (**Figure 13**). Cette séquence répétée est située en amont de la TATA box et du site de fixation du ribosome (**Figure 14**). La délétion ou la modification de certaines bases de cette région empêche la fixation de HssR à l'ADN (Stauff et al., 2007).

Classiquement, les systèmes senseurs des TCS sont activés par des signaux environnementaux par l'intermédiaire de leur partie extracellulaire qui va reconnaître et transduire le signal à la partie intracytoplasmique du senseur activant son autophosphorylation. Dans le cas de HssS, la capacité de la boucle extracytoplasmique de

		**** *		*** * *	
<i>S. aureus</i>	AAACAATT	GTTTCATATT	GA	GTTTCATATT	TCAACCTT
<i>S. epidermidis</i>	TCACACTT	GTTTCATATT	AG	GTTTCATATT	TTCCTCTT
<i>S. haemolyticus</i>	TTCTTAAA	GTTTCATATT	CA	GTTTCATAAT	GTGTCATT
<i>S. saprophyticus</i>	TTAGATGC	GTTTCATATT	GA	GTTTCACATT	GATAGCAT
<i>B. cereus</i>	AATCTTCT	GTTTCATATT	CC	GTTTCATATT	TCTTTTTT
<i>B. anthracis</i>	AATCTTCT	GTTTCATATT	CC	GTTTCATATT	TCTTTTTT
<i>L. monocytogenes</i>	AAAATCCG	ATTCACATT	CC	GTTTACAAC	ACTTCTTT
<i>L. innocua</i>	AAAATCCG	ATTCACATT	CC	GTTTACAAA	ACTTCTTT

Figure 13. Conservation de la séquence répétée dans le promoteur de *hrtBA*. Une séquence répétée en tandem (en gras) a été identifiée dans la région promotrice de l'opéron *hrtBA* comme site de fixation de HssR. Les bases en bleu marquées par une étoile sont conservées à travers les différentes espèces citées (Stauff *et al.*, 2007).



Figure 14. Organisation du promoteur de l'opéron *hrtBA*. La séquence répétée (cadres bleus) est située en amont de la TATA box (en rose) et du site de fixation du ribosome (RBS en jaune)

-37 -23
 L. Lactis 5' ATGACACAGTGCAT AAATTAAATGATTGGAGAAAAAATG 3'

Figure 15. Séquence palindromique de fixation d'HrtR. Dans le promoteur de l'opéron *hrtRBA* chez *L. lactis*, une séquence palindromique de 15 nucléotides (encadrée en bleu) est le site de fixation d'HrtR en absence d'hème.

HssS de *S. aureus* (**Figure 12**) à lier l'hème n'est pas connu. Cependant, des mutations ponctuelles de ce domaine ont cependant permis d'identifier certains AA qui semblent indispensables à la transduction du signal hème suggérant que le domaine extracellulaire joue un rôle qui reste à déterminer dans l'activation de HssS (Stauff and Skaar, 2009).

● Le régulateur transcriptionnel HrtR.

La découverte des protéines YgfB et YgfA présentant respectivement 46% et 29% d'identité avec les protéines HrtA et HrtB de *S. aureus* et dont l'expression était fortement induite en présence d'hème (voir ci-dessus) a posé la question de la fonction de la protéine YgfC présente dans l'opéron *ygfCBA* (Pedersen *et al.*, 2008). L'analyse de cette protéine a montré qu'elle appartenait à la famille des régulateurs transcriptionnels TetR (Cuthbertson and Nodwell, 2013), d'où l'hypothèse que YgfC rebaptisé HrtR par analogie au système Hrt de *S. aureus*, pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression de HrtBA chez *L. lactis* (**Figure 11, B**). La délétion du gène *hrtR* entraîne un phénotype d'hypersensibilité à l'hème démontrant le rôle d'HrtR dans l'activité transcriptionnelle de l'opéron *hrtRBA* (Lechardeur *et al.*, 2012). Le mécanisme de cette régulation a été élucidé tout d'abord en montrant, que HrtR fixe l'hème par une liaison hexacoordonnée impliquant les histidines 72 et 149 (Lechardeur *et al.*, 2012). L'impact de cette fixation sur la régulation a été montrée par des expériences de retard sur gel. En l'absence d'hème, HrtR, de manière similaire à TetR (Lechardeur *et al.*, 2012) se fixe via une arginine (R46) et une tyrosine (Y50) sur une séquence palindromique de 15 nucléotides (**Figure 15**) présente dans le promoteur de l'opéron *hrtRBA*, réprimant sa transcription (Lechardeur *et al.*, 2012) (**Figure 11, B**). Lorsqu'HrtR se lie à l'hème, la protéine change de conformation ce qui entraîne la perte de l'affinité pour la liaison à l'ADN (Sawai *et al.*, 2012).

A.4.1.4 Distribution de HrtR et de HssRS parmi les bactéries à GRAM positif

Une recherche d'homologues de HrtR ou de HssRS parmi les bactéries à GRAM positif montre que HrtR est présent dans les bactéries commensales et/ou alimentaires alors que le système à deux composants HssRS est retrouvé plutôt chez des bactéries pathogènes (**Tableau II**). Ceci suggère que la régulation transcriptionnelle de HrtBA est adapté à l'environnement bactérien notamment au sang pour les pathogènes (Lechardeur *et al.*, 2012; Stauff *et al.*, 2007).

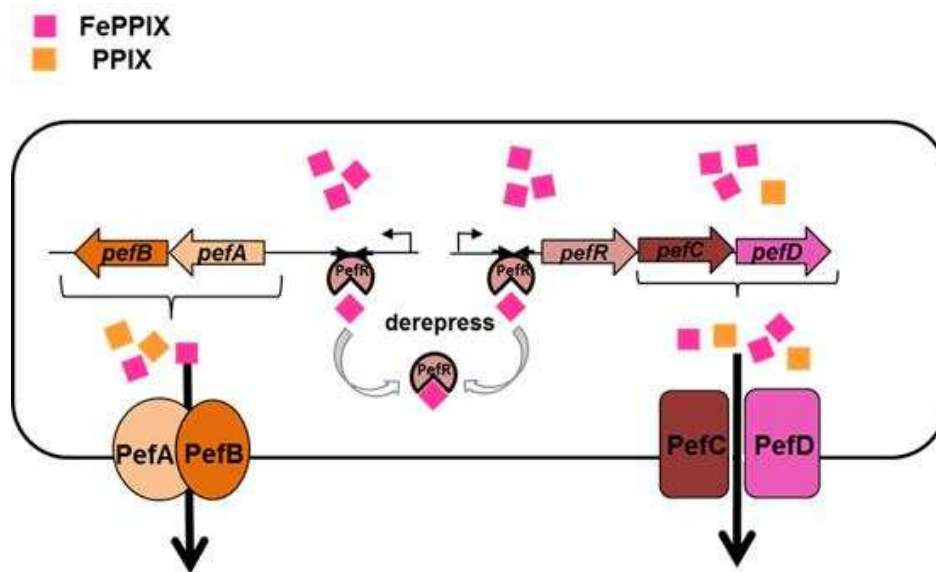


Figure 16. Le système de contrôle de la toxicité de l'hème Pef chez *S. agalactiae*. L'hème et les porphyrines intracellulaires activent le régulateur intracellulaire PefR. PefR contrôle la transcription de PefAB et PefCD. Par le même mécanisme que pour HrtR, l'hème fixe PefR qui lève la répression de transcriptions des différents gènes.

Tableau II. Distribution de HssRS et HrtR parmi les bactéries à GRAM positif

Système à 2 composants HssRS	Système à 1 composant HrtR
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Lactococcus lactis, lactis</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Lactococcus lactis, cremoris</i>
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Lactobacillus delbruckii</i>
<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Listeria innocua</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Lactobacillus amylolyticus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus vaginalis</i>
	<i>Leuconostoc kimchii</i>
	<i>Leuconostoc citreum</i>

A.4.2 Le système d'efflux de porphyrines (Pef)

Le système de transporteurs Pef (Porphyrin efflux) a été mis en évidence chez *Streptococcus agalactiae* dans une étude transcriptomique dans laquelle deux opérons *pefAB* et *pefRCD* étaient fortement induits en présence d'hème (Fernandez *et al.*, 2010). Ces 2 opérons sont régulés par PefR (**Figure 16**) (Fernandez *et al.*, 2010) qui appartient à la famille des répresseurs transcriptionnels de la famille MarR (multiple antibiotic resistance regulator) (Fernandez *et al.*, 2010). Ces régulateurs sont impliqués dans la régulation de gènes impliqués dans la réponse au stress, la virulence ou l'export de produits toxiques comme les antibiotiques (Wilkinson and Grove, 2006). PefR se fixe sur les promoteurs des 2 opérons *pefAB* et *pefRCD*. En présence d'hème mais aussi de protoporphyrine (le noyau porphyrinique sans fer, PPIX), l'inhibition de la transcription des 2 opérons est levée permettant l'induction de l'expression des transporteurs PefAB et PefCD (Krishnamurthy *et al.*, 2007). Leur délétion entraîne une hypersensibilité à l'hème. Le système Pef est induit pour des quantités d'hème faibles par rapport à HrtBA (Fernandez *et al.*, 2010). Un système similaire a été identifié chez *Streptococcus pyogenes* où il a été montré que Pef n'était pas spécifique de l'hème et de PPIX mais pouvait aussi transporter de multiples composés comme des antibiotiques (ampicilline,

erythromycine, norfloxacine), d'autres médicaments comme la doxorubine ou des agents toxiques comme l'intercalant de l'ADN bromure d'éthidium (Sachla and Eichenbaum, 2016). Le système Pef participerait donc à l'homéostasie de l'hème mais serait un système non spécifique de cette molécule contrairement à HrtBA. Des orthologues du système Pef sont exprimés chez *Enterococcus faecalis* (PefAB) (Fernandez *et al.*, 2010), *Streptococcus pyogenes* (PefCD) (Sachla and Eichenbaum, 2016) ou *Streptococcus uberis* (PefAB et PefCD) (Fernandez *et al.*, 2010). Un système d'efflux similaire a été identifié chez la bactérie à GRAM négatif *E. coli* (Turlin *et al.*, 2014).

A.5 Chaperonnes intracellulaires

La toxicité et la faible solubilité de l'hème soulèvent la question de la présence de protéines chaperonnes qui pourraient prévenir la toxicité de l'hème importé. Par exemple, chez *E.coli*, la protéine CcmE (cytochrome c maturation) lie l'hème et le délivre à une cytochrome *c* (Feissner *et al.*, 2006). Des protéines ayant un rôle de chaperonne ont été décrites chez certaines bactéries à GRAM positif mais leur rôle reste à préciser.

A.5.1 L'alkylhydroperoxyde reductase (AhpC)

L'alkylhydroperoxyde reductase 2-Cys peroxiredoxine C (AhpC) a récemment été identifiée comme une protéine capable de lier l'hème chez les bactéries à GRAM positif comme *L. lactis* et *S. agalactiae*. AhpC appartient à la famille des peroxyredoxines (Prx). Ces protéines font partie d'une famille très conservée de peroxydases impliquées dans la défense des bactéries contre le stress oxydant (Rhee, 2016). Ces protéines sont aussi impliquées dans la régulation de fonctions comme la transcription et l'apoptose chez les eucaryotes (Rhee, 2016). AhpC lie l'hème mais n'a pas de fonction catalytique pour cette peroxydase (Lechardeur *et al.*, 2010). Cette protéine présente 38% d'homologie de séquence avec HBP23, protéine présente dans le foie de rats qui a une forte affinité pour l'hème mais dont la fonction est encore inconnue (Iwahara *et al.*, 1995). Chez *S. agalactiae* un mutant Δ ahpC perd en partie sa capacité à respirer en présence d'hème exogène suggérant que la complémentation du cytochrome *bd* est perturbé (Lechardeur *et al.*, 2010). Le même mutant transformé avec la catalase A à hème de *E. faecalis* (**Partie 1 § A.6**) exprime moins de catalase fonctionnelle, c'est à dire liée à l'hème (Lechardeur *et al.*, 2010). Des expériences *in vitro* ont montré que la liaison de AhpC avec l'hème protège la molécule des dégradations oxydatives. Ces résultats suggèrent que AhpC participe à la biodisponibilité de l'hème

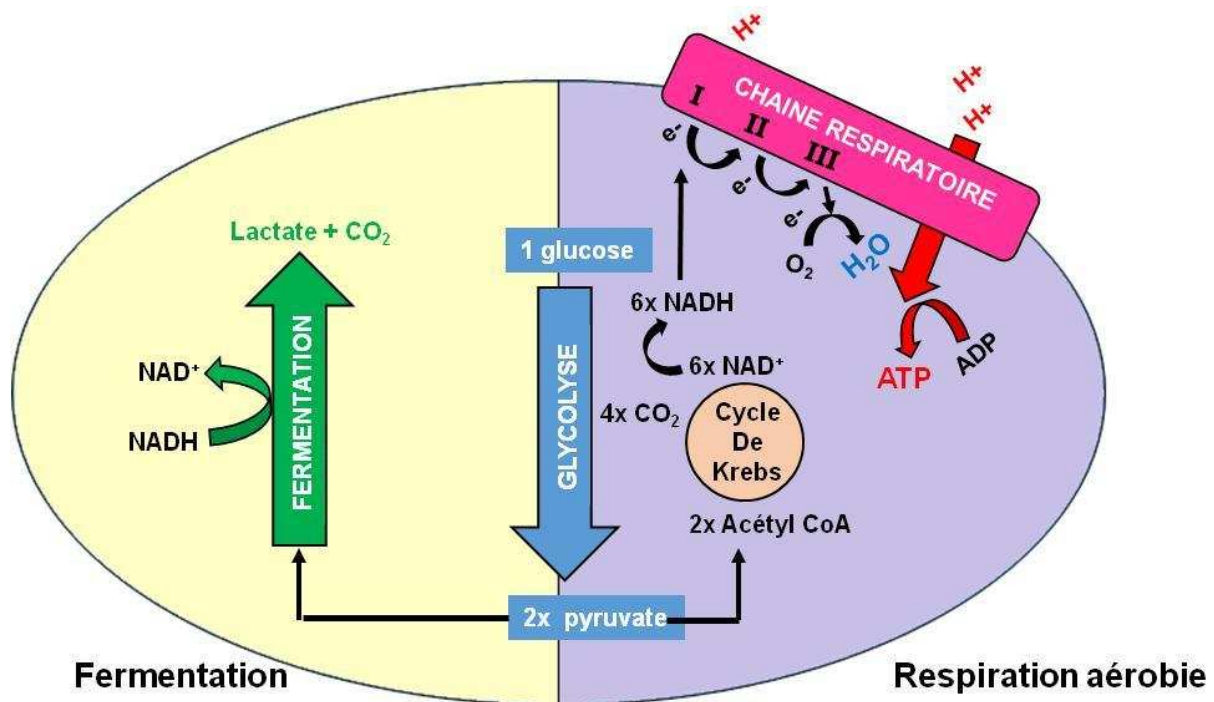


Figure 17. Fermentation et respiration aérobie. La glycolyse permet la formation de pyruvate à partir de sucres comme le glucose (en bleu). Dans le cas de la fermentation (en vert, partie jaune), le pyruvate est transformé en lactate et CO_2 sous l'action de la lactate deshydrogénase. Cette réaction entraîne l'oxydation du NADH en NAD^+ . Lors de la respiration aérobie (en violet), le pyruvate est oxydé en acétyl-CoA. L'acétyl CoA entre dans le cycle de Krebs (en rose pâle) avec la formation de CO_2 et de NADH. Le NADH est oxydé en NAD^+ par le complexe I de la chaîne respiratoire. Les protons (en rouges) sont efflués dans le milieu extracellulaire et les électrons transportés du complexe I au II puis au III. Les électrons sont alors utilisés par l' O_2 pour former de l'eau. Les protons rentrent à l'intérieur de la bactérie en activant l'ATP synthase (en rouge) qui catalyse la formation d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi).

internalisé et optimise son utilisation intracellulaire chez *S. agalactiae*, d'où l'hypothèse d'une fonction chaperonne de l'hème pour cette protéine (Lechardeur *et al.*, 2010).

A.5.2 La déshydrogénase HemW

L. lactis est auxotrophe pour l'hème mais elle exprime pourtant deux gènes caractéristiques : *hemH* et *hemW* (aussi nommé *hemN*). Le gène *hemH* code pour une ferrochélatase qui permet l'insertion du fer dans la protoporphyrine ce qui permet à la bactérie d'utiliser aussi bien la protoporphyrine IX que l'hème pour permettre le fonctionnement de la cytochrome *bd* oxydase (**Partie 1 § A.6.1.1**) et permettre à la bactérie d'activer le métabolisme respiratoire (Bolotin *et al.*, 2001). Le gène *hemW* code pour une protéine qui possède 50 % d'identité avec *HemN*, une déshydrogénase du coproporphyrinogène III qui intervient dans la synthèse de l'hème. Cependant HemW ne possède pas de fonction enzymatique car elle ne possède pas le site catalytique de la deshydrogénase (**Figure 2**) (Layer *et al.* 2002). HemW lie l'hème dans la membrane. Un rôle de chaperonne de l'hème pour la chaîne respiratoire de manière similaire aux protéines Ccm chez *E. coli* a été suggéré mais reste à démontrer (Abicht *et al.*, 2012).

A.6 Utilisation métabolique de l'hème chez les bactéries à GRAM positif

Chez les bactéries à GRAM positif, l'hème est majoritairement utilisé dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire et des catalases à hème. Il a été aussi montré que l'hème est la source préférée de fer pour certains pathogènes tels que *S. aureus* (Skaar *et al.*, 2004).

A.6. 1 Métabolisme respiratoire

Les procaryotes, ont besoin pour survivre et se multiplier, de produire de l'énergie sous forme d'ATP le plus souvent à partir de sucres comme le glucose. Le glucose est catabolisé au cours de la glycolyse. Dans cette voie catabolique, le glucose est dégradé en NADH et pyruvate suivant la formule simplifiée : $(1 \text{ glucose} + 2\text{ADP} + 2 \text{ Pi} + 2 \text{ NAD}^+ \rightarrow 2 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ pyruvates})$. Le pyruvate est utilisé dans deux voies 2 voies métaboliques, la fermentation ou la respiration (**Figure 17**).

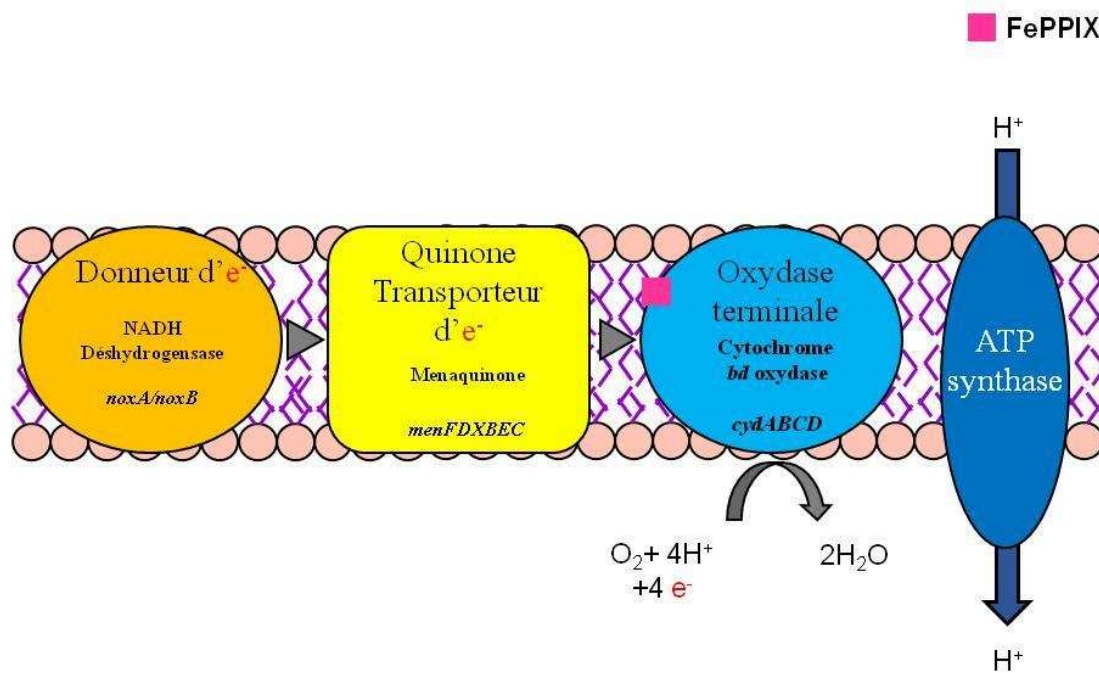


Figure 18. La chaîne respiratoire La chaîne respiratoire est composée de la NADH déshydrogénase comme donneur d'électrons. Les quinones agissent comme transporteurs d'électrons jusqu'au cytochrome *bd*. L'hème est indispensable au fonctionnement de la cytochrome oxydase qui est l'accepteur d'électrons. L'oxygène récupère alors 4 électrons pour former 2 molécules d'eau. Les protons permettent l'activation de l'ATP synthase par un mécanisme appelé « force protomotrice ».

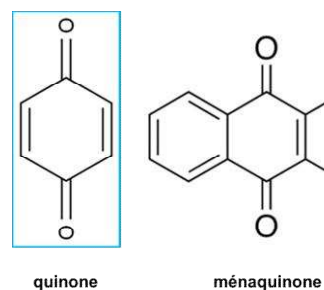


Figure 19. Structure des ménaquinones. Les quinones sont des composés à noyau benzéniques. Ces structures sont cycliques mais, à la différence du benzène, deux liaisons carbone-hydrogène sont remplacées par deux doubles liaisons carbone-oxygène. Les ménaquinones appartiennent à la famille des naphtoquinones mais diffèrent par la présence d'un groupement méthyle. Les ménaquinones varient au niveau de la taille de leur chaîne latérale (R) $n=7$ pour MK7 et $n=10$ pour MK10.

A.6.1.1 Fonctionnement de la chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est constituée d'un ensemble de protéines insérées dans la membrane de la bactérie. Il s'agit d'une chaîne de transport d'électrons qui part du donneur NADH pour parvenir à l'oxygène, l'accepteur final d'électrons dans le cas de la respiration aérobie (**Figure 17**). Lorsque l'accepteur final d'électrons n'est pas l'oxygène mais l'ion nitrate ou l'ion sulfate, la respiration est dite anaérobie. Dans le métabolisme respiratoire, le pyruvate est oxydé en acétyl-coenzyme A (acétyl CoA) par la pyruvate déshydrogénase avec un dégagement de CO₂ dans le cycle de Krebs (**Figure 17**) (Gest, 1987). Le cycle de Krebs permet la formation de 8 NADH (en plus des 2 déjà produits par la glycolyse) par molécule de glucose (**Figure 17**). Ces NADH formés sont pris en charge par la NADH déshydrogénase, complexe I de la chaîne respiratoire.

Les étapes successives de la chaîne respiratoire sont constituées d'une série de réactions d'oxydo-réduction :

● Complexe I : la NADH déshydrogénase

La NADH déshydrogénase (ou complexe I) est la première enzyme de la chaîne respiratoire (**Figure 18**). La NADH déshydrogénase oxyde le NADH en NAD⁺ + H⁺ et libère 2 électrons. Les protons libérés traversent la membrane et s'accumulent dans le milieu extracellulaire.

● Complexe II : les quinones

Les quinones sont des composés de structure benzénique, Il existe différentes familles de quinones dont les ménaquinones (MK), possédant un noyau naphtalène, un groupement méthyl et une chaîne latérale carbonée. Les MK sont synthétisées par les bactéries à GRAM positif (Meganathan, 2001) (**Figure 19**). Chez ces organismes, la structure des MK varie par la longueur de sa chaîne latérale (MK-7 à MK-10) (**Figure 19**). La synthèse des ménaquinones est conservée chez les bactéries à GRAM positif et nécessite plusieurs enzymes codées par les gènes *men* (Meganathan, 2001). Les quinones, aussi appelées complexe II, sont réduites en quinols par les électrons issus de l'oxydation du NADH par le complexe I. Les quinols sont ré-oxydés en quinones une fois les électrons transmis aux cytochromes qui constituent le complexe III de la chaîne (**Figure 20**) (Borisov and Verkhovsky, 2015).

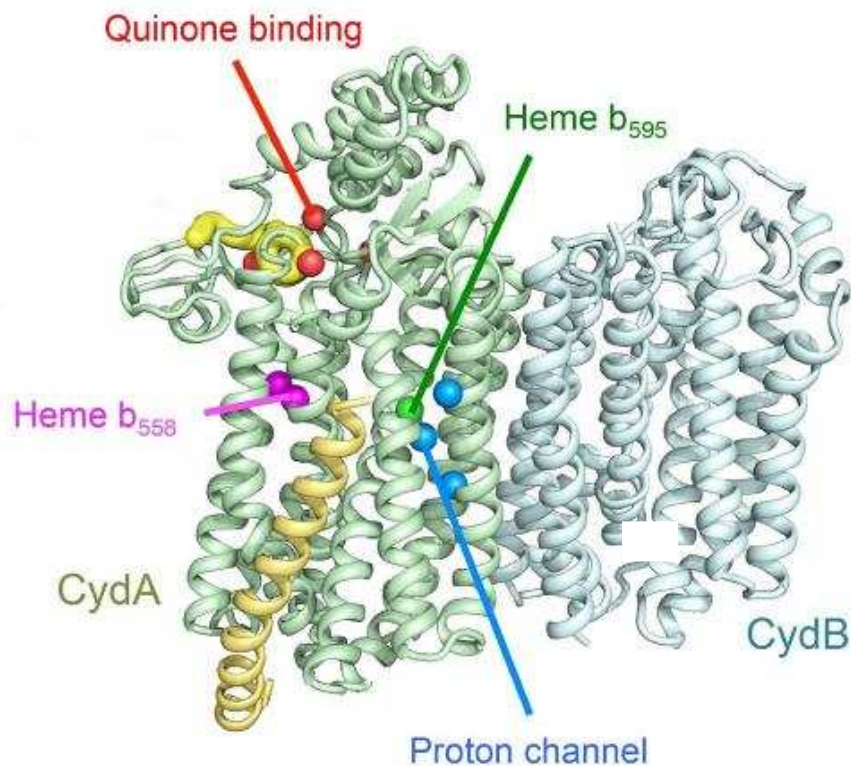


Figure 20. La Cytochrome *bd* oxydase. Le cytochrome *bd* oxydase est composé de 2 sous unités (A en vert et B en gris). Il est lié aux complexes qui l'entourent c'est-à-dire le complexe III formé par les quinones (en rouge) et l'ATP synthase (en bleu). La cytochrome oxydase est nommée *bd* car elle porte 2 molécules d'hème *b* (en rose et vert) et 1 molécule d'hème *d* (non visible) (Ovchinnikov *et al.*, 2015).

● **Complexe III : les cytochrome oxydases**

Les cytochromes oxydases (complexe III) oxydent les quinols en quinones (**Figure 20**). Plusieurs types de cytochrome existent selon le type d'hème utilisé comme cofacteur. La cytochrome *bd* oxydase est un cytochrome présent uniquement chez les procaryotes (Giuffrè *et al.*, 2014) et qui utilise l'hème sous forme *b* et *d* (Ingledeu *et al.*, 1992). Les cytochromes oxydases utilisent l'hème pour le transfert des électrons à l'oxygène qui est l'accepteur final.

● **L'oxygène, l'accepteur final d'électrons de la respiration aérobie**

L'oxygène est réduit par le cytochrome en présence de deux protons (H^+) (**Figure 18**).

● **L'ATP synthase**

Les protons du milieu extracellulaire sont internalisés par l'ATP synthase (complexe F_0F_1) qui forme un canal transmembranaire. Le passage des protons dans ce canal apporte l'énergie nécessaire pour catalyser la formation d'ATP à partir d'ADP (Dittrich *et al.*, 2004).

A.6.1.2 Avantages du métabolisme respiratoire par rapport à la fermentation

Le rendement énergétique du métabolisme respiratoire est supérieur à celui de la fermentation en terme de nombre de molécules d'ATP produites (Duwat *et al.*, 2001). De plus, la respiration permet de diminuer le stress oxydant provoqué par l'oxygène (Gaudu *et al.*, 2002). En effet, la chaîne respiratoire utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons et le convertit en H_2O . La consommation de l' O_2 prévient ainsi la formation de radicaux libres toxiques qu'il génère (HO et de H_2O_2) (Lechardeur *et al.*, 2011; Gaudu *et al.*, 2002). Enfin, le métabolisme respiratoire permet la régénération du NADH en NAD^+ (**Figure 17**), ce qui limite la production de l'acide lactique à partir du NADH par la lactate déshydrogénase (Yamamoto *et al.*, 2005). Le stress acide généré par l'acide lactique est donc diminué (Lechardeur *et al.*, 2011; Duwat *et al.*, 2001). La respiration permet ainsi une meilleure croissance et une meilleure survie des bactéries

A.6.1.3 Transport et maturation de l'hème nécessaire pour la respiration

La cytochrome *bd* oxydase utilise l'hème *b* et l'hème *d* (**Figure 21**) comme cofacteurs (Borisov *et al.*, 2011). Il n'a pas encore été établi de manière évidente comment cette forme d'hème est synthétisée. Chez les bactéries à GRAM négatif comme *E. coli*, l'hème *b* est

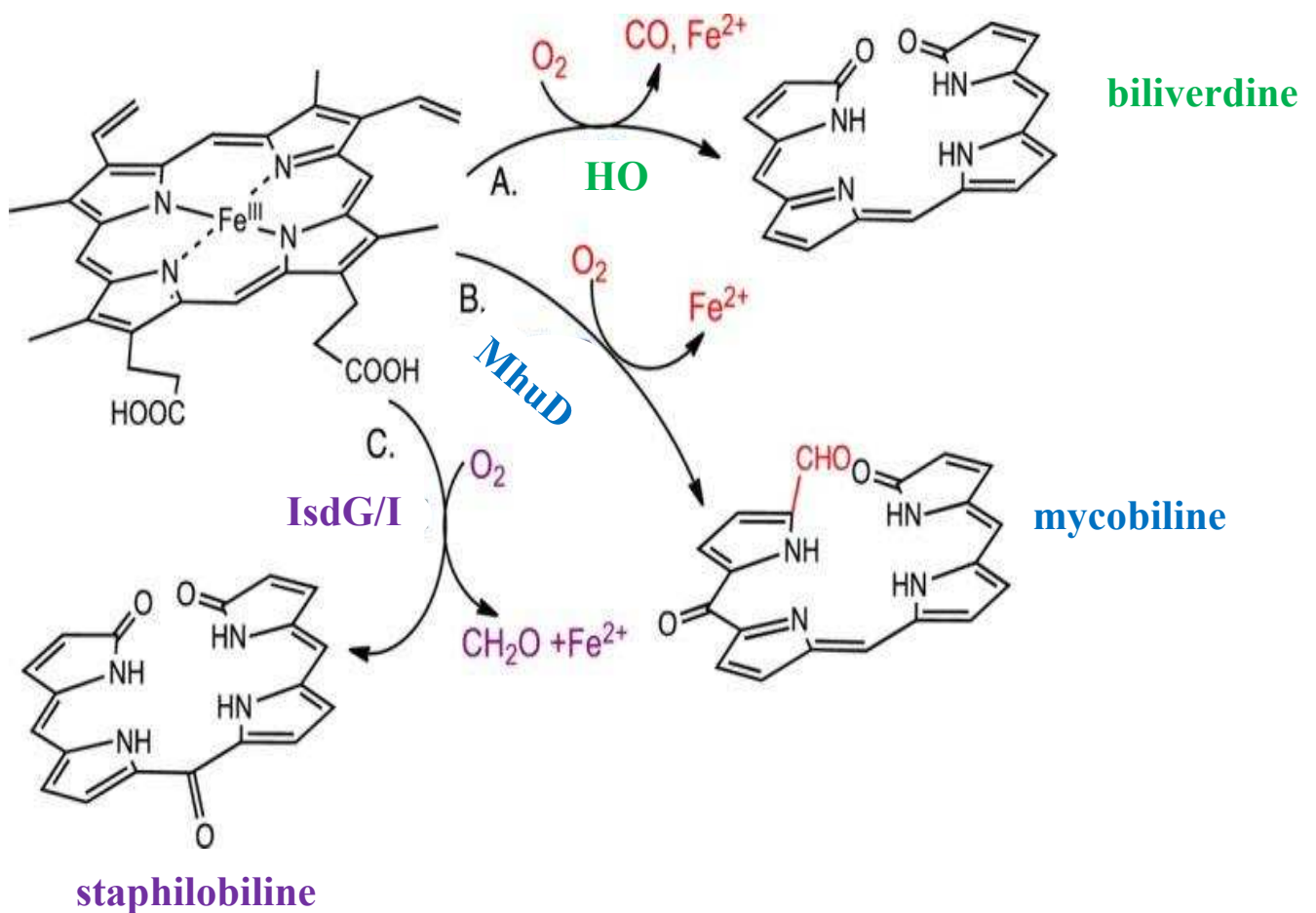


Figure 21. Les différentes oxygénases d'hème. Il existe 3 types d'hème oxygénases. Les HO (en vert) dégradent l'hème en biliverdine et en monoxyde de carbone (CO) en présence d'oxygène tout en libérant le fer de l'hème. MhuD (en bleu) dégrade l'hème en mycobiline sans générer de monoxyde de carbone. Les IsdG/I (en violet) dégradent l'hème en staphilobiline avec libération de méthanal d'après (O'Neill and Wilks, 2013).

transformé en hème *d* sous l'action d'une enzyme nommée hydroperoxydase II (HPH) (Obinger *et al.*, 1997) mais cette enzyme n'est pas présente chez les bactéries à GRAM positif.

A.6. 2 Les catalases à hème

Les catalases ont pour fonction de détoxifier H₂O₂ en le transformant en H₂O et O₂ (Baureder *et al.*, 2014). Ces enzymes permettent de lutter contre le stress oxydant rencontré par les bactéries aérobies. Il existe 3 catégories de catalases décrites chez les bactéries : les catalases strictes, les catalases-peroxydases qui utilisent l'hème comme cofacteur et les catalases-peroxydases qui utilisent le manganèse (Zámocký and Koller, 1999).

La catalase A (KatA) d'*E. faecalis* a particulièrement été bien décrite (Frankenberg *et al.*, 2002; Baureder and Hederstedt, 2012). C'est un homotétramère contenant une molécule d'hème par monomère proche des autres catalases strictes telles que HPH de *E. coli*. Chez *E. faecalis*, auxotrophe pour l'hème, l'apport d'hème exogène est nécessaire lors de la biosynthèse de la protéine (Frankenberg *et al.*, 2002). La forme apo de la catalase n'est pas détectée probablement parce que sa conformation est déficiente. L'hème bien que lié de façon non-covalente à KatA est donc incorporé lors de la biosynthèse de la protéine (Frankenberg *et al.*, 2002). KatE est une autre catalase parmi les plus conservées et présents chez la plupart des bactéries (Klotz *et al.*, 1997) aussi bien chez les bactéries à GRAM négatif comme *E. coli* (Von Ossowski *et al.*, 1991) ou *Brucella abortus* (Kim and Mayfield, 2000) que chez les bactéries à GRAM positif comme *Bacillus subtilis* (Engelmann *et al.*, 1995) ou *M. tuberculosis* (Johnsson *et al.*, 1997).

A.6.3 L'hème, une source de fer

L'hème internalisé par les bactéries peut être utilisé comme tel ou être utilisé comme une source de fer. La dégradation de l'hème qui permet la libération du fer, fait intervenir une famille d'enzyme appelées oxygénase d'hème (HO). Les HO, dites classiques, dégradent l'hème en présence d'oxygène en biliverdine et en monoxyde de carbone (CO) en libérant le fer de l'hème (**Figure 21**). Cette famille d'HO fonctionne de manière similaire que les oxygénases eucaryotes. Parmi ces enzymes, on peut citer HmuO chez *Corynebacterium diptheriae* (Wilks and Schmitt, 1998), HemO chez les différentes espèces de la famille *Neisseriaceae* (Zhu *et al.*, 2000) ou encore PigA chez *Pseudomonas aeruginosa* (Wegele *et al.*, 2004).

Une autre classe de HO, les IsdG chez *Staphylococcus aureus* et les IsdG-like présentes chez *Bacillus anthracis*, convertissent l'hème en 5-oxo-bilirubine et 15-oxo

bilirubine (staphylobiline) (**Figure 21**) (Reniere *et al.*, 2010; O'Neill and Wilks, 2013). *Mycobacterium tuberculosis* produit l'hème oxygénase MhuD qui est une IsdG-like qui dégrade l'hème en mycobiline (**Figure 21**) (Nambu *et al.*, 2013). Ces oxygénases permettent la libération du fer qui est recyclé dans les bactéries.

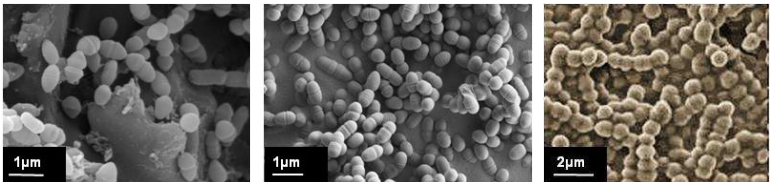


Figure 22. Classification de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis*. Ces trois bactéries à GRAM positif appartiennent au phylum des firmicutes, à la classe des Bacilli, à l'ordre des Lactobacillales mais diffèrent par leur genre et leur famille. Ces trois bactéries sont des coques de l'ordre de 1µm de diamètre.

B Les bactéries *Lactococcus lactis*, *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis*

Lactococcus lactis, *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis* sont des bactéries proches d'un point de vue phylogénétique. Toutes trois sont des bactéries à GRAM positif du phylum des Firmicutes. Elles appartiennent toutes à la classe des *Bacilli*, et à l'ordre des *Lactobacillales* mais diffèrent par leur genre et leur famille (**Figure 22**). D'un point de vue morphologique, ce sont trois coques pouvant s'associer par paires ou en chaînettes. Leur forme est ovoïde de l'ordre de 1 µm de diamètre (**Figure 22**).

Lactococcus lactis est une bactérie alimentaire considérée comme inoffensive. *Streptococcus agalactiae* et *Enterococcus faecalis* sont des bactéries pathogènes opportunistes qui colonisent de façon asymptomatique le tractus vaginal (*S. agalactiae*) et le tractus digestif (*S. agalactiae* et *E. faecalis*). Elles peuvent néanmoins devenir des pathogènes dans certaines conditions et être à l'origine d'infections graves.

Ces 3 bactéries ont aussi en commun qu'elles ne synthétisent pas l'hème, Elles utilisent l'hème pour activer une cytochrome *bd* oxydase qui leur permet de basculer d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme respiratoire.

B.1 Des bactéries auxotrophes pour l'hème

Les trois bactéries modèles utilisées dans ce travail, *Lactococcus lactis* (Pedersen *et al.*, 2008), *Streptococcus agalactiae* (Yamamoto *et al.*, 2006) et *Enterococcus faecalis* (Bryan-Jones and Whittenbury, 1969; Frankenberg *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2008) sont des bactéries auxotrophes pour l'hème (BAH). Les BAH sont très dispersées d'un point de vue phylogénétique (Panek and O'Brian, 2002). La perte de différentes voies de synthèse peut s'expliquer par une perte de la pression de sélection du milieu comme par exemple l'association avec un hôte eucaryote source d'hème.

Pour toutes les BAH, il manque toutes ou au moins certaines enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème (**Partie 1 § A.1.2**). Les principales bactéries auxotrophes sont répertoriées dans le **Tableau III**. Parmi les procaryotes qui ne synthétisent pas l'hème, outre les bactéries du projet, on peut citer tous les Lactobacilles connus (Pedersen *et al.*, 2012), différentes espèces de *Mycoplasmes* (Smith *et al.*, 1963), les bactéries à GRAM négatif *Haemophilus influenzae*, *Bartonella henselae* (Sander *et al.*, 2000) et *Borrelia burgdorferi* (Boylan *et al.*, 2003) ainsi que les bactéries à GRAM positif *L. lactis* (Pedersen *et al.*, 2008),

Table III. Répertoire des principales bactéries auxotrophe pour l’hème (d’après Gruss *et al.*, 2012)

Species or genus	Heme synthesis		Heme utilization			Porphyrin turnover			Heme uptake				Heme chaperone		Heme efflux			
	Path way	Fe-chelatase	aerobic respiration	anaerobic respiration	Heme catalase	Heme oxygenase	Deferro-chelataases EfeB/YfeX ^e	Cobalt chelataase CbiK ^f	IsdE/ Sia/ HtsA ^g	Shp ^g	Shr ^g	HupC/ FepC ^g	CcmH	AhpC ^h	HrtBA ⁱ	HrtRBA ⁱ	PefAB ^k	PefRCD ^k
<i>E coli</i>			Cyd/Cyo	Frd/Sdh	Nar		1 / 2 ^e											
Buchnera			Cyo															
<i>H influenzae</i>			Cyd	Frd/Sdh														
<i>H parasuis</i>			Cyd	Frd/Sdh														
<i>B henselae</i>			Cyo	Frd/Sdh														
<i>S pyogenes</i>									^g									
<i>S pneumoniae</i>							1 / 2											
<i>S suis</i>				FrdA														
<i>S equi</i>																		
<i>S dysgalactiae</i>			Cyd															
<i>S thermophilus</i>							1 / 2											
<i>S agalactiae</i>			Cyd														k	k
<i>S uberis</i>			Cyd	FrdA														
<i>S mutans</i>				FrdA														
<i>S sanguinis</i>	P						1 / 2											
<i>S gordonii</i>							1 / 2											
<i>L lactis</i>	P		Cyd	FrdA										^h		^j		
Leuconostoc			Cyd	FrdA			1 / 2											
<i>E faecalis</i>		^a	Cyd	FrdA ^b														
<i>Lb rhamnosus</i>			Cyd				1 / 2											
<i>Lb reuteri</i>	P		Cyd	FrdA	Nar	HmoB ^d	1 / 2											
<i>Lb delbrueckii</i>				FrdA														
<i>Lb johnsonii</i>			Cyd	FrdA														
<i>Lb plantarum</i>			Cyd	FrdA	Nar ^c		1 / 2											
<i>Lb casei</i>			Cyd	FrdA			1 / 2											
<i>Lb brevis</i>			Cyd			HmoB	1 / 2											
<i>Lb sakei</i>							1 / 2										#k	
<i>Lb helveticus</i>				FrdA														
<i>Lb acidophilus</i>				FrdA														
<i>Lb salivarius</i>			Cyd	FrdA			1 / 2											
<i>Lb gasseri</i>			Cyd	FrdA														
<i>F magna</i>																		
Clostridia spp.	P					HemO ^d				1 sp.								
<i>B fragilis</i>			Cyd	Frd/Sdh			1 / 2											
<i>B thetaiotaomicron</i>			Cyd	Frd/Sdh			2											
<i>P gingivalis</i>			Cyd	Frd/Sdh			2											

The presence and absence of heme/porphyrin-related functions is shown for HAB organized taxonomically. Note that this table is indicative of functions and is not meant to be comprehensive. See text for further description and for functions that are specific to a single genus. Unless otherwise referenced, the table was drawn up manually, and presence/absence of gene functions was determined using BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), EMBL string (<http://string-db.org/>), and MetaCyc (<http://metacyc.org/>) online databases. Black signifies that the indicated function is generally present in the indicated species or genus. Dark gray signifies that some but not all species or isolates are positive for the function. White indicates the absence of the function. For the heme biosynthesis pathway, white indicates that few of the pathway genes are present; light gray indicates that several genes of are present (P for partial).

aTwo functions, EfeB (periplasmic) and YfeX (cytoplasmic), are deferrochelataases (Letoffe, Heuck, Delepelaire, Lange, & Wandersman, 2009); presence of EfeB homologs is indicated by “1” and YfeX by “2”.

bCbiX is a cobalt chelataase (Raux et al., 1997).

cHtsA is an IsdE homolog (Pluym, Vermeiren, Mack, Heinrichs, & Stillman, 2007) characterized in S. pyogenes (Bates, Montanez, Woods, Vincent, & Eichenbaum, 2003). See Nobles and Maressoo (2011) for review.

dThe S. agalactiae AhpC peroxidase is a heme-binding protein and possible heme chaperone (Lechardeur et al., 2010).

eHrtBA was first described in S. aureus as a transporter involved in heme toxicity (Torres et al., 2007).

fHrtBA was discovered to be a heme-efflux transporter, which in numerous commensal bacteria is regulated by the intracellular HrtRprotein (Lechardeur et al., 2012).

gThe Pef regulon as described in S. agalactiae NEM316 comprises two loci, PefAB and PefRCD (see text; Fernandez et al., 2010).

hP. Serror, some natural isolates of E. faecalis are ferrochelataase-negative; personal communication.

iExperimental proof (Huycke et al., 2001).

jHmoB (YhgC) was reported as a heme-oxygenase in Bacillus subtilis (Gaballa & Helmann, 2011); HemO is described (Hassan et al., 2010).

kExperimental proof (Brooijmans, de Vos, & Hugenholtz, 2009).

lFrameshift mutation in Lb. sakei pefA homolog (Fernandez et al., 2010). Lb, Lactobacillus

S. agalactiae (Yamamoto *et al.*, 2006) et *E. faecalis* (Bryan-Jones and Whittenbury, 1969; Frankenberg *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2008) utilisées dans ce projet.

De façon anecdotique, quelques bactéries ne synthétisent ni n'ont besoin d'hème (Panek and O'Brian, 2002). C'est le cas de *Treponema pallidum* responsable de la syphilis (Fraser *et al.*, 1998), *Borrelia burgdorferi* responsable de la maladie de Lyme (Casjens *et al.*, 2012) et *Mycoplasma pneumoniae* responsable d'infections respiratoires (Xiao *et al.*, 2015). Ces bactéries sont caractérisées par un génome réduit et une association stricte à un hôte eucaryote pour compléter ses fonctions réduites.

On peut définir deux types d'auxotrophie pour l'hème: i) une auxotrophie «vraie» ou obligatoire qui concerne des bactéries à GRAM négatif; ii) une auxotrophie facultative qui concerne des BAH à GRAM positif.

B.1.1 Auxotrophies obligatoires et facultatives

En général, l'hème est indispensable aux BAH pour l'activation d'une cytochrome oxydase (**Figure 20**) (**Partie 1 § A.6.1.1**) (Gruss *et al.*, 2012). Cette activation leur permet d'assurer un métabolisme respiratoire aérobie ou anaérobie, qui fournit l'énergie nécessaire à leur survie. La distinction entre auxotrophie obligatoire et auxotrophie facultative est principalement due à la capacité certaines bactéries BAH à utiliser un métabolisme fermentaire en absence d'hème pour suppléer au métabolisme respiratoire, ce qui rend leur besoin en hème facultatif. Cette faculté les distingue des bactéries à GRAM négatif qui ont un besoin vital d'hème pour assurer le fonctionnement d'une chaîne respiratoire aérobie ou anaérobie.

Certaines de ces bactéries expriment aussi une catalase à hème pour lutter contre le stress oxydant (**Partie 1 § A.6.2**). C'est le cas d'*E. faecalis* qui exprime une catalase A fonctionnelle que lorsque de l'hème est présent dans son environnement (**Partie 1 § B.4**). Sa capacité à résister à un stress oxydant est donc lié à la présence d'hème exogène (Baureder *et al.*, 2014).

L'apport d'hème est aussi nécessaire à l'activité d'enzymes comme la pyridoxal 5' phosphate intervenant dans la conversion de la cystéine en homocystéine (Kery *et al.*, 1994).

B.1.2 Auxotrophie partielle

Certaines BAH ont conservé certaines enzymes de la voie de biosynthèse de l'hème (**Partie 1 § A.1.2**). Par exemple, *L. lactis* possède le gène *hemH* qui permet l'expression d'une ferrochélatase fonctionnelle qui catalyse l'insertion d'un atome de fer au centre de la

protoporphyrine IX (PPIX), dernier intermédiaire de la voie de synthèse (Gaudu *et al.*, 2002). *L. lactis* peut donc activer un métabolisme respiratoire en présence de fer et de PPIX. C'est aussi le cas de *H. influenzae* et *Bacteroides* qui peuvent transformer le PPIX en hème (Fournier *et al.*, 2011; Caldwell *et al.*, 1965). *E. faecalis* possède aussi un gène *hemH* mais l'addition de PPIX ne suffit pas à activer sa catalase suggérant que la PPIX n'est pas transformée en hème (Brugna *et al.*, 2010). Ces résultats montrent que certaines BAH peuvent en théorie compléter leur déficit en hème à partir d'intermédiaires de synthèse de l'hème.

B.2 *Lactococcus lactis* : une bactérie alimentaire

Lactococcus lactis est impliquée dans la fermentation des aliments, ce qui représente actuellement 40 % des aliments consommés dans le monde. Ce n'est qu'après la mise en évidence de la nature biologique des ferments au 19^{ème} siècle que commence l'étude des organismes responsables de la fermentation des aliments. En 1873, *Lactococcus lactis* est décrite et dénommée pour la première fois par Lister (Cavanagh *et al.*, 2015). En 1924, *Lactococcus lactis* entre dans la classification des bactéries lactiques mais sera classée comme *streptocoque lactique* à cause de sa forme ovoïde jusqu'en 1985 lorsque Sheifer réalise une classification basée sur les ARNs 16S. En 2010, la « food and drug administration » (FDA) aux États-Unis classe cette bactérie « generally recognised as safe » (GRAS). Cette nomenclature internationale considère ces bactéries comme totalement inoffensives pour le consommateur et permet leur exploitation dans de nombreuses applications en dehors des fermentations alimentaires, telles que la production de métabolites (Lv *et al.*, 2005), la vectorisation de molécules thérapeutiques dans le tube digestif (Foligne *et al.*, 2007) ou l'utilisation probiotique (Larisch *et al.*, 1994).

L. lactis appartient au genre *Lactococcus* (**Figure 22**). Cette espèce est divisée en 4 sous-espèces dont 2 majeures, *lactis* et *cremoris*, qui partagent 85 % d'identité. Le premier génome de la souche IL 1403 de *L. lactis* a été séquencé et publié en 2001 (Bolotin *et al.*, 2001). La souche MG1363, utilisée dans ce projet, de sous-espèce *cremoris*, dérive de la souche NCDO712 curée de ses plasmides (Wegmann *et al.*, 2012) et séquencée en 2007 (Wegmann *et al.*, 2007) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_009004). Les souches naturelles de *L. lactis* ssp. *cremoris* peuvent contenir de 4 à 7 plasmides. L'utilisation du métabolisme respiratoire (**Partie 1 § A.7**) chez *L. lactis*, permet une meilleure croissance et survie. Cette propriété est utilisée par l'industrie agro-alimentaire pour la production de ferments utilisés pour la production de fromages (Gaudu *et al.*, 2002) (**Partie 1 § A.7**). Le

métabolisme respiratoire permet aussi une production d'acétoïne plus importante qui est utilisée dans la production d'arômes (Pedersen *et al.*, 2012; Passerini *et al.*, 2013).

Le principal réservoir de *Lactococcus lactis* est le lait. Ce milieu fournit tous les nutriments nécessaires pour la propagation des bactéries lactiques. On distingue les souches dites « domestiques » qui sont présentes dans les exploitations laitières, dans le lait et ses produits dérivés ou d'autres aliments fermentés. Leur présence contribue à la consistance et au goût des produits. De plus, la sécrétion de bactériocines, des peptides antimicrobiens, participe à la conservation des aliments. Parmi ces bactériocines, la nisine empêche la germination des spores chez de nombreux membre de la famille *Bacillus* (Egan *et al.*, 2016). Les souches dites « environnementales » sont isolées à partir de plantes ou d'animaux sauvages dans leurs environnements naturels (Cavanagh *et al.*, 2015).

B.3 *Streptococcus agalactiae* : une bactérie pathogène opportuniste

B.3.1 Généralités

Streptococcus agalactiae a été identifiée et dénommée pour la première fois en 1887 par Nocard et Mollereau dans le cas de mammites qui provoquent une diminution de la lactation chez les vaches laitières (Le Doare and Heath, 2013) ; « *agalactiae* » signifiant « absence de lait ». En 1935, cette bactérie est identifiée comme membre de la flore vaginale humaine par Lancefield et Hare alors qu'ils recherchaient des agents responsables de la fièvre puerpérale (R. C. Lancefield, 1935). *S. agalactiae* porte aussi le nom de « Streptocoque du Groupe B Lancefield » (GBS) (R. C. Lancefield, 1934). En 1938, Fry décrit 3 cas de femmes décédées après une infection post-partum à *S. agalactiae*. A partir des années 1960, *S. agalactiae* est reconnue comme le principal agent responsable d'infections néonatales aux Etats-Unis (Dermer *et al.*, 2004). A partir de 1970, *S. agalactiae* est la principale cause de septicémies et méningites néonatales avec une incidence de 0.4 pour 1000 naissances dans les pays développés comme la France estimé en 2011, l'Allemagne (Fluegge *et al.*, 2006), la Finlande (Kalliola *et al.*, 1999), le Portugal (Neto, 2008) ou le Brésil (Johri *et al.*, 2013). Dans les pays en voie de développement tel que l'Inde, son incidence peut atteindre 2.6 pour 1000 naissances (1991) (Johri *et al.*, 2006)

S. agalactiae appartient à la famille des *Streptococcaceae* et au genre *Streptococcus* (**Figure 22**). Cette bactérie est une coque non mobile, non sporulante et ne possède pas de système mettant en œuvre des enzymes catalases. *S. agalactiae* est une bactérie anaérobie facultative et β hémolytique (**Figure 22**). Le séquençage complet de *Streptococcus agalactiae* du séro groupe III de NEM 316 utilisée dans ce projet, isolée à partir d'une culture de sang

néonatal d'un cas de septicémie fatale, a été réalisé en 2002 (Glaser *et al.*, 2002) (<http://genolist.pasteur.fr/SagaList/>). Le génome de cette souche est composé de 2 211 485 bases comprenant 2118 séquences codantes dont 2082 séquences codent pour des protéines et 36 pour des pseudogènes. Le pourcentage G/C est de 35.6%. Une fonction a pu être attribuée à 62 % des protéines, 25% sont des protéines de fonction inconnue et 9% sont des protéines inconnues n'ayant pas d'homologues chez d'autres *Streptocoques* ou *Lactocoques* (Glaser *et al.*, 2002).

La paroi de *Streptococcus agalactiae* est caractéristique des bactéries à GRAM positif. A la surface de la bactérie, la paroi est composée d'un polymère de peptidoglycane, ramifié par des unités d'acide N-acetylmuraminique. A la surface de cette paroi, sont ancrés les antigènes spécifiques de *S. agalactiae* permettant de déterminer leur sérologie. On distingue 10 sérotypes dits « capsulaires » : Ia, Ib, Ic II-IX en fonction des antigènes exprimés. Aux Etats-Unis et en Europe, les sérotypes les plus courants sont: Ia, Ib, II, III et V (Rivera *et al.*, 2015). *S. agalactiae* de sérotype capsulaire III est, à lui seul, responsable de 80 % des méningites néonatales (Le Doare and Heath, 2013). Le sérotype III est subdivisé en complexes clonaux. Parmi ces complexes clonaux, celui nommé ST-17 (Sequence Type) ou « hypervirulent » est identifié dans 80% des infections de type tardif chez le nouveau-né (Jones *et al.*, 2006). *S. agalactiae* colonise de manière asymptomatique la flore vaginale de 25 à 30 % des femmes (Six *et al.*, 2014). Le tractus vaginal constituant le principal réservoir humain. La prévalence de colonisation dans le tractus vaginal est expliquée par le pH acide des muqueuses vaginales qui permet une meilleure adhérence de la bactérie (Tamura *et al.*, 1994). Il a été montré qu'un pH acide entraîne une augmentation de l'expression d'adhésines qui favorisent l'adhésion de *S. agalactiae* sur l'épithélium vaginal (Park *et al.*, 2012). Cette bactérie est aussi présente dans le microbiote intestinal et a été identifiée, par exemple, chez 5 % des enfants de moins de 5 ans (Persson *et al.*, 1986). Parmi la population adulte, tous âges et sexes compris, *S. agalactie* est présent dans les selles de 15 % des personnes (Persson *et al.*, 1986) et peut aussi coloniser l'urètre (Hickman *et al.*, 1999). Chez les animaux, *S. agalactiae* est majoritairement retrouvée sur les glandes mammaires des bovins (Keefe, 1997). *S. agalactiae* a aussi été isolée chez de nombreux mammifères (chats, chiens lapins, chevaux), des batraciens (grenouilles) (Brochet *et al.*, 2006) ou des poissons d'élevage (Soto *et al.*, 2015; Delannoy *et al.*, 2013). Dans l'environnement, *S. agalactiae* est présente dans le lait issu de vaches contaminées (Keefe, 1997). Elle a aussi été isolée dans les milieux aquatiques (Delannoy *et al.*, 2013).

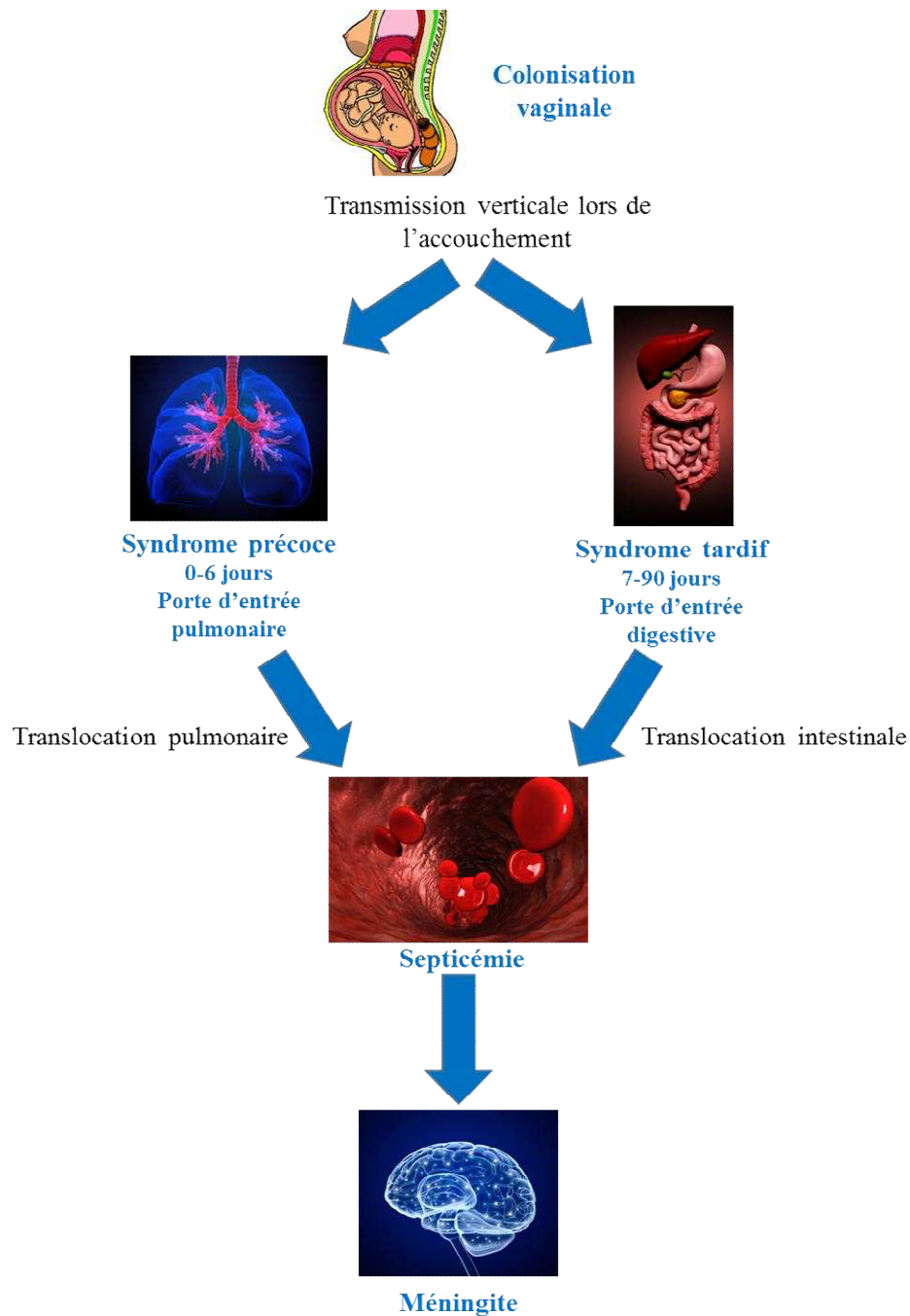


Figure 23. Infections néonatales précoces et tardives par *Streptococcus agalactiae*. Les infections précoces se déclarent entre les premières heures et la première semaine de la vie. La porte d'entrée est pulmonaire. Les infections tardives se déclarent entre la première semaine et les 3 premiers mois de la vie. La porte d'entrée est digestive (Six *et al.*, 2014).

B.3.2 Les infections à *Streptococcus agalactiae*

B.3.2.1 Infections humaines

S. agalactiae est le principal pathogène responsable d'infections néonatales (Mullaney, 2001) mais peut générer des infections variées chez les personnes immunodéprimées (Edwards and Baker, 2005). Les personnes âgées ou atteintes de certaines pathologies comme le cancer ou le diabète sont particulièrement à risque (Farley, 2001). L'incidence 2010 en Angleterre était de 2,39 pour 100000 adultes (Lamagni *et al.*, 2013). *S. agalactiae* est aussi considérée comme un pathogène responsable d'infections nosocomiales dans les services obstétriques et soins intensifs néonataux des hôpitaux (MacFarquhar *et al.*, 2010)

S. agalactiae est la principale cause de septicémies et méningites néonatales avec une incidence de 0.4 pour 1000 naissances dans les pays développés (Melin and Efstratiou, 2013). Les infections des nouveau-nés sont classées en deux types, les infections précoces et les infections tardives (**Figure 23**).

● Les infections néonatales précoces.

Elles se déclarent pendant la première semaine après l'accouchement. Dans ce type d'infection, il y a transmission de la mère porteuse de *S. agalactiae* à l'enfant lors de l'accouchement (**Figure 23**). Les bactéries peuvent être inhalées avec les sécrétions vaginales dans lesquelles la bactérie est présente. La transmission peut aussi se faire par contamination du liquide amniotique lors de la rupture de la membrane du sac amniotique. Les symptômes peuvent être des problèmes respiratoires allant jusqu'à des pneumonies. *S. agalactiae* peut franchir la paroi pulmonaire et passer dans le système sanguin générant des septicémies dont la gravité peut aller jusqu'à un choc septique (Cowgill *et al.*, 2003). Avec la mise en place de dépistages systématiques des femmes enceintes et l'utilisation d'un traitement antibiotique préventif, le nombre d'infections précoces a fortement diminué. En revanche du fait de l'absence de traitement dans les pays en développement, les infections précoces représentent encore 80 % des infections néonatales (Di Renzo *et al.*, 2014).

● Les infections néonatales tardives.

Elles se déclarent entre 7 et 90 jours après la naissance. Ce type d'infection est aussi le résultat d'une transmission de la mère à l'enfant. Les bactéries ne sont pas inhalées mais plutôt avalées lors de l'accouchement. La bactérie peut alors coloniser le système digestif et passer dans le système sanguin. Les symptômes sont des infections du système sanguin

provoquant des septicémies et pouvant aller jusqu'au franchissement de la barrière hémato-encéphalique provoquant des méningites qui peuvent entraîner des lésions du système nerveux central. Ces infections sont associées à une forte mortalité (environ 7 % des infections néonatales provoquées par *S. agalactiae* sont fatales (étude menée aux Etats Unis entre 1998 et 2007) (Thigpen *et al.*, 2011). Ce type d'atteinte peut laisser des séquelles graves aux enfants survivants à une telle infection comme un retard mental, des paralysies ou des convulsions (Gibbs *et al.*, 2004). Malgré la politique de traitement systématique des femmes enceintes, le nombre d'infections tardives n'a pas diminué suggérant d'autres modes de contamination comme des infections nosocomiales par exemple (Easmon *et al.*, 1981; Davanzo *et al.*, 2013).

● Infections chez les adultes.

Le nombre de personnes de plus de 65 ans souffrant d'infection à *S. agalactiae* ne cesse d'augmenter et est passé de 0.92 en 1991 à 2.39 pour 100000 adultes en 2010 en Europe (Lamagni *et al.*, 2013). Aux Etats-Unis, en 2000, il a été estimé que 2/3 des infections à *S. agalactiae* concernaient des patients adultes (Phares *et al.*, 2008). Les personnes atteintes de diabète ou de cancer sont particulièrement touchées (Ballard *et al.*, 2016; Pimentel *et al.*, 2016). Des actes chirurgicaux comme la pose de cathéters urinaires ont été décrits comme responsables d'infections par *S. agalactiae* (Farley, 2001). Les personnes âgées présentent aussi potentiellement des dysfonctionnements de leur immunité qui facilite l'invasion de la bactérie. *S. agalactiae* est à l'origine des pneumonies, endocardites et méningites proches de celles des nouveau-nés. Des infections de la peau et du tractus urinaire ont également été décrites (Phares *et al.*, 2008). Des crises d'arthrites dues à *S. agalactiae* ont aussi été répertoriées (Nolla *et al.*, 2003). Plusieurs cas d'ostéomyélites (García-Lechuz *et al.*, 1999) ont aussi été identifiés.

B.3.2.2 Infections animales

S. agalactiae adhère à l'épithélium mammaire des vaches et conduit à une inflammation des mamelles (mammites) (Keefe, 1997). En France, environ 40 % des vaches laitières souffrent de mammites. Ces mammites peuvent entraîner une forte diminution de la production de lait ainsi qu'une modification de son aspect (Keefe, 1997). L'état général de la vache peut être affecté dans les cas extrêmes. La présence de la bactérie dans le lait modifie sa composition notamment en dégradant des protéines comme la lactalbumine et la

lactoglobuline, ce qui modifie la texture des produits dérivés tels que le fromage (Keefe, 1997). Ces mammites existent aussi chez les camélidés (Tibary *et al.*, 2006).

S. agalactiae est aussi responsable d'infection de poissons. Des cas d'infections ont été décrits pour une multitude d'espèces de poissons sauvages et d'élevage aussi bien dans les eaux tropicales comme l'Amérique du Sud ou la Thaïlande (Soto *et al.*, 2015) que dans eaux tempérées (Soto *et al.*, 2015). L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) dans son avis relatif à la « hiérarchisation des dangers sanitaires exotiques ou présents en France métropolitaine chez les poissons d'élevage » du 29 juillet 2015 classe les infections par *S. agalactiae* parmi les maladies de poissons d'élevage avec un impact économique de 3 sur une échelle de 0 à 5. Parmi les reptiles, plusieurs cas de nécroses provoquées par *S. agalactiae* ont été observés chez des crocodiles marins dans des « fermes aux crocodiles » conduisant à la mort des animaux (Bishop *et al.*, 2007).

B.3.3 Pathogenèse

L'infection par *S. agalactiae* se déroule en plusieurs phases de colonisation de l'hôte puis de pénétration dans l'organisme et en dissémination dans cet organisme.

B.3.3.1 Adhésion aux épithéliums et endothéliums

Streptococcus agalactiae est capable d'adhérer à un grand nombre de cellules aussi bien épithéliales, comme par exemple l'épithélium vaginal ou l'épithélium respiratoire, qu'endothéliales comme les cellules de la membrane du placenta ou celles de la barrière hémato-encéphalique (Wibawan *et al.*, 1992; Tazi *et al.*, 2010).

La bactérie exprime plusieurs protéines de surface permettant une interaction avec les cellules épithéliales et endothéliales. Ces protéines se lient à différents constituants de la matrice extracellulaire (Lindahl *et al.*, 2005) des cellules eucaryotes, constituée d'un réseau de polysaccharides et de protéines tels que les fibronectines, les laminines ou le collagène. *S. agalactiae* exprime à sa surface plusieurs types de protéines qui vont permettre son adhésion : les adhésines de surface et les pilis.

● Les adhésines de surface.

Des protéines telles que FsbA (pour fibrinogen-binding proteins A) (Jiang and Wessels, 2014), ScpB (streptococcal C5a peptidase) (Shabayek *et al.*, 2010), BibA (immunogenic bacterial adhesin) ainsi que la protéine de transport de la glutamine GlnQ (Tamura *et al.*, 2002) se lient aux fibronectines de la matrice (**Figure 24**). Les adhésines de

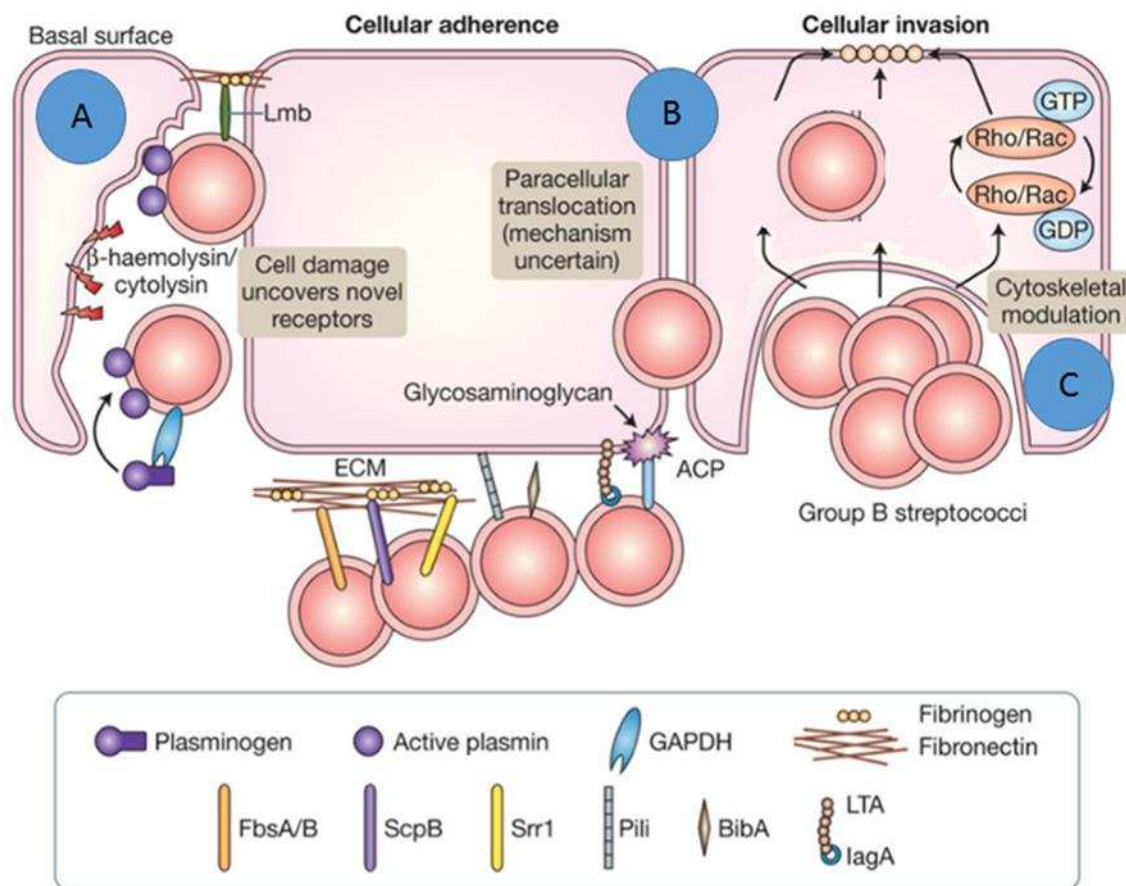


Figure 24. Mécanismes d'adhérence et d'invasion de *S. agalactiae*. Les protéines FbsaA/B, ScpB, srr1, BibA, LTA ACP et les pilis exprimés à la surfaces de *S. agalactiae* permettent l'adhésion de la bactérie à des composants de la matrice extracellulaire de la cellule de l'hôte comme les fibrinogènes ou les fibronectines. (A) la sécrétion de L'hémolysine β /cytolysine favorise la lyse des cellules qui permet le passage de la bactérie à travers l'épithélium. *S. agalactiae* utilise aussi la GAPDH qui active le plasminogène de l'hôte et dégrade la matrice extracellulaire. (B) *S. agalactiae* peut aussi traverser les barrières épithéliales de l'hôte par passage paracellulaire dont le mécanisme n'est pas connu. (C) l'invasion intracellulaire de l'hôte est permise grâce à un réarrangement du cytosquelette par les GTPases de la famille Rho. (B) Abbreviations: ACP, alpha C protein; BibA, GBS immunogenic bacterial adhesin; ECM, extracellular matrix; FAK, focal adhesion kinase; FbsA/B, fibrinogen-binding proteins A and B; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GDP, guanosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; Lmb, laminin-binding protein, LTA, lipoteichoic acid; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; ScpB, C5a peptidase; Srr1, serine-rich repeat domain protein 1 (Maisey *et al.*, 2008).

surface Lmb (laminin binding) se lie aux laminines (Ragunathan *et al.*, 2009) (**Figure 24**). Un autre type de protéines de surface, Srr-1 et Srr-2 (serine-rich repeat proteins), caractérisées par une séquence riche en répétitions de sérines, ont une forte affinité pour le fibrinogène (Samen *et al.*, 2007; Seifert *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2002) (**Figure 24**). La souche de *S. agalactiae* hyper virulente ST-17 est caractérisée par une capacité d'adhésion à la barrière hémato-encéphalique grâce à l'expression de HgVa (hypervirulent GBS adhesin) (Tazi *et al.*, 2010).

● Des pilis.

Ce sont des structures protéiques filamenteuses présentes à la surface de la bactérie. Chez *S. agalactiae*, les pilis sont composés de 3 protéines. GBS1477 (PilB) est la piline majeure. La taille du pilus varie en fonction du nombre de monomères de PilB. GBS1474 (PilC) et GBS1478 (PilA) sont deux protéines auxiliaires (Dramsi *et al.*, 2006). PilC permet l'ancrage du pilus à la paroi cellulaire (Nobbs *et al.*, 2008) et pilA est responsable des propriétés adhésives du pilus (Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009).

Les pilis sont capables de lier le collagène (**Figure 24**). Ils interviennent dans l'adhésion aux cellules épithéliales pulmonaires (Dramsi *et al.*, 2006) ainsi qu'à l'endothélium vasculaire cérébral (Maisey *et al.*, 2007). Ces structures sont aussi indispensables à la formation de biofilms (Rosini and Margarit, 2015) et facilitent la translocation à travers la barrière hémato-encéphalique (Konto-Ghiorghi *et al.*, 2009).

B.3.3.2 La translocation à travers les barrières physiologiques

Le franchissement des barrières épithéliales et endothéliales par *S. agalactiae* fait intervenir plusieurs types de mécanismes : i) la cytolysine, ii) la transcytose ou iii) le passage paracellulaire (**Figure 24**).

● La cytolysine

L'hémolysine β /cytolysine (β -H/C) : *S. agalactiae* sécrète deux types de protéines qui ont une activité lytique : l'hémolysine β /cytolysine (β -H/C) (Rosa-Fraile *et al.*, 2014) et le facteur CAMP. La β -H/C est codée par l'opéron *cyl*, composé de 12 gènes. Les gènes *cylA* et *cylB* codent ensemble pour un ABC transporteur qui permet l'export de la β -H/C synthétisé grâce aux 10 autres gènes de l'opéron (**Figure 25**). La β -H/C est un pigment nommé granadaène (**Figure 26**). Il a été démontré expérimentalement par comparaison entre souches productrices du pigment ou non que le granadaène permet une meilleure résistance aux stress

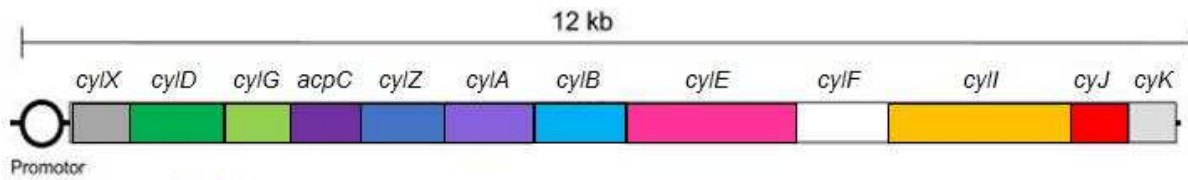


Figure 25. L'opéron *cyl*. Les gènes *cylA* et *cylB* codent pour un transporteur ABC et les 10 autres gènes codent pour les enzymes nécessaires à la synthèse du pigment. (Whidbey *and al.*, 2013).

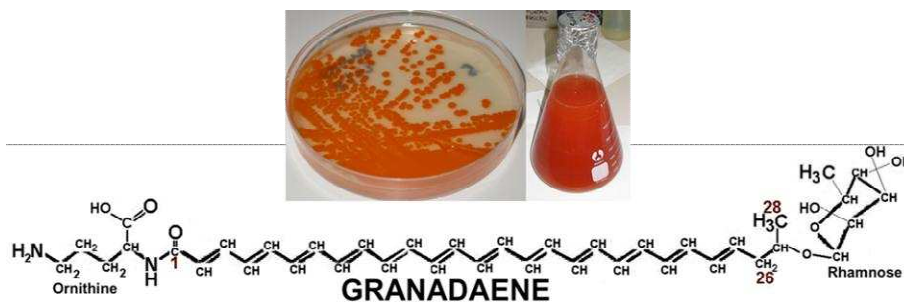


Figure 26: Le granadaène. Le granadaène est un pigment rouge brique de la famille des rhamnolipides. Il forme des agrégats qui s'intercalent dans les membranes des cellules ce qui provoque leur lyse (Whidbey *et al* , 2013).

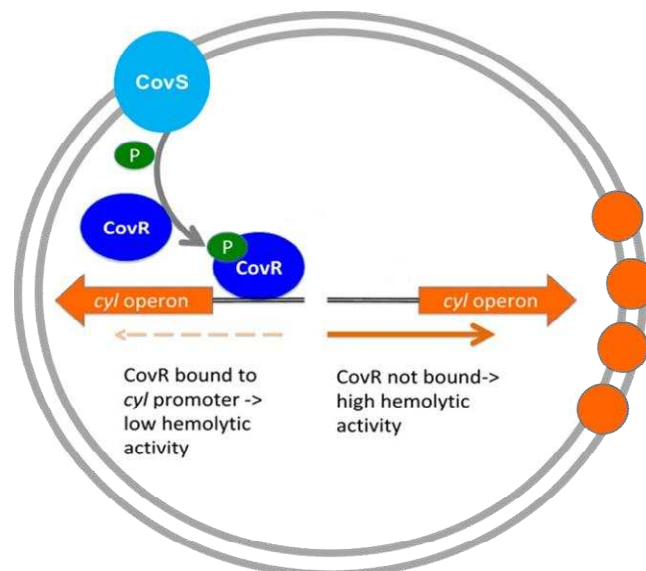


Figure 27. Régulation de l'opéron *cyl*. CovS activé s'autophosphoryle au niveau d'une histidine. CovS va alors phosphoryler le régulateur CovR au niveau d'un acide aspartique. CovR activé va alors se fixer au niveau du promoteur de l'opéron *cyl* sur une séquence très conservée et réprimer son expression (à gauche). En l'absence de CovR l'opéron *cyl* est surexprimé ce qui entraîne une surexpression du pigment. (Lamy *et al.*, 2004).

oxydant généré par les phagolysosomes comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'hypochlorite (ClO^-) (Liu *et al.*, 2004). Le granadaène est aussi responsable de l'activité hémolytique et cytolytique de *S. agalactiae* (Pritzlaff *et al.*, 2001; Rosa-Fraile *et al.*, 2014). Ce pigment est un rhamnolipide (Whidbey *et al.*, 2013). Comme d'autres rhamnolipides telle que la nystatine, le pigment forme des petits agrégats capables de pénétrer les membranes, de déstabiliser la bicouche lipidique entraînant leur perméabilisation (**Figure 26**). L'ensemble de ces mécanismes conduisent à la lyse des érythrocytes, des cellules épithéliales et endothéliales (Knopik-Skrocka and Bielawski, 2002). L'opéron *cyl* est contrôlé par le système à deux composants (SDC) CovS/CovR (Control of Virulence, S pour sensor et R pour regulator). CovS activé s'autophosphoryle au niveau d'une histidine. CovS phosphoryle alors le régulateur CovR au niveau d'un acide aspartique. CovR, activé, se fixe sur le promoteur de l'opéron *cyl* dont il réprime la transcription (Lamy *et al.*, 2004) (**Figure 27**). Le lien entre pigmentation et capacité d'hémolyse des souches a permis d'établir un lien entre coloration et virulence des souches de *S. agalactiae*. Néanmoins des souches non hémolytiques (non pigmentées) peuvent être responsables de septicémies démontrant l'intervention d'autres facteurs de virulence dans la pathogénicité de *S. agalactiae* (Six *et al.*, 2016).

La toxine CAMP : cette protéine sécrétée est capable de reconnaître et de lier les groupements glycosyl-phosphatidyl-inositols (GPI) dans la membrane des cellules de l'hôte. Les toxines s'oligomérisent ensuite au niveau de ce groupement GPI, entraînant une dégradation et une perméabilisation de la membrane de la cellule de l'hôte qui conduit à la lyse de la cellule (Lang *et al.*, 2007).

● La transcytose

Ce mécanisme consiste en l'entrée de *S. agalactiae* dans les cellules épithéliales (Winram *et al.*, 1998) (**Figure 24, C**). Le processus d'internalisation fait intervenir des GTPases de la famille Rho (Duménil and Nassif, 2005). *S. agalactiae* provoque l'augmentation du taux de RhoA activée, ce qui active l'internalisation de la bactérie. L'utilisation d'inhibiteurs de ces GTPases abolit l'internalisation de *S. agalactiae* dans des cellules épithéliales (HeLa) (Burnham *et al.*, 2007).

● Le passage paracellulaire

Ce mécanisme permet le franchissement de la barrière épithéliale entre les cellules épithéliales tout en maintenant l'intégrité des cellules (**Figure 24, B**). Il a été observé par microscopie électronique que *S. agalactiae* sépare les jonctions intercellulaires pour permettre

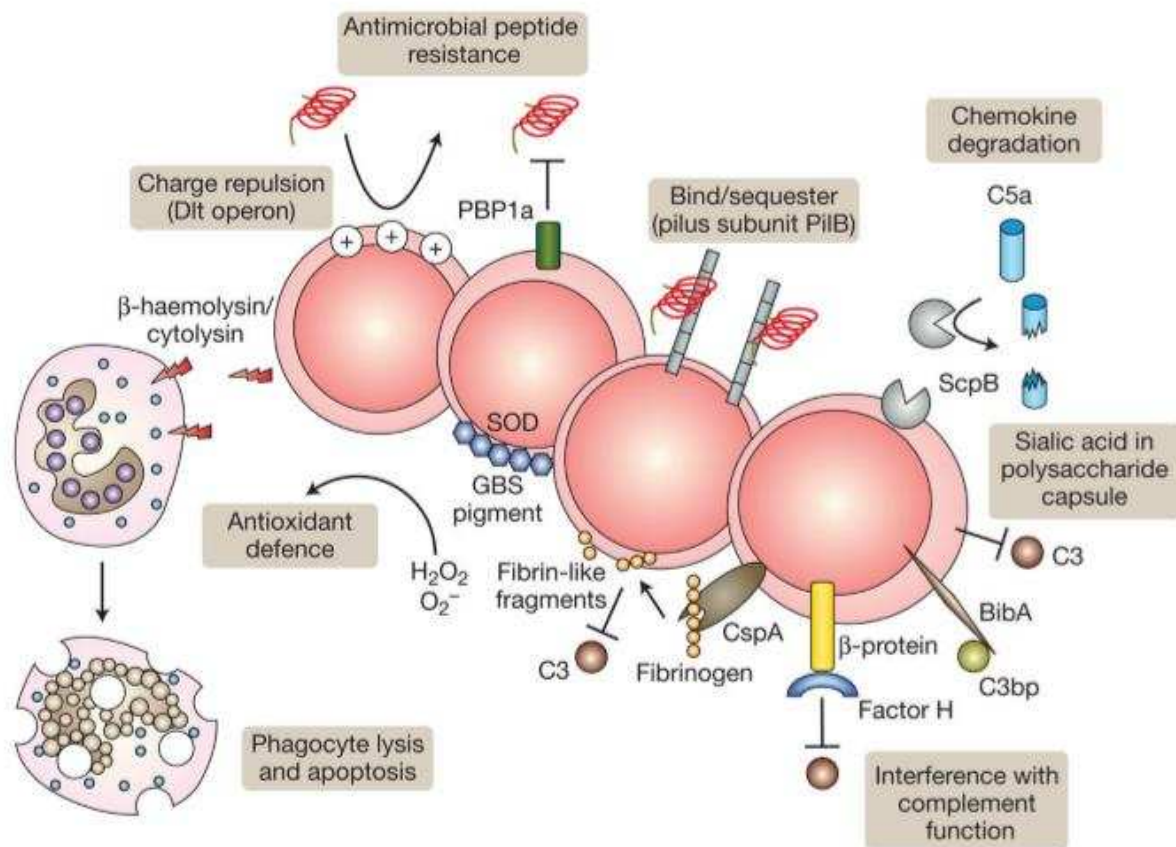


Figure 28: Les différents mécanismes de protection contre le système immunitaire de l'hôte. *S. agalactiae* exprime ou sécrète différents facteurs pour échapper au système immunitaire et promouvoir sa survie. L'incorporation de résidus D-alanine dans la paroi de la cellule réduit la charge de la bactérie et son affinité pour les peptides antimicrobiens de l'hôte chargés positivement. Les sous-unités du pilus de *S. agalactiae* et pilB contribuent aussi à la résistance contre les peptides antimicrobiens. ScpB, l'acide sialique de la capsule, BibA, les protéines β et CspA participent tous à l'inhibition des mécanismes de défense de l'hôte en dégradant les composants du complément C5a, C3 et C3bp. L'hémolysine β /cytolysine favorise la survie de la bactérie en provoquant la lyse des phagocytes et le pigment la protège contre le stress oxydant. Abbreviations: BibA, GBS immunogenic bacterial adhesin; CspA, cell-surface protease A; PBP1a, penicillin-binding protein 1a; ScpB, C5a peptidase; SOD, superoxide dismutase. (Maisey *et al.*, 2008).

son passage. Une fois le passage de la barrière effectué, les jonction intercellulaires se réassocient pour maintenir l'intégrité du tissu épithélial (Soriani *et al.*, 2006). Le mécanisme exact de ce phénomène n'a pas encore été mis en évidence mais il a été démontré que les pilis sont indispensables dans ce processus (Pezzicoli *et al.*, 2008).

B.3.3.3 Protection de la bactérie contre la réponse immunitaire de l'hôte

Une fois les barrières épithéliales et/ou endothéliales franchies, la bactérie est confrontée à la réponse immunitaire de l'hôte. Il existe 2 types de réponses immunitaires : la réponse innée, qui est rapide mais non spécifique et la réponse adaptative, qui est plus tardive mais plus spécifique. La réponse innée utilise le mécanisme de phagocytose pour dégrader tout élément reconnu comme étranger tandis que la réponse adaptative met en jeu les lymphocytes. Il existe 2 types de lymphocytes : les lymphocytes B, responsables de la réponse humorale, et les lymphocytes T, responsables de la réponse cellulaire. *S. agalactiae* possède plusieurs mécanismes permettant une protection face aux réactions immunitaires de l'hôte qui sont schématisées dans la **Figure 28**.

● Mimétisme

S. agalactiae possède en plus de sa paroi une capsule polysaccharidique qui définit le sérotype de la bactérie (Lancefield and Freimer, 1966). Cette capsule est composée en particulier d'acide sialique qui est un dérivé saccharidique. L'acide sialique, étant aussi exprimé à la surface des cellules eucaryotes, ce mécanisme de mimétisme permet à la bactérie de limiter sa reconnaissance par les phagocytes (Marques *et al.* 1992) (**Figure 28**).

● Diminution de la réponse immunitaire

Cette protéine dégrade les chimiokines qui servent de signal pour le recrutement des cellules du système immunitaire. ScpB permet donc la diminution de la réponse immunitaire médiée par les chimiokines (Brown *et al.*, 2005) (**Figure 28**).

● Bouclier de protection

Lors de la réponse immunitaire innée, les cellules épithéliales sécrètent de nombreux peptides antimicrobiens comme les cathélicidines et les défensines (Elsbach, 2003). Ces peptides ont 3 modes d'action pour lutter contre les bactéries. Ils peuvent entraîner i) une rupture mécanique des membranes bactériennes, ii) une déstructuration enzymatique des membranes bactériennes, iii) une séquestration des nutriments nécessaires à la bactérie. Pour se défendre contre ces agents, *S. agalactiae* dispose de 2 systèmes de défense. Le premier est

l'expression des pilis (**Partie 1 § B.3.1.1**) qui forment un bouclier de protection à la surface de la bactérie (Maisey et al., 2008). Le second est la modification de la charge ionique de la bactérie par la fixation des résidus D-alanine chargés positivement sur l'acide lipoteïchoïque de la paroi. Ce mécanisme provoque une diminution de la charge négative de la bactérie, réduisant l'interaction avec les agents microbiens chargés positivement et limitant ainsi leur activité (Poyart *et al.*, 2001) (**Figure 28**).

● L'hémolyse

Elle est impliquée dans la lyse des cellules, en particulier, des cellules épithéliales et des érythrocytes mais aussi des cellules phagocytaires (Liu *et al.*, 2004) (**Figure 31**). La lyse des phagocytes participe à la diminution de la réponse immunitaire. Le pigment granadaène protège aussi la bactérie contre le stress oxydant généré lors de la lyse des phagocytes (Liu *et al.*, 2004).

● Blocage des voies d'activation

Ces deux protéines (**Partie 1 § B.3.1.1**) (**Figure 28**) bloquent toutes les voies d'activation du complément, un système composé d'environ 20 protéines qui réagissent en cascade par clivage protéolytique et qui permettent d'activer la réponse inflammatoire et la phagocytose. (Santi *et al.*, 2007; Maruvada *et al.*, 2009).

B.4 *Enterococcus faecalis*: une bactérie commensale de la flore intestinale

B.4.1 Généralités

La première observation d'*Enterococcus faecalis* a été décrite en 1899 par Thiercelin (Thiercelin, 1899). *E. faecalis* a aussi été isolée dans des cas d'endocardites par MacCallum et Hastings. A l'origine dénommé *Micrococcus zymogenes* (Maccallum and Hastings, 1899), le terme *Streptococcus faecalis* a été utilisé pour la première fois en 1906 par Andrewes et Horder qui furent les premiers à établir le lien entre les caractéristiques des bactéries retrouvées dans les intestins humains et celles des bactéries isolées de patients atteints d'endocardites. Durant les 10 années suivantes, beaucoup de publications décrivirent des bactéries nommées *Streptococcus faecalis* qui englobaient en réalité beaucoup d'espèces différentes, telles que des bactéries identifiées comme *S. faecium* ou *S. glycerinaceus*. Ce n'est qu'en 1984 que Kilpper-Baltz and Sheifer proposèrent de transférer ces bactéries du genre *Streptococcus* au genre *Enterococcus*. Depuis ces dernières années, *Enterococcus*

faecalis a été identifiée comme la 4^{ème} cause d'infections nosocomiales dans le monde et la 3^{ème} cause de bactériémie aux Etats-Unis (Jett *et al.*, 1994).

Enterococcus faecalis appartient à la famille des *Enterococcaceae* et au genre *Enterococcus* (**Figure 22**). Cette bactérie est non mobile, non sporulante. *E. faecalis* est également une bactérie anaérobie facultative, hémolytique, et auxotrophe pour l'hème. Elle possède une catalase hème dépendante capable de dégrader le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en eau (H₂O) et en oxygène (O₂).

Le séquençage complet d'*Enterococcus faecalis* de la souche OG1RF a été réalisé en 2008 (Bourgogne *et al.*, 2008). Ce génome est constitué de 2 739 625 paires de bases avec un rapport G/C de 37.8 %. Parmi les 2701 gènes identifiés, 2474 gènes sont identiques à la souche V583 et seuls 227 sont spécifiques à OG1RF. Parmi ces 227 gènes, 114 codent pour des protéines avec des fonctions connues, 50 codent pour des protéines conservées aux fonctions hypothétiques et 63 n'ont pas de fonctions identifiées (Bourgogne *et al.*, 2008).

Le peptidoglycane constituant la paroi d'*E. faecalis* est composé d'unités d'acide N-acetylmuraminique liées par de l'acide D glutamique (Bouhss *et al.*, 2002). Les entérocoques peuvent croître dans des milieux avec des températures allant de 5 à 50°C, aussi bien en aérobie qu'en anaérobie et supportent des pH allant de 4.6 à 9.9 avec un pH optimum de 7.5 (Van Den Berghe *et al.*, 2006). Elles peuvent aussi se développer en présence de sels biliaries et jusqu'à 6.5 % de NaCl (Fisher and Phillips, 2009). La résistance à ces conditions extrêmes s'explique par la résistance et l'imperméabilité de sa membrane dont les acides gras sont plus ou moins insaturés en fonction du stress (Ivanov *et al.*, 1999; Nakajo *et al.*, 2006). Ces caractères lui confèrent aussi une résistance naturelle aux antibiotiques, notamment à la vancomycine.

Enterococcus faecalis possède différents sérotypes : les sérotypes A et B, définis par les carbohydrates capsulaires *csp-A* et *csp-B* respectivement, ne sont pas pathogènes (Hufnagel *et al.*, 2005); les sérotypes C et D, définis par les carbohydrates capsulaires *csp-C* et *csp-D* sont pathogènes (Hufnagel *et al.*, 2005).

Enterococcus faecalis fait partie des premières bactéries à coloniser le tractus digestif des nouveau-nés à partir de la flore intestinale maternelle (Fanaro *et al.*, 2003) car elle fait partie de la flore normale de la bouche (Smyth *et al.*, 1987) de l'intestin grêle et du côlon (Lebreton *et al.*, 2014). *E. faecalis* est ainsi présente dans 78 % des prélèvements de fèces humains (Tedim *et al.*, 2015). Les entérocoques *E. faecalis* et *E. faecium* constituent une grande partie du microbiote intestinal aussi bien des humains que des animaux. Ces entérocoques sont retrouvés chez les mammifères (71 % des prélèvements) et les reptiles

(70% des prélèvements) (Mundt, 1963), soit des proportions proches de celle de l'humain (Tedim *et al.*, 2015). *E. faecalis* est aussi régulièrement isolé de produits alimentaires issus d'animaux comme le fromage, le poisson ou la viande (Devriese *et al.*, 1995). Les bactéries présentes dans les produits alimentaires contaminés d'origine animale survivent à la chaleur utilisée dans les procédés de conservation comme la pasteurisation qui chauffe les aliments entre 60°C et 80°C (Klein, 2003). Un chauffage de 30 minutes à 70°C permet une diminution de la population d'*E. faecalis* de 10¹⁰ CFU/ml (McAuley *et al.*, 2012).

B.4.2 Pathogenèse

E. faecalis est un membre du microbiote intestinal sain, cependant dans certaines conditions, cette bactérie peut franchir la barrière intestinale et générer des infections comme des endocardites, des bactériémies et des septicémies (Poh *et al.*, 2006). *E. faecalis* peut aussi infecter le tractus urinaire. Cette bactérie est depuis une dizaine d'années, la seconde cause d'infections du tractus urinaire et la 3^{ème} cause de bactériémies (Silva Lopes *et al.*, 2005). En 2005 en Angleterre, sur 7066 cas de bactériémies à Entérocoques, 63 % des cas étaient provoqués par *E. faecalis* (Health Protection Agency, 2007).

E. faecalis est un membre commensal normal du microbiote intestinal, cependant la bactérie peut traverser les cellules épithéliales de l'intestin et transloquer dans la circulation sanguine. Les étapes de l'infection par *E. faecalis* sont similaires à celles suivies par *S. agalactiae* (**Partie 1 § B.3.3**) c'est à dire l'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin suivi du franchissement de cette barrière et enfin la dissémination dans l'organisme. L'étude du génome de cette bactérie montre que les gènes codants pour des facteurs de virulences et des gènes de résistance aux antibiotiques sont situés dans des régions précises du génome appelées « pathogenicity Island » (PAI) (McBride *et al.*, 2009). Les principaux facteurs de virulences identifiés, selon les différentes étapes de l'infection sont connus. Pour l'adhésion, *E. faecalis* dispose des MSCRAMM (Microbial surface component recognizing adhesive matrix molecule adhesin of collagen from Enterococci) (Rich *et al.*, 1999) et de pilis (Handley and Jacob, 1981). Pour la traversée des parois digestives, la bactérie exprime des hémolysines et cytolysines (Ike *et al.*, 1987) contrôlées par un TCS (Haas *et al.*, 2002). Elle exprime aussi une gélatinase capable de lyser le collagène et l'hémoglobine (Sifri *et al.*, 2002). Les facteurs de virulence d'*Enterococcus faecalis* sont très proches de ceux de *S. agalactiae*, à tel point que le génome de cette dernière a permis d'identifier des facteurs de virulence par homologie de séquence (Shankar and Gilmore, 1997). Une étude réalisée en 2014 a d'ailleurs mis en

évidence les difficultés rencontrées pour distinguer l'implication les deux bactéries dans différentes pathologies (Savini *et al.*, 2015).

Partie 2

Résultats

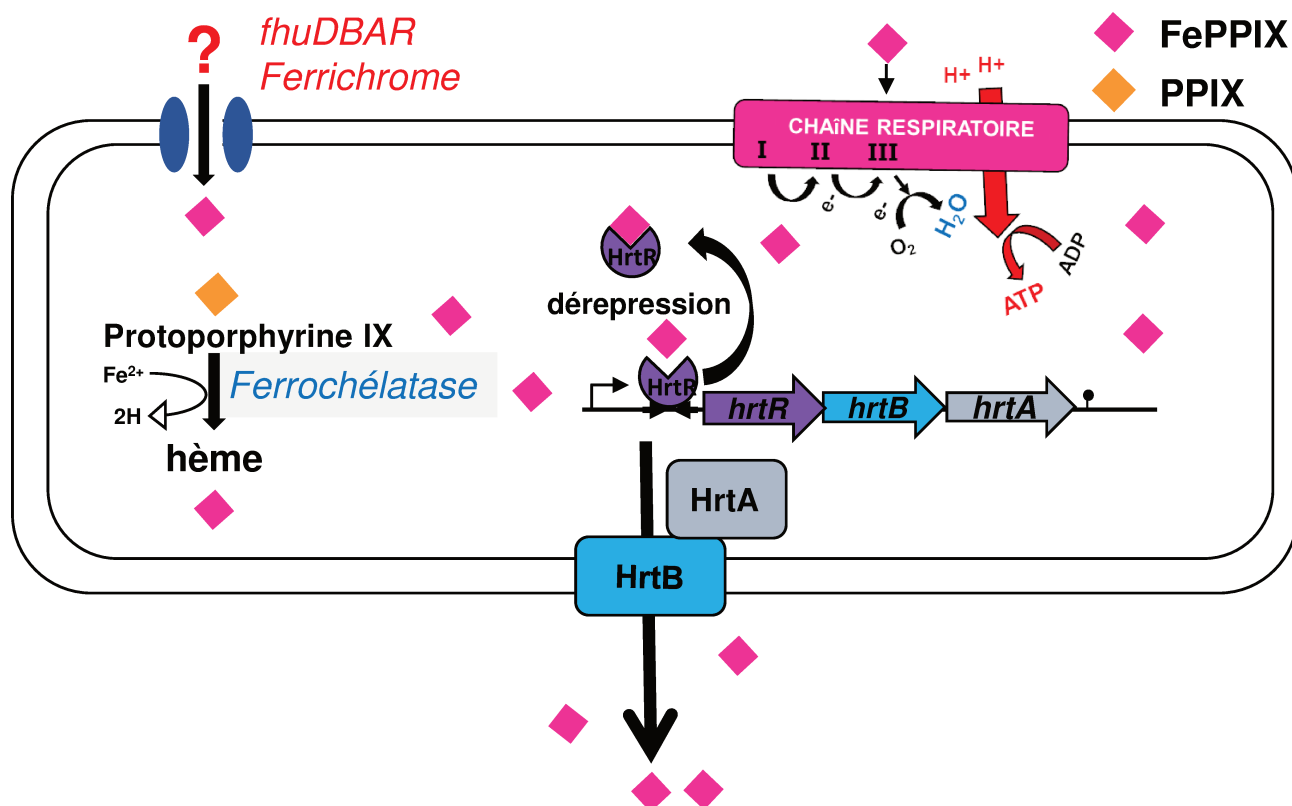


Figure 29. Utilisation et homéostasie de l'hème chez *Lactococcus lactis*. Voir Partie 2 § A.1.

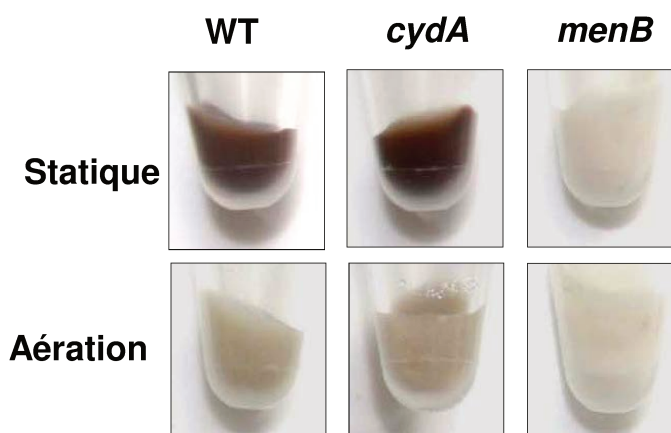


Figure 30. Accumulation d'hème dans les bactéries *L. lactis*. L'hème exogène s'accumule dans les membranes de *L. lactis* en condition de culture statique par un mécanisme qui dépend de la synthèse des ménaquinones (mutant *menB*) et indépendamment du métabolisme respiratoire qui est activé en présence d'hème (mutant *cydA*).

Cette partie 2 est organisée en 3 chapitres. Le chapitre A traite des mécanismes de l'homéostasie de l'hème chez *Lactococcus lactis* et a fait l'objet d'un article publié dans « Molecular Microbiology » (Joubert *et al.*, 2014). Le chapitre B traite de l'impact de l'hème sur les capacités infectieuses de *S. agalactiae* et a fait l'objet d'un article qui a été soumis au journal « Scientific Report ». Le chapitre C regroupe des résultats préliminaires de la mise en évidence du « sensing » de l'hème par la bactérie *Enterococcus faecalis* dans le tractus digestif.

A Rôle de HrtBA dans l'homéostasie de l'hème chez *Lactococcus lactis*

A.1 *L. lactis* et l'hème

L. lactis (**Figure 29**) est une bactérie auxotrophe pour l'hème qui peut basculer d'un métabolisme fermentaire à respiratoire en présence de cette molécule. Cette bactérie contrôle l'homéostasie de l'hème grâce au transporteur d'efflux de l'hème HrtBA. Ce transporteur est régulé par un répresseur transcriptionnel de la famille TetR, HrtR (Lechardeur *et al.*, 2012). HrtR est une hémoprotéine dont la liaison à l'hème lève la répression de la transcription de l'opéron *hrtRBA* (Lechardeur *et al.*, 2012). L'opéron *fhuDBAR* code les différentes protéines d'un transporteur du fer qui pourrait aussi être impliqué dans le transport de l'hème (Gaudu *et al.*, 2003). *L. lactis* exprime aussi une ferrochélatase (*hemH*). Cette bactérie serait donc capable de synthétiser de l'hème à partir de protoporphyrine (Bolotin *et al.*, 2001). Des orthologues du système d'efflux de porphyrine PefAB ont été identifiés dans la souche Il1403 (Fernandez *et al.*, 2010).

A.2 Contexte

Lors de la caractérisation du système d'efflux de l'hème HrtBA et de sa régulation par un senseur intracellulaire d'hème HrtR chez *L. lactis* (Lechardeur *et al.*, 2012), il avait été observé que selon les conditions d'oxygénation des cultures (conditions statiques (ou microaérobies) ou conditions aérées), l'hème que l'on ajoute dans le milieu de culture interagit différemment avec *L. lactis* (**Figure 30**). Ainsi le culot de cellules issues de la culture statique présente une coloration rouge marquée tandis que les mêmes cellules cultivées en conditions aérobies sont blanches (**Figure 30, WT**). De plus, le métabolisme respiratoire des bactéries qui est activé en conditions de cultures aérées en présence d'hème n'explique pas ce phénomène (**Figure 30, *cydA***) puisqu'un mutant qui ne « respire » pas présente la même

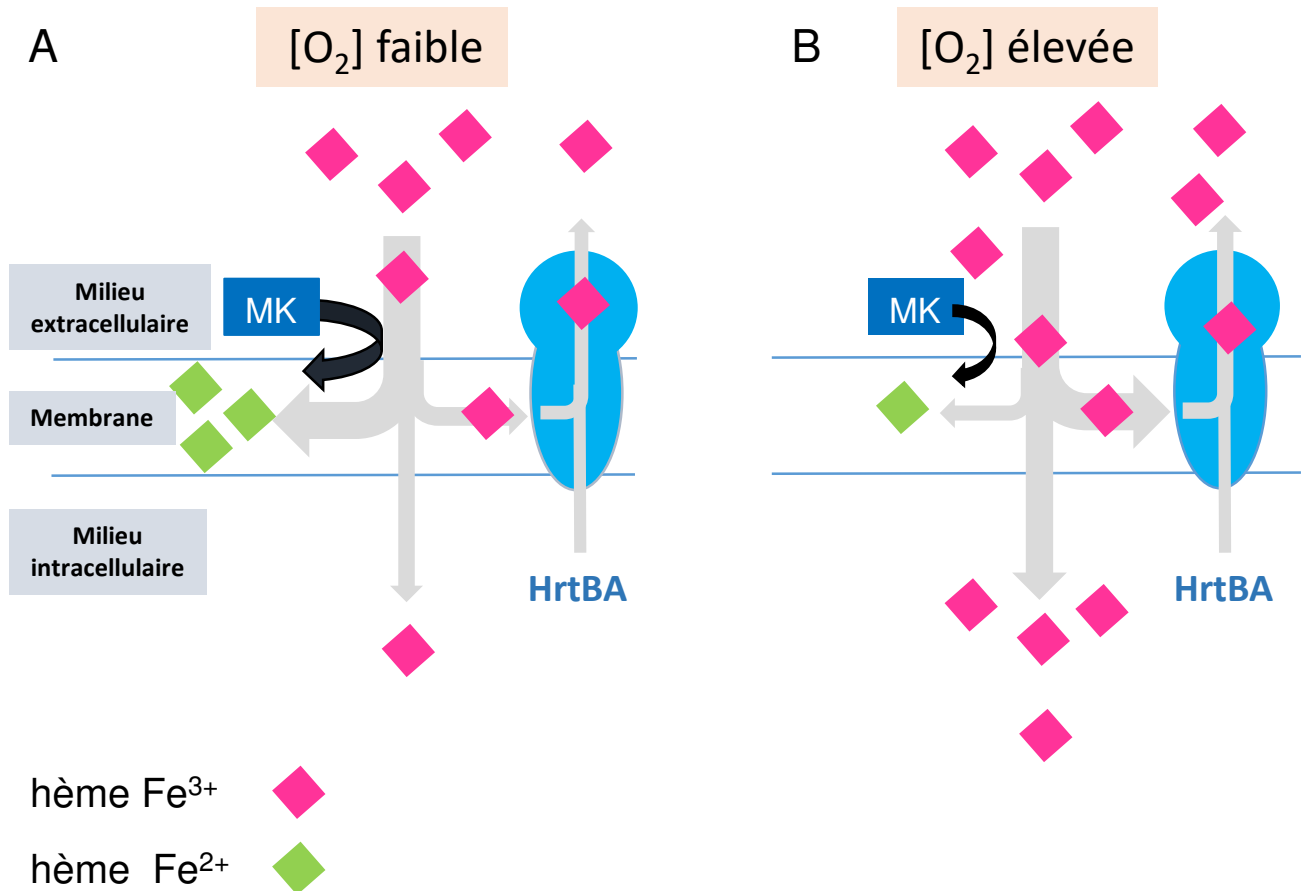


Figure 31. Modèle décrivant le mécanisme de contrôle de l'homéostasie de l'hème chez *L. lactis*. (A) Le fer (Fe³⁺) de l'hème est réduit en Fe²⁺ grâce à l'activité réductrice des ménaquinones (MK) ce qui entraîne son accumulation dans la membrane. (B) Cette activité réductrice des ménaquinones peut être inhibée lorsque le milieu est oxydant ce qui aboutit à une diminution d'hème dans le compartiment membranaire.

coloration. A l'inverse, l'accumulation d'hème dans les cellules en conditions de faible oxygénation, est dépendante de l'expression des ménaquinones membranaires (**Figure 30, *menB***).

L'objectif de mon travail était donc de comprendre i-les mécanismes permettant d'expliquer ces phénotypes ; ii-le lien entre l'accumulation d'hème observée et le contrôle de l'homéostasie de l'hème par le système *hrt* chez *L. lactis*. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication intitulée « HrtBA and menaquinones control haem homeostasis in *Lactococcus lactis* » (Joubert *et al.*, 2014)

A.3 Publication 1 : HrtBA et les ménaquinones contrôlent l'homéostasie de l'hème chez *Lactococcus lactis*

HrtBA and menaquinones control haem homeostasis in *Lactococcus lactis*

Laetitia Joubert,^{1,2} Aurélie Derré-Bobillot,^{1,2}
Philippe Gaudu,^{1,2} Alexandra Gruss^{1,2} and
Delphine Lechardeur^{1,2*}

¹INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

²AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

Summary

Lactococcus lactis is a fermenting Gram-positive bacterium widely used for production of dairy products. Lacking haem biosynthesis genes, *L. lactis* can still shift to an energetically favourable respiratory metabolism by activating a terminal cytochrome *bd* oxidase when haem is added to an aerated culture. Haem intracellular homeostasis is mediated by the *hrtRBA* operon encoding the conserved membrane HrtBA haem efflux permease and the unique intracellular haem sensor and regulator, HrtR. Here we report that membrane-associated menaquinones (MK) favour the accumulation of reduced haem in membranes. An oxidative environment, provided by oxygen, prevents and reverses haemin reduction by MK and thus limits haem accumulation in membranes. HrtBA counteracts MK-dependent membrane retention of excess haem in membrane, suggesting direct efflux from this compartment. Moreover, both HrtBA and MK-mediated reduction have a strong impact on haem intracellular pools, as determined via HrtR haem sensor induction, suggesting that intracellular haem acquisition is controlled at the membrane level without the need for dedicated import systems. Our conclusions lead to a new hypothesis of haem acquisition and regulation in which HrtBA and the bacterial membrane have central roles in *L. lactis*.

Introduction

Haem and respiration in Lactococcus lactis

Haem, an iron-containing porphyrin, is the prosthetic group for numerous key cellular enzymatic and regulatory

processes (Furuyama *et al.*, 2007; Gruss *et al.*, 2012; Girvan and Munro, 2013). The porphyrin ring facilitates iron solubility and optimizes iron catalytic activity by 5–10 orders of magnitude (Kraemer, 2004). The properties of iron as a transition metal that cycles between redox states are maintained in haem, making it a valuable cofactor for biological processes, but generating toxic free radicals through Fenton chemistry (Alayash *et al.*, 2001). The resulting reactive oxygen species can be deleterious to lipids, proteins and nucleic acids.

Most bacteria encode the biosynthetic enzymes needed for endogenous haem production. Remarkably however, numerous bacteria lack a complete haem biosynthesis pathway, yet encode haem-requiring functions. For such haem-auxotrophs, haem must be captured from the environment for direct use. This is in contrast to most studied bacteria, which synthesize haem but also scavenge it from their environment to use as an iron source (Anzaldi and Skaar, 2010; Pishchany and Skaar, 2012). A well-studied example of a haem auxotroph is *Lactococcus lactis*, a fermenting bacterium that produces lactic acid, which can shift to an energetically favourable respiratory metabolism when haem is added to an aerated culture. Respiration metabolism has a major positive impact on growth and long-term survival (Duwat *et al.*, 2001; Lechardeur *et al.*, 2011; Pedersen *et al.*, 2012). Numerous other lactic acid bacteria (LAB), including opportunist pathogens like *Streptococcus agalactiae* and *Enterococcus faecalis* similarly use haem to activate respiration growth (Winstedt *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2005; Gruss *et al.*, 2012). Haem-mediated respiration in *L. lactis* depends on endogenously synthesized membrane-localized lipophilic menaquinones (MK), which shuttle electrons from oxidoreductases to cytochrome oxidases (Gaudu *et al.*, 2002; Rezaiki *et al.*, 2004). In bacteria, quinones also accept electrons from proteins other than dehydrogenases, like redox proteins, and participate in multiple cellular functions such as secretion and defence against oxidative stress (Nohl *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2006). MKs synthesized by *L. lactis* consist of two distinct subgroups: (i) MK-8 to MK-10, considered as hallmarks of *L. lactis*, are produced throughout growth, and (ii) Short-chain MK-3 and demethyl MK-3 are present only in early stationary growth phase (Rezaiki *et al.*, 2004). Quinone profiles were similar for extracts derived from static, aeration or respiration (in the presence of haemin and oxygen). The redox state of MKs varies

Accepted 3 July, 2014. *For correspondence. E-mail delphine.lechardeur@jouy.inra.fr; Tel. (+33) 134 652 395; Fax (+33) 134 652 065.

according to oxygen and haem availability, and cytochrome *bd* activity: in static and aeration conditions, MKs efficiently reduce iron and copper, while in respiration permissive conditions, this capacity is diminished following oxygen reduction by the cytochrome *bd* (Rezaiki *et al.*, 2004).

Haem toxicity management in *L. lactis*

While the importance of haem as a cofactor for respiration and numerous bacterial functions is well established (Reniere *et al.*, 2007b; Schultz *et al.*, 2010; Gruss *et al.*, 2012) the question remains as to what means are available to the cell for limiting haem toxicity due to iron bound to the protoporphyrin ring (forming ferriprotoporphyrin IX; FePPIX, haem). *L. lactis* encodes an orthologue of the Haem Regulated Transporter proteins, HrtB (permease) and HrtA (ATPase), which was first described in *Staphylococcus aureus* as involved in preventing haem toxicity, and whose inactivation results in haem hypersensitivity (Torres *et al.*, 2007; Pedersen *et al.*, 2008; Stauff *et al.*, 2008; Stauff and Skaar, 2009a). Our recent studies in *L. lactis* revealed that HrtBA functions directly as a haem-specific efflux pump, which we suggest is the case for HrtBA as present in other bacteria (Lechardeur *et al.*, 2012). However, unlike the situation in *S. aureus*, *hrtBA* regulation involves a transcriptional factor, HrtR, that controls the *hrtRBA* operon (Pedersen *et al.*, 2008; Lechardeur *et al.*, 2012). In the absence of haem, HrtR binds to the *hrtRBA* promoter, blocking transcription. High-affinity binding of HrtR to haem alleviates its interaction with the *hrtRBA* promoter, thus allowing transcription (Lechardeur *et al.*, 2012). HrtR functions as an intracellular haem sensor that plays a key role in haem intracellular homeostasis. Functional characterization of HrtBA in *L. lactis* expanded its suggested role and evolution of the *hrt* system beyond bacterial pathogens such as *S. aureus*, and gave insight into its direct function. In addition to efflux as a means of haem control, a recent study in *S. aureus* evoked a further role for MKs in haem toxicity (Wakeman *et al.*, 2012). In that study, mutants lacking enzymes of the MK synthesis pathway were found to have accrued resistance to environmental haem cytotoxicity. MK-mediated toxicity was attributed to oxidation of membrane-associated haem reservoirs (Wakeman *et al.*, 2012).

In this work, we investigated the link between haemin partitioning into membranes and HrtBA efflux activity, and how these two functions regulate *L. lactis* intracellular haem homeostasis. *L. lactis* is particularly suited for this study as haem levels are fully controlled by environmental pools. We observed that MKs and more generally reducing conditions in *L. lactis* correlate positively with the amounts of membrane-bound haem, while oxidative conditions have the opposite effect. HrtBA counteracts

MK-dependent membrane retention of excess haem. Finally, we investigated the possibility that haemin can reach the cytoplasm without the need for dedicated import systems for haem acquisition. Our conclusions lead to a new picture of haem intracellular acquisition and regulation in *L. lactis* in which HrtBA and the bacterial membrane have central roles.

Results

In this report, haem refers to iron protoporphyrin IX regardless of the iron redox state, whereas haemin refers to ferric iron protoporphyrin IX.

Added haemin is trapped in *L. lactis* membranes

Bacterial pellets of *L. lactis* grown with haemin (10 μ M) in a low-O₂ environment (static growth conditions) appeared strongly red (Fig. 1A, static). Colour intensity of pellets increased with increasing haemin concentrations (Fig. S1A). In contrast, bacteria remained white when grown in high-O₂ conditions (vigorous aeration) (Fig. 1A, aeration). Addition of haemin to *L. lactis* cultures in the presence of oxygen induces respiration metabolism (Duwat *et al.*, 2001; Pedersen *et al.*, 2012). The possibility that the contrasted colour phenotypes between static and aeration conditions could originate from respiratory chain activity was first investigated using two strains defective in key proteins of the respiratory chain; a subunit of the cytochrome *bd* oxidase and an enzyme of the MK biosynthesis pathway; respectively encoded by *cydA* and *menB* (Duwat *et al.*, 2001; Rezaiki *et al.*, 2004). As shown on Fig. 1A, the *cydA::ISS1* mutant behaved like the WT strain by accumulating haemin in static but not in aeration conditions. This observation suggested that activation of respiration metabolism was not responsible for the contrasted colour phenotypes of *L. lactis* in the presence of haemin. In contrast, the Δ *menB* mutant strain remained uncoloured compared to the WT strain (Fig 1A, Δ *menB*). Comparable results were also obtained when bacteria were grown in strict anaerobic fermentation conditions (data not shown). All together these first observations led us to conclude that *L. lactis* accumulates haemin by a mechanism driven by MK-mediated reduction and counterbalanced by oxygen availability. They suggested that low-oxygen conditions increase haemin (Fe³⁺PPIX) accumulation in *L. lactis* after reduction by MK. It is plausible that an oxidative aerobic environment prevents Fe³⁺PPIX reduction by interfering with MK reducing activity. To confirm this hypothesis, dithionite, a strong non-membrane-permeable reductant was added to the culture medium (Langner and Hui, 1993). As shown on Fig. 1B, dithionite restored haem sequestration in Δ *menB* mutants as a function of the concentration (0–5 mM). Addition of VitK2, a MK, had a similar effect. In

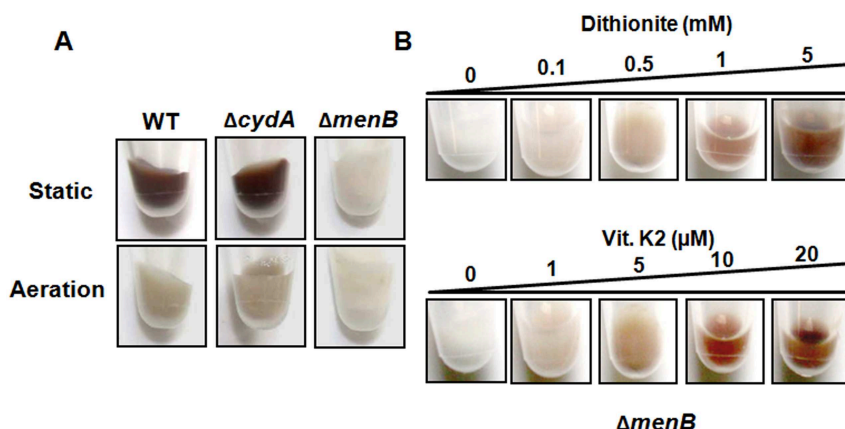


Fig. 1. *L. lactis* accumulates high levels of haem by an MK- and oxygen-dependent mechanism.

A. Colour phenotype of WT (MG1363), *cydA*::ISS1 (MG1363H1) and $\Delta menB$ (MG1363H2) strains in the presence of haemin. All *L. lactis* strains were grown to $OD_{600} = 0.5$ in static conditions prior to addition of 10 μM haemin to culture medium for an additional 1 h, in static or aeration conditions as indicated. Cells were pelleted by centrifugation.

B. Colour phenotype is restored in the $\Delta menB$ mutant (MG1363H2) by addition of dithionite or Vitamin K2 (a menaquinone). The $\Delta menB$ strain was grown in static conditions and incubated with 10 μM haemin together with the indicated concentrations of dithionite or Vitamin K2 for 1 h. Cells were pelleted by centrifugation. Result is representative of three independent experiments.

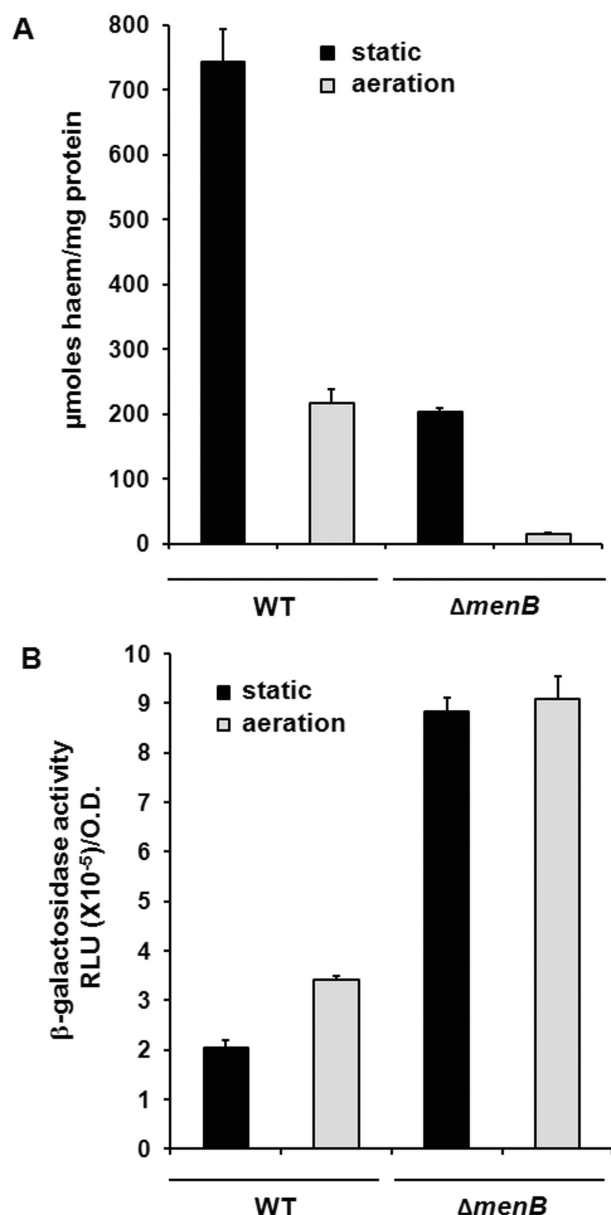
aeration conditions, addition of up to 2 mM dithionite did not lead to haem retention (data not shown), further suggesting that haemin is only poorly reduced in the presence of oxygen.

The above results indicate that $Fe^{3+}PPIX$ is reduced to $Fe^{2+}PPIX$ by membrane-located MKs, and is a strongly oxygen-sensitive event. Fast reversibility of retention when bacteria are transferred from static to aeration growth conditions further consolidates this conclusion (Fig. S1B). A role for MKs in haem redox status is in line with recent work of Wakeman *et al.* (2012) that gives evidence for MK-mediated reduction of haem retained in *S. aureus* membranes. Importantly, our work in *L. lactis* further reveals that the amount of cell-associated haem is also strongly dependent on environmental oxygen.

Both membrane and intracellular haem contents are MK-dependent in *L. lactis*

The subcellular localization of haem and its impact on haem intracellular homeostasis was analysed next. Accumulated haem remained associated with the bacteria following treatment with lysozyme, suggesting that accumulated haem was not associated with the cell wall (data not shown). Membrane and intracellular haem pools were quantified in WT and $\Delta menB$ bacteria exposed to haemin. Haem quantification in isolated membranes was assessed using the pyridine haemochrome assay (Fig. 2A). When grown in static conditions, membranes from WT strains contained about four times more haem than membranes from $\Delta menB$ strains (Fig. 2A), showing that haemin associates readily with membranes when MKs are present.

Enrichment of the culture medium with oxygen through aeration almost completely abolished the presence of haem in both WT and $\Delta menB$ membranes (Fig. 2A). The intracellular haem content was evaluated under the same conditions. Direct quantification of haem in the cytoplasmic fraction was not performed, as our results suggested that high concentrations of added haem might contaminate the cytoplasmic fraction during preparation. We therefore made use of the HrtR intracellular haem sensor to quantify haem intracellular concentrations, as shown previously (Lechardeur *et al.*, 2012). Intracellular haem concentrations were followed using $P_{hrt}hrtR-lac$ as reporter established in the WT and $\Delta menB$ strains (Fig. 2B). $P_{hrt}hrtR-lac$ is virtually off in the absence of haemin validating the haemin requirement for β -gal induction (Lechardeur *et al.*, 2012). In static growth conditions, β -gal activity was about fourfold higher in $\Delta menB$ strains compared to WT exposed to 5 μM haemin, a concentration that did not saturate the HrtR mediated response system (Lechardeur *et al.*, 2012). These results suggested that the defect in MK synthesis led to a significant increase of intracellular haem (Fig. 2B). Western blot analysis using HrtR-directed antibodies further confirmed the higher intracellular haem balance in the $\Delta menB$ mutant compared to the WT strain in static conditions (Fig. S2A). Unlike the case for membrane haem, amounts of intracellular haem were higher in the WT strain grown in aeration compared to static growth conditions (Fig. 2B and Fig. S2B). We noted that haemin toxicity was minimal at the tested concentration (5 μM) and conditions, although the $\Delta menB$ strain was less sensitive to haemin than the WT at higher concentrations (Fig. S3). These results show that exogenously added haem parti-



tions between the membrane and intracellular compartments, and that MKs impact its differential localization.

*HrtBA mediated efflux prevents haem sequestration in the *L. lactis* membrane*

A role for HrtBA in reducing haem toxicity was first reported in *S. aureus* and shown in several bacteria (Reniere *et al.*, 2007a; Torres *et al.*, 2007; Stauff and Skaar, 2009b; Bibb and Schmitt, 2010; Burgos and Schmitt, 2012; Juarez-Verdayes *et al.*, 2012; Lechardeur *et al.*, 2012). Our studies in *L. lactis* further implicated HrtBA as responsible for efflux of haem intracellular pools (Lechardeur *et al.*, 2012). However, the recent work of Skaar and col-

Fig. 2. Both membrane and intracellular haem contents are modified upon oxygen availability and menaquinone activity. A. Haem is sequestered in membranes of *L. lactis* grown in static conditions. WT (MG1363) and ΔmenB (MG1363H2) strains were grown in static conditions to $\text{OD}_{600} = 0.5$ prior addition of 3 μM haemin in the indicated growth conditions. Control bacteria were grown in the same conditions without haemin (not shown). Bacteria were pelleted and membranes isolated (see *Experimental procedures*). Membrane fractions were solubilized in 50 mM Tris-Cl, pH 7.5 containing 150 mM NaCl and 0.2% Triton X-100. Haem content was determined by the pyridine haemochrome assay and normalized to protein concentration (see *Experimental procedures*). Results represent the mean $\pm$ standard deviation from triplicate samples. Result is representative of three independent experiments.

B. Induction of the HrtR intracellular haem sensor by haemin in WT (MG1363) and ΔmenB (MG1363H2) strains grown in static and aeration growth conditions. The strains carrying $P_{\text{hrtR-lac}}$ were grown to $\text{OD}_{600} = 0.5$. β -gal activity was determined after 1 h incubation with 3 μM haemin as in (A) and quantified by luminescence (*Experimental procedures*). Results represent the mean $\pm$ standard deviation from triplicate samples. Values of luminescence obtained with no added haem are subtracted. Result is representative of three independent experiments.

leagues (Wakeman *et al.*, 2012) linked MK-dependent haem sequestration in membranes to haem toxicity, which was alleviated in *S. aureus* by HrtBA activity, but not to haem quantity. We asked whether HrtBA also manages membrane haem levels, and exploited the fact that haem pools in *L. lactis* are fully exogenously controlled. To investigate this, we evaluated membrane haem sequestration in *L. lactis* strains either lacking the entire *hrtRBA* operon or overexpressing the HrtBA transporter (Lechardeur *et al.*, 2012). In static growth conditions, the amount of haem sequestered in WT *L. lactis* was dependent on the expression of HrtBA (Fig. 3A). Overproducing the HrtBA transporter [$\Delta\text{hrtRBA}(\text{phrtBA})$] almost completely abrogated haem accumulation, while ΔhrtRBA mutant bacteria were more intensely coloured than the WT strain (Fig. 3A). Haem quantification in isolated membranes from WT, $\Delta\text{hrtRBA}(\text{phrtBA})$ and $\Delta\text{hrtRBA}(\text{pCtrl})$ bacteria exposed to 3 μM haemin confirmed that HrtBA overproduction prevented accumulation of haem in membranes (Fig. 3B). These data are consistent with the conclusion that HrtBA regulates the amounts of cellular haem both at the intracellular and at the membrane levels.

*HrtBA competes with quinone haemin reducing activity to control *L. lactis* haem content*

The finding that both HrtBA and MKs impact haem accumulation in cytoplasmic and membrane compartments might imply that haemin reduction, e.g. by MKs, is a prerequisite for HrtBA-mediated efflux. To study the impact of membrane haem retention on HrtBA function, we relied on the colour phenotype of bacteria. While haem sequestration in membranes was lower in aeration conditions (WT,

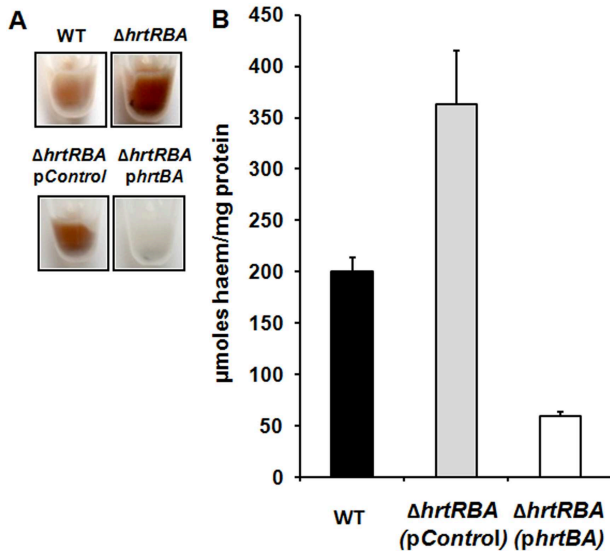


Fig. 3. The HrtBA transporter controls membrane haem content via efflux in *L. lactis*.

A. HrtBA participates in the colour phenotype of *L. lactis* upon haemin exposure. WT (MG1363), $\Delta hrtRBA$ (MG1363H3), $\Delta hrtRBA(pControl)$ or $\Delta hrtRBA(phrtBA)$ were grown in static conditions to $OD_{600} = 0.5$ prior addition of 3 μM haemin to the culture for 1 h. Cells were pelleted by centrifugation. Result is representative of three independent experiments.

B. HrtBA overproduction prevents membrane accumulation of haemin. Pyridine assay was performed on membranes isolated from bacteria exposed to 3 μM haemin as in (A). Haem content was normalized to the protein concentration (see *Experimental procedures*). Results represent the mean $\pm$ standard deviation from triplicate samples. Result is the mean of three independent experiments.

aeration) compared to static conditions, the $\Delta hrtRBA$ mutant exhibited significantly stronger staining in both growth conditions (Fig. 4A). When the same assay was performed in a $\Delta menB$ background, i.e. comparing $\Delta menB$ and $\Delta menB \Delta hrtRBA$, the $\Delta menB \Delta hrtRBA$ strain was slightly more coloured than the $\Delta menB$ strain. In other words, even if membrane sequestration of haem is low in oxidizing conditions (Fig. 4A), or in the $\Delta menB$ mutant (Fig. 4B), HrtBA is needed to drive out residual haem. These data support the idea that haemin reduction by MKs is not a prerequisite to HrtBA control of haem homeostasis at the membrane level.

We next investigated the impact of inhibiting haemin reduction on the capacity of HrtBA to regulate haem intracellular pools. In Fig. 2B, we showed that $P_{hrt}hrtR-lac$ induction was optimal in conditions where haemin is not reduced by MKs (i.e. in aeration conditions and in a $\Delta menB$ mutant). Increased intracellular haem could result from inhibition of haem efflux by HrtBA, but also from greater haem uptake. To discriminate between these possibilities, the amount of intracellular haem was tested independently of HrtBA efflux activity by comparing $\Delta menB \Delta hrtRBA$ and

the $\Delta hrtRBA$ mutant (Fig. 4C). In static growth conditions, $\Delta menB$ deletion led to a significant increase of intracellular haem as seen by β -gal activity from $pP_{hrt}hrtR-lac$ (Fig. 4C; note that 10 μM haem is not toxic in the $\Delta menB$ strain) This

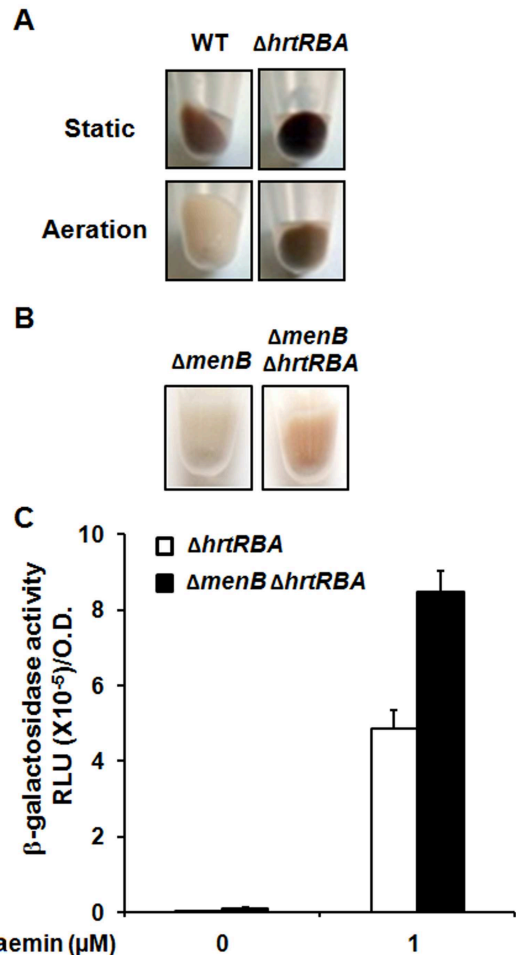


Fig. 4. HrtBA is functional in conditions when haem does not accumulate in membranes.

A. HrtBA participates in the colour phenotype of *L. lactis* upon haemin exposure in both static and aeration growth conditions. WT (MG1363), $\Delta hrtRBA$ (MG1363H3) *L. lactis* cultures were grown in static conditions to $OD_{600} = 0.5$ prior addition of 10 μM haemin to the culture grown for an additional 1 h in static followed by 5 min in aeration conditions as indicated. Cells were pelleted by centrifugation. Result is representative of three independent experiments.

B. Comparative colour phenotype of $\Delta menB$ (MG1363H2) and $\Delta menB \Delta hrtRBA$ (MG1363H4) *L. lactis*. Mutant strains were grown in static conditions to $OD_{600} = 0.5$. 10 μM haemin was added to the culture for 1 h and bacteria were harvested by centrifugation. Result is representative of three independent experiments.

C. Intracellular haem content of $\Delta menB$ (MG1363H2) and $\Delta menB \Delta hrtRBA$ (MG1363H4) strains. Strains carrying $P_{hrt}hrtR-lac$ were grown to $OD_{600} = 0.5$. β -gal activity was induced for 1 h in the presence of the indicated concentrations of haemin and quantified by luminescence (*Experimental procedures*). Results represent the mean $\pm$ standard deviation from triplicate samples and are representative of three independent experiments.

result supports the notion that the observed increase of intracellular haem in $\Delta menB$ or in the WT strain grown in aeration is due to greater haem uptake, independently of HrtBA efflux activity. This result was further confirmed by showing that overexpressing HrtBA in the $\Delta menB \Delta hrtRBA$ strain (Fig. S4) led to a considerable decrease of intracellular haem as seen by the expression of $pP_{hrt}hrtR-lac$, β -gal activity, similarly to what was observed in the WT strain (Lechardeur *et al.*, 2012). Altogether, these results suggest that membrane and intracellular haem homeostasis in *L. lactis* is the result of two competing but independent mechanisms with opposite effects, i.e. sequestration favoured by MKs and export by HrtBA.

Haem acquisition is not dependent on surface ABC transporters in *L. lactis*

The results described above point out that haem acquisition in *L. lactis* as tested by the HrtR-based haem intracellular haem sensor depends on the combined activities of both environmental or membrane reduction capacity, and HrtBA-mediated haem efflux. These results led us to ask whether haemin acquisition in *L. lactis* could occur by membrane diffusion. While the lipophilic character of haemin could be compatible with diffusion, haemin import in Gram-positive bacteria has been shown to rely on ABC-transporters associated with membrane-anchored lipoproteins (for review, Gruss *et al.*, 2012). To discriminate between these two possibilities in *L. lactis*, we relied first on sodium orthovanadate, a potent inhibitor of ATPases that blocks ABC-transporter functions implicated in most import systems (Garvey and Piddock, 2008). The impact of ATPase inhibition on haem acquisition was examined in $\Delta hrtRBA$ strains transformed with the $pP_{hrt}hrtR-lac$ reporter. Cells pre-treated with 2 mM orthovanadate for 0.5 h followed by 1 h induction with 1 μ M haemin (non-toxic in the $\Delta hrtRBA$ strain) exhibited β -gal activity that was only slightly diminished compared to control bacteria (Fig. 5). HrtBA is an ATP-dependent transporter and presumably orthovanadate-sensitive. Under the same conditions, haemin intracellular content in the $\Delta hrtRBA(phrtBA)$ strain, used as a control of orthovanadate treatment, was over fivefold increased, thus validating the effect of orthovanadate in inhibiting the HrtA ATPase (Fig. S5). These results suggested that in the experimental μ M haem concentrations used in the present study, haem intracellular import is mainly independent of the function of ABC transporters. These data are compatible with the notion that haem import is not mediated by lipoproteins associated with ABC transporters. These observations are consistent with our proposal that haem import in *L. lactis* occurs by membrane diffusion and is modulated by the combined actions of reducing activity via MKs and HrtBA-mediated efflux.

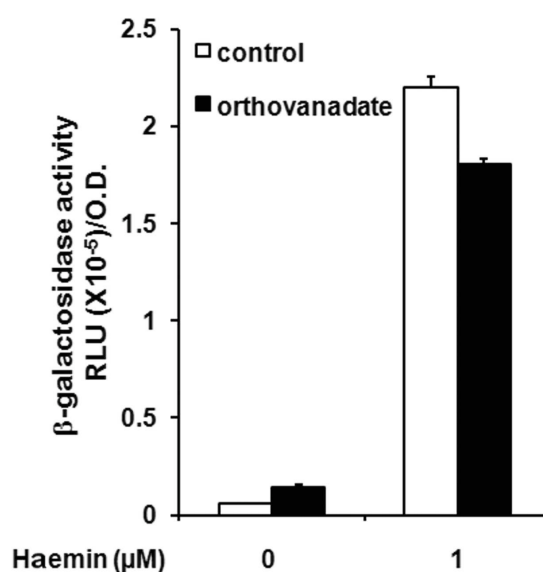


Fig. 5. Surface ABC transporters are not involved in haemin transport to the cytoplasm. Inhibition of ATPases with orthovanadate has a minimal impact on intracellular haem homeostasis. The $\Delta hrtRBA$ (MG1363H3) strain carrying $P_{hrt}hrtR-lac$ was grown to $OD_{600} = 0.5$ and split in two. Cultures were pre-incubated for 0.5 h without or with 2 mM orthovanadate, followed when indicated by the addition of 1 μ M haemin for 1 h. Luminescence was determined as described (*Experimental procedures*). Results represent the mean $\pm$ standard deviation from triplicate samples and are representative of three independent experiments.

Two conserved tyrosine residues localized in the large extracellular domain of HrtB are essential for haem efflux

In an effort to decipher the mechanism of haem efflux from membranes by HrtB, we looked for amino acids (AAs) in HrtB that might be implicated in haem binding, e.g. as reported for the haem transporter CcsBA in *Escherichia coli* (Frawley and Kranz, 2009). HrtB is predicted to comprise four transmembrane segments and one large extra-cytoplasmic loop (ECL) comprising AAs 41 to 237 (by TopPred 0.01, mobyle.Pasteur.fr; Fig. 6A). Alignment of HrtB sequences from several strains revealed two conserved tyrosines that might serve as haem axial ligands localized at positions 168 and 231 on the predicted ECL (Fig. 6A and Fig. S6). To investigate a possible implication of these two tyrosines in haem efflux by HrtB, both were substituted with leucines either separately or together by overlap mutagenesis using a plasmid expressing *hrtBA* (see *Experimental procedures*), and generating mutant proteins Y168L and Y231L as well as a double mutant Y168L, Y231L (Tables S1 and S2). WT and mutant HrtB together with HrtA were overexpressed in the $\Delta hrtRBA$ mutant background. To verify that the mutations did not impact HrtB expression or its insertion in the membrane, an

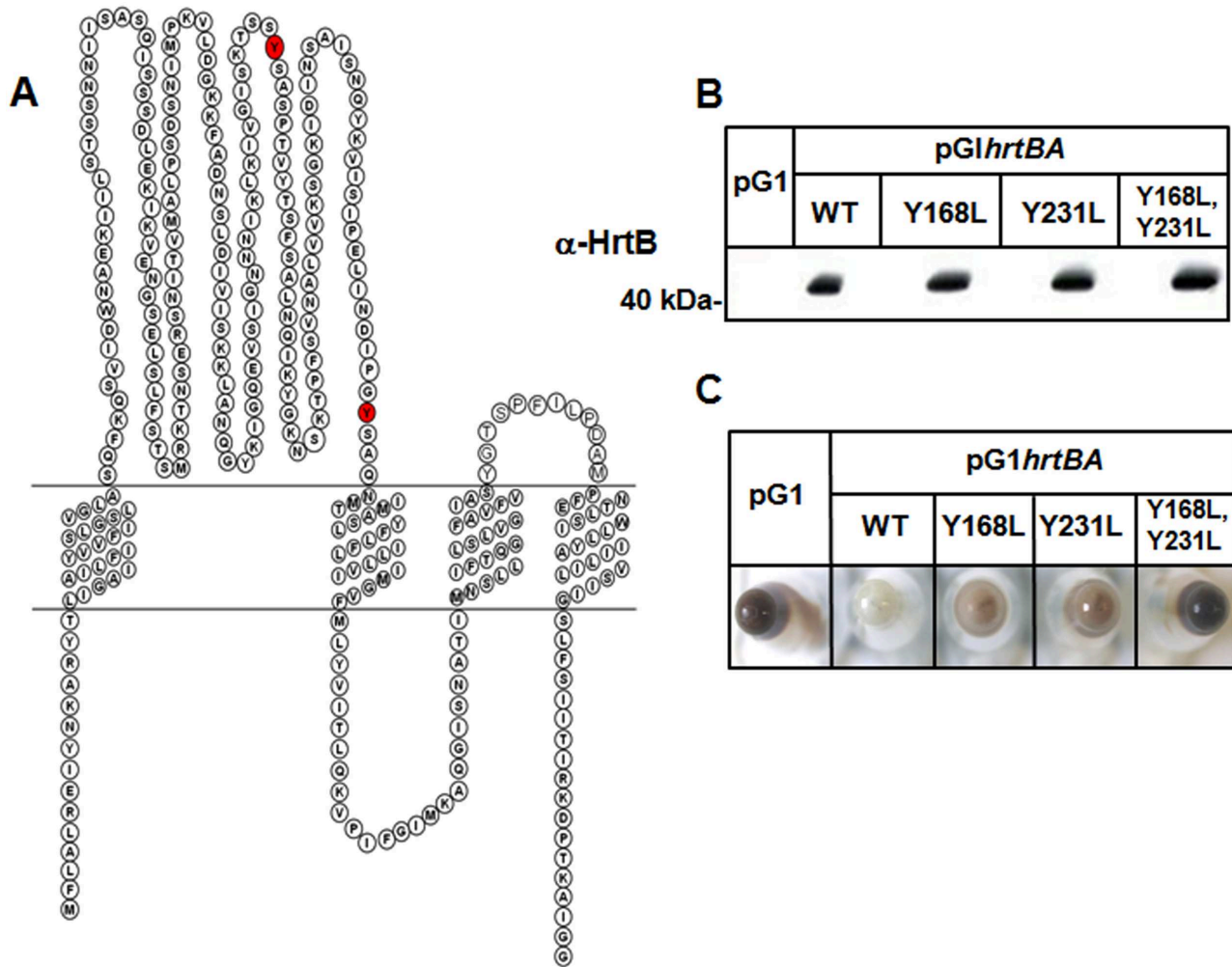


Fig. 6. Two conserved tyrosines are required for HrtB function.

A. Predicted membrane topology of HrtB. HrtB hypothetical insertion in the membrane was drawn from its predicted membrane topology and is characterized by four transmembrane segments and a large extracytoplasmic domain comprising the [41–237] domain. Two conserved tyrosines are highlighted in red.

B. WT HrtB, and Y168L, Y231L and YY variants are expressed similarly in *L. lactis* membranes. An antibody raised against the ECL domain of HrtB (see *Experimental procedures*) was used on Western blots of membranes isolated from bacteria overexpressing the HrtBA WT or with the HrtB variants overexpressing the WT HrtBA transporter or single Y168L and Y231L as well as double Y168L, Y231L (YY) HrtB mutations.

C. Mutations of two conserved tyrosines (Y) of the ECL domain inhibit haem efflux by HrtB. Colour phenotype of $\Delta hrtRBA$ strains incubated with 10 μ M haemin as in Fig. 1, overproducing the WT or mutant HrtBA transporter (as in B).

antibody recognizing the predicted ECL (Fig. 6A) was obtained with purified His-HrtB-ECL (data not shown). Both modified and wild-type HrtBA proteins displayed similar HrtB expression levels in membranes in Western blots (Fig. 6B), and on the cell surface by immunofluorescence microscopy of fixed non-permeabilized cells (Fig. S7). These results confirmed that the predicted ECL comprising AAs 37 to 237 was extracellular and that the mutation did not detectably modify HrtB localization. Similar results were obtained with the single mutants (data not shown). When incubated with 5 μ M haemin in static conditions, cells overexpressing WT HrtBA showed essentially no haem accumulation when compared to the control

$\Delta hrtRBA$ strain (Fig. 6C). In contrast, bacteria overproducing either HrtB mutant-HrtA couple accumulated significantly more haemin as seen by the bacterial pellet phenotype (Fig. 6C). In the same conditions, bacteria overexpressing the doubly mutated HrtB and HrtA displayed a $\Delta hrtBA$ minus phenotype. The colour phenotype observed with the tyrosine mutants probably arose from HrtB dysfunction linked to haem efflux. While the two conserved tyrosines are potential haem ligands, we cannot rule out that their mutations alter overall conformation of HrtB-ECL. Additional studies will thus be needed to validate that haem binding to ECL participates in the haem efflux mechanism. These data highlight the importance of the large ECL

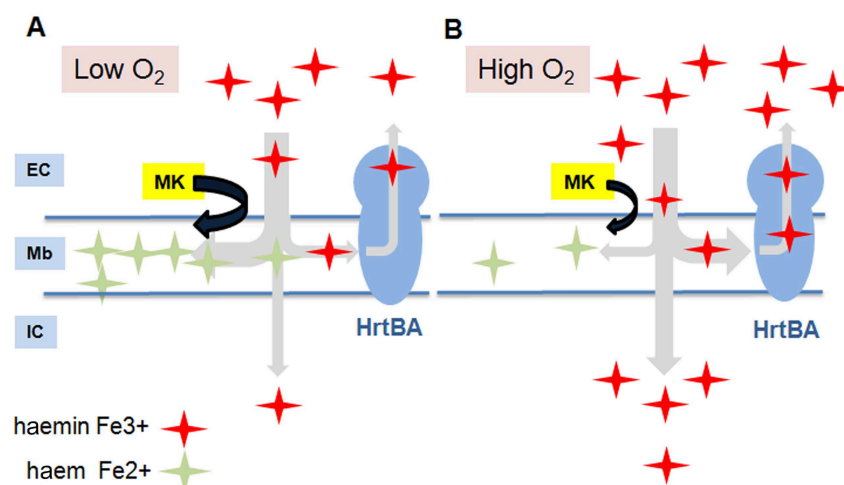


Fig. 7. Schematic representation of the control of haem homeostasis by menaquinones and HrtBA in *L. lactis*. Extracellular (EC) haemin (red star) enters the intracellular (IC) space through the membrane (Mb) compartment. Along this path, haemin is either sequestered in the membrane following its reduction to haem (green star) by MK (or other) reductase activity, or intercepted and effluxed back to the medium. Reduction of extracellular haemin by MKs is more frequent in low oxygen (A), than in a high-oxygen environment (B). The degree of haem immobilization in membranes is also counterbalanced by HrtBA-mediated haemin efflux that further limits MK reduction. Intracellular homeostasis of acquired haemin thus depends on both redox via MK and oxygen, and HrtBA activities in the *L. lactis* membrane.

domain in the efflux mechanism of HrtB and are compatible with our finding that HrtBA has a specific role in effluxing membrane haem.

Discussion

Acquired haemin accumulates in membranes by a mechanism involving menaquinone and oxygen

In this work, we observed that haem accumulates in *L. lactis* membranes by a mechanism that depends on reducing activity, notably due to endogenous membrane-localized menaquinones (MKs). An oxidative environment, provided by oxygen, prevents and reverses haemin reduction and thus limits haem accumulation in membranes. The implication of MKs in the reduction of metals present in bacterial environment (Cu, Fe) has been reported (Duwat *et al.*, 2001; Rezaiki *et al.*, 2004; Richard-Fogal *et al.*, 2009; Abicht *et al.*, 2013). We extend the previous findings to suggest that MKs may also reduce Fe in the haem molecule. However we cannot exclude the implication of yet unidentified MK-dependent haemin reductase(s). The question of why reduced haemin accumulates in membranes remains to be investigated. However, lack of saturation and fast reversibility upon oxygen addition favour the idea that reduced haemin partitions into the membrane lipid bilayer because of its lipophilicity rather than by binding to protein targets. Our results provide new information that modifies previous conclusions of Wakeman *et al.* (2012) on the role of MKs on haem toxicity in aerobically grown *S. aureus*. Their data suggested that membrane-associated haem and quinone molecules form a redox cycle that continuously generates semi-quinones and reduced haem to produce cytotoxic superoxides (Wakeman *et al.*, 2012). Our results in *L. lactis* support the conclusion that in lower oxygen conditions, while MKs reduce larger pools of haemin than in aerated conditions,

the bacteria can probably tolerate larger membrane haem pools because of their lower reactivity.

HrtBA prevents haem accumulation in membranes by direct efflux

Recently, we established that HrtBA was responsible for intracellular haem homeostasis by direct haem efflux in *L. lactis* (Lechardeur *et al.*, 2012). Here we show that HrtBA also controls membrane-localized haem pools, thus providing a mechanistic explanation for the role of HrtBA in regulating haem toxicity (Torres *et al.*, 2007; Anzaldi and Skaar, 2010; Lechardeur *et al.*, 2012). Our results are consistent with the hypothesis that HrtBA effluxes haem from the membrane compartment before it reaches the intracellular space. We propose a model in which membrane MK reducing activity favours haem retention while HrtBA activity prevents this effect by transporting the toxic molecule back to the medium from the membrane (Fig. 7). In view of these results, the HrtBA efflux mechanism could be similar to that of efflux transporters of non-polar molecules known to partition into the lipid bilayer where they accumulate to high concentrations (Sharom, 2008). Similar mechanisms are considered for efflux pumps that confer multidrug resistance to antibiotics and chemotherapeutic drugs, both in prokaryotes and in eukaryotes (Lage, 2003). In the latter examples, MDR family efflux pumps likely function as 'hydrophobic vacuum cleaners' or 'flip-pases', which expel hydrophobic molecules into the extracellular medium from the membrane, thus preventing them from reaching their intracellular targets (Higgins and Gottesman, 1992; Sharom, 1997; 2008; Eckford and Sharom, 2009). The overall conformation of HrtB, including a large extracellular domain with potential substrate specificity, is also reminiscent of transporters involved in efflux of hydrophobic molecules (Fig. 6) (Murakami *et al.*, 2002; Sharom, 2008; Frawley and Kranz, 2009; Xu *et al.*, 2009;

Desuzinges-Mandon *et al.*, 2010). Our results are thus consistent with the hypothesis that HrtBA drives out membrane haem, and further indicate that HrtRBA is the sole dedicated regulator of haem homeostasis in *L. lactis*.

Haem acquisition in *L. lactis*

Altogether our findings that MKs and HrtBA control haem intracellular homeostasis in *L. lactis* favour the notion that haem entry is not rate-limiting. While significant progress has been made in identifying and understanding the mechanisms responsible for haem transport in a few Gram-positive bacteria including *S. aureus* (Mazmanian *et al.*, 2003; Skaar and Schneewind, 2004; Maresso *et al.*, 2008; Gruss *et al.*, 2012), how haem is internalized in most bacteria remains poorly described. We give strong evidence that, in the conditions tested, haem crosses the *L. lactis* membrane by a mechanism that does not imply surface transporters. Diffusion of several lipid-soluble compounds across membranes is documented for example, for small organic molecules ligands of TetR family regulators (Ramos *et al.*, 2005). In Gram-positive bacteria, the accepted uptake model for soluble molecules relies on membrane-anchored lipoprotein ABC transporters that bind and transfer specific ligands to a transmembrane permease. The transported molecules thereby circumvent contact with the hydrophobic interior of the lipid bilayer (Sharom, 1997). According to our data, haem entry into the intracellular space of *L. lactis* is optimal when its retention in membranes is minimal (i.e. when haemin is *not* reduced) (Fig. 2). This would suggest that Fe³⁺PPIX freely diffuses across the membrane while Fe²⁺PPIX accumulates within it (Fig. 7). The extent of haem partitioning into the membrane could therefore dictate the rate of entry of the non-reduced haemin. Further biophysical studies will be needed to determine the exact mechanism of haem interaction with the membrane.

Based on our data, we propose that in the μ M range, free haem entry in *L. lactis* is dictated by redox activities associated with MKs and oxygen, and HrtBA-mediated efflux of membrane-localized haem. It is conceivable that in conditions where haem concentrations are low, expression of membrane transporters combined with high-affinity haemophores are necessary for haem acquisition in *L. lactis*.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

The strains and plasmids used in this work are listed in Table S1. Experiments in *L. lactis* were all performed using strain MG1363 and derivatives. Overnight pre-cultures were grown at 30°C in M17 medium supplemented with 1% glucose. They

were then diluted and grown in M17 with 0.2% glucose. Aerated cultures were obtained by growing strains in Erlenmeyer flasks with a 1:20 medium : volume ratio in a rotary shaker (200 r.p.m.). Cultures grown in static conditions were considered as microaerobic. When needed, antibiotics were used for *L. lactis* at 5 μ g ml⁻¹ erythromycin and 5 μ g ml⁻¹ tetracycline; for *E. coli* at 50 μ g ml⁻¹ kanamycin. Liquid cultures were generally grown to OD₆₀₀ = 0.5 and then incubated for 1 h with the test porphyrin at the indicated concentration. Oligonucleotides used for plasmid constructions are listed in Table S2. Haemin (FePPIX) (Frontier Scientific) stock solution (10 mM) was prepared in 50 mM NaOH. All other chemicals were from Sigma Aldrich.

β -Galactosidase assay

β -Galactosidase (β -gal) activity was assayed on bacteria carrying the pP_{hrtR}hrtR-lac plasmid as described (Lechardeur *et al.*, 2012). β -gal was quantified by luminescence in an Infinite M200 spectroluminometer (Tecan, Austria) using the β -Glo assay system as recommended by manufacturer (Promega).

Anti-HrtB antibody

An anti-HrtB antibody targeted to the extracellular loop (ECL) corresponding to AAs [41–337], HrtB-ECL, was prepared with His-tagged HrtB-ECL as antigen, purified from bacterial lysates on a nickel affinity resin (Sigma Aldrich) as described (Lechardeur *et al.*, 2012). The resulting purified His-HrtB-ECL was used for rabbit antibody production (Covalab, France). Antiserum specificity was determined by Western blots using known amounts of purified His-HrtB-ECL proteins and bacterial lysates expressing HrtB.

Bacterial lysate preparation

Bacteria were pelleted by centrifugation and washed with phosphate-buffered saline (PBS). Resuspended cells were then pelleted at 3500 *g* for 10 min, resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, containing 0.2% Triton X-100 (lysis buffer), and disrupted with glass beads (Fastprep, MP Biomedicals). Cell debris was removed by centrifugation at 18 000 *g* for 15 min at 4°C.

Membrane isolation and pyridine assay

Bacteria were pelleted by centrifugation at 3500 *g* for 10 min and resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, and were lysed with glass beads (Fastprep, MP Biomedicals). Cell debris was removed by centrifugation at 18 000 *g* at 4°C for 15 min and cell membranes were sedimented at 100 000 *g* for 45 min at 4°C. Membrane pellets were resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2% Triton X-100. Proteins were quantified by the Lowry Method (Bio-Rad) and equivalent amounts (in a volume of 65 μ l) were mixed with 10 μ l NaOH 1 M, 20 μ l pyridine and 5 μ l sodium dithionite 100 mM or 5 μ l of potassium ferricyanide 20 mM. Absorption spectra of the samples were recorded from 500 nm and

600 nm in an Infinite M200 spectroluminometer (Tecan). Dithionite-reduced minus ferricyanide-oxidized spectra of pyridine haemochromes from membrane-enriched fractions were used to determine the amount of haem *b* by following the absorbance change at 557 nm using a difference extinction coefficient of $28.15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Berry and Trumpower, 1987).

Acknowledgements

We thank Cécile Wandersman (Institut Pasteur, Paris), Philippe Delepelaire (Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris), and Elise Borezée (INRA) for helpful discussions.

This work was supported by the HemeStockExchange project by the French 'Agence Nationale de la Recherche' ANR-12-BSV3-022-01 and by funding from the French National Research Agency ANR-11-IDEX-0003-02; 'ALIAS' project.

References

- Abicht, H.K., Gonskikh, Y., Gerber, S.D., and Solioz, M. (2013) Non-enzymic copper reduction by menaquinone enhances copper toxicity in *Lactococcus lactis* IL1403. *Microbiology* **159**: 1190–1197.
- Alayash, A.I., Patel, R.P., and Cashon, R.E. (2001) Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications. *Antioxid Redox Signal* **3**: 313–327.
- Anzaldi, L.L., and Skaar, E.P. (2010) Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect Immun* **78**: 4977–4989.
- Berry, E.A., and Trumpower, B.L. (1987) Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem* **161**: 1–15.
- Bibb, L.A., and Schmitt, M.P. (2010) The ABC transporter HrtAB confers resistance to hemin toxicity and is regulated in a hemin-dependent manner by the ChrAS two-component system in *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* **192**: 4606–4617.
- Burgos, J.M., and Schmitt, M.P. (2012) The ChrA response regulator in *Corynebacterium diphtheriae* controls hemin-regulated gene expression through binding to the hmuO and hrtAB promoter regions. *J Bacteriol* **194**: 1717–1729.
- Desuzingues-Mandon, E., Arnaud, O., Martinez, L., Huché, F., Di Pietro, A., and Falson, P. (2010) ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *J Biol Chem* **285**: 33123–33133.
- Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., et al. (2001) Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol* **183**: 4509–4516.
- Eckford, P.D., and Sharom, F.J. (2009) ABC efflux pump-based resistance to chemotherapy drugs. *Chem Rev* **109**: 2989–3011.
- Frawley, E., and Kranz, R. (2009) CcsBA is a cytochrome c synthetase that also functions in heme transport. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 10201–10206.
- Furuyama, K., Kaneko, K., and Vargas, P.D. (2007) Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Tohoku J Exp Med* **213**: 1–16.
- Garvey, M.I., and Piddock, L.J. (2008) The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 1677–1685.
- Gaudu, P., Vido, K., Cesselin, B., Kulakauskas, S.J., Rezaiki, L., Lamberet, G., et al. (2002) Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**: 263–269.
- Girvan, H.M., and Munro, A.W. (2013) Heme sensor proteins. *J Biol Chem* **288**: 13194–13203.
- Gruss, A., Borezee-Durant, E., and Lechardeur, D. (2012) Environmental heme utilization by heme-auxotrophic bacteria. *Adv Microb Physiol* **61**: 69–124.
- Higgins, C.F., and Gottesman, M.M. (1992) Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* **17**: 18–21.
- Juarez-Verdayes, M.A., Gonzalez-Urbe, P.M., Peralta, H., Rodriguez-Martinez, S., Jan-Roblero, J., Escamilla-Hernandez, R., et al. (2012) Detection of *hssS*, *hssR*, *hrtA*, and *hrtB* genes and their expression by hemin in *Staphylococcus epidermidis*. *Can J Microbiol* **58**: 1063–1072.
- Kraemer, S.M. (2004) Iron oxide dissolution and solubility in the presence of siderophores. *Aquat Sci* **66**: 3–18.
- Lage, H. (2003) ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents* **22**: 188–199.
- Langner, M., and Hui, S.W. (1993) Dithionite penetration through phospholipid bilayers as a measure of defects in lipid molecular packing. *Chem Phys Lipids* **65**: 23–30.
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Fernandez, A., Lamberet, G., Garrigues, C., Pedersen, M., et al. (2011) Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **22**: 143–149.
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Liebl, U., Vos, M.H., Fernandez, A., Brun, C., et al. (2012) Discovery of an intracellular heme-binding protein, HrtR, that controls heme-efflux by the conserved HrtB HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* **287**: 4752–4758.
- Maresso, A.W., Garufi, G., and Schneewind, O. (2008) *Bacillus anthracis* secretes proteins that mediate heme acquisition from hemoglobin. *PLoS Pathog* **4**: e1000132.
- Mazmanian, S.K., Skaar, E.P., Gaspar, A.H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., et al. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**: 906–909.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002) Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**: 587–593.
- Nohl, H., Staniek, K., Kozlov, A.V., and Gille, L. (2003) The biomolecule ubiquinone exerts a variety of biological functions. *Biofactors* **18**: 23–31.
- Pedersen, M., Garrigues, C., Tophile, K., Brun, C., Vido, K., Bennedsen, M., et al. (2008) Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: identification of a heme-responsive operon. *J Bacteriol* **190**: 4903–4911.
- Pedersen, M.B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M.A., and Gruss, A. (2012) Aerobic respiration metabolism in lactic

- acid bacteria and uses in biotechnology. *Annu Rev Food Sci Technol* **3**: 37–58.
- Pishchany, G., and Skaar, E.P. (2012) Taste for blood: hemo-globin as a nutrient source for pathogens. *PLoS Pathog* **8**: e1002535.
- Ramos, J., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., *et al.* (2005) The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 326–356.
- Reniere, M.L., Torres, V., and Skaar, E.P. (2007a) Intracellular metalloporphyrin metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials* **20**: 333–345.
- Reniere, M.L., Torres, V.J., and Skaar, E.P. (2007b) Intracellular metalloporphyrin metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Biomaterials* **20**: 333–345.
- Rezaiki, L., Cesselin, B., Yamamoto, Y., Vido, K., van West, E., Gaudu, P., and Gruss, A. (2004) Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long-term survival of *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* **53**: 1331–1342.
- Richard-Fogal, C.L., Frawley, E.R., Bonner, E.R., Zhu, H., San Francisco, B., and Kranz, R.G. (2009) A conserved haem redox and trafficking pathway for cofactor attachment. *EMBO J* **28**: 2349–2359.
- Schultz, I.J., Chen, C., Paw, B.H., and Hamza, I. (2010) Iron and porphyrin trafficking in heme biogenesis. *J Biol Chem* **285**: 26753–26756.
- Sharom, F.J. (1997) The P-glycoprotein efflux pump: how does it transport drugs? *J Membr Biol* **160**: 161–175.
- Sharom, F.J. (2008) ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics* **9**: 105–127.
- Skaar, E.P., and Schneewind, O. (2004) Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect* **6**: 390–397.
- Stauff, D., and Skaar, E. (2009a) the heme sensor system of *Staphylococcus aureus*. *Contrib Microbiol* **16**: 120–135.
- Stauff, D., Bagaley, D., Torres, V., Joyce, R., Anderson, K., Kuechenmeister, L., *et al.* (2008) *Staphylococcus aureus* HrtA is an ATPase required for protection against heme toxicity and prevention of a transcriptional heme stress response. *J Bacteriol* **190**: 3588–3596.
- Stauff, D.L., and Skaar, E.P. (2009b) *Bacillus anthracis* HssR signaling to HrtAB regulates heme resistance during infection. *Mol Microbiol* **72**: 763–778.
- Torres, V., Stauff, D., Bezbradica, J., Gordy, L., Iturregui, J., Anderson, K., *et al.* (2007) A *Staphylococcus aureus* regulatory system that responds to host heme and modulates virulence. *Cell Host Microbe* **1**: 109–119.
- Wakeman, C.A., Hammer, N.D., Stauff, D.L., Attia, A.S., Anzaldi, L.L., Dikalov, S.I., *et al.* (2012) Menaquinone biosynthesis potentiates haem toxicity in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **86**: 1376–1392.
- Winstedt, L., Frankenberg, L., Hederstedt, L., and Von Wachenfeldt, C. (2000) *Enterococcus faecalis* V583 contains a cytochrome bd-type respiratory oxidase. *J Bacteriol* **182**: 3863–3866.
- Xu, Y., Sim, S.H., Nam, K.H., Jin, X.L., Kim, H.M., Hwang, K.Y., *et al.* (2009) Crystal structure of the periplasmic region of MacB, a noncanonic ABC transporter. *Biochemistry* **48**: 5218–5225.
- Yamamoto, Y., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., Gruss, A., and Gaudu, P. (2005) Respiration metabolism of group B Streptococcus is activated by environmental haem and contributes to virulence. *Mol Microbiol* **56**: 525–534.
- Yamamoto, Y., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., Gruss, A., and Gaudu, P. (2006) Roles of environmental heme, and menaquinone, in *streptococcus agalactiae*. *Biomaterials* **19**: 205–210.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Supporting Information

HrtBA and menaquinones control heme homeostasis in *Lactococcus lactis*

Laetitia Joubert, Aurélie Derré-Bobillot, Philippe Gaudu, Alexandra Gruss and Delphine Lechardeur

Supplementary material and methods

Plasmid constructions

$\Delta menB$ (MG1363H2) and $\Delta menB \Delta hrtRBA$ (MG1363H4) mutants: The $\Delta menB$ mutant was constructed as follows: two DNA fragments of ~600 bp flanking the *menB* gene were PCR-amplified using *L. lactis* MG1363 genomic DNA as template and primer pairs (O1-O2) and (O3-O4) (Table S2). Both fragments were used as templates in a second round of PCR amplification with primers (O1-O4), resulting in an overlapping 1.2 kb fragment, which was digested by *EcoRI* and *XbaI* and cloned in the thermosensitive plasmid pG+host8 (Maguin *et al.*, 1996), giving rise to *pmenB* (Table S2). *pmenB* was established by transformation in *L. lactis* MG1363 WT and $\Delta hrtRBA$ strains (Holo and Nes, 1989). The double cross-over event leading to the $\Delta menB$ mutant and $\Delta menB \Delta hrtRBA$ double mutant was obtained as described (Maguin *et al.*, 1996). Correct inactivation was confirmed by PCR analyses using the primer pair (O5-O6), which hybridizes to genomic DNA outside the region of the double-crossover event.

pG1hrtB^{Y168L}hrtA, pG1hrtB^{Y231L}hrtA and pG1hrtB^{Y168L,Y231L}hrtA constructions: The *hrtBA* DNA sequence together with the P23 promoter was amplified from *phrtBA* genomic DNA using primers (O8-O9; including *XhoI* and *XbaI* restriction sites respectively) (Table S2) and cloned into the *E. coli* expression plasmid pG1 (gift from P. Trieu-Cuot, Pasteur Institute) giving rise to pG1hrtBA vector (Table S2). Mutants HrtB^{Y168L}, HrtB^{Y231L} were obtained by overlapping PCR mutagenesis as described (Lechardeur *et al.*, 2010) using primer pairs (O10-O11), (O12-O13) to introduce Y168L and/or Y231L point mutations in the HrtB sequence. The double mutant HrtB^{Y168L, Y231L} was obtained by introducing Y168L mutation into the HrtB^{Y231L} sequence. The products were cloned into pG1 vector using *EcoRI* and *XbaI* restriction sites (Table S1). All plasmids were verified by DNA sequencing.

Anti-HrtR antibody

Anti-HrtR was prepared in rabbits with purified His-tagged HrtR as antigen (Covalab, Villeurbanne France). Antibody specificity was determined using known amounts of purified protein and bacterial lysates expressing HrtR.

Immunofluorescence

Immunostaining was performed on bacteria grown overnight and immobilized on glass slides (Superfrost Ultra Plus, Thermo Scientific). Cells were then fixed with 3% paraformaldehyde for 10 min and treated with 1 mg.ml⁻¹ lysozyme for 20 min at room temperature prior to successive incubations with anti-HrtB-ECL (1/500) and anti-rabbit Alexa 488 antibodies (1/500) (Jackson). All incubations and washings were performed in PBS containing 1% BSA. Coverslips were mounted in SlowFade Gold antifade reagent (Invitrogen). Fluorescence was observed on an inverted Zeiss Actiovision microscope equipped with an X100 Plan-apochromat objective. Image acquisition was performed with the Zen program (Zeiss) keeping identical settings between slides and images exported to Photoshop.

Supplementary tables

Table S1. Strains and plasmids used in this study.

<i>Strain/plasmid</i>	<i>Characteristics</i>	<i>Source/ reference</i>
Strain		
<i>E. coli</i>		
TOP10	<i>F</i> <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) $\emptyset$ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK rpsL (Str^r) endA1</i>	Invitrogen
BL21 (DE3)	<i>lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514</i> Δ <i>araBA-D_{AH33}</i> Δ <i>rhaBAD_{LD78}</i>	Invitrogen
<i>L. lactis</i>		
MG1363	MG1363 WT, cured of ϕ T712, plasmid-free derivative of NCDO 712	(Gasson, 1983)
MG1363H1	MG1363, <i>cydA::ISS1</i>	(Duwat <i>et al.</i> , 2001)
MG1363H2	MG1363 Δ <i>menB</i> , deletion of the <i>menB</i> gene	This study
MG1363H3	MG1363 Δ <i>hrtRBA</i> , deletion of <i>hrtRBA</i> operon	(Pedersen <i>et al.</i> , 2008)
MG1363H4	MG1363 Δ <i>menB</i> Δ <i>hrtRBA</i> , deletion of the <i>menB</i> gene and <i>hrtRBA</i> operon	This study
Plasmid		
pGhost8	Temperature-sensitive vector, Tet ^R	(Maguin <i>et al.</i> , 1996)
pG1	Temperature-sensitive vector, Cm ^R	P.Trieu-Cuot
<i>phrtRBA</i>	<i>hrtRBA</i> operon cloned in pG+host8 Tet ^R	(Pedersen <i>et al.</i> , 2008)
pP _{hrt} <i>hrtR-lac</i>	DNA fragment containing the promoter region and <i>hrtR</i> cloned in pTCV- <i>lac</i> . Ery ^R	(Lechardeur <i>et al.</i> , 2012)
pET200	Cloning vector. Kan ^R	Invitrogen
<i>phis-HrtB-ECL</i>	Expression of N-terminal His-tagged AAs 41 to 237 of HrtB. Cloned into pET200.	This study
<i>phrtBA</i>	Expression of <i>hrtBA</i> with the constitutive promoter P ₂₃ , cloned into pGhost8.	(Lechardeur <i>et al.</i> , 2012)
pG1 <i>hrtBA</i>	Expression of <i>hrtBA</i> with the constitutive promoter P ₂₃ , cloned into pG1.	This study
pG1 <i>hrtB</i> ^{Y168L} A	Expression of <i>hrtB</i> ^{Y168L} A with the constitutive promoter P ₂₃ , cloned into pG1.	This study
pG1 <i>hrtB</i> ^{Y231L} A	Expression of <i>hrtB</i> ^{Y231L} A with the constitutive promoter P ₂₃ , cloned into pG1.	This study
pG1 <i>hrtB</i> ^{Y168L, Y231L} A	Expression of <i>hrtB</i> ^{Y168L Y231L} A with the constitutive promoter P ₂₃ , cloned into pG1.	This study
<i>pmenB</i>	<i>menB</i> fragment cloned into pG+host8 to obtain the Δ <i>menB</i> and Δ <i>menB</i> Δ <i>hrtRBA</i> mutants.	This study

Table S2.

Oligonucleotides used in this study.

<i>Primer</i>	<i>Sequence 5'-3'</i>	<i>Target</i>
O1	GATCGGATCCGATTCCCGTCGCTGGCTCGG	<i>menB</i>
O2	CCCTTCTTTGGCTTCATCGTTACGATTAAGGGCAAC CC	<i>menB</i>
O3	GGGTTGCCCTTAATCGTAACGATGAAGCCAAAGAA	<i>menB</i>
O4	GATCTCTAGACAGGTTTCAGCAGTTGTTGCC	<i>menB</i>
O5	GCCAAAGAGATTTTTGCGCC	<i>menB</i>
O6	CCGAAGTATTCATGATAACAGCG	<i>menB</i>
O7	CACCAGTCAATTTAAACAGTCGG	<i>phrtB-ECL</i>
O8	TAATAA <u>CTCGAGG</u> TCGACGGTATCGATAAG	pG1 <i>hrtBA</i>
O9	TAATAA <u>TCTAGA</u> ACTAGTGGATCCCCGGG	pG1 <i>hrtBA</i>
O10	AGCCCAACCGTTTTAACCTCTTTTTCTGCC	pG1 <i>hrtB</i> ^{Y168L} A
O11	GGCAGAAAAA GAGGTAAAA CGGTTGGG	pG1 <i>hrtB</i> ^{Y168L} A
O12	GACATTCCTGGATTATCTGCGCAAAATATG	pG1 <i>hrtB</i> ^{Y231L} A
O13	CATATTTTGC GCAGATAATC CAGGAATGTC	pG1 <i>hrtB</i> ^{Y231L} A

Underlined, restriction sites for cloning into plasmids

Supplementary Figures

Figure S1. Hemin is sequestered in *L. lactis* (MG1363) (A) Color phenotype of *L. lactis* exposed to increasing hemin concentrations. The WT strain was grown in static growth conditions to $OD_{600} = 0.5$ before addition of the indicated concentration of hemin for 1 h. Cells were pelleted by centrifugation, washed with PBS, and pellets were photographed. (B) Color phenotype due to hemin is reversed by oxygenation. WT strain was grown in static conditions to $OD_{600} = 0.5$ and incubated with 10 μ M hemin in static conditions for 1 h and the culture was aerated for the indicated time. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure S2. HrtR expression is increased in a $\Delta menB$ mutant strain and in aeration growth conditions. (A) HrtR expression levels in WT (MG1363) and $\Delta menB$ (MG1363H2) strains grown with 10 μ M hemin. Both strains were grown to $OD_{600} = 0.5$ before adding 10 μ M hemin for an additional 1 h incubation in static conditions. Whole cell lysates were analysed by Western blot (Supplementary Materials and Methods). (B) Comparison of HrtR expression levels in WT (MG1363) strain grown in static and aeration conditions. Immunoblots were performed on cells grown as in (A). Bacteria were grown in static or aerated conditions once hemin was added to the medium.

Figure S3. Comparison of hemin toxicity in WT (MG1363) and $\Delta menB$ (MG1363H2) *L. lactis* strains. Strains were grown to $OD_{600} = 0.5$ before adding the indicated concentration of hemin in the cultures for an additional 1 h incubation in static conditions. OD_{600} were normalized and 5 μ l of serial 10-fold dilutions were then plated on M17 + 1% glucose agar. Plates were photographed after 24 h incubation.

Figure S4. Intracellular heme homeostasis in $\Delta menB \Delta hrtRBA$ (MG1363H4) (pControl) and $\Delta menB \Delta hrtRBA$ (*phrtBA*) *L. lactis* strains. The strains carrying the pGhost empty control vector (pControl) or $P_{hrt}hrtR-lac$ were grown to $OD_{600} = 0.5$. β -gal activity was induced for 1 h in the presence of the indicated hemin concentrations and quantified by luminescence (Materials and Methods). Results represent the mean $\pm$ standard deviation from triplicate samples and are representative of 3 independent experiments.

Figure S5. HrtBA heme efflux is inhibited by orthovanadate. ATPase inhibition by orthovanadate is illustrated with HrtBA inhibition (as a control for Fig. 5). The $\Delta hrtRBA(phrtBA)$ strain carrying $P_{hrt}hrtR-lac$ was grown to $OD_{600} = 0.5$. Cultures were

preincubated for 0.5 h with 2 mM orthovanadate followed by addition of 1 μ M hemin for 1 h, and luminescence was determined (Materials and Methods). Results represent the mean $\pm$ standard deviation from triplicate samples and are representative of 3 independent experiments.

Figure S6. Amino acid sequence alignment of HrtB of *L. lactis* strains, MG1363, IL1403, *Streptococcus haemolyticus* (JCS1435), *Enterococcus faecalis* (V583), *Listeria monocytogenes* (EGD-e), *Streptococcus agalactiae* (NEM316), *Staphylococcus aureus* (Newman and MRSA252), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC1530) and *Staphylococcus epidermidis* (ATCC12228). The two tyrosines (Y) implicated in heme efflux are in red. Identical amino acids “*”; conserved amino acids “:”; partially conserved amino acids “.”.

Figure S7. Cell surface exposure of the [41-237] domain of HrtB. Immunofluorescence of strains expressing WT HrtAB, or HrtA together HrtB^{Y168L, Y231L} mutant. The Δ *hrtRBA* (MG1363H3) strain transformed with either pG1 (control), pG1*hrtBA* or pG1*hrtBA*^{Y168L, Y231L} were incubated with anti-HrtB-ECL antibody (see Materials and Methods). HrtB was detected by an anti-rabbit antibody conjugated with Alexa-488. Bar, 10 μ m.

Supplementary references

- Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir, Y., Violet, F., Loubiere, P. and Gruss, A. (2001) Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J Bacteriol* **183**: 4509-4516.
- Gasson, M. (1983) Plasmids complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast induced curing. *J Bacteriol* **154**: 1-9.
- Holo, H. and Nes, I. (1989) High-Frequency Transformation, by Electroporation, of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris Grown with Glycine in Osmotically Stabilized Media. *Appl Environ Microbiol* **155**: 3119-3123.
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Liebl, U., Vos, M.H., Fernandez, A., Brun, C., Gruss, A. and Gaudu, P. (2012) Discovery of an intracellular heme-binding protein, HrtR, that controls heme-efflux by the conserved HrtB HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* **287**: 4752-4758.

- Lechardeur, D., Fernandez, A., Robert, B., Gaudu, P., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G. and Gruss, A. (2010) The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase c binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae*. *J Biol Chem* **285**: 16032-16041.
- Maguin, E., Prévost, H., Ehrlich, S. and Gruss, A. (1996) Efficient insertional mutagenesis in lactococci and ther Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **178**: 931-935.
- Pedersen, M., Garrigues, C., Tophile, K., brun, C., Vido, K., Bennedsen, M., Møllgaard, H., Gaudu, P. and Gruss, A. (2008) Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: identification of a heme-responsive operon. *J Bacteriol* **190**: 4903-4911.

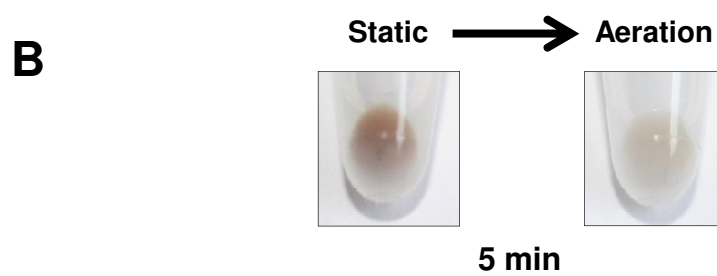


Figure S1

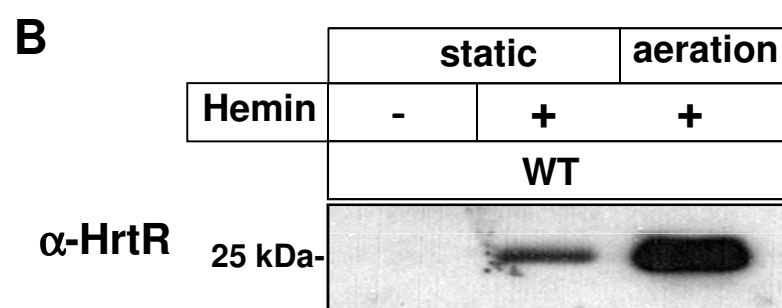
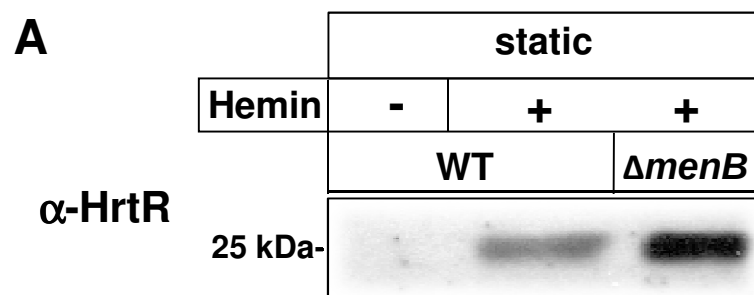


Figure S2

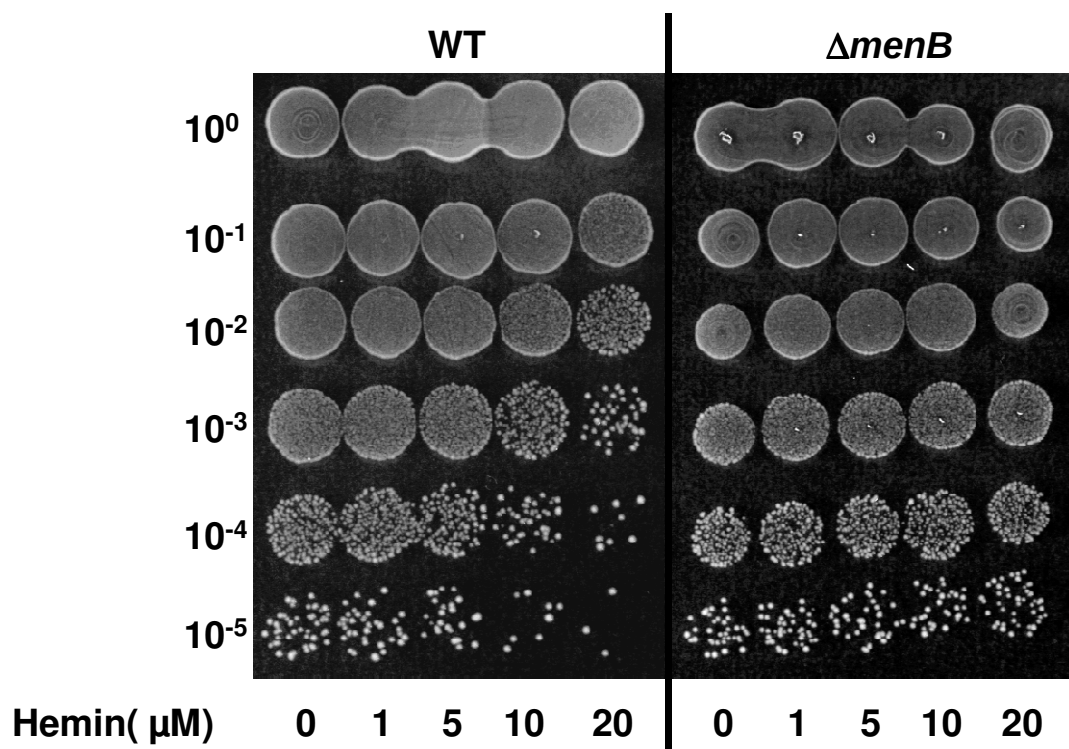


Figure S3

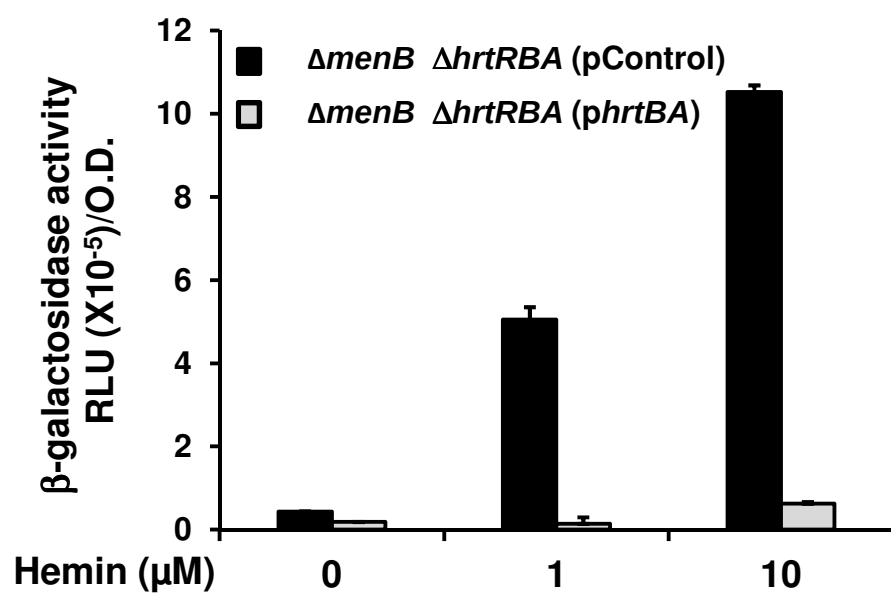


Figure S4

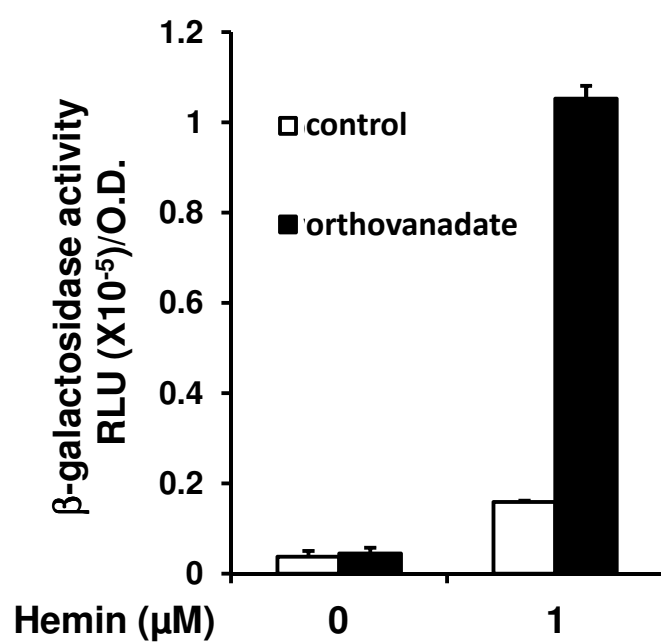


Figure S5

L. lactis MG1363 MFLALREIRYNKARYTLIGAIIFLIAYVVFILSGLSVGLASQFKQSVIDWNAEKIILSTS 60
L. lactis IL1403 MFLALREIRYNKARYTLIGAIIFLIAYVVFILSGLSVGLASQFKQAVLDWKAQVVLSTS 60
S. haemolyticus MFLAWNEIKRNKLFGLIGLVLISYLLFLLSGLASGLINMTEGKIKWKADAIVLNKD 60
E. faecalis V583 MFLGFNEMKYSKGRYVVLVLMVLIAWLIFILSGLANGLAQGNRLAVDQWQANQVVSKE 60
L. monocytogenes EGD-e MFLGLRELVPYSKLRYILVTGIMVLMMLSLILSGLANGLAYDNASSVADNGVPYYVLSKD 60
S. agalactiae NEM316 MSHAWKELTFYKKKYLIELLIIVMMFMVFLSGLANGLGRAVSAAIENNPATYILNEG 60
S. aureus Newman MKLAIKEIMFYKFRYILITLIIILLSIMVLFISGLAQGLGRENISLFEHFDNDEYVQKM 60
S. aureus MRSA252 MKLAIKEIMFYKFRYILITLIIILLSIMVLFISGLAQGLGRENISLFEHFDNDEYVQKM 60
S. saprophyticus MKLAWQEIKYYKFRYILIMLIIILLGIMVLFISGLAQGLARENISMLDNMKSEKYVLQDN 60
S. epidermis MNLAWKEIKFYKFRFILMFIIFLMAIMVLFISGLAQGLARENISIFDQIKGNQFVVQKM 60
* . .*: * ::*: ::::: : .:***: ** . . :.:

L. lactis MG1363 SNNIISASQISS---SDLEKIK--VENGESELSLSTSMRKTNSERSNITVMALPDSNSIM 115
L. lactis IL1403 SNNIISASQITS---DDLSNIH--IENGSELSLSTSMRKSSESRDNIAIIALPDKSKIM 115
S. haemolyticus ANQTVQQSVFKS---SDVEGKF--KEEAPLKQIGVIASNGESEE--NALLFGVTSNFI 113
E. faecalis V583 ANSNLNVSVLDENVKETISGGK--IAPIGQQSLAIRPADDKKAELTNVSLFGIEKESFLM 118
L. monocytogenes EGD-e SDNRLTRSNLTASETDSVAKQVKKSESTNLGVQMGTITPPNKDKKTIDITYFGDKTGFMK 120
S. agalactiae NEM316 AEQVITSSVLTTKDQTDLNSLN-LKDSTTLNIQRSSLTRQGEKKIDISYFAIDKDSFMA 119
S. aureus Newman KEPQIEKSQSLSDTQQNQIKKVIH-----QEPYKMNIQTLKLSNKEQDVITMNDVKQQR 113
S. aureus MRSA252 KEPQIEKSQSLSDTQQNQIKKVIH-----QESYKMNIQTLKLSNKEQDVITMNDVKQQR 113
S. saprophyticus KQPQIEKSIIKPEQQNKIEDITG-----QEPLKMAPQTLKIDKNEEDVLINTYVKNK 113
S. epidermis KEPQLEKSILSRSKQDNISKIID-----EKPFKMAGKTFKINGEENVMAINSVMKNHQ 113
: : * : :. . :.:

L. lactis MG1363 PKVLDGKKFADNSL-DIVISKLANQGYKIGQEVSIGNNNIKLKIVGISKTSYASPTV 174
L. lactis IL1403 PEVLEGKKFTDNHL-EMIISKLANQGYKIGQEVSVGNNNIKIKIVGISKSSSYASSPVI 174
S. haemolyticus PKIEEGKKFNKDN--DVVIDQSLKDKGFKVGDTITLSQSDKHLHIVGVSESAKYNASPVI 171
E. faecalis V583 PKVIEGNAFTDKN--QVIASETLKNQGFKIGDKLTAGKYDEQLEIVGFISKSSYNIVPVI 176
L. monocytogenes EGD-e PKISDGANIQVTKPDEIVVDSLSKSDGKIGDVLMDLILNRELTVVGFTENQKYSHAPVV 180
S. agalactiae NEM316 PTLSEGKQLTSYKK-AIILNDSLKAEGIKLGDVIDKSSSISLTVGVFVHNSMYGHGPVA 178
S. aureus Newman IQLKKGDYPKNAHE--VAINDKLAADNIRVGDRLHFKNNSTSYRVSGILNDTMYAHSISV 171
S. aureus MRSA252 IQLKKGDYPKNAHE--VAINDKLAADNIRVGDRLHFKNNSTSYRVSGILNDTMYAHSISV 171
S. saprophyticus PELKAGHYPTKDNE--VAINNKLADGINVGDRIKIKLD-GKALKVSGVLNDTMYSHSSVV 170
S. epidermis PNLKSGHYPKNGNQ--IAINEKLTAEGLYLDDKVKVKGGDDTTYKVVGILKNTMYSHSNIV 171
: * : :..* . . :.: : . :*. *

L. lactis MG1363 YTSFSALNQIKYKGNKSTPFSVNALVVKSGKIDI-NSAISNQYKVISIPELINDIPGYSA 233
L. lactis IL1403 YTSFSALNQIKFGEKSTSTSSVNAVVKSGVKIK-DSSISNQYKVLISIDLINDIPGYSA 233
S. haemolyticus FANDKTIEKIN---PALSSDKTNNAVVKDSNWK-DKNVDKDLLEVIGIDDFVENLPGYKP 226
E. faecalis V583 YTSLDTWRSIKYGDNPAMAKMVNGFIVRSKDNT-VKTTNKDSQVLSISDFIEKLPGYSA 235
L. monocytogenes EGD-e YINIAATWQEIINPVLYHQIPQTSTIAIKTENPDKGVTLTDKDLTTIDHKEFLNQIPGYSA 240
S. agalactiae NEM316 FIDKDIYTEINKKINPQYQLPQALVMKNDKSSIS--HLPTQLEAVSKKDVIQHIPGYSA 235
S. aureus Newman LLNDNGFNALNKVNTAFYPVKNLTTQQRDELNKI-----NDVQVVSEKDLTGNIASVQA 225
S. aureus MRSA252 LLNDNGFNALNKVNTAFYPVKNLTTQQRDELNKI-----NDVQVVNEKDLTDNIASVQA 225
S. saprophyticus MMSDNGFNTLNKQASTIYPVKDLKSEQEKVNDI-----SGVKVFTENDITSEIPSVQA 224
S. epidermis MMDQSKIEQSSNVAT-FYVTNQLSKSDKNKINHI-----KGVTATTDDITSNIASVKA 224
. . . :.: :..*..

L. lactis MG1363 QNMTLSAMIYFLFLIVLLIIGVFMVITLQKVPIFGIMKAQGISNATIMNSLLGQTFILS 293
L. lactis IL1403 QNMTLSAMIYFLFLIVLLIIGVFMVITLQKVPIFGIMKAQGISNRIIMNSLLGQSFIIIS 293
S. haemolyticus QNLTMNFMITFLFVISATVIGVFLYVITLQKKNLFGVLKAQGFTNGFLMKMVLQAFTILA 286
E. faecalis V583 QNLTLDMIYFLIVIAAFIIGIFIVMTLQKTAMFGVLKVQGVPTSFLAKAVMLQTALLA 295
L. monocytogenes EGD-e EQMTLNMMIIFLLIIGGFILTAFFVMTLQKTTQFGILKALGTKTSYLKSIITQVVIIS 300
S. agalactiae NEM316 EQSTLNMILWLVLVASAGILGVFFYIITLQKRHEFSVMKAIGTKMSEIALFQLSQVILA 295
S. aureus Newman EQAPLNMIMIVSLFAITAIVLSAFFYVMTIQKISQIGILKAIGIKTRHLLSALVLQILTTLT 285
S. aureus MRSA252 EQAPLNMIMIVSLFAITAIVLSAFFYVMTIQKISQIGILKAIGIKTRHLLSALVLQILTTLT 285
S. saprophyticus EQAPLNMIMIVSLFVISAIVLSAFFYVMTIQKIPKIEIGILKAIGMKTTHLLSALIIQILITT 284
S. epidermis EQTPLDMMIISLYIITAIVLSAFFYVMTIQKTSEIGILKAIGITTKHLLTSLILQISMIT 284
: : .: : * : : *::*:** :.:*. * : : * :

L. lactis MG1363 LVGVFVAFIASYGTSTFILPDAMPFEISLTNWLALYALILIVSIIIGLSFIITIRKIDPTK 353
L. lactis IL1403 LVGVFVAFIASYGTSTFILPDAMPFEISLTNWLALYALILIVSIIIGLSFIITIRKIDPTK 353
S. haemolyticus VLGVAIGLALTGYITVLFLEAMPYATNGRPMILFSVLLILSALIGGAFSIRTIKADPLI 355
E. faecalis V583 IISILISVGVTLILPSIMPAAMPFRLSPMTIALYSGLFFLVALFGALLSLRRIAKVDALD 360
L. monocytogenes EGD-e LFGIIVGDGLAIALSYVLPAQMPFVINWQNIILVSFVFLVIAMISSALSIVKAKIDPVE 355
S. agalactiae NEM316 IIGVGIAVIIIVGLSFMPVTPMPFYLTQNIILLMVGIFILVAILGASLSFIKLFKVDPIE 345
S. aureus Newman IIGVGIAVIIIVGLSFMPVTPMPFYLTQNIILLMVGIFILVAILGASLSFIKLFKVDPIE 345
S. aureus MRSA252 EQAPLNMIMIVSLFAITAIVLSAFFYVMTIQKISQIGILKAIGIKTRHLLSALVLQILTTLT 285
S. saprophyticus MIGVIISVAIITGLSFLMPVSMPPFHVTTNLLLVGVFIIIVAIIGAILSFIKLFKVDPIE 344
S. epidermis FIGVAIAEVVIFLISQILPVSMPPFHIDMHNIIIVLVFMIVGLIGTSLFSFIKLIKIDPIE 344
... :. :.* :* : :.: :.. :*. :*:.

L. lactis MG1363 AIGG--- 357
L. lactis IL1403 AIGG--- 357
E. faecalis V583 AIGG--- 359
L. monocytogenes EGD-e AIRGGDE 367
S. agalactiae NEM316 VINGGGE 362
S. aureus Newman AIGGAE- 351
S. aureus MRSA252 AIGGAE- 351
S. saprophyticus AIGGGE- 350
S. epidermis AIGGGQ- 350
.*

Figure S6

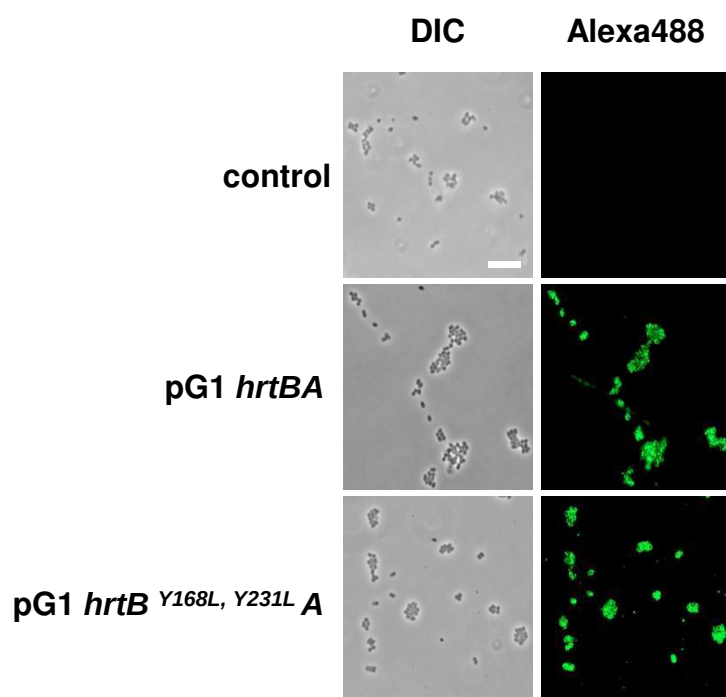


Figure S7

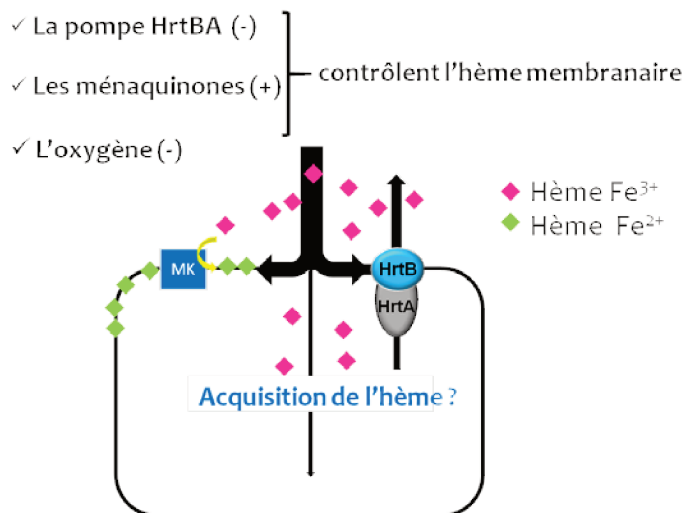


Figure 32. L'homéostasie de l'hème chez *L. lactis*. La régulation du transport et de l'efflux de l'hème dépend de l'oxygène, de l'expression de HrtBA et de l'activité des ménaquinones

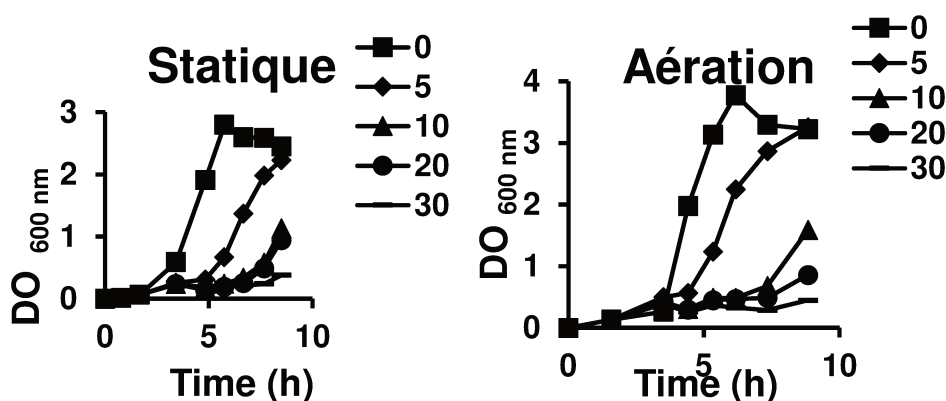


Figure 33. Impact de la toxicité de l'hème sur la croissance. Les précultures de nuit sont diluées à DO_{600 nm} = 0.05. Ces cultures sont supplémentées avec différentes concentrations d'hème (1 à 30 μM) et incubées durant le temps indiqué en conditions microaérées (à gauche, statique) ou en condition d'aération (à droite, aération).

	Statique		Aération	
Hème (μM)	0	10	0	10

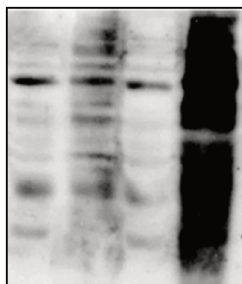


Figure 34. Impact de l'hème sur le stress oxydatif chez *L. lactis*. La souche WT est cultivée jusqu'à une DO_{600 nm} = 0,4 puis 10 μM d'hème sont ajoutés dans le milieu. Les bactéries sont ensuite incubées durant 8 h en condition de culture statique ou d'aération. Les bactéries sont ensuite lysées et 10 μg de protéines séparées par SDS-PAGE. Après transfert du gel sur membrane de nitrocellulose, la 4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) est ajoutée et se fixe sur les fonctions carbonyles générés par le stress oxydant. Un Western blot avec un anticorp anti-DNPH permet de révéler le stress oxydant.

A.4 Principales conclusions

Les principaux résultats de ce travail sont regroupés dans le schéma de la **Figure 31**.

✓ **Les ménaquinones en réduisant le fer de l'hème exogène provoquent son accumulation dans la membrane de *L. lactis*.**

Nous avons montré que l'hème s'accumule dans les membranes une fois réduit par les ménaquinones. En aération, l'environnement oxydant s'oppose à l'activité réductrice des ménaquinones envers l'hème, ce qui empêche leur accumulation membranaire.

✓ **HrtBA permet de contrôler l'accumulation d'hème dans les membranes.**

L'expression de HrtBA provoque la diminution de l'hème intracellulaire mais aussi membranaire. Nous avons par ailleurs montré que certains acides aminés situés sur la partie extracellulaire de la perméase HrtB sont indispensables à son activité d'efflux de l'hème.

✓ **La quantité d'hème retenue dans les membranes impacte sa biodisponibilité membranaire.**

En me basant sur l'expression du senseur d'hème intracellulaire d'hème HrtR pour mesurer l'hème intracellulaire (Lechardeur *et al.*, 2012) et de mesures de la concentration d'hème dans des membranes isolées, j'ai pu montrer que la rétention de l'hème dans la membrane entraînait une diminution du contenu intracellulaire d'hème.

✓ **L'accumulation de grandes quantités d'hème dans la membrane entraîne une toxicité indépendante des phénomènes oxydatifs induits par le fer.**

Dans les conditions où l'hème s'accumule dans les membranes sans générer de stress oxydatif important (anaérobie ou microaérobie), j'observe néanmoins que l'hème est toxique car son accumulation engendre une perméabilisation des membranes.

En conclusion, dans les conditions expérimentales utilisées dans ce travail, l'homéostasie de l'hème chez *L. lactis* dépend de trois paramètres, l'oxygène, l'expression de HrtBA et l'activité des ménaquinones (Figure 32).

A.5 Résultats annexes : Accumulation d'hème membranaire et toxicité

L'interdépendance de l'activité de HrtBA impliqué dans le contrôle de la toxicité de l'hème (Torres *et al.*, 2007; Stauff and Skaar, 2009b; Lechardeur *et al.*, 2012) et de la

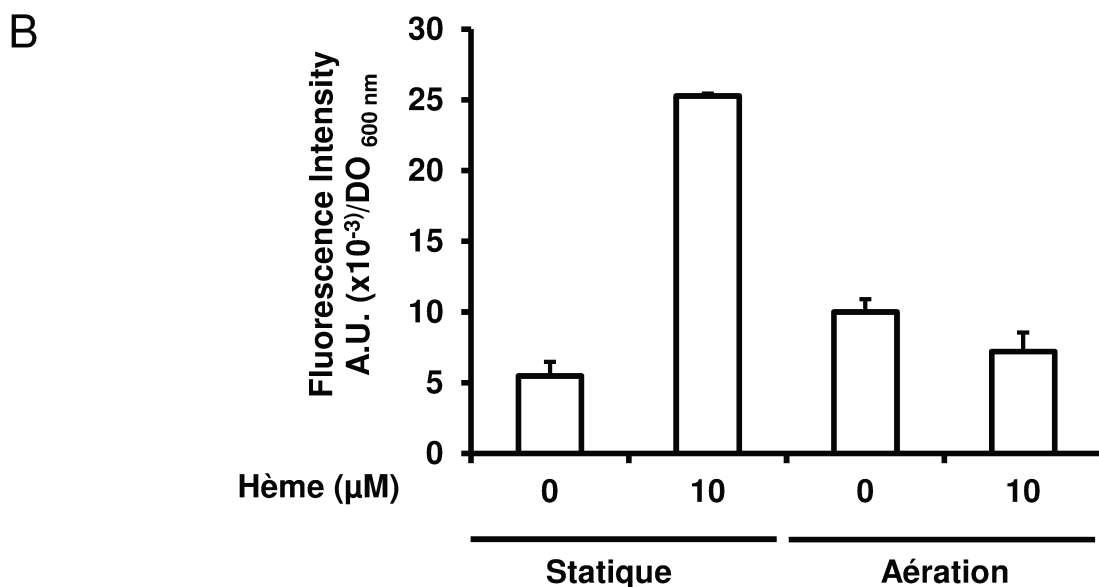
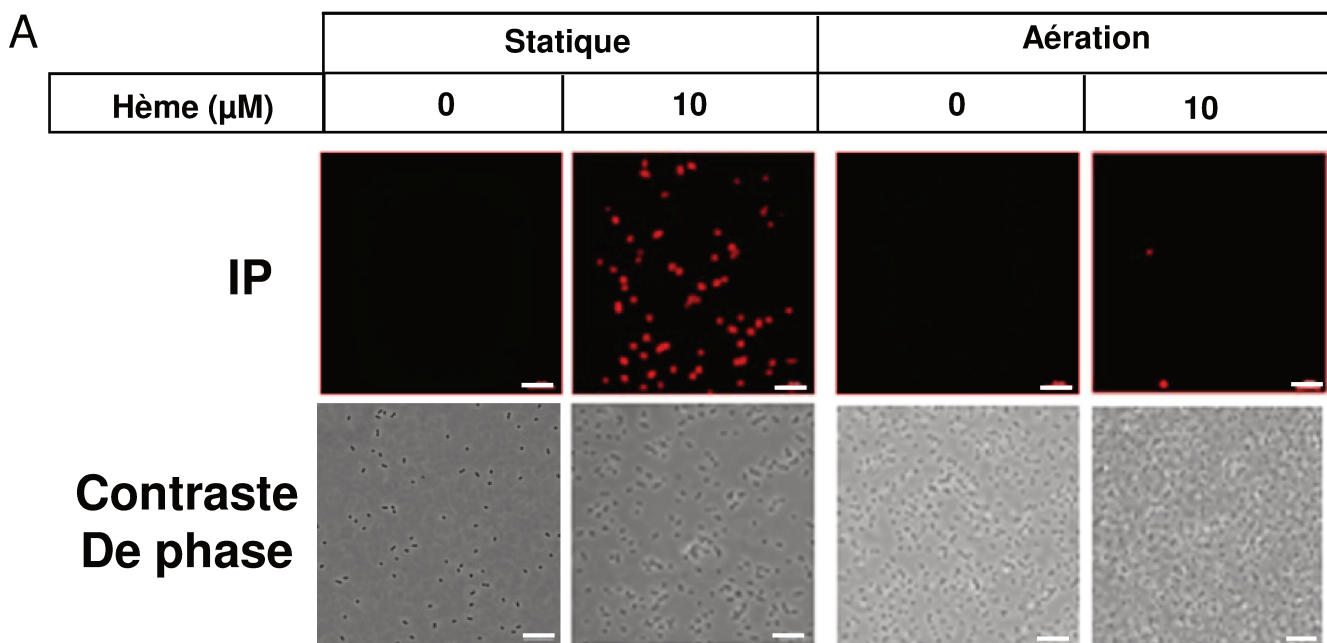


Figure 35. L'hème impacte sur la perméabilisation des membranes. *L. lactis* (WT) est cultivée jusqu'à une $\text{DO}_{600 \text{ nm}} = 0.4$ puis est incubée avec $10 \mu\text{M}$ d'hème pendant 1,5 h en condition de culture statique ou d'aération. La perméabilité des cellules est testée par ajout de $10 \mu\text{M}$ d'iodure de propidium (IP). (A) les cellules sont étalées sur lamelles de poly-lysine, fixées avec du paraformaldehyde à 3% et observées avec un microscope (Zeiss Actovision) à fluorescence avec un objectif X100. En haut, les images de la fluorescence de l'IP, en bas, une photographie (contraste de phase) du même champ est présentée. La barre indique une longueur de $10 \mu\text{m}$, (B) la fluorescence des mêmes cultures traitées avec de l'IP est quantifiée dans un lecteur de microplaque « TECAN Infinite M200 » (Excitation: 535 nm; Emission: 617 nm).

rétenion membranaire de l'hème pose la question de la toxicité de l'hème qui est retenu dans la membrane dans des conditions de faible oxygénation. Dans ces conditions (anaérobie ou micro-aérobie), le stress oxydant généré par la réaction de Fenton (**Partie 1 § A.1.4**) entre le fer et l'oxygène devrait être limité. Cependant, lorsqu'on incube des cultures de *L. Lactis* avec des quantités croissantes d'hème, la toxicité est similaire que les cultures soient aérées ou microaérées (conditions de culture statique) (**Figure 33**).

Pour confirmer l'origine de cette toxicité, j'ai mis en évidence le stress oxydant en présence d'hème par la technique de l'oxyblot qui permet de révéler par Western blot les protéines porteuses de fonctions carbonyles (=O) résultant de l'oxydation de certains acides aminés tels que la proline, l'arginine, la lysine ou la thréonine (Dalle-Donne *et al.*, 2003). La quantité de protéines carbonylées issues de *L. lactis* cultivées en présence d'hème en conditions d'aération est beaucoup plus importante qu'en conditions de culture statique (**Figure 34**) ce qui suggère qu'il n'y a pas de corrélation entre la quantité d'hème présent dans les membranes et sa toxicité (**Figures 30 et 34**). L'hème en condition d'aération génère beaucoup de stress oxydatif bien que son accumulation dans les membranes soit faible (**Figure 30**). Ainsi, si le stress oxydant généré par l'hème explique à lui seul sa toxicité bactérienne, l'hème devrait être faiblement toxique en conditions de faible oxygénation, malgré sa grande concentration. Ces résultats suggèrent donc qu'il existe une toxicité de l'hème indépendante du stress oxydant qu'elle génère. Nous avons fait l'hypothèse que la forte accumulation d'hème observée pouvait provoquer une déstabilisation de la membrane.

J'ai donc testé l'intégrité de la membrane de *L. lactis* dans les différentes conditions de culture avec de l'iodure de propidium (IP), une molécule qui ne traverse pas les membranes des cellules vivantes et qui est fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN. Sur la **Figure 35** une fluorescence accrue en condition de culture statique en présence d'hème est observée en comparaison des conditions de culture aérée (**Figure 35**).

Ces résultats suggèrent que l'hème est toxique pour *L. lactis* soit parce qu'il s'accumule en grande quantités provoquant une déstabilisation de la membrane soit parce qu'il génère un stress oxydant en réagissant avec l'oxygène O₂. L'ensemble de ces résultats sont discutés dans la partie 3.

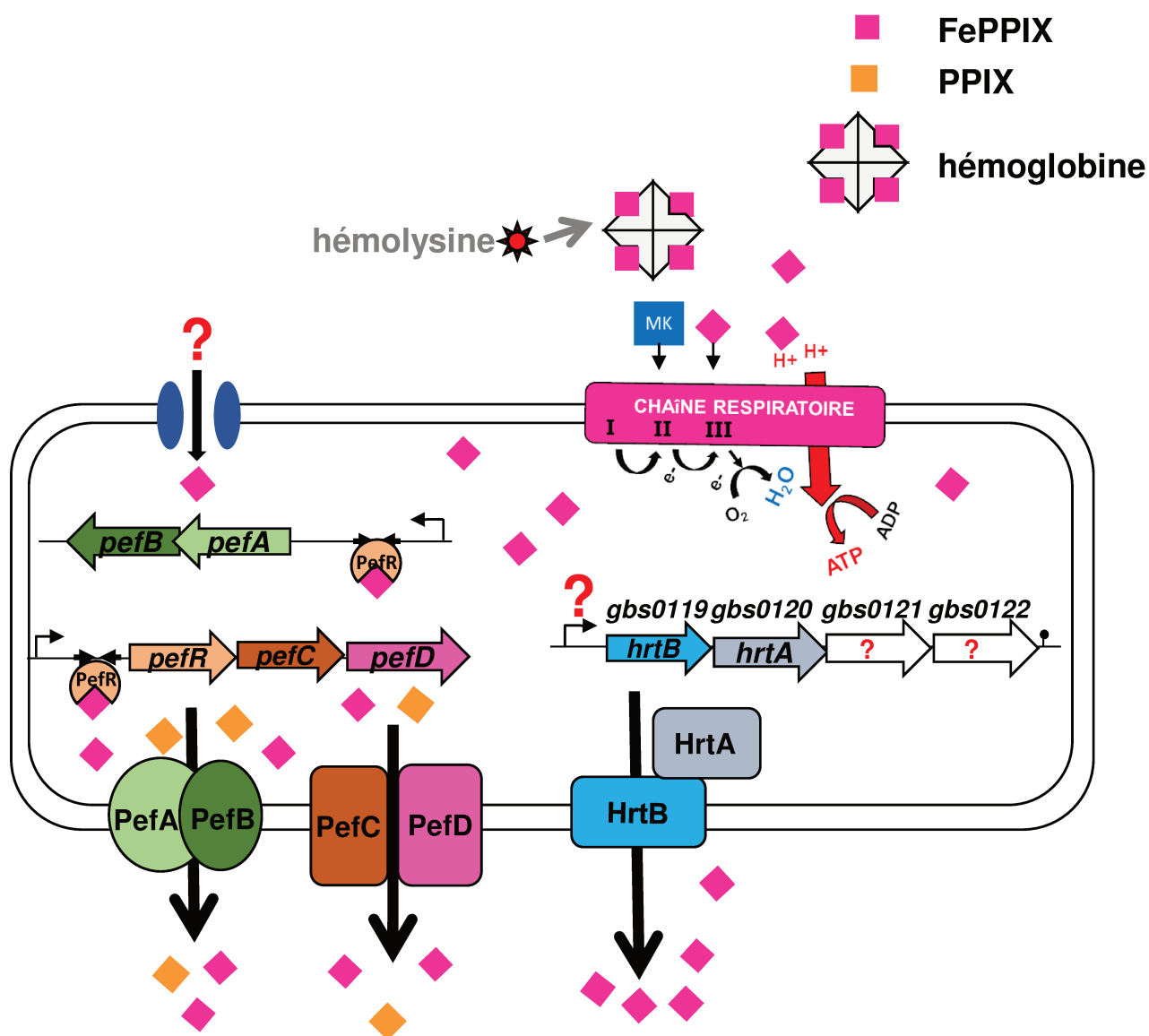


Figure 36. Utilisation et homéostasie de l'hème chez *Streptococcus agalactiae*. Voir Partie 2 § B.1.

B Impact de l'hème de l'hôte lors de la virulence de *S. agalactiae*

B.1 *S. agalactiae* et l'hème

S. agalactiae (**Figure 36**) est auxotrophe pour l'hème et pour les ménaquinones qui peuvent activer une chaîne respiratoire (Yamamoto *et al.*, 2005). Aucun mécanisme de capture ou d'internalisation n'a été identifié pour cette bactérie. Deux système d'efflux (Pef) ont été mis en évidence en plus de la pompe à efflux de l'hème HrtBA (Fernandez *et al.*, 2010) dont j'ai mis en évidence la régulation.

B.2 Contexte

Les bénéfices et la toxicité de l'hème sont principalement décrits *in vitro*, mais le rôle et l'impact de l'hème de l'hôte *in vivo* sur la capacité de colonisation de bactéries pathogènes sont inconnus.

- Une étude menée chez la bactérie à GRAM positif *S. aureus* montre que l'inhibition de la chaîne respiratoire (par délétion de la sous-unité B de la cytochrome *bd* oxydase) diminue considérablement la virulence de cette bactérie (colonisation des organes diminuée de l'ordre de 2 log pour le mutant comparé à la souche sauvage) (Hammer *et al.*, 2013).

- A l'inverse l'inhibition de HrtBA chez *S. aureus* ($\Delta hrtA$) entraîne *in vitro* une augmentation de la sécrétion de facteurs de virulence par le mutant comparé à la souche sauvage ce qui laisse supposer qu'il existe un lien entre l'hème de l'hôte et virulence de *S. aureus* (Torres *et al.*, 2007).

- *In vivo*, la souche $\Delta hrtA$ est aussi plus infectieuse comme le montre la formation d'abcès dans le foie et l'augmentation du nombre de bactéries dans cet organe de l'ordre de 2 à 3 log comparé à la souche sauvage dans un modèle de virulence (Torres *et al.*, 2007).

- De nombreux mécanismes de capture de l'hème par les bactéries ont été décrits dans la littérature. Cependant, leur impact *in vivo* sur la virulence n'a pas été élucidé. De nombreux mécanismes existent chez l'hôte qui empêchent que de l'hème libre soit présent dans le sang et les organes (**Partie 1 § A.2**). La question reste donc posée de la capacité pour les bactéries à récupérer de l'hème chez leur hôte.

S. agalactiae étant auxotrophe pour l'hème mais utilisant cette molécule pour la respiration, c'est un modèle de choix pour étudier l'impact de l'hème de l'hôte sur la virulence de cette bactérie.

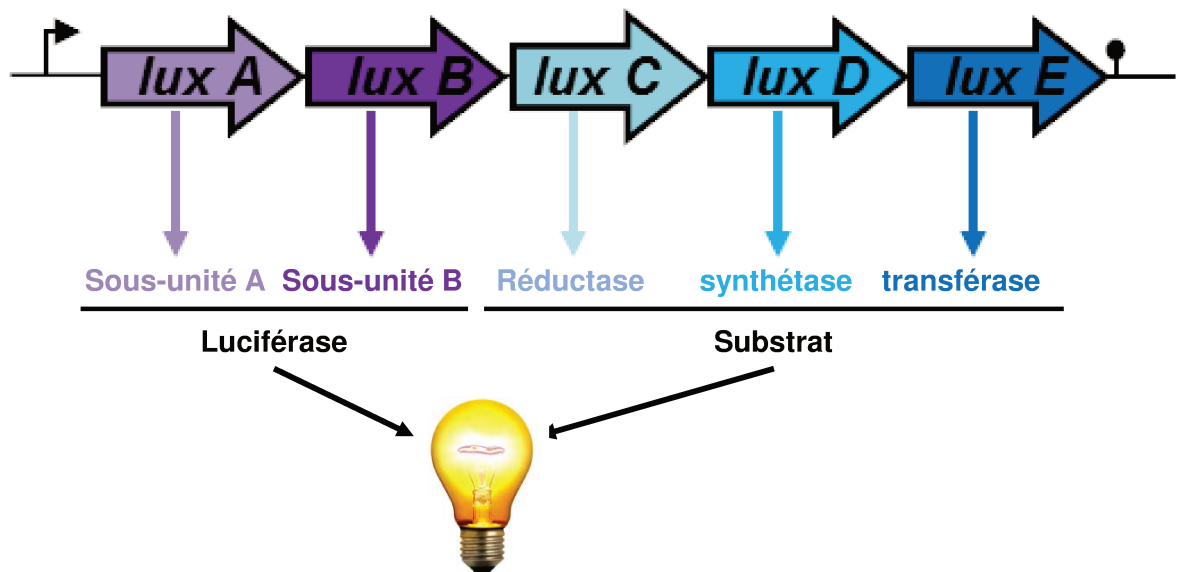


Figure 37. Organisation de l'opéron *luxABCDE* de *Photobacterium luminescens*. Les gènes *luxA* et *luxB* codent pour les deux sous-unités de la luciférase tandis que les gènes *luxC*, *luxD* et *luxE* codent respectivement pour une réductase, une synthétase et une transférase qui permet la synthèse du substrat de la luciférase.

B.3 Stratégie expérimentale

Mes objectifs étaient de mettre en évidence l'impact de l'hôte de l'hôte sur les capacités de colonisation et d'infection de *S. agalactiae*. Pour cela, nous avons choisi de mettre en place les éléments d'une stratégie expérimentale utilisant la luminescence qui permettait de suivre en temps réel et *in vivo* la dissémination de *S. agalactiae* ainsi que leur capacité à acquérir cette molécule dans un modèle murin.

B.3.1 La luminescence pour suivre les bactéries dans leur hôte

B.3.1.1 L'opéron *luxABCDE* de *Photobacterium luminescens*

Certains organismes aussi bien procaryotes qu'eucaryotes sont capables d'émettre de la luminescence. En expérimentation, les luciférase d'origine eucaryote sont toujours exprimées seules et nécessitent l'ajout d'un substrat (appelé luciférine) pour induire l'émission de luminescence (Hutchens and Luker, 2007). En revanche, deux luciférase bactériennes, provenant des organismes *Vibrio fischeri* et *Photobacterium luminescens* ont l'avantage d'exprimer dans un même opéron tous les gènes nécessaire à la réaction permettant l'émission de luminescence (Meighen, 1991). L'émission de luminescence est permise par ces deux bactéries à GRAM négatif grâce à la riboflavine qui est le cofacteur nécessaire à la réaction d'oxydation du substrat. Cette molécule est synthétisée par tous les procaryotes. L'utilisation de ce type de luminescence permet une observation directe des bactéries dans leur hôte. De plus, une étude menée pour comparer lequel de ces deux systèmes était le plus performant a montré que le niveau de luminescence est identique mais que la réponse induite par le système de *P. luminescens* est plus stable (Tchell *et al.*, 2005). Nous avons donc fait le choix de prendre ce système dans notre projet.

● Organisation génétique et Fonction des protéines codées par l'opéron *lux*

L'opéron *lux* de *P. luminescens* est composé de 5 gènes : *luxA* et *luxB* codent pour les sous unités A et B de la luciférase, les gènes *luxC*, *luxD* et *luxE* codent respectivement pour les enzymes : réductase, synthétase et transférase qui permettent la synthèse du substrat (**Figure 37**). L'organisation naturelle de l'opéron *lux* chez *Photobacterium luminescens* est *luxCDABE*. Cet opéron a été réorganisé en *luxABCDE* et un nouveau site de fixation du ribosome (RBS) a été ajouté sur un plasmide en amont de l'opéron de manière à être reconnu par les bactéries à GRAM positif (Francis *et al.*, 2000). Cette réorganisation permet une augmentation de l'efficacité de transcription de l'opéron *lux* et donc une augmentation de

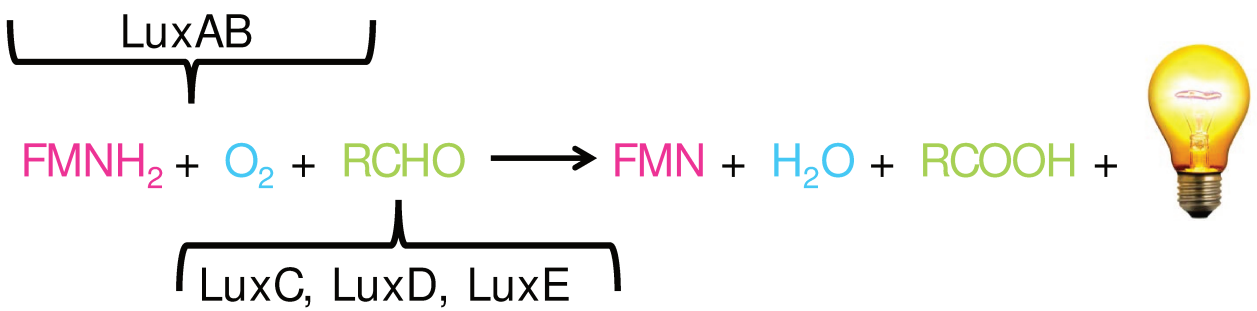


Figure 38. Réaction d'oxydation catalysée par l'opéron *lux* à l'origine de l'émission de lumière. La riboflavine (FMNH₂) synthétisée par les bactéries est réduite en riboflavine-5'-phosphate (FMN). En parallèle l'aldéhyde à longue chaîne carbonée (RCHO) synthétisée par LuxC, LuxD et LuxE s'oxyde en RCOOH. Ces deux réactions nécessitent de l'oxygène (O₂). Cette réaction génère l'émission d'un photon responsable de l'émission de la lumière.

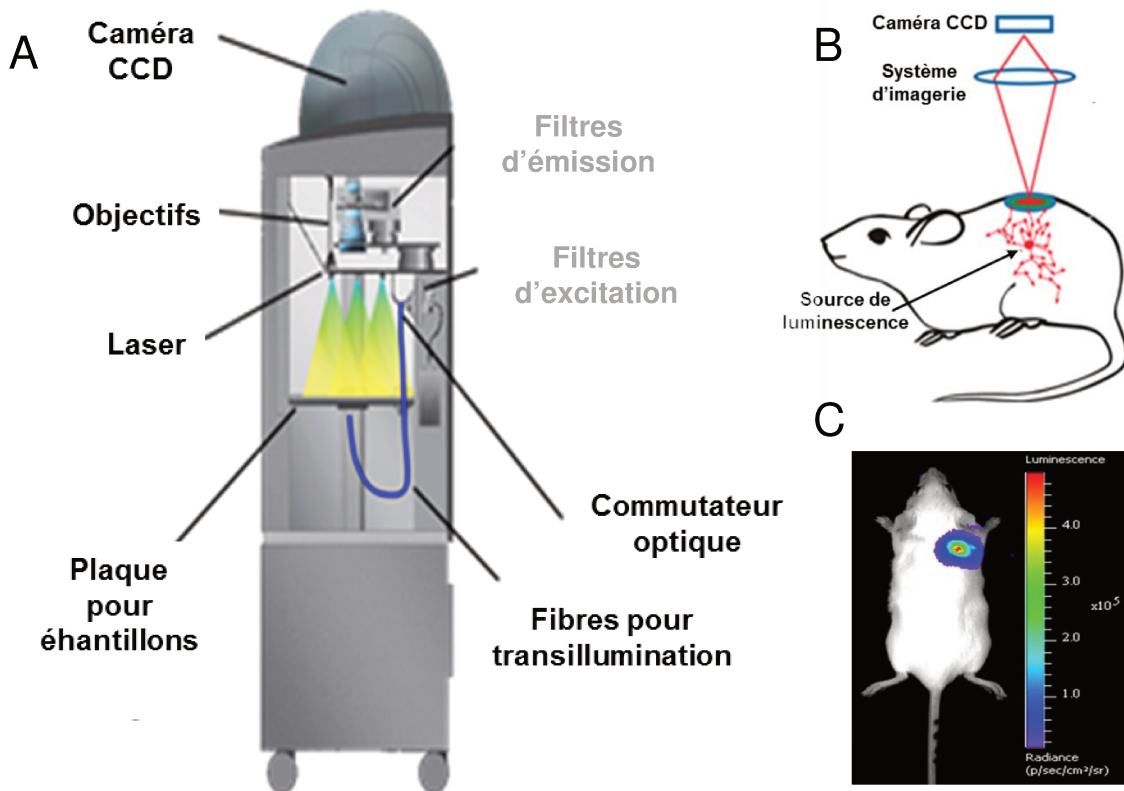


Figure 39. Principe de la détection de la luminescence par le système IVIS. (A) IVIS est équipé d'une camera CCD; d'objectifs pour la prise des photographies; d'un laser pour projeter sur la plaque pour échantillons la surface visualisée (paramètres ajustables suivant le grossissement désiré); le commutateur optique permet l'interface avec l'ordinateur ; les fibres pour la transillumination permettent une visualisation en 3 dimensions de l'animal. Les filtres d'émission et d'excitation sont adaptés à la fluorescence. (B) La source de luminescence peut être détectée dans les tissus profonds par le système d'imagerie. (C) Le signal est artificiellement retranscrit à la surface de la photographie de l'animal et quantifié par une échelle de couleur.

l'émission de la luminescence de l'ordre de 1000 fois chez les bactéries à GRAM positif. (Francis *et al.*, 2000).

● **L'émission de lumière par les bactéries transformées par l'opéron *lux***

Contrairement à la luminescence d'origine eucaryote, la luminescence bactérienne de *Photorhabdus luminescens* n'est pas dépendante de l'ATP. En revanche, la riboflavine (FMNH₂) produite par les bactéries est réduite en riboflavine-5'-phosphate (FMN). En parallèle, l'aldéhyde à longue chaîne carbonée (RCHO) synthétisée par *luxC*, *luxD* et *luxE* s'oxyde en RCOOH (**Figure 38**). Cette réaction d'oxydation fait passer le substrat d'un état stable à un état électroniquement instable. En retournant à son état stable, le substrat émet des photons à l'origine d'une lumière bleue (à 490 nm). Cette réaction est catalysée par l'oxygène (Meighen, 1991).

B.3.1.2 Suivi de la luminescence *in vivo* : le système d'acquisition de la luminescence IVIS

L'acquisition des images est réalisée par l'appareil IVIS (*In Vivo* Imaging System, perkin Elmer). Cet appareil est équipé pour détecter la luminescence grâce à sa caméra CCD (Charged Coupled Device) très sensible par rapport aux caméras classiques. Le traitement des intensités du signal détecté est retranscrit selon une échelle de couleur. (**Figure 39**).

L'acquisition des images peut être définie selon plusieurs paramètres :

● **Le temps d'acquisition** : plus le temps d'acquisition est long plus le nombre de photons émis et donc détecté sera grand.

● **Le binning** : correspond à la taille d'un pixel. Plus le pixel est grand moins la résolution sera précise mais plus le nombre de photons détectés et donc le signal sera important. Il peut être « small » 1 pixel, « medium » 4 pixel sont regroupés en 1 ou « large » 16 pixels sont regroupés en 1.

● **Unité de mesure de la luminescence** : L'unité de mesure des images acquises est la radiance. Elle correspond au nombre de photons par seconde par cm² par stéradian. Le stéradian est une unité d'angle solide, il s'agit du calcul du nombre de photon détecté dans la surface visualisée par rapport au nombre total de photon capturés.

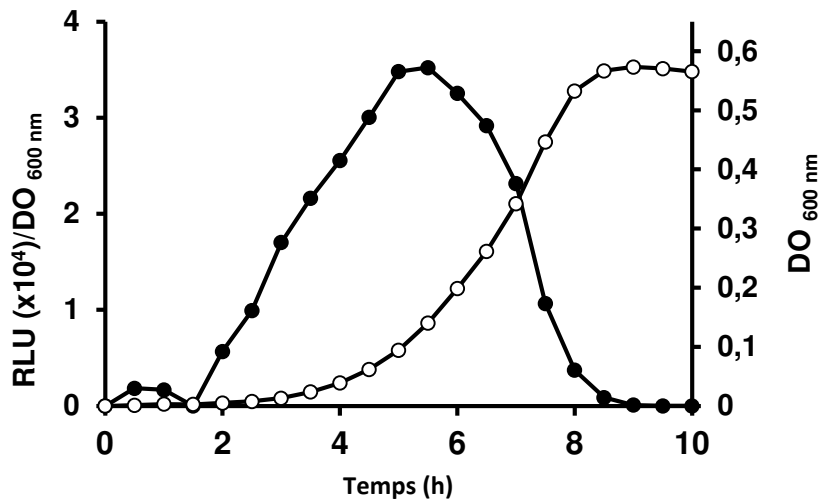


Figure 40. Expression de la luminescence au cours de la croissance de *S. agalactiae* WT transformée par le plasmide $pP_{23}lux$. La luminescence (●) est exprimée en fonction du temps en $RLU/DO_{600\text{ nm}}$ tandis que la croissance (○) est exprimée en fonction du temps par mesure de l'absorbance à 600 nm.

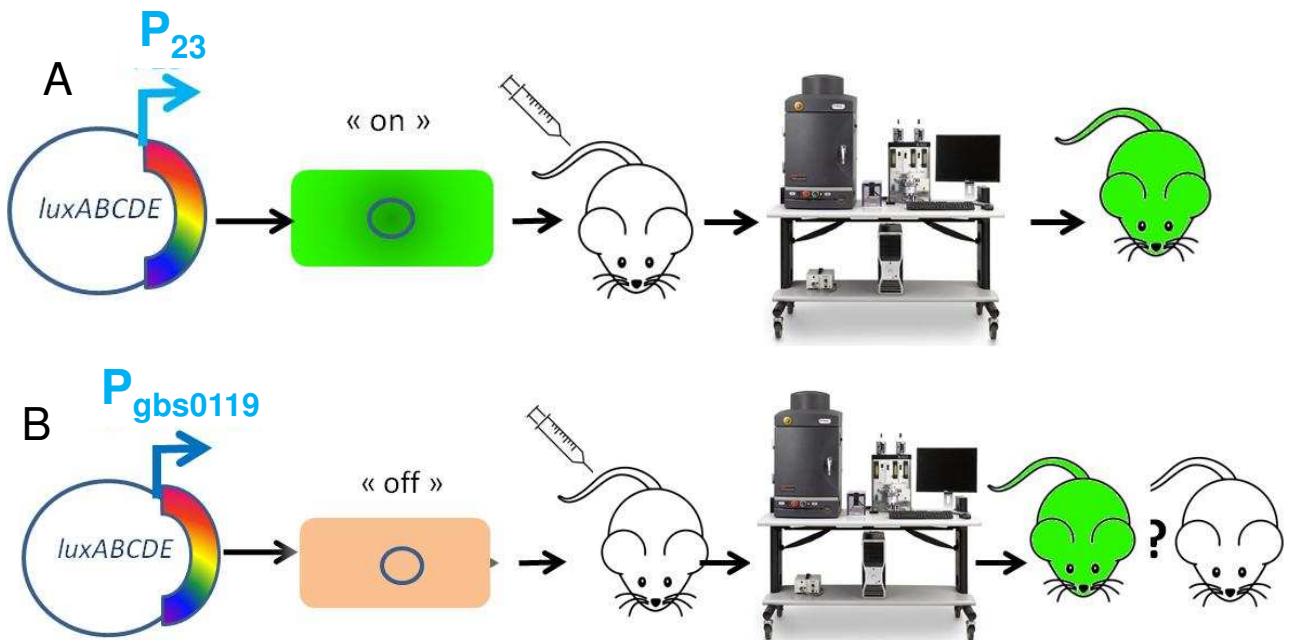


Figure 41. Les 2 stratégies utilisées pour l'étude *in vivo*. (A) Le promoteur constitutif P_{23} couplé au rapporteur *lux* permet une émission de bioluminescence constitutive qui permet ainsi le suivi des bactéries. (B) Le senseur de *S. agalactiae* couplé au rapporteur *lux* permet une émission de luminescence uniquement lorsque le senseur d'hème intracellulaire est activé par l'hème de l'hôte.

B.3.2 Visualisation de la luminescence émise par les bactéries

B.3.2.1 Visualisation de la luminescence émise par les bactéries *in vitro*

L'émission de lumière par les bactéries transformées avec le système *luxABCDE* de *P. luminescens* est dépendante de leur phase de croissance *in vitro* (Meighen, 1991). En effet, la luminescence émise décroît fortement lorsque les bactéries entrent en phase stationnaire de croissance comme par exemple pour *S. agalactiae* (**Figure 40**). De plus, il ne s'agit pas d'un épuisement du milieu car si les bactéries ayant perdu leur signal sont remises en suspension dans un milieu frais, le signal reste indétectable (non montré). Ce phénomène peut s'expliquer par le fait, qu'en phase de croissance stationnaire, les bactéries ne seraient pas métaboliquement actives pour synthétiser des différents acteurs nécessaires à la luminescence comme la riboflavine (Hutchens and Luker, 2007). Ce phénomène a été observé lors des cinétiques de nos bactéries modèles, *L. lactis*, *S. agalactiae*, *E. faecalis* ainsi que chez d'autres bactéries comme par exemple les bactéries *Streptococcus pneumoniae* (Francis *et al.*, 2001), *Leishmania amazonensis* (Lang *et al.*, 2005) ou *Mycobacterium smegmatis* (Carroll *et al.*, 2010) ainsi que chez diverses bactéries lactiques du genre *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* and *Enterococcus* (Van Zyl *et al.*, 2015).

B.3.2.2 Construction d'un outil adapté à la visualisation de la luminescence émise par les bactéries *in vivo* lors de l'infection

Pour obtenir des bactéries luminescentes, nous avons cloné l'opéron *lux* de *Photobacterium luminescens* (**Partie 2 § B.3.1.1**) dans le plasmide pTCV (Poyart and Trieu-Cuot, 1997) Nous avons développé 2 stratégies.

- A) La première utilise le promoteur constitutif P₂₃ couplé au rapporteur *lux* qui permet une émission de bioluminescence constitutive par les bactéries. Cet outil permet un suivi des bactéries au cours de l'infection ou de la colonisation (**Figure 41, A**).

- B) La seconde stratégie utilise le système senseur de l'hème intracellulaire de *S. agalactiae* constitué par le promoteur de l'opéron *hrtBAhrrRS*, mis en évidence dans ce projet, couplé au rapporteur *lux* qui permettent une émission de luminescence uniquement lorsque le senseur d'hème de la bactérie est activé (**Figure 41, B**). Cet outil permet de visualiser la détection de l'hème au cours de l'infection ou de la colonisation par *S. agalactiae*.

B.3.1.5 Mise au point des conditions de l'infection et de l'observation

Plusieurs modèles d'infections ont été utilisées pour l'étude de *S. agalactiae* tels que les rats adultes (Barichello *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2009) ou nouveau-nés (Yamamoto *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2006), les poissons zèbres (zebrafish) adultes (Patterson *et al.*, 2012) ou sous forme larvaire (Kim *et al.*, 2015). La souris (*Mus musculus*) est le modèle qui est le plus souvent utilisé (Tissi *et al.*, 1990; Fernandez *et al.*, 2010; Tazi *et al.*, 2010). Sur le plan génétique, la souris est très similaire à l'homme : 99 % de ses gènes présentent un gène homologue chez l'humain. De plus, cet animal possède tous les atouts pour l'élevage en laboratoire : une descendance nombreuse, un développement rapide et une taille réduite. Le type de souris choisi est la souris BalbC/J. Il s'agit de souris albinos à cause d'une mutation qui bloque la production de mélanine. La couleur de la souris est importante. Une souris blanche augmente la sensibilité de la luminescence détectée alors que le poil noir des souris absorbe la lumière ce qui diminue fortement la sensibilité de la détection. Enfin, ce sont des souris consanguines ce qui permet une réponse plus homogène dans la progression de l'infection (Kruisbeek, 2001).

Pour les infections systémiques, les injections ont été réalisées dans le sinus rétro-orbital de la souris anesthésiée par un mélange de xylazine (15 µg/g de souris) et kétamine (100 µg/g de souris) en injection intra-péritonéales. L'infection dans le sinus rétro-orbital est une technique qui est reconnue et validée (Yardeni *et al.*, 2011). Nous utilisons cette technique car elle est pratiquée en routine et préférentiellement à l'animalerie du centre de recherche INRA de Jouy-en-Josas. Les souris BalbC/J sont plus réceptives à l'infection par *S. agalactiae* Nem316 que les souris SWISS utilisées dans notre laboratoire. Une phase de mise au point a donc été nécessaire pour déterminer le nombre de bactéries à injecter pour une progression de l'infection observable sur 24 h.

Ainsi une dose de 2×10^7 CFU permet d'observer les premiers signes cliniques de l'infection, caractérisés par des poils hérissés 8 h après l'injection. L'infection étant déclarée, les souris sont prostrées 15 h après l'injection. La fin de vie se situe entre 24 et 30 h après l'injection.

B.4 Publication 2 : Visualisation du rôle de l'hème de l'hôte sur la virulence de la bactérie auxotrophe *Streptococcus agalactiae*.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*

Received: 29 September 2016

Accepted: 06 December 2016

Published: xx xx xxxx

Laetitia Joubert¹, Jean-Baptiste Dagieu¹, Annabelle Fernandez², Aurélie Derré-Bobillot¹, Elise Borezée-Durant¹, Isabelle Fleurot³, Alexandra Gruss¹ & Delphine Lechardeur¹

Heme is essential for several cellular key functions but is also toxic. Whereas most bacterial pathogens utilize heme as a metabolic cofactor and iron source, the impact of host heme during bacterial infection remains elusive. The opportunist pathogen *Streptococcus agalactiae* does not synthesize heme but still uses it to activate a respiration metabolism. Concomitantly, heme toxicity is mainly controlled by the HrtBA efflux transporter. Here we investigate how *S. agalactiae* manages heme toxicity versus benefits in the living host. Using bioluminescent bacteria and heme-responsive reporters for *in vivo* imaging, we show that the capacity of *S. agalactiae* to overcome heme toxicity is required for successful infection, particularly in blood-rich organs. Host heme is simultaneously required, as visualized by a generalized infection defect of a respiration-negative mutant. In *S. agalactiae*, HrtBA expression responds to an intracellular heme signal via activation of the two-component system HssRS. A *hssRS* promoter-driven intracellular luminescent heme sensor was designed to identify host compartments that supply *S. agalactiae* with heme. *S. agalactiae* acquires heme in heart, kidneys, and liver, but not in the brain. We conclude that *S. agalactiae* response to heme is organ-dependent, and its efflux may be particularly relevant in late stages of infection.

Heme is ubiquitous in biological systems and an essential cofactor of several enzymes¹. The importance of heme resides in the unique properties of its iron center, including the capacity to undergo electron transfer, perform acid-base reactions, and interact with various coordinating ligands². Recent evidence emphasizes another role of heme, as a signalling molecule that regulates the function of key proteins implicated in several cellular processes^{3,4}. Most bacteria carry the enzymatic machinery for endogenous heme synthesis and are also capable of acquiring environmental heme. Once internalized, heme is incorporated into bacterial proteins and/or degraded to release iron^{3,4}. However, numerous bacteria, designated as heme-auxotrophs, lack some or all the enzymes needed for autosynthesis, but still require this molecule for their metabolism. The inability to synthesize heme means that these bacteria rely on environmental heme sources. One heme auxotroph is the Gram-positive opportunistic pathogen *Streptococcus agalactiae* (Group B streptococcus, GBS), a commensal inhabitant of the human gastrointestinal and female genitourinary tracts. Pregnant women who carry GBS asymptotically can transmit the bacterium to their newborns during delivery, sometimes resulting in devastating neonatal infections including septicemia and meningitis^{5–7}. GBS has emerged in the last 2 decades as a cause of invasive infections in adults with predisposing underlying diseases such as diabetes and cancer^{8,9}.

Heme iron redox reactions may generate reactive oxygen species (ROS), which accelerate membrane peroxidation and damage to cellular proteins and DNA¹⁰. Several pathogens have evolved diverse and sophisticated strategies to outcompete heme sequestration by the host and fuel their heme requirements, they also need to balance their intracellular heme concentration below toxic levels^{11–13}. Tolerance to heme in numerous Gram-positive bacteria involves a heme-regulated efflux pump (HrtBA; Heme-regulated transport), as identified in *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, and *Corynebacterium diphtheriae*^{14–16}. Pump-defective mutants are heme hypersensitive^{3,15,17}. In *S. aureus* and *B. anthracis*, the HssRS (Hss; heme sensing system, R; regulator, S; sensor) two-component system (TCS) regulates HrtBA transporter expression^{16,18} in response to exogenous heme. Interestingly, *L. lactis* and other food/commensal heme auxotroph bacteria seem to have evolved a distinct response system that relies on intracellular heme sensing by the transcriptional regulator HrtR through heme

¹Micalis Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy en Josas, France. ²Fromagerie BEL, 7 boulevard de l'Industrie, 41100 Vendôme, France. ³Unité ISP, INRA, 37380 Nouzilly, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to D.L. (email: delphine.lechardeur@inra.fr)

binding¹⁵. In GBS, *hrtBA* orthologs were identified whose transcription is induced by hemin¹⁹. HssRS orthologs were also identified, but their exact function and regulation remain to be characterized. We previously proposed that HrtBA would protect cells in a heme-rich environment, e.g., during infection, when host red blood cells are degraded¹⁹. A distinct porphyrin efflux network called Pef, for porphyrin efflux, also contributes to PPIX and heme homeostasis; this system responds to low PPIX/heme concentrations compared to HrtBA¹⁹.

GBS depends on exogenous heme to activate a respiration chain that *in vitro* increases bacterial fitness and survival compared to fermentation metabolism, and is required for full virulence in a neonate rat model²⁰. Menaquinones, which are also required, are provided from the diet or the gut and are present in blood in low amounts^{20,21}. Heme captured from the environment activates the final acceptor complex of the GBS aerobic respiration chain, the cytochrome *bd* quinol oxidase (CydAB, encoded by *cydAB* genes)^{11,21–24}. In *L. lactis* and GBS, respiration gene expression appears to be constitutive, with a slight increase late in growth^{20,22,25}. This suggests that metabolism can switch efficiently from fermentation to respiration upon availability of the required cofactors in the local environment.

Passage in blood is a crucial step for colonization and pathogenesis of numerous bacteria²⁶. However, the mechanisms involved in heme homeostasis and the availability and impact of host heme during infection are still unclear. As a heme auxotroph, GBS is particularly suited for such a study, as heme levels are fully controlled by exogenous heme pools. Here, we developed bacterial and heme biosensors combined with bioluminescence imaging to investigate GBS heme management *in vitro* and during infection. We demonstrate that HrtBA has a major impact on GBS survival in the host by preventing lethal heme overdose. On the other hand, heme acquisition activates respiration metabolism, which is crucial for GBS infection in a mouse septicemia model. Finally, based on the heme sensor, we show that GBS responses to host heme *in vivo* occur preferentially in specific organs, which contrasts with overall GBS distribution in the host. These experiments establish that GBS responses to exogenous heme are required for invasion and growth in the hostile host environment.

Results

Role of *hrtBA* in controlling GBS heme toxicity. GBS0119 and GBS0120 showed respectively 30% and 45% amino acid identity with HrtB and HrtA of *S. aureus*¹⁷. In GBS, the operon comprises 2 additional genes, *gbs0121* and *gbs0122* (Fig. 1A and see below). GBS HrtBA was needed to manage environmental heme toxicity, as an in-frame Δ *hrtBA* deletion mutant (Table S1, strain NEMJ18, Supplementary Methods) exhibited hemin hypersensitivity compared to the WT (Fig. 1B; note that hemin refers to the oxidized molecule as present extracellularly, and heme refers to the reduced form of the molecule). The Δ *hrtBA* mutant was sensitive to hemin concentrations as low as 5 μ M as determined in liquid culture assays (Fig. S1A,B). The role of HrtBA in managing heme toxicity was confirmed by complementation of the GBS Δ *hrtBA* strain expressing *hrtBA* from a constitutive promoter; growth of this complemented strain was insensitive to the same hemin concentration (Figs 1B and S1C, Table S1, Supplementary Methods).

To ascertain that increased hemin toxicity in the GBS Δ *hrtBA* mutant was linked to its accumulation, cellular ⁵⁷Fe-labeled heme concentrations were quantified by inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS)¹⁵. The ⁵⁷Fe concentration was nearly 2-fold higher in Δ *hrtBA* than in the WT strain, while heme accumulation was reduced by 40% compared to the WT in the strain overexpressing HrtBA (Fig. 1C). These results confirm the functional link between HrtBA expression and heme accumulation in GBS. GBS HrtBA is thus a heme efflux permease that maintains cellular heme concentration by efflux to prevent toxicity.

Control of host heme toxicity is critical for GBS virulence. Mammalian host organs are rich in blood but heme is mostly entrapped inside erythrocytes bound to hemoglobin or captured by hemoproteins, limiting its access¹¹. We therefore asked whether *hrtBA*-mediated heme management is required during GBS infection in a mouse model. Mice were infected intravenously with WT GBS and the heme-sensitive Δ *hrtBA* strain, both carrying the *lux* bioluminescent reporter plasmid, from which *Photorhabdus luminescens luxABCDE* (*lux*) genes are constitutively expressed²⁶ (Table S1 and Supplementary Methods). A series of control experiments verified that luminescent GBS was suitable for *in vivo* study: i- the *lux* plasmid remained stable in the absence of antibiotic pressure over a 24 h period, corresponding to 50 generations²⁷ (Fig. S2A); ii- a linear correlation between colony forming units (CFU) and relative light units (RLU) was established *in vitro*, demonstrating that luminescence intensity correlated with CFU (Fig. S2B); iii- *lux* operon expression did not alter GBS growth rate (Fig. S2C). We conclude that progression of GBS infection can be followed by monitoring bioluminescence.

WT(*lux*) and Δ *hrtBA*(*lux*) strains exhibited a strong and similar autonomous luminescent signal as seen on agar plates (Fig. 2A) and in liquid cultures (Fig. S3A). Mice were infected with 2.10⁷ CFU of both strains by intraorbital injection (Fig. 2B). In mice infected with the WT(*lux*) strain, the first clinical signs of infection (bristly hairs) were seen around 8 h post-injection, and overt signs of advanced disease (prostrated animals with spiky hairs) were seen 20–24 h post-injection. In parallel, whole animal luminescence following infection with GBS WT(*lux*) was detectable in the first 8 h following the start of infection and then increased rapidly between 8 h and 13 h (Fig. 2B, left; Fig. 2C, WT). GBS WT(*lux*) was detectable throughout mouse bodies (as seen on ventral and dorsal images), while higher levels of luminescence were localized in the head and thorax regions (Fig. 2B, WT at 13 h). At 8 h, luminescence observed in mice infected with Δ *hrtBA* and WT was comparable (Fig. 2B, right, and Fig. 2C, Δ *hrtBA*; note that the quantified number of photons in Fig. 2C gives a more accurate assessment of luminescence). However, luminescence intensity of Δ *hrtBA* was markedly lower at 13 h compared to the WT strain, indicating that infection progressed more slowly in the mutant. This observation is in line with the clinical status of the animals that showed less pronounced signs of disease.

Infection of different organs by the WT and Δ *hrtBA* strains was compared. Mice were euthanized 13 h post-infection. Bacteria were enumerated in heart, kidney, liver and brain (Fig. 3A) after luminescence in dissected organs was monitored (Fig. 3B). The highest levels of WT GBS were recovered from the heart and kidneys

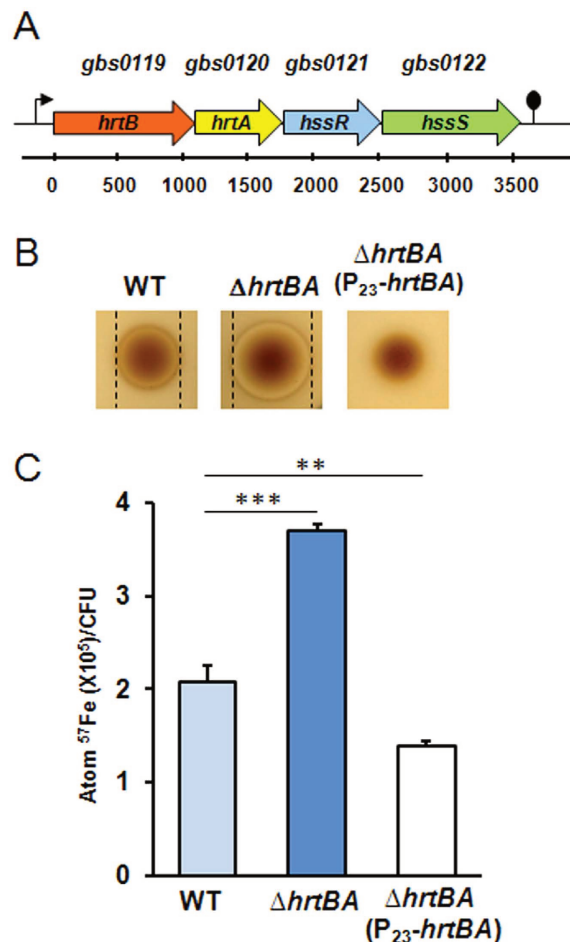


Figure 1. Heme toxicity regulation in GBS. (A) Operon organization of *hrtBAhssRS*. Schematic representation of the *hrtBAhssRS* operon in *S. agalactiae* (NEM316). *HrtB* (*gbs0119*) and *hrtA* (*gbs0120*) encode a permease and an ATPase, respectively while *hssS* (*gbs0122*) and *hssR* (*gbs0121*) encode the sensor histidine kinase and response regulator of a two-component system. (B) The *hrtBA* locus is involved in the control of heme toxicity in GBS. Stationary phase cultures of WT (NEM316), $\Delta hrtBA$ (NEMJJ8) and $\Delta hrtBA$ carrying a plasmid overexpressing *hrtBA* (P_{23} -*hrtBA*) were plated in soft agar (Methods). Hemin (10 μ l of a 10 mM stock solution) was pipetted directly onto plates, which were incubated at 37°C for 24 h. Inhibition zones appear as a clearing in the center of each panel delimited by black lines. No inhibition zone was visible for $\Delta hrtBA$ (P_{23} -*hrtBA*). (C) Heme cellular content is dependent on HrtBA expression. Heme content of GBS WT, $\Delta hrtBA$ and $\Delta hrtBA$ (P_{23} -*hrtBA*) strains was assessed by ICP-MS on bacteria incubated with Fe^{57} labelled hemin (Methods). Results represent the mean $\pm$ standard deviation from triplicate samples and are representative of 3 independent experiments. Two-tailed Student test was used to determine P values: WT/ $\Delta hrtBA$, $P = 0.0001$; WT/ $\Delta hrtBA$ (P_{23} -*hrtBA*), $P = 0.0036$. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

(Fig. 3A, WT) and correlated to strongly luminescent localized spots on the dissected tissues (Fig. 3B (heart and kidney, WT)). Lower bacterial counts (3 logs compared to the heart) were enumerated from livers, in keeping with the absence of luminescence in this organ (Fig. 3B, liver) and indicating the detection limit of this sensor system. GBS colonization of brain tissue (Figs 2B and 3A) was observed as discrete spots of luminescence on the surface and inside the organ, in accordance with its capacity to penetrate cerebral tissue (Fig. 3B). Bacterial burden was approximately 1 log lower in the heart, kidneys and liver upon infection with the $\Delta hrtBA$ strain (Fig. 3A), and paralleled the lower luminescence of infected organs (Fig. 3B). Interestingly, $\Delta hrtBA$ and WT strains colonized the brain to comparable levels (Fig. 3A,B), supporting the idea that heme challenge encountered by GBS in the brain is limited. Bacterial counts in lung and blood samples were too low for significant comparison between WT and $\Delta hrtBA$ strains. However, growth of $\Delta hrtBA$ and WT strains in fresh mouse blood revealed that $\Delta hrtBA$ failed to multiply in whole blood (Fig. 3C) highlighting the importance of HrtBA during prolonged exposure of GBS to blood.

We conclude that GBS might encounter toxic levels of heme in blood and blood-rich organs such as heart, kidney and liver during systemic infection in the mouse model, which necessitates expression of the heme efflux transporter HrtBA. The HrtBA requirement appears to be more pronounced late in infection. In contrast, GBS colonization of the brain was not altered for the $\Delta hrtBA$ strain, in keeping with the strict control of blood exchanges with the cerebral tissue.

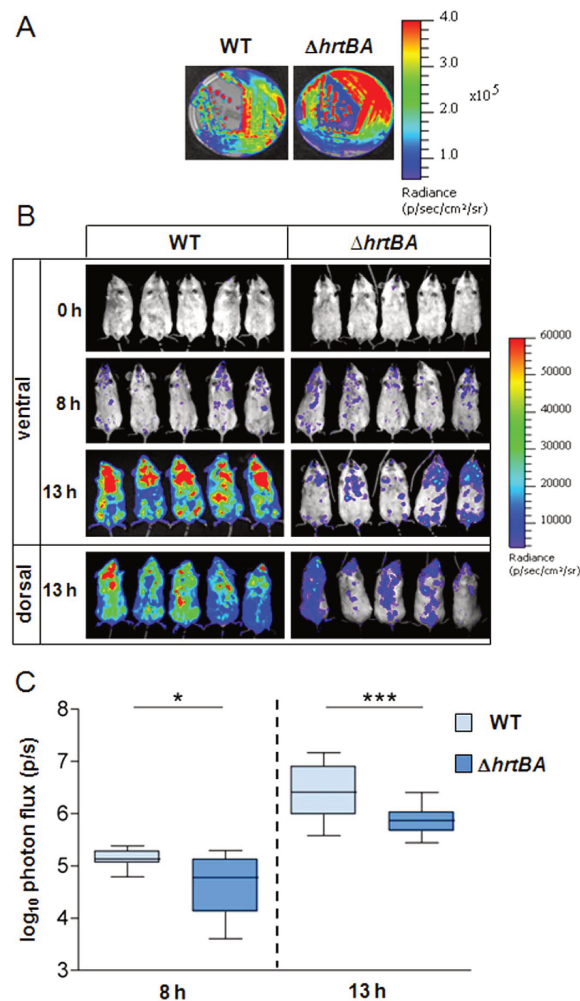


Figure 2. HrtBA expression is essential for full GBS virulence. (A) Luminescence of WT(*lux*) and $\Delta hrtBA$ (*lux*) streaked on solid agar plates. Luminescence was imaged with the IVIS 200 system (acquisition time, 1 min; binning 8) (Methods). (B) Course of infection of WT and $\Delta hrtBA$ GBS strains in mice. BALB/c mice were infected by intravenous injection of 2.10^7 CFU of luminescent WT(*lux*) and $\Delta hrtBA$ (*lux*) GBS strains. Light emission in whole anesthetized animals was acquired and imaged in an IVIS 200 imaging system (acquisition time, 10 min; binning 8) immediately following bacterial inoculation ($t = 0$), at 8 h and 13 h (Methods). Batches of 3 mice for each time are shown and are representative of 3 independent experiments. (C) Quantification of bioluminescence in live mice at 8 h and 13 h post-infection with WT(*lux*) and $\Delta hrtBA$ (*lux*) as described in Fig. 2B. Images were analyzed by measuring the total light flux (number of photons per second). Light emission from mice at 0 time point was subtracted. Box and whiskers plot of data from 5 experiments (corresponding to $n = 15$ mice per time point per strain). Quantified luminescence values correlate with bacterial counts in different organs (e.g., Fig. 3A). Two-tailed Mann–Whitney analyses was used to determine P values: 8 h, $P = 0.015$; 13 h, $P = 0.006$. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$ according to the Mann–Whitney test.

GBS virulence relies on host heme-activated respiration metabolism. The use of heme as a quinol oxidase cofactor leads to more robust GBS growth *via* respiration^{20,21}. We explored the role of respiration metabolism as a main heme-requiring function in GBS infection using the *lux* biosensor. The capacity of a $\Delta cydA$ (cytochrome A subunit) mutant that is respiration-defective transformed with *lux*, $\Delta cydA$ (*lux*) mutant strain (Table S1, NEMJ17, Supplementary Methods) to grow and sustain a successful infection in mice was tested as in Fig. 2. The $\Delta cydA$ (*lux*) mutant emitted light similarly to the WT *in vitro* (Fig. 4A and S3B). The course of systemic infection by the $\Delta cydA$ strain was dramatically limited compared to the WT as seen by the biophotonic images of representative infected mice at 13 h post-injection (Fig. 4B). While results with both strains were similar at the 8 h time point (Fig. 4B, 8 h), mice infected with the $\Delta cydA$ mutant showed no sign of disease at 13 h post-injection while those infected with the WT were prostrated with spiky hairs. Consistently, quantification of total luminescence of injected mice showed a quasi-arrest in $\Delta cydA$ luminescence between 8 h and 13 h of infection, while infection by the WT strain progressed rapidly (Fig. 4C). The $\Delta cydA$ bacteria appeared to be disseminated in mice, while WT bacteria were concentrated preferentially in the thorax and head (Fig. 4B, 13 h).

Bacterial distribution in dissected organs was quantified (Fig. 5A). Compared to the WT, the $\Delta cydA$ bacterial load was 2 to 3 logs lower in heart and kidney while CFU levels in the liver were similar for both strains (Fig. 5A).

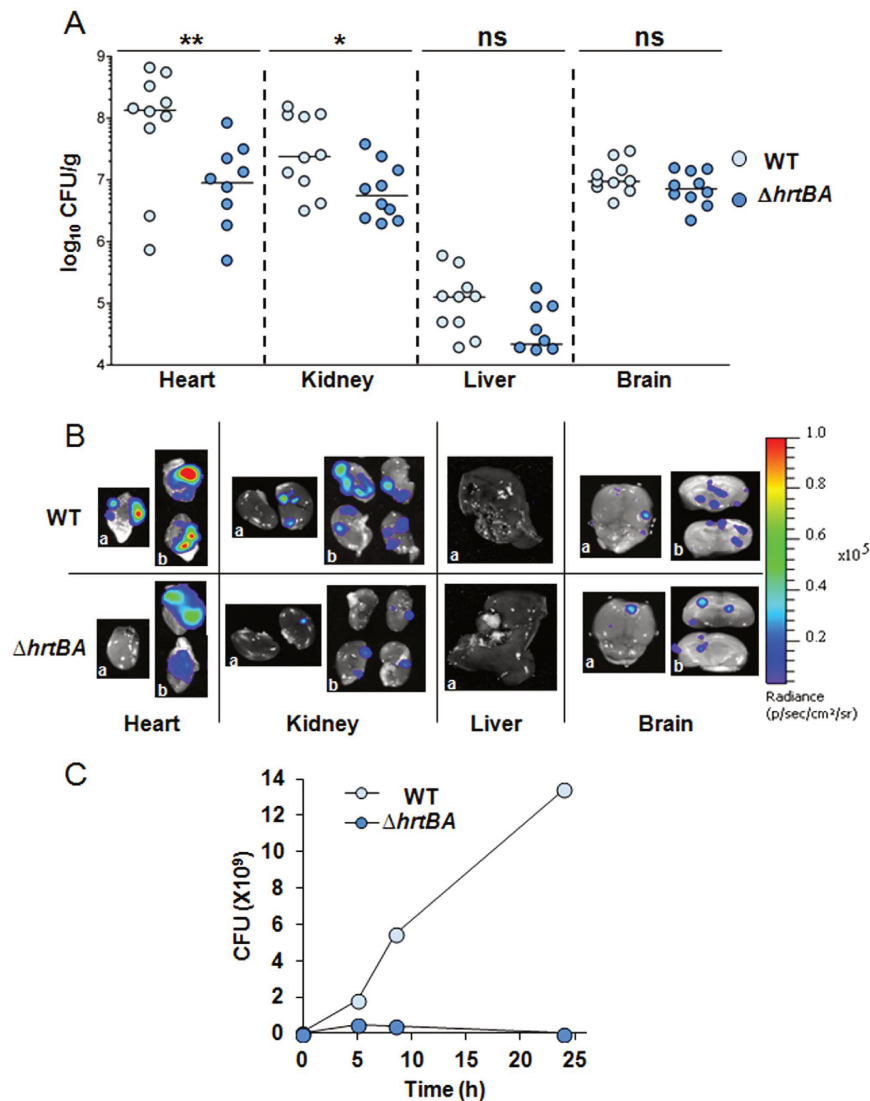


Figure 3. GBS depends on HrtBA expression to colonize host blood-rich organs. (A) Organ CFU of WT and $\Delta hrtBA$ GBS strains at 13 h post-infection. Mice infected as described in Fig. 2B were euthanized at 13 h post-infection. Dissected organs were homogenized and processed for CFU determinations (Methods). Symbols represent data from $n = 8$ to 10 mice from 3 independent experiments. Two tailed Mann–Whitney was used to determine P values: heart, $P = 0.009$; kidney, $P = 0.029$; liver $P = 0.067$; brain, $P = 0.19$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant ($P > 0.05$). (B) Bioluminescence from dissected organs. Indicated organs were imaged with the IVIS 200 (acquisition time, 5 min; binning 8). Representative organs from systematically infected mice sacrificed 13 h following the start of infection as in Fig. 3B. a, top view; b, cross section of the indicated organs. (C) Growth of WT and $\Delta hrtBA$ in mouse blood. Bacteria from an ON preculture were diluted to an OD = 0.01 in 1 ml of freshly collected (<24 h) and heparinized blood of 6 weeks old BALB/c mice (Janvier, Le Genest Saint-Isle, France). At the indicated times, 100 μ l of the culture was serially diluted and plated on agar plates for determination of the CFU. Results are representative of three independent experiments.

CFU corresponding to $\Delta cydA$ strain in the brain were decreased by 1 log (Fig. 5A). In accordance with CFU results, representative organs of mice injected with the $\Delta cydA$ mutant showed little luminescence compared to the WT, as clearly observed in the heart, kidney and brain (Fig. 5B).

We conclude that while GBS must adapt to host heme toxicity by strictly limiting its intracellular accumulation (via HrtBA), it also needs to find heme within the host, particularly late in infection, to fulfill its needs for respiration metabolism. These results highlight the importance of heme management and acquisition during GBS infection.

Internalized heme activates HrtBA expression via HssRS signaling. A bioinformatic search for potential activators of HrtBA expression identified *gbs0121* and *gbs0122* as encoding a regulator and sensor histidine kinase (HK) of a two-component system (Fig. 1A). These proteins share respectively 39% and 31% identity with the heme sensing system proteins HssR (heme sensing system regulator) and HssS (heme sensing

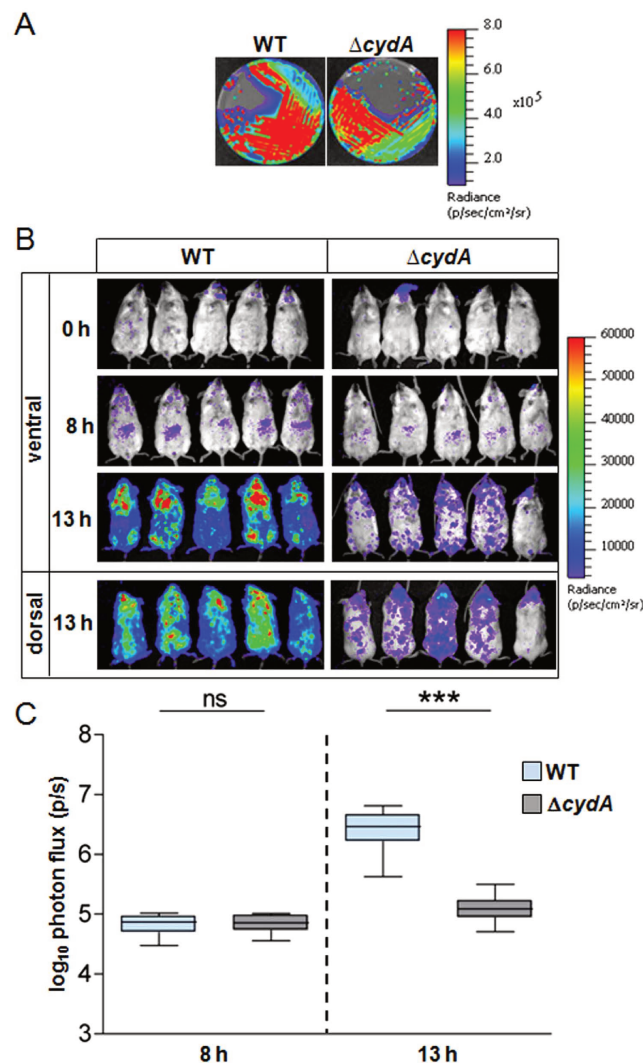


Figure 4. GBS virulence relies on host heme-activated respiration metabolism. (A) Bioluminescence of WT(NEM316) and $\Delta cydA$ (NEMJ17) transformed with *lux* on agar plates. Luminescence was imaged with the IVIS 200 system (acquisition time, 1 min; binning 8) (Methods). (B) Course of infection of WT and $\Delta cydA$ GBS strains in mice. BALB/c mice were infected by intravenous injection of 2.10^7 CFU of luminescent WT(*lux*) and $\Delta cydA$ (*lux*) GBS strains. Animal luminescence was imaged as in Fig. 3A at the indicated time points by IVIS 200 (acquisition time, 10 min; binning 8). Five mice for each time and are representative of 3 independent experiments. (C) Quantification of bioluminescence in live mice at 8 h and 13 h post-infection with WT and $\Delta cydA$ strains. Luminescence from live animals infected with WT(*lux*) and $\Delta cydA$ (*lux*) was determined as in Fig. 4B. Box and whiskers plot of data from 3 experiments (corresponding to a total of $n = 15$ mice per time point). Two-tailed Mann–Whitney was used for data analyses: 8 h, $P = 0.912$; 13 h, $P = 0.0001$. ns, not significant ($P > 0.05$); *** $P < 0.001$.

system sensor) of *S. aureus*^{17,18}. For both bacteria, the coding genes are adjacent to *hrtBA*. We tentatively renamed GBS0121 as HssR and GBS0122 as HssS. To verify the role of HssRS in HrtBA regulation, an in-frame deletion of *hssR* and *hssS* was constructed (Table S1, strain NEMJ19, Supplementary methods). The $\Delta hssRS$ GBS strain was hypersensitive to hemin as seen on agar plates (Fig. 6A) and liquid cultures (Fig. S3A,B). Complementation of the mutant $\Delta hssRS$ strain with *hssRS-HA* controlled by the P_{gbs0119} promoter ($pP_{\text{gbs0119}}\text{-hssRS-HA}$, Table S1, Supplementary methods) further suggested that HssRS expression was required for HrtBA function (Fig. 6A, right panel; Fig. S4C). Finally, heme dependent expression of HssS tagged at its C-terminus with the HA epitope from $\Delta hssRS(pP_{\text{gbs0119}}\text{-hssRS-HA})$ was verified on Western blot (Fig. 6B). The heme-inducible promoter of the *hrtBA**hssRS* operon was also fused to *lacZ* ($P_{\text{gbs0119}}\text{-lac}$)¹⁹ (Table S1). In the WT strain, induction is linear in the range of 0.1 μM and 1 μM heme (below hemin toxicity concentrations in GBS, Figs S1A and S4A). In contrast, $P_{\text{gbs0119}}\text{-lac}$ expression in the $\Delta hssRS$ strain remained virtually null in the presence of 1 μM hemin compared to the WT strain (Fig. 6C) indicating a role of HssRS in transcriptional *hrtBA**hssRS* activation. We conclude that the *hrtBA**hssRS* operon is induced by heme via HssRS activation.

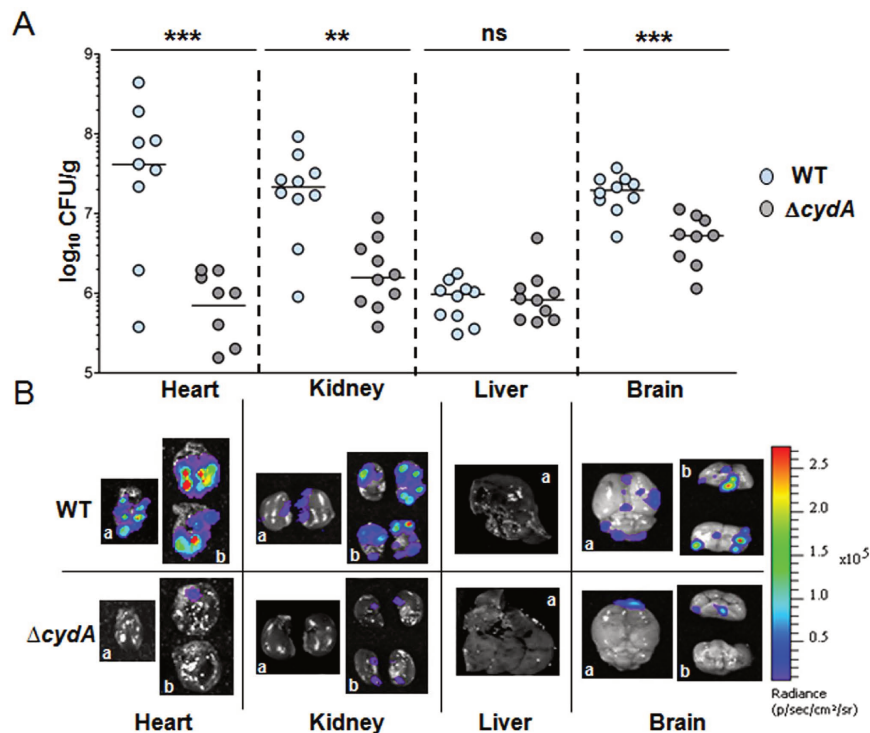


Figure 5. GBS capacity to colonize host organs requires heme-activated respiration metabolism.

(A) Organ CFU of WT and $\Delta cydA$ GBS strains at 13 h post-infection. Mice infected as described in Fig. 2B were euthanized at 13 h post-infection and bacterial burden in dissected organs determined as in Fig. A. Symbols represent data from $n = 8$ to 10 mice from 3 independent experiments. Two-tailed Mann–Whitney was used to determine P values: heart, $P = 0.001$; kidney, $P = 0.0015$; liver, $P = 0.97$; brain, $P = 0.0004$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, not significant ($P > 0.05$). (B) WT(*lux*) and $\Delta cydA$ (*lux*) bioluminescence in dissected organs. Representative organs from infected mice were sacrificed 13 h post-infection. Organs were visualized in an IVIS 200 system (acquisition time, 5 min; binning 8).

In *S. aureus*, heme-triggered HssRS activation of *hrtBA* expression involves HssS amino acid residues predicted to be localized in the extracellular domain (ECD, comprising amino acids 33–164)^{18,28,29} (Fig. S5). Surprisingly, GBS HssS lacks nearly the entire predicted heme sensing ECD as identified in *S. aureus* (Fig. S5), leading us to question the role of extracellular heme for GBS *hrtBA*HssRS induction. We hypothesized that intracellular, rather than extracellular heme, might be required to activate GBS *hrtBA*HssRS expression. To test this, we depleted intracellular heme levels by constitutively expressing the HrtBA heme efflux pump. $P_{\text{gbs0119-lac}}$ induction in response to 1 μM hemin was tested in strains that either accumulate intracellular heme ($\Delta hrtBA$), or efflux heme (HrtBA overproducer) (Fig. 6D). Compared to the WT, $P_{\text{gbs0119-lac}}$ expression was about 2.5 times higher in $\Delta hrtBA$. Importantly, expression was essentially non-detectable in the HrtBA overexpression strain, despite the presence of heme in the extracellular medium (Fig. 6D). Thus, β -gal expression correlated to heme cellular, and not extracellular, accumulation (also see Fig. 1C). Finally, this conclusion is consistent with β -gal expression of the *L. lactis* intracellular heme sensor $P_{\text{hrt}}\text{hrtR-lac}$ as a reporter of cytoplasmic heme¹⁵ in GBS WT and $\Delta hrtBA$ strains (Table S1 and Fig. S6). They further suggest that heme uptake and internalization are required for *hrtBA*HssRS induction, and that P_{gbs0119} functions as a heme sensor that detects and responds to heme bacterial accumulation.

Hemoglobin (Hb) and blood are physiologically available heme sources. To get insight into the capacity of GBS to internalize heme from Hb, we compared $P_{\text{gbs0119-lac}}$ induction in the presence of equivalent concentrations (1 μM) of hemin and Hb (Fig. 6E). β -gal expression was induced by Hb, although with lower efficacy than by free hemin. This result highlights the need for GBS to recover heme bound to Hb before its internalization. As expected, the $\Delta hrtBA$ mutant accumulated more heme from Hb than its WT counterpart (Fig. 6E). Similarly, fresh heparinized blood from BALB/c mice activated $P_{\text{gbs0119-lac}}$ at increased levels in the $\Delta hrtBA$ mutant (Fig. 6F). Altogether, these data show that GBS derives its intracellular heme from common host sources, and regulates its intracellular heme concentration via *hrtBA*HssRS.

We exploited the $P_{\text{gbs0119-lac}}$ heme sensor and $\Delta hrtBA$ mutants to evaluate GBS behavior in response to heme availability in the living host. For this purpose, we generated $pP_{\text{gbs0119-lux}}$ for *in vivo* use as a heme sensor (Table S1). As expected, the strain emitted light specifically in the presence of hemin, Hb and blood (Figs 6G and S4E).

Heme sensing during systemic infection. The above results (Figs 2 and 4) imply that during infection, GBS concurrently manages host heme toxicity and meets its heme requirements as to ensure respiration metabolism. The WT strain carrying a non-luminescent plasmid ($pP_{\text{O-lux}}$), or the $pP_{\text{gbs0119-lux}}$ plasmid (Table S1) was

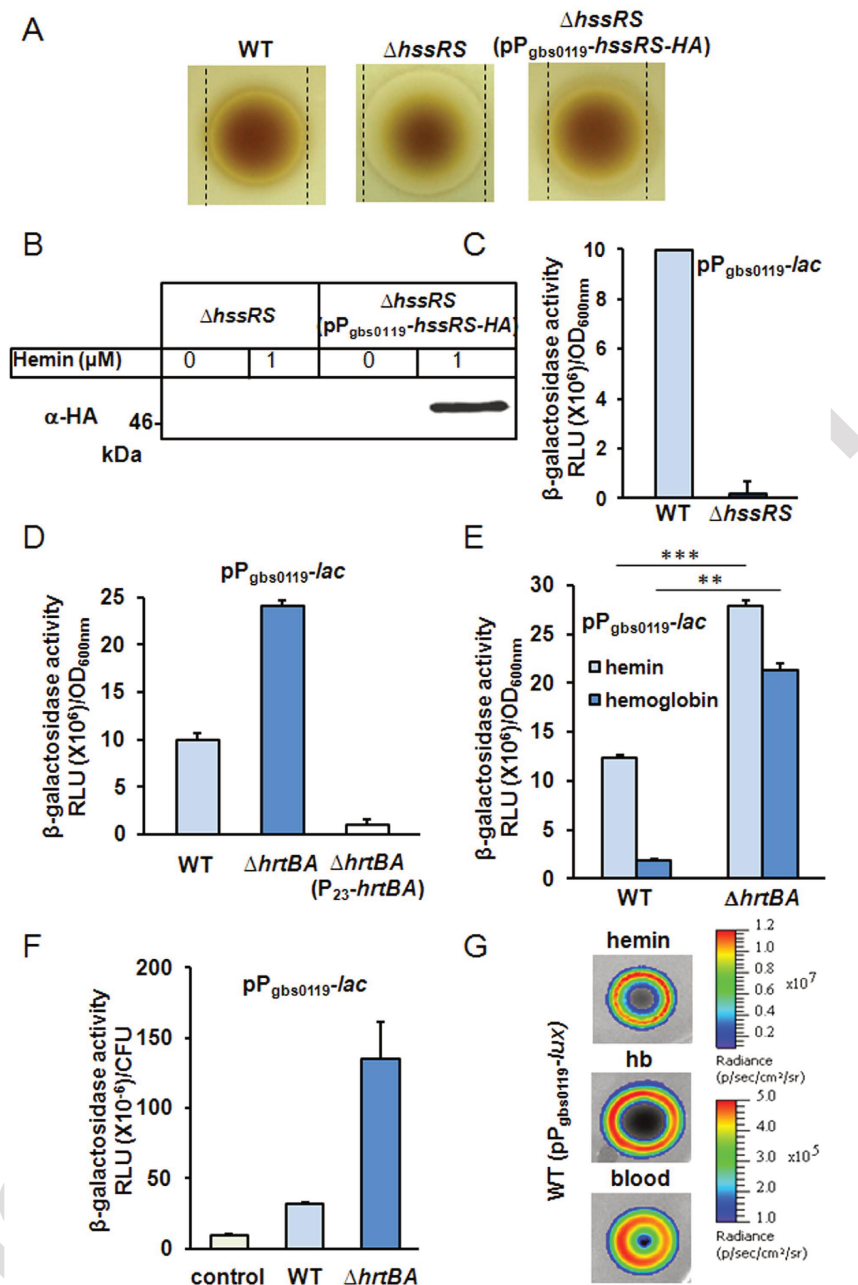


Figure 6. Intracellular heme controls the expression of *hrtBAhssRS* in GBS. (A) HrtBA expression is mediated by HssRS. Cultures of WT, $\Delta hssRS$ and $\Delta hssRS(pP_{gbs0119}-hssRS-HA)$ GBS strains were plated as in Fig. 1B. (B) HssS is expression is induced by hemin. GBS $\Delta hssRS$ and $\Delta hssRS(pP_{gbs0119}-hssRS-HA)$ strains were grown to OD_{600nm} = 0.5 and treated for 1 h with hemin as indicated. Western blot was performed with cell lysates using an anti-HA antibody (Supplementary methods). (C) The *hrtBAhssRS* operon is controlled by HssRS. β -galactosidase activity of WT and $\Delta hssRS$ GBS strains transformed with $P_{gbs0119}-lac$ was performed as in (B). (D) $P_{gbs0119}$ induction depends on heme intracellular accumulation. WT, $\Delta hrtBA$ and $\Delta hrtBA(P_{23}-hrtBA)$ carrying the $P_{gbs0119}-lac$ expression cassette were treated with hemin as in (B). (E) GBS internalizes heme from Hb. WT($pP_{gbs0119}-lac$) and $\Delta hrtBA(pP_{gbs0119}-lac)$ GBS strains were incubated with 1 μ M hemin or freshly prepared bovine Hb (Methods). β -gal expression was followed as described in (B). The Hb solution did not contain measurable amounts of free heme as verified by UV-visible spectroscopy. Two-tailed Student test was used to determine P values: WT (hemin/Hb), $P = 0.0001$; $\Delta hrtBA$ (hemin/Hb), $P = 0.009$. $**P < 0.01$ and $***P < 0.001$. (F) GBS scavenges heme from blood. WT($pP_{gbs0119}-lac$), $\Delta hrtBA(pP_{gbs0119}-lac)$, and negative control WT ($pTCV-lac$) were grown to OD_{600nm} = 0.5 and mixed with 25% BALB/c fresh blood for 3 h at 37 °C (Methods). Luminescence was determined as in (C) and CFU from blood samples were determined by serial dilutions on plates. (G) Heme dependent light emission by the heme sensing GBS strain. GBS WT($pP_{gbs0119}-lux$) was resuspended in soft agar and overlayed on agar plates. Hemin, Hb (10 μ l of a 10 mM stock solution) or fresh BALB/c mice blood (10 μ l) were directly spotted on plates. Plates were incubated at 37 °C for 24 h and luminescence was visualized using an IVIS 200 luminescence imaging system (Methods).

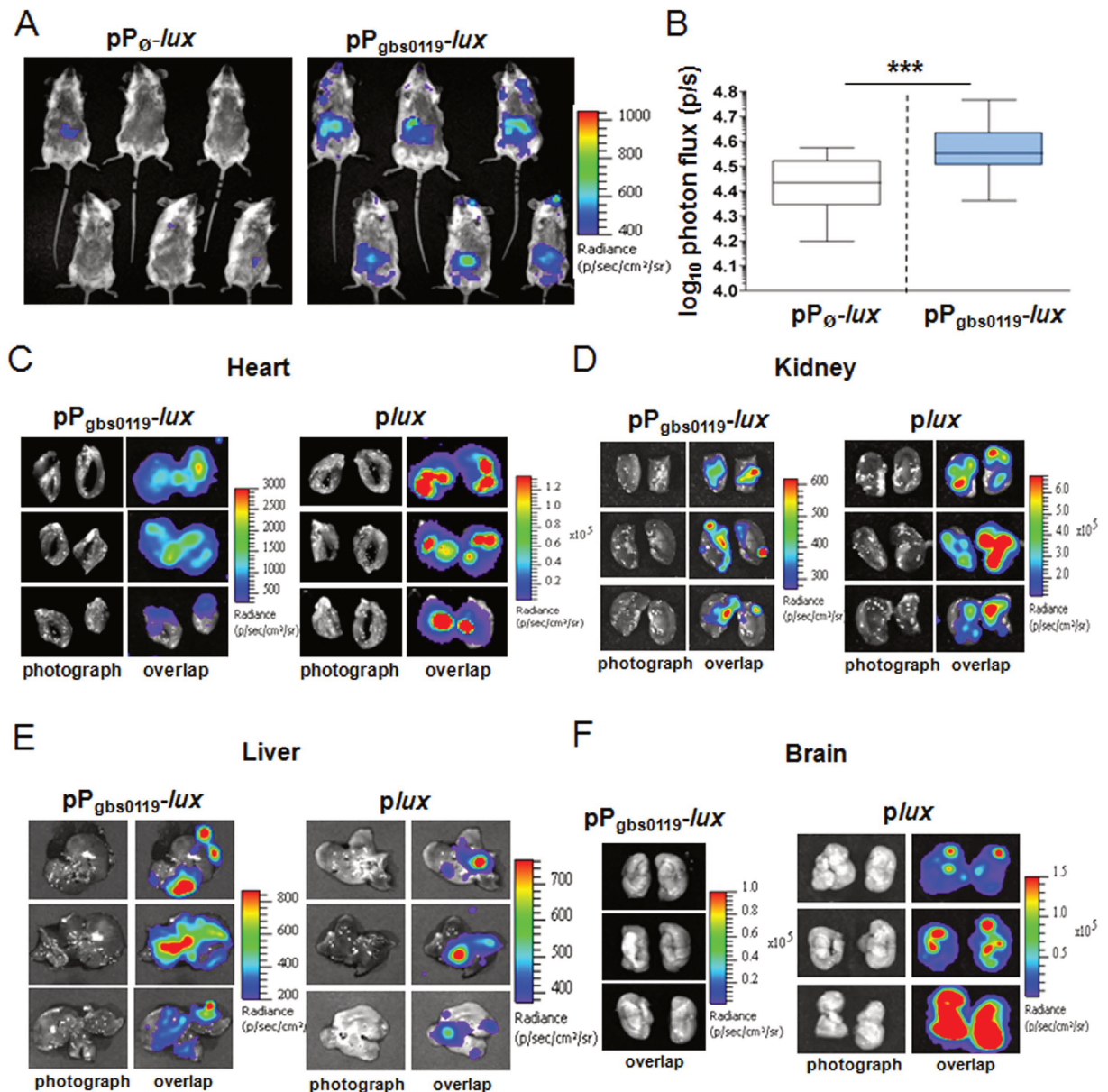


Figure 7. Heme sensing by GBS during systemic infection. (A) Heme sensing by GBS over the course of infection. Female BALB/c mice were infected with 2.10^7 CFU of WT($pP_{ghs0119-lux}$) or WT($pP_{ghs0-lux}$) strains. At 20 h post-infection, anesthetized mice were shaved and imaged organs in the IVIS 200 system (acquisition time, 20 min; binning 16; Methods). (B) Quantification of bioluminescence in live mice at 20 h post-infection. Luminescence of the abdomen of mice infected as in Fig. 5B was determined (Methods). Box and whiskers plot of data collected from 4 experiments (corresponding to a total of $n = 25$ mice per strain). The P value determined using a two-tailed Mann–Whitney test was 0.0002 ($***P < 0.001$). (C–F) Heme sensing *versus* bacterial establishment in dissected organs. Photograph, and overlap images of photograph and luminescence are shown BALB/c mice infected as in Fig. 2B were euthanized 20 h post-injection. All organs except the brain were imaged in a IVIS 200 system with acquisition times of 10 min and 5 min for WT($pP_{ghs0119-lux}$) and WT($plux$) strains respectively; binning 16). No signal was detected in dissected organs of control mice inoculated with the control WT($pP_{ghs0-lux}$) strain. In visualization of brain (F), no signal was detected using WT($pP_{ghs0119-lux}$), while a strong signal was observed using the bacterial reporter WT($plux$). we used acquisition time, 1 min, binning 16; as WT($pP_{ghs0119-lux}$) gave no luminescent signal in the brain (F), only the overlap photo is presented.

inoculated intravenously as above. Since our results suggest that GBS uses respiration metabolism during infection (Fig. 4), we verified that $P_{ghs0119}$ was induced by heme in respiration conditions (Fig. S8). Imaging was performed at different times following injection. A significant signal (Fig. 7A) was detected in WT($pP_{ghs0119-lux}$)-infected mice 20 h post-infection. At this late stage of infection, total bacterial luminescence in animals was about 5 times that at 13 h (Fig. S8A) and bacterial counts at this late stage of infection were estimated to be ~6 times those at

13 h (Fig. S8A). The heme sensor-associated signal appeared to be localized in the abdominal region and was significant compared to that in mice injected with the control strain WT(pP_{ϕ} -*lux*) (Fig. 7A). Statistical analysis confirmed the significance of the luminescent signal in the abdominal region, indicating that GBS responded to heme during infection (Fig. 7B). Surprisingly, a heme sensor signal was absent in the thorax and head regions (Fig. 7A) where GBS preferentially accumulates (Fig. 2B, 13 h or Fig. S8B, 20 h). Nevertheless, examination of dissected organs revealed heme sensor-associated luminescence in the heart (Fig. 7C, left panel). As expected, this localization coincides with that observed with WT(*plux*) (Fig. 7C, right panel). Weak luminescence driven by P_{gbs0119} compared to the constitutively expressed *plux* (Fig. 7C), and/or signal obstruction by the rib cage might explain why no luminescence was observed in the heart region in whole animals (Fig. 7A). Similarly, a discrete luminescent signal was present in the cortex of dissected kidneys, correlating with the high bacterial load of this organ (Fig. 7D, right panel). Remarkably, in late stage infection (20 h), heme-sensing-driven luminescence in the liver (Fig. 7E, left panel) exhibited an intensity and distribution similar to that of GBS WT(*plux*) (Fig. 7E, right panel). No luminescence was detected in the digestive tract, suggesting that abdominal luminescence in living mice arises essentially from the liver. High P_{gbs0119} -*lux* expression in the liver contrasts with the relatively low GBS bacterial load (compare luminescence intensity in right panels of Fig. 7C,D,E). These observations seem to suggest that GBS is exposed to toxic levels of heme in this organ. Finally, while the brain was colonized by WT(*plux*) and generated a strong signal at 20 h post-infection (Fig. 7F, *plux*), the same strain carrying the heme sensor showed no detectable luminescence (Fig. 7F, pP_{gbs0119} -*lux*). This observation correlates with similar CFUs of WT and Δ *hrtBA* strains in the isolated brain (Fig. 3B). We conclude that GBS is exposed to heme toxicity in the heart, kidneys, and liver, but not in the brain.

Discussion

The dichotomy between toxicity and benefits of heme explains the need for strict management of intracellular heme pools, which may be crucial during infection. In GBS and other bacterial pathogens, homeostasis is mediated by heme efflux *via* HrtBA, whose expression is regulated by HssRS. While HssRS-mediated *hrtBA* regulation is conserved in numerous pathogens, GBS appears to be the first example in which intracellular, rather than extracellular heme is the activating signal²⁸. Heme, hemoglobin, and blood all lead to HrtBA induction, suggesting the adaptability of this system to infection conditions. *In vivo* bioluminescent imaging using a set of bacterial and heme sensors identified host compartments in which heme toxicity or utilization impacts GBS survival. Numerous organs, with the exception of the brain, rely on *hrtBA* to limit heme toxicity. Conversely, the use of heme for bacterial respiration impacts infection of all tested organs including the brain. The need for these heme-related functions appears to increase as infection progresses. Bioimaging revealed that GBS colonization of the liver involves strong induction of heme efflux functions late in infection.

Despite conservation of *hrtBA* and *hssRS* genes, their organization and encoded functions in GBS have unique features. First, *hrtBA* and *hssRS* comprise a single operon, whereas in *S. aureus* and other pathogens, *hrtBA* and *hssRS* are organized as 2 independent operons¹⁷. Only 2 other known Gram-positive bacterial species, (*Granulicatella adjacens* and *Exiguobacterium*, <http://string-db.org/>) share this organization. The organisation of *hrtBA* and *hssRS* as a single operon implicates that both HssRS expression and activation are controlled by heme. The second unique feature of GBS HrtBA regulation resides in the ECD of HssS. Interestingly, while the 134 amino acids predicted to comprise the ECD of *S. aureus* HssS are implicated in heme signal transduction²⁸, in GBS, the ECD is reduced to only 19 amino acid residues, raising doubts on the role of extracellular heme in its activation (Fig. S5). Blast analysis of HssS analogs in several Gram-positive bacteria showed that a reduced ECD is unique to GBS. Our experimental results give strong support that cellular, and not extracellular, heme pools control *hrtBA*/*hssRS* induction and heme efflux (Fig. 6D). We speculate that GBS HssS senses heme through its cytoplasmic and possibly membrane domains by interactions that remain to be investigated. These unique features of *hrtBA*/*hssRS* in GBS support the idea that HrtBA expression control may vary among Gram-positive bacteria as a function of bacterial lifestyle. Our earlier finding that in *L. lactis*, HrtBA is regulated by an intracellular TetR-family heme sensor, HrtR, illustrates this variability¹⁵. It is thus tempting to speculate that differences in host niches, and in bacterial heme utilization and metabolism, might explain disparities in heme sensing mechanisms that control HrtBA expression. While heme is required for robust GBS virulence and respiration metabolism, the mode of heme entry remains unknown. Despite extensive efforts (mutagenesis, blast analysis, proteomic approach using heme affinity chromatography), we failed to identify heme importers in GBS (our unpublished results). Our studies, including recent work in *L. lactis*, suggest that intracellular heme levels are mainly regulated by heme efflux, and suggest that heme is mainly acquired *via* diffusion. It is tempting to speculate that in conditions of heme excess, e.g., in blood, heme efflux is a main strategy used by GBS to maintain intracellular heme homeostasis.

The infection process likely exposes GBS and other invading pathogens to heme-rich organs. The use of bacterial and heme sensors allowed us to show that in GBS, the HrtBA heme efflux system is required for full virulence and survival in the heart, kidney and liver (Fig. 2). GBS behavior differs markedly from that of *S. aureus*, for which a Δ *hrtA* mutant was more virulent than the WT in a mouse model of systemic infection¹⁷. *S. aureus* hypervirulence was correlated to an increase of secreted virulence factors in the Δ *hrtA* mutant in response to intracellular heme accumulation¹⁷. In contrast, attenuated infection by the GBS Δ *hrtBA* mutant implies that it is overcome by toxic amounts of heme in blood and blood-rich cardiac, renal and liver tissues. Free heme concentrations in blood and organs are normally tightly regulated in mammals by a series of mechanisms including dedicated heme-binding proteins that could limit heme availability to invading GBS¹¹. Our results therefore suggest that systemic infection by GBS may lead to massive release of free heme, probably due to its hemolytic activity. Direct observation of heme sensing using P_{gbs0119} -*lux* showed induction in the same blood-rich organs in which host heme was toxic to GBS establishment. Interestingly, the heme sensor was highly induced in the liver late in infection, suggesting that heme availability is progressively increased in the course of infection. HrtBA-mediated heme

efflux may thus be required for GBS survival late in infection. In contrast, deletion of *hrtBA* did not impact the capacity of GBS to colonize cerebral tissue, in keeping with the controlled exchanges between blood and cerebral tissue by the blood brain barrier^{30,31}. Altogether, these results underline the crucial role of host heme homeostasis control for GBS adaptation *in vivo*.

GBS does not biosynthesize heme, but it relies on exogenous heme to activate a respiration metabolism *in vitro*. In contrast to pathogens such as *S. aureus* that depend on host heme as an iron source, GBS has low iron requirements and does not encode identified heme-oxygenases¹³. These observations raise the question of whether environmental heme constitutes a metabolic requirement for GBS during infection. A role for bacterial respiration in virulence was reported for diverse Gram-positive pathogens, including *S. aureus*³² and *Mycobacterium tuberculosis*³³, but unlike GBS, these bacteria biosynthesize heme and are autonomous for respiration. Our present and previous results give strong evidence that exogenous heme-activated respiration metabolism is required for successful infection²⁰. This result correlates here with impaired colonization by the GBS Δ *cydA*(*plux*) strain of organs usually targeted by GBS, i.e., the heart, kidney and brain. Thus, while *in vitro* GBS heme requirements are facultative, they are essential and obligatory *in vivo*. We hypothesize that respiration metabolism increases bacterial robustness and reduces heme toxicity (by its incorporation in cytochrome oxidase), both of which might improve GBS fitness and survival in the hostile host environment. Identification of heme as a key player of GBS virulence could lead to novel antimicrobial strategies that inhibit GBS respiration or HrtBA-related functions.

Methods

Ethics statement. Animal experiments were carried out in strict accordance with the recommendations in the guidelines of the Code for Methods and Welfare Considerations in Behavioural Research with Animals of the EEC council (Directive 2010/63/EU). The protocols were approved by the Animal Care and Use Committee at the Research center of Jouy en Josas (COMETHEA; protocol number 15–61) and by the Ministry of Education and Research (APAFIS#2277-2015081917023093 v4). All efforts were undertaken to minimize animal suffering. All experimental procedures were performed in biosafety level 2 facilities.

Bacterial strains. GBS strain NEM316, whose genome sequence is known, belongs to the capsular serotype III strain (GBS) and was isolated from a case of fatal septicemia³⁴. The GBS Δ *hrtBA* and Δ *hssRS* mutants were constructed as described in S1 Text and S1 Table. The Δ *cydA* mutant was generated as described previously³⁵. Characteristics of relevant plasmids are described in S1 Table.

Bacterial Growth Conditions and Media. GBS and its derivatives were grown as overnight (ON) precultures at 37 °C in rich M17 liquid broth (DIFCO) supplemented with 0.2% glucose. Heme content of this medium is below 0.5 μ M (data not shown), and is insufficient to activate heme-related functions in GBS. Precultures were diluted in M17 medium supplemented with 1% glucose for further use in fermentation conditions. When indicated, GBS WT and mutants were plated on M17/agar plates supplemented with 1% glucose or blood plates (Columbia agar, 5% sheep blood; Biomerieux, France). *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37 °C with aeration by shaking at 180 rpm. When needed, antibiotics were used as follows: 50 μ g/ml kanamycin and 10 μ g/ml chloramphenicol for *E. coli*; 5 μ g/ml erythromycin and 5 μ g/ml chloramphenicol for GBS. Hemin was prepared from a stock solution of 10 mM hemin chloride dissolved in 50 mM NaOH; Frontier Scientific, USA). 10 mM Hb (Sigma, Saint-Louis) stock solution was prepared freshly in PBS. Fresh heparinized mouse blood (BALB/c) was purchased from Janvier laboratory (France) and used within 24 h of blood withdrawal.

β -galactosidase assays. β -galactosidase (β -gal) activity was assayed on bacteria grown as described in the previous section. Briefly, GBS strains were grown to OD_{600nm} = 0.5 and then incubated for 1 h with the indicated concentrations of hemin or Hb and for 3 h in the case of blood. β -galactosidase activity was quantified by luminescence in a infinite M200 luminescence reader (TECAN, Germany) using the β -glo assay system as described¹⁵. All β -galactosidase results represent the mean $\pm$ standard deviation from triplicate samples and are representative of 3 independent experiments

Heme toxicity assay on plates. Stationary phase cultures were diluted 1/10 with 0.6% melted agar in H₂O and plated above solid M17 medium containing 1% glucose. 10 μ l of hemin (10 mM) was pipetted directly onto the mixture bacteria and agar, and incubated ON at 37 °C.

Cellular status of heme. Bacteria were grown to OD_{600nm} = 0.5 prior to addition or not of 2 μ M ⁵⁷FePPIX (Frontier Scientific, USA) for 1 h. Cells were washed 3 times in PBS. Cell pellets were desiccated and mineralized by successive incubations in 65% nitric acid solution. ⁵⁷Fe was quantified by inductively coupled plasma mass spectroscopy (Agilent 7700X, USA).

Mouse virulence assay. For systemic injection, GBS strains were prepared as follows: GBS precultures were diluted and grown in M17 with 1% glucose to OD_{600nm} = 0.5 that was determined to correspond to 6.10⁸ CFU/ml. Bacteria were then centrifuged at 6000 rpm at 4 °C for 15 min and pellets were resuspended in PBS to a final concentration of 2.10⁸ cells/ml. Bacterial stocks were aliquoted and frozen in liquid nitrogen. Aliquots were kept at –80 °C until use. Bacterial counts were confirmed by plating serial dilutions of cultures. 6 week old female BALB/c mice (Janvier, France) were anesthetized intraperitoneally with 100 μ g/g ketamine and 15 μ g/g xylazine. For systemic inoculation, 2.10⁷ bacteria in a 100 μ l volume were injected into the retro-orbital vein of the right eye. When indicated the ventral area of animals was shaven prior to infection. Detection of luminescence (see below) in whole animals (0 time point) was performed immediately following injection (see above). Detection of light emission at time 0 (strains carrying the *plux* plasmid) indicated that were not successfully injected (luminescence localized mostly in the head around the injection site); such individuals were excluded from the experiment

and immediately euthanized. Following image acquisition, mice were removed from the IVIS 200 imaging system and immediately sacrificed by cervical dislocation. When indicated, the animals were dissected for imaging of the isolated organs or determination of CFU. For that purpose, each organ was homogenized with an Ultra-Turrax (IKA Works, Germany) in 2 ml PBS and bacterial load within each organ was quantified by plating serial dilutions of the organ homogenate and counting CFU. Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA) was used for statistical analyses as indicated in the figure legends.

In vivo imaging. Light emission from whole animals was measured in an *in vivo* imaging system (IVIS 200, Caliper Life Sciences, USA) equipped with the Living image software (version 4.0, Caliper Life Science, USA). IVIS 200 was also used to evaluate luminescence on agar plates or from isolated organs (see above). Bioluminescence images were acquired with a 25 cm field of view (FOV), medium or large binning factor and an exposure time as indicated. A digital false-color photon emission image was generated according to photon counts within a constant region of interest (ROI) corresponding to the surface of the entire mouse. Rainbow images show the relative level of luminescence ranging from low (blue), to medium (green), to high (yellow/red). Photon emission was measured in radiance ($\text{p.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}.\text{sr}^{-1}$). Threshold parameters were chosen to maintain the luminescence detection under saturation level and were kept identical within an experiment. Images were adjusted for brightness and contrast using PhotoShop CS3 (Adobe Systems, San Jose, CA) with parameters kept identical in all images of the same figure. Quantitative analysis of bioluminescence of whole bodies or selected abdominal areas (in the case of the heme sensor) corresponding to a selected ROI was performed taking into account the contribution of the background light emission. ROI measurements are expressed in total flux of photons (p/s).

References

1. Satak, R., Lesuisse, E., Tachezy, J. & Richardson, D. R. Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends Microbiol.* **16**, 261–268, doi: 10.1016/j.tim.2008.03.005 (2008).
2. Kumar, S. & Bandyopadhyay, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* **157**, 175–188, doi: 10.1016/j.toxlet.2005.03.004 (2005).
3. Anzaldi, L. L. & Skaar, E. P. Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect. Immun.* **78**, 4977–4989, doi: 10.1128/IAI.00613-10 (2010).
4. Pishchany, G. & Skaar, E. P. Taste for blood: hemoglobin as a nutrient source for pathogens. *PLoS Pathog.* **8**, e1002535, doi: 10.1371/journal.ppat.1002535 (2012).
5. Jordan, J. A., Hall, G. & Davis, T. Multicenter study evaluating performance of the Smart Group B Streptococcus (GBS) assay using an enrichment protocol for detecting GBS colonization in patients in the antepartum period. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3193–3197, doi: 10.1128/JCM.00106-10 (2010).
6. Le Doare, K. & Heath, P. T. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine* **31** Suppl 4, D7–12, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.01.009 (2013).
7. Baker, C. J. The spectrum of perinatal group B streptococcal disease. *Vaccine* **31** Suppl 4, D3–6, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.030 (2013).
8. Farley, M. M. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin. Infectious Dis.* **33**, 556–561, doi: 10.1086/322696 (2001).
9. Sendi, P., Johansson, L. & Norrby-Teglund, A. Invasive group B Streptococcal disease in non-pregnant adults : a review with emphasis on skin and soft-tissue infections. *Infection* **36**, 100–111, doi: 10.1007/s15010-007-7251-0 (2008).
10. Nagababu, E. & Rifkind, J. M. Heme degradation by reactive oxygen species. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 967–978, doi: 10.1089/ars.2004.6.967 (2004).
11. Gruss, A., Borezee-Durant, E. & Lechardeur, D. Environmental heme utilization by heme-auxotrophic bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **61**, 69–124, doi: 10.1016/B978-0-12-394423-8.00003-2 (2012).
12. Joubert, L., Derre-Bobillot, A., Gaudu, P., Gruss, A. & Lechardeur, D. HrtBA and menaquinones control haem homeostasis in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **93**, 823–833, doi: 10.1111/mmi.12705 (2014).
13. Haley, K. P. & Skaar, E. P. A battle for iron: host sequestration and Staphylococcus aureus acquisition. *Microbes Infect.* **14**, 217–227, doi: 10.1016/j.micinf.2011.11.001 (2012).
14. Bibb, L. A. & Schmitt, M. P. The ABC transporter HrtAB confers resistance to hemin toxicity and is regulated in a hemin-dependent manner by the ChrAS two-component system in Corynebacterium diphtheriae. *J. Bact.* **192**, 4606–4617, doi: 10.1128/JB.00525-10 (2010).
15. Lechardeur, D. *et al.* Discovery of an intracellular heme-binding protein, HrtR, that controls heme-efflux by the conserved HrtB HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **287**, 4752–4758, doi: 10.1074/jbc.M111.297531 (2012).
16. Stauff, D. L. & Skaar, E. P. Bacillus anthracis HssRS signalling to HrtAB regulates haem resistance during infection. *Mol. Microbiol.* **72**, 763–778, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06684.x (2009).
17. Torres, V. J. *et al.* A Staphylococcus aureus regulatory system that responds to host heme and modulates virulence. *Cell Host Microbe* **1**, 109–119, doi: 10.1016/j.chom.2007.03.001 (2007).
18. Stauff, D. L., Torres, V. J. & Skaar, E. P. Signaling and DNA-binding activities of the Staphylococcus aureus HssR-HssS two-component system required for heme sensing. *J. Biol. Chem.* **282**, 26111–26121, doi: 10.1074/jbc.M703797200 (2007).
19. Fernandez, A. *et al.* Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.* **6**, e1000860, doi: 10.1371/journal.ppat.1000860 (2010).
20. Yamamoto, Y. *et al.* Respiration metabolism of Group B Streptococcus is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence. *Mol. Microbiol.* **56**, 525–534, doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04555.x (2005).
21. Yamamoto, Y. *et al.* Roles of environmental heme, and menaquinone, in Streptococcus agalactiae. *Biometals* **19**, 205–210, doi: 10.1007/s10534-005-5419-6 (2006).
22. Duwat, P. *et al.* Respiration capacity of the fermenting bacterium Lactococcus lactis and its positive effects on growth and survival. *J. Bact.* **183**, 4509–4516, doi: 10.1128/JB.183.15.4509-4516.2001 (2001).
23. Gaudu, P. *et al.* Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**, 263–269 (2002).
24. Lechardeur, D. *et al.* Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**, 143–149, doi: 10.1016/j.copbio.2010.12.001 (2011).
25. Zhou, W. T. & Yamamoto, S. Effects of environmental temperature and heat production due to food intake on abdominal temperature, shank skin temperature and respiration rate of broilers. *Br. Poult. Sci.* **38**, 107–114, doi: 10.1080/00071669708417949 (1997).
26. Andreu, N., Zelmer, A. & Wiles, S. Noninvasive biophotonic imaging for studies of infectious disease. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 360–394, doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00252.x (2011).

27. Maurer, J. J. & Mattingly, S. J. *In vitro* method to differentiate isolates of type III *Streptococcus agalactiae* from symptomatic and asymptomatic patients. *J. Clin. Microb.* **26**, 686–691 (1988).
28. Mike, L. A. *et al.* Activation of heme biosynthesis by a small molecule that is toxic to fermenting *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 8206–8211, doi: 10.1073/pnas.1303674110 (2013).
29. Stauff, D. L. *et al.* *Staphylococcus aureus* HrtA is an ATPase required for protection against heme toxicity and prevention of a transcriptional heme stress response. *J. Bact.* **190**, 3588–3596, doi: 10.1128/JB.01921-07 (2008).
30. Dang, T. N., Robinson, S. R., Dringen, R. & Bishop, G. M. Uptake, metabolism and toxicity of heme in cultured neurons. *Neurochem. Int.* **58**, 804–811, doi: 10.1016/j.neuint.2011.03.006 (2011).
31. Robinson, S. R., Dang, T. N., Dringen, R. & Bishop, G. M. Heme toxicity: a preventable source of brain damage following hemorrhagic stroke. *Redox Rep.* **14**, 228–235, doi: 10.1179/135100009X12525712409931 (2009).
32. Hammer, N. D. *et al.* Two heme-dependent terminal oxidases power *Staphylococcus aureus* organ-specific colonization of the vertebrate host. *mBio* **4**, doi: 10.1128/mBio.00241-13 (2013).
33. Shi, L. *et al.* Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under *in vitro* conditions affecting aerobic respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 15629–15634, doi: 10.1073/pnas.0507850102 (2005).
34. Gaillot, O., Poyart, C., Berche, P. & Trieu-Cuot, P. Molecular characterization and expression analysis of the superoxide dismutase gene from *Streptococcus agalactiae*. *Gene* **204**, 213–218 (1997).
35. Yamamoto, Y. *et al.* The Group B *Streptococcus* NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. *Mol. Microbiol.* **62**, 772–785, doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05406.x (2006).

Acknowledgements

This work was supported by the HemeStockExchange ANR-12-BSV3-0022-01 project by the French “Agence Nationale de la Recherche” and by funding from the French National Research Agency ANR-11-IDEX-0003-02; “ALIAS” project. LJ was the recipient of a doctoral fellowship from the French National Research Agency ANR-11-IDEX-0003-02; “ALIAS” project. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank Chantal Doucet (Université de Montpellier II) for ICP-MS, Jérôme Pottier and all members of the “Unité Expérimentale Animalerie Rongeurs” (INRA, Jouy en Josas) for their technical help for animal studies. We are grateful to the MIMA2 platform for access to IVIS200.

Author Contributions

L.J. and D.L. designed, performed and analysed the experimental work. J.B.D. and A.D.B. assisted L.J. for animal studies and their analysis. A.F., I.F., E.B.D. constructed plasmids. LJ and DL prepared figures. DL and AG wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <http://www.nature.com/srep>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

How to cite this article: Joubert, L. *et al.* Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*. *Sci. Rep.* **7**, 40435; doi: 10.1038/srep40435 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2017

Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*

Laetitia Joubert, Jean-Baptiste Dagieu, Annabelle Fernandez, Aurélie Derré-Bobillot, Elise Borezée-Durant, Isabelle Fleurot, Alexandra Gruss and Delphine Lechardeur

Supplementary informations

Supplementary Methods

Plasmid constructions. Plasmid pP_Ø-*lux* (pTCV-J22, Table S1) was constructed using the Gibson assembly method¹. Briefly, the *luxABCDE* operon was PCR-amplified using pXen5 as a template with oligonucleotides O1 and O2 (Table S2). The entire backbone except the *lac* gene of the pTCV-*lac* plasmid was PCR-amplified with O3 and O4 (Table S2). The 2 resulting DNA fragments were ligated as described¹. Plasmids pP_{gbs0119}-*lux* (pTCV-J23) and *plux* (pTCV-J24) were constructed as follows: DNA fragments containing P_{gbs0119} were PCR amplified from pP_{gbs0119}-*lac* (pTCV-J21) and P₂₃ from *phrtBA*² with the primer pairs O5/O6 and O7/O8 respectively (Tables S1 and S2). The 2 PCR products were gel purified, digested with *EcoRI* and *BamHI* and ligated with the plasmid pP_Ø-*lux* (pTCV-J22, Table S1). The pP₂₃-*hrtBA*, P_{gbs0119}-*lac* (pTCV-J25, Table S1) was obtained by an overlap of 3 PCRs : P₂₃ amplified from *phrtBA*² with primer O7/O9; *hrtBA* and P_{gbs0119} from genomic DNA of GBS NEM316 with primers O10/O11 and O12/O6. The resulting PCR product was digested by *EcoRI* and *BamHI* and ligated into the *EcoRI* and *BamHI* restriction sites of pTCV-*lac* (Tables S1 and S2). All inserts were sequenced.

Construction of GBS $\Delta hrtBA$ and $\Delta hssRS$ mutant strains. The $\Delta hrtBA$ GBS (NEMJ18, Table S1) mutant strain was obtained by PCR amplification of 2 fragments of ~ 450 bp flanking the *gbs0119-0120* genes using primer pairs O13/O14 and O15/O16 respectively (Table S2). Following digestion by *BamHI*, both fragments were ligated together and purified, and the resulting ligation product was amplified using O13 and O16. The amplicon was then digested by *EcoRI* and cloned into the temperature-sensitive shuttle vector, pG+host1³ giving rise to the p $\Delta hrtBA$ plasmid (pTCV-J26, Table S1). The GBS $\Delta hssRS$ mutant strain (NEMJ19, Table S1) was constructed as follows: 2 fragments of ~ 500 bp

flanking the *gbs0121-0122* genes were amplified from genomic DNA of GBS NEM316 by PCR using primer pairs O17/O18 and O19/O20 (Table S2). The 2 DNA fragments were fused together by PCR-overlap with primers O17 and O20. The resulting 1.1 kb fragment was gel-purified, digested by *SalI* and *EcoRI*, and cloned into pG+host1³ giving rise to the p Δ *hssRS* plasmid (pTCV-J27, Table S1). The recombinant vectors were introduced by electroporation into GBS strain NEM316 at 28°C. The double-crossover events leading to the expected gene disruptions were obtained as described³. Correct inactivation was confirmed by PCR analysis with oligonucleotides hybridizing outside the region of the double-crossover events. The mutants pTCV-J26 and pTCV-J27 are respectively referred to as Δ *hrtBA* and Δ *hssRS* in the manuscript (Table S1).

References

1. Gibson, D. G. *et al.* Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature methods* **6**, 343-345, doi:10.1038/nmeth.1318 (2009).
2. Lechardeur, D. *et al.* Discovery of an intracellular heme-binding protein, HrtR, that controls heme-efflux by the conserved HrtB HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* **287**, 4752-4758, doi:10.1074/jbc.M111.297531 (2012).
3. Biswas, I., Gruss, A., Ehrlich, S. D. & Maguin, E. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* **175**, 3628-3635 (1993).

Supplementary Tables

Table S1. Strains and plasmids used in this study.

<i>Strain/plasmid</i>	<i>Characteristics</i>	<i>Source/ reference</i>
Strain		
<i>E. coli</i>		
TOP10	<i>F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Ø80lacZΔM15 lacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1</i>	Invitrogen
<i>S. agalactiae</i>		
NEM316	Serotype III isolated from neonatal blood culture	1
NEMJ17	NEM316 <i>cydA::aphA3</i> , kan ^R	2
NEMJ18	NEM316 Δ <i>hrtBA</i> , deletion of <i>hrtB</i> and <i>hrtA</i> genes	This study
NEMJ19	NEM316 Δ <i>hssRS</i> , deletion of <i>hssR</i> and <i>hssS</i> genes	This study
Plasmid		
pTCV- <i>lac</i>	Conjugative <i>E. coli</i> Gram-positive bacteria shuttle plasmid with β -galactosidase reporter construct. Ery ^R Kan ^R	3
pXen5	Conjugative <i>E. coli</i> Gram-positive bacteria shuttle plasmid with <i>luxABCDE</i> reporter construct. Ery ^R	Perkin Elmer
pTCV-J21	pP _{gbs0119} - <i>lac</i> , <i>gbs0119</i> promoter region cloned into pTCV- <i>lac</i> . Ery ^R Kan ^R	4
pTCV-J22	P _Ø - <i>lux</i> , <i>luxABCDE</i> reporter genes Ery ^R Kan ^R	This study
pTCV-J23	pP _{gbs0119} - <i>lux</i> , <i>gbs0119</i> promoter cloned in pTCV-J23. Ery ^R Kan ^R	This study
pTCV-J24	<i>lux</i> , P ₂₃ promoter cloned in pTCV-J23. Ery ^R Kan ^R	This study
pTCV-J25	pP ₂₃ <i>hrtBA</i> , P _{gbs0119} - <i>lac</i> , expression of <i>hrtBA</i> with the constitutive promoter P ₂₃ , cloned into pTCV-J21	This study
pTCV-J26	p Δ <i>hrtBA</i> , <i>hrtBA</i> fragment cloned into pG+host1 to obtain the Δ <i>hrtBA</i> mutant	This study
pTCV-J27	p Δ <i>hssRS</i> , <i>hssRS</i> fragment cloned into pG+host1 to obtain the Δ <i>hssRS</i> mutant	

Table S2. Oligonucleotides used in this study.

<i>Primer</i>	<i>Sequence 5'-3'</i>	<i>Target</i>
O1	CTTTTATATAGGGAAAAGGTGGTGAGAAGCTTCTGCAG ATGAAGCAAGAG	<i>luxABCDE</i>
O2	CTTAACCGAAGCGTTTGATAGTTAATCTTTATTTATCAG CCG GAAAACCT	<i>luxABCDE</i>
O3	AGGTTTTCCGGCTGATAAATAAAGATTAACTATCAAAC GCTTCGGTTAAG	pTCV- <i>lac</i>
O4	CTCTTGCTTCATCTGCAGAAGCTTCTCACCACCTTTTCC CTATATAAAAAG	pTCV- <i>lac</i>
O5	ATACGCCAGAATTCTCGGCGAC	P _{gbs0119}
O6	CCTTGGATCCTTTGATGTGAAC	P _{gbs0119}
O7	CCGGAATTC CGTTCCTAAAAAGGAATAAGC	P ₂₃
O8	CGCGGATCCCTAGAATTTAATTCTAATACT	P ₂₃
O9	CATGTGACATGGTTTTTCTCCTTTGTAGAATTTAATTCT AATACTATTTT	P ₂₃
O10	AAAATAGTATTAGAATTAAATTCTACAAAGGAGAAAAA CCATGTCACATG	<i>hrtBA</i>
O11	AACAAGAGCCATTTAGAAGAAGAGTTTAGAAGT TTTCTTTAACTAATTTC	<i>hrtBA</i>
O12	GAAATTAGTTAAAGAAAACCTTCTAAACTCTTCTTCTAAA TGGCTCTTGTT	P _{gbs0119}
O13	TAGGAATTCTTCAACTCCTC	<i>gbs0119</i>
O14	ATTGGATTCAAGCATGTGACA	<i>gbs0119</i>
O15	TGGGGATTACGATGAGCGC	<i>gbs0120</i>
O16	AGTTTTTATCAGTTTTCCATTTTA	<i>gbs0120</i>
O17	CCGGTCGACTATGTCAATCATGAGAACGTT	<i>gbs0121</i>
O18	TTGGCAGTTATTGTTTTAAATAATAAATCACCTCTAGCT TATTG	<i>gbs0121</i>
O19	CAATAAGCTAGAGGTGATTTATTATTTAAAACAATAAC TGCCA	<i>gbs0122</i>
O20	CGGGAATTCCACTTGGTCATTTCTTTAC	<i>gbs0122</i>

References

1. Gasson, M. J. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. *Journal of bacteriology* **154**, 1-9 (1983).
2. Yamamoto, Y. *et al.* Roles of environmental heme, and menaquinone, in *Streptococcus agalactiae*. *Biometals : an international journal on the role of metal*

- ions in biology, biochemistry, and medicine* **19**, 205-210, doi:10.1007/s10534-005-5419-6 (2006).
3. Maguin, E., Prevost, H., Ehrlich, S. D. & Gruss, A. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *Journal of bacteriology* **178**, 931-935 (1996).
 4. Fernandez, A. *et al.* Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.* **6**, e1000860, doi:10.1371/journal.ppat.1000860 (2010).

Supplementary Figure legends

Figure S1. Hemin toxicity. (A-B) Growth of WT (A) and $\Delta hrtBA$ (B) in the presence of hemin. Precultures of the indicated bacteria grown in M17 with 0.2 % glucose were diluted to $OD_{600nm} = 0.01$ in a 96 well plate (200 μ l M17 with 1 % glucose with the indicated concentration of hemin). OD_{600nm} was measured at 37°C each 30 min during 12 h in an infinite M200 spectrolumineter (TECAN, Austria). Results are representative of three independent experiments.

Figure S2. Evaluation of luminescent GBS strains for *in vivo* experiments. (A) *lux* stability in GBS. WT(*lux*) was grown ON at 37°C in M17 supplemented with 0.2 % glucose and 3 μ g/ml erythromycin. The culture was then diluted 1/1000 in M17 supplemented with 1 % glucose without antibiotics and grown over a 5 days period with a serial dilution every 24h. Aliquots were taken every day for CFU determinations on solid medium containing or not 3 μ g/ml erythromycin. Plasmid stability was calculated as the percentage of antibiotic resistant cells bacteria compared to the total CFU. (B) Correlation between CFU and luminescence. A GBS WT(*lux*) preculture was diluted to an $OD_{600nm} = 0.01$ in M17 supplemented with 1 % glucose and grown at 37°C. At different times ranging from 0 to 8 h, 200 μ l of the culture was removed, luminescence was quantified in a Biolumate LB9500T luminometer (Berthold, Germany) and CFU were determined by serial dilution and plating on agar plates containing 3 μ g/ml erythromycin. (C) Growth profile of WT and WT(*lux*) GBS strains. Precultures of the indicated bacteria grown in M17 with 0.2 % glucose were diluted to an $OD_{600nm} = 0.01$ and grown as in Fig. S1A. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure S3. *In vitro* evaluation of bioluminescence of WT(*lux*), $\Delta hrtBA$ (*lux*) and $\Delta cydA$ (*lux*) (A) Evaluation of luminescence emission by WT(*lux*) and $\Delta hrtBA$ (*lux*) during growth in liquid culture. Precultures of the indicated bacteria grown in M17 with 0.2 % glucose were diluted to an $OD_{600nm} = 0.01$ in 200 μ l M17 with 1 % glucose in a 96-well white plate with clear bottom (Greiner). OD_{600nm} and luminescence were measured each 30 min during 10 h in an infinite M200 spectrolumineter (TECAN, Austria). Results are representative of 3 independent experiments. (B) Evaluation of luminescence emission by WT(*lux*) and $\Delta cydA$ (*lux*) during growth. Luminescence was evaluated as in (B).

Figure S4. Heme-dependent induction of the P_{gbs0119} promoter. (A) WT and ΔhrtBA GBS strains transformed with $P_{\text{gbs0119-lac}}$ were grown to $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.5$. β -galactosidase activity was induced for 1 h in the presence of the indicated concentrations of hemin and quantified by luminescence (Materials and Methods). Results represent the mean $\pm$ standard deviation from triplicate samples. (B) Evaluation of luminescence emission by WT ($P_{\text{gbs0119-lux}}$) during growth in liquid culture. Precultures of the indicated bacteria grown in M17 with 0.2 % glucose were diluted to an $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.01$ in 200 μl M17 with 1 % glucose in a 96-well white plate with clear bottom with the indicated concentration of hemin. $\text{OD}_{600\text{nm}}$ and luminescence were measured each 30 min during 10 h in an infinite M200 spectroluminometer (TECAN, Austria). Results are representative of 3 independent experiments.

Figure S5. Comparison of *S. aureus* Newman and GBS NEM316 HssS amino acid sequences and membrane topologies. Alignments were determined with the EMBL-EBI multiple sequence alignment program MUSCLE (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>). The transmembrane topology prediction of the proteins was established with TopPred 1.10 program through the Pasteur Institute MOBYLE portal (<http://mobyale.pasteur.fr>). Cytoplasmic domains are indicated in black, transmembrane helixes in orange, and the extracellular loop (ECD) in green.

Figure S6. GBS WT(*lux*) luminescence in mice 20 h following the inoculation of GBS WT(*lux*). BALB/c mice were infected with $2 \cdot 10^7$ CFU of WT(*lux*) as described in Fig. 3 and Fig. 4. The luminescence was determined with the IVIS 200 imaging system (acquisition time, 5 min; binning 16). (A) Quantification of bioluminescence in live mice. Images were analyzed by measuring the total light flux (number of photons per second) as in Fig. 2C. To show progression of infection between 13 h and 20 h, data from Fig. 3B were reported on the same graph. Values correspond to batches of 25 mice for each time point. Two tailed Mann-Whitney was used to determine P values: 8 h/13 h, $P = 0.0001$; 13 h/20 h, $P = 0.0075$ (**, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). (B) Overall luminescence of anesthetized mice infected with GBS WT(*lux*) at 20 h post-infection. To visualize relative bacterial loads in the head/thorax regions compared to the abdomen, the bioluminescence sensitivity threshold was lowered on acquired images (acquisition time, 5 min; binning 16). Results are representative of 3 experiments.

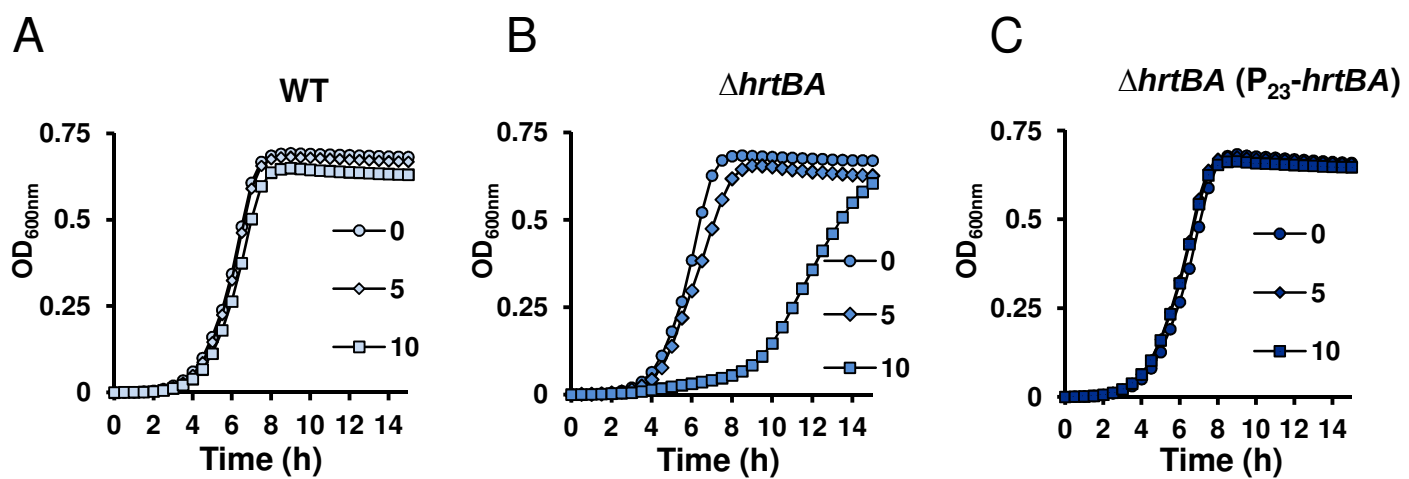


FIGURE S1

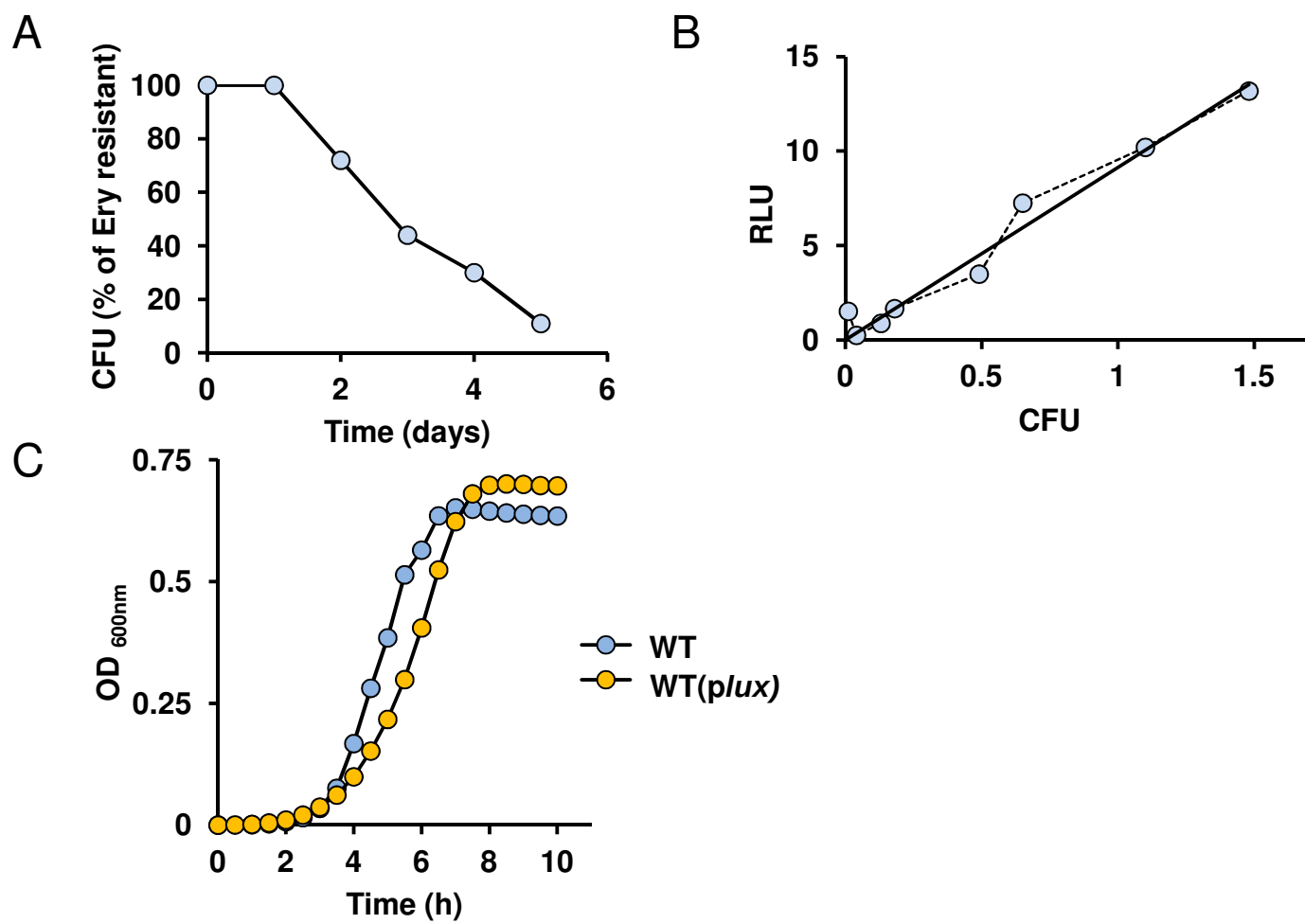
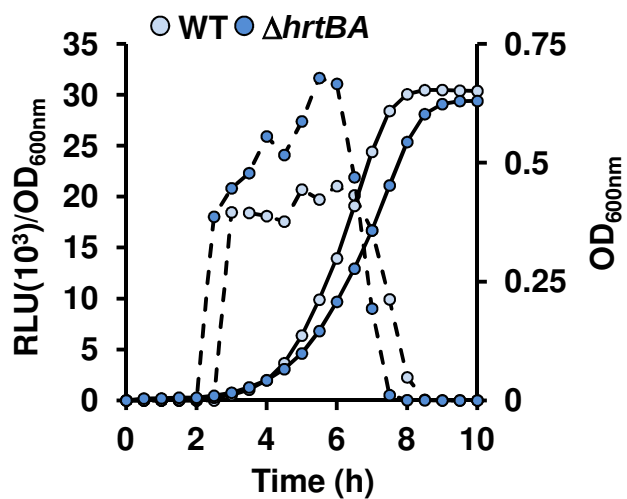


FIGURE S2

A



B

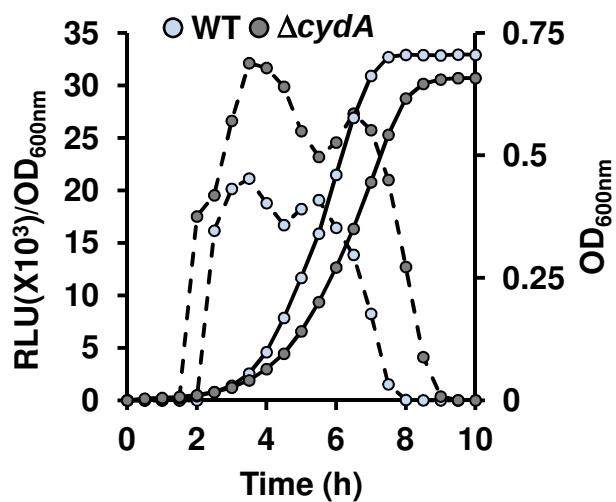


FIGURE S3

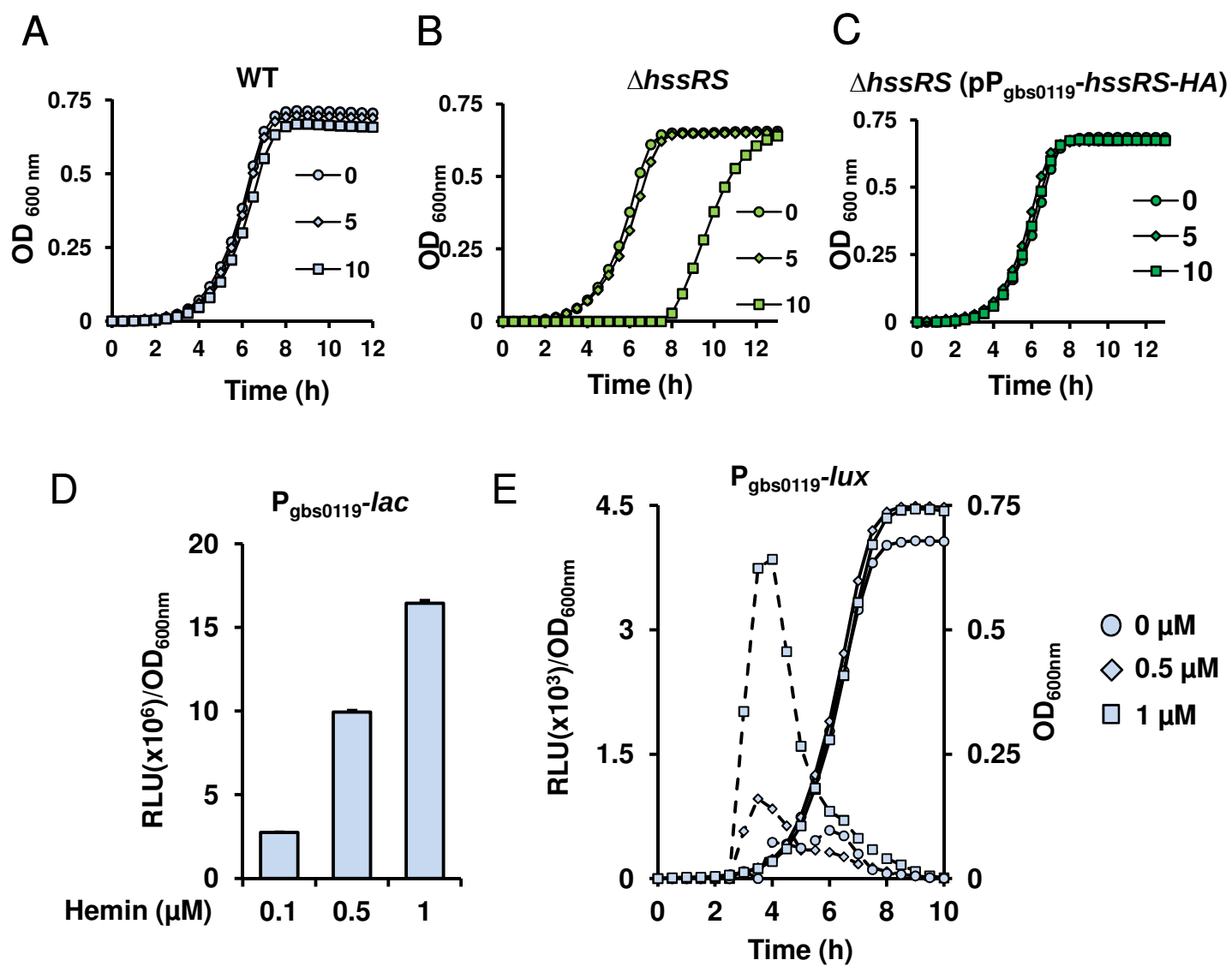


FIGURE S4

NWMN_2264	MFKTLYAR IAIYSITVILFSALISFVL TVYYHYNLKASNDAKIMKTLKE	50
GBS0122	MTKLRRFRFPLR----- FYFTLMFVLT ----- MLFSVLASLLLVAAI	37
	* * * : : * : **** : * * : : .	
NWMN_2264	ARQYEQSAKPTHIQQYFKHLGQMNYQIMTIDQKGHKTFYGEFPFREDT LSQ	100
GBS0122	VFTFFQGVLTTHVLQVS -----	54
	. : * . . ** : *	
NWMN_2264	NAINNVLNNQDYHGKDKPFALFVTGFFDNVTDNTVGINFKTKDGSIAVF	150
GBS0122	-----	
NWMN_2264	MRPDIGET FSEFR TF LAVLL MLLLFISISLV IASTYSIIRPVKKLKATE	200
GBS0122	----- ALAVVFLSLVIASISMWYG -SYHLTKPILDISRIVS	89
	***: : * : * : . : * : : * : . .	
NWMN_2264	RLIDGDFETPIKQTRK-----DEIGTLQYHFNKMRESLGQVDQMRQH	242
GBS0122	NVADGDFEGHIYRNSNRRKSYEYYNELDESESINQMIVSLSHMDHMRKD	139
	. : ***** * . : : * : . : * : * : * : * : *	
NWMN_2264	FVQNVSHEIKTPLTHIHLLSELQQT-SDKTLRQQYINDIYTITTQLSGL	291
GBS0122	FITNVSHELKTPIAAVANIVELLQDPELDEETQSELLGLVKTESLRLTRL	189
	* : ***** : * : : : . * : . : : : * : : * : *	
NWMN_2264	TTELLLLSELDNHQHLLFDDKIQVNQLIKDIIRHEQFAADEKSLIILADL	341
GBS0122	CDTMLQMSRVDNQETIGELSSVRVDEQIRQAMISLTERWQAKRINFQLDS	239
	: * : * : * : : . : * : * : * : : * : : *	
NWMN_2264	ESINFLGNQRLLHQALSNNLLINAIKYTDVGGAIDIALQSHNNIIFTISN	391
GBS0122	KPYTVYSNSDLLMQVWINLLDNAIKYSDDIVDLRVRMEETNNHYLRVIIS	289
	: . . . * . * * * . * * * * : * : : : : * : : * .	
NWMN_2264	D-GSPISPQAEARLFRFYKVS KHDN--SNGLGLAITKSIIE LHG TIQF	438
GBS0122	DKGRGISQYDVQHIFDKFYQADQSHNQGNGLGLAIVKR IIVLCKGRISV	339
	* * * : * : * : * : . * . * * * * . * * * : * * .	
NWMN_2264	TQSNEYVTTFTITLPNNSL	457
GBS0122	SSQFEIGTEFCVELPLS--	356

FIGURE S5

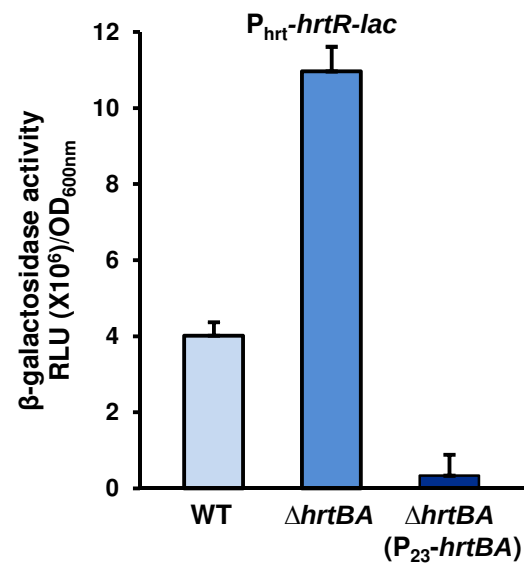


FIGURE S6

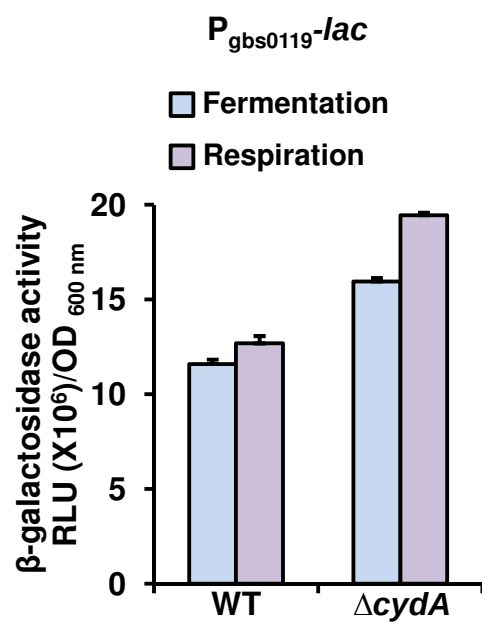


FIGURE S7

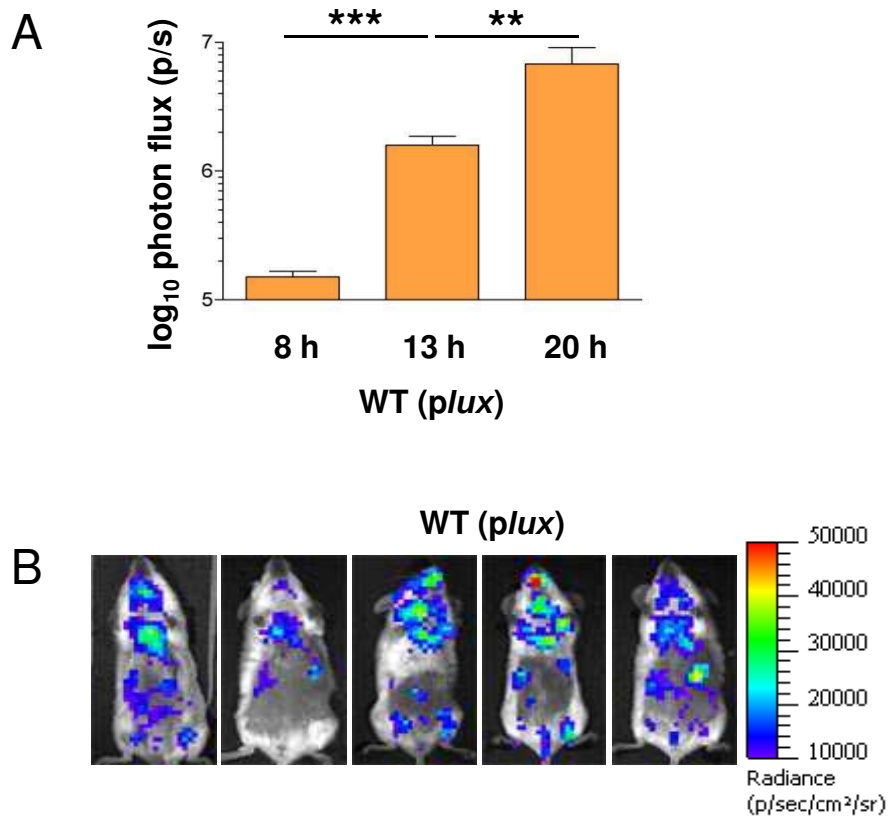


FIGURE S8

B.5 Principales conclusions

✓ Caractérisation de la régulation du transporteur d'efflux HrtBA chez *S. agalactiae*.

Chez *S. agalactiae*, l'expression de HrtBA est contrôlée par le système à deux composants HssRS de manière similaire à celui de *S. aureus* (Torres *et al.*, 2007). Cependant, l'organisation génomique des gènes *hrtBA* et de ceux du TCS *hssRS* sont regroupés en un seul opéron ce qui est unique parmi les pathogènes.

Nous avons aussi démontré que la régulation du TCS HssRS est activé par l'hème intracellulaire et non pas par l'hème extracellulaire comme il a été démontré chez *S. aureus* (Stauff *et al.*, 2007). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec la quasi absence de boucle extracellulaire de HssS chez *S. agalactiae*.

Ces données nous ont permis de mettre en évidence la possibilité de considérer que l'induction de HrtBA associé à l'activation de HssRS en présence d'hème chez *S. agalactiae* comme un senseur d'hème intracellulaire. Ce système sera utilisé comme outil pour détecter le sensing de l'hème et par extension l'acquisition de l'hème chez *S. agalactiae in vivo*.

✓ L'hème de l'hôte joue un rôle essentiel dans la virulence de *S. agalactiae*

La forte diminution de la multiplication de *S. agalactiae* dans notre modèle d'infection systémique d'un mutant hypersensible à l'hème ($\Delta hrtBA$) et d'un mutant qui ne peut compléter sa chaîne respiratoire ($\Delta cydA$) démontrent la nécessité absolue de *S. agalactiae* à s'adapter à l'hème de l'hôte pour pouvoir assurer une infection. De plus, nos données confirment le caractère obligatoire de la dépendance à l'hème de l'hôte de *S. agalactiae in vivo*.

Notre étude illustre, par l'exemple de l'hème, l'impératif pour une bactérie pathogène à GRAM positif de s'adapter à son hôte, en contrôlant la toxicité de cette molécule tout en assurant ses besoins pour compléter sa chaîne respiratoire.

✓ La toxicité de l'hème dans les organes et corrélée à la présence du sang.

L'impact de la délétion de HrtBA sur les capacités infectieuses de *S. agalactiae* est particulièrement important dans les organes tels que le cœur ou les reins. Par contre, la mutation ne semble pas affecter la capacité de *S. agalactiae* à se disséminer dans le cerveau. Nous concluons qu'il existe une corrélation entre la présence de sang et l'impact de HrtBA sur la virulence de *S. agalactiae* dans les organes.

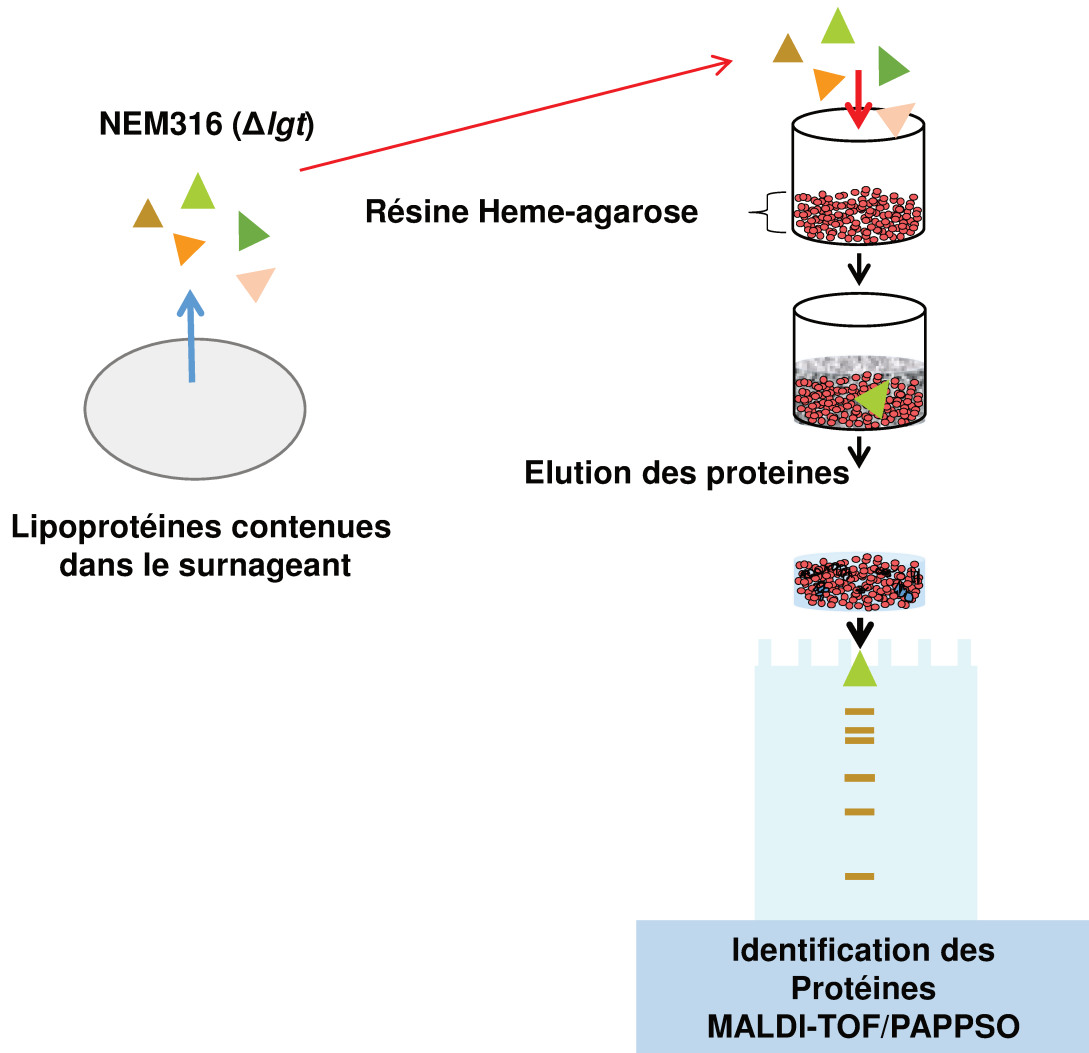


Figure 42. Stratégie expérimentale pour la recherche de transporteurs d'hème chez *S. agalactiae*. La délétion du gène codant pour la protéine Lgt (lipoprotein diacylglycerol transferase) entraîne la libération des lipoprotéines de la membrane dans le surnageant. Ce surnageant est mis en contact avec une résine d'affinité pour l'hème. Les protéines retenues sont éluées et séparées sur SDS-PAGE. Les bandes de protéines sont analysées par spectrométrie de masse par méthode de Maldi-Tof.

✓ Visualisation du « sensing » de l'hème *in vivo*

Grâce à la caractérisation du transporteur d'efflux de l'hème chez *S. agalactiae*, nous avons construit un outil pour détecter le « sensing » de l'hème *in vivo*. Nos résultats montrent que *S. agalactiae* est confronté à des quantités toxiques d'hème. Ces résultats confirment ceux obtenus avec le mutant $\Delta hrtBA$ et démontrent l'importance de l'homéostasie de l'hème pour *S. agalactiae* lors de l'infection. Par extension, nos résultats montrant l'induction du senseur d'hème *in vivo* démontrent que *S. agalactiae* peut acquérir de l'hème *in vivo* par des mécanismes inconnus.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats indique que la virulence de *S. agalactiae* dépend de sa capacité à contrôler l'hème toxique de l'hôte qui limite la virulence mais aussi de sa capacité à trouver et capturer l'hème de son hôte pour assurer un métabolisme respiratoire indispensable à sa virulence bien que cette bactérie n'ait qu'un besoin facultatif en hème *in vitro*. L'ensemble de ces résultats sont discutés dans la partie 3.

B.6 Résultats annexes : Import de l'hème

La mise en évidence du « sensing » de l'hème intracellulaire (**Partie 2 § B.5**) *in vivo*, ainsi que dans le sang (**Partie 2 § B.5**), démontre que *S. agalactiae* est capable d'internaliser l'hème exogène. Chez *S. aureus*, de nombreux systèmes de capture, de transport et de dégradation de l'hème sont décrits (Maresso and Schneewind, 2006) (**Partie 1 § A.3.3.2**). Dans le laboratoire, chez *S. agalactiae*, la recherche bioinformatique n'a pas permis d'identifier d'orthologues de systèmes de transport décrits dans la littérature. De même, une approche génétique par mutagenèse aléatoire (Yamamoto and Gruss, communication personnelle) n'a pas permis non plus de découvrir de systèmes de transport dédiés à l'hème.

Nous avons donc mis en place une approche biochimique en nous basant sur l'hypothèse que : i) si un ou des systèmes de transport de l'hème existent chez *S. agalactiae*, il sera du même type que ceux déjà décrits, c'est-à-dire un transporteur ABC associé à une lipoprotéine ; ii) cette lipoprotéine est affine pour l'hème.

✓ Stratégie expérimentale et méthode

Notre stratégie a donc consisté à utiliser un mutant Δlgt de *S. agalactiae* *Nem316* (don de P. Trieu-Cuot, Institut Pasteur ; Henneke *et al.*, 2008). La protéine Lgt (pour lipoprotein diacylglycerol transferase) permet la maturation et l'ancrage des lipoprotéines

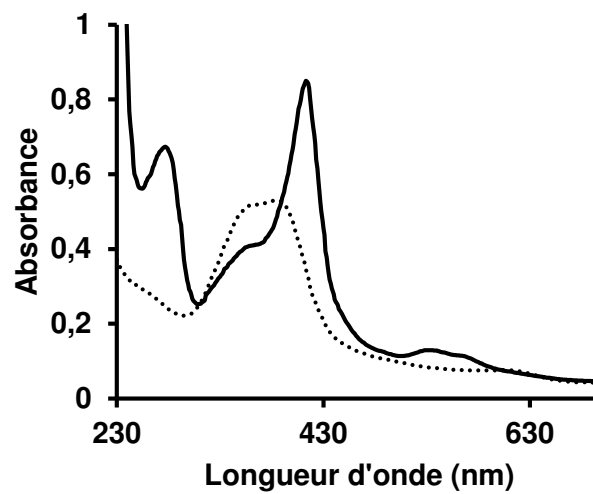


Figure 43. Spectre UV visible caractéristique d'une liaison protéine-hème. Le spectre de l'hème libre est décrit en pointillé. La liaison de la protéine AhpC (Lechardeur *et al.*, 2010) à l'hème provoque l'apparition d'une bande Soret autour de 400 nm.

dans la membrane. Sa délétion entraîne la libération de ces lipoprotéines dans le surnageant (Henneke *et al.*, 2008). Les milieux de cultures du mutant Δlgt cultivé avec et sans hème (0,1 μ M et 1 μ M) sont concentrés et les protéines affines pour l'hème sont purifiées par chromatographie d'affinité sur une résine couplée à l'hème (Lechardeur *et al.*, 2012) (**Figure 42**). Les protéines ainsi isolées sont identifiées par spectrométrie de masse (Plateforme Pappso INRA, Jouy en Josas) par la méthode de Maldi-Tof.

✓ Bilan de l'approche protéomique

Plus de 80 protéines ont été identifiées (présenté en **annexe**) dans les deux conditions expérimentales testées (+/- hème). Parmi ces protéines, plusieurs lipoprotéines ont été identifiées : GBS1042, GBS1463 et GBS2033 mais leur niveau d'expression était similaire dans les cultures avec ou sans hème. Ne nombreux autres candidats ont été identifiés parmi lesquels nous avons retenu GBS1811 correspondant à la GAPDH et GBS0608 correspondant à l'énolase. Ces deux protéines bien que majoritaires et pouvant être sécrétées (Oliveira *et al.*, 2012) sont donc potentiellement contaminantes des protéines isolées mais ont tout de même été sélectionnées car elles ont été décrites comme liant l'hème en particulier chez les eucaryotes (Ferdinand, 1964 ; Chakravarti *et al.*, 2010 ; Hannibal *et al.*, 2012).

✓ Production des protéines

Les séquences codantes des lipoprotéines GBS1042, GBS1463 et GBS2033 (délétées du domaine Nt nécessaire à leur insertion dans la membrane) ainsi que celles de l'énolase et GAPDH ont été clonées dans un plasmide pET200 adapté à la surexpression de protéines chez *E. coli*. Les protéines taguées par 6 histidines sont purifiées par chromatographie d'affinité sur une résine Nickel. L'affinité de la protéine pour l'hème est ensuite testée en réalisant des spectres d'absorption UV-visible en présence d'hème (**Figure 43**). Le spectre d'absorption de l'hème lié spécifiquement à une protéine est caractérisé par l'apparition d'une bande Soret autour de 400 nm (l'exemple de la protéine AhpC (GBS1875) est montré **Figure 43**). Cette méthode permet de confirmer rapidement si les protéines sont des hémoprotéines.

✓ Evaluation de la liaison à l'hème des différentes protéines sélectionnées

Les différents candidats retenus et purifiés ont donc été testés pour leur capacité à lier l'hème *in vitro*. L'ensemble des résultats est présenté sous forme de **Tableau IV**.

Tableau IV : Spectres UV-visible en présence d'hème des candidats sélectionnés

Nom	Fonction	Spectre
GBS 1042	Protéine de 342 acides aminés homologue à la protéine de liaison d'un ABC transporteur spécifique du fer	
GBS 2033	Protéine de 320 acides aminés homologue à la protéine de liaison d'un ABC transporteur inconnu.	
GBS 1463	Protéine de 310 acides aminés est homologue à la protéine de liaison d'un ABC transporteur spécifique du fer	
Enolase	Métalloprotéine de 427 acides aminés impliquée dans la 9 ^{ème} étape de la glycolyse	
GAPDH	Métalloprotéine impliquée dans la 6 ^{ème} étape de la glycolyse	

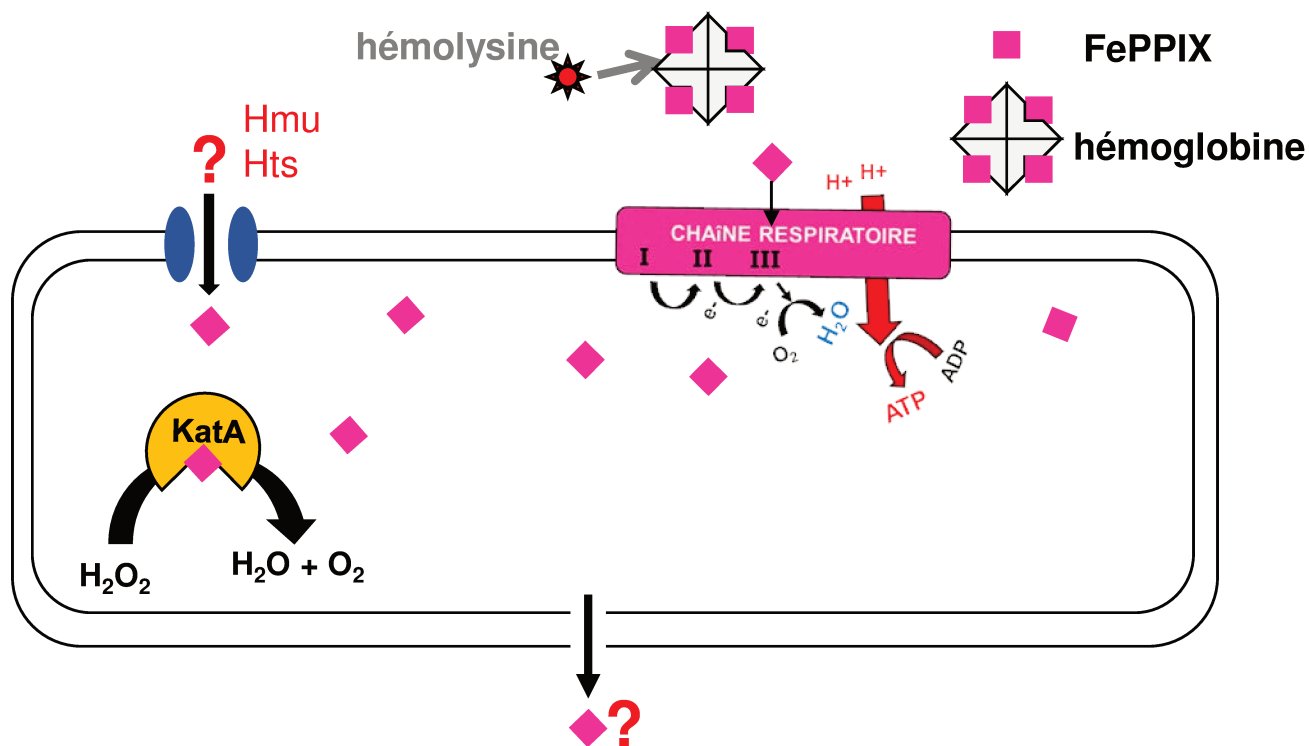


Figure 44. Utilisation et homéostasie de l'hème chez *Enterococcus faecalis*. Voir Partie 2 § C.1.

Le candidat GBS1556 n'a pas pu être purifié (nous pensons que la surproduction de cette protéine est toxique pour *E. coli*). Selon les spectres obtenus en présence d'hème (**Tableau IV**), aucune des lipoprotéines testées ne lie de manière significative l'hème *in vitro*. Un résultat similaire est obtenu avec l'énolase tandis que pour GAPDH, un shift à 414 nm était observé. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour confirmer ce résultat.

C Détection de l'hème par *Enterococcus faecalis* dans le tractus digestif

C.1 *E. Faecalis* et l'hème

E. faecalis est une bactérie auxotrophe pour l'hème qui peut activer un métabolisme respiratoire lorsque de l'hème est présent dans son environnement. *E. faecalis* exprime aussi une catalase à hème (KatA) (**Partie 1 § A.6.2**). L'import et le contrôle de l'homéostasie de l'hème ne sont pas connus (**Figure 44**).

C.2 Contexte

Bien que son origine soit peu connue, la présence d'hème dans le tractus intestinal a été démontrée (Halpern and Gruss, 2015.; Ahlquist *et al.*, 1985) (**Partie 1 § A.2.2**). De plus le microbiote contient de nombreuses espèces de bactéries à GRAM négatif qui ne synthétisent pas l'hème et qui en dépendent strictement pour leur survie, impliquant l'existence de sources d'hème dans le tube digestif pour assurer leur besoins. Ces données permettent de faire l'hypothèse qu'à l'instar du sang lors de l'infection, l'hème du tube digestif pourrait avoir un impact sur les capacités de colonisation de bactéries pathogènes opportunistes colonisant le microbiote intestinal. Le but de cette étude était donc d'étudier l'impact de l'hème intestinal sur les capacités de colonisation. J'ai donc mis en place, de manière similaire à *S. agalactiae* (**Partie 2 § B.3.2.2**) les outils génétiques pour pouvoir, dans un premier temps, visualiser *E. faecalis* dans l'intestin grâce au plasmide pP_{23lux} (**Figure 38, A**). En ce qui concerne le « sensing » de l'hème, nous avons d'abord caractérisé le transporteur HrtBA dans cette bactérie et ainsi validé le promoteur de *hrtBA* en tant que senseur d'hème **voir ci-dessous** chez *E. faecalis* (**Figure 38, B**).

C.3 Caractérisation du « sensing » de l'hème chez *E. faecalis*

Sur le modèle de *S. agalactiae* (**Partie 2 § B.5**), j'ai caractérisé le transporteur HrtBA chez *E. faecalis*

✓ Recherche d'orthologues de HrtBA

Une recherche bio-informatique par BLAST de protéines orthologues de la perméase HrtB et de l'ATPase HrtA de *Staphylococcus aureus* chez *E. faecalis* (OG1RF) a été réalisée. Deux protéines présentant respectivement 29 et 45 % d'identité avec HrtB et HrtA ont été identifiées (**Tableau V**). De plus, les deux tyrosines Y170 et Y233, indispensables à l'activité d'efflux de l'hème de HrtB, sont conservées (Joubert *et al.*, 2014) (**Figure 45**).

Tableau V. Identification de protéines orthologues à HrtB et HrtA de *S. aureus*.

Souche	Blast (<i>S. aureus</i>)	Candidat	Identité
OG1RF	HrtB	EF0792	29 %
OG1RF	HrtA	EF0793	45 %

Ces résultats suggèrent que le locus *ef0792-0793* code pour la pompe HrtBA. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement (voir ci-dessous).

✓ Le mutant $\Delta ef0792-0793$ est hypersensible à l'hème

Le mutant $\Delta ef0792-0793$ (nommé $\Delta hrtBA$) a été testé pour sa sensibilité à l'hème par rapport à la souche WT (**Figure 46**). La zone d'inhibition de croissance du mutant est plus importante comparée à la souche WT, suggérant que les protéines EF0792 et EF0793 sont bien des protéines orthologues de HrtB et HrtA respectivement. HrtBA étant induit par l'hème que ce soit chez *S. aureus* ((Friedman *et al.*, 2006), **Partie 1 § A.4.1**), *S. agalactiae* ((Fernandez *et al.*, 2010), **Partie 1 § A.4.1**) et *L. lactis* ((Martin Bastian Pedersen *et al.*, 2008), (**Partie 1 § A.4.1**), l'induction du locus *ef0792-0793* par l'hème a été vérifiée chez *E. faecalis*.

✓ Le locus *ef0792-0793* est induit par l'hème

La région promotrice de l'opéron *ef0792-0793*, nommée P_{ef0792} , a été clonée en amont du gène rapporteur *lacZ* dans le plasmide pTCVlac (Poyart and Trieu-Cuot, 1997). L'induction de la β galactosidase par l'hème ajouté dans le milieu de culture de la souche d'*E. faecalis* OG1RF WT et $\Delta hrtBA$ (**Figure 47**) indique que l'expression du gène rapporteur est proportionnelle à la quantité d'hème. Ces résultats suggèrent que le locus *ef0792-0793* est induit par l'hème de manière similaire à HrtBA de *S. aureus* ((Friedman *et al.*, 2006), **Partie 1 § A.4.1**), *S. agalactiae* ((Fernandez *et al.*, 2010), **Partie 1 § A.4.1.4**) et *L. lactis* ((Martin Bastian Pedersen *et al.*, 2008), **Partie 1 § A.4.1**). Le niveau de l'induction de *lacZ* est plus

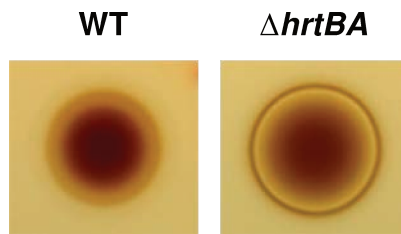


Figure 46. La délétion de *ef0792-0793* ($\Delta hrtBA$) entraîne une hypersensibilité à l'hème. Les souches WT et $\Delta hrtBA$ de *E. faecalis* sont ensemencées dans de l'agar mou sur lequel est déposé 10 μ l d'hème (10 mM). On observe une augmentation de la toxicité de l'hème lorsque le locus *ef0792-0793* est délété.

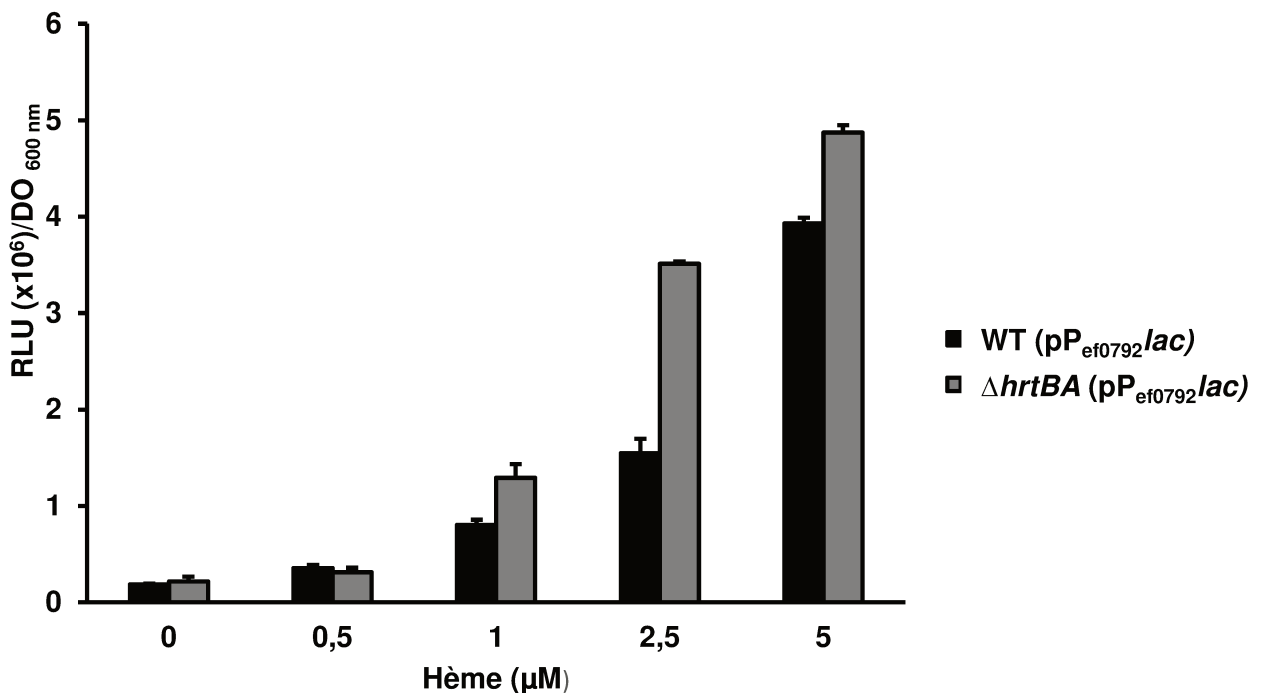


Figure 47. Comparaison de l'induction du promoteur de l'opéron *ef0792-0793* par l'hème entre la souche WT et $\Delta hrtBA$. Les souches WT et $\Delta hrtBA$ transformées par le plasmide $pP_{ef0792}lac$ sont cultivées jusqu'à $DO_{600\text{ nm}} = 0.5$ avant d'être incubées 1 h avec différentes concentrations d'hème. L'activité β galactosidase est ensuite mesurée avec le substrat « β glo » (Proméga) dans un « TECAN Infinite M200 ».

élevé dans le mutant (**Figure 47**) suggérant que HrtBA est un transporteur d'efflux d'hème chez *E. faecalis* dont l'expression est sensible à la concentration intracellulaire d'hème. De plus, l'induction de HrtBA semble spécifique de l'hème puisque de nombreux métaux ainsi que la protoporphyrine testés n'induisent pas l'opéron (non-montré).

Ces résultats démontrent que le locus *ef0792-0793* code pour le transporteur d'efflux de l'hème HrtBA (Lechardeur *et al.*, 2012; Juarez-Verdayes *et al.*, 2012). A partir de ces résultats, j'ai remplacé le gène rapporteur *lacZ* par l'opéron *lux* (**Partie 2 § B.3.1**) pour utiliser P_{ef0792} comme le senseur d'hème de *E. faecalis*.

✓ Contrôle de l'expression de HrtBA chez *E. Faecalis*

Une étude du contexte génomique du locus *ef0792-0793* n'a pas permis de trouver de locus codant pour des systèmes à deux composants immédiatement adjacents comme dans le cas de *hssSR* de *S. aureus* (**Partie 1 § A.4.1.4, Figure 48**) ou de *B. anthracis* (Stauff and Skaar, 2009). Néanmoins, l'analyse du promoteur P_{ef0792} montre la présence d'une séquence de 20 nucléotides présentant une similarité de séquence avec le site de fixation de HssR dans le promoteur de HrtBA de *S. aureus* (9 nucléotides conservés) (**Figure 49**) suggérant une régulation du transporteur d'efflux HrtBA par un système à deux composants De manière similaire aux autres pathogènes. Une recherche par Blast d'orthologues de HssRS de *S. aureus* montre l'existence d'un opéron codant pour deux protéines avec 28 % et 33 % d'identité pour HssR et HssS respectivement (**Tableau VI**). A noter qu'une recherche par Blast n'a pas permis d'identifier d'homologues de HrtR chez *E. faecalis*. Néanmoins, un gène *ef0791* codant pour un régulateur de type TetR est immédiatement adjacent à *ef0792-0793* (**Figure 48**). L'implication de ce gène ou d'un système à deux composants dans la régulation de hrtBA d'*E. faecalis* reste à démontrer.

Tableau VI. Identification de protéines orthologues à HssS et HSSR de *S. aureus*.

Souche	Blast (<i>S. aureus</i>)	Candidat	Identité
OG1RF	HssS	EF0372	28 %
OG1RF	HssR	EF0373	33 %

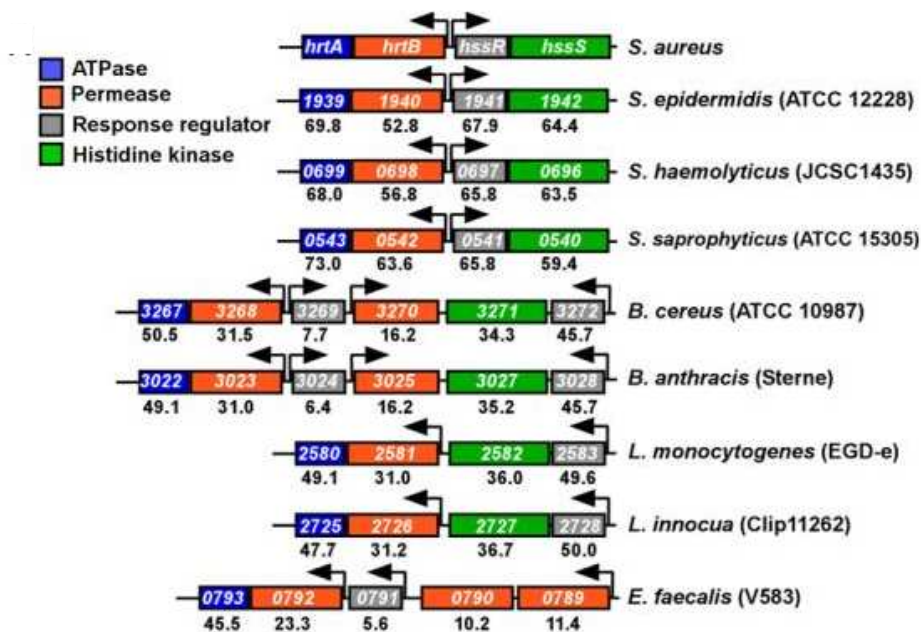


Figure 48. Environnement génétique de HrtBA chez différentes bactéries à GRAM positif. Chez *E. faecalis* il n’y a aucun locus codant pour des systèmes à deux composants immédiatement adjacents à HrtBA comme dans le cas de HssRS de *S. aureus*. Le gène *ef0791* code pour un régulateur de type TetR mais EF0791 n’a pas d’identité significative avec HrtR (Lechardeur *et al.*, 2012).

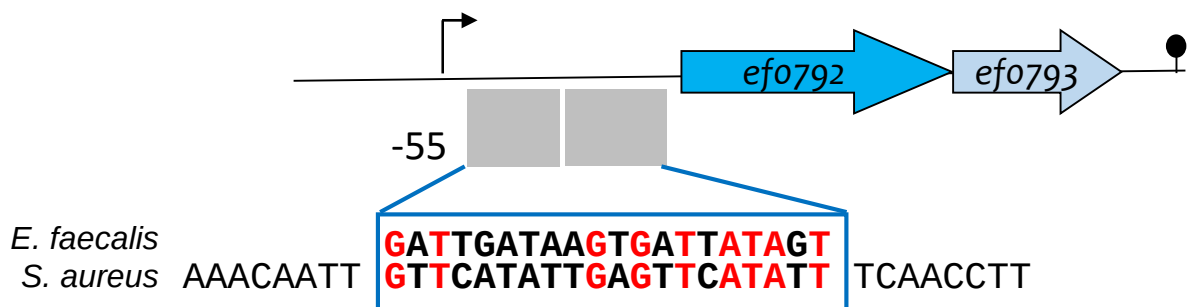


Figure 49. Séquence promotrice de l’opéron hrtBA chez *E. faecalis*. Une séquence répétée qui présente une similarité avec la séquence répétée impliquée dans la fixation de HssR de *S. aureus* est mise en évidence dans la région promotrice de l’opéron *ef0792-0793*. 9 nucléotides sur 20 sont conservés.

C.4 Stratégie expérimentale pour l'étude du « sensing » de l'hème dans l'intestin

C.4.1 Outils génétiques utilisés pour visualiser le « sensing » de l'hème chez *E. Faecalis* dans le tractus digestif

Le plasmide pP_{lux}, sans promoteur est utilisé comme témoin du bruit du fond luminescent. Le plasmide pP_{23lux} permet le suivi des bactéries dans le tractus digestif. Le plasmide pP_{ef0792lux} est utilisé comme senseur d'hème d'*E. faecalis* OG1RF.

Les deux premières constructions (pP_{lux} et pP_{23lux}) ont été réalisées comme décrit dans la publication 2. Le plasmide pP_{ef0792lux} a été construit par amplification du promoteur de l'opéron *ef0792-0793* à partir de l'ADN génomique de *E. faecalis* OG1RF. Les produits de PCR ont été digérés par les enzymes de restrictions EcoRI et BamHI et clonés dans le plasmide pP_{lux} en amont du gène rapporteur. Les oligonucélotides utilisés sont répertoriés dans le **Tableau VII**.

Tableau VII. Oligonucléotides utilisés pour la construction du plasmide pP_{ef0792lux}

Oligonucléotide	Séquence 5'-3'	cible
O1	5' CCG GAATTC CTT ACA AGA GGG CAT CAG TGT 3'	P _{ef0792-0793}
O2	5' CGC GGATCC CTT TTC GAA ATA AAC TAT ATC 3'	P _{ef0792-0793}

C.4.2 Gavage et observation du « sensing » de l'hème chez *E. faecalis*

L'introduction des bactéries dans le tube digestif est effectué par gavage de souris BalbC/J à l'aide de sondes gastriques souples selon le protocole décrit dans l'autorisation APAFIS#2277-2015081917023093. Chaque souris est gavée avec 100 µL de solution de bactéries contenant 10¹⁰ CFU. Cette dose a été choisie car des doses inférieures ne permettaient pas une détection d'un signal luminescent significatif. La luminescence émise par les souris gavées est observée dès 3 h après le gavage dans l'appareil IVIS. Les souris sont immobilisées par inhalation d'isoflurane ou anesthésiées par un mélange de 100 µg/g de souris de kétamine et 15 µg/g de souris de xylazine.

C.5 Résultats

Dans un premier temps, nous avons utilisé le plasmide pP_{23lux} afin de valider si *E. faecalis* est observable dans le tractus digestif. L'observation des souris gavées avec *E. faecalis* WT et $\Delta hrtBA$ transformées avec pP_{23lux} (**Figure 50**), indique que l'outil pP_{23lux} est

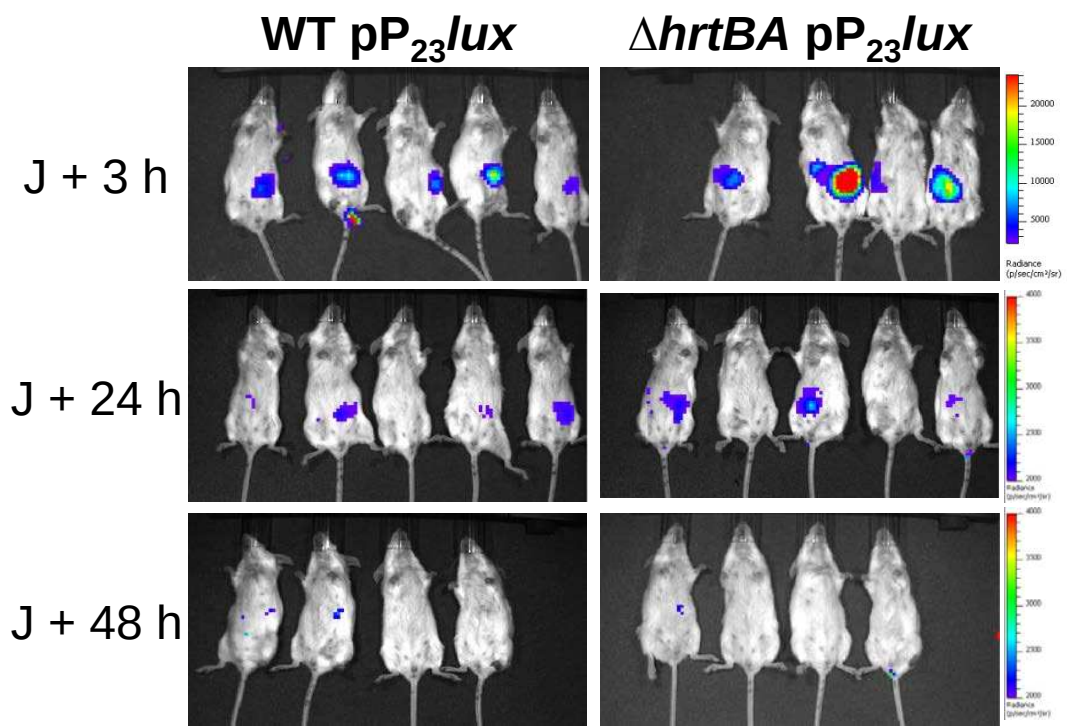


Figure 50. Suivi de *E. faecalis* lors du transit intestinal. Des souris gavées avec 10^{10} CFU de *E. faecalis* WT et $\Delta hrtBA$ transformées avec pP_{23lux} . La luminescence des souris anesthésiées par inhalation d’isoflurane est observée aux temps indiqués dans l’appareil IVIS (acquisition 10 min; binning large).

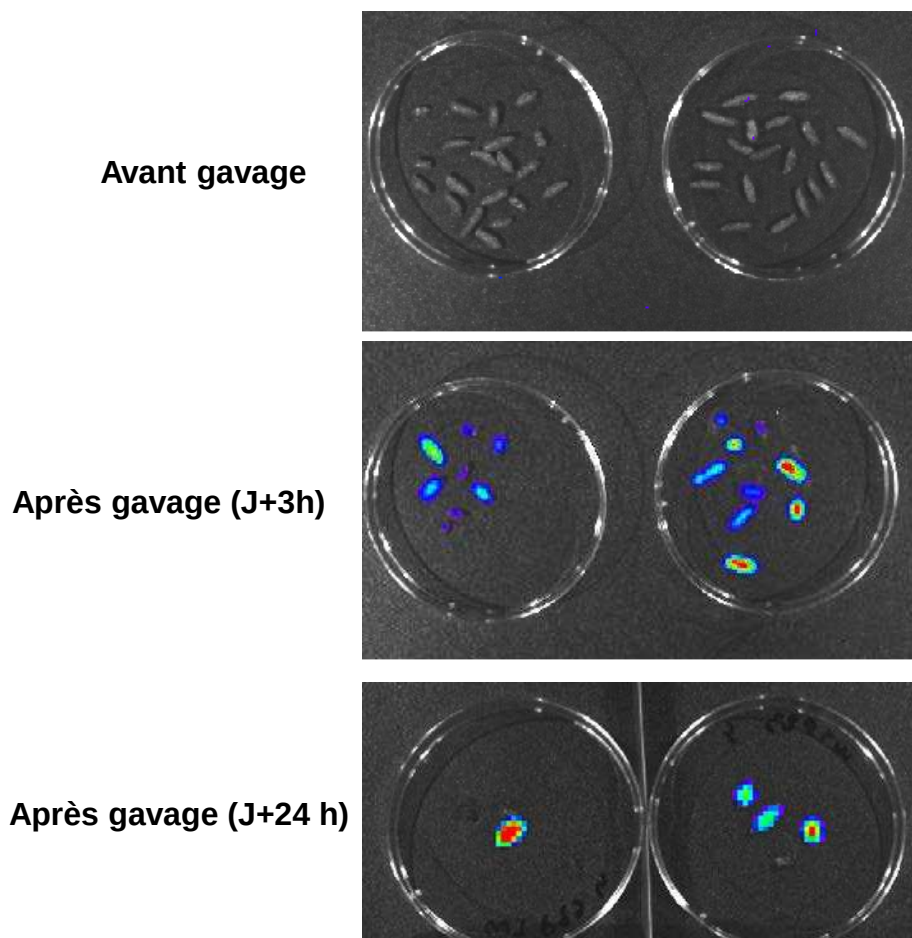


Figure 51. Suivi de *E. faecalis* dans les fécès. Des fécès de souris gavées comme indiqué Figure 50 sont prélevées et visualisées dans l’appareil IVIS (acquisition: 5 min; binning large).

fonctionnel dans le tractus digestif. Le signal luminescence est détectable pendant 48 h après le gavage des souris (**Figure 50**).

La luminescence de *E. Faecalis* WT (pP_{23lux}) est détectable dans les fécès des souris montrant que *E. faecalis* est viable après avoir transité dans le tractus digestif (**Figure 51**). L'utilisation de la luminescence permet donc un suivi du transit de *E. faecalis* dans le TD. Aucun signal n'est retrouvé après 48h (non montré). Outre l'estomac, les bactéries sont présentes dans l'intestin grêle, en forte quantité dans le caecum, et en quantité moindre dans le gros intestin (**Figures 53 et 54**).

Une fois la fonctionnalité de l'outil pP_{23lux} validé, nous avons étudié le « sensing » de l'hème par utilisation de l'outil pP_{ef0792lux} sur les souris vivantes (**Figure 52**). Comme le montre la figure, pour la luminescence associée au senseur, l'hème est détectable dans le tractus digestif des souris 3 h après le gavage uniquement avec la souche $\Delta hrtBA$ (**Figure 53**), probablement parce que cette souche accumule plus d'hème comparé au WT ce qui permet l'émission d'un signal lumineux plus important (**Partie 2 § C.3**). Ces observations *in vivo* sont confirmées par l'observation des fécès 3 h après le gavage (**Figure 55**).

L'observation du caecum, (**Figure 54**), indique que le senseur intracellulaire est particulièrement activé par l'hème dans cet organe ce qui suggère qu'il contient une quantité relativement importante d'hème biodisponible.

L'ensemble de ces résultats indique pour la première fois que les bactéries *Enterococcus faecalis* rencontrent et internalisent de l'hème lors de leur passage dans le système digestif. Ces résultats préliminaires mériteraient d'être poursuivis par une étude complète utilisant les mutants Δcyd et $\Delta hrtBA$ de *E. faecalis* afin de répondre à la question de l'importance de l'hème dans les capacités de colonisation de *E. faecalis* dans le tractus digestif.

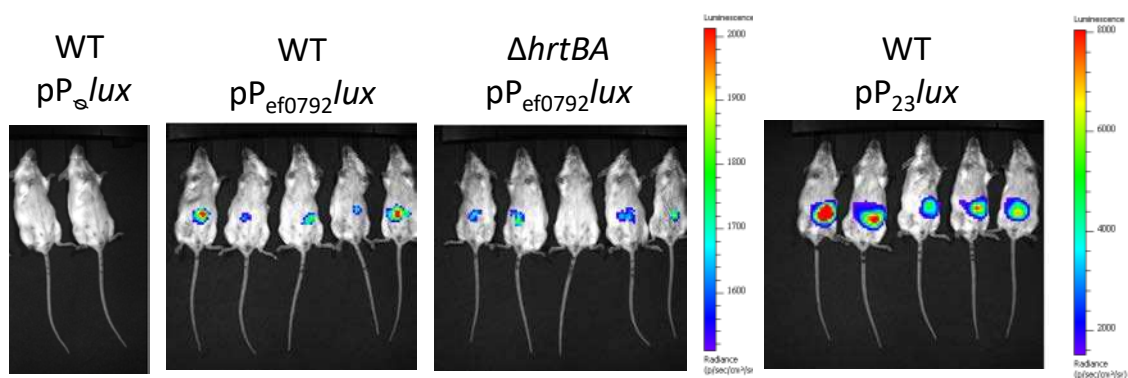


Figure 52. Détection de l'hème par *E. faecalis* lors du transit intestinal. Des souris gavées par 10^{10} CFU de *E. faecalis* WT ou $\Delta hrtBA$ transformées avec le plasmide senseur d'hème $pP_{ef0792}lux$ (au centre). La souche WT (pP_Slux) (à gauche), est utilisé comme témoin du bruit de fond, et la souche WT ($pP_{23}lux$) (à droite) est utilisée comme témoin de la présence des bactéries. La luminescence des souris anesthésiées par un mélange de 100 μ g/g de souris de kétamine et 15 μ g/g de souris de xylazine est observée dans l'appareil IVIS 3 h après gavage (acquisition : 15 min; binning large).

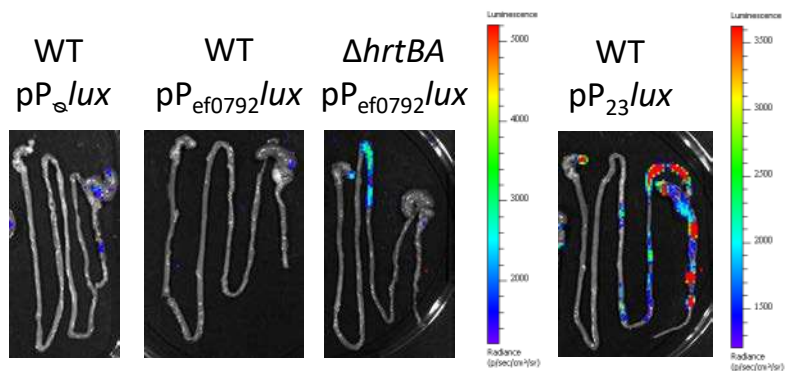


Figure 53. Détection de l'hème par *E. faecalis* dans le système digestif. Les souris gavées comme décrit Figure 52 ont été euthanasiées et le système digestif a été prélevé et la luminescence observée dans l'appareil IVIS 3 h après gavage (acquisition : 10 min; binning large).

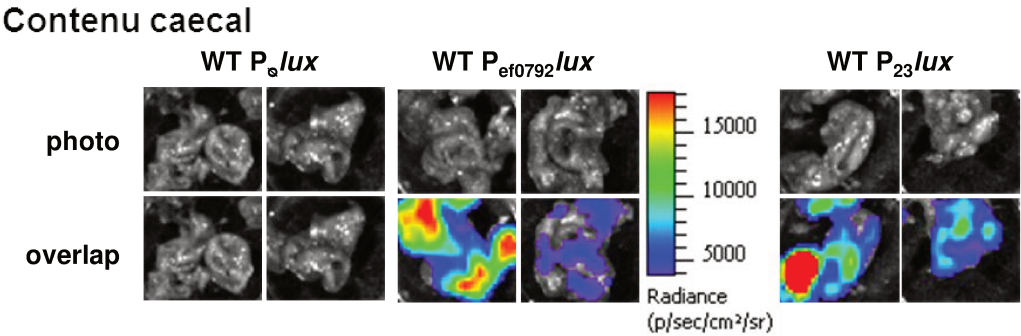


Figure 54. Contenu caecal de souris gavée avec *E. faecalis*. Des souris gavées comme indiqué Figure 52 sont euthanasiées 3 h après le gavage et la poche du caecum est ouverte de manière à libérer son contenu. Toutes les photos ont été prises selon les mêmes paramètres soit un temps d'exposition de 10 minutes et un binning large et sont comparés avec la même échelle.

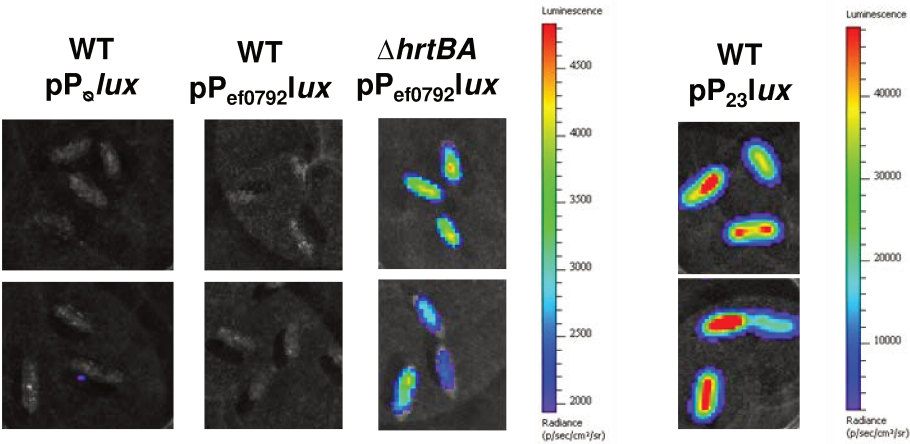


Figure 55. Visualisation des fécès chez *E. faecalis*. Des fécès de souris gavées comme indiqué Figure 52 sont prélevées 3 h après le gavage et visualisées dans l'appareil IVIS (acquisition: 5 min; binning large).

Partie 3

Discussion

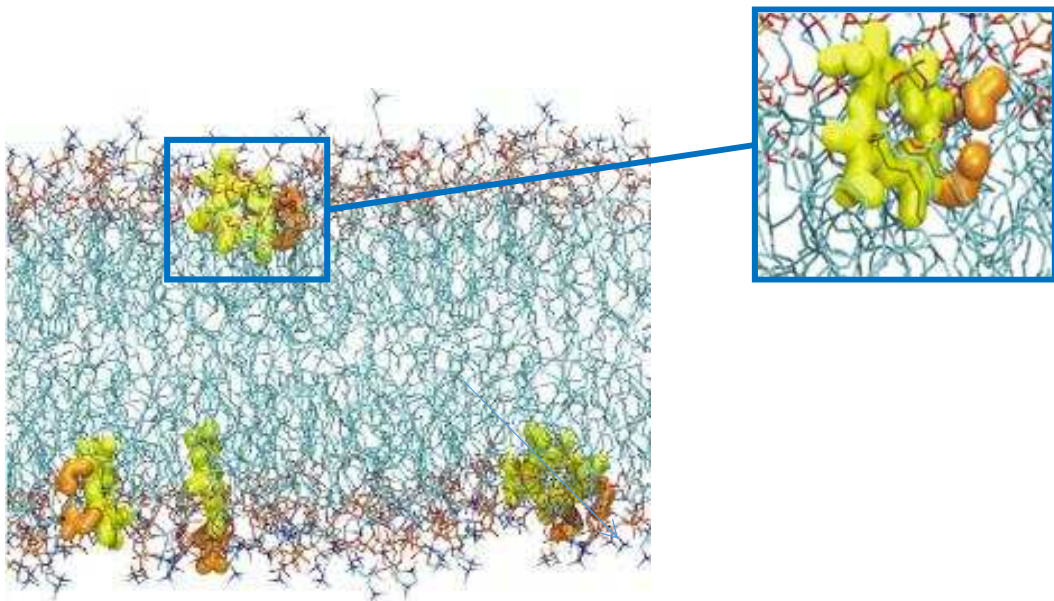


Figure 56. Visualisation de l'insertion de molécules de protoporphyrines encapsulées dans des liposomes constitués de 1-palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholine. D'après (Stepniewski *et al.*, 2012).

A Interaction de l'hème avec la membrane de *L. Lactis*

Dans la publication 1, nous avons mis en évidence que l'hème s'accumule dans les membranes de *L. lactis* par un mécanisme qui dépend des ménaquinones. Un environnement oxydant (cultures aérées) empêche la réduction de l'hème via les MKs, limitant leur accumulation membranaire (**figure 32**).

A.1 Les ménaquinones catalysent la réduction de l'hème

Les ménaquinones sont des molécules lipophiles membranaires qui transportent les électrons des déshydrogénases vers les cytochromes oxydases dans la chaîne respiratoire (**Partie 1 § A.6.1.1**) (Borisov and Verkhovsky, 2015). Chez les procaryotes, les MKs acceptent aussi des électrons d'autres protéines et participent à de multiples fonctions cellulaires telles que la sécrétion et la défense contre le stress oxydant (Yamamoto *et al.*, 2006; Nohl *et al.*, 2003).

L'implication des MKs dans la réduction de métaux (Fe, Cu) du milieu extracellulaire a aussi été démontrée (Abicht *et al.*, 2013; Cesselin *et al.*, 2009). Nos résultats suggèrent ainsi que les MKs peuvent aussi réduire le fer de l'hème. Le fer sous sa forme réduite étant très instable, il est difficile de mettre en évidence la réduction de l'hème par les MKs dans des conditions *in vitro*. Ces résultats ne permettent pas non plus d'exclure qu'une réductase de l'hème MK dépendante non-identifiée puisse jouer un rôle dans la réduction de l'hème.

A.2 Devenir de l'hème réduit

La question reste de savoir pourquoi et par quel mécanisme l'hème une fois réduit s'accumule en grandes quantités dans la membrane plasmique de *L. lactis*. L'absence de saturation et la réversibilité du mécanisme semblent suggérer que l'hème réduit est ancré dans la membrane à cause de sa liposolubilité plutôt que par un mécanisme impliquant des protéines membranaires cibles.

La capacité des molécules liposolubles, dont l'hème, à s'insérer dans l'environnement des phospholipides et acides gras membranaires est connu (Kuzelová and Brault, 1994; Stępniewski *et al.*, 2012) (**Figure 56**). La solubilité du fer dépend des conditions d'oxydo-réduction du milieu : le fer oxydé étant beaucoup moins soluble dans les milieux aqueux que le fer réduit (Wandersman and Delepelaire, 2004). Bien que le noyau porphyrine de l'hème soit aussi à prendre en compte, ces données suggèrent que la liposolubilité de l'hème varie en fonction de l'état d'oxydo-réduction du fer. Ainsi la liposolubilité de l'hème sous-forme

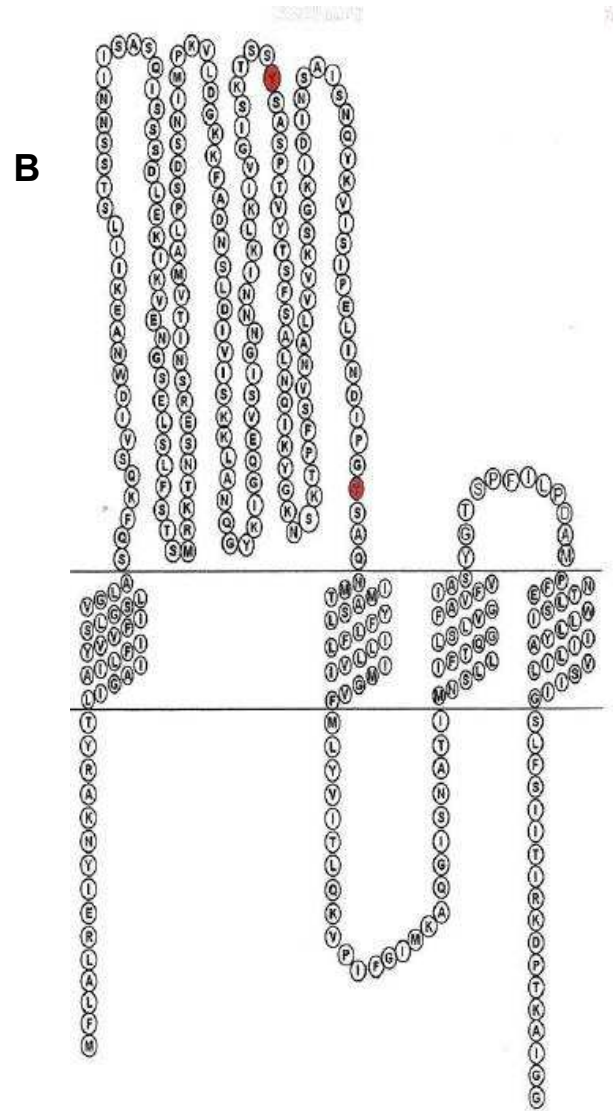
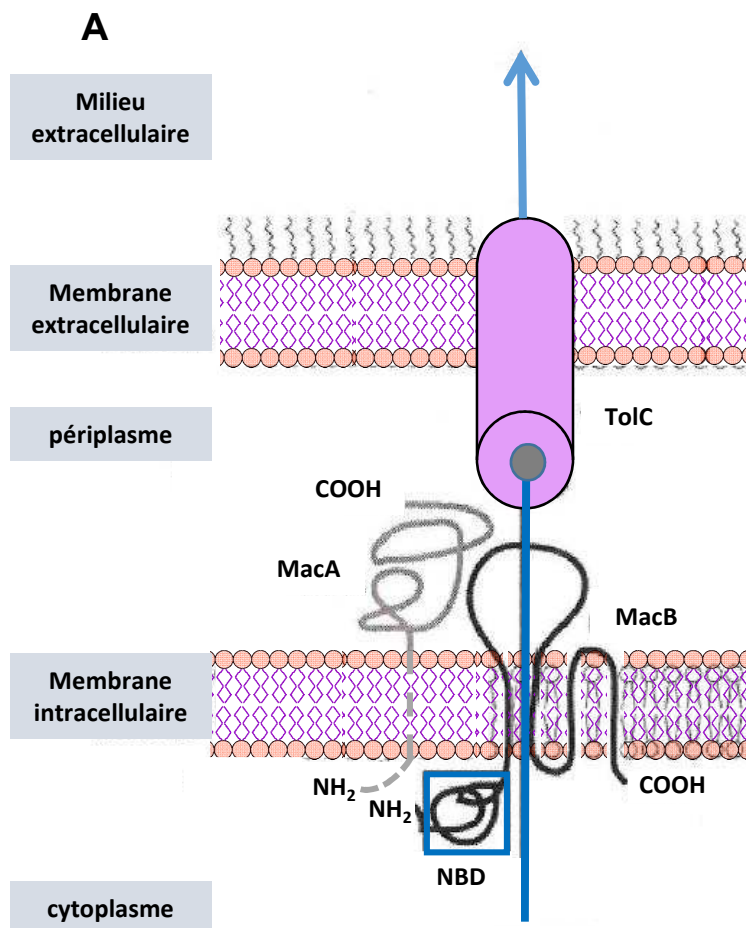


Figure 57. MacAB de *E. coli* (A) et HrtB de *L. lactis* (B) ont des topologies similaires. Les deux protéines possèdent 4 domaines transmembranaires. (A) une grande boucle périplasmique est identifiée pour MacAB. (B) Une grande boucle est aussi présente chez HrtB mais localisée dans le milieu extracellulaire. Dans MacB, le domaine ATPase (NBD) est inclus dans la protéine. MacA est indispensable à l'activité ATPase de MacB.

réduite serait compatible avec son accumulation dans la membrane. Des expériences préliminaires de chromatographie sur couche mince (G. Lamberet, MicrobAdapt) avec de l'hème sous forme oxydée ou réduite montre une différence de migration entre les deux formes d'hème, ce qui suggère une différence de solubilité.

A noter aussi que certains organismes sont capables de détoxifier l'hème par des mécanismes de polymérisation de l'hème : c'est le cas par exemple de l'hémozoïne chez *Plasmodium falciparum* (Stiebler *et al.*, 2010). Il serait intéressant d'étudier si l'accumulation d'hème est organisée dans la bicouche lipidique. Des expériences de microscopie électronique, de spectroscopie Raman (B. Robert, CEA) ou RMN (D. Warschawski, IBPC) avec des cellules ou des membranes isolées chargées en hème sont envisagées et permettraient de répondre à ces questions.

B Homéostasie de l'hème

Mon travail a permis de caractériser le transporteur d'efflux d'hème HrtBA chez *S. agalactiae* et *E. faecalis*. HrtBA qui avait déjà été mis en évidence chez des pathogènes tels que *S. aureus* et *B. anthracis* ainsi que chez la bactérie alimentaire *L. lactis* est présente dans de nombreuses autres espèces de bactéries à GRAM positif (**Tableau III, Figure 45**) (Lechardeur *et al.*, 2012; Stauff *et al.*, 2008; Stauff & Skaar, 2009). De plus chez *L. lactis*, les résultats présentés dans le manuscrit 1 montrent que la surexpression de ce transporteur d'efflux régule l'homéostasie de l'hème à la fois membranaire et intracellulaire.

B.1 Mécanisme d'export de l'hème par HrtBA

La modélisation de la topologie de HrtB (Topred) montre que celle-ci est très proche de celle de MacB : 4 domaines transmembranaires et une grande boucle dans le périplasma pour MacB et extracellulaire pour HrtB (**Figure 57**). MacB est la perméase du transporteur MacAB (macrolide antibiotic transporter), qui chez *Escherichia coli*, associé à la protéine TolC, permet l'efflux de nombreuses molécules lipophiles depuis la membrane plasmique dont la protoporphyrine (PPIX). Ces données suggèrent que HrtB pourrait fonctionner de manière similaire à ce type de transporteur.

L'hème étant une molécule hydrophobe qui s'insère facilement dans les membranes physiologiques, nos observations que l'accumulation d'hème dans la membrane est contrôlée par HrtBA suggère que ce transporteur pourrait effluer l'hème par un mécanisme similaire à ceux décrits pour les transporteurs d'efflux de drogues ou de petites molécules liposolubles de

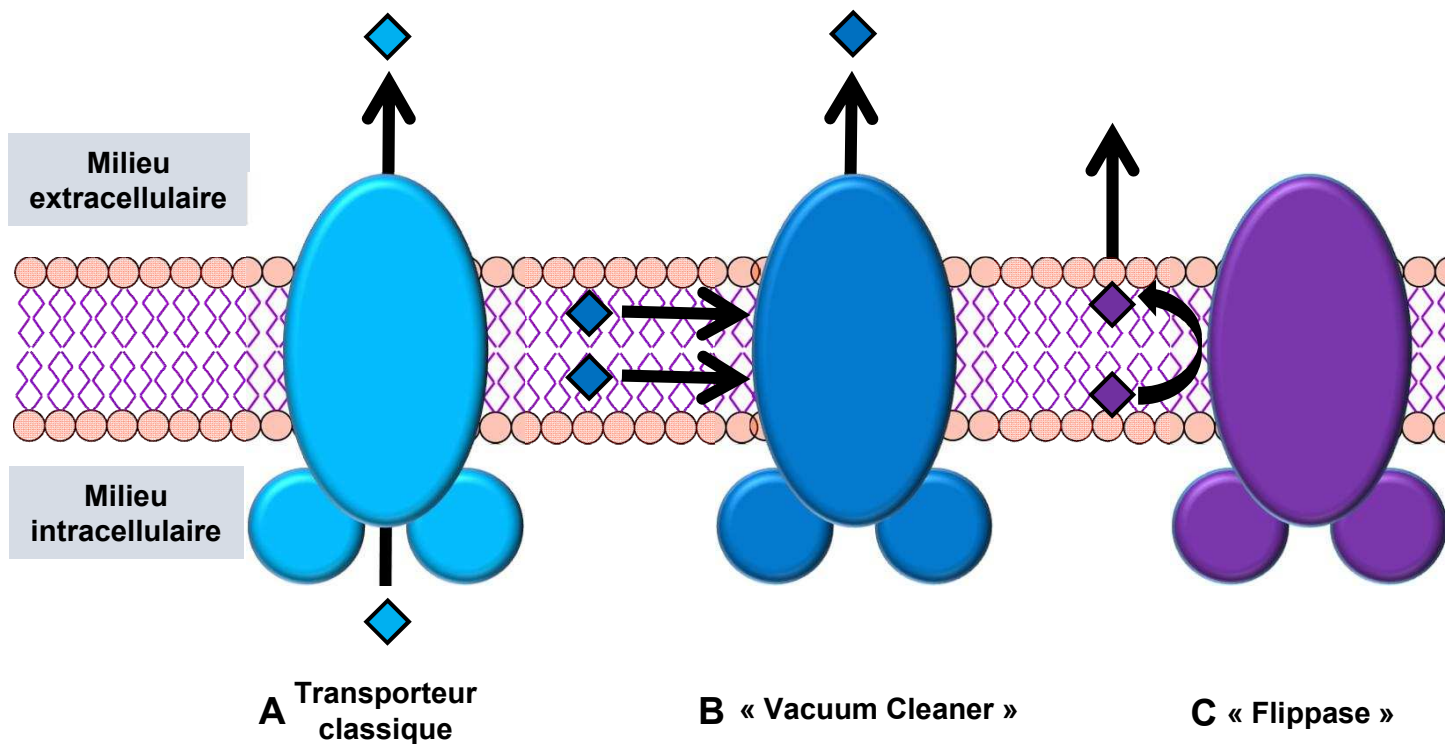


Figure 58. Les différents transporteurs d'efflux. (A) Les transporteurs classiques permettent le transport du substrat hydrosoluble du milieu intracellulaire à un milieu extracellulaire à travers une voie hydrophile formée par une des régions transmembranaires de la protéine. (B) Les « vacuum cleaner » effluent le substrat lipophile depuis la membrane vers le milieu extracellulaire. (C) Les « flippases » transfèrent le substrat lipophile depuis la membrane cytoplasmique vers la membrane externe, à partir de laquelle il diffuse dans le milieu extérieur.

type MDR (multidrug resistance) existant aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. Parmi les transporteurs MDR présents chez les eucaryotes, les transporteurs ABCG2 (pour ATP-binding cassette superfamily G member 2) sont largement étudiés pour leur implication dans la résistance des cellules cancéreuses à certaines molécules anti-tumorales (Ejendal and Hrycyna, 2002). Il a été démontré que cette protéine est aussi capable d'effluer la protoporphyrine IX (P. Krishnamurthy et al., 2004) et l'hème (Wagener *et al.*, 2012). Des souris KO pour cette protéine accumulent de la protoporphyrine dans le sang (syndrome de la porphyrie) (Zhou *et al.*, 2005).

De plus, dans la publication 1, nous avons aussi démontré que la boucle extracellulaire de HrtB serait impliquée dans la liaison à l'hème via 2 tyrosines. L'étude de ABCG2 a démontré que sa boucle extracellulaire est aussi capable de lier l'hème (via une histidine et une tyrosine) afin de l'effluer de la cellule pour le transférer à l'albumine sérique (Desuzinges-Mandon *et al.*, 2010).

Ces données permettent de penser qu'une similarité de fonction existe entre les transporteurs d'efflux ABC de type ABCG2 et HrtBA. Les mécanismes moléculaires des systèmes d'efflux de type MDR ont fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de mieux comprendre le fonctionnement de ces transporteurs. Les données actuelles montrent que, contrairement aux transporteurs d'efflux de molécules hydrosolubles qui permettent le franchissement de la barrière membranaire à leurs substrats (**Figure 58, A**), les transporteurs de molécules lipophiles peuvent prendre en charge les molécules qu'ils transportent à partir de la membrane par un mécanisme dit de « vacuum cleaner » ou de « flippase » (**Figure 58, B et C**). Il reste à savoir si ces mécanismes décrits pour des protéines eucaryotes peuvent s'appliquer à HrtBA. Enfin, on peut remarquer que contrairement à ces transporteurs, HrtBA semble être un transporteur spécifique de l'hème, ce qui implique peut-être des mécanismes d'efflux différents qui restent à élucider.

En conclusion, bien que restant à démontrer expérimentalement, un fonctionnement de HrtBA proche de celui décrit pour certains transporteurs MDR des eucaryotes, de type vacuum cleaner par exemple, serait compatible avec nos résultats. En effet, HrtBA prendrait en charge l'hème exogène qui arrive au niveau de la membrane avant d'atteindre le cytoplasme, ce qui pourrait expliquer l'impact de ce transporteur d'efflux à la fois sur les « pools » d'hème membranaire et intracellulaire. Il reste aussi à démontrer si HrtBA transporte l'hème oxydé ou réduit ou les deux. HrtBA est fonctionnel alors que les

ménaquinones ne sont pas synthétisées (*S. agalactiae*) ou inhibées par l'oxygène (*L. lactis*) ce qui laisse supposer que l'hème sous sa forme oxydée peut être transportée par HrtBA.

B.2 Import de l'hème

Nous avons démontré chez *L. lactis* (publication 1) et chez *S. agalactiae* (publication 2) que HrtBA contrôle la concentration d'hème intracellulaire et membranaire par l'efflux. Chez certains modèles bactériens comme *S. aureus*, des transporteurs d'hème sont néanmoins connus mais leur fonction exacte reste à préciser (Counteras *et al.*, 2014). Des transporteurs d'hème de type de ceux identifiés chez *S. aureus* (Isd) (Choby and Skaar, 2016) comprenant un transporteur ABC associé à une lipoprotéine affine pour l'hème ont été recherchés chez *S. agalactiae*.

B.2.1 Des transporteurs d'hème chez *S. agalactiae*

Une approche par Blast n'a pas permis de mettre en évidence l'existence de lipoprotéines avec un % d'identité significatif avec des lipoprotéines affines pour l'hème connues. Une seconde approche par mutagenèse a été réalisée au laboratoire (A. Gruss, P. Gaudu, Y. Yamamoto, communication personnelle). Cette approche n'a pas permis d'identifier des transporteurs d'hème, l'hypothèse étant que des systèmes redondants et complémentaires pouvaient expliquer une absence de phénotype lorsqu'un seul transporteur est muté. Nous avons donc mis en place une approche biochimique en utilisant une résine couplée à l'hème pour isoler et identifier des protéines affines pour l'hème de surnageants de cultures de la souche Δlgt incubées ou non en présence d'hème. Ce mutant libère les lipoprotéines dans le milieu de culture. Quelques lipoprotéines ont pu être identifiées telles que GBS1042, GBS1463 et GBS2033 mais la validation de leur affinité pour l'hème n'a pas été concluante. Parmi ces 3 protéines, 2 sont décrites comme des transporteurs de fer ce qui pourrait expliquer qu'elles ont une certaine affinité pour le fer de l'hème. Parmi les autres protéines identifiées par cette méthode, nous avons sélectionné la GAPDH car elle avait été décrite comme affine pour l'hème chez les eucaryotes (Hannibal *et al.*, 2012). Nous avons pu mettre en évidence une liaison à l'hème de GAPDH *in vitro* qui reste à confirmer. En conclusion, cette méthode n'a pas permis d'identifier de lipoprotéines pour l'hème qui auraient pu appartenir à un transporteur spécifique de cette molécule. Cette méthode ayant permis d'identifier des hémoprotéines (communication personnelle, E. Borezée-Durant) à partir de lysats de cellules, la question reste posée de l'existence de tels transporteurs chez *S.*

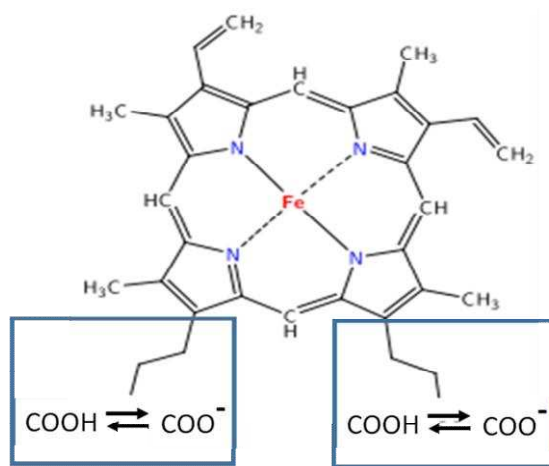


Figure 59. L'hème (type *b*). Les chaînes propionates (encadrées en bleu) peuvent générer des charges négatives qui sont à l'origine de liaisons électrostatiques.

agalactiae (et d'autres bactéries à GRAM positif). Enfin une approche similaire chez *L. Lactis* (D. Lechardeur) n'a pas non plus permis d'identifier des transporteurs d'hème.

B.2.2 Diffusion passive de l'hème à travers les membranes des bactéries à GRAM positif

La question de la diffusion de l'hème en tant que molécule hydrophobe à travers la bicouche lipidique a déjà fait l'objet de nombreuses études dont les conclusions sont contradictoires.

Le premier type d'étude montre que si l'hème peut s'associer aux membranes de par sa liposolubilité, des interactions fortes avec les lipides membranaires médiées par les chaînes propionates latérales de l'hème l'immobilise dans la membrane sans possibilité de la traverser (Krishnamurthy *et al.*, 2006) (**Figure 59**). Une autre étude a été réalisée avec des liposomes contenant une apo-hémoprotéine de forte affinité pour l'hème. Les résultats indiquent que l'ajout d'hème sur ces liposomes ne permet pas la complémentation de l'hémoprotéine suggérant que l'hème ne peut traverser la bicouche lipidique des liposomes (Light and Olson, 1990).

Des résultats contrastés sont issues d'expériences sur cellules vivantes. Un premier type d'expérience a montré que l'hème pouvait atteindre le périplasme des bactéries à GRAM négatif sans intervention de transporteurs spécifiques (Stojiljkovic *et al.*, 2001). On peut aussi citer une étude réalisée sur *S. aureus* qui semble montrer que la délétion de tous les transporteurs (systèmes Isd et Hts) n'empêche pas la bactérie d'utiliser l'hème comme seule source de fer (Wright and Nair, 2012).

En conclusion, la similarité structurale et fonctionnelle entre HrtBA et certains transporteurs d'efflux de molécules lipophiles qui traversent la membrane plasmique par diffusion questionne l'existence de systèmes dédiés au transport de l'hème chez les bactéries à GRAM positif. Une explication pourrait être que, dans les conditions expérimentales que nous avons utilisées (concentrations d'hème toxiques ou subtoxiques), cette molécule peut traverser la membrane par diffusion et que des transporteurs spécifiques sont exprimés pour récupérer l'hème dans un environnement où cette molécule serait présente à l'état de traces.

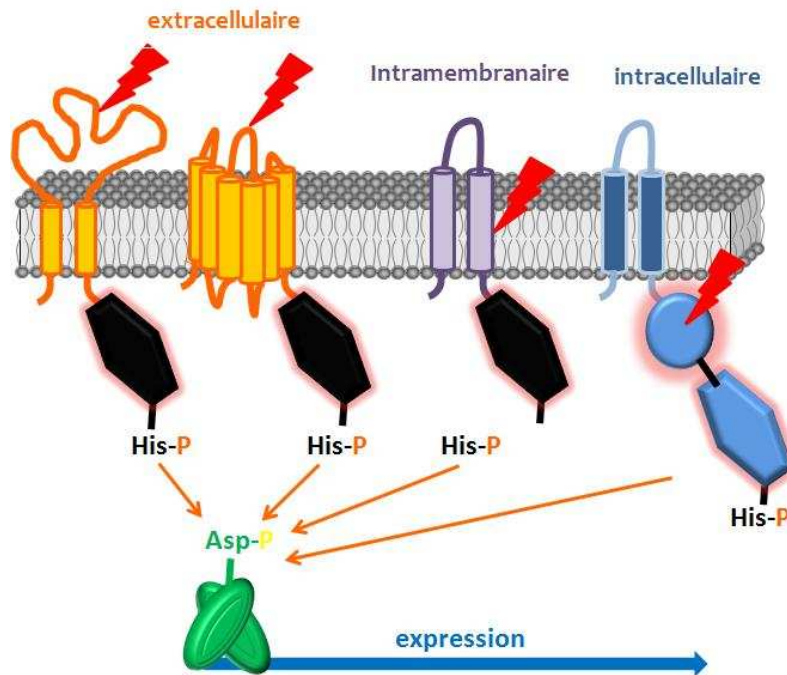


Figure 60. Les différents systèmes à deux composants (TCS). Le TCS est composé d'un système senseur le plus souvent membranaire qui reconnaît un signal pouvant être extracellulaire, intramembranaire ou intracellulaire. La reconnaissance de ce signal est suivie par sa transmission à la partie intracellulaire du senseur par des changements conformationnels (qui peuvent impliquer le domaine HAMP) et aboutissent à l'autophosphorylation du senseur (au niveau d'une histidine His). Cette autophosphorylation est suivie d'une activité kinase (sur un acide aspartique Asp) du régulateur qui une fois activé va induire la transcription de gènes cibles.

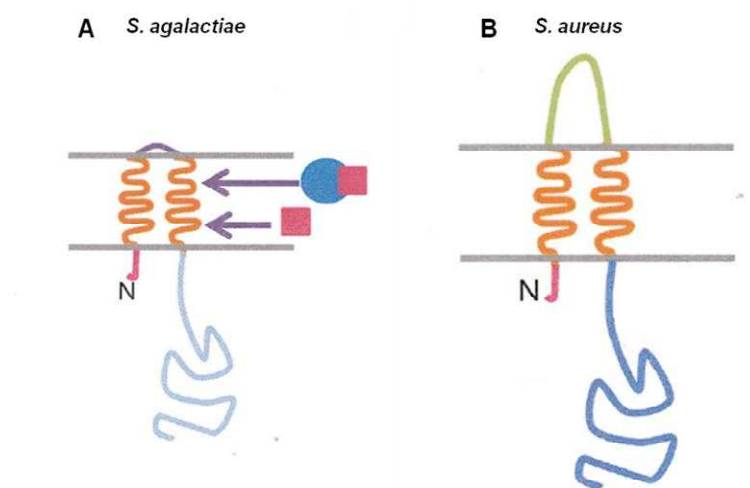


Figure 61. Topologie de HssS chez *S. agalactiae* (A) et *S. aureus* (B). Chez *S. agalactiae*, la boucle extracellulaire est limitée à 19 acides aminés contre 140 pour *S. aureus*. Cette topologie et nos résultats de l'activation de HrtBA par l'hème cellulaire suggèrent une activation impliquant une intervention de l'hème directe ou indirecte (A) avec les domaines transmembranaires.

C La Régulation de HrtBA

Nous avons mis en évidence que chez *S. agalactiae*, la transcription de HrtBA est régulée par un système à deux composants (TCS) similaire au système HssRS de *S. aureus* (Torres *et al.*, 2007) (**Figure 60**).

Les systèmes à deux composants sont impliqués dans la détection de changements de conditions de l'environnement et participent ainsi à l'adaptation bactérienne. Le modèle classique de TCS est composé d'un système senseur, le plus souvent membranaire, qui reconnaît un signal par l'intermédiaire d'une boucle extracellulaire (Perry *et al.*, 2011) (**Figure 60**). La reconnaissance de ce signal est suivie par sa transmission à la partie intracellulaire du senseur par des changements conformationnels qui impliquent le domaine HAMP (Schultz *et al.*, 2015) jusqu'au domaine d'autophosphorylation (His 249) pour HssS de *S. agalactiae*. Cette autophosphorylation est suivie d'une activité kinase du régulateur qui une fois activé va induire la transcription de gènes cibles (Groves and Kuriyan, 2010). Chez HssS de *S. aureus*, il a été montré que certains AAs de la partie cytoplasmique de HssS sont indispensables à la fonction de transduction du signal hème de HssS (Stauff and Skaar, 2009). Cependant une interaction directe de l'hème avec ce domaine n'a pas été montré.

Nous avons démontré que chez *S. agalactiae*, l'induction du promoteur senseur P_{GBS0119} n'est pas sensible à l'hème extracellulaire mais à l'hème intracellulaire ce qui suggère un mécanisme différent. Il est intéressant de noter que si on compare les séquences protéiques de HssS trouvées chez de nombreux pathogènes et celle de *S. agalactiae*, une partie importante du domaine extracellulaire est manquante (de la sérine S66 à l'alanine A163) (**Figure 61**). Cette donnée confirme qu'il est peu probable que HssS de *S. agalactiae* reconnaisse l'hème extracellulaire. Des TCS qui n'ont pas de domaine extracellulaire ont déjà été décrits et semblent être activés par un signal intramembranaire (Higgins *et al.*, 2004; Mascher *et al.*, 2006).

L'activation dans la membrane peut être directe, ou se faire via une protéine intermédiaire relai, comme il a déjà été décrit pour l'activation du système à deux composants CovRS impliqué dans la sécrétion du pigment hémolytique chez *S. agalactiae*. CovS est activée via la protéine transmembranaire Abx1 (Firon *et al.*, 2013).

Pour résoudre cette question, une mutagenèse pourrait permettre d'identifier des candidats impliqués dans l'activation de HssS.

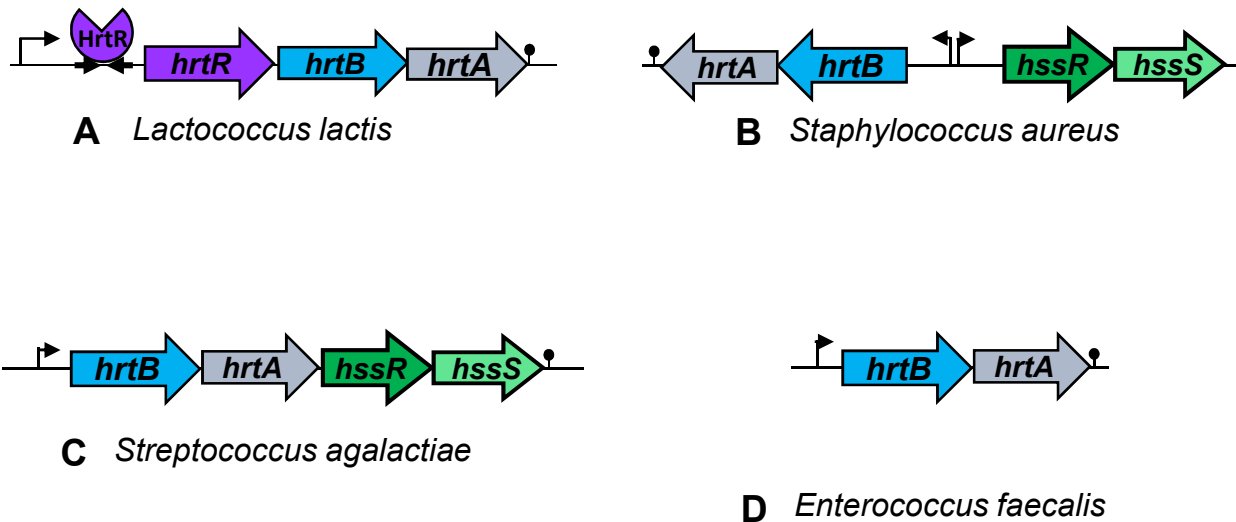


Figure 62. Organisation génétique de HrtBA et son système régulateur HssRS chez *L. lactis* (A), *S. aureus* (B), *S. agalactiae* (C) et *E. faecalis* (D). Les opérons *hrtBA* et *hssRS* présentent 4 organisations génétiques différentes (Torres *et al.*, 2007). (A) Chez *L. lactis*, l'opéron *hrtBA* est régulé par un répresseur transcriptionnel HrtR. (B) Chez *S. aureus*, les deux opérons *hrtBA* et *hssRS* sont adjacents. (C) Chez *S. agalactiae*, *hrtBA* et *hssRS* sont localisés dans le même opéron. (D) Chez *E. faecalis* aucun système à deux composants n'est situé à proximité de l'opéron.

Organisation génétique de l'opéron HrtBA

L'expression de HrtBA peut être contrôlée par un régulateur transcriptionnel de la famille TetR retrouvé chez des bactéries commensales ou alimentaires (Lechardeur *et al.*, 2012). Dans le cas des bactéries pathogènes, elle peut être régulée par le système à deux composants HssRS qui peut être organisé en un opéron distinct de celui de *hrtBA* ou dans le même opéron dans le cas de *S. agalactiae*. Dans le cas de *E. faecalis*, nous n'avons pas identifié de TCS adjacent à l'opéron *hrtBA* (**Figure 61**).

Des systèmes de régulation différents de *hrtBA* semblent donc exister selon les bactéries. On peut faire l'hypothèse que ces différents types d'organisation génétique participent à l'adaptation bactériennes dans différents environnements.

D Impact de l'hème lors de la virulence chez *S. agalactiae*

Nos résultats expérimentaux *in vivo* démontrent que l'hème de l'hôte est un paramètre important de la capacité de *S. agalactiae* à s'adapter à l'environnement hostile du sang pour développer une infection.

D.1 Importance du contrôle de la toxicité de l'hème par le système HrtBA chez *S. agalactiae*

Nous avons démontré dans la publication 2 que chez *S. agalactiae*, le contrôle de la toxicité de l'hème est indispensable à la virulence. Ceci implique que *S. agalactiae* doit faire face *in vivo* à des concentrations toxiques d'hème chez l'hôte. L'hème libre chez l'hôte est régulé de manière très stricte par des hémoprotéines qui neutralisent la toxicité de l'hème. D'autre part, la majorité de l'hème est contenu dans les érythrocytes (Chiabrando *et al.*, 2014) (**Partie 1 § A.2.1**). *In vitro* nous avons montré que la transcription de *hrtBA* (par l'intermédiaire du senseur P_{GBS0119}) était activée dans le sang ce qui suggère que *S. agalactiae* peut utiliser l'hème des érythrocytes. On peut donc supposer que *S. agalactiae* de manière similaire à d'autres pathogènes tels que *S. aureus* peut récupérer de l'hème de l'hôte (Farrand *et al.*, 2013).

S. agalactiae sécrète des hémolysines responsables de la lyse des érythrocytes libérant l'hémoglobine et par conséquent l'hème (**Partie 1 § B.3.3.3**). On peut raisonnablement penser que dans les organes très vascularisés tels que le cœur ou le foie, la capacité hémolytique de *S. agalactiae* explique que cette bactérie se trouve en présence de quantités toxiques d'hème. Il sera intéressant de tester si dans des mutants $\Delta covRS$ ou Δcyl qui sont hyper ou

hypohémolytiques respectivement (Lamy *et al.*, 2004), la toxicité de l'hème est la même chez *S. agalactiae*.

Nous avons démontré que bien que le cerveau soit infecté avec des quantités importantes de bactéries, il n'y a pas d'impact de la délétion de *hrtBA* dans l'infection de cet organe. Logiquement, nous n'avons pas détecté l'activation du senseur d'hème dans cet organe. Comparativement aux autres organes, la protection du tissu cérébral du sang par l'intermédiaire de la barrière hémato-encéphalique ainsi qu'une vascularisation restreinte permet de penser que *S. agalactiae* n'est pas confronté à des concentrations toxiques d'hème dans cet organe.

Nous avons observé que le senseur d'hème est particulièrement activé dans le foie suggérant que dans cet organe, l'hème est particulièrement biodisponible. Le foie a plusieurs caractéristiques pouvant expliquer cette observation. Cet organe est le seul à recevoir le sang de 2 sources : l'artère hépatique qui apporte le sang du cœur et la veine porte qui apporte le sang provenant des intestins. Cet organe est donc particulièrement vascularisé ce qui pourrait peut-être expliquer que les bactéries soient particulièrement confrontées à la toxicité de l'hème dans cet organe.

Bien que notre système senseur d'hème ne réponde qu'à des concentrations toxiques de cette molécule, la visualisation de la luminescence induite par ce système montre que *S. agalactiae* est capable d'internaliser ou au moins d'accumuler dans sa membrane de l'hème *in vivo* puisque nos résultats démontrent que HssS est sensible à la concentration cellulaire d'hème.

D.2 Importance du métabolisme respiratoire dans la virulence de *S. agalactiae*

Nous avons aussi démontré que *S. agalactiae*, bien que pouvant utiliser un métabolisme fermentaire, est dépendante du métabolisme respiratoire pour assurer sa virulence. La virulence de cette bactérie est donc dépendante de sa capacité à acquérir de l'hème.

Comme il a été décrit dans la **partie 1 §A.6.1.1**, le métabolisme respiratoire possède un rendement énergétique supérieur à la fermentation (Duwat *et al.*, 2001). Il est concevable que cet avantage soit nécessaire à la bactérie qui, lors de l'infection se multiplie dans les différents organes de l'hôte. Le métabolisme respiratoire permet aussi à la bactérie de lutter contre le stress oxydant provoqué par l'oxygène et le stress acide provoqué par l'acide

lactique produit lors de la fermentation (Lechardeur *et al.*, 2011; Gaudu *et al.*, 2002; Duwat *et al.*, 2001), ce qui peut lui conférer un avantage dans le milieu oxydant du sang. La nécessité pour la bactérie de se protéger du stress oxydant est déjà démontrée puisque la délétion des gènes codants pour la superoxyde dismutase qui permet la lutte contre le stress oxydant, diminue la virulence de *S. agalactiae* (Poyart *et al.*, 2001).

E Perspectives

E.1 Poursuite des études *in vitro*

Plusieurs axes d'études sont à poursuivre *in vitro* :

- ✓ L'étude des mécanismes d'efflux de l'hème par le transporteur HrtBA par exemple par l'identification des mécanismes d'activation du senseur HssS par l'hème ainsi que l'étude de l'induction membranaire pour définir une activation directe ou médiée par une protéine membranaire.
- ✓ La validation des candidats HssS et HssR chez *E. faecalis*

E.2 Poursuite des études *in vivo*

Plusieurs études en fonctions des différentes bactéries modèles sont à poursuivre :

- ✓ Chez *L. lactis*, l'utilisation des bactéries chargées en hème membranaire (comme moyen de réduire les carences en fer. Une collaboration avec Danone est envisagée.
- ✓ Chez *S. agalactiae*, l'étude du lien entre hémolyse et l'acquisition de l'hème par l'utilisation des souches $\Delta covRS$ et Δcyl , souches hyper et hypohémolytiques
- ✓ Chez *E. faecalis*, l'étude de l'importance du métabolisme respiratoire et de la toxicité de l'hème pour la colonisation du tractus digestif, impact de l'hème apporté par l'alimentation sur la colonisation et la persistance des bactéries.
- ✓ Chez *S. aureus*, l'impact de la toxicité de l'hème de l'hôte pourra être étudié. Ces études n'ont pas été menées, faute de temps, mais tous les éléments (souches, plasmides) sont fonctionnels.
- ✓ Le plasmide pP₂₃*lux* est fonctionnel aussi bien chez les bactéries à GRAM positif que chez les bactéries à GRAM négatif. Il pourrait être utilisé pour différentes études (efficacité d'un antibiotique, étude de la dissémination de bactéries pathogènes durant l'infection, étude de la colonisation élargie à d'autres membres du microbiote intestinal).

E.3 Améliorations possibles

Plusieurs démarches sont envisageables pour améliorer les études :

✓ Pour optimiser la luminescence plusieurs démarches sont envisageable comme l'injection de riboflavine, participants aux mécanismes d'émission de la luminescence ; l'ajout d'un promoteur fort devant les gènes permettant la synthèse du substrat ; l'insertion de l'opéron complet dans le chromosome pour éviter tout problèmes liés à la stabilité du plasmide.

✓ Pour affiner l'étude de la virulence, l'injection des bactéries en intra-péritonéale et non en intraveineux pourraient peut-être mieux mimer un schéma d'infection et/ou permettre une infection plus étalée dans le temps

✓ Pour poursuivre les études de la colonisation, la mise au point d'un traitement antibiotique entraînant une dysbiose (perturbation du microbiote intestinal) pourrait permettre une étude de la colonisation du microbiote intestinal à long terme.

Bibliographie

- Abicht, H. K., Gonskikh, Y., Gerber, S. D., & Solioz, M. (2013). Non-enzymic copper reduction by menaquinone enhances copper toxicity in *Lactococcus lactis* IL1403. *Microbiology (United Kingdom)*, 159(PART 6), 1190–1197. <http://doi.org/10.1099/mic.0.066928-0>
- Abi-Khalil, E., Segond, D., Terpstra, T., André-Leroux, G., Kallassy, M., Lereclus, D., ... Nielsen-Leroux, C. (2015). Heme interplay between IlsA and IsdC: Two structurally different surface proteins from *Bacillus cereus*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(9), 1930–1941. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.06.006>
- Ahlquist, D. a, McGill, D. B., Schwartz, S., Taylor, W. F., & Owen, R. a. (1985). Fecal blood levels in health and disease. A study using HemoQuant. *The New England Journal of Medicine*, 312(22), 1422–8. <http://doi.org/10.1056/NEJM198505303122204>
- Al-Maani, A., Streitenberger, L., Clarke, M., Yau, Y. C. W., Kovach, D., Wray, R., & Matlow, A. (2014). Nosocomial transmission of group B streptococci proven by positive environmental culture. *Oman Medical Journal*, 29(5), 376–379. <http://doi.org/10.5001/omj.2014.100>
- Andersen, C. B. F., Torvund-Jensen, M., Nielsen, M. J., de Oliveira, C. L. P., Hersleth, H.-P., Andersen, N. H., ... Moestrup, S. K. (2012). Structure of the haptoglobin–haemoglobin complex. *Nature*, 489(7416), 456–459. <http://doi.org/10.1038/nature11369>
- Andrade, M. a, Ciccarelli, F. D., Perez-Iratxeta, C., & Bork, P. (2002). NEAT: a domain duplicated in genes near the components of a putative Fe³⁺ siderophore transporter from Gram-positive pathogenic bacteria. *Genome Biology*, 3(9), RESEARCH0047. <http://doi.org/10.1186/gb-2002-3-9-research0047>
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Visca, P., Altruda, F., Tolosano, E., Beringhelli, T., & Fasano, M. (2005). Hemoglobin and heme scavenging. *IUBMB Life*, 57(11), 749–759. <http://doi.org/10.1080/15216540500380871>
- Ballard, M. S., Schønheyder, H. C., Knudsen, J. D., Lyytikäinen, O., Dryden, M., Kennedy, K. J., ... Laupland, K. B. (2016). The changing epidemiology of group B streptococcus bloodstream infection: A multi-national population-based assessment. *Infectious Diseases (London, England)*, 1–6. <http://doi.org/10.3109/23744235.2015.1131330>
- Barichello, T., Lemos, J. C., Generoso, J. S., Carradore, M. M., Moreira, A. P., Collodel, A., ... Quevedo, J. (2013). Evaluation of the brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor and memory in adult rats survivors of the neonatal meningitis by *Streptococcus*

- agalactiae. *Brain Research Bulletin*, 92, 56–59.
<http://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.05.014>
- Baureder, M., Barane, E., & Hederstedt, L. (2014). In vitro assembly of catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 289(41), 28411–28420. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.596148>
- Baureder, M., & Hederstedt, L. (2012). Genes important for catalase activity in enterococcus faecalis. *PLoS ONE*, 7(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0036725>
- Bishop, E. J., Shilton, C., Benedict, S., Kong, F., Gilbert, G. L., Gal, D., ... Currie, B. J. (2007). Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus porosus* caused by *Streptococcus agalactiae*: an outbreak and review of the animal and human literature. *Epidemiology and Infection*, 135(8), 1248–1255.
<http://doi.org/10.1017/S0950268807008515>
- Bolotin, A., Wincker, P., Mager, S., Jaillon, O., Malarne, K., Weissenbach, J., ... Sorokin, A. (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Research*. <http://doi.org/10.1101/gr.1697R>
- Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J., & Verkhovsky, M. I. (2011). The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <http://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.06.016>
- Borisov, V. B., & Verkhovsky, M. I. (2015). Oxygen as Acceptor. *EcoSal Plus*, 6(2), 1–32.
<http://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.2.7>
- Bouhss, A., Josseume, N., Severin, A., Tabei, K., Hugonnet, J. E., Shlaes, D., ... Arthur, M. (2002). Synthesis of the L-alanyl-L-alanine cross-bridge of *Enterococcus faecalis* peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 277(48), 45935–45941.
<http://doi.org/10.1074/jbc.M207449200>
- Bourgogne, A., Garsin, D. A., Qin, X., Singh, K. V., Sillanpaa, J., Yerrapragada, S., ... Weinstock, G. M. (2008). Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. *Genome Biol*, 9(7), R110.
<http://doi.org/10.1186/gb-2008-9-7-r110>
- Boylan, J. a, Posey, J. E., & Gherardini, F. C. (2003). *Borrelia* oxidative stress response regulator, BosR: a distinctive Zn-dependent transcriptional activator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11684–9.
<http://doi.org/10.1073/pnas.2032956100>
- Brear, E. M., Day, D. A., & Smith, P. M. C. (2013). Iron: an essential micronutrient for the legume-rhizobium symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 4(359), 1–15.
<http://doi.org/10.3389/fpls.2013.00359>

- Brochet, M., Couvé, E., Zouine, M., Vallaëys, T., Rusniok, C., Lamy, M.-C., ... Glaser, P. (2006). Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes and Infection / Institut Pasteur*, 8(5), 1227–43. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.11.010>
- Brown, C. K., Gu, Z.-Y., Matsuka, Y. V, Purushothaman, S. S., Winter, L. a, Cleary, P. P., ... Earhart, C. a. (2005). Structure of the streptococcal cell wall C5a peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18391–18396. <http://doi.org/10.1073/pnas.0504954102>
- Brugna, M., Tasse, L., & Hederstedt, L. (2010). In vivo production of catalase containing haem analogues. *FEBS Journal*, 277(12), 2663–2672. <http://doi.org/10.1111/j.1742-464X.2010.07677.x>
- Bryan-Jones, D. G., & Whittenbury, R. (1969). Haematin-dependent Oxidative Phosphorylation in *Streptococcus faecalis*. *Journal of General Microbiology*, 58(2), 247–260. <http://doi.org/10.1099/00221287-58-2-247>
- Burgos, J. M., & Schmitt, M. P. (2012). The ChrA response regulator in *Corynebacterium diphtheriae* controls hemin-regulated gene expression through binding to the hmuO and hrtAB promoter regions. *Journal of Bacteriology*, 194(7), 1717–1729. <http://doi.org/10.1128/JB.06801-11>
- Burnham, C. A. D., Shokoples, S. E., & Tyrrell, G. J. (2007). Rac1, RhoA, and Cdc42 participate in HeLa cell invasion by group B streptococcus. *FEMS Microbiology Letters*, 272(1), 8–14. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00768.x>
- Caldwell DR, White DC, Bryant MP, D. R. (1965). Specificity of the heme requirement for growth of *Bacteroides ruminicola*. *J Bacteriol.*
- Carlin, A. F., Lewis, A. L., Varki, A., & Nizet, V. (2007). Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 189, pp. 1231–1237). <http://doi.org/10.1128/JB.01155-06>
- Carroll, P., Schreuder, L. J., Muwanguzi-Karugaba, J., Wiles, S., Robertson, B. D., Ripoll, J., ... Parish, T. (2010). Sensitive detection of gene expression in mycobacteria under replicating and non-replicating conditions using optimized far-red reporters. *PLoS ONE*, 5(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0009823>
- Casjens, S. R., Mongodin, E. F., Qiu, W. G., Luft, B. J., Schutzer, S. E., Gilcrease, E. B., ... Fraser, C. M. (2012). Genome stability of lyme disease spirochetes: Comparative genomics of *borrelia burgdorferi* plasmids. *PLoS ONE*, 7(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0033280>

- Cavanagh, D., Fitzgerald, G. F., & McAuliffe, O. (2015). From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology*, 47, 45–61. <http://doi.org/10.1016/j.fm.2014.11.001>
- Cederlund, M., Deronic, A., Pallon, J., Sørensen, O. E., & Ørskov, B. (2015). A1M-microglobulin is proteolytically activated by myeloperoxidase, binds its heme group and inhibits low density lipoprotein oxidation. *Frontiers in Physiology*, 6(FEB). <http://doi.org/10.3389/fphys.2015.00011>
- Cesselin, B., Ali, D., Gratadoux, J. J., Gaudu, P., Duwat, P., Gruss, A., & El Karoui, M. (2009). Inactivation of the *Lactococcus lactis* high-affinity phosphate transporter confers oxygen and thiol resistance and alters metal homeostasis. *Microbiology*, 155(7), 2274–2281. <http://doi.org/10.1099/mic.0.027797-0>
- Chiabrando, D., Mercurio, S., & Tolosano, E. (2014). Heme and erythropoiesis: More than a structural role. *Haematologica*. <http://doi.org/10.3324/haematol.2013.091991>
- Choby, J. E., & Skaar, E. P. (2016). Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. *Journal of Molecular Biology*, 428(17), 3408–3428. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.03.018>
- Cowgill, K., Taylor, T. H. J., Schuchat, A., Schrag, S., K., C., T.H., T. J., ... S., S. (2003). Report from the CDC. Awareness of perinatal group B Streptococcal infection among women of childbearing age in the United States, 1999 and 2002. *Journal of Women's Health*, 12(6), 527–532. <http://doi.org/10.1089/154099903768248221>
- Cuthbertson, L., & Nodwell, J. R. (2013). The TetR Family of Regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, 77(3), 440–475. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00018-13>
- Cutler, C. W., Kalmar, J. R., & Genco, C. A. (1995). Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends in Microbiology*. [http://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88874-5](http://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88874-5)
- Dailey, H. A., Gerdes, S., Dailey, T. A., Burch, J. S., & Phillips, J. D. (2015). Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(7), 2210–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.1416285112>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. [http://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](http://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
- Daou, N., Buisson, C., Gohar, M., Vidic, J., Bierre, H., Kallassy, M., ... Nielsen-LeRoux, C.

- (2009). IIsA, a unique surface protein of *Bacillus cereus* required for iron acquisition from heme, hemoglobin and ferritin. *PLoS Pathogens*, 5(11). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000675>
- Das, P. K., & Dey, A. (2014). Resonance raman, electron paramagnetic resonance, and density functional theory calculations of a phenolate-bound iron porphyrin complex: Electrostatic versus covalent contribution to bonding. *Inorganic Chemistry*, 53(14), 7361–7370. <http://doi.org/10.1021/ic500716d>
- Davanzo, R., De Cunto, A., Travan, L., Bacolla, G., Creti, R., & Demarini, S. (2013). To feed or not to feed? Case presentation and best practice guidance for human milk feeding and group B streptococcus in developed countries. *Journal of Human Lactation : Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 29(4), 452–7. <http://doi.org/10.1177/0890334413480427>
- De Château, M. & Björck, L. Protein PAB, a mosaic albumin-binding bacterial protein representing the first contemporary example of module shuffling. *J. Biol. Chem.* **269**, 12147–12151 (1994).
- Delanghe, J. R., & Langlois, M. R. (2001). Hemopexin: A review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta*. [http://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00586-1](http://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00586-1)
- Delannoy, C. M. J., Crumlish, M., Fontaine, M. C., Pollock, J., Foster, G., Dagleish, M. P., ... Zadoks, R. N. (2013). Human *Streptococcus agalactiae* strains in aquatic mammals and fish. *BMC Microbiology*, 13(1), 41. <http://doi.org/10.1186/1471-2180-13-41>
- Dermer, P., Lee, C., Eggert, J., & Few, B. (2004). A history of neonatal group B streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States. *Journal of Pediatric Nursing*. <http://doi.org/10.1016/j.pedn.2004.05.012>
- Desuzinges-Mandon, E., Arnaud, O., Martinez, L., Huché, F., Di Pietro, A., & Falson, P. (2010). ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), 33123–33133. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.139170>
- Devriese, L. A., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K., & Haesebrouck, F. (1995). Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 187–197. [http://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00119-Q](http://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00119-Q)
- Di Renzo, G. C., Melin, P., Berardi, a, Blennow, M., Carbonell-Estrany, X., Donzelli, G. P., ... El Helali, N. (2014). Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis: a

- European consensus conference. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine : The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 0(0), 1–17. <http://doi.org/10.3109/14767058.2014.934804>
- Dittrich, M., Hayashi, S., & Schulten, K. (2004). ATP hydrolysis in the betaTP and betaDP catalytic sites of F1-ATPase. *Biophysical Journal*, 87(5), 2954–2967. <http://doi.org/10.1529/biophysj.104.046128>
- Dramsi, S., Caliot, E., Bonne, I., Guadagnini, S., Prévost, M. C., Kojadinovic, M., ... Trieu-Cuot, P. (2006). Assembly and role of pili in group B streptococci. *Molecular Microbiology*, 60(6), 1401–1413. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05190.x>
- Dryla, A., Gelbmann, D., Von Gabain, A., & Nagy, E. (2003). Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Molecular Microbiology*, 49(1), 37–53. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03542.x>
- Duménil, G., & Nassif, X. (2005). Extracellular bacterial pathogens and small GTPases of the Rho family: an unexpected combination. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 291, 11–28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15981457>
- Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., ... Gruss, A. (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology*, 183(15), 4509–4516. <http://doi.org/10.1128/JB.183.15.4509-4516.2001>
- Easmon, C. S., Hastings, M. J., Clare, A. J., Bloxham, B., Marwood, R., Rivers, R. P., & Stringer, J. (1981). Nosocomial transmission of group B streptococci. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 283(6289), 459–61. <http://doi.org/10.1136/bmj.283.6289.459>
- Edwards, M. S., & Baker, C. J. (2005). Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(6), 839–847. <http://doi.org/10.1086/432804>
- Egan, K., Field, D., Rea, M. C., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2016). Bacteriocins: Novel Solutions to Age Old Spore-Related Problems? *Frontiers in Microbiology*, 7, 461. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00461>
- Egesten, A., Frick, I. M., Mörgelin, M., Olin, A. I. & Björck, L. Binding of albumin promotes bacterial survival at the epithelial surface. *J. Biol. Chem.* **286**, 2469–2476 (2011).
- Ejendal, K. F. K., & Hrycyna, C. a. (2002). Multidrug resistance and cancer: the role of the

- human ABC transporter ABCG2. *Current Protein & Peptide Science*, 3(5), 503–511.
<http://doi.org/10.2174/1389203023380521>
- Elsbach, P. (2003). What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *Journal of Clinical Investigation*.
<http://doi.org/10.1172/JCI18761>
- Engelmann, S., Lindner, C., & Hecker, M. (1995). Cloning, nucleotide sequence, and regulation of katE encoding a sigma B-dependent catalase in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 177(19), 5598–5605.
- Faller, M., Matsunaga, M., Yin, S., Loo, J. a, & Guo, F. (2007). Heme is involved in microRNA processing. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(1), 23–9.
<http://doi.org/10.1038/nsmb1182>
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., & Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl*, 92(1), 48–55.
<http://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2003.tb00646.x>
- Farley, M. M. (2001). Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(4), 556–561. <http://doi.org/10.1086/322696>
- Farrand, A. J., Reniere, M. L., Ingmer, H., Frees, D., & Skaar, E. P. (2013). Regulation of host hemoglobin binding by the *Staphylococcus aureus* Clp Proteolytic system. *Journal of Bacteriology*, 195(22), 5041–5050. <http://doi.org/10.1128/JB.00505-13>
- Feissner, R. E., Richard-Fogal, C. L., Frawley, E. R., & Kranz, R. G. (2006). ABC transporter-mediated release of a haem chaperone allows cytochrome c biogenesis. *Molecular Microbiology*, 61(1), 219–231. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05221.x>
- Fernandez, A., Lechardeur, D., Derré-Bobillot, A., Couvé, E., Gaudu, P., & Gruss, A. (2010). Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathogens*, 6(4), e1000860.
<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000860>
- Firon, A., Tazi, A., Da Cunha, V., Brinster, S., Sauvage, E., Dramsi, S., ... Trieu-Cuot, P. (2013). The Abi-domain Protein Abx1 Interacts with the CovS Histidine Kinase to Control Virulence Gene Expression in Group B *Streptococcus*. *PLoS Pathogens*, 9(2).
<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003179>
- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*. <http://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>

- Fluegge, K., Siedler, A., Heinrich, B., Schulte-Moenting, J., Moennig, M.-J., Bartels, D. B., ... Berner, R. (2006). Incidence and clinical presentation of invasive neonatal group B streptococcal infections in Germany. *Pediatrics*, 117(6), e1139-45. <http://doi.org/10.1542/peds.2005-2481>
- Foligne, B., Dessein, R., Marceau, M., Poiret, S., Chamaillard, M., Pot, B., ... Daniel, C. (2007). Prevention and Treatment of Colitis With *Lactococcus lactis* Secreting the Immunomodulatory Yersinia LcrV Protein. *Gastroenterology*, 133(3), 862–874. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2007.06.018>
- Fournier, C., Smith, A., & Delepelaire, P. (2011). Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity. *Molecular Microbiology*, 80(1), 133–148. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07562.x>
- Francis, K. P., Joh, D., Bellinger-Kawahara, C., Hawkinson, M. J., Purchio, T. F., & Contag, P. R. (2000). Monitoring bioluminescent *Staphylococcus aureus* infections in living mice using a novel luxABCDE construct. *Infection and Immunity*, 68(6), 3594–3600. <http://doi.org/10.1128/IAI.68.6.3594-3600.2000>
- Francis, K. P., Yu, J., Bellinger-Kawahara, C., Joh, D., Hawkinson, M. J., Xiao, G., ... Contag, P. R. (2001). Visualizing pneumococcal infections in the lungs of live mice using bioluminescent *Streptococcus pneumoniae* transformed with a novel gram-positive lux transposon. *Infection and Immunity*, 69(5), 3350–3358. <http://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3350-3358.2001>
- Franco, R. S. (2012). Measurement of red cell lifespan and aging. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. <http://doi.org/10.1159/000342232>
- Frankenberg, L., Brugna, M., & Hederstedt, L. (2002). *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase. In *Journal of Bacteriology* (Vol. 184, pp. 6351–6356). <http://doi.org/10.1128/JB.184.22.6351-6356.2002>
- Fraser, C. M., Norris, S. J., Weinstock, G. M., White, O., Sutton, G. G., Dodson, R., ... Venter, J. C. (1998). Complete Genome Sequence of *Treponema pallidum*, the Syphilis Spirochete. *Science*, 281(5375), 375–388. <http://doi.org/10.1126/science.281.5375.375>
- Friedman, D. B., Stauff, D. L., Pishchany, G., Whitwell, C. W., Torres, V. J., & Skaar, E. P. (2006). *Staphylococcus aureus* redirects central metabolism to increase iron availability. *PLoS Pathogens*, 2(8), 0777–0789. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020087>
- Gaudu, P., Lamberet, G., Poncet, S., & Gruss, A. (2003). CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 50(1), 183–192. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03700.x>

- Gaudu, P., Vido, K., Cesselin, B., Kulakauskas, S., Tremblay, J., Rezaïki, L., ... Gruss, A. (2002). Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82(1–4), 263–269. <http://doi.org/10.1023/A:1020635600343>
- Geissler, C., & Singh, M. (2011). Iron, meat and health. *Nutrients*. <http://doi.org/10.3390/nu3030283>
- Gest, H. (1987). Evolutionary roots of the citric acid cycle in prokaryotes. *Biochemical Society Symposium*, 54, 3–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3332996>
- Gibbs, R. S., Schrag, S., & Schuchat, A. (2004). Perinatal Infections Due to Group B Streptococci. *Obstetrics & Gynecology*, 104(5, Part 1), 1062–1076. <http://doi.org/10.1097/01.AOG.0000144128.03913.c2>
- Gilles-Gonzalez, M.-A., & Gonzalez, G. (2004). Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md : 1985)*, 96(2), 774–783. <http://doi.org/10.1152/jappphysiol.00941.2003>
- Giuffré, A., Borisov, V. B., Arese, M., Sarti, P., & Forte, E. (2014). Cytochrome bd oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <http://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2014.01.016>
- Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., ... Kunst, F. (2002). Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular Microbiology*, 45(6), 1499–1513. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03126.x>
- Grinberg, L. N., O'Brien, P. J., & Hrkal, Z. (1999). The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalytic activities of hemin. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(1–2), 214–219. [http://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00082-9](http://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00082-9)
- Groves, J. T., & Kuriyan, J. (2010). Molecular mechanisms in signal transduction at the membrane. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(6), 659–665. <http://doi.org/10.1038/nsmb.1844>
- Gruss, A., Borezée-Durant, E., & Lechardeur, D. (2012). Environmental Heme Utilization by Heme-Auxotrophic Bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 61, 69–124. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00003-2>
- Haas, W., Shepard, B. D., & Gilmore, M. S. (2002). Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature*, 415(6867), 84–87. <http://doi.org/10.1038/415084a>

- Hagman, K. E., Pan, W., Spratt, B. G., Balthazar, J. T., Judd, R. C., & Shafer, W. M. (1995). Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrRCDE efflux system. *Microbiology*, 141(3), 611–622. <http://doi.org/10.1099/13500872-141-3-611>
- Halpern, D., Gruss, A. A sensitive bacterial-growth-based test reveals how intestinal *Bacteroides* meet their porphyrin requirement. *BMC Microbiol.* 2015 Dec 29;15:282. Doi: 10.1186/s12866-015-0616-0.
- Hammer, N. D., Reniere, M. L., Cassat, J. E., Zhang, Y., Hirsch, A. O., Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2013). Two heme-dependent terminal oxidases power *Staphylococcus aureus* organ-specific colonization of the vertebrate host. *mBio*, 4(4). <http://doi.org/10.1128/mBio.00241-13>
- Handley, P. S., & Jacob, A. E. (1981). Some structural and physiological properties of fimbriae of *Streptococcus faecalis*. *J Gen Microbiol*, 127(2), 289–293. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6123542
- Hannibal, L., Collins, D., Brassard, J., Chakravarti, R., Vempati, R., Dorlet, P., ... Stuehr, D. J. (2012). Heme binding properties of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, 51(43), 8514–8529. <http://doi.org/10.1021/bi300863a>
- Hargrove, M. S., Barrick, D., & Olson, J. S. (1996). The association rate constant for heme binding to globin is independent of protein structure. *Biochemistry*, 35(35), 11293–11299. <http://doi.org/10.1021/bi960371l>
- Hargrove, M. S., & Olson, J. S. (1996). The stability of holomyoglobin is determined by heme affinity. *Biochemistry*, 35(35), 11310–11318. <http://doi.org/10.1021/bi9603736>
- Hederstedt, L. (2012). Heme A biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. <http://doi.org/10.1016/j.bbabo.2012.03.025>
- Henneke, P., Dramsi, S., Mancuso, G., Chraïbi, K., Pellegrini, E., Theilacker, C., ... Trieu-Cuot, P. (2008). Lipoproteins are critical TLR2 activating toxins in group B streptococcal sepsis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(9), 6149–6158. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.6149>
- Heyer, A., G??tgens, C., Hentschel, E., Kalinowski, J., Bott, M., & Frunzke, J. (2012). The two-component system ChrSA is crucial for haem tolerance and interferes with HrrSA in haemdependent gene regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(12), 3020–3031. <http://doi.org/10.1099/mic.0.062638-0>
- Hickman, M. E., Rench, M. a, Ferrieri, P., & Baker, C. J. (1999). Changing epidemiology of

- group B streptococcal colonization. *Pediatrics*, 104(2), 203–209.
<http://doi.org/10.1542/peds.104.2.203>
- Higgins, M. K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., & Koronakis, V. (2004). Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(27), 9994–9.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0400375101>
- Hufnagel, M., Kropec, A., Theilacker, C., & Huebner, J. (2005). Naturally acquired antibodies against four *Enterococcus faecalis* capsular polysaccharides in healthy human sera. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(8), 930–4.
<http://doi.org/10.1128/CDLI.12.8.930-934.2005>
- Hutchens, M., & Luker, G. D. (2007). Applications of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases. *Cellular Microbiology*. <http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00995.x>
- Ike, Y., Hashimoto, H., & Clewell, D. B. (1987). High incidence of hemolysin production by *Enterococcus* (*Streptococcus*) *faecalis* strains associated with human parenteral infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(8), 1524–1528.
- Imlay, J. A., & Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240(4857), 1302–1309. <http://doi.org/10.1126/science.3287616>
- Ingledeu, W. J., Rothery, R. a, Gennis, R. B., & Salerno, J. C. (1992). The orientation of the three haems of the “in situ” ubiquinol oxidase, cytochrome bd, of *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal*, 282 (Pt 1, 255–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1130916&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Ivanov, I. T., Boytcheva, S., & Mihailova, G. (1999). Parallel study of thermal resistance and permeability barrier stability of *Enterococcus faecalis* as affected by salt composition, growth temperature and pre-incubation temperature. *Journal of Thermal Biology*, 24(4), 217–227. [http://doi.org/10.1016/S0306-4565\(99\)00012-1](http://doi.org/10.1016/S0306-4565(99)00012-1)
- Iwahara, S., Satoh, H., Song, D. X., Webb, J., Burlingame, a L., Nagae, Y., & Muller-Eberhard, U. (1995). Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol. *Biochemistry*, 34(41), 13398–13406.
<http://doi.org/10.1021/bi00041a017>
- Garcia-Lechuz, JM., Bachiller, P., Vasallo, FJ., Munoz, P., Padilla, B., Bouza, E. (1999). Group B streptococcal osteomyelitis in adults. *Medicine*, 78(3), 191–199.
<http://doi.org/10.1097/00005792-199905000-00005>

- Jett, B. D., Huycke, M. M., & Gilmore, M. S. (1994). Virulence of Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. <http://doi.org/10.1128/CMR.7.4.462>
- Jiang, S., & Wessels, M. R. (2014). BsaB, a novel adherence factor of group B Streptococcus. *Infection and Immunity*, 82(3), 1007–1016. <http://doi.org/10.1128/IAI.01014-13>
- Johnsson, K., Froland, W. a, & Schultz, P. G. (1997). Overexpression, purification, and characterization of the catalase-peroxidase KatG from Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2834–2840. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.5.2834>
- Johri, A. K., Hem, L., Puja, Y., Meenakshi, D., Yang, Y., Xu, X., ... Black, S. (2013). Epidemiology of Group B Streptococcus in developing countries. (Special Issue: Prevention of perinatal group B streptococcal disease through maternal immunization.). *Vaccine*, 31, D43–D45.
- Johri, A. K., Paoletti, L. C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P. K., Grandi, G., & Rappuoli, R. (2006). Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(12), 932–942. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1552>
- Jones, N., Oliver, K. A., Barry, J., Harding, R. M., Bisharat, N., Spratt, B. G., ... Crook, D. W. (2006). Enhanced invasiveness of bovine-derived neonatal sequence type 17 group B streptococcus is independent of capsular serotype. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42(7), 915–924. <http://doi.org/10.1086/500324>
- Joubert, L., Derré-Bobillot, A., Gaudu, P., Gruss, A., & Lechardeur, D. (2014). HrtBA and menaquinones control haem homeostasis in Lactococcus lactis. *Molecular Microbiology*, 93(4), 823–833.
- Juarez-Verdayes, M. a, Gonzalez-Urbe, P. M., Peralta, H., Rodriguez-Martinez, S., Jan-Roblero, J., Escamilla-Hernandez, R., ... Cancino-Diaz, J. C. (2012). Detection of hssS, hssR, hrtA, and hrtB genes and their expression by hemin in Staphylococcus epidermidis . *Can.J.Microbiol.*, 58, 1063–1072. <http://doi.org/10.1139/W2012-086>
- Kim, B. J., Hancock, B. M., Del Cid, N., Bermudez, A., Traver, D., & Doran, K. S. (2015). Streptococcus agalactiae infection in zebrafish larvae. *Microbial Pathogenesis*, 79, 57–60. <http://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.01.007>
- Kalliola, S., Vuopio-Varkila, J., Takala, A. K., & Eskola, J. (1999). Neonatal group B streptococcal disease in Finland: a ten-year nationwide study. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 18(9), 806–810. <http://doi.org/10.1097/00006454-199909000-00012>
- Karaaslan, A., Soysal, A., Kepenekli Kadayifci, E., Yakut, N., Ocal Demir, S., Akkoc, G., ...

- Bakir, M. (2016). *Lactococcus lactis* spp *lactis* infection in infants with chronic diarrhea: two cases report and literature review in children. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(3), 304–7. <http://doi.org/10.3855/jidc.7049>
- Keefe, G. P. (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. *Canadian Veterinary Journal*, 38(7), 429–437. <http://doi.org/1997-008>
- Kery, V., Bukovska, G., & Kraus, J. P. (1994). Transsulfuration depends on heme in addition to pyridoxal 5'-phosphate: Cystathionine γ -synthase is a heme protein. *Journal of Biological Chemistry*, 269(41), 25283–25288.
- Kim, J. A., & Mayfield, J. (2000). Identification of *Brucella abortus* OxyR and its role in control of catalase expression. *Journal of Bacteriology*, 182(19), 5631–5633. <http://doi.org/10.1128/JB.182.19.5631-5633.2000>
- Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. In *International Journal of Food Microbiology* (Vol. 88, pp. 123–131). [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00175-2](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00175-2)
- Kleingardner, J. G., & Bren, K. L. (2015). Biological Significance and Applications of Heme c Proteins and Peptides. *Accounts of Chemical Research*, 48(7), 1845–1852. <http://doi.org/10.1021/acs.accounts.5b00106>
- Klotz, M. G., Klassen, G. R., & Loewen, P. C. (1997). Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Molecular Biology and Evolution*, 14(9), 951–958.
- Knopik-Skrocka, A., & Bielawski, J. (2002). The mechanism of the hemolytic activity of polyene antibiotics. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 7(1), 31–48.
- Kobayashi, N., Nishino, K., & Yamaguchi, A. (2001). Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5639–5644. <http://doi.org/10.1128/JB.183.19.5639-5644.2001>
- Konto-Ghiorgi, Y., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., & Dramsi, S. (2009). Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathogens*, 5(5). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000422>
- Krishnamurthy, P., Xie, T., & Schuetz, J. D. (2007). The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacology and Therapeutics*. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.02.001>
- Kristiansen, M., Graversen, J. H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H. J., Law, S. K., & Moestrup, S. K. (2001). Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*, 409(6817), 198–201. <http://doi.org/10.1038/35051594>

- Krishnamurthy, P. C., Du, G., Fukuda, Y., Sun, D., Sampath, J., Mercer, K. E., ... Schuetz, J. D. (2006). Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature*, 443(7111), 586–589. <http://doi.org/10.1038/nature05125>
- Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., ... Schuetz, J. D. (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 24218–24225. <http://doi.org/10.1074/jbc.M313599200>
- Kruisbeek, a M. (2001). Commonly used mouse strains. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.]*, Appendix 1(1986), Appendix 1C. <http://doi.org/10.1002/0471142735.ima01cs17>
- Kühl, T., Wißbrock, A., Goradia, N., Sahoo, N., Galler, K., Neugebauer, U., ... Imhof, D. (2013). Analysis of Fe(III) heme binding to cysteine-containing heme-regulatory motifs in proteins. *ACS Chemical Biology*, 8(8), 1785–1793. <http://doi.org/10.1021/cb400317x>
- Kumar, S., & Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters*. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.03.004>
- Kuzelová, K., & Brault, D. (1994). Kinetic and equilibrium studies of porphyrin interactions with unilamellar lipidic vesicles. *Biochemistry*, 33(32), 9447–9459.
- Lamagni, TL., Keshishian, C., Efstratiou, A., Guy, R., Henderson, JL., Broughton, K., Sheridan, E. Emerging trends in the epidemiology of invasive group B streptococcal disease in England and Wales, 1991-2010. *Clin Infect Dis*. **57(5):682-**, (2013).
- Lamy, MC., Zouine, M., Vergassola, M., Couve, E., Pellegrini, E., Glasser, P., Kunst, F., Msadek, T., Trieu-Cuot, P., Poyart, C. CovS/CovR of group B streptococcus: A two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol. Microbiol*. **54**, 1250–1268 (2004).
- Lancefield, R. C. (1934). A SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF SPECIFIC TYPES OF BOVINE HEMOLYTIC STREPTOCOCCI (GROUP B). *The Journal of Experimental Medicine*, 59(4), 441–58. <http://doi.org/10.1084/jem.59.4.441>
- Lancefield, R. C. (1935). THE SEROLOGICAL DIFFERENTIATION OF PATHOGENIC AND NON-PATHOGENIC STRAINS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCI FROM PARTURIENT WOMEN. *Journal of Experimental Medicine*, 61(3), 335–349. <http://doi.org/10.1084/jem.61.3.335>
- Lancefield, RC., Freimer, EH. Type-specific polysaccharide antigens of group B streptococci. *J Hyg* **4(2): 191–**, (1966).
- Lang, S., Xue, J., Guo, Z., & Palmer, M. (2007). Streptococcus agalactiae CAMP factor binds

- to GPI-anchored proteins. *Medical Microbiology and Immunology*, 196(1), 1–10.
<http://doi.org/10.1007/s00430-006-0021-2>
- Lang, T., Goyard, S., Lebastard, M., & Milon, G. (2005). Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harboring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. *Cellular Microbiology*, 7(3), 383–392.
<http://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00468.x>
- Larisch, B. C., Poncelet, D., Champagne, C. P., & Neufeld, R. J. (1994). Microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. *Journal of Microencapsulation*, 11(2), 189–95.
<http://doi.org/10.3109/02652049409040450>
- Layer, G., Reichelt, J., Jahn, D., & Heinz, D. W. (2010). Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Science*. <http://doi.org/10.1002/pro.405>
- Layer, G., Verfürth, K., Mahlitz, E., & Jahn, D. (2002). Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase hemN from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34136–34142. <http://doi.org/10.1074/jbc.M205247200>
- Le Doare, K., & Heath, P. T. (2013). An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine*.
<http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.01.009>
- Lebreton, F., Willems, R. J. L., & Gilmore, M. S. (2014). *Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649513>
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Fernandez, A., Lamberet, G., Garrigues, C., Pedersen, M., ... Gruss, A. (2011). Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.001>
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Liebl, U., Vos, M. H., Fernandez, A., Brun, C., ... Gaudu, P. (2012). Discovery of intracellular heme-binding protein HrtR, which controls heme efflux by the conserved HrtB-HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(7), 4752–4758. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.297531>
- Lechardeur, D., Fernandez, A., Robert, B., Gaudu, P., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., & Gruss, A. (2010). The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase C binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), 16032–16041. <http://doi.org/10.1074/jbc.M109.024505>
- Light, W. R., & Olson, J. S. (1990). Transmembrane movement of heme. *Journal of Biological Chemistry*, 265(26), 15623–15631.

- Lindahl, G., Stålhammar-Carlemalm, M., & Areschoug, T. (2005). Surface proteins of *Streptococcus agalactiae* and related proteins in other bacterial pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. <http://doi.org/10.1128/CMR.18.1.102-127.2005>
- Liu, G. Y., Doran, K. S., Lawrence, T., Turkson, N., Puliti, M., Tissi, L., & Nizet, V. (2004). Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40), 14491–14496. <http://doi.org/10.1073/pnas.0406143101>
- Lupo, A., Ruppen, C., Hemphill, A., Spellerberg, B., & Sendi, P. (2014). Phenotypic and molecular characterization of hyperpigmented group B Streptococci. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM*, 304(5–6), 717–24. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.05.003>
- Lv, W., Zhang, X., & Cong, W. (2005). Modelling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3), 322–326. <http://doi.org/10.1007/s00253-005-1892-7>
- Maccallum, W. G., & Hastings, T. W. (1899). A CASE OF ACUTE ENDOCARDITIS CAUSED BY MICROCOCCUS ZYMOGENES (NOV. SPEC.), WITH A DESCRIPTION OF THE MICROORGANISM. *The Journal of Experimental Medicine*, 4(5–6), 521–34. <http://doi.org/10.1084/jem.4.5-6.521>
- MacFarquhar, J., Jones, T., Woron, A., Kainer, M., Beall, B., Schrag, S., Schaffner, W. (2010). Outbreak of late-onset group B Streptococcus in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control.*, 38(4):283-8.
- Maisey HC, Hensler M, Nizet V, Doran, K. (2007). Group B streptococcal pilus proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J Bacteriol, Feb;189(4)*.
- Maisey, HC., Doran, K. S. & Nizet, V. Recent advances in understanding the molecular basis of group B Streptococcus virulence. *Expert Rev. Mol. Med.* **10**, e27 (2008).
- Maisey, HC., Quach, D., Hensler, M. E., Liu, G. Y., Gallo, R. L., Nizet, V., & Doran, K. S. (2008). A Group B Streptococcal Pilus Protein Promotes Phagocyte Resistance and Systemic Virulence. *The FASEB Journal*, 22(6), 1715–1724. <http://doi.org/10.1096/fj.07-093963>
- Maresso, A. W., & Schneewind, O. (2006). Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. In *BioMetals* (Vol. 19, pp. 193–203). <http://doi.org/10.1007/s10534-005-4863-7>
- Marques, M. B., Kasper, D. L., Pangburn, M. K., & Wessels, M. R. (1992). Prevention of C3

- deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. *Infection and Immunity*, 60(10), 3986–3993.
- Maruvada, R., Prasadaraao, N. V., & Rubens, C. E. (2009). Acquisition of factor H by a novel surface protein on group B Streptococcus promotes complement degradation. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23, 3967–3977. <http://doi.org/10.1096/fj.09-138149>
- Mascher, T., Helmann, J. D., & Uden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 70(4), 910–938. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00020-06>
- Mazmanian, S. K., Liu, G., Ton-That, H., & Schneewind, O. (1999). Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5428), 760–3. <http://doi.org/10.1126/science.285.5428.760>
- McAuley, C. M., Gobius, K. S., Britz, M. L., & Craven, H. M. (2012). Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 162–168. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.033>
- McBride, S. M., Coburn, P. S., Baghdayan, A. S., Willems, R. J. L., Grande, M. J., Shankar, N., & Gilmore, M. S. (2009). Genetic variation and evolution of the pathogenicity island of Enterococcus faecalis. *Journal of Bacteriology*, 191(10), 3392–3402. <http://doi.org/10.1128/JB.00031-09>
- Meganathan, R. (2001). Biosynthesis of menaquinone (vitamin K2) and ubiquinone (coenzyme Q): a perspective on enzymatic mechanisms. *Vitam.Horm.*, 61(0083–6729 (Print)), 173–218. <http://doi.org/10.1128/ecosalplus.3.6.3.3>
- Meighen, E. a. (1991). Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiological Reviews*, 55(1), 123–142. <http://doi.org/10.1146/annurev.bi.47.070178.001115>
- Melin, P., & Efstratiou, A. (2013). Group B streptococcal epidemiology and vaccine needs in developed countries. *Vaccine*. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.012>
- Mitchell, R. J., Ahn, J. M., & Gu, M. B. (2005). Comparison of Photobacterium luminescens and Vibrio fischeri lux fusions to study gene expression patterns. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(1), 48–54.
- Mocny, J. C., Olson, J. S., & Connell, T. D. (2007). Passively released heme from hemoglobin and myoglobin is a potential source of nutrient iron for Bordetella bronchiseptica. *Infection and Immunity*, 75(10), 4857–4866. <http://doi.org/10.1128/IAI.00407-07>
- Moet, G. J., Jones, R. N., Biedenbach, D. J., Stilwell, M. G., & Fritsche, T. R. (2007).

- Contemporary causes of skin and soft tissue infections in North America, Latin America, and Europe. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 57(1), 7–13. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=17059876&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum \n<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13936611> \n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1057958>
- Mullaney, D. M. (2001). Group B streptococcal infections in newborns. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*, 30(6), 649–658.
- Mundt, J. O. (1963). Occurrence of enterococci on plants in a wild environment. *Applied Microbiology*, 11(2), 141–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13936611> \n<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1057958>
- Muryoi, N., Tiedemann, M. T., Pluym, M., Cheung, J., Heinrichs, D. E., & Stillman, M. J. (2008). Demonstration of the iron-regulated surface determinant (Isd) heme transfer pathway in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(42), 28125–28136. <http://doi.org/10.1074/jbc.M802171200>
- Nakajo, K., Komori, R., Ishikawa, S., Ueno, T., Suzuki, Y., Iwami, Y., & Takahashi, N. (2006). Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(5), 283–288. <http://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00289.x>
- Nambu, S., Matsui, T., Goulding, C. W., Takahashi, S., & Ikeda-Saito, M. (2013). A new way to degrade heme: The mycobacterium tuberculosis enzyme MhuD catalyzes heme degradation without generating CO. *Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 10101–10109. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.448399>
- Neto, M. T. (2008). Group B streptococcal disease in Portuguese infants younger than 90 days. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 93(2), F90–F93. <http://doi.org/10.1136/adc.2007.127464>
- Nitzan, Y., Wexler, H. M., & Finegold, S. M. (1994). Inactivation of anaerobic bacteria by various photosensitized porphyrins or by hemin. *Current Microbiology*, 29(3), 125–131. <http://doi.org/10.1007/BF01570752>
- Nobbs, A. H., Rosini, R., Rinaudo, C. D., Maione, D., Grandi, G., & Telford, J. L. (2008). Sortase A utilizes an ancillary protein anchor for efficient cell wall anchoring of pili in *Streptococcus agalactiae*. *Infection and Immunity*, 76(8), 3550–3560. <http://doi.org/10.1128/IAI.01613-07>

- Nobles, C. L., & Maresso, A. W. (2011). The theft of host heme by Gram-positive pathogenic bacteria. *Metallomics : Integrated Biometal Science*, 3(8), 788–796. <http://doi.org/10.1039/c1mt00047k>
- Nohl, H., Kozlov, a V, Gille, L., & Staniek, K. (2003). Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts. *Biochemical Society Transactions*, 31(Pt 6), 1308–1311. <http://doi.org/10.1042/BST0311308>
- Nolla, J. M., Gómez-Vaquero, C., Corbella, X., Ordóñez, S., García-Gómez, C., Pérez, A., ... Ariza, J. (2003). Group B streptococcus (*Streptococcus agalactiae*) pyogenic arthritis in nonpregnant adults. *Medicine*, 82(2), 119–28. <http://doi.org/10.1097/00005792-200303000-00006>
- O'Neill, M. J., & Wilks, A. (2013). The *P. aeruginosa* heme binding protein PhuS is a heme oxygenase titratable regulator of heme uptake. *ACS Chemical Biology*, 8(8), 1794–1802. <http://doi.org/10.1021/cb400165b>
- Obinger, C., Maj, M., Nicholls, P., & Loewen, P. (1997). Activity, peroxide compound formation, and heme d synthesis in *Escherichia coli* HPII catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 342(1), 58–67. <http://doi.org/10.1006/abbi.1997.9988>
- Panek, H., & O'Brian, M. R. (2002). A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology*. <http://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2273>
- Park, S. E., Jiang, S., & Wessels, M. R. (2012). CsrRS and environmental pH regulate group B *Streptococcus* adherence to human epithelial cells and extracellular matrix. *Infection and Immunity*, 80(11), 3975–3984. <http://doi.org/10.1128/IAI.00699-12>
- Passerini, D., Laroute, V., Coddeville, M., Le Bourgeois, P., Loubière, P., Ritzenthaler, P., ... Daveran-Mingot, M. L. (2013). New insights into *Lactococcus lactis* diacetyl- and acetoin-producing strains isolated from diverse origins. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 329–336. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.023>
- Patterson, H., Saralahti, A., Parikka, M., Dramsi, S., Trieu-Cuot, P., Poyart, C., ... R??met, M. (2012). Adult zebrafish model of bacterial meningitis in *Streptococcus agalactiae* infection. *Developmental and Comparative Immunology*, 38(3), 447–455. <http://doi.org/10.1016/j.dci.2012.07.007>
- Pedersen, M. B., Garrigues, C., Tophile, K., Brun, C., Vido, K., Bennedsen, M., ... Gruss, A. (2008). Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: Identification of a heme-responsive operon. *Journal of Bacteriology*, 190(14), 4903–4911. <http://doi.org/10.1128/JB.00447-08>
- Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M.-A., & Gruss, A. (2012). Aerobic

- Respiration Metabolism in Lactic Acid Bacteria and Uses in Biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 37–58. <http://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101255>
- Perry, J., Koteva, K., & Wright, G. (2011). Receptor domains of two-component signal transduction systems. *Molecular bioSystems*, 7(5), 1388–98. <http://doi.org/10.1039/c0mb00329h>
- Persson, K. M. S., Bjerre, B., Elfstr m, L., Polberger, S., & Forsgren, A. (1986). Faecal carriage of group B streptococci. *European Journal of Clinical Microbiology*, 5(2), 156–159. <http://doi.org/10.1007/BF02013972>
- Peschel, A. (2002). How do bacteria resist human antimicrobial peptides? *Trends in Microbiology*. [http://doi.org/10.1016/S0966-842X\(02\)02333-8](http://doi.org/10.1016/S0966-842X(02)02333-8)
- Pezzicoli, A., Santi, I., Lauer, P., Rosini, R., Rinaudo, D., Grandi, G., ... Soriani, M. (2008). Pilus backbone contributes to group B Streptococcus paracellular translocation through epithelial cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(6), 890–8. <http://doi.org/10.1086/591182>
- Phares, C. R., Lynfield, R., Farley, M. M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L. H., Petit, S., ... Schrag, S. J. (2008). Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA : The Journal of the American Medical Association*, 299(17), 2056–65. <http://doi.org/10.1001/jama.299.17.2056>
- Pimentel, B. A. S., Martins, C. A. S., Mendonça, J. C., Miranda, P. S. D., Sanches, G. F., Mattos-Guaraldi, A. L., & Nagao, P. E. (2016). Streptococcus agalactiae infection in cancer patients: a five-year study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, pp. 1–7. <http://doi.org/10.1007/s10096-016-2617-9>
- Pishchany, G., Sheldon, J. R., Dickson, C. F., Alam, M. T., Read, T. D., Gell, D. A., ... Skaar, E. P. (2014). IsdB-dependent hemoglobin binding is required for acquisition of heme by Staphylococcus aureus. *Journal of Infectious Diseases*, 209(11), 1764–1772. <http://doi.org/10.1093/infdis/jit817>
- Poh, C. H., Oh, H. M. L., & Tan, A. L. (2006). Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 3533–3537. <http://doi.org/10.1128/JCM.44.12.3533-3537.2006>
- Poyart, C., Lamy, MC., Boumaila, C., Fiedler, F., Trieu-Cuot, P. Regulation of D-alanyl-lipoteichoic acid biosynthesis in Streptococcus agalactiae involves a novel two-component regulatory system. *J Bacteriol.* **183(21):63**, (2001).
- Poyart, C., Pellegrini, E., Gaillot, O., Boumaila, C., Baptista, M., & Trieu-Cuot, P. (2001). Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of

- Streptococcus agalactiae*. *Infection and Immunity*, 69(8), 5098–5106. <http://doi.org/10.1128/IAI.69.8.5098-5106.2001>
- Poyart, C., & Trieu-Cuot, P. (1997). A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to β -galactosidase in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 156(2), 193–198. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00423-0](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00423-0)
- l of Infection*, 52(5), 383–386. <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2005.07.011>
- Pritzlaff, C. a, Chang, J. C., Kuo, S. P., Tamura, G. S., Rubens, C. E., & Nizet, V. (2001). Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B *Streptococcus*. *Molecular Microbiology*, 39(2), 236–247. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02211.x>
- Ragunathan, P., Spellerberg, B., & Ponnuraj, K. (2009). Structure of laminin-binding adhesin (Lmb) from *Streptococcus agalactiae*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 65(12), 1262–1269. <http://doi.org/10.1107/S0907444909038359>
- Reniere, M. L., Ukpabi, G. N., Harry, S. R., Stec, D. F., Krull, R., Wright, D. W., ... Skaar, E. P. (2010). The IsdG-family of haem oxygenases degrades haem to a novel chromophore. *Molecular Microbiology*, 75(6), 1529–1538. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07076.x>
- Rhee, S. G. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and Cells*, 39(1), 1–5. <http://doi.org/10.14348/molcells.2016.2368>
- Rich, R. L., Kreikemeyer, B., Owens, R. T., LaBrenz, S., Narayana, S. V. L., Weinstock, G. M., ... H????k, M. (1999). Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(38), 26939–26945. <http://doi.org/10.1074/jbc.274.38.26939>
- Rivera, L., Sáez-Llorens, X., Feris-Iglesias, J., Ip, M., Saha, S., Adrian, P. V., ... Slobod, K. S. (2015). Incidence and serotype distribution of invasive group B streptococcal disease in young infants: a multi-country observational study. *BMC Pediatrics*, 15, 143. <http://doi.org/10.1186/s12887-015-0460-2>
- Rosa-Fraile, M., Dramsi, S., & Spellerberg, B. (2014). Group B streptococcal haemolysin and pigment, a tale of twins. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(5), 932–946. <http://doi.org/10.1111/1574-6976.12071>
- Rosini, R., & Margarit, I. (2015). Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5, 6. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00006>

- Rouault. (2004). Microbiology. Pathogenic bacteria prefer heme. *Science*, 10;305(569).
- Sachla, A.J., Eichenbaum, Z. The GAS PefCD exporter is a MDR system that confers resistance to heme and structurally diverse compounds. *BMC Microbiol.* **16**: 68, (2016).
- Samen, U., Eikmanns, B. J., Reinscheid, D. J., & Borges, F. (2007). The surface protein Srr-1 of *Streptococcus agalactiae* binds human keratin 4 and promotes adherence to epithelial HEP-2 cells. *Infection and Immunity*, 75(11), 5405–5414. <http://doi.org/10.1128/IAI.00717-07>
- Sander, A., Kretzer, S., Bredt, W., Oberle, K., & Bereswill, S. (2000). Hemin-dependent growth and hemin binding of *Bartonella henselae*. *FEMS Microbiology Letters*, 189(1), 55–59. [http://doi.org/10.1016/S0378-1097\(00\)00243-3](http://doi.org/10.1016/S0378-1097(00)00243-3)
- Santi, I., Scarselli, M., Mariani, M., Pezzicoli, A., Masignani, V., Taddei, A., ... Soriani, M. (2007). BibA: A novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. *Molecular Microbiology*, 63(3), 754–767. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05555.x>
- Savini, V., Gherardi, G., Marrollo, R., Franco, A., Pimentel De Araujo, F., Dottarelli, S., ... Carretto, E. (2015). Could β -hemolytic, group B *Enterococcus faecalis* be mistaken for *Streptococcus agalactiae*? *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82(1), 32–33. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.12.005>
- Sawai, H., Yamanaka, M., Sugimoto, H., Shiro, Y., & Aono, S. (2012). Structural basis for the transcriptional regulation of heme homeostasis in *Lactococcus lactis*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(36), 30755–30768. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.370916>
- Schubert, A., Zakikhany, K., Schreiner, M., Frank, R., Spellerberg, B., Eikmanns, B. J., & Reinscheid, D. J. (2002). A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Molecular Microbiology*, 46(2), 557–569. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03177.x>
- Schultz, J. E., Kanchan, K., & Ziegler, M. (2015). Intraprotein signal transduction by HAMP domains: A balancing act. *International Journal of Medical Microbiology*. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.12.007>
- Seifert, K. N., Adderson, E. E., Whiting, A. A., Bohnsack, J. F., Crowley, P. J., & Brady, L. J. (2006). A unique serine-rich repeat protein (Srr-2) and novel surface antigen (??) associated with a virulent lineage of serotype III *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology*, 152(4), 1029–1040. <http://doi.org/10.1099/mic.0.28516-0>
- Shabayek, S., Abdalla, S., & Abouzeid, A. M. H. (2010). Comparison of scpB gene and cfb

- gene polymerase chain reaction assays with culture on Islam medium to detect Group B Streptococcus in pregnancy. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 28, 320–325. <http://doi.org/10.4103/0255-0857.71821>
- Shankar V1, G. (1997). Characterization of the Enterococcus faecalis alpha C protein homolog. Evidence for the expression of alternate forms in commensal and infection derived isolates. *Adv Exp Med Biol.*, 418:1045-8.
- Sifri, C. D., Mylonakis, E., Singh, K. V., Qin, X., Garsin, D. A., Murray, B. E., ... Calderwood, S. B. (2002). Virulence effect of Enterococcus faecalis protease genes and the quorum-sensing locus fsr in Caenorhabditis elegans and mice. *Infection and Immunity*, 70(10), 5647–5650. <http://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5647-5650.2002>
- Silva Lopes, M. D. F., Ribeiro, T., Abrantes, M., Figueiredo Marques, J. J., Tenreiro, R., & Barreto Crespo, M. T. (2005). Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology*, 103(2), 191–198. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.025>
- Six, A., Firon, A., Plainvert, C., Caplain, C., Touak, G., Dmytruk, N., ... Poyart, C. (2016). Molecular characterization of nonhemolytic and nonpigmented group b streptococci responsible for human invasive infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 75–82. <http://doi.org/10.1128/JCM.02177-15>
- Six, A., Joubrel, C., Tazi, A., & Poyart, C. (2014). [Maternal and perinatal infections to Streptococcus agalactiae]. *Presse Médicale (Paris, France : 1983)*, 43(6 Pt 1), 706–14. <http://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.04.008>
- Skaar, E. P., Gaspar, A. H., & Schneewind, O. (2004). IsdG and IsdI, Heme-degrading Enzymes in the Cytoplasm of Staphylococcus aureus. *Journal of Biological Chemistry*, 279(1), 436–443. <http://doi.org/10.1074/jbc.M307952200>
- Skaar, E. P., Humayun, M., Bae, T., DeBord, K. L., & Schneewind, O. (2004). Iron-source preference of Staphylococcus aureus infections. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5690), 1626–8. <http://doi.org/10.1126/science.1099930>
- SMITH, S. L., VANDEMARK, P. J., & FABRICANT, J. (1963). RESPIRATORY PATHWAYS IN THE MYCOPLASMA. I. LACTATE OXIDATION BY. *Journal of Bacteriology*, 86, 893–897.
- Smyth, C. J., Matthews, H., Halpenny, M. K., Brandis, H., & Colman, G. (1987). Biotyping, serotyping and phage typing of Streptococcus faecalis isolated from dental plaque in the human mouth. *Journal of Medical Microbiology*, 23(1), 45–54. <http://doi.org/10.1099/00222615-23-1-45>

- Soriani, M., Santi, I., Taddei, A., Rappuoli, R., Grandi, G., & Telford, J. L. (2006). Group B Streptococcus crosses human epithelial cells by a paracellular route. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(2), 241–250. <http://doi.org/10.1086/498982>
- Soto, E., Wang, R., Wiles, J., Green, C., Plumb, J., Hawke, J., & Soto, E. (2015). Characterization of isolates of Streptococcus agalactiae from diseased farmed and wild marine fish from the U.S. Gulf coast, Latin America, and Thailand. *Journal of Aquatic Animal Health*, 27(2), 123–134. <http://doi.org/10.1080/08997659.2015.1032439>
- Sousa, E. H. S., Tuckerman, J. R., Gondim, A. C. S., Gonzalez, G., & Gilles-Gonzalez, M. A. (2013). Signal transduction and phosphoryl transfer by a FixL hybrid kinase with low oxygen affinity: Importance of the vicinal PAS domain and receiver aspartate. *Biochemistry*, 52(3), 456–465. <http://doi.org/10.1021/bi300991r>
- Stauff, D. L., & Skaar, E. P. (2009). Bacillus anthracis HssRS signalling to HrtAB regulates haem resistance during infection. *Molecular Microbiology*, 72(3), 763–778. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06684.x>
- Stauff, D. L., & Skaar, E. P. (2009b). The heme sensor system of staphylococcus aureus. *Contributions to Microbiology*, 16, 120–135. <http://doi.org/10.1159/000219376>
- Stauff, D. L., Bagaley, D., Torres, V. J., Joyce, R., Anderson, K. L., Kuechenmeister, L., ... Skaar, E. P. (2008). Staphylococcus aureus HrtA Is an ATPase required for protection against heme toxicity and prevention of a transcriptional heme stress response. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3588–3596. <http://doi.org/10.1128/JB.01921-07>
- Stauff, D. L., Torres, V. J., & Skaar, E. P. (2007). Signaling and DNA-binding activities of the Staphylococcus aureus HssR-HssS two-component system required for heme sensing. *Journal of Biological Chemistry*, 282(36), 26111–26121. <http://doi.org/10.1074/jbc.M703797200>
- Stępniewski, M., Kepczynski, M., Jamróz, D., Nowakowska, M., Rissanen, S., Vattulainen, I., & Róg, T. (2012). Interaction of hematoporphyrin with lipid membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, 116(16), 4889–4897. <http://doi.org/10.1021/jp300899b>
- Stiebler, R., Hoang, A. N., Egan, T. J., Wright, D. W., & Oliveira, M. F. (2010). Increase on the initial soluble heme levels in acidic conditions is an important mechanism for spontaneous heme crystallization in vitro. *PLoS ONE*, 5(9), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0012694>
- Stojiljkovic, I., Evavold, B. D., & Kumar, V. (2001). Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 10(2), 309. <http://doi.org/10.1517/13543784.10.2.309>

- Tamura, G. S., Kuypers, J. M., Smith, S., Raff, H., & Rubens, C. E. (1994). Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: Roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infection and Immunity*, 62(6), 2450–2458.
- Tamura, G. S., Nittayajarn, A., & Schoentag, D. L. (2002). A glutamine transport gene, *glnQ*, is required for fibronectin adherence and virulence of group B streptococci. *Infection and Immunity*, 70(6), 2877–2885. <http://doi.org/10.1128/IAI.70.6.2877-2885.2002>
- Tang, S. M., Gabelaia, L., Gauthier, T. W., & Brown, L. A. (2009). N-acetylcysteine improves group B streptococcus clearance in a rat model of chronic ethanol ingestion. *Alcohol Clin Exp Res*, 33(7), 1197–1201. <http://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.00943.x>
- Tazi, A., Disson, O., Bellais, S., Bouaboud, A., Dmytruk, N., Dramsi, S., ... Poyart, C. (2010). The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(11), 2313–22. <http://doi.org/10.1084/jem.20092594>
- Tedim, A. P., Ruiz-Garbajosa, P., Corander, J., Rodríguez, C. M., Cantón, R., Willems, R. J., ... Coque, T. M. (2015). Population biology of intestinal Enterococcus Isolates from hospitalized and nonhospitalized individuals in different age groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1820–1831. <http://doi.org/10.1128/AEM.03661-14>
- Thiercelin. (1899). Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin susceptible de devenir pathogene. *Soc. Biol.*, 5:269-271.
- Thigpen, M. C., Whitney, C. G., Messonnier, N. E., Zell, E. R., Lynfield, R., Hadler, J. L., ... Schuchat, A. (2011). Bacterial meningitis in the United States, 1998-2007. *The New England Journal of Medicine*, 364(21), 2016–2025. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1005384>
- Tibary, A., Fite, C., Anouassi, A., & Sghiri, A. (2006). Infectious causes of reproductive loss in camelids. *Theriogenology*, 66(3 SPEC. ISS.), 633–647. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.008>
- Tissi, L., Marconi, P., Mosci, P., Merletti, L., Cornacchione, P., Rosati, E., ... Orefici, G. (1990). Experimental model of type IV Streptococcus agalactiae (group B streptococcus) infection in mice with early development of septic arthritis. *Infection and Immunity*, 58(9), 3093–3100.
- Tolosano, E., Fagoonee, S., Morello, N., Vinchi, F., & Fiorito, V. (2010). Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(2), 305–20. <http://doi.org/10.1089/ars.2009.2787>

- Torres, V. J., Stauff, D. L., Pishchany, G., Bezbradica, J. S., Gordy, L. E., Iturregui, J., ... Skaar, E. P. (2007). A *Staphylococcus aureus* Regulatory System that Responds to Host Heme and Modulates Virulence. *Cell Host and Microbe*, 1(2), 109–119. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.001>
- Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373(1), 1–6. <http://doi.org/10.1006/abbi.1999.1518>
- Turlin, E., Heuck, G., Simões Brandão, M. I., Szili, N., Mellin, J. R., Lange, N., & Wandersman, C. (2014). Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen*, 3(6), 849–859. <http://doi.org/10.1002/mbo3.203>
- Van Den Berghe, E., De Winter, T., & De Vuyst, L. (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 159–170. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.027>
- Van Zyl, W. F., Deane, S. M., & Dicks, L. M. T. (2015). Reporter systems for in vivo tracking of lactic acid bacteria in animal model studies. *Gut Microbes*. <http://doi.org/10.1080/19490976.2015.1086058>
- Vavra, M. R., Timkovich, R., Yap, F., & Gennis, R. B. (1986). Spectroscopic studies on heme d in the visible and infrared. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 250(2), 461–468. [http://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90750-2](http://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90750-2)
- Vido, K., Le Bars, D., Mistou, M. Y., Anglade, P., Gruss, A., & Gaudu, P. (2004). Proteome Analyses of Heme-Dependent Respiration in *Lactococcus lactis*: Involvement of the Proteolytic System. *Journal of Bacteriology*, 186(6), 1648–1657. <http://doi.org/10.1128/JB.186.6.1648-1657.2004>
- Von Ossowski, I., Mulvey, M. R., Leco, P. A., Borys, A., & Loewen, P. C. (1991). Nucleotide sequence of *Escherichia coli* katE, which encodes catalase HP11. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 514–520.
- Wagener, F. A. D. T. G., Dankers, A. C. A., van Summeren, F., Scharstuhl, A., van den Heuvel, J. J. M. W., Koenderink, J. B., ... Masereeuw, R. (2012). Heme Oxygenase-1 and Breast Cancer Resistance Protein Protect Against heme-induced toxicity. *Current Pharmaceutical Design*. <http://doi.org/10.2174/1381612811319150004>
- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2004). BACTERIAL IRON SOURCES: From Siderophores to Hemophores. *Annu. Rev. Microbiol*, 58, 611–47. <http://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>

- Wandersman, C., & Delepelaire, P. (2012). Haemophore functions revisited. *Molecular Microbiology*. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08136.x>
- Wegele, R., Tasler, R., Zeng, Y., Rivera, M., & Frankeinberg-Dinkel, N. (2004). The heme oxygenase(s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 45791–45802. <http://doi.org/10.1074/jbc.M408303200>
- Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., ... Kok, J. (2007). Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3256–3270. <http://doi.org/10.1128/JB.01768-06>
- Wegmann, U., Overweg, K., Jeanson, S., Gasson, M., & Shearman, C. (2012). Molecular characterization and structural instability of the industrially important composite metabolic plasmid pLP712. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(12), 2936–2945. <http://doi.org/10.1099/mic.0.062554-0>
- Whidbey, C., Harrell, M. I., Burnside, K., Ngo, L., Becraft, A. K., Iyer, L. M., ... Rajagopal, L. (2013). A hemolytic pigment of Group B *Streptococcus* allows bacterial penetration of human placenta. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(6), 1265–81. <http://doi.org/10.1084/jem.20122753>
- Wibawan, I. T., Lämmle, C., & Pasaribu, F. H. (1992). Role of hydrophobic surface proteins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. *Journal of General Microbiology*, 138(6), 1237–1242. <http://doi.org/10.1099/00221287-138-6-1237>
- Wilkinson, S. P., & Grove, A. (2006). Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Current Issues in Molecular Biology*, 8(1), 51–62.
- Wilks, A., & Schmitt, M. P. (1998). Expression and characterization of a heme oxygenase (Hmu O) from *Corynebacterium diphtheriae*. Iron acquisition requires oxidative cleavage of the heme macrocycle. *Journal of Biological Chemistry*, 273(2), 837–841. <http://doi.org/10.1074/jbc.273.2.837>
- Winram, S. B., Jonas, M., Chi, E., & Rubens, C. E. (1998). Characterization of group B streptococcal invasion of human chorion and amnion epithelial cells in vitro. *Infection and Immunity*, 66(10), 4932–4941.
- Wójtowicz, H., Guevara, T., Tallant, C., Olczak, M., Sroka, A., Potempa, J., ... Gomis-Rüth, F. X. (2009). Unique structure and stability of HmuY, a novel heme-binding protein of *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS Pathogens*, 5(5). <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000419>

- Wright, J. A., & Nair, S. P. (2012). The lipoprotein components of the Isd and Hts transport systems are dispensable for acquisition of heme by *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 329(2), 177–185. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02519.x>
- Xiao, L., Ptacek, T., Osborne, J. D., Crabb, D. M., Simmons, W. L., Lefkowitz, E. J., ... Dybvig, K. (2015). Comparative genome analysis of *Mycoplasma pneumoniae*. *BMC Genomics*, 16, 610. <http://doi.org/10.1186/s12864-015-1801-0>
- Yamamoto, Y., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., Gruss, A., & Gaudu, P. (2005). Respiration metabolism of Group B *Streptococcus* is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence. *Molecular Microbiology*, 56(2), 525–534. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04555.x>
- Yamamoto, Y., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., Gruss, A., & Gaudu, P. (2006). Roles of environmental heme, and menaquinone, in *Streptococcus agalactiae*. In *BioMetals* (Vol. 19, pp. 205–210). <http://doi.org/10.1007/s10534-005-5419-6>
- Yamamoto, Y., Pargade, V., Lamberet, G., Gaudu, P., Thomas, F., Texereau, J., ... Poyart, C. (2006). The Group B *Streptococcus* NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. *Molecular Microbiology*, 62(3), 772–785. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05406.x>
- Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H. D., Huizing, M., & Hoogstraten-Miller, S. (2011). Retro-orbital injections in mice. *Lab Animal*, 40(5), 155–160. <http://doi.org/10.1038/labon0511-155>
- Zambolin, S., Clantin, B., Chami, M., Hoos, S., Haouz, A., Villeret, V., & Delepelaire, P. (2016). Structural basis for haem piracy from host haemopexin by *Haemophilus influenzae*. *Nature Communications*, 7(May 2016), 11590. <http://doi.org/10.1038/ncomms11590>
- Zámocký, M., & Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: Clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. [http://doi.org/10.1016/S0079-6107\(98\)00058-3](http://doi.org/10.1016/S0079-6107(98)00058-3)
- Zhou, X., Yang, X., Wang, Q., Coburn, R. A., & Morris, M. E. (2005). Effects of dihydropyridines and pyridines on multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein: in vitro and in vivo studies. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 33(8), 1220–8. <http://doi.org/10.1124/dmd.104.003558>
- Zhu, H., Xie, G., Liu, M., Olson, J. S., Fabian, M., Dooley, D. M., & Lei, B. (2008). Pathway for heme uptake from human methemoglobin by the iron-regulated surface determinants

- system of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 18450–18460. <http://doi.org/10.1074/jbc.M801466200>
- Zhu, W., Hunt, D. J., Richardson, A. R., & Stojiljkovic, I. (2000). Use of heme compounds as iron sources by pathogenic neisseriae requires the product of the hemO gene. *Journal of Bacteriology*, 182(2), 439–447. <http://doi.org/10.1128/JB.182.2.439-447.2000>

Annexe

Group	Sub-group	Description	log(E value)	Coverage	MW	Spectra	Uniques	PAI
1	1.01	sp P64080 ENO_STR3 Enolase OS=Streptococcus agalactiae serotype III (strain NE	-94,32087708	44	47	151	14	7,190476418
2	2.01	tr Q8E7X9 Q8E7X9_STR3 PcsB protein OS=Streptococcus agalactiae serotype III (strain	-135,4134674	47	46,59999847	129	22	8,600000381
3	3.01	tr Q8E446 Q8E446_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1556 OS=Streptococ	-111,4742508	63	59	82	30	3,279999971
4	4.01	sp Q8E3F0 PGK_STR3 Phosphoglycerate kinase OS=Streptococcus agalactiae serotype	-67,83488464	44	42	78	13	3,714285612
5	5.01	tr Q8E5Q0 Q8E5Q0_STR3 Pyruvate kinase OS=Streptococcus agalactiae serotype III (st	-89,10366821	49	54	74	19	2,960000038
6	6.01	tr Q8E530 Q8E530_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1204 OS=Streptococcus :	-42,50463104	54	19,39999962	57	9	5,181818008
7	7.01	tr Q8E4W4 Q8E4W4_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1279 OS=Streptococcus:	-93,80292511	39	94,09999847	55	27	1,195652127
8	8.01	sp Q53591 HYSA_STR3 Hyaluronate lyase OS=Streptococcus agalactiae serotype III (st	-86,45269012	29	111,4000015	54	24	1
9	9.01	sp Q8E645 EFTU_STR3 Elongation factor Tu OS=Streptococcus agalactiae serotype III (	-36,22400665	29	43,90000153	49	7	2,578947306
10	10.01	tr Q8E3E8 Q8E3E8_STR3 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase OS=Strepto	-62,53553391	60	35,90000153	46	12	2,875
11	11.01	tr Q8E7M9 Q8E7M9_STR3 Putative uncharacterized protein gbs0125 OS=Strepti	-50,73780441	34	31,39999962	40	8	4,444444656
12	12.01	tr Q8E3N0 Q8E3N0_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1727 OS=Streptococcus	-46,22875595	34	54,40000153	34	13	2,428571463
13	13.01	tr Q8E517 Q8E517_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1042 OS=Streptococc	-30,45044518	27	37,59999847	30	11	1,764705896
14	14.01	sp Q8E3E7 EFG_STR3 Elongation factor G OS=Streptococcus agalactiae serotype III (st	-46,30200958	17	76,40000153	30	8	1
15	15.01	tr Q8E5Y9 Q8E5Y9_STR3 Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase OS=Strepti	-32,43722534	25	63,20000076	27	8	1,173913002
16	16.01	tr Q8E2V6 Q8E2V6_STR3 Putative uncharacterized protein gbs2008 OS=Streptococcus	-39,04724121	12	172	26	15	0,366197169
17	17.01	tr Q8E539 Q8E539_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1195 OS=Streptococcus :	-44,07404327	35	50,79999924	26	14	1,238095284
18	18.01	sp Q8CX22 CH60_STR3 60 kDa chaperonin OS=Streptococcus agalactiae serotype III (s	-30,37031937	19	57,09999847	25	6	0,862068951
19	19.01	tr Q8CX23 Q8CX23_STR3 CAMP factor OS=Streptococcus agalactiae serotype III (strair	-28,44521523	41	28,29999924	24	9	2,666666746
20	20.01	sp P0A3J2 DNAK_STR3 Chaperone protein DnaK OS=Streptococcus agalactiae serotypi	-22,82487869	11	64,80000305	24	5	0,888888896
21	21.01	tr Q8E411 Q8E411_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1420 OS=Streptococcus a	-38,94744873	29	59,90000153	21	12	0,839999974
22	22.01	tr Q8E4J8 Q8E4J8_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1403 OS=Streptococcus :	-32,26696396	19	75	21	12	0,699999988
23	23.01	tr Q8E789 Q8E789_STR3 Putative uncharacterized protein gbs0268 OS=Streptococcus :	-35,20272446	15	71	19	7	0,730769217
24	24.01	tr Q8E2T4 Q8E2T4_STR3 Putative uncharacterized protein gbs2033 OS=Streptococ	-37,05827713	27	34,40000153	18	11	2
25	25.01	tr Q8E5D2 Q8E5D2_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1100 OS=Streptococcus	-21,89723396	11	63,09999847	18	5	0,5
26	26.01	sp Q8E7T7 RL4_STR3 50S ribosomal protein L4 OS=Streptococcus agalactiae serotype	-19,0634861	37	22	18	4	3
27	27.01	tr Q8E5N9 Q8E5N9_STR3 Putative uncharacterized protein gbs0942 OS=Streptococcus	-33,33683014	40	36	17	9	1,307692289
28	28.01	tr Q8E722 Q8E722_STR3 3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2 OS=Streptococcus	-27,00629616	23	43,59999847	16	5	1,142857194
29	29.01	tr Q8E3C2 Q8E3C2_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1839 OS=Streptococcus	-13,95186996	9	45,20000076	15	4	0,75
30	30.01	tr Q8E317 Q8E317_STR3 Putative uncharacterized protein gbs1772 OS=Streptococcus a	-23,74542236	12	86,59999847	15	5	0,384615391

31	31.01	Similar to Pyruvate formate-lyase tr Q8E509 Q8E509_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs1225 OS=Streptococcus ; similar to ribosomal protein S1-like DNA-binding protein	-16,54300308	14	43,59999847	14	5	0,777777791
32	32.01	tr Q8E532 Q8E532_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs1202 OS=Streptococcus ;	-21,56288338	40	19,20000076	11	4	1
33	33.01	tr Q8E7P3 Q8E7P3_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0111 OS=Streptococcus similar to mercury(II) reductase	-17,57406044	15	48,09999847	11	4	0,5
34	34.01	sp P64195 G6PI_STRA3 Glucose-6-phosphate isomerase OS=Streptococcus agalactiae s	-25,17273331	10	49,5	11	4	0,733333349
35	35.01	tr Q8E5E5 Q8E5E5_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs1087 OS=Streptococcus	-21,11773682	9	47,40000153	10	5	0,454545468
36	36.01	highly repetitive peptidoglycan bound protein (LPXTG motif) tr Q8E334 Q8E334_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs1929 OS=Streptococcus ;	-17,54195976	14	87,40000153	10	8	0,243902445
37	37.01	Similar to nucleotidase (esterase), putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif) sp P65885 PURA_STRA3 Adenylosuccinate synthetase OS=Streptococcus agalactiae ser	-10,35538387	7	47,40000153	10	3	0,476190478
38	38.01	sp P66390 RS13_STRA3 30S ribosomal protein S13 OS=Streptococcus agalactiae seroty	-9,429456711	11	13,39999962	9	2	1,5
39	39.01	tr Q8E6Y9 Q8E6Y9_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0419 OS=Streptococcus similar to esterase	-14,70478535	17	37,79999924	9	5	0,642857134
40	40.01	sp Q8E7S4 RS5_STRA3 30S ribosomal protein S5 OS=Streptococcus agalactiae serotype	-6,371611118	14	17	9	2	1,125
41	41.01	tr Q8E5Y8 Q8E5Y8_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0841 OS=Streptococcus similar to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-16,89504051	14	51,09999847	9	5	0,360000014
42	42.01	sp Q8E7T3 RL16_STRA3 50S ribosomal protein L16 OS=Streptococcus agalactiae seroty	-14,9270153	11	15,39999962	8	2	2,666666746
43	43.01	sp P64055 EFTS_STRA3 Elongation factor Ts OS=Streptococcus agalactiae serotype III (ε	-12,86391354	10	37,5	8	2	0,615384638
44	44.01	sp Q8E7F6 PNP_STRA3 Polyribonucleotide nucleotidyltransferase OS=Streptococcus aga	-12,02576447	6	77	8	3	0,285714298
45	45.01	tr Q8E6V8 Q8E6V8_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0451 OS=Streptococcus	-9,701024055	4	135,5	7	5	0,116666667
46	46.01	Putative peptidoglycan bound protein (LPXTS motif) similar to C5A peptidase sp P66093 RL1_STRA3 50S ribosomal protein L1 OS=Streptococcus agalactiae serotype I	-6,409604073	14	24,20000076	7	2	0,777777791
47	47.01	tr Q8E6J4 Q8E6J4_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0569 OS=Streptococcus ε	-14,43226814	14	26,70000076	7	3	0,699999988
48	48.01	Similar to meso-2,3-butanediol dehydrogenase (D-acetoin forming) sp Q8E5M8 GUAA_STRA3 GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] OS=Streptococcus aga	-23,66074753	11	57,40000153	7	3	0,280000001
49	49.01	tr Q8E7L0 Q8E7L0_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0144 OS=Streptococcus ; similar to oligopeptide ABC transporter (binding protein)	-6,296330452	7	60,40000153	6	3	0,260869563
50	50.01	tr Q8E676 Q8E676_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0750 OS=Streptococcus ;	-11,95703125	13	30,89999962	6	3	0,600000024
51	51.01	sp Q8E4M6 RL10_STRA3 50S ribosomal protein L10 OS=Streptococcus agalactiae seroty	-5,267606258	17	17,70000076	6	2	0,666666687
52	52.01	tr Q8E770 Q8E770_STRA3 Putative uncharacterized protein pepC OS=Streptococcus aga similar to cysteine aminopeptidase C	-13,85714245	22	50,5	6	5	0,315789461
53	53.01	tr Q8E712 Q8E712_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0172 OS=Streptococcus a	-11,82044792	15	38,5	6	2	0,315789461
54	54.01	similar to glutamyl-aminopeptidase and/or to endo-1,4-beta-glucanase tr Q8E723 Q8E723_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0335 OS=Streptococcus ;	-4,771856308	17	25,79999924	5	2	0,555555582
55	55.01	similar to beta-ketoacyl-ACP reductase tr Q8E4J6 Q8E4J6_STRA3 Glutamate dehydrogenase OS=Streptococcus agalactiae serot	-7,402305126	13	48,5	5	3	0,227272734
56	56.01	tr Q8E2K4 Q8E2K4_STRA3 Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Streptococcus	-7,359518528	7	52,90000153	5	2	0,238095239
57	57.01	sp Q8E2M6 RS4_STRA3 30S ribosomal protein S4 OS=Streptococcus agalactiae serotype	-9,800179482	22	23	5	3	0,357142866
58	58.01	sp Q8E5P8 GLMS_STRA3 Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase [isomerizin	-8,806875229	7	65,5	5	3	0,200000003
59	59.01	sp Q8E5Y0 METHK_STRA3 S-adenosylmethionine synthase OS=Streptococcus agalactiae	-7,852014542	9	43,20000076	5	2	0,333333343
60	60.01	tr Q8E366 Q8E366_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs1895 OS=Streptococcus ;	-4,927015305	4	71,90000153	4	2	0,121212125

61	61.01	tr Q8E343 Q8E343_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs1919 OS=Streptococcus ; Similar to neuraminidase	-8,108462334	3	92,59999847	4	2	0,097560972
62	62.01	tr Q8E7W4 Q8E7W4_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0031 OS=Streptococcus ; group B streptococcal surface immunogenic protein	-7,013138771	11	45,40000153	4	3	0,307692319
63	63.01	sp Q8E644 TPIS_STRA3 Triosephosphate isomerase OS=Streptococcus agalactiae seroty	-4,630784035	13	26,5	4	2	0,444444448
64	64.01	sp Q8E7S9 RL5_STRA3 50S ribosomal protein L5 OS=Streptococcus agalactiae serotype	-5,968510628	19	19,70000076	4	3	0,363636374
65	65.01	sp Q8E7P8 PYRG_STRA3 CTP synthase OS=Streptococcus agalactiae serotype III (strair	-5,292429924	6	59,20000076	4	2	0,173913047
66	66.01	sp Q53778 PEPB_STRA3 Group B oligopeptidase PepB OS=Streptococcus agalactiae ser	-7,763513088	5	69,5	4	3	0,210526317
67	67.01	tr Q8E4V2 Q8E4V2_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs1291 OS=Streptococcus similar to dipeptidase	-7,38552475	11	51,59999847	4	3	0,266666681
68	68.01	sp Q8E643 GPMA_STRA3 2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	-8,194003105	22	25,89999962	4	3	0,307692319
69	69.01	tr Q8E777 Q8E777_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs0280 OS=Streptococcus ; Similar to amino acids ABC transporter (binding protein)	-5,707744122	9	29,79999924	3	2	0,230769232
70	70.01	tr Q8E3R8 Q8E3R8_STRA3 Lipoprotein OS=Streptococcus agalactiae serotype III (strain f	-5,543633938	9	30,5	3	2	0,214285716
71	71.01	sp P67573 SYN_STRA3 Asparagine--tRNA ligase OS=Streptococcus agalactiae serotype	-8,841637611	4	51	3	2	0,13636364
72	72.01	sp Q8E7J8 RPOB_STRA3 DNA-directed RNA polymerase subunit beta OS=Streptococcus	-6,61225462	3	132,8000031	3	2	0,06122449
73	73.01	tr Q8E3Z3 Q8E3Z3_STRA3 Methionine--tRNA ligase OS=Streptococcus agalactiae seroty	-9,791827202	5	75,40000153	3	2	0,090909094
74	74.01	sp Q8E5V0 ATPA_STRA3 ATP synthase subunit alpha OS=Streptococcus agalactiae sero	-5,920818806	9	54,5	3	2	0,1875
75	75.01	sp Q8E3P4 GATA_STRA3 Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A OS=Streptoco	-5,308034897	8	52,59999847	3	2	0,119999997
76	76.01	tr Q8E462 Q8E462_STRA3 Putative uncharacterized protein gbs1540 OS=Streptococcus ; similar to amidase or hydrolase, putative peptidoglycan bound protein (LPXTG motif)	-4,329197884	3	74,40000153	2	2	0,068965517
77	77.01	sp Q8E6N1 SYI_STRA3 Isoleucine--tRNA ligase OS=Streptococcus agalactiae serotype III	-4,024108887	2	104,6999969	2	2	0,060606062
78	78.01	sp Q8E388 RS2_STRA3 30S ribosomal protein S2 OS=Streptococcus agalactiae serotype	-5,745210171	15	28,5	2	2	0,166666672
79	79.01	sp Q8E720 FABZ_STRA3 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase FabZ OS=Strept	-4,286509514	19	15,39999962	2	2	0,333333343

En bleu sont indiquées les protéines majoritaires, en vert les protéines de paroi et en jaune les lipoprotéines.
En gras sont indiqués les candidats retenus.

Titre : Caractérisation de l'homéostasie et de l'impact de l'hème sur les capacités de virulence et de colonisation de bactéries à GRAM positif

Mots clés : Bactérie à GRAM positif, adaptation, virulence, sang, hème.

Résumé : L'hème est une molécule essentielle à de nombreuses fonctions bactériennes. Cependant, cette molécule génère des radicaux libres qui lui confèrent des propriétés toxiques. Nous avons caractérisé les mécanismes de l'homéostasie de l'hème impliquant le transporteur d'efflux HrtBA. Chez *L. lactis* nous avons démontré que HrtBA empêche l'accumulation membranaire et intracellulaire d'hème exogène par un mécanisme ménaquinone dépendant. HrtBA est aussi présent chez de nombreux pathogènes. Chez *S. agalactiae*, la transcription de HrtBA est régulée par un système à deux composants HssRS. Le senseur HssS reconnaît l'hème exogène internalisé. Pour élucider le rôle de l'hème de l'hôte dans la virulence de *S. agalactiae*, un modèle d'infection systémique chez la souris utilisant la luminescence (*lux*) et l'imagerie *in vivo* (IVIS) a été mis en place. Le suivi de la luminescence de bactéries hypersensibles à l'hème (Δ *hrtBA*) montre que l'hème de l'hôte est toxique et que la capacité de *S. agalactiae* à assurer son homéostasie est déterminante pour l'infection. De manière similaire, en montrant que le

métabolisme respiratoire est indispensable pour l'infection (Δ *cydA*), *S. agalactiae* dépend donc de sa capacité à acquérir l'hème de l'hôte pour être infectieuse. En utilisant le promoteur de HrtBA couplé à l'opéron *lux*, nous avons étudié la capacité de *S. agalactiae* à détecter et acquérir l'hème *in vivo* au cours de l'infection. Nos résultats montrent que l'hème de l'hôte est particulièrement biodisponible dans le foie. Au contraire dans le cerveau, l'hème n'est pas détecté par la bactérie. Nos résultats démontrent que l'hème de l'hôte est un paramètre important des capacités d'adaptation de *S. agalactiae* à son hôte lors de l'infection. Bloquer HrtBA ou le senseur d'hème HssS pourrait constituer une cible pour la recherche antibiotique chez *S. agalactiae* ou d'autres pathogènes.

Enfin, nous avons démontré chez *E. faecalis* que l'expression de HrtBA est aussi dépendante d'un système à deux composants. Nous avons utilisé la même stratégie que pour *S. agalactiae* pour créer un senseur d'hème spécifique qui a permis de démontrer pour la première fois que *E. faecalis* rencontre et utilise l'hème du tractus digestif.

Title : Characterization of heme homeostasis and impact on virulence and colonization of GRAM positive bacteria

Keywords : GRAM positive bacteria, virulence, adaptation, blood, heme, respiration metabolism

Abstract: heme is a redox-reactive molecule with essential function in bacterial metabolism. However, this molecule generates reactive oxygen species responsible for its toxicity. We characterized the mechanism of heme homeostasis involving the efflux transporter HrtBA. In *L. lactis*, we demonstrated that HrtBA prevents from membrane and intracellular accumulation of internalized exogenous heme thanks to a menaquinone dependent mechanism. HrtBA is also present in several pathogens. In *S. agalactiae*, the transcription of HrtBA is regulated by a two-component system HssRS. The HssS sensor recognizes internalized exogenous heme. To clarify the role of heme of the host in the virulence of *S. agalactiae*, a systemic infection model in mice using luminescence (*lux*) and *in vivo* imaging (IVIS) has been set up. The monitoring of luminescence generated by heme hypersensitive (Δ *hrtBA*) bacteria shows that heme of host is toxic and that the capability of *S. agalactiae* to control

heme homeostasis is crucial for infection. In the same way, by demonstrating that respiratory metabolism is crucial for infection (Δ *cydA*), we demonstrated that *S. agalactiae* depends on its capacity to acquire the heme of the host to become infectious. By using the HrtBA promoter coupled with *lux* operon, we studied the capacity of *S. agalactiae* to detect and to acquire heme *in vivo* during the infection. Our results show that host heme is especially biodisponible in the liver. On the contrary, heme is not detected by bacteria in the brain. Our results prove that heme of the host is an important parameter for the adaptation of *S. agalactiae* to its host during infection. Blocking HrtBA or heme sensor HssS could so be a target for antibiotic research against *S. agalactiae* and other pathogens. Finally, we show in *E. faecalis* that HrtBA expression also depends on a two-component system. We used the same strategy as in *S. agalactiae* to create a specific heme sensor that allowed us to demonstrate for the first time that *E. faecalis* meets and uses heme in the digestive tract.

