

# UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

*ÉCOLE DOCTORALE SSBCV*

UMR1282 – Infectiologie et Santé Publique

Equipe 5 : Bactéries et Risque Materno-Fœtal

## THÈSE

présentée par :

**Pauline MOULIN**

soutenue le : 20 Décembre 2017

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Microbiologie

## Caractérisation du transporteur de zinc *Adc/Lmb de Streptococcus agalactiae*

**THÈSE dirigée par :**

**M. MEREGHETTI Laurent**

PU-PH, université François – Rabelais de Tours

**RAPPORTEURS :**

**Mme DE REUSE Hilde**

**Mme GARDAN Rozenn**

DR, institut Pasteur de Paris

CR, HDR, INRA Jouy-en-Josas

---

**JURY :**

**Mme DE REUSE Hilde**

**Mme DURMORT Claire**

**M. DUSSURGET Olivier**

**Mme GARDAN Rozenn**

**Mme HIRON Aurélia**

**M. MEREGHETTI Laurent**

DR, institut Pasteur de Paris

MCU, HDR, université Grenoble Alpes

PU, institut Pasteur de Paris, université Paris 7

CR, HDR, INRA Jouy-en-Josas

MCU, université François – Rabelais de Tours

PU-PH, université François – Rabelais de Tours







# UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

*ÉCOLE DOCTORALE SSBCV*

**UMR1282 – Infectiologie et Santé Publique**

**Equipe 5 : Bactéries et Risque Materno-Fœtal**

## THÈSE

présentée par :

**Pauline MOULIN**

soutenue le : **20 Décembre 2017**

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

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Microbiologie

## **Caractérisation du transporteur de zinc Adc/Lmb de *Streptococcus agalactiae***

**THÈSE dirigée par :**

**M. MEREGHETTI Laurent**

PU-PH, université François – Rabelais de Tours

**RAPPORTEURS :**

**Mme DE REUSE Hilde**

**Mme GARDAN Rozenn**

DR, institut Pasteur de Paris

CR, HDR, INRA Jouy-en-Josas

---

**JURY :**

**Mme DE REUSE Hilde**

**Mme DURMORT Claire**

**M. DUSSURGET Olivier**

**Mme GARDAN Rozenn**

**Mme HIRON Aurélia**

**M. MEREGHETTI Laurent**

DR, institut Pasteur de Paris

MCU, HDR, université Grenoble Alpes

PU, institut Pasteur de Paris, université Paris 7

CR, HDR, INRA Jouy-en-Josas

MCU, université François – Rabelais de Tours

PU-PH, université François – Rabelais de Tours



## Remerciements

*Je souhaiterais remercier tout d'abord mon directeur de thèse Laurent Mereghetti de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de l'équipe Bactéries et Risque Materno-Fœtal. Merci pour la confiance que tu m'as accordé, tes conseils et de t'être rendu aussi disponible que tu le pouvais.*

*Mes remerciements vont ensuite à Aurélia Hiron, ma co-directrice de thèse. Tu seras d'accord avec moi je pense, pour dire que dès le début j'ai eu ce sujet de thèse dans la peau !...Ah souvenirs d'une extraction d'ADN au phénol...nous conduisant un lundi soir aux urgences où tu as pris 10 ans d'un coup par cette interne (« Vous êtes sa mère ? »^^) ! On va dire que c'est moi qui faisais très jeune ;) Je te donnerai quand même le qualificatif de « maman » d'adoption de la science car dès le début et jusqu'au bout tu as toujours été disponible pour moi, tu m'as encadré en m'apprenant de nombreuses techniques et a répondu à mes interrogations dès que tu le pouvais. Avec toi j'ai aussi appris que suivre un protocole c'est bien mais qu'avec quelques entorses ça fonctionne également ! Je garderai en mémoire ton optimisme sans failles malgré parfois/souvent des mutants difficiles à obtenir ! Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur en toutes circonstances. Enfin, tu as su au cours de ces trois années me transmettre ta passion pour la bactério et me conforter dans l'idée de continuer dans cette voie même si la recherche n'est pas un long fleuve tranquille. Je suis fière d'avoir été ta première thésarde. Pour tout ce que tu m'as appris MERCI*

*J'aimerais remercier ensuite les membres de mon jury de thèse Claire Durmort et Olivier Dussurget pour l'évaluation de ce travail, Hilde De Reuse et Rozenn Gardan qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.*

*Je remercie ma technicienne de labo préférée (bon ok c'est la seule de l'équipe...) Vanessa Rong de m'avoir épaulé tant techniquement que moralement. Nous avons fait nos débuts ensemble et je me rappelle de nos premières manips à se demander « c'est normal ça ? » ou la grande question « pourquoi ça marche pas ? ». Nos pauses café et repas du midi à parler de tout et de rien me manqueront. De ces trois années passées ensemble est née une belle amitié qui perdurera longtemps je l'espère (promis si je pars à l'étranger je me mets à Facebook !).*



*Merci à mon amie et coloc de bureau Adeline Pastuszka. J'ai apprécié nos échanges au labo et les moments passés en dehors quand tu arrivais à te libérer du CHU, de la qualité, de l'enseignement.... Merci pour ton réconfort à grands coups de chocobons et pâtisseries en tout genre (The tarte au citron et le fameux brookie !). Alors Trousseau ou Bretonneau cette semaine ?*

*Je remercie vivement Daniel Niquet, ou devrais-je dire le « Macgyver » du labo d'avoir réparé nos appareils avec deux trombones et un tournevis pour que l'avancée de la science continue ! Merci d'avoir toujours répondu présent quand j'en avais besoin et d'avoir fait en sorte que l'on ne manque jamais de rien.*

*J'aimerais remercier Emilie Camiade pour son soutien tout au long de cette thèse. Tu as toujours pris du temps pour moi quand j'en avais besoin aussi bien côté manips qu'enseignement. Je retiendrai ta « zénitude » et tes rires aux éclats qu'on entendait à travers tout le labo.*

*Je souhaiterais remercier l'ensemble des membres de notre laboratoire, Agnès Rosenau ; Marie-Frédérique Lartigue ; Philippe Gilot ; Philippe Lanotte ; Anne-Sophie Valentin et Nathalie van der Mee-Marquet pour leur accueil au sein du laboratoire et les conseils qu'ils m'ont apporté lors des réunions de labo.*

*Je remercie chaleureusement les membres de mon comité de thèse Franck Biet ; Arnaud Firon et Elise Borezée-Durant pour leurs conseils et leur implication dans le suivi de mon travail durant ces trois années de thèse.*

*Je tiens à remercier mes collègues d'enseignement des départements de Microbiologie et Biologie Végétale Agnès Petit ; Catherine Dupuy ; Gwendoline Richardeau et Olivier Pichon de l'aide apportée pour la mise en place de mes cours. J'ai eu la chance de faire partie de deux équipes formidables avec des gens d'une extrême gentillesse et passionnés par leur travail ce qui m'a conforté dans l'idée de faire de l'enseignement.*

*J'aimerais remercier les chercheurs que j'ai rencontré Isabelle Virlogeux ; Pierre Germon ; Eric Morello ; Martine Braibant ; Eric Reiter pour leurs conseils et l'aide apportée*



*pour les manips. Je remercie en particulier Florence Gilbert et Thierry Cochard pour la semaine passée avec eux à me montrer la technique d'HPLC.*

*Merci aux stagiaires Adeline, Alex et Alice qui ont contribué à ce travail ainsi qu'aux stagiaires de Master 2 que j'ai côtoyé lors de ces trois années Sylvie, Amandine, Claudia et Paul et dont les gaffes et les discussions animées m'ont permis de faire retomber la pression.*

*Je remercie mes amis et mes collègues doctorants Harmonie pour ses petites virées en weekend me changeant les idées, Tatiana pour tes encouragements, Kévin pour ton implication dans mon travail par tes conseils, les manips que tu m'as montré et le temps accordé à la correction de mon article, Mégane avec qui j'ai passé 5 jours géniaux lors de notre premier « international congress » et les doctorants Tatiana, Florent, Marion, Dimitri mes copains de galère !*

*Enfin un merci ne suffirait pas à exprimer mes sentiments envers ma famille, mes parents, Maman, Papa merci pour votre soutien tout au long de ces années d'études, sans vous rien n'aurait été possible, merci pour tout ce que vous m'avez appris et fait découvrir, tout simplement merci d'être mes parents. Merci à mon frère Louis pour ces moments de décompression passés ensembles, trop rares à mon grand regret. Merci à ma tite sœur Juju qui a toujours su répondre présente pour partager mes joies mais aussi mes moments de doutes et de coups de blues. Mamie, ma confidente, merci pour ton écoute, ton soutien et ses moments passés toutes les deux chers à mon cœur.*



# Résumé

*Streptococcus agalactiae* est une bactérie commensale des tractus intestinal et génital humain représentant, en France, la première cause d'infections materno-fœtales. Parmi les facteurs de virulence de la bactérie nous nous sommes intéressés à la lipoprotéine Lmb décrite comme une adhésine liant la laminine humaine. Par recherche *in silico* nous avons mis en évidence deux homologues de la protéine Lmb, nommés AdcA et AdcAII. Les trois protéines sont classées dans la famille des protéines fixatrices de métaux et leurs analogues chez *Streptococcus pneumoniae* ont été montrés comme faisant partie d'un transporteur ABC de zinc. Nous avons recherché et trouvé sur les génomes séquencés de *S. agalactiae*, des gènes pouvant coder les autres composants de cet ABC transporteur de zinc. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que les protéines Lmb, AdcA et AdcAII, avec le complexe AdcCB et les protéines Sht et ShtII composeraient un transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae*.

L'objectif de mon travail de thèse a été de caractériser le transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae*.

Tout d'abord, nous avons étudié l'implication de chacune des protéines identifiées dans le transport du zinc ainsi que l'organisation et le fonctionnement de ce transporteur. Pour cela, des souches mutées pour différentes combinaisons des gènes identifiés ont été construites et leur croissance analysée en milieu chimiquement défini. Nous avons montré que les trois protéines membranaires Lmb, AdcA et AdcAII ont une redondance fonctionnelle dans la capture de zinc et qu'elles forment, avec le complexe AdcCB, le transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae*. Ce transporteur se compose également des protéines Sht et ShtII, présentes au niveau de la paroi de la bactérie, et nécessaires aux protéines Lmb et AdcAII pour l'acquisition de zinc.

Dans une seconde partie, nous avons analysé l'importance du transporteur et le rôle du zinc dans la physiologie de la bactérie en utilisant des souches mutées pour le transporteur ( $\Delta adcCB$  ou  $\Delta lmb/adcA/adcAII$ ). Nous avons ainsi montré que le transporteur est essentiel pour la croissance et la morphologie de la bactérie lorsqu'elle se trouve dans un environnement carencé en zinc. Nous avons également montré que ce transporteur participe à la survie de la bactérie en milieux biologiques humains. Le zinc est ainsi un élément trace essentiel pour *S. agalactiae* et dans des conditions de forte carence en zinc, le transporteur Adc/Lmb représente le principal système d'acquisition de zinc de la bactérie.

Enfin, dans une dernière partie nous avons étudié un second rôle potentiel joué par les protéines du transporteur à partir de rôles précédemment décrits. Le rôle d'adhésine à la lamine de la protéine Lmb, n'a pas été retrouvé pour cette protéine ni mis en évidence pour ses homologues AdcA et AdcAII. En revanche, le rôle dans la résistance au complément de la protéine Sht, par sa liaison au facteur H, a bien été retrouvé pour la protéine Sht et a été mis en évidence pour la protéine ShtII. L'importance de ce rôle reste cependant à confirmer par des analyses complémentaires, amenant ainsi de nouvelles perspectives d'étude.

**Mots-clés :** *Streptococcus agalactiae*, transporteur ABC, homéostasie du zinc, protéine fixatrice de métaux



# Abstract

*Streptococcus agalactiae* is a commensal bacterium of the human genital and intestinal tracts which represents, in France, the first cause of materno-foetal infections. Among the bacterium virulence factors, we have focused our research on the Lmb lipoprotein described as laminin-binding protein. By *in silico* searches we found two homologs of the Lmb protein, named AdcA and AdcAII. These three proteins are classified in the metal-binding protein family and their homologs in *Streptococcus pneumoniae* were described as belonging to a zinc-ABC transporter. In the sequenced genomes of *S. agalactiae*, we found genes that could encode the others components of this zinc-ABC transporter. We hypothesized that the Lmb, AdcA and AdcAII proteins, with the AdcCB complex and the Sht and ShtII proteins may compose a zinc-ABC transporter in *S. agalactiae*.

The objective of my work was to characterize the zinc-ABC transporter of *S. agalactiae*.

First, we studied the implication of each identified proteins in zinc transport but also the organization and the functioning of the transporter. We constructed mutant strains, containing single or combined deletion of each identified gene, and analyzed their growth in chemically defined medium. We showed that the three Lmb, AdcA and AdcAII lipoproteins present a functional redundancy in zinc capture and that they form, with the AdcCB complex, the zinc-ABC transporter of *S. agalactiae*. This transporter is also composed of the Sht and ShtII proteins, which are found in the cell wall, and that are necessary for zinc acquisition through the Lmb and AdcAII proteins.

In a second part, we analyzed the importance of the transporter and the role of zinc in the physiology of the bacterium using mutant strains ( $\Delta adcCB$  or  $\Delta lmb/adcA/adcAII$ ). We showed that the transporter is essential for the growth and the morphology of the bacterium in zinc-restricted environments. We also showed that the transporter contributes to the survival of the bacterium in human biological fluids. Thus, zinc is an essential trace element for *S. agalactiae* and in conditions of high zinc deficiency, the Adc/Lmb transporter is the main zinc acquisition system of the bacterium.

In a last part, we studied a second potential role of the constitutive proteins of the transporter from previously described roles. Surprisingly, we didn't observe a role as laminin-binding proteins for the Lmb lipoprotein or even for the AdcA or AdcAII lipoproteins. Nevertheless, the role in the resistance of complement of the Sht protein, by its binding to factor H, has been retrieve for the Sht protein and it was observed for the ShtII protein. However, the importance of this role must be confirmed by additional analyzes, providing new prospects of study.

**Keywords :** *Streptococcus agalactiae*, ABC transporter, zinc homeostasis, metal-binding protein



# Table des matières

|                            |   |
|----------------------------|---|
| INTRODUCTION GENERALE..... | 1 |
|----------------------------|---|

|                              |   |
|------------------------------|---|
| REVUE DE LA LITTERATURE..... | 5 |
|------------------------------|---|

## I) *Streptococcus agalactiae*, un pathogène opportuniste .....

|                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| 1) Caractères généraux de <i>S. agalactiae</i> .....                 | 7  |
| A) Taxonomie.....                                                    | 7  |
| B) Marqueurs épidémiologiques .....                                  | 7  |
| C) Caractères morphologiques, culturels et métaboliques .....        | 11 |
| D) Caractères génomiques.....                                        | 13 |
| 2) Epidémiologie de <i>S. agalactiae</i> .....                       | 13 |
| A) Une bactérie commensale de l'Homme .....                          | 13 |
| B) Un pathogène animal et pathogène opportuniste humain .....        | 15 |
| 3) Eléments participant à la virulence de <i>S. agalactiae</i> ..... | 29 |
| A) Facteurs d'adhérence et de colonisation.....                      | 29 |
| B) Facteurs d'invasion des tissus de l'hôte .....                    | 31 |
| C) Facteurs d'échappement au système immunitaire .....               | 33 |
| D) Le système de régulation CovR/S .....                             | 35 |
| E) Les nutriments essentiels : l'exemple des ions métalliques.....   | 37 |

## II) Le zinc, un élément-trace essentiel.....

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1) Place du zinc chez les organismes vivants .....                          | 41 |
| A) Le zinc chez l'Homme .....                                               | 41 |
| B) Le zinc chez les bactéries .....                                         | 43 |
| C) Utilisation du zinc comme mécanisme de défense contre les bactéries..... | 45 |
| 2) Le maintien de l'homéostasie du zinc chez les bactéries .....            | 49 |
| A) Les systèmes d'import de zinc .....                                      | 49 |
| B) Les systèmes d'export de zinc.....                                       | 51 |
| C) Régulation des transporteurs de zinc .....                               | 55 |



### **III) Les transporteurs de zinc de type Adc ..... 65**

|                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1) Généralités sur les transporteurs ABC .....                                               | 65 |
| A) Structure générale des transporteurs ABC.....                                             | 65 |
| B) Mécanisme de fonctionnement des transporteurs ABC.....                                    | 67 |
| 2) Structure des transporteurs de type Adc.....                                              | 69 |
| A) Organisation générale des transporteurs de type Adc.....                                  | 69 |
| B) Organisation génétique des transporteurs de type Adc.....                                 | 71 |
| C) Structure des protéines de fixation du substrat (SBP) des transporteurs de type Adc ..... | 73 |
| D) Structure des protéines Pht .....                                                         | 77 |
| 3) Rôles des transporteurs de type Adc .....                                                 | 81 |
| A) Rôle des transporteurs de type Adc dans l'import de zinc .....                            | 81 |
| B) Rôle des transporteurs de type Adc dans la virulence .....                                | 85 |
| C) Autres rôles des transporteurs de type Adc.....                                           | 87 |

### **OBJECTIFS DE L'ETUDE.....93**

### **RESULTATS.....105**

#### **I) Le système Adc/Lmb assure le transport de zinc chez *S. agalactiae* et contribue à la croissance et la survie de la bactérie ..... 107**

|                                                                                                                         |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1) Etude de l'expression et de la régulation des gènes codant le transporteur ABC de zinc de <i>S. agalactiae</i> ..... | 107 |
| 2) Implication du complexe AdcCB et des SBP Lmb, AdcA et AdcAII dans l'acquisition de zinc .....                        | 109 |
| 3) Rôle du zinc dans la physiologie de <i>S. agalactiae</i> .....                                                       | 109 |

#### **Résultats complémentaires de la Publication 1 ..... 157**

|                                                                                                                                 |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1) Le zinc est-il impliqué dans la résistance au lysozyme ? .....                                                               | 157 |
| 2) Les protéines AdcA et AdcAII jouent-elles un rôle dans l'adhérence de <i>S. agalactiae</i> ? .....                           | 159 |
| A) Test de liaison de <i>S. agalactiae</i> à la laminine.....                                                                   | 159 |
| B) Test de liaison à différents composants de la matrice extracellulaire par expression hétérologue chez <i>L. lactis</i> ..... | 161 |
| C) Test d'adhérence de <i>L. lactis</i> à la lignée cellulaire humaine A549 .....                                               | 163 |



|                                                                        |     |
|------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3) Matériels et Méthodes .....                                         | 165 |
| A) Souches bactériennes et conditions de culture .....                 | 165 |
| B) Résistance au lysozyme .....                                        | 167 |
| C) Liaison à différents composants de la matrice extracellulaire ..... | 167 |
| D) Adhérence aux cellules A549 .....                                   | 167 |

## **II) Les protéines streptococciques à triade d’histidine Sht et ShtII participent à l’acquisition du zinc au sein du transporteur Adc/Lmb et contribuent à la résistance au complément..... 171**

|                                                                                             |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 1) Rôle des protéines Sht et ShtII dans l’acquisition de zinc de <i>S. agalactiae</i> ..... | 171 |
| 2) Rôle des protéines Sht et ShtII dans la résistance au complément.....                    | 173 |

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....225**

## **CONCLUSION GENERALE.....247**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....251**

## **ANNEXES.....307**



## Liste des tableaux

|                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1. Principaux facteurs de virulence impliqués dans la colonisation, l'invasion et l'échappement au système immunitaire de <i>S. agalactiae</i> ..... | 30 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|



## Liste des figures

|                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Arbre phylogénétique du genre <i>Streptococcus</i> basé sur l'analyse comparative des génomes.....                                                                                             | 6  |
| <b>Figure 2.</b> Caractéristiques morphologiques et culturelles de <i>S. agalactiae</i> .....                                                                                                                   | 10 |
| <b>Figure 3.</b> Représentation schématique des différents modes de contamination de l'enfant lors de la naissance.....                                                                                         | 20 |
| <b>Figure 4.</b> Proportion des souches de CC17 selon les syndromes néonataux recensés en France de 2007 à 2012. ....                                                                                           | 22 |
| <b>Figure 5.</b> Incidence des infections invasives néonatales précoces et tardives au streptocoque du groupe B en France métropolitaine de 1996 à 2015.....                                                    | 24 |
| <b>Figure 6.</b> Représentation schématique de l'infection ascendante à <i>S. agalactiae</i> .....                                                                                                              | 26 |
| <b>Figure 7.</b> Incidence des infections invasives à <i>S. agalactiae</i> chez l'adulte ( $\geq 15$ ans) aux Etats-Unis de 1999 à 2005.....                                                                    | 28 |
| <b>Figure 8.</b> Représentation schématique de l'immunité nutritionnelle pour les métaux de transition (sauf le fer) lors d'une infection bactérienne. ....                                                     | 44 |
| <b>Figure 9.</b> Représentation schématique de la réponse des bactéries à Gram – (A et C) ou à Gram + (B et D) suite à une carence en zinc (A et B) ou à une toxicité en zinc (C et D) induites par l'hôte..... | 48 |
| <b>Figure 10.</b> Principales familles des métallo-régulateurs du zinc.....                                                                                                                                     | 54 |
| <b>Figure 11.</b> Schéma de régulation des gènes cibles de la protéine AdcR chez <i>S. pneumoniae</i> .....                                                                                                     | 58 |
| <b>Figure 12.</b> Mécanisme de fonctionnement des importateurs de la superfamille des transporteurs ABC.....                                                                                                    | 64 |
| <b>Figure 13.</b> Diversité de structure des transporteurs ABC chez les bactéries.....                                                                                                                          | 66 |
| <b>Figure 14.</b> Organisation des gènes et représentation du transporteur ABC de zinc de <i>S. pneumoniae</i> . ....                                                                                           | 68 |
| <b>Figure 15.</b> Diversité d'organisation des gènes et de composition du transporteur ABC de zinc parmi quelques exemples de streptocoques. ....                                                               | 70 |
| <b>Figure 16.</b> Structure cristallographique de la protéine ZnuA d' <i>E. coli</i> . ....                                                                                                                     | 72 |
| <b>Figure 17.</b> Structure cristallographique de la protéine Lmb de <i>S. agalactiae</i> . ....                                                                                                                | 74 |
| <b>Figure 18.</b> Distribution des gènes de type <i>pht</i> identifiés parmi 38 souches de streptocoques.....                                                                                                   | 76 |
| <b>Figure 19.</b> Relation structurale et génétique des protéines Pht (polyhistidine triad). ....                                                                                                               | 78 |
| <b>Figure 20.</b> Représentation du motif de fixation du zinc retrouvé entre les résidus 166 à 220 de                                                                                                           |    |



|                                                                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| la protéine PhtA de <i>S. pneumoniae</i> . ....                                                                                                                                                                                                         | 80  |
| <b>Figure 21.</b> Modèle de l'import de zinc chez <i>S. pneumoniae</i> . ....                                                                                                                                                                           | 82  |
| <b>Figure 22.</b> La résistance au complément de <i>S. pneumoniae</i> . ....                                                                                                                                                                            | 86  |
| <b>Figure 23.</b> La régulation du gène <i>lmb</i> est dépendante du zinc. ....                                                                                                                                                                         | 96  |
| <b>Figure 24.</b> La protéine AdcR est nécessaire pour la répression par le zinc des gènes <i>lmb</i> , <i>adcA</i> et <i>adcAII</i> . ....                                                                                                             | 98  |
| <b>Figure 25.</b> Les deux AdcR box au niveau de la région promotrice de l'opéron <i>lmb-sht</i> sont nécessaires pour une répression efficace dépendante du zinc. ....                                                                                 | 100 |
| <b>Figure 26.</b> Résistance des souches A909 WT et mutantes $\Delta lmb/adcA/adcAII$ et $\Delta adcCB$ au lysozyme. ....                                                                                                                               | 156 |
| <b>Figure 27.</b> Liaison à la laminine humaine immobilisée des souches A909 WT et mutantes $\Delta lmb$ , $\Delta lmb/adcA/adcAII$ de <i>S. agalactiae</i> . ....                                                                                      | 158 |
| <b>Figure 28.</b> Liaison à la laminine humaine immobilisée des souches de <i>L. lactis subsp cremoris</i> NZ9000 transformées avec le vecteur pMS3545 vide ou contenant les gènes <i>lmb</i> , <i>adcA</i> ou <i>adcAII</i> . ....                     | 160 |
| <b>Figure 29.</b> Liaison à différents composants de la matrice extracellulaire des souches de <i>L. lactis subsp cremoris</i> NZ9000 transformées avec le vecteur pTCV-P <sub>Tet</sub> vide ou contenant les gènes <i>lmb</i> ou <i>adcAII</i> . .... | 162 |
| <b>Figure 30.</b> Adhérence aux cellules A549 des souches de <i>L. lactis subsp cremoris</i> NZ9000 transformées avec le vecteur pMS3545 vide ou contenant les gènes <i>lmb</i> , <i>adcA</i> ou <i>adcAII</i> . .                                      | 164 |



## Liste des annexes

|                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Annexe 1.</b> Poster pour le congrès Biotechnocentre (2014) .....                                                             | 311 |
| <b>Annexe 2.</b> Poster pour le congrès Lancefield et la Journée de la Recherche Tours-Poitiers-Limoges (2014) .....             | 313 |
| <b>Annexe 3.</b> Poster pour le congrès Biotechnocentre (2015) et la Journée de la Recherche Tours-Poitiers-Limoges (2016) ..... | 315 |
| <b>Annexe 4.</b> Poster pour le congrès FEMS (2017) .....                                                                        | 317 |



## Liste des abbréviations

|           |                                                        |
|-----------|--------------------------------------------------------|
| ABC       | « ATP-Binding-Cassette »                               |
| BHI       | « Brain Heart Infusion »                               |
| CAMP      | «Christie-Atkins-Munch-Peterson »                      |
| CC        | Complexe clonal                                        |
| CDF       | «Cation Diffusion Facilitator »                        |
| CNR-Strep | Centre National de Référence des Streptocoques         |
| EGM       | Element Génétique Mobile                               |
| EOD       | «Early-Onset Disease»                                  |
| Ery       | Erythromycine                                          |
| Fur       | « Fe-regulated uptake repressor »                      |
| HT        | Motif à Triade d’Histidine                             |
| ICP-MS    | Spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif |
| LCR       | Liquide Céphalo-Rachidien                              |
| LOD       | «Late-Onset Disease»                                   |
| MarR      | « Multiple antibiotic resistance Regulator »           |
| MBR       | « Membrane Binding Receptor »                          |
| MCD       | Milieu Chimiquement Défini                             |
| MerR      | « Mercuric ion resistance Regulator »                  |
| MLST      | « Multiple Locus Sequence Typing »                     |
| MFP       | « Membrane Fusion Protein »                            |
| OMF       | « Outer Membrane Factor »                              |
| pb        | paire de base                                          |
| Pht       | « Polyhistidine triad protein »                        |
| RND       | « Resistance Nodulation cell Division »                |
| SBP       | « Substrate Binding Protein »                          |
| SGB       | Streptocoque du Groupe B                               |
| Sht       | « Streptococcal histidine triad protein »              |
| ST        | « Sequence Type »                                      |
| TetR      | « Tetracycline Repressor »                             |
| TH        | « Todd Hewitt »                                        |



# **INTRODUCTION GENERALE**



Ce travail de thèse s'inscrit dans l'une des thématiques de recherche de l'équipe Bactéries et Risque Materno-Fœtal qui vise à étudier les mécanismes d'adaptation de *S. agalactiae* à des niches écologiques variées. Nous nous sommes centrés pour cette étude sur les systèmes d'acquisition des métaux.

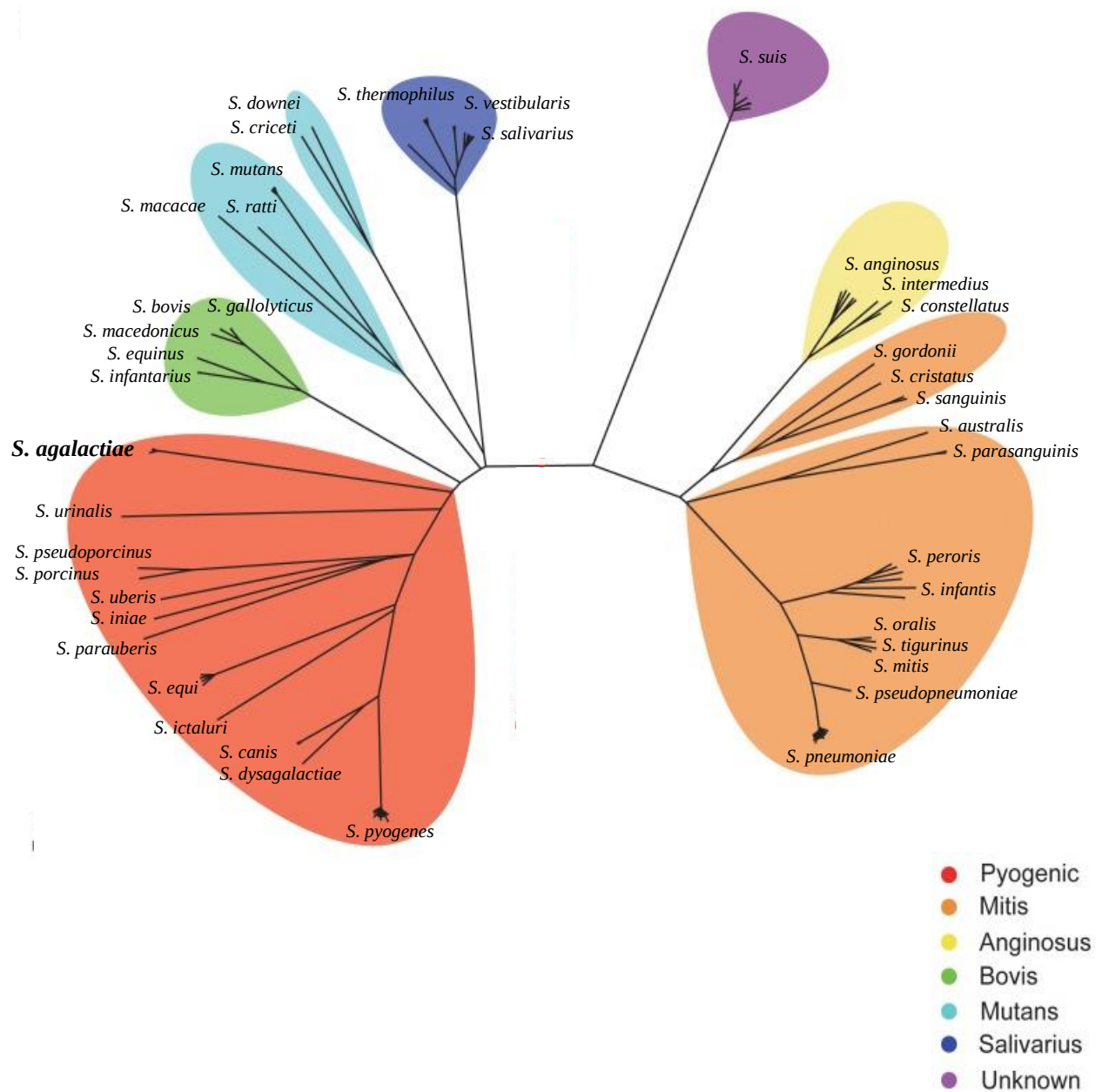
Ce mémoire de thèse débute par une revue de la littérature décrivant les principaux éléments d'épidémiologie des infections à *S. agalactiae*, certains acteurs de la virulence de *S. agalactiae*, la place du zinc chez les procaryotes et les mécanismes de maintien de son homéostasie pour finir par la description d'un transporteur ABC de zinc retrouvé chez les streptocoques.

Nous présenterons ensuite notre travail expérimental dont l'objectif était la caractérisation du transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae*.

Dans une première partie nous avons étudié le fonctionnement du transporteur ABC de zinc ainsi que son importance et le rôle du zinc dans la physiologie de *S. agalactiae* (Publication 1). Le rôle des protéines de fixation du zinc du transporteur en tant qu'adhésine a ensuite été testé (Résultats non publiés). Dans une dernière partie nous avons décrit le rôle des deux protéines Sht et ShtII dans le fonctionnement du transporteur ABC de zinc ainsi qu'une implication de ces protéines dans la fixation au facteur H.



# **REVUE DE LA LITTERATURE**



**Figure 1. Arbre phylogénétique du genre *Streptococcus* basé sur l'analyse comparative des génomes. (Adapté de Gao et al., 2014)**

# I) *Streptococcus agalactiae*, un pathogène opportuniste

## 1) Caractères généraux de *S. agalactiae*

### A) Taxonomie

*Streptococcus agalactiae* est une bactérie du phylum des Firmicutes et de l'ordre des Lactobacilles. Elle fait partie de la famille des *Streptococcaceae* qui regroupe les genres *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*. Le genre *Streptococcus*, de la terminologie grecque *streptus* : flexible et *coccus* : grain, se divise en six sous-groupes : Mitis, Anginosus, Bovis, Mutans, Salivarius et Pyogene auquel *S. agalactiae* appartient (Figure 1) (Gao *et al.*, 2014). Actuellement 121 espèces et 23 sous-espèces composent le genre *Streptococcus* (<http://www.bacterio.net/streptococcus.html>) mais de nouvelles espèces sont régulièrement découvertes augmentant ce nombre. Selon les gènes utilisés pour la classification ainsi que la prise en compte des nouvelles espèces identifiées, le nombre de sous-groupes varie entre les études (Richards *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2014; Póntigo *et al.*, 2015).

### B) Marqueurs épidémiologiques

#### a) Classification phénotypique

La première classification moderne des streptocoques fut mise au point en 1933 par Rebecca Lancefield (Lancefield, 1933). Elle repose sur les propriétés antigéniques de l'acide teichoïque et d'un composant de la paroi, le polyside C. Dix-neuf sérogroupes ont été déterminés (A-H, K-P, R-V) dont dix-sept en fonction de la nature du polyside C et deux en fonction de la nature de l'acide teichoïque (D et N) (Lancefield, 1933; Lancefield and Freimer, 1966). Les streptocoques dépourvus de polyside C sont dits non-groupables. La classification de Lancefield identifie *S. agalactiae* comme un streptocoque du groupe B. Communément *S. agalactiae* est appelé « le streptocoque du groupe B » ou « SGB » même si



ce groupe se compose également de *Streptococcus porcinus* (Lancefield and Freimer, 1966; Thompson and Facklam, 1997; Duarte *et al.*, 2005).

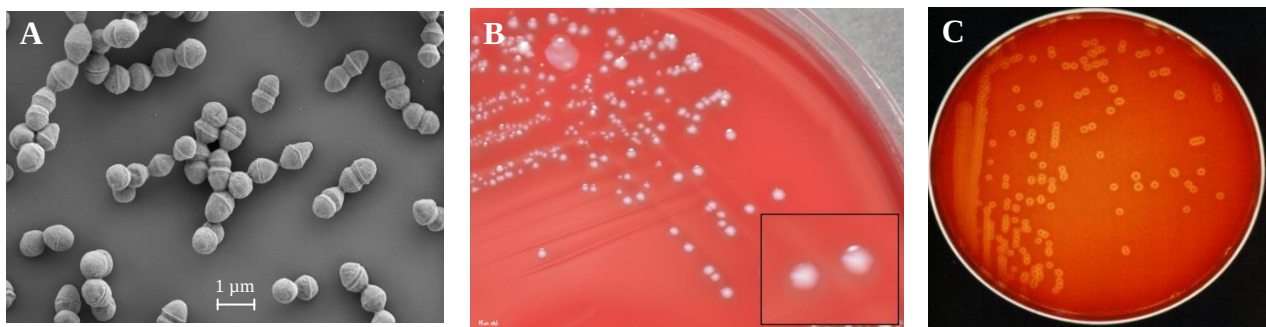
Au sein de l'espèce *S. agalactiae*, la classification des souches a tout d'abord été réalisée aux moyens de marqueurs phénotypiques comme la lysotypie, l'électrophorèse des isoenzymes métaboliques ou la sérotypie (Jensen, 1979; Stringer, 1980; Selander *et al.*, 1986). Le principe de la sérotypie repose sur la réaction d'anticorps vis-à-vis des antigènes de capsule. Chaque sérotype correspond à un arrangement différent de quatre sucres (antigènes) parmi cinq possibles (glucose, rhamnose, galactose, N-acétylglucosamine et acide acétylneuraminique ou acide sialique). Dix sérotypes ont été décrits : Ia et Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII et IX (Jensen, 1979; Jelínková and Motlová, 1985; Motlová *et al.*, 1986; Rýc *et al.*, 1988; Slotved *et al.*, 2007). Depuis sa mise au point la sérotypie a été l'un des marqueurs les plus utilisés pour suivre l'épidémiologie des infections à *S. agalactiae*.

L'utilisation de marqueurs phénotypiques pour classer les streptocoques ou les souches de *S. agalactiae* a cependant des limites, certaines souches ne pouvant être caractérisées et se retrouvant être non groupables ou non typables.

## **b) Classification génotypique**

Avec l'amélioration des techniques de biologie moléculaire, les souches de *S. agalactiae* ont pu être classées plus finement et plus facilement selon des marqueurs génotypiques. La plupart de ces techniques sont basées sur l'analyse de l'ADN comme l'électrophorèse en champ pulsé, les profils de restriction ou l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (Schwartz and Cantor, 1984; Welsh and McClelland, 1990; Nagano *et al.*, 1991). Une technique de référence utilisée pour classer et différencier les souches de *S. agalactiae* est la technique du MLST (« Multiple Locus Sequence Typing »). Cette technique a l'avantage d'être reproductible par tous les laboratoires et son appréciation ne peut être subjective.

La technique du MLST fut appliquée pour la première fois en 1998 pour caractériser les souches de *Neisseria meningitidis* (Maiden *et al.*, 1998) puis adaptée cinq ans après pour *S. agalactiae* (Jones *et al.*, 2003). Actuellement elle peut être utilisée pour plus d'une centaine d'espèces bactériennes différentes et neuf espèces d'eucaryotes. Le MLST est basé sur la comparaison des séquences nucléotidiques de sept gènes de ménage : le gène *adhP* codant



**Figure 2. Caractéristiques morphologiques et culturelles de *S. agalactiae*.**

A) Observation de *S. agalactiae* NEM316 en microscopie électronique (Equipe «Bactéries et Risque Materno-Fœtal », ISP, UMR 1282, INRA-Université de Tours).

B) Morphologie de colonies de *S. agalactiae* sur gélose au sang de cheval.

C) Hémolyse  $\beta$  de *S. agalactiae* sur gélose au sang de cheval ([www.microbiologyinpictures.com](http://www.microbiologyinpictures.com)).

l'alcool déshydrogénase, le gène *pheS* codant la phénylalanine ARNt synthétase, le gène *atr* codant la protéine de transport de la glutamine, le gène *glnA* codant la glutamine synthétase, le gène *sdhA* codant la sérine déshydratase, le gène *glcK* codant la glucokinase et le gène *tkt* codant la transcétolase. L'identification des allèles des gènes de ménage se fait directement par séquençage nucléotidique d'un fragment interne (400-500 pb) des gènes. A chaque séquence est affecté un numéro d'allèle et la combinaison de chaque locus donne un profil allélique appelé séquence type (ST). Certains ST sont regroupés en clusters appelés complexes clonaux (CC). Les ST assignés à un même CC possèdent au moins cinq allèles en commun sur les sept loci étudiés. Les ST qui ne sont affiliés à aucun CC sont appelés singletons (Feil *et al.*, 2004). Le site (<http://www.mlst.net>) recense à ce jour plus de 1148 ST différents pour *S. agalactiae* à partir de 2886 isolats. Cette banque de données internationale, consultable librement, sert ainsi pour l'étude de l'épidémiologie de la bactérie à l'échelle mondiale.

### C) Caractères morphologiques, culturels et métaboliques

*S. agalactiae* se présente sous forme de cocci à Gram positif (Gram +), immobiles, asporulés et mésophiles, caractéristiques communes de la famille des *Streptococcaceae*. La bactérie est retrouvée en diplocoques ou chainettes de longueur variables avec des cocci de taille comprise entre 0,6 et 1,2  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 2A). Ce streptocoque est peu exigeant et se développe sur des milieux de culture commerciaux tels que les milieux Todd Hewitt (TH) ou de bouillon cœur-cerveille (BHI). Après 24 heures de culture à 37°C sur milieu nutritif gélosé additionné de sang de cheval, *S. agalactiae* se présente sous forme de petites colonies de 3 à 4 millimètres de diamètre, à bords nets, blanches, plates et muqueuses et réalise une hémolyse totale dite  $\beta$ -hémolyse formant un halo transparent autour de la colonie (Figures 2B et 2C). Certaines colonies peuvent produire un pigment jaune à rouge brique (Fallon, 1974).

Ce streptocoque est anaérobie-aérotolérant et possède un métabolisme fermentatif du glucose avec une production d'acides lactique, acétique et formique, d'éthanol et de dioxyde de carbone entraînant une acidification du milieu de culture (Brown and Collins, 1977). Il est dépourvu d'oxydase et de catalase et ne réduit pas les nitrates. Les principaux caractères d'identification de l'espèce sont les tests de résistance à la bacitracine, au triméthoprime-sulfaméthoxazole et l'hydrolyse de l'hippurate. En microbiologie clinique le test « CAMP »



(Christie-Atkins-Munch-Peterson) est également utilisé. Il met en évidence une hémolyse synergique sur gélose au sang de mouton en présence de la  $\beta$ -toxine de *Staphylococcus aureus* (Christie *et al.*, 1944).

## D) Caractères génomiques

Les deux premiers génomes de la bactérie ont été séquencés en 2002 à partir des souches NEM316 (sérotypage III) et 2603 (sérotypage V) (Glaser *et al.*, 2002; Tettelin *et al.*, 2002). Rapidement le séquençage de six autres génomes provenant de divers sérotypes (Ia, Ib, II, III et V) a suivi (Tettelin *et al.*, 2005). Leur analyse comparative a montré que le génome de *S. agalactiae* se compose d'un chromosome circulaire d'environ 2,2 millions de paires de bases (pb). Il possède un faible contenu en bases guanine et cytosine représentant 35,6% de son génome, une caractéristique retrouvée chez les membres de la famille des *Streptococcaceae*. La bactérie possède une partie conservée, le « core » génome, représentant environ 80% du génome (1811 gènes), le reste, partiellement partagé, voire spécifique de souche représente le génome accessoire avec 765 gènes (Maione *et al.*, 2005; Tettelin *et al.*, 2005). Le génome accessoire est constitué d'îlots responsables de la diversité génomique au sein de l'espèce. Ces derniers contiennent notamment des gènes associés à des éléments génétiques mobiles (intégrases, transposases) ou des gènes de virulence connus ou putatifs. De fait, certains de ces îlots pourraient correspondre à des îlots de pathogénicité (Herbert *et al.*, 2005).

## 2) Epidémiologie de *S. agalactiae*

### A) Une bactérie commensale de l'Homme

*S. agalactiae* est une bactérie commensale de diverses espèces animales dont l'Homme (Keefe, 1997; Hansen *et al.*, 2004; Mian *et al.*, 2009; Six *et al.*, 2014). La colonisation chez l'Homme se fait majoritairement au niveau des tractus gastro-intestinal et génital. La bactérie peut également être retrouvée au niveau des flores oropharyngées et cutanées. En France, le portage vaginal est d'environ 23% au sein de la population féminine adulte (van der Mee-Marquet *et al.*, 2008). Bien que cette contamination provienne principalement du tractus gastro-intestinal de la femme, une corrélation entre portage vaginal et activité sexuelle a également été suggérée (Badri *et al.*, 1977; Anthony *et al.*, 1978; Manning *et al.*, 2000; Meyn



*et al.*, 2002; Meyn *et al.*, 2009). Chez la femme enceinte, le portage vaginal varie entre 6 et 36% selon les pays avec une moyenne de 13,6% en France (Schuchat, 1998; Puopolo *et al.*, 2005; Barcaite *et al.*, 2008). En plus de l'origine géographique, la fréquence de cette colonisation semble également dépendre de l'origine ethnique des patients : le portage de *S. agalactiae* est ainsi plus fréquent chez les femmes d'origine africaine que caucasienne (Phares *et al.*, 2008). De plus, le portage de cette bactérie apparaît comme dynamique, la colonisation pouvant être transitoire, intermittente ou permanente (Anthony *et al.*, 1978; Yow *et al.*, 1980). Une étude a déterminé que seules 30 à 40% des femmes colonisées en début de grossesse possédaient encore le germe au moment de l'accouchement (Dillon *et al.*, 1982). Une étude plus récente, réalisée sur des femmes enceintes qui ont ensuite été suivies sur une période de deux ans, a montré qu'environ 50% d'entre elles présentaient une détection intermittente du même clone (Hansen *et al.*, 2004). Cette instabilité de colonisation a ainsi entraîné de nombreuses controverses quant au dépistage systématique au cours de la grossesse.

## B) Un pathogène animal et pathogène opportuniste humain

### a) Les infections chez les animaux

#### a.1) Les infections bovines

La première description de *S. agalactiae* comme agent pathogène chez les bovins fut réalisée par le médecin vétérinaire et microbiologiste Edmond Nocard en 1887 décrivant la bactérie comme « le streptocoque de la mammitte bovine » (Nocard and Mollereau, 1887). Le nom actuel de la bactérie fut donné quelques années plus tard par Lehmann et Neumann avec comme choix « *agalactiae* » pour l'« absence de lait » observée chez les vaches lors d'infections à *S. agalactiae* (Lehmann and Neumann, 1896). La bactérie a ensuite été identifiée comme une cause majeure de mammites chroniques ou sub-cliniques (inflammation modérée sans signe clinique visible au niveau de la vache, de la mamelle ou du lait). Entre les années 1976 et 1982, *S. agalactiae* a été retrouvée avec une prévalence de 44,7% parmi les infections bovines du Massachusetts (Oliver and Mitchell, 1984). L'infection à *S. agalactiae* étant responsable d'une diminution de la quantité et de la qualité du lait, elle engendre d'importantes pertes économiques au niveau de la filière laitière (Jain, 1979; Keefe, 1997). La mise en place de programmes de prophylaxie basés sur l'utilisation adaptée d'antibiotiques a permis une diminution du nombre de cas à l'échelle mondiale (Hillerton and Berry, 2003).



Actuellement la prévalence des infections bovines à *S. agalactiae* est très variable à travers le monde. Certains pays comme la France, l'Angleterre ou la Belgique ont pratiquement réussi à éradiquer la bactérie alors que d'autres comme l'Egypte ou l'Allemagne ont encore des prévalences de 20 et 29% respectivement (Tenhagen *et al.*, 2006; Bradley *et al.*, 2007; Piepers *et al.*, 2007; Poutrel, 2015; Elhaig and Selim, 2015).

#### a.2) Les infections chez les poissons

Les premiers isollements de *S. agalactiae* chez les poissons ont été réalisés en 1966 chez un poisson d'eau douce, le méné jaune (*Notemigonus crysoleucas*) (Robinson and Meyer, 1966). Rapidement le nombre d'isolats a augmenté à partir des années 1980 et des études ont identifié la bactérie comme responsable d'épidémies chez les poissons d'élevage. Des élevages israéliens de Tilapia et de truite arc-en-ciel ont en effet subi la mort de 30 à 50% des animaux suite à des méningo-encéphalites causées par la bactérie (Eldar *et al.*, 1995). A l'heure actuelle, des épidémies à *S. agalactiae* sont retrouvées à la fois chez les poissons d'élevage comme le Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) ou le Ya-fish (*Schizothorax prenanti*) en Chine mais aussi chez des poissons sauvages comme le Muge (*Mugil cephalus*) au niveau de la baie du Koweït (Evans *et al.*, 2008; Jafar *et al.*, 2008; Mian *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2010; Geng *et al.*, 2012). Récemment un cas de zoonose impliquant les poissons a été mis en évidence. En effet, suite à une série d'infections humaines sévères (méningites, arthrites septiques et infections spinales) à *S. agalactiae* durant l'automne 2015 à Singapour, une étude a associé cette épidémie à la consommation de poisson cru porteur d'une souche de *S. agalactiae* de sérotype III et ST28 (Rajendram *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2016; Kalimuddin *et al.*, 2017).

#### a.3) Les infections chez d'autres espèces

*S. agalactiae* a également été isolée chez différentes espèces de mammifères comme les souris, les chiens, les chats, les singes, les chevaux et les dauphins mais également chez des grenouilles ou des crocodiles (Elliott *et al.*, 1990; Lämmler *et al.*, 1998; Yildirim *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2006; Bishop *et al.*, 2007). Dans certains de ces cas il semble que le pouvoir pathogène de la bactérie soit dû à une association avec d'autres espèces bactériennes (Yildirim *et al.*, 2002). De plus, un grand nombre de ces infections pourraient avoir été transmises par l'Homme, les animaux ayant développé l'infection étant en contact étroit avec l'Homme. De plus, cette hypothèse est appuyée par le fait que les isolats ont des



caractéristiques phénotypiques et génotypiques identiques ou très proches des souches humaines (Elliott *et al.*, 1990; Lämmle *et al.*, 1998; Yildirim *et al.*, 2002). Cependant ces cas sont pour la plupart anecdotiques et le pouvoir pathogène de *S. agalactiae* chez ces espèces y reste encore peu étudié. *S. agalactiae* peut ainsi infecter une large gamme d'hôtes expliquant en partie le grand nombre de souches identifiées et la diversité des ST.

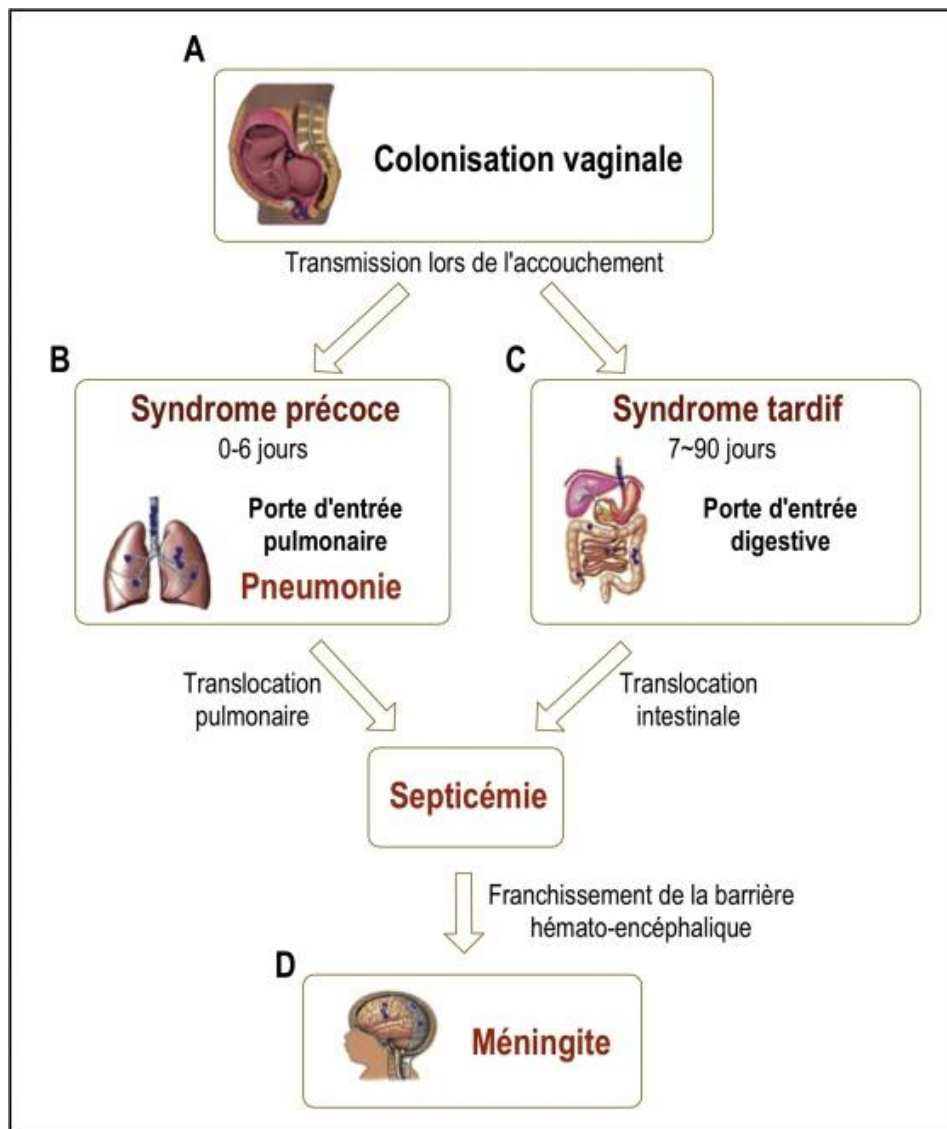
## **b) Les infections humaines**

### **b.1) Infections néonatales**

Les premiers cas d'infections néonatales causées par *S. agalactiae* ont été décrits en 1964 par Eickhoff (Eickhoff *et al.*, 1964). Une colonisation vaginale maternelle par la bactérie pendant la grossesse a ensuite été identifiée comme le principal facteur de risque. Beaucoup plus tard, cette même colonisation a été liée aux naissances prématurées et aux morts à la naissance (Lawn *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2013; Monari *et al.*, 2013). Malgré des mesures de prévention mises en place, *S. agalactiae* est actuellement la première cause d'infections invasives chez les nouveaux nés dans les pays industrialisés. Le taux global de mortalité des infections néonatales dues à la bactérie est d'environ 10%. De plus, 40% des enfants ayant survécu à une méningite se retrouvent avec des séquelles neurologiques permanentes (Edmond *et al.*, 2012; Libster *et al.*, 2012). Deux syndromes sont associés à l'infection par la bactérie selon l'âge de l'enfant lors de la déclaration de l'infection, le syndrome précoce et le syndrome tardif. En France, le centre national de référence des streptocoques (CNR-Strep) ([www.cnr-strep.fr](http://www.cnr-strep.fr)) recense, entre autres, les cas décrits de syndromes précoces et tardifs à *S. agalactiae*. Ainsi, entre 2007 et 2012, 438 cas d'infections néonatales à *S. agalactiae* ont été recensés dont 174 cas de syndromes précoces (39,7% des cas) (incluant la mort *in utero* de l'enfant) et 264 cas de syndromes tardifs (60,3% des cas) (Joubrel *et al.*, 2015) ([www.cnr-strep.fr](http://www.cnr-strep.fr)).

#### **b. 1.1) Le syndrome précoce**

Le syndrome précoce se déclare durant la première semaine de vie et pour la grande majorité des cas, durant les premières heures suivant la naissance. La voie d'entrée de la bactérie se situe au niveau des poumons, provoquant des troubles respiratoires et une pneumonie. Cette infection progresse rapidement en bactériémie et choc septique avec la



**Figure 3. Représentation schématique des différents modes de contamination de l'enfant lors de la naissance.** (D'après Six *et al.*, 2014)

A) La contamination du nouveau-né a lieu lors de l'accouchement par inhalation ou ingestion des sécrétions vaginales ou de liquide amniotique contaminés.

B) Le syndrome précoce résulte d'une colonisation pulmonaire pouvant évoluer en bactériémie suite à la translocation des bactéries à travers l'épithélium pulmonaire.

C) Le syndrome tardif résulte probablement d'une colonisation intestinale précoce suivie d'une translocation intestinale provoquant une bactériémie.

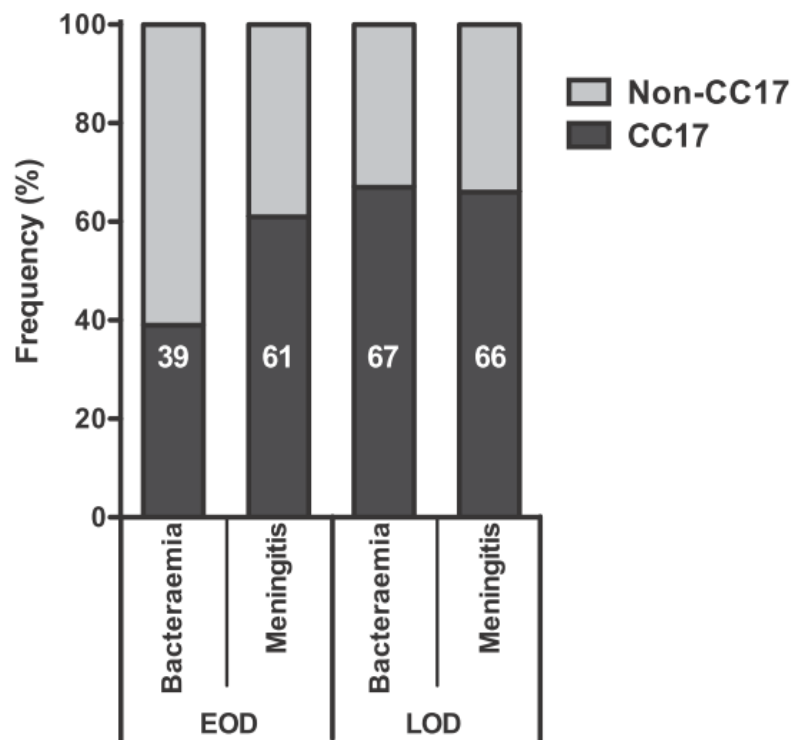
D) La bactériémie peut évoluer en méningite après franchissement de la barrière hémato-encéphalique par la bactérie.

translocation de la bactérie dans le sang (Berner, 2004). Entre 2007 et 2012 en France, le CNR-Strep a recensé que 61% des cas de syndromes précoces étaient associés à une bactériémie, 27% à une méningite et 6% à des infections du tractus respiratoire (Joubrel *et al.*, 2015) ([www.cnr-strep.fr](http://www.cnr-strep.fr)). La contamination de l'enfant peut se faire par transmission verticale de la bactérie via le liquide amniotique contaminé ou via des sécrétions vaginales contaminées de la mère que l'enfant va inhaler (Figure 3). Le portage vaginal maternel, un haut taux de colonisation et une rupture prématurée des membranes sont des facteurs déterminants dans la contamination du nouveau-né (Baker, 1997).

#### b. 1.2) Le syndrome tardif

Les infections à *S. agalactiae* survenant entre la première semaine et trois mois de vie sont qualifiées de syndromes tardifs. La porte d'entrée de la bactérie se situe au niveau digestif, provoquant une septicémie après translocation intestinale de la bactérie puis une méningite lorsqu'elle franchit la barrière hémato-encéphalique (Figure 3). Le CNR-Strep a recensé que 53,3% des syndromes tardifs se traduisaient par une méningite et 35,3% par une bactériémie (Joubrel *et al.*, 2015) ([www.cnr-strep.fr](http://www.cnr-strep.fr)). Ce syndrome est ainsi caractérisé par une forte proportion de méningite. A l'heure actuelle, le mode de transmission de la bactérie à l'enfant n'est pas clairement défini pour ce syndrome et reste encore très controversé. Différentes hypothèses, non exclusives, ont été avancées.

Une première hypothèse serait une transmission verticale de la bactérie de la mère à l'enfant lors de l'accouchement ou par l'allaitement, engendrant une colonisation intestinale précoce du nouveau-né (Godambe *et al.*, 2005; Gagneur *et al.*, 2009; Tazi *et al.*, 2010; Filleron *et al.*, 2014; Six *et al.*, 2014). Cette colonisation intestinale de la bactérie, suite à une translocation, déboucherait sur une septicémie, puis une méningite dans les cas où la bactérie franchirait la barrière hémato-encéphalique (Figure 3). Cette hypothèse est appuyée par la mise en évidence de la bactérie dans le tissu intestinal, l'endothélium cérébral et les méninges lors d'analyses bactériologiques d'un cas létal de syndrome tardif confirmant que la bactérie peut franchir les barrières intestinale et hémato-encéphalique dans ce contexte (Tazi *et al.*, 2010). De plus, 60 et 40% des nouveau-nés colonisés au niveau intestinal à la naissance le sont encore à 4 et 12 semaines de vie respectivement (Weindling *et al.*, 1981). Enfin, certains nouveau-nés peuvent être colonisés pendant un an par une souche isolée de la flore vaginale maternelle (Hansen *et al.*, 2004).



**Figure 4. Proportion des souches de CC17 selon les syndromes néonataux recensés en France de 2007 à 2012.** (D'après Joubrel *et al.*, 2015)

EOD : Syndrome précoce (Early-Onset Disease)

LOD : Syndrome tardif (Late-Onset Disease)

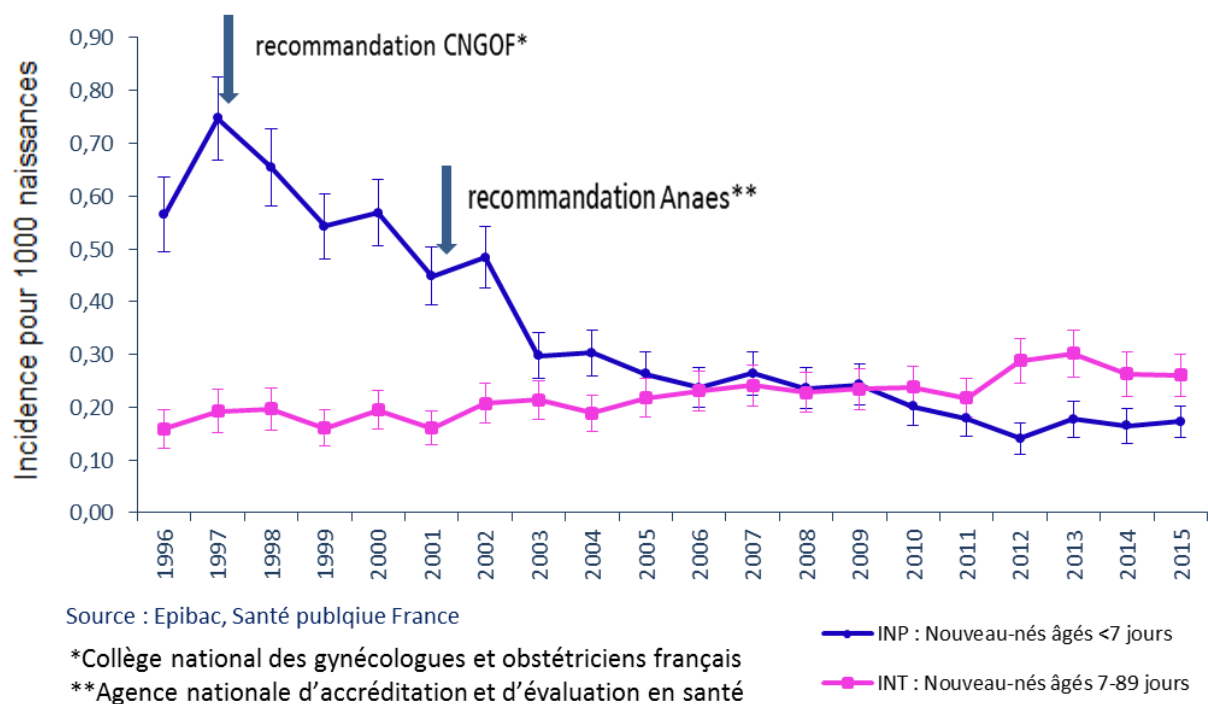
Une seconde hypothèse serait une transmission horizontale de la bactérie via une source environnementale (personnel soignant). Au sein d'unités intensives de soins néonataux, une même souche a en effet été retrouvée chez des nouveau-nés ayant déclarés des syndromes tardifs (MacFarquhar *et al.*, 2010; Al-Maani *et al.*, 2014). Le mode de contamination de l'enfant lors du syndrome tardif pourrait ainsi avoir différentes origines contrairement au syndrome précoce.

#### b. 1.3) Le clone « hyper-virulent ST17 »

Depuis les années 1970, une association a été observée entre le sérotype III et les méningites néonatales (Edmond *et al.*, 2012; Joubrel *et al.*, 2015). Parmi ce sérotype, un clone appartenant au CC17 et plus spécifiquement au ST17 est responsable d'un peu plus de 60% des méningites néonatales (Figure 4) (Tazi *et al.*, 2010; Joubrel *et al.*, 2015). Ce dernier a ainsi été désigné comme le clone « hyper-virulent ST17 ». Quelques facteurs moléculaires ont été mis en évidence comme spécifiques des souches de ST17 et expliquent en partie l'hyper-virulence et le tropisme méningé du clone ST17. Parmi ces facteurs de virulence la protéine HvgA a été identifiée comme responsable de l'adhérence et du franchissement des barrières intestinale et hémato-encéphalique (Tazi *et al.*, 2010). Les souches de ST17 possèdent également une version différente de la protéine glycosylée et riche en sérine Srr1, la protéine Srr2. Cette protéine possède une affinité six fois supérieure pour le fibrinogène (une protéine plasmatique et un constituant de la matrice extracellulaire humaine) et contribue ainsi à une plus forte adhérence de la bactérie (Seo *et al.*, 2013). Ces deux facteurs peuvent expliquer la meilleure adhérence des souches de ST17 aux cellules épithéliales intestinales et de l'endothélium vasculaire cérébral ainsi que la meilleure capacité de colonisation digestive observée dans un modèle murin (Tazi *et al.*, 2010).

#### b. 1.4) Prévention et traitement des infections néonatales

Dans le cadre de la prévention anténatale du risque infectieux du nouveau-né, des recommandations concernant le dépistage et la prise en charge maternelle ont été proposées dans différents pays et notamment aux Etats-Unis dès 1996 (recommandations révisées en 2002 puis 2010) et en France en 2001 (Anonyme, 1996; Anonyme, 2001; Verani *et al.*, 2010). L'HAS (Haute Autorité de Santé) recommande ainsi un dépistage systématique du portage vaginal de *S. agalactiae* chez la femme enceinte vers la fin de la grossesse (entre les 35<sup>e</sup> et 37<sup>e</sup> semaines de grossesse). En cas de dépistage positif, une antibioprophylaxie *per-partum* est

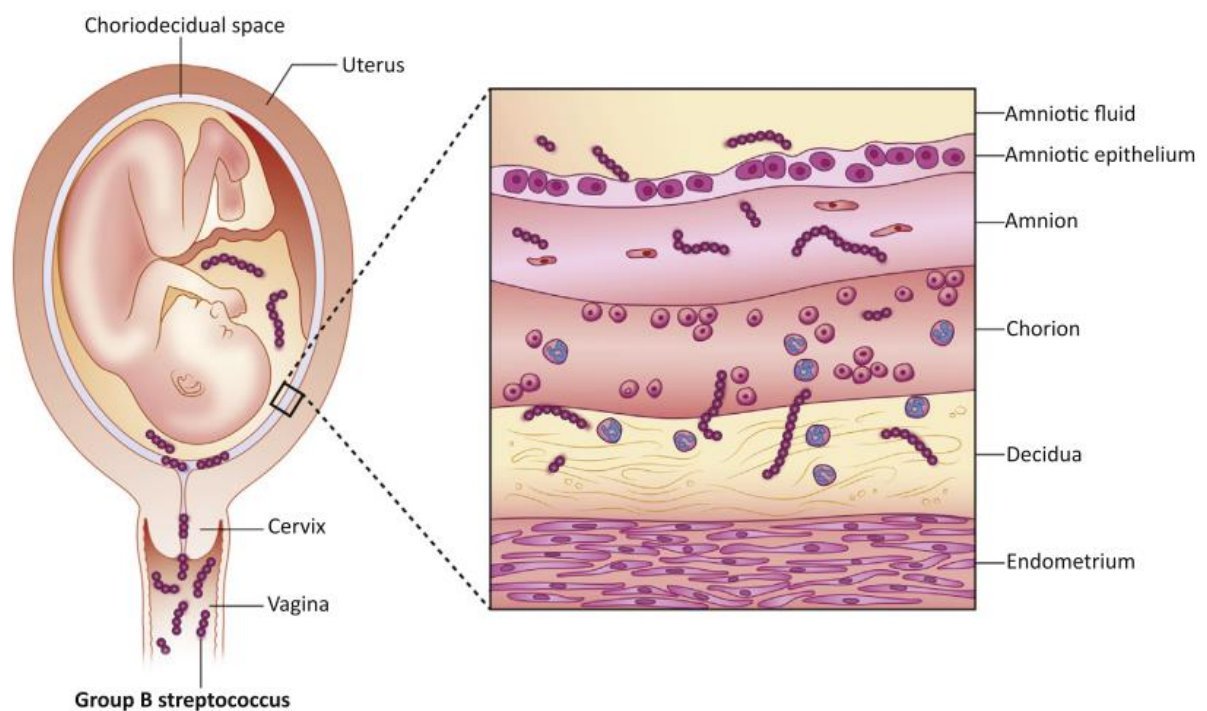


**Figure 5. Incidence des infections invasives néonatales précoces et tardives au streptocoque du groupe B en France métropolitaine de 1996 à 2015.** (D'après Epibac 2016, InVS)

(<http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses>)

mise en place. Elle consiste en l'injection par voie intraveineuse de pénicilline G ou d'amoxicilline toutes les quatre heures dès le déclenchement du travail et jusqu'à la naissance. En cas d'allergie aux pénicillines, l'administration d'érythromycine (Ery), d'une céphalosporine ou de clindamycine est indiquée. Ces mesures de prévention ont permis de diminuer de manière significative les incidences des syndromes précoces de 1,8 cas pour 1000 naissances en 1990, à 0,26 cas pour 1000 naissances en 2010 en France, mais n'a apporté en revanche aucun changement sur le nombre des syndromes tardifs (Figure 5) (Schrag and Verani, 2013) ([www.invs.santepubliquefrance.fr](http://www.invs.santepubliquefrance.fr)). La persistance à faible fréquence des cas de syndromes précoces peut être expliquée par une absence de dépistage maternel ou par des faux négatifs (Poyart *et al.*, 2008). Par contre l'inefficacité de l'antibioprophylaxie à réduire le nombre de syndromes tardifs pose encore question.

Bien que la mise en place de l'antibioprophylaxie a permis de faire baisser le nombre global d'infections néonatales, cette utilisation d'antibiotiques provoque des inquiétudes. Tout d'abord, des études ont observé une augmentation de la résistance aux antibiotiques au niveau d'isolats de souches invasives (Castor *et al.*, 2008; Phares *et al.*, 2008). Une prévalence de résistance des souches invasives de *S. agalactiae* à l'érythromycine et la clindamycine de 25-32% et 13-20% respectivement a notamment été mesurée entre 2006 et 2009 aux Etats-Unis. De plus, des études commencent à mettre en lien les effets des antibiotiques sur la santé des nouveau-nés et notamment sur la composition de leur microbiome (Langdon *et al.*, 2016; Bokulich *et al.*, 2016). Cette modification du microbiome pourrait être en effet associée à des risques d'obésité, de diabète ou d'asthme (Kilkkinen *et al.*, 2006; Azad *et al.*, 2014; Arrieta *et al.*, 2015). La stagnation de l'incidence des syndromes tardifs et les problèmes posés par l'utilisation systématique des antibiotiques, nous démontre l'importance de mettre en place de nouveaux moyens de prévention. La vaccination est une approche actuellement à l'étude. Un vaccin pentavalent ciblant la capsule des sérotypes majoritairement retrouvés lors d'infection est notamment en études pré-cliniques (Kobayashi *et al.*, 2016). L'utilisation couplée des protéines de surface Rib et alpha C comme vaccin est actuellement en première phase d'essais cliniques. Ces deux protéines ont l'avantage d'être très immunogènes et d'être retrouvées chez la plupart des souches de *S. agalactiae* (Heath, 2016). Ce vaccin permettrait ainsi de cibler les bactéries non typables responsables également d'infections et de contrecarrer le changement possible de sérotype de la bactérie pour échapper au système immunitaire (Ramaswamy *et al.*, 2006; Bellais *et al.*, 2012). Un autre vaccin élaboré à partir de bactéries inactivées, et inoculé à des souris avant la grossesse,



**Figure 6. Représentation schématique de l'infection ascendante à *S. agalactiae*.** (D'après Vornhagen *et al.*, 2017).

La colonisation vaginale augmente le risque d'infection ascendante durant la grossesse. L'infection ascendante de *S. agalactiae* consiste au passage de la bactérie à travers le vagin pour conduire au final à l'invasion bactérienne des membranes placentaires (chorion et amnion), de la cavité amniotique et du fœtus.

a montré une diminution du taux des naissances prématurées dues à la bactérie et pourrait constituer une piste intéressante (Bernardini *et al.*, 2016). La vaccination des mères assurerait ainsi une protection des nourrissons par immunisation passive.

Une autre approche en cours d'étude est l'utilisation des probiotiques pour réduire la colonisation vaginale par *S. agalactiae*. Il a été montré que l'utilisation de différentes espèces de Lactobacilles empêche l'adhérence de la bactérie aux cellules épithéliales vaginales et diminue ainsi la colonisation vaginale par *S. agalactiae* (Ortiz *et al.*, 2014; De Gregorio *et al.*, 2015). Une autre étude a également mis en évidence le fait que l'inoculation de *Streptococcus salivarius* diminue la quantité de *S. agalactiae* dans un modèle murin de colonisation vaginale par un mécanisme encore inconnu (Patras, Wescombe, *et al.*, 2015).

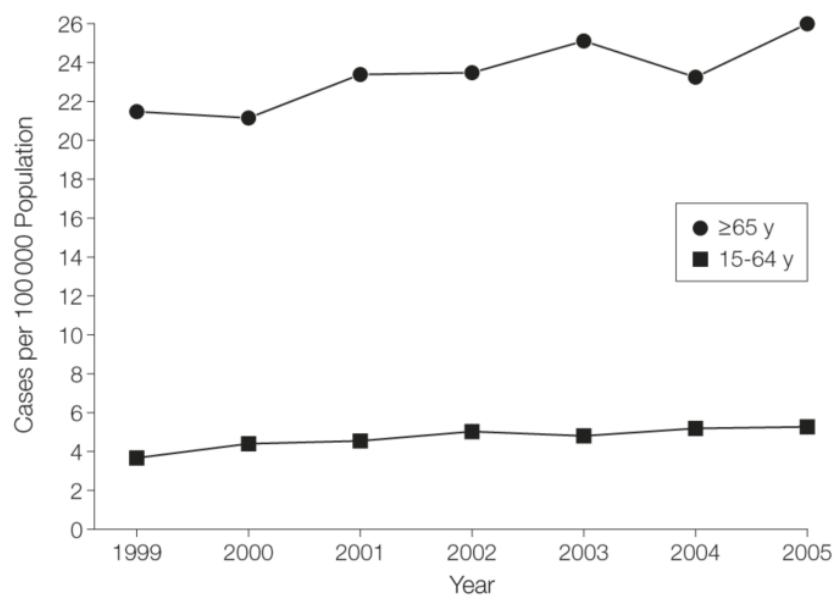
## b.2) Infection chez l'adulte

### b.2.1) Infection chez la femme enceinte

La femme enceinte ayant une forte colonisation vaginale par *S. agalactiae* développe un risque accru d'infection ascendante conduisant à la contamination du liquide amniotique ainsi qu'à des infections sévères. Parmi ces infections, on dénombre 30% de chorioamniotites responsables de naissances prématurées et de mort fœtal *in utero* (Figure 6) (Baker, 1997; Krohn *et al.*, 1999). La bactérie est également responsable de 20% des endométrites du *post-partum* et *post-abortionum* qui peuvent être accompagnées de bactériémies (Deutscher *et al.*, 2011).

### b.2.2) Infection chez l'adulte âgé ou immunodéprimé

Depuis les années 2000, *S. agalactiae* est décrit comme un pathogène opportuniste émergent chez l'adulte, et plus particulièrement chez les personnes âgées de plus de 65 ans, les personnes immunodéprimées et celles présentant des pathologies sous-jacentes (diabète, cirrhose, insuffisance rénale, cancer...) (Figure 7) (Farley, 2001; Blancas *et al.*, 2004; Edwards and Baker, 2005; Phares *et al.*, 2008; Skoff *et al.*, 2009). Les manifestations cliniques sont très variées : des infections de la peau et des tissus mous, des infections urinaires, des pneumonies et septicémies, des arthrites ainsi que des ostéomyélites (Farley, 2001; Edwards and Baker, 2005; Skoff *et al.*, 2009). En France, les sérotypes majoritairement incriminés sont les sérotypes Ia (22,7% des infections), III (25,7% des infections) et V (23,4%



**Figure 7. Incidence des infections invasives à *S. agalactiae* chez l'adulte ( $\geq 15$  ans) aux Etat-Unis de 1999 à 2005. (D'après Phares *et al.*, 2008)**

des infections), ce qui distingue les infections chez l'adulte des infections néonatales très largement dominées par le sérotype III (Tazi *et al.*, 2011).

### 3) Eléments participant à la virulence de *S. agalactiae*

Le développement de l'infection par *S. agalactiae* repose sur la réussite de différentes étapes que la bactérie doit franchir successivement. La bactérie est tout d'abord capable d'adhérer et de coloniser différents épithéliums et endothéliums (épithéliums vaginal, pulmonaire et digestif, endothélium vasculaire cérébral). Elle franchit ensuite les barrières épithéliales et endothéliales avant de finalement se disséminer dans les organes via le sang tout en échappant au système immunitaire. Cette multiplicité de lieux de colonisation ainsi que son trophisme pour une large gamme d'hôtes (bovins, poissons, Homme...) démontre une grande capacité d'adaptation de la bactérie, qui repose sur l'expression de nombreux facteurs.

#### A) Facteurs d'adhérence et de colonisation

La bactérie est capable de coloniser différents types d'épithéliums tels que les épithéliums vaginal, pulmonaire, intestinal ou encore l'endothélium vasculaire cérébral. Or l'adhérence aux cellules épithéliales de l'hôte constitue une étape critique dans le processus de colonisation. La bactérie doit, en effet, éviter d'être éliminée mécaniquement par la contraction intestinale lors de la digestion ou par les mucus vaginal ou respiratoire.

Cette adhérence aux tissus repose notamment sur l'interaction de différentes protéines de surface de la bactérie avec plusieurs composants de la matrice extracellulaire de l'hôte (Tableau 1).

- Les pili de la bactérie, et notamment l'adhésine PilA, ont été décrits comme jouant un rôle majeur dans l'adhérence. A l'heure actuelle un désaccord a lieu quant au récepteur de ces pili. Deux études ont décrit une liaison de la protéine PilA au collagène de type I (Banerjee *et al.*, 2011; Sheen *et al.*, 2011) alors qu'une autre étude n'a pas observé de liaison de l'adhésine PilA au collagène de type I mais au fibrinogène (Dramsi, Morello, *et al.*, 2012).
- La protéine FbsA se lie au fibrinogène grâce à un motif répété de 16 acides aminés (Schubert *et al.*, 2002; Rosenau *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2007). Son rôle a été montré

**Tableau 1. Principaux facteurs de virulence impliqués dans la colonisation, l'invasion et l'échappement au système immunitaire de *S. agalactiae*.**

| Facteur de virulence                                 | Cible de l'hôte                                                   | Fonction                                                                                                                | Régulation                                                              | Référence(s)                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Facteurs d'adhérence et de colonisation</b>       |                                                                   |                                                                                                                         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Pili</b>                                          | Collagène de type I, Fibrinogène                                  | Adhérence aux cellules épithéliales vaginales                                                                           | Inhibé par CovR/S via Ape1 et activé par Rga et RogB (souche dépendant) | (Banerjee <i>et al.</i> , 2011; Sheen <i>et al.</i> , 2011; Jiang <i>et al.</i> , 2012; Dramsi, Dubrac, <i>et al.</i> , 2012)                                                                                         |
| <b>FbsA</b>                                          | Fibrinogène                                                       | Adhérence aux cellules épithéliales pulmonaires et endothéliales de la barrière hémato-encéphalique                     | Réprimé par CovR/S et RovS, activé par RogB                             | (Schubert <i>et al.</i> , 2002; Gutekunst <i>et al.</i> , 2003; Schubert <i>et al.</i> , 2004; Tenenbaum <i>et al.</i> , 2005; Samen <i>et al.</i> , 2006; Rosenau <i>et al.</i> , 2007; Rivera <i>et al.</i> , 2007) |
| <b>FbsB</b>                                          | Fibrinogène                                                       | Adhérence                                                                                                               | Réprimé par MtaR                                                        | (Jacobsson, 2003; Bryan <i>et al.</i> , 2008)                                                                                                                                                                         |
| <b>BsaB/FbsC</b>                                     | Fibrinogène et laminine                                           | Adhérence aux cellules épithéliales vaginales                                                                           | Inhibé par CovR/S                                                       | (Jiang and Wessels, 2014; Buscetta <i>et al.</i> , 2016)                                                                                                                                                              |
| <b>Lmb</b>                                           | Laminine                                                          | Adhérence                                                                                                               |                                                                         | (Spellerberg <i>et al.</i> , 1999)                                                                                                                                                                                    |
| <b>PbsP</b>                                          | Plasminogène                                                      | Adhérence                                                                                                               | Inhibé par CovR/S                                                       | (Papaserghi <i>et al.</i> , 2013; Buscetta <i>et al.</i> , 2016)                                                                                                                                                      |
| <b>Srr1/Srr2</b>                                     | Fibrinogène                                                       | Adhérence aux cellules épithéliales vaginales et cervicales                                                             | <i>srr1</i> activé par Rga                                              | (Mistou <i>et al.</i> , 2009; Sheen <i>et al.</i> , 2011; Seo <i>et al.</i> , 2013; Wang <i>et al.</i> , 2014; Six <i>et al.</i> , 2015)                                                                              |
| <b>BibA/HvgA</b>                                     |                                                                   | Adhérence aux cellules épithéliales cervicales, intestinales et endothéliales de la barrière hémato-encéphalique        | Inhibé par CovR/S                                                       | (Tazi <i>et al.</i> , 2010; Di Palo <i>et al.</i> , 2013)                                                                                                                                                             |
| <b>Facteurs d'invasion</b>                           |                                                                   |                                                                                                                         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Protéine C <math>\alpha</math></b>                | Glycosaminoglycanes de surface des cellules de l'hôte             | Invasion des cellules épithéliales cervicales                                                                           | Non déterminé                                                           | (Bolduc <i>et al.</i> , 2002; Baron <i>et al.</i> , 2007)                                                                                                                                                             |
| <b>Facteur CAMP</b>                                  | Membrane cellulaire, Protéines à ancre GPI                        | Formation de pores membranaires                                                                                         | Activé par CovR/S et inhibé par Stk1 via CovR/S                         | (Lang and Palmer, 2003; Lamy <i>et al.</i> , 2004; Jiang <i>et al.</i> , 2005; Rajagopal <i>et al.</i> , 2006; Lin <i>et al.</i> , 2009)                                                                              |
| <b>Pigment hémolytique</b>                           |                                                                   | Invasion des cellules épithéliales amniotiques                                                                          | Inhibé par CovR/S et activé par Stk1 via CovR/S                         | (Pritzlaff <i>et al.</i> , 2001; Lamy <i>et al.</i> , 2004; Jiang <i>et al.</i> , 2005; Rajagopal <i>et al.</i> , 2006; Whidbey <i>et al.</i> , 2013)                                                                 |
| <b>Lmb</b>                                           |                                                                   | Invasion des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique                                                  |                                                                         | (Tenenbaum <i>et al.</i> , 2007)                                                                                                                                                                                      |
| <b>BibA/HvgA</b>                                     |                                                                   | Invasion des cellules épithéliales intestinales et endothéliales de la barrière hémato-encéphalique                     | Inhibé par CovR/S                                                       | (Tazi <i>et al.</i> , 2010; Di Palo <i>et al.</i> , 2013)                                                                                                                                                             |
| <b>FbsB</b>                                          | Fibrinogène                                                       | Invasion des cellules épithéliales pulmonaires                                                                          | Réprimé par MtaR                                                        | (Gutekunst <i>et al.</i> , 2004; Bryan <i>et al.</i> , 2008)                                                                                                                                                          |
| <b>Facteurs d'échappement au système immunitaire</b> |                                                                   |                                                                                                                         |                                                                         |                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Capsule</b>                                       | Siglecs (Lectines de type immunoglobuline liant l'acide-sialique) | Blocage de la signalisation induite par les Siglecs au niveau des cellules épithéliales amniotiques et des neutrophiles | Inhibition par RogB et activation par CovR/S souche dépendant           | (Gutekunst <i>et al.</i> , 2003; Lamy <i>et al.</i> , 2004; Soriani <i>et al.</i> , 2006; Ali <i>et al.</i> , 2014)                                                                                                   |
| <b>ScpB</b>                                          | C5a du complément                                                 | Inhibition du recrutement des neutrophiles par clivage du C5a du complément                                             | Inhibé par CovR/S et RgfC/A souche dépendant                            | (Bohnsack <i>et al.</i> , 1991; Spellerberg <i>et al.</i> , 2002; Beckmann <i>et al.</i> , 2002; Lamy <i>et al.</i> , 2004; Jiang <i>et al.</i> , 2005)                                                               |
| <b>Sht</b>                                           | Facteur H                                                         | Inhibition du dépôt de C3 à la surface bactérienne                                                                      |                                                                         | (Maruvada <i>et al.</i> , 2009)                                                                                                                                                                                       |
| <b>BibA/HvgA</b>                                     | C4bp                                                              | Liaison C4bp                                                                                                            | Inhibé par CovR/S                                                       | (Santi <i>et al.</i> , 2007; Di Palo <i>et al.</i> , 2013)                                                                                                                                                            |
| <b>SodA</b>                                          | Macrophages                                                       | Résistance au stress oxydatif                                                                                           | Activé par RovS                                                         | (Poyart <i>et al.</i> , 2001; Samen <i>et al.</i> , 2006)                                                                                                                                                             |
| <b>HylB</b>                                          | Acide Hyaluronique                                                | Blocage du signal des TLR2/4                                                                                            | Non déterminé                                                           | (Baker and Pritchard, 2000; Kolar <i>et al.</i> , 2015; Vornhagen <i>et al.</i> , 2016)                                                                                                                               |
| <b>Pigment hémolytique</b>                           | neutrophiles, mastocytes et macrophages                           | Résistance aux neutrophiles, dégranulation des mastocytes, pyroptose                                                    | Inhibé par CovR/S et activé par Stk1 via CovR/S                         | (Lamy <i>et al.</i> , 2004; Liu <i>et al.</i> , 2004; Jiang <i>et al.</i> , 2005; Rajagopal <i>et al.</i> , 2006)                                                                                                     |
| <b>FbsA</b>                                          |                                                                   | Résistance à l'opsonisation                                                                                             | Réprimé par CovR/S et RovS, activé par RogB                             | (Schubert <i>et al.</i> , 2002; Gutekunst <i>et al.</i> , 2003; Samen <i>et al.</i> , 2006; Pierno <i>et al.</i> , 2006)                                                                                              |

dans l'adhérence aux cellules épithéliales pulmonaires ainsi qu'aux cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Schubert *et al.*, 2004; Tenenbaum *et al.*, 2005). La protéine FbsB joue également un rôle dans la liaison au fibrinogène et dans l'adhérence aux cellules épithéliales pulmonaires mais avec un rôle mineur par rapport à celui joué par la protéine FbsA (Jacobsson, 2003; Gutekunst *et al.*, 2004; Rosenau *et al.*, 2007).

- La protéine extracellulaire BsaB, nommée également FbsC, se lie à la laminine et au fibrinogène de l'hôte permettant l'adhérence à l'épithélium vaginal et la formation de biofilms (Jiang and Wessels, 2014; Buscetta *et al.*, 2014).
- La lipoprotéine Lmb a été décrite comme jouant un rôle dans la liaison à la laminine. Aucun site responsable de la liaison à la laminine n'a été mis en évidence mais une homologie d'une région de la protéine avec la chaîne B2 de la laminine humaine a été observée (Spellerberg *et al.*, 1999).
- La protéine PbsP a été identifiée comme une protéine majeure de liaison au plasminogène, liaison assurée par trois domaines riches en lysine, SSURE-1, SSURE-2 (« Streptococcal Surface Repeats ») et MK-rich (« methionine and lysine-rich region ») (Buscetta *et al.*, 2016).
- Les glycoprotéines Srr1 et Srr2 (serine-rich repeat) contribuent à la colonisation vaginale par *S. agalactiae* dans un modèle de colonisation vaginale murin en fixant le fibrinogène par un mécanisme de « dock, lock and latch » (Sheen *et al.*, 2011; Seo *et al.*, 2013).
- La protéine HvgA, spécifique des souches du ST17, permet l'adhérence aux cellules épithéliales intestinales et cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique en se fixant à un récepteur de l'hôte non encore identifié (Tazi *et al.*, 2010).

## B) Facteurs d'invasion des tissus de l'hôte

Une fois fixée *S. agalactiae* est amenée à franchir différentes barrières épithéliales (pulmonaire et intestinale) et endothéliales (barrière hémato-encéphalique). Plusieurs voies de passage de la bactérie ont été décrites et pourraient co-exister : la voie intracellulaire, la voie paracellulaire (avec ou sans modification des jonctions intercellulaires) ou la destruction des barrières par l'action de facteurs bactériens ou suite à la réponse inflammatoire induite par la bactérie (Tableau 1).



Une des premières évidences d'un passage de la bactérie par voie intracellulaire s'est faite par l'observation de la bactérie en microscopie électronique. Cette observation a montré que la bactérie peut franchir des couches unicellulaires de chorion, sans provoquer de désorganisation des jonctions intercellulaires, par un mécanisme de transcytose (Winram *et al.*, 1998). La bactérie utilise également un autre mécanisme d'endocytose pour son passage par la voie intracellulaire. La liaison de la protéine C  $\alpha$  de la bactérie aux glycosaminoglycanes associés aux cellules épithéliales, induit l'internalisation de la bactérie dans une vacuole par un mécanisme dépendant de l'actine, permettant son passage par voie intracellulaire (Baron *et al.*, 2004; Baron *et al.*, 2007).

Un passage paracellulaire de la bactérie a été suggéré suite à l'étude de l'invasion des cellules épithéliales cervicales et intestinales. Lors de cette étude *S. agalactiae* a en effet été retrouvée au niveau des jonctions cellulaires (Soriani *et al.*, 2006). De plus, il a été montré que la protéine C  $\alpha$  en se liant à la sous-unité  $\alpha 1$  de l'intégrine  $\alpha 1/\beta 1$  favoriserait ce passage par la voie paracellulaire (Bolduc *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2007; Bolduc and Madoff, 2007).

D'autres facteurs vont permettre l'invasion de la bactérie par lyse cellulaire : le facteur CAMP s'oligomérisse pour former des pores au niveau de la membrane cellulaire (Lang and Palmer, 2003). Le pigment hémolytique CylE par son action cytolitique permet l'invasion des cellules épithéliales amniotiques et du chorion (Whidbey *et al.*, 2013).

Enfin, certaines protéines qui ont été décrites comme ayant un rôle dans l'adhérence semblent également être impliquées dans l'invasion. Le mécanisme d'entrée et leur cible reste cependant non déterminé. Ainsi la protéine Lmb, qui se lie à la laminine de l'hôte, favoriserait l'invasion des cellules de la barrière hémato-encéphalique (Spellerberg *et al.*, 1999; Tenenbaum *et al.*, 2007). Le facteur HvgA est impliqué dans l'adhérence et l'invasion des cellules épithéliales intestinales et des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Tazi *et al.*, 2010). La protéine FbsB permet l'adhérence mais également l'invasion aux cellules épithéliales pulmonaires (Gutekunst *et al.*, 2004).

### C) Facteurs d'échappement au système immunitaire

Suite au franchissement des barrières épithéliales par *S. agalactiae*, une large réponse immunitaire est activée pour éliminer l'infection. Au niveau du vagin la réponse immunitaire innée fait appel notamment aux neutrophiles, mastocytes et macrophages (Patras *et al.*, 2013;



Carey *et al.*, 2014; Gendrin *et al.*, 2015; Patras, Rösler, *et al.*, 2015). Plusieurs chimiokines et cytokines pro-inflammatoires ont également été identifiées comme réduisant la colonisation vaginale par *S. agalactiae* (Patras *et al.*, 2013; Carey *et al.*, 2014; Patras, Rösler, *et al.*, 2015). Les mécanismes de la réponse immunitaire adaptative impliquant les lymphocytes T sont pour l'instant mal connus et ne semblent pas jouer de rôle majeur dans la réponse à l'infection par *S. agalactiae* (Carey *et al.*, 2014).

Pour permettre l'échappement au système immunitaire, la bactérie exprime plusieurs facteurs de virulence agissant au niveau des défenses innées ou acquises de l'hôte (Tableau 1). Les acides sialiques de la capsule, vont interférer avec le processus d'opsonisation et atténuent la réaction inflammatoire (Ali *et al.*, 2014). D'autres facteurs interfèrent avec le processus d'opsonisation tels que la C5a peptidase ScpB, la protéine Sht ou la protéine BibA en agissant respectivement sur les composants du complément C5a, facteur H et C4bp (Bohnsack *et al.*, 1991; Chmouryguina *et al.*, 1996; Santi *et al.*, 2007; Maruvada *et al.*, 2009).

La superoxide-dismutase SodA confère une résistance au stress oxydatif, apportant à la bactérie une meilleure survie après sa phagocytose par les macrophages (Poyart *et al.*, 2001). La hyaluronidase HylB est capable de moduler la réaction immunitaire de l'hôte grâce à la dégradation de l'acide hyaluronique en disaccharides. Ces derniers en se liant aux récepteurs des TLR2 et TLR4, vont bloquer leur voie de signalisation induisant ainsi une action immunosuppressive (Kolar *et al.*, 2015).

D'autres protéines participent à la fois à l'adhérence ou l'invasion des tissus et à la résistance au système immunitaire : Le pigment hémolytique CylE responsable de la lyse des cellules épithéliales amniotiques permet de traverser le placenta mais également de résister aux espèces réactives de l'oxygène par son activité anti-oxydante (Liu *et al.*, 2004). La protéine FbsA intervient dans l'adhérence aux cellules épithéliales pulmonaires et endothéliales de la barrière hémato-encéphalique et protège la bactérie contre l'opsonisation (Schubert *et al.*, 2002; Pierno *et al.*, 2006).

#### D) Le système de régulation CovR/S

Lors du processus infectieux *S. agalactiae* est amenée à rencontrer différents environnements (épithéliums, sang, endothéliums...) dans lesquels la température, le pH, les nutriments disponibles et le niveau d'oxygène peuvent varier. La bactérie est capable de percevoir ces variations du milieu en exprimant des régulateurs qui modulent l'expression



des gènes impliqués dans le métabolisme ou la virulence. Les régulateurs des principaux facteurs de virulence sont indiqués dans le Tableau 1. Parmi les régulateurs de *S. agalactiae*, le système CovR/S est un des régulateurs centraux de la virulence (Lamy *et al.*, 2004).

Le régulateur CovR/S (« Control of virulence »), également appelé CsrR/S (« capsule synthesis regulator »), fait partie des systèmes à deux composants. Il se compose d'une protéine membranaire à fonction d'histidine kinase CovS et d'un régulateur cytoplasmique CovR. Lorsque la protéine CovS perçoit un stimulus extérieur elle active par phosphorylation la protéine CovR qui va venir se fixer à son domaine de liaison à l'ADN et réguler ainsi l'expression des gènes cibles.

Ce système régule environ 7% du génome de *S. agalactiae*. Parmi ces gènes on retrouve des gènes codant des systèmes de transport de peptides, d'acides aminés, de sucres ou de métaux ainsi que des gènes de virulence (Tableau 1) (Lamy *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005; Santi *et al.*, 2009). Un des signaux activant le système CovR/S qui a été suggéré est le pH. Une étude a en effet observé que le passage de la bactérie d'un milieu acide à un milieu neutre induisait la surexpression des facteurs de virulence régulés par le système CovR/S (Santi *et al.*, 2009). Ce régulateur participerait ainsi à l'adaptation de la bactérie lors de son passage du vagin (pH 4,5) au liquide amniotique ou aux poumons du fœtus (pH 7).

## E) Les nutriments essentiels : l'exemple des ions métalliques

En plus de facteurs directement impliqués dans la virulence, la bactérie doit être capable d'importer les nutriments dont elle a besoin pour se développer et qui vont indirectement permettre sa virulence. Parmi les nutriments essentiels on trouve les ions métalliques. Chez les bactéries, les besoins en fer ont été les plus étudiés. Le fer est en effet un cofacteur de nombreuses enzymes impliquées dans divers processus essentiels comme la voie des pentoses phosphates, la réplication de l'ADN ou la transcription (Andrews *et al.*, 2003). Selon l'organe considéré, la disponibilité en métaux, dont le fer, peut être très variable et influencer ainsi sur la virulence de la bactérie (Palmer and Skaar, 2016). Le fer a, en effet, été montré comme nécessaire pour la virulence de nombreuses bactéries comme *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* ou *Bacillus anthracis* (Choby and Skaar, 2016).

Chez *S. agalactiae* le fer active notamment la chaîne respiratoire améliorant sa survie dans un milieu aérobie ainsi que sa virulence dans un modèle murin de septicémie (Yamamoto *et*



*al.*, 2006). Une autre étude a montré que les besoins en fer de la bactérie pour sa virulence sont dépendants des organes dans lesquels elle se trouve (Joubert *et al.*, 2017).

De plus, l'étude du transporteur de manganèse et fer MtsBCA de *S. agalactiae* a montré que non seulement le fer mais aussi le manganèse sont essentiels au développement de la bactérie *in vitro* dans un milieu riche où la concentration en métaux est contrôlée (Bray *et al.*, 2009). De la même manière la caractérisation d'un transporteur de fer et manganèse de la famille NRAMP (Natural Resistance-Associated Macrophages Protein) a montré l'importance de ces métaux pour la résistance au stress oxydatif ainsi que la survie de la bactérie à pH acide (Shabayek *et al.*, 2016). Cependant, parmi les ions métalliques que *S. agalactiae* pourrait utiliser, peu d'études font référence au zinc. Or, comme développé dans le paragraphe suivant, le zinc est un métal particulièrement important chez les bactéries. L'étude de son implication dans la physiologie de *S. agalactiae* ouvre donc des perspectives intéressantes sur la compréhension de l'adaptation et la virulence de la bactérie.



## II) Le zinc, un élément-trace essentiel

### 1) Place du zinc chez les organismes vivants

#### A) Le zinc chez l'Homme

Le zinc est un élément essentiel pour tous les organismes vivants. Chez l'Homme, le zinc a été estimé comme interagissant avec 10% du protéome ce qui en fait, après le fer, le deuxième élément trace le plus abondant dans le corps. Plus de 300 protéines ont été décrites comme ayant besoin du zinc pour maintenir leur structure 3D ou pour leur activité catalytique (Whittaker, 1998; Zalewski *et al.*, 2005). Parmi ces protéines, la classe la plus abondante est celle des facteurs de transcription dont la plupart possèdent un motif à doigts de zinc avec deux motifs principaux de fixation du zinc, Cys<sub>4</sub> et Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub>. Le reste des protéines fixant le zinc est composé principalement d'enzymes avec les classes des hydrolases (peptidases et phosphatases) et des transférases (kinases) mais inclue également d'autres types de protéines comme les protéines de transport d'ions avec les canaux potassiques voltage dépendant (Andreini *et al.*, 2006a).

La quantité de zinc libre dans la cellule est très faible, de l'ordre du picomolaire (Outten and O'Halloran, 2001; Colvin *et al.*, 2010). De plus, la concentration de zinc dans le corps humain est très variable selon le tissu ou l'organe considéré. Dans le plasma elle varie entre 12 et 16  $\mu\text{M}$  dont la majorité est liée aux protéines plasmatiques comme l'albumine, l'alpha-2 macroglobuline et la transferrine (Rink, 2000). Le liquide céphalo-rachidien et les alvéoles contiennent 2,3 et 1,5  $\mu\text{M}$  de zinc respectivement (Meret and Henkin, 1971; Harlyk *et al.*, 1997).

Le zinc tient une place importante dans le fonctionnement du système immunitaire. Une défaillance dans l'homéostasie du zinc perturbe de manière critique les réponses innée et adaptative de l'hôte envers le pathogène (Rink, 2000; Andreini *et al.*, 2006a). Une déficience ou une surcharge de zinc entraîne ou contribue à de nombreuses pathologies avec des degrés d'importance divers comme des diarrhées, des infections respiratoires, une lymphopénie, une

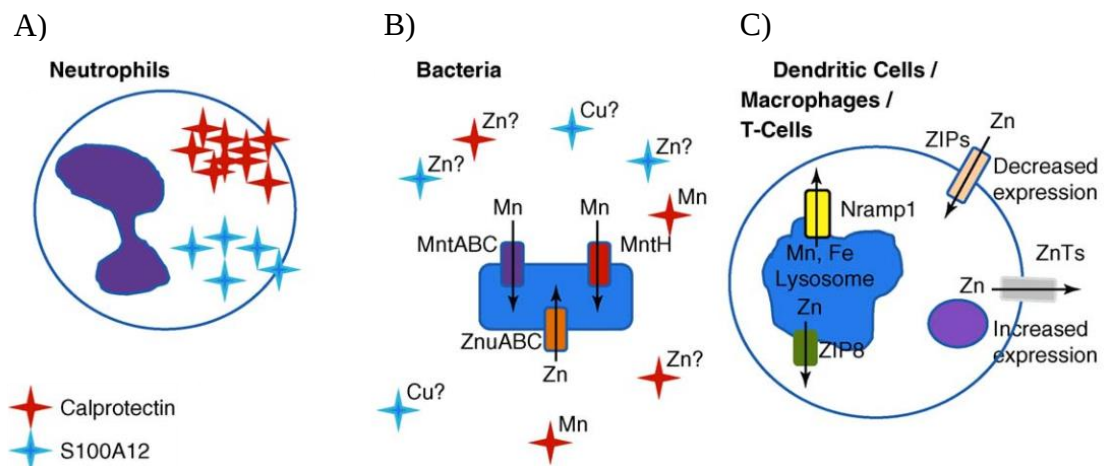


perturbation des réponses immunitaires cellulaires et médiées par les anticorps ou la maladie d'Alzheimer (Kawahara *et al.*, 1997; Fischer Walker and Black, 2004; King *et al.*, 2005).

## B) Le zinc chez les bactéries

Le pourcentage de protéines liant le zinc chez les bactéries est moins important que chez les eucaryotes (entre 5 et 6% du protéome). Ceci peut s'expliquer notamment par le très faible nombre de facteurs de transcription à motifs à doigts de zinc. Contrairement aux eucaryotes, le zinc est principalement utilisé chez les bactéries comme cofacteur de métalloenzymes. Parmi ces métalloenzymes, les lactamases, les métallophosphatases et les peptidases sont les plus représentées (Outten and O'Halloran, 2001; Andreini *et al.*, 2006b; Jacobsen *et al.*, 2011; Begg *et al.*, 2015). Le zinc est également retrouvé au niveau de facteurs de transcription ou entrant dans la structure de certaines protéines comme les protéines ribosomales. Une étude de 2011 a montré également qu'un peu plus de 200 protéines de *Streptococcus pneumoniae* (8,7% de son protéome) contiennent du zinc (Sun *et al.*, 2011). De par le nombre et la diversité des protéines décrites comme nécessitant du zinc, ce métal est ainsi impliqué indirectement dans de nombreuses fonctions essentielles pour la bactérie comme la transcription, la fermentation alcoolique, la synthèse de la paroi ou la virulence. Les protéines suivantes ont en effet été caractérisées comme fixant le zinc : des protéines ribosomales, l'alcool déshydrogénase, la phosphorylcholine estérase et diverses métalloprotéinases (Panina *et al.*, 2003; Blue *et al.*, 2003; Lagartera *et al.*, 2005; Shafeeq *et al.*, 2011).

Si le zinc est un élément essentiel, un excès de zinc dans la bactérie peut néanmoins être nocif. *S. pneumoniae* montre par exemple, un retard de croissance lorsque la concentration de zinc du milieu dépasse 300  $\mu$ M (Plumtre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014). Cette toxicité s'explique notamment par un effet de compétition avec d'autres métaux. En effet, à haute concentration le zinc peut se fixer sur des sites actifs d'enzymes utilisant d'autres métaux en cofacteur (Xu and Imlay, 2012; Eijkelkamp *et al.*, 2014). Ainsi, chez *S. pneumoniae*, un excès de zinc peut gêner l'import de manganèse par le transporteur PsaCBA, le zinc venant interférer en se fixant au niveau de la protéine fixatrice de manganèse PsaA. Le manganèse ayant un rôle antioxydant, la bactérie devient ainsi sensible au stress oxydatif (McDevitt *et al.*, 2011; Eijkelkamp *et al.*, 2014).



**Figure 8. Représentation schématique de l'immunité nutritionnelle pour les métaux de transition (sauf le fer) lors d'une infection bactérienne.** (D'après Kehl-Fie and Skaar, 2010)

Lors d'une infection bactérienne, les cellules immunitaires recrutées mettent en place l'immunité nutritionnelle. Ce mécanisme consiste à diminuer la concentration extracellulaire et intracellulaire des métaux de transition au niveau du site de l'infection.

A) Les neutrophiles sécrètent dans le milieu extracellulaire une protéine chélatrice de zinc et manganèse, la calprotectine, ainsi que la protéine S100A12 chélatrice de zinc et cuivre.

B) Pour faire face à cette séquestration de métaux, la bactérie exprime des systèmes d'import de métaux de haute affinité.

C) Les cellules dendritiques activées vont surexprimer leur exportateur de zinc ZnT et sous-exprimer leur importateur de zinc ZIP afin de diminuer la quantité de zinc intracellulaire. Les lymphocytes T et les macrophages activés expriment un exportateur ZIP8 au niveau de leur lysosome permettant de le carencer en zinc. Les macrophages expriment également une protéine Nramp1 (Natural resistance-associated macrophage protein 1) assurant la sortie de manganèse du lysosome.

### C) Utilisation du zinc comme mécanisme de défense contre les bactéries

Les métaux de transition comme le fer, le zinc, le manganèse et le cuivre interviennent dans de nombreuses fonctions biologiques en servant de cofacteurs enzymatiques. Pour lutter contre les infections bactériennes, les vertébrés jouent sur ce besoin en séquestrant les métaux disponibles au niveau du site de l'infection. Ce mécanisme est nommé l'immunité nutritionnelle. Lors d'infections, l'organisme peut cependant appliquer le mécanisme inverse pour éliminer les bactéries consistant à élever la concentration des métaux de transition à un niveau toxique pour les bactéries.

#### a) L'immunité nutritionnelle

La séquestration des métaux par l'organisme se réalise à la fois dans le milieu extracellulaire au niveau du site de l'infection mais également à l'intérieur des cellules immunitaires recrutées. La carence en fer induite par l'hôte lors du processus infectieux est un des mécanismes le mieux caractérisé. Le fer peut être séquestré par des protéines de forte affinité comme la transferrine et la ferritine ou être gardé à l'écart des bactéries dans des cellules par exemple via l'hème de l'hémoglobine transportée dans les érythrocytes (Ma *et al.*, 2015).

Ce mécanisme d'immunité nutritionnelle a également lieu pour le zinc. Dans ce mécanisme, le zinc est redistribué à différents organes comme le foie permettant de diminuer le taux de zinc dans le sang. Ce processus se réalise grâce à la surexpression, induite par l'interleukine 6, du transporteur ZIP14 assurant l'import de zinc dans les hépatocytes (Liuzzi *et al.*, 2005).

La rétention de zinc au niveau du milieu extracellulaire du site de l'infection est assurée par des protéines de haute affinité pour le zinc, la famille des protéines S100. Lors d'une infection les neutrophiles recrutés sécrètent notamment les calprotectines (Figure 8). Ces protéines correspondent à un hétérodimère des protéines S100A8 et S100A9 et constituent entre 40 et 50% des protéines cytoplasmiques des neutrophiles (Gebhardt *et al.*, 2006). Les calprotectines possèdent deux motifs différents permettant de fixer le zinc ou le manganèse (Brodersen *et al.*, 1999; Moroz *et al.*, 2003; Moroz *et al.*, 2009). Les neutrophiles peuvent également libérer la protéine S100A12 (calgranuline C) pour capturer le zinc et le cuivre (Moroz *et al.*, 2003; Pietzsch and Hoppmann, 2009; Moroz *et al.*, 2009).

Au niveau du site d'infection, d'autres cellules immunitaires sont recrutées : des macrophages, des lymphocytes T activés et des cellules dendritiques. Pour faciliter leur



action, ces cellules ayant phagocyté le pathogène diminuent la quantité de zinc au niveau de leur cytoplasme ou de leur lysosome pour aider à l'élimination de la bactérie. Une fois activés les macrophages et lymphocytes vont en effet surexprimer l'exportateur de zinc ZIP8 au niveau de leur lysosome (Begum *et al.*, 2002; Aydemir *et al.*, 2009). Les cellules dendritiques activées vont diminuer leur concentration intracellulaire de zinc en diminuant l'expression de leur importateur de zinc de la famille ZIP et en augmentant l'expression de leur exportateur de zinc ZnT (Figure 8).

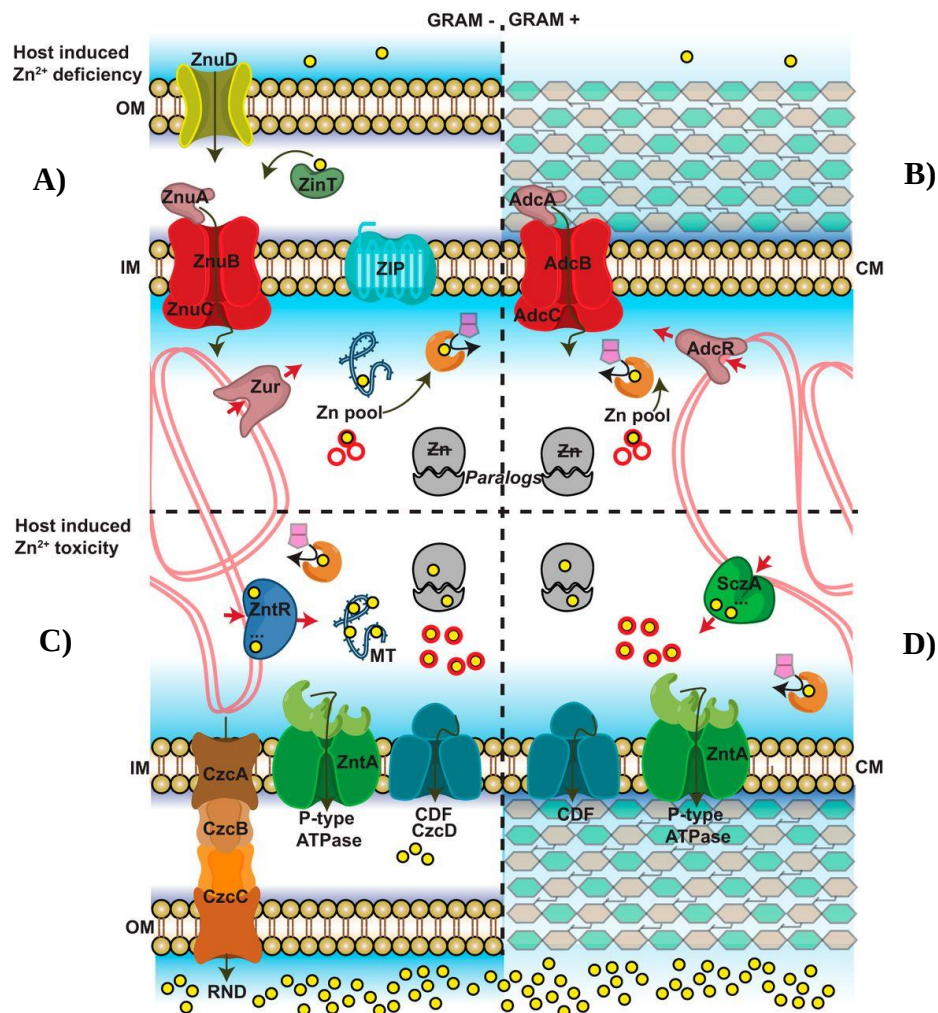
### **b) La toxicité de zinc**

Récemment il a été mis en évidence que l'hôte pouvait utiliser le zinc à des concentrations toxiques comme action antimicrobienne. Le taux de zinc a notamment été mesuré par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS) au sein de différents organes de souris infectées depuis 48h par *S. pneumoniae* et comparé au taux de zinc retrouvé chez des souris non infectées. Chez les souris infectées, le taux de zinc est augmenté de 2 à 24 fois selon le compartiment du corps donnant notamment des concentrations de 100 à 120  $\mu\text{M}$  de zinc dans les poumons et le cerveau et jusqu'à 650  $\mu\text{M}$  dans le sérum (McDevitt *et al.*, 2011).

Au niveau intracellulaire, au lieu d'induire une carence de zinc au niveau de leur phagosome, les macrophages peuvent y accumuler une quantité toxique de zinc (Djoko *et al.*, 2015). L'entrée du zinc dans ces cellules est en effet assurée par la famille de transporteurs SLC39A (Stafford *et al.*, 2013). Le zinc est ensuite emprisonné au niveau de vésicules qui fusionneront avec le phagosome pour libérer leur contenu (Kapetanovic *et al.*, 2016). De même, il a été observé que les neutrophiles ayant phagocyté *S. pyogenes* accumulent du zinc pour aider à l'élimination du pathogène (Ong *et al.*, 2014).

Deux stratégies antimicrobiennes jouant sur la concentration de zinc ont ainsi été mises en évidence. Le mécanisme permettant de passer à une carence ou une toxicité de zinc pour éliminer la bactérie est encore mal connu. Il semble dépendre du pathogène, de l'organe ou du type cellulaire infecté ainsi que de l'étape du cycle infectieux (Hood and Skaar, 2012; Djoko *et al.*, 2015).

Au cours de l'infection, les bactéries sont ainsi amenées à être en présence de différentes concentrations de zinc. L'homéostasie du zinc chez les bactéries pathogènes joue donc un rôle important dans leur survie, leur pathogénicité et leur virulence chez l'hôte. Pour assurer une



**Figure 9. Représentation schématique de la réponse des bactéries à Gram – (A et C) ou à Gram + (B et D) suite à une carence en zinc (A et B) ou à une toxicité en zinc (C et D) induites par l’hôte. (D’après Capdevila *et al.*, 2016)**

Chez les bactéries l’homéostasie du zinc (cercle jaune) est généralement sous le contrôle d’un couple de régulateurs dépendant du zinc comprenant un régulateur de l’import du zinc (protéines Zur ou AdcR) et un régulateur de l’export du zinc (protéines ZntR ou SczA).

Lors d’une carence de zinc (A et B), les régulateurs Zur ou AdcR vont permettre l’expression de transporteurs de haute affinité (ZnuD, ZnuCBA et AdcCBA) et de faible affinité (ZIP). Des métallochaperonnes chélatrices de zinc (croissant orange), comme la protéine ZinT, viennent en aide à d’autres protéines ou au transporteur ABC dans la capture de zinc, en redistribuant le zinc qu’elles ont fixé. En cas de carence extrême, des protéines ribosomales paralogues indépendantes du zinc remplacent celles dépendantes du zinc.

En excès de zinc (C et D), les régulateurs ZntR et SczA permettent l’expression de transporteurs d’efflux du zinc des familles RND, CDF ou ATPase-P. Les métallochaperonnes et de petites molécules (cercles rouges) comme les acides aminés, les acides organiques, le bacillithiol ou les métallothionéines (ruban bleu) vont également fixer le surplus de zinc libre du cytoplasme.

IM, Membrane interne; OM, Membrane externe; CM, Membrane cytoplasmique ; MT, méthallothionéine ; CDF, « Cation Diffusion Facilitator » ; RND, « Resistance Nodulation cell Division »

concentration intracellulaire optimale de zinc les bactéries sont dotées de systèmes d'import et d'efflux du zinc.

## 2) Le maintien de l'homéostasie du zinc chez les bactéries

Pour importer spécifiquement le zinc dont elles ont besoin ou l'exporter lorsqu'il est en excès, les bactéries utilisent des systèmes de transport actif de haute affinité. L'énergie de ces transporteurs est fournie par :

- i) l'hydrolyse de l'ATP présent au niveau du cytoplasme. Les transporteurs de type ABC (ATP-Binding-Cassette) et les transporteurs à ATPases de type P sont par exemple utilisés par les bactéries.
- ii) l'énergie obtenue par le passage couplé du zinc avec des protons ou d'autres ions à travers la membrane. Parmi ces systèmes, les bactéries utilisent notamment les transporteurs de la famille des facilitateurs de la diffusion cationique (CDF) ou les transporteurs à pompes d'efflux de la famille RND (Résistance/Nodulation/Division cellulaire).

### A) Les systèmes d'import de zinc

Plusieurs types d'importateurs de zinc ont été décrits chez les bactéries à Gram- dont un transporteur de faible affinité (famille des transporteurs ZIP) et deux transporteurs de forte affinité (un transporteur de la famille TonB-dépendant et un transporteur de la famille des transporteurs ABC) (Figure 9A). Chez les bactéries à Gram +, seuls des transporteurs de la famille ABC ont été décrits pour l'import du zinc (Figure 9B).

La protéine ZupT appartient à la famille des transporteurs de faible affinité ZIP et utilise la force proton motrice comme énergie au fonctionnement du système (Figure 9A). Cette perméase a été décrite chez *E. coli* comme assurant le transport de plusieurs cations métalliques (le fer, le zinc et le cobalt) mais avec une plus grande spécificité pour le zinc (Grass *et al.*, 2002; Grass *et al.*, 2005).

Le transporteur de haute affinité ZnuD initialement découvert chez *Neisseria meningitidis* permet l'import de zinc au niveau de l'espace périplasmique (Figure 9A) (Stork *et al.*, 2010;



Calmettes *et al.*, 2015). Ce transporteur appartient à la famille des récepteurs TonB-dépendant c'est-à-dire nécessitant l'énergie fournie par le complexe TonB/ExbB/ExbD situé au niveau de la membrane interne. Dans ce système, le passage du substrat dans l'espace périplasmique est couplé à un gradient de protons au niveau de la membrane interne (Noinaj *et al.*, 2010).

Les transporteurs de type ABC sont des transporteurs tripartite de haute affinité retrouvés chez les bactéries à Gram + et - (Dintilhac *et al.*, 1997; Gabbianelli *et al.*, 2011; Cerasi *et al.*, 2013). Le transporteur ABC, appelé ZnuCBA chez les bactéries à Gram- et AdcCBA chez les bactéries à Gram+, se compose d'une protéine de fixation du substrat (ZnuA ou AdcA), d'une protéine transmembranaire (ZnuB ou AdcB) permettant le passage du substrat à travers la membrane plasmique et d'une ATPase (ZnuC ou AdcC) fournissant l'énergie nécessaire au fonctionnement du transporteur (Figure 9A et B). La structure et le mécanisme de fonctionnement de ce type de transporteur sont détaillés un peu plus loin. Chez certaines bactéries Gram – comme *Escherichia coli*, en cas de carence extrême, le transporteur ABC ZnuCBA nécessite une protéine auxiliaire de capture du zinc, la métallochaperonne périplasmique nommée ZinT (ou YodA) (Figure 9A) (Graham *et al.*, 2009; Petrarca *et al.*, 2010). Les métallochaperonnes sont des protéines chélatrices assurant le transport d'un métal à travers un compartiment bactérien (périplasma, cytoplasme) et constituent un réservoir de métal disponible pour les protéines en ayant besoin. L'analyse cristallographique de la protéine ZinT a révélé qu'elle possède des motifs de fixation au zinc communs avec les protéines des différents transporteurs ABC de zinc dont une boucle riche en histidine en N-terminal retrouvée chez ZnuA (transporteur ZnuCBA) et une triade d'histidine en C-terminal retrouvée chez AdcA (transporteur AdcCBA) (Yatsunyk *et al.*, 2008; Petrarca *et al.*, 2010; Plumptre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014).

## B) Les systèmes d'export de zinc

Différents exportateurs de zinc ont été décrits chez les bactéries dont les principaux sont les ATPases de type P, les transporteurs de la famille des facilitateurs de la diffusion cationique (CDF) et les transporteurs à pompes d'efflux de la famille RND (Résistance/Nodulation/Division cellulaire) (Figure 9C et D). Selon les bactéries plusieurs systèmes d'export du zinc peuvent être présents.

Les ATPases-P sont constituées de 6 ou 8 segments transmembranaires formant un pore pour le passage du zinc à travers la membrane plasmique. L'énergie nécessaire pour le



fonctionnement de ce système est fournie par l'hydrolyse d'ATP au niveau d'une boucle cytoplasmique située entre les domaines transmembranaires six et sept. Un motif de fixation du zinc est retrouvé au niveau des segments transmembranaires six à huit. Ce motif se compose d'une séquence CPC (Cystéine-Proline-Cystéine) au niveau du sixième domaine transmembranaire, d'une lysine au niveau du septième domaine transmembranaire, d'une asparagine et d'une glycine au niveau du huitième domaine transmembranaire (Argüello *et al.*, 2007). Chez les bactéries à Gram + et -, les ATPases-P transportant le zinc ont été nommées ZntA (Figure 9C et D) (Beard *et al.*, 1997; Xiong and Jayaswal, 1998). Chez *E. coli*, la protéine ZntA lie le zinc via un motif CxxC situé au niveau N-terminal de la protéine (Banci *et al.*, 2002). Malgré la spécificité pour leur substrat ces pompes peuvent également transporter d'autres métaux. Les ATPases de zinc sont capables de transporter du cadmium et les ATPases de cobalt peuvent transporter du cadmium et du zinc (Argüello *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2017).

Les transporteurs CDF constituent une large famille de transporteurs de métaux divalents et jouent un rôle important dans l'homéostasie intracellulaire des métaux chez les trois domaines du vivant (Kolaj-Robin *et al.*, 2015). Ces transporteurs sont généralement composés de six domaines transmembranaires. Le transport du substrat se réalise contre un gradient électrochimique à travers la membrane plasmique. Pour leur fonctionnement, ces transporteurs utilisent l'énergie fournie par le passage d'un co-substrat dans le sens de son gradient, que ce soit en symport ou antiport (Haney *et al.*, 2005). Chez *E. coli*, deux CDF d'export du zinc ont été identifiés YiiP et ZitB (ou CzcD) (Figure 9C) (Grass *et al.*, 2001; Lu and Fu, 2007). Le système YiiP est un des transporteurs les mieux caractérisés dans la famille des CDF. Son mécanisme de fonctionnement consiste en une alternance de transport entre le zinc et les protons qui conduit à un changement de conformation permettant le déplacement du zinc à travers la membrane (Coudray *et al.*, 2013). Ce système transporte avec la même efficacité le zinc et le cadmium et a également été décrit comme permettant l'efflux de fer (Grass, Otto, *et al.*, 2005; Hoch *et al.*, 2012). Chez les bactéries Gram +, l'efflux du zinc se réalise par le transporteur CzcD (Figure 9D) (Kloosterman *et al.*, 2007). Chez *S. pneumoniae*, ce transporteur représente le principal système de résistance à l'excès de zinc. Contrairement au même système présent chez *E. coli*, il assure l'efflux d'un seul métal. Un motif permettant cette spécificité a été mis en évidence au niveau du domaine transmembranaire du transporteur.



Il se compose de deux histidines et deux acides aspartiques (HD-HD) (Martin and Giedroc, 2016). Chez *E. coli* ce motif ne possède qu'une histidine (DD-HD) expliquant la moins grande spécificité du transporteur pour le zinc. Chez *S. agalactiae* un homologue de la protéine CzcD de *S. pneumoniae* est présent avec 51% d'identité protéique (avec le motif HD-HD) mais n'a pas été étudié.

Le système d'efflux du zinc CzcCBA, retrouvé chez les bactéries Gram -, fait partie des transporteurs à pompes d'efflux de la famille RND (Figure 9C). Il permet le passage du zinc du périplasme vers l'extérieur de la cellule ou du cytoplasme directement vers le milieu extérieur. Cet antiport zinc-proton, utilisant comme énergie la force protomotrice, est un système à trois composants (Nies, 1995). La pompe d'efflux CzcA de la famille RND, est localisée au niveau de la membrane interne et se prolonge dans le périplasme. Elle est associée à la porine CzcC de la famille OMF (Outer Membrane Factor) insérée dans la membrane externe et présentant également un long prolongement périplasmique. La troisième protéine CzcB de la famille MFP (Membrane Fusion Protein) permet de consolider le lien au niveau du périplasme entre les deux protéines précédentes. Chez *Ralstonia metallidurans*, ce système a notamment été associé à la résistance à des concentrations toxiques des métaux zinc, cobalt, cadmium et nickel (Saier *et al.*, 1994; Mergeay *et al.*, 2003).

Le zinc ne pouvant être synthétisé ou dégradé, son homéostasie est donc assurée par un ensemble de processus permettant un équilibre entre l'entrée et la sortie de ce métal de la bactérie. L'expression des différents acteurs de cet équilibre doit donc être finement régulée.

### C) Régulation des transporteurs de zinc

En réponse à un excès ou une carence de zinc les bactéries vont exprimer un ensemble de gènes sous le contrôle de facteurs de transcription, dépendant du zinc, nommés également protéines métallorégulatrices. La régulation du zinc est principalement assurée par quatre familles de métallorégulateurs : Fur, MarR pour la régulation de l'import du zinc et MerR, TetR pour la régulation de l'export du zinc (Figure 10).

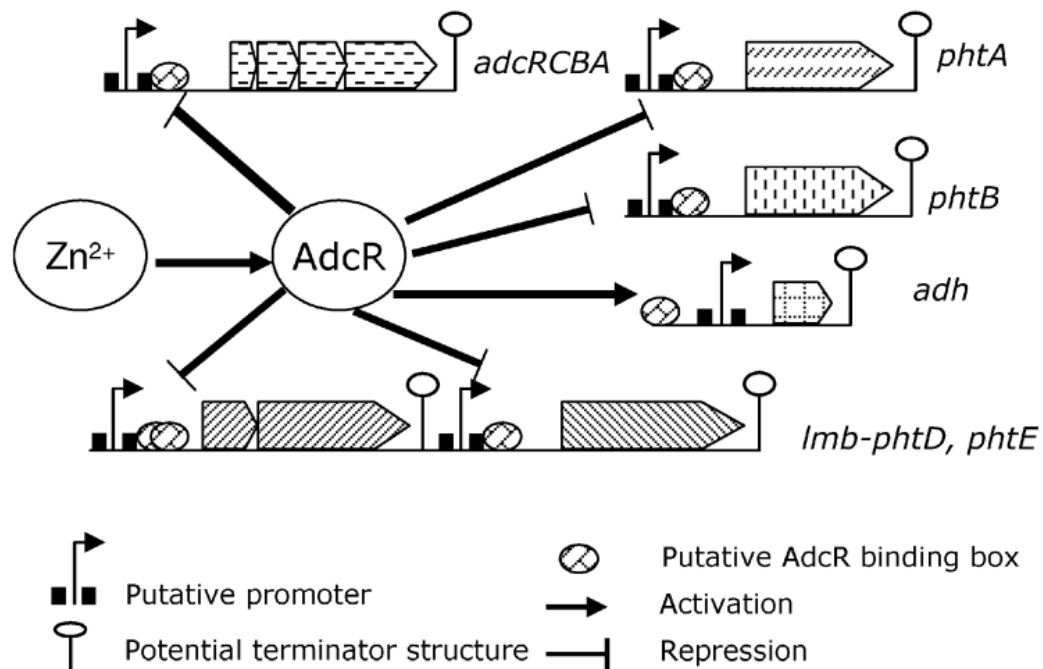
#### a) Régulation des systèmes d'import du zinc

Chez les bactéries à Gram -, l'import de zinc est sous le contrôle de la protéine Zur. Ce régulateur fait partie de la famille des métallorégulateurs Fur. Le nom de cette famille vient



du premier membre de cette famille caractérisé chez *E. coli*, le régulateur Fur « Fe-regulated uptake repressor » qui contrôle le métabolisme du fer chez la plupart des bactéries à Gram - (Andrews *et al.*, 2003). Cette famille comprend également les régulateurs Mur, Nur de l'import de manganèse/fer et de nickel respectivement (Figure 10) (Díaz-Mireles *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2006). Le nombre de gènes régulés par la protéine Zur varie selon les espèces mais inclue à chaque fois l'opéron des gènes codant le transporteur ZnuCBA ainsi qu'un ou plusieurs gènes codant des protéines ribosomales paralogues indépendantes du zinc (protéines L31\*, L33\* ou S14\* chez *E. coli* ou *B. subtilis*) remplaçant les protéines ribosomales dépendantes du zinc (Figure 9A) (Panina *et al.*, 2003; Natori *et al.*, 2007; Graham *et al.*, 2009; Gilston *et al.*, 2014; Shin and Helmann, 2016). Les métallochaperonnes chélatrices de zinc présentes chez certaines bactéries comme *B. subtilis* (YciC et ZinT) ou *E. coli* (ZinT) sont également régulées par la protéine Zur (Gaballa and Helmann, 1998; Gaballa *et al.*, 2002; Graham *et al.*, 2009). Le régulateur Zur est une protéine dimérique fixant deux ou plusieurs atomes de zinc selon les espèces (Outten *et al.*, 2001; Lucarelli *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2011). Un atome de zinc intervient dans la structure de la protéine Zur alors que les autres atomes favorisent son repliement pour permettre sa fixation au niveau de séquences spécifiques d'ADN localisées au niveau de la région promotrice des gènes à réguler. En présence de zinc, les gènes codant l'importateur de zinc ZnuCBA sont donc réprimés évitant l'excès de zinc dans la bactérie. Lorsque la concentration de zinc diminue, la protéine Zur, dépourvue de zinc, se décroche de l'ADN, dé-réprimant les gènes codant le transporteur ZnuCBA ainsi que ceux codant les protéines ribosomales paralogues indépendantes du zinc et les métallochaperonnes.

La régulation de l'import de zinc chez les bactéries à Gram + est contrôlée par les régulateurs de la famille MarR (Multiple antibiotic resistance Regulator) qui constituent un groupe de régulateurs transcriptionnels régulant négativement l'expression des gènes impliqués dans l'import de métaux, le stockage de métaux et les réponses liées à un manque de métaux (Figure 10) (Reyes-Caballero *et al.*, 2010; Guerra *et al.*, 2011). Les membres de cette famille modulent également l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires (voies métaboliques, stress antibiotique et antimicrobien, stress oxydatif, facteurs de virulence...) (Wilkinson and Grove, 2006; Ellison and Miller, 2006; Grove, 2017). Chez les streptocoques, l'équivalent du régulateur Zur est la protéine AdcR (Figure 9B). La protéine AdcR de *S. pneumoniae* agit à la fois comme activateur et



**Figure 11. Schéma de régulation des gènes cibles de la protéine AdcR chez *S. pneumoniae*.** (D'après Shafeeq *et al.*, 2011)

En présence d'une quantité suffisante de zinc dans le milieu intracellulaire, la protéine AdcR réprime l'expression des opérons *adcRCBA*, *lmb-phtD* et des gènes *phtA*, *phtB*, et *phtE* et active l'expression du gène *adh*.

*lmb* = *adcAII*

répresseur. Elle réprime l'opéron *adcRCBA* et les gènes *phtA*, *phtB*, *phtD* et *phtE* codant le transporteur ABC de zinc (Ogunniyi *et al.*, 2009; Shafeeq *et al.*, 2011) et active l'expression du gène *adh* codant l'alcool déshydrogénase (Figure 11) (Reyes-Caballero *et al.*, 2010; Shafeeq *et al.*, 2011). Chez cette bactérie le répresseur AdcR est actif à partir de quelques micromolaire de zinc dans le milieu extérieur (Shafeeq *et al.*, 2011). Chez *S. suis* et *S. pyogenes*, il a également été montré que la protéine AdcR réprime l'expression d'une protéine ribosomale paralogue indépendante du zinc (Aranda *et al.*, 2009; Sanson *et al.*, 2015).

L'analyse cristallographique de la protéine chez *S. pneumoniae* a révélé que cet homodimère présente deux motifs de fixation du zinc par monomère. Le premier site est de haute affinité pour le zinc et apparait nécessaire et suffisant au fonctionnement du régulateur (Reyes-Caballero *et al.*, 2010; Guerra *et al.*, 2011). Le second site de fixation est de faible affinité et son rôle dans la répression des gènes du transporteur ABC lors d'une carence de zinc a été décrit comme moins important chez *S. pyogenes* (Makthal *et al.*, 2017). Cependant, des souches de *S. pyogenes* mutantes pour le premier ou le deuxième site de fixation du zinc de la protéine AdcR s'avèrent significativement moins virulentes que la souche WT suggérant un rôle joué par les deux motifs *in vivo*. Le premier site de fixation se compose de trois histidines et d'un acide glutamique. Lorsque la concentration intracellulaire de zinc est suffisante pour la bactérie, du zinc est fixé au niveau du premier site sur chaque monomère, induisant un changement de conformation de la protéine AdcR. La protéine AdcR est alors dans une conformation active où elle possède une forte affinité pour des séquences d'ADN spécifiques. Des expériences de mobilité sur gel ont montré que le régulateur AdcR de *S. pneumoniae* se fixe au niveau de séquences conservées palindromiques en amont des gènes codant le transporteur ABC de zinc réprimant ainsi leur expression (Figure 11) (Ogunniyi *et al.*, 2009; Reyes-Caballero *et al.*, 2010; Shafeeq *et al.*, 2011). Ce mécanisme de co-répression, induit par la liaison de zinc au niveau de la protéine AdcR, est unique parmi les membres de la famille MarR. Mis à part quelques exceptions, la liaison des ligands aux régulateurs de cette famille entraîne une diminution de l'affinité de ces régulateurs pour leur séquence d'ADN entraînant la dé-répression des gènes qu'ils régulent.

La protéine AdcR de *S. pneumoniae* a également été décrite comme pouvant fixer du manganèse et du cobalt à la place du zinc mais avec une affinité plus faible. Ce changement de métal pourrait ainsi modifier l'expression du régulon de la protéine AdcR (Reyes-Caballero *et al.*, 2010). Cet effet a notamment été observé en présence d'un autre métal, le nickel. Les gènes codant le transporteur ABC de zinc sont en effet surexprimés avec



l'augmentation de la concentration en nickel du milieu (Manzoor, Shafeeq, Afzal, *et al.*, 2015). Le même effet a été observé avec la protéine *PsaR*, de la famille *MarR*, régulant les gènes codant l'importateur de manganèse *PsaCBA*. La fixation de manganèse par ce régulateur réprime l'expression des gènes *psaCBA* alors que la fixation de zinc, ou nickel active leur expression (Kloosterman *et al.*, 2008; Manzoor, Shafeeq, Kloosterman, *et al.*, 2015; Manzoor, Shafeeq, and Kuipers, 2015). Le passage du manganèse au zinc étant facilité dans ce cas par une fixation imparfaite du manganèse au régulateur (Couñago *et al.*, 2014).

### **b) Régulation des systèmes d'export du zinc**

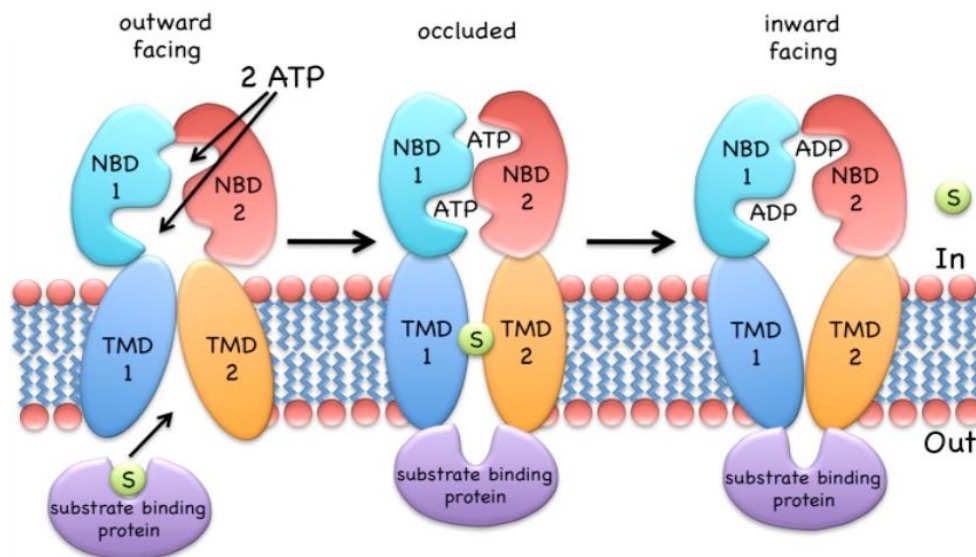
Chez les bactéries à Gram -, l'efflux de zinc est sous le contrôle de la protéine *ZntR* (Figure 9C) (Singh *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2009). Cette protéine appartient à la famille des métallorégulateurs *MerR* pour « Mercuric ion resistance regulator » car la première protéine de cette famille ayant été identifiée régule les gènes impliqués dans la résistance au mercure (Lund *et al.*, 1986). Cette famille comprend une large classe de régulateurs fonctionnant presque tous exclusivement comme activateurs transcriptionnels des gènes responsables de l'efflux des métaux, de la résistance aux antibiotiques ou au stress oxydatif (Figure 10) (O'Halloran *et al.*, 1989; Lund and Brown, 1989; Permina *et al.*, 2006). Les régulateurs de l'efflux des métaux de cette famille possèdent une boucle de liaison des métaux comprenant un motif spécifique pour chaque métal. Cette famille de régulateurs possède un mécanisme d'activation des gènes qui leur est spécifique (O'Halloran *et al.*, 1989). Les séquences d'ADN reconnues par les régulateurs de cette famille ont la particularité d'avoir les boîtes promotrices -35 et -10 espacées de 19 à 20 pb provoquant une faible affinité de l'ARN polymérase pour cette région. En excès de zinc, le régulateur *ZntR* fixe un atome de zinc, augmentant son affinité pour sa séquence d'ADN spécifique. La liaison de la protéine *ZntR* déforme la double hélice d'ADN amenant les boîtes -35 et -10 dans une position augmentant l'affinité de l'ARN polymérase pour cette zone (Brown *et al.*, 2003). Les gènes responsables de l'efflux de zinc sont ainsi activés.

La régulation de l'efflux de zinc chez les bactéries à Gram + est principalement contrôlée par le régulateur *SczA* (Figure 9D). Ce régulateur est un homodimère de la famille *TetR* pour « Tetracycline Repressor » venant du premier membre identifié (Izaki *et al.*, 1966). Cette famille de régulateurs est associée à la résistance aux antibiotiques ainsi que la régulation des gènes codant des exportateurs de petites molécules dont les métaux (Figure 10). Les membres de cette famille fixent une large variété de ligands comme des antibiotiques, des molécules



intervenant dans la signalisation cellule-cellule ou des métabolites intervenant dans les métabolismes carboné, lipidique, ou des acides aminés (Ma *et al.*, 2009; Cuthbertson and Nodwell, 2013). Chez *S. pneumoniae* le régulateur SczA agit à la fois comme un activateur et un répresseur. En carence de zinc, la protéine SczA agit comme répresseur en se fixant au niveau d'une séquence palindromique dans la région promotrice du gène *czcD* codant l'exportateur de zinc. En excès de zinc, le zinc vient se fixer au niveau du régulateur SczA diminuant son affinité pour la séquence qu'il fixe. Le régulateur SczA vient alors occuper un autre site en amont du promoteur du gène *czcD* dé-réprimant ainsi ce gène (Kloosterman *et al.*, 2007). Le mécanisme induisant le passage du régulateur d'un site à l'autre est encore indéterminé. Chez *S. pneumoniae*, le régulateur SczA est actif à partir d'une concentration en zinc du milieu de culture supérieure à 10-20  $\mu$ M (Jacobsen *et al.*, 2011; Shafeeq *et al.*, 2011). Le régulateur SczA est conservé chez les streptocoques. Pour *S. agalactiae* l'homologue du régulateur SczA présente une identité protéique de 48% avec celui de *S. pneumoniae* (Martin *et al.*, 2017). La structure cristallographique de ce régulateur a été obtenue chez *S. agalactiae* et montre deux sites de fixation du zinc distincts et situés aux deux extrémités de la protéine. La composition du motif situé en N-terminal est conservée chez les streptocoques alors que celle du motif C-terminal varie. La présence des deux motifs de fixation du zinc est cependant requise pour le fonctionnement du régulateur et indirectement pour la résistance de *S. pneumoniae* à la toxicité de zinc ainsi qu'à la résistance aux macrophages (Martin *et al.*, 2017).

L'homéostasie du zinc chez les bactéries est donc médiée par des protéines régulatrices régulant les systèmes d'import et d'efflux du zinc, les métallochaperonnes chélatrices de zinc et les protéines paralagues indépendantes du zinc. L'homéostasie du zinc fait également appel à l'utilisation de petites molécules fixatrices de zinc permettant de fixer l'excédent de zinc cytoplasmique (Colvin *et al.*, 2010). Ces petites molécules peuvent être des acides aminés, des acides organiques, du glutathion ou encore des petites protéines riches en cystéine comme les métallothionéines (Maret, 1994; Helbig *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2014). Le glutathion joue, par exemple, un rôle important dans la résistance au stress oxydatif ainsi que la toxicité au zinc chez *S. pneumoniae* (Potter *et al.*, 2012). Une protéine homologue de l'importateur du glutathion de *S. pneumoniae* est présente chez *S. agalactiae* avec 49% d'identité protéique. L'ensemble de ces mécanismes est résumé en Figure 9.



**Figure 12. Mécanisme de fonctionnement des importateurs de la superfamille des transporteurs ABC.** (D'après Wilkens, 2015)

Pour importer son substrat la SBP du transporteur va tout d'abord fixer son substrat au niveau du milieu extérieur. Elle va ensuite se lier au dimère de TMD puis chaque NBD va fixer une molécule d'ATP et un ion magnésium. La dimérisation des NBD entraîne le passage du transporteur ABC dans une conformation fermée où le substrat se retrouve au niveau d'une cavité (motif de fixation) formée par le dimère de TMD. L'hydrolyse de l'ATP puis la dissociation des NBD permet le passage du substrat à l'intérieur de la cellule.

NBD : domaine de liaison des nucléotides

TMD : domaine transmembranaire

SBP : protéine de liaison du substrat

In : cytoplasme bactérien

Out : milieu extérieur

### III) Les transporteurs de zinc de type Adc

#### 1) Généralités sur les transporteurs ABC

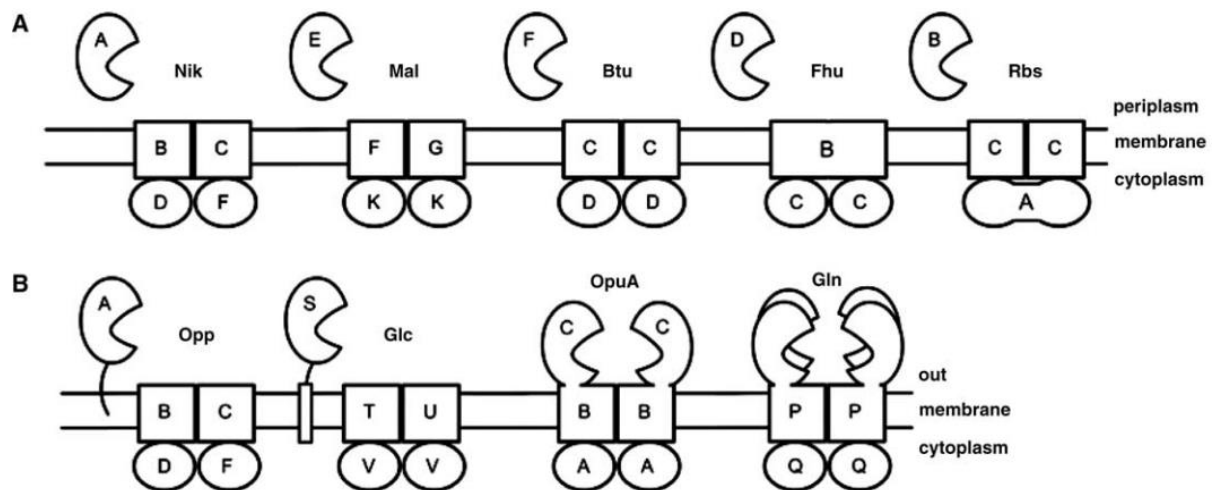
Cette famille de transporteurs est présente dans les trois domaines du vivant et représente actuellement la famille de protéines la plus vaste. Une étude a montré qu'entre 1 et 3% du génome des procaryotes et archées code des sous-unités des transporteurs ABC (Tomii and Kanehisa, 1998) . Cette famille assure le transport d'un large spectre de substrats allant des petites molécules inorganiques et organiques comme les acides aminés, les sucres, les nucléosides, les vitamines et les métaux aux plus grands composés comme les peptides, des molécules lipidiques, des oligonucléotides et polysaccharides.

Les transporteurs ABC font partie des transporteurs actifs primaires : l'énergie dégagée par la liaison et l'hydrolyse de l'ATP est couplée au transport unidirectionnel de substrats à travers la membrane. Ils appartiennent à la famille des « nucleotide triphosphate hydrolases » (NTPases) à boucle P (phosphate binding loop). Les transporteurs ABC sont divisés en deux sous-types selon le sens de la molécule transportée : les exportateurs et les importateurs. Les procaryotes utilisent les deux sous-types de transporteurs ABC alors que les eucaryotes, à quelques exceptions près, ne possèdent que des exportateurs.

#### A) Structure générale des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC sont composés typiquement de quatre unités fonctionnelles comprenant : deux domaines cytoplasmiques NBD (NBD1 et NBD2) et deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2) (Figure 12).

Le domaine de liaison des nucléotides (NBD) est un domaine conservé au sein des différents types de transporteurs ABC. Ce domaine est responsable de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire au système pour le transport de molécules. Dans un transporteur ABC, deux domaines NBD forment un sandwich inversé piégeant deux molécules d'ATP à l'interface du dimère (Figure 12). Cette dimérisation est induite par la liaison du nucléotide (Smith *et al.*, 2002). Le domaine catalytique de l'ATPase



**Figure 13. Diversité de structure des transporteurs ABC chez les bactéries.** (D'après Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006)

A) Représentation d'importateurs d'une bactérie à Gram – *E. coli* : Nik, transporteur de nickel ; Mal, transporteur de maltose/dextrine ; Btu, transporteur de vitamine B12 ; Fhu, transporteur de sidérophore/hème/vitamine B12 ; Rbs, transporteur de ribose.

B) Représentation d'importateurs de bactéries à Gram + et d'Archées : Opp, transporteur d'oligopeptides de *Lactococcus lactis*; Glc, transporteur de glucose de *Sulfolobus solfataricus*; OpuA, transporteur de glycine bêtaïne de *L. lactis*; Gln, transporteur de glutamine/acide glutamique de *L. lactis*.

Forme de pac-man : protéines de liaison du substrat

Rectangle : Domaines transmembranaires

Ovale : Domaines nucléotidiques

de ces transporteurs possède un motif caractéristique (LSGGQ). Ce motif, appelé « motif signature des ABC transporteurs » ou encore boucle C, est à l'origine du nom des transporteurs ABC pour ATP-Binding Cassette (Walker *et al.*, 1982; Higgins *et al.*, 1986).

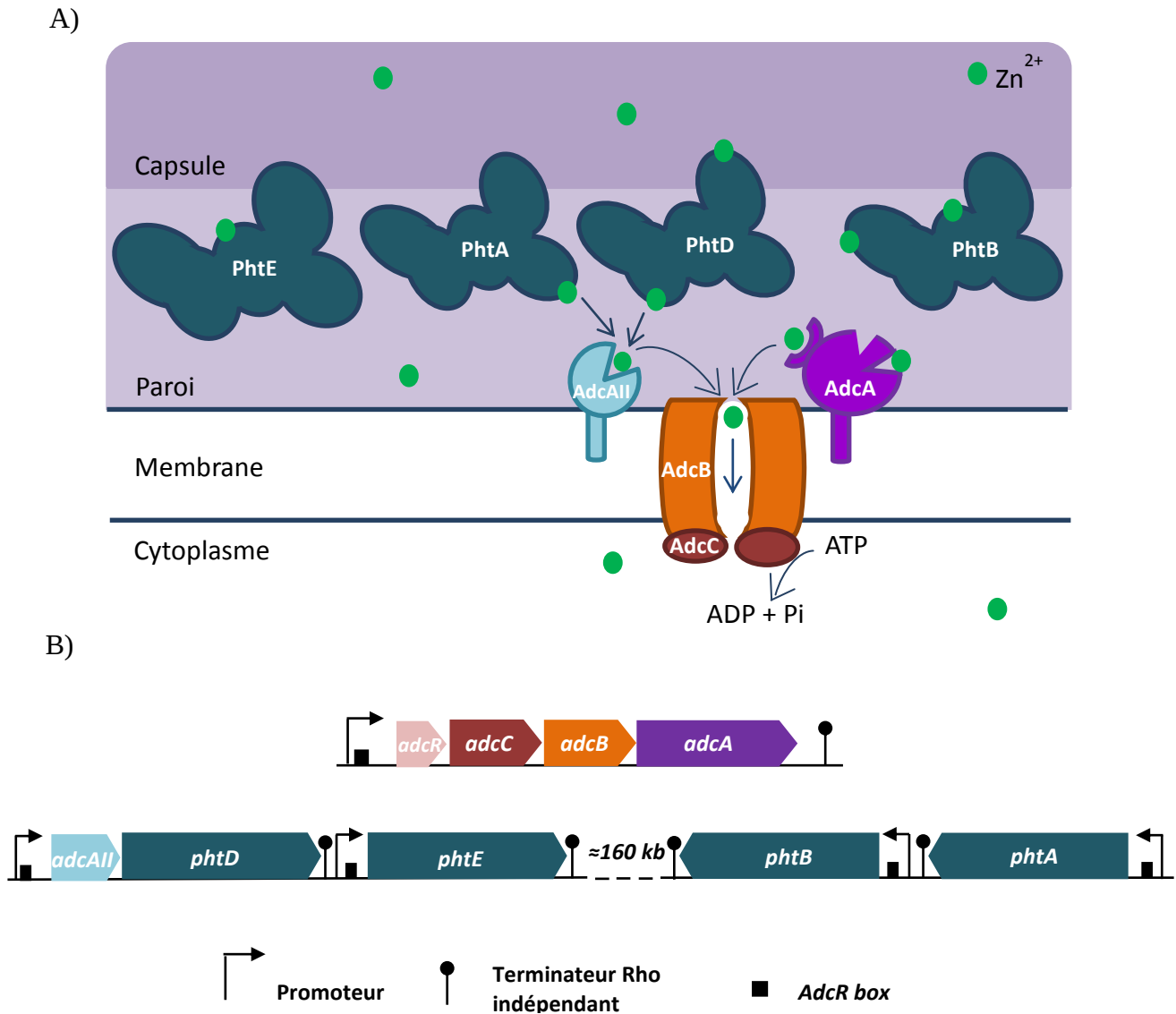
Le domaine transmembranaire (TMD) des transporteurs ABC est le domaine responsable du passage du substrat à travers la membrane plasmique. Un transporteur ABC possède deux domaines transmembranaires TMD1 et TMD2 composés d'hélices  $\alpha$  assemblées pour former un pore transmembranaire accessible par le cytoplasme ou l'extérieur de la cellule (Figure 12). Contrairement aux domaines NBD, la séquence primaire, la taille, l'architecture et le nombre d'hélices  $\alpha$  des domaines transmembranaires varie considérablement selon les transporteurs ABC. Cette absence de conservation de structure est due à la diversité des substrats transportés. Le mode de liaison du substrat aux domaines TMD varie également selon le type de substrat et le sens du transport.

A partir de cette structure minimale de quatre domaines une grande diversité d'architecture et de topologie est retrouvée parmi les transporteurs ABC (Holland and Blight, 1999). En plus des quatre domaines, les importateurs bactériens ont besoin d'une sous-unité supplémentaire responsable de la capture du substrat appelée Substrate Binding Protein (SBP), qui transfère ensuite le substrat au domaine TMD. Chez les bactéries à Gram -, cette sous-unité est une protéine soluble entre 30 et 50 kDa retrouvée au niveau du périplasme alors que chez les bactéries Gram + cette sous-unité est une lipoprotéine ancrée du côté du feuillet externe de la membrane (Figure 13).

## B) Mécanisme de fonctionnement des transporteurs ABC

Les transporteurs ABC permettent le passage de leur substrat dans une direction unique (import ou export). Ces transporteurs partagent des étapes élémentaires dont l'ordre exact reste encore à déterminer (Figure 12) :

- i) la liaison du substrat à la SBP (pour les importateurs) ou directement aux TMD,
- ii) la liaison de deux molécules d'ATP et d'ions  $Mg^{2+}$  aux NBD puis la dimérisation des NBD,
- iii) le changement de conformation des TMD avec leur ouverture de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule pour les importateurs (ou inversement pour les exportateurs),



**Figure 14. Organisation des gènes et représentation du transporteur ABC de zinc de *S. pneumoniae*.**

A) Le transporteur ABC de zinc de *S. pneumoniae* se compose d'un translocon formé de la protéine transmembranaire AdcB et de l'ATPase AdcC, de deux protéines de liaison du substrat AdcA et AdcAII ancrées à la membrane et de quatre protéines à motif de triade d'histidine nommées Pht aidant la protéine AdcAII dans l'acquisition du zinc.

B) Les gènes *adcC*, *adcB* et *adcA* sont en opéron avec le gène *adcR*. Les gènes *pht* sont arrangés par paires (*phtD/phtE* et *phtA/phtB*). Le gène *phtD* forme un opéron avec le gène *adcAII* alors que les autres gènes *pht* sont monocistroniques. La position des promoteurs et des terminateurs est indiquée. Les sites de fixation de la protéine AdcR au niveau de sa séquence spécifique d'ADN sont représentés par un carré noir.

- iv) l'hydrolyse d'ATP, la libération d'ADP et de phosphate inorganique avec la libération du substrat concomitante à la dissociation des deux NBD pour entamer un nouveau cycle.

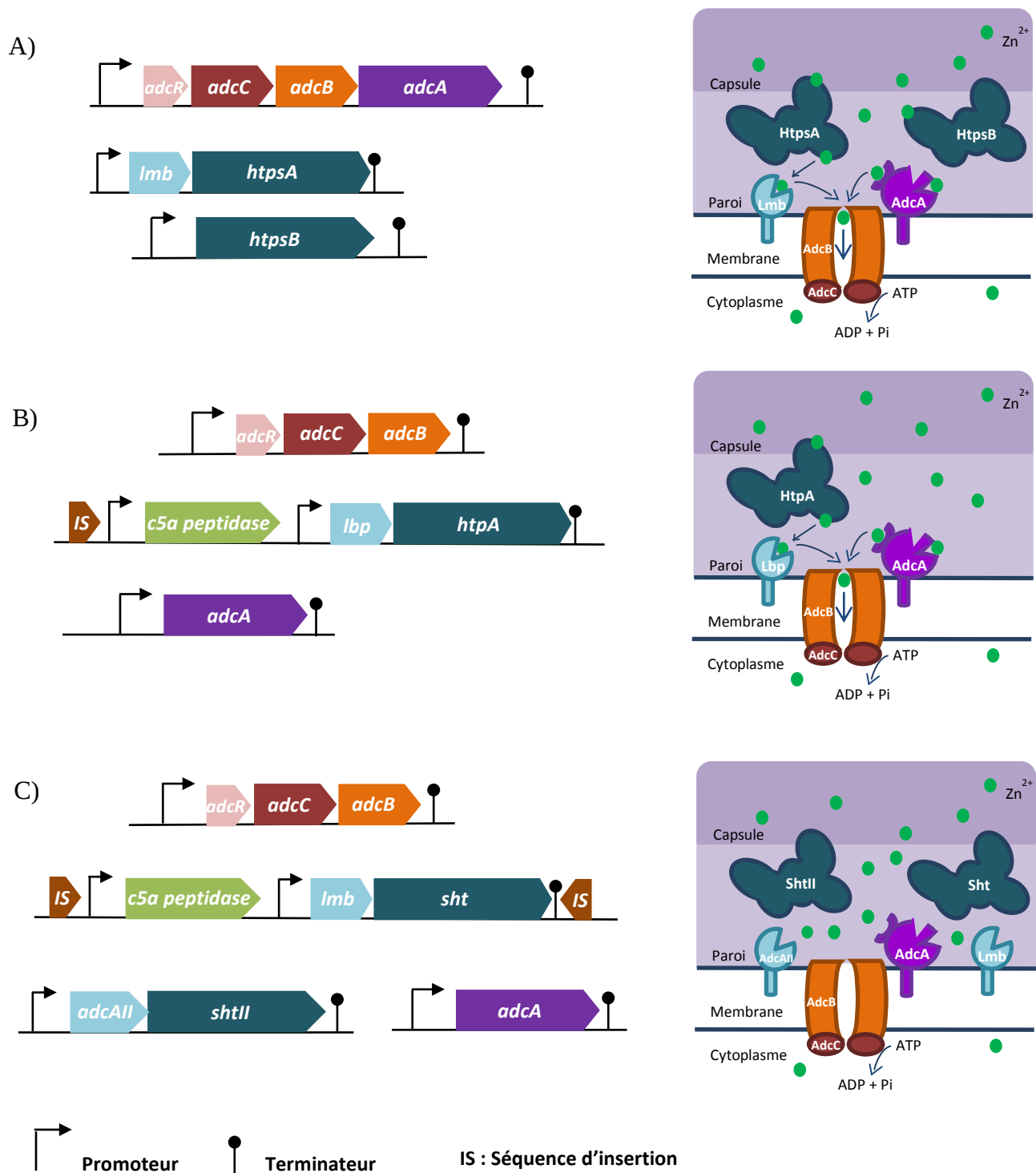
## 2) Structure des transporteurs de type Adc

### A) Organisation générale des transporteurs de type Adc

Les transporteurs de type Adc sont des systèmes de haute affinité assurant l'import du zinc dans la bactérie. Le nom d'Adc pour « adhesion competence operon » a été donné initialement au transporteur de zinc de *S. pneumoniae* suite à la recherche de gènes dont la mutation affecte la compétence pour la transformation génétique de la bactérie. Le terme « adhesion » vient de l'identité de séquence observée entre AdcA et d'autres protéines de transporteurs ABC dont un second rôle dans l'adhérence a été décrit (Dintilhac and Claverys, 1997). Parmi ces protéines, nous retrouvons les protéines PsaA et FimA, faisant partie des transporteurs ABC de manganèse de *S. pneumoniae* et *Streptococcus parasanguis* respectivement. Les transporteurs Adc appartiennent à la superfamille des transporteurs ABC et à la famille 3.A.1.15 c'est-à-dire la famille des transporteurs de manganèse, zinc et fer.

Les transporteurs de type Adc se composent d'une protéine transmembranaire AdcB formant un pore pour le passage du substrat du milieu extérieur vers le cytoplasme, d'une ATPase AdcC fournissant l'énergie pour le fonctionnement du système et d'une à trois copies de protéines de fixation du substrat nommées AdcA ou AdcAII (Dintilhac and Claverys, 1997; Loisel *et al.*, 2008; Bayle *et al.*, 2011). Ce transporteur possède également entre une et cinq protéines de type Pht (Polyhistidine triad protein), présentes au niveau de la paroi et venant aider la ou les protéines de type AdcAII dans le recrutement de zinc (Figure 14A) (Adamou *et al.*, 2001; Loisel *et al.*, 2008; Plumptre, Hughes, *et al.*, 2014).

Parmi les streptocoques, *S. thermophilus* possède par exemple la version de base du transporteur avec une copie des protéines AdcR, AdcC, AdcB et AdcA. Les streptocoques, dont le transporteur de zinc a été étudié, comme *S. pneumoniae*, *Streptococcus suis* et *S. pyogenes* possèdent deux SBP : une protéine de type AdcA et une protéine nommée respectivement AdcAII, Lmb et Lbp (Lsp ou Lmb) ainsi qu'une protéine de type Pht nommée PhtD, HtpS (HtpsA) et HtpA respectivement (Figures 14A, 15A et B) (Kunitomo *et al.*, 2008; Linke *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2011; Bersch *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2013). *S. suis* possède



**Figure 15. Diversité d'organisation des gènes et de composition du transporteur ABC de zinc parmi quelques exemples de streptocoques.**

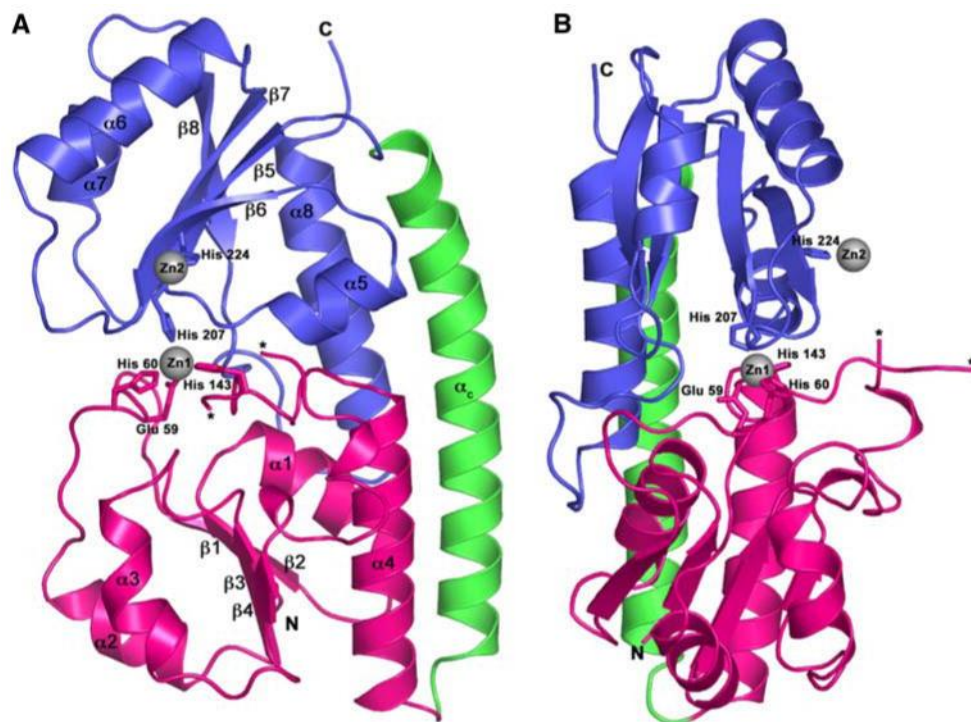
L'organisation des gènes et la représentation du transporteur ABC de zinc pour *S. suis* (A), *S. pyogenes* (B) et *S. agalactiae* (C) est représentée. La position des promoteurs et des terminateurs est indiquée.

une seconde protéine de type Pht nommée HtpsB (Figure 15A) (Li *et al.*, 2015). L'espèce *S. pneumoniae* a la particularité de posséder entre deux et cinq copies des protéines de type Pht selon les souches (Figure 14A) (Plumptre *et al.*, 2012; Plumptre, Hughes, *et al.*, 2014).

## B) Organisation génétique des transporteurs de type Adc

Au sein du genre *Streptococcus*, les gènes *adcR*, *adcC*, *adcB*, *adcA* sont conservés mais leur organisation diffère selon les espèces (Panina *et al.*, 2003). Chez *S. pneumoniae* et *S. suis*, les gènes codant les protéines AdcC, AdcB et AdcA sont en opéron avec un gène codant la protéine régulatrice AdcR (Figures 14B et 15A) (Dintilhac and Claverys, 1997; Aranda *et al.*, 2008). Chez *S. pyogenes*, les gènes *adcR*, *adcC*, *adcB*, forment un opéron et le gène *adcA*, retrouvé plus loin sur le génome, est monocistronique (Figure 15B) (Brenot *et al.*, 2007). Chez *S. pneumoniae*, *S. suis* et *S. pyogenes*, les gènes *adcAII*, *lmb* et *lbp*, présents à un autre endroit du génome que l'opéron *adcRCB*, sont en opéron avec les gènes *phtD*, *htpS* (*htpsA*) et *htpA* respectivement (Figures 14B, 15A et 15B) (Kunitomo *et al.*, 2008; Shao *et al.*, 2011; Loisel *et al.*, 2011; Shao *et al.*, 2013). *S. suis* possède un deuxième gène *htpsB* monocistronique sans second gène *lmb* (Figure 15A) (Li *et al.*, 2015). Chez *S. pneumoniae*, les gènes codant les protéines Pht sont eux arrangés par paires : *phtA/phtB* ; *phtD/phtE* et sont monocistroniques à l'exception du gène *phtD* formant un opéron avec le gène *adcAII* (Figure 14B) (Adamou *et al.*, 2001; Rioux *et al.*, 2011).

Chez *S. agalactiae*, nous avons retrouvé sur les génomes séquencés de la bactérie l'opéron *adcRCB* ainsi que le gène *adcA* avec la même organisation génétique que *S. pyogenes* (Figure 15C). Deux protéines homologues aux protéines AdcAII et PhtD de *S. pneumoniae* avaient précédemment été identifiées et nommées Lmb et Sht respectivement (Spellerberg *et al.*, 1999; Maruvada *et al.*, 2009). Les gènes *lmb* et *sht* ont la même organisation que leurs homologues de *S. pneumoniae*, en opéron (Figure 15C). Cependant en amont de cet opéron est présent le gène *scpB* codant une peptidase C5a impliquée dans l'échappement au système immunitaire par clivage du composé C5a du complément (Bohnsack *et al.*, 1991; Chmouryguina *et al.*, 1996). L'ensemble est localisé au niveau d'un transposon de 16 kb entouré par deux séquences d'insertions (ISSag2) (Figure 15C). L'ajout d'un marqueur de résistance à l'érythromycine au niveau du gène *lmb* a montré que ce transposon est mobilisable (Franken *et al.*, 2001). L'analyse de 68 souches de *S. agalactiae* a montré que cet îlot génomique est retrouvé chez toutes les souches humaines mais seulement



**Figure 16. Structure cristallographique de la protéine ZnuA d'*E. coli*.** (D'après Yatsunyk *et al.*, 2008)

A) Le domaine N-terminal (rose) de la protéine possède deux motifs de fixation du zinc (sphère grise). Le premier motif se compose de trois histidines et d'un acide glutamique (Glu59, His60, His143 et His207) suivi du deuxième motif se composant d'une boucle riche en histidines dont la fin est représentée par des astérisques. Le domaine C-terminal (bleu) possède un motif de fixation du zinc ZinT-like. Les deux domaines sont reliés par une hélice  $\alpha$  (vert).

B) Vue d'environ 90° par rapport à l'axe vertical de la représentation A).

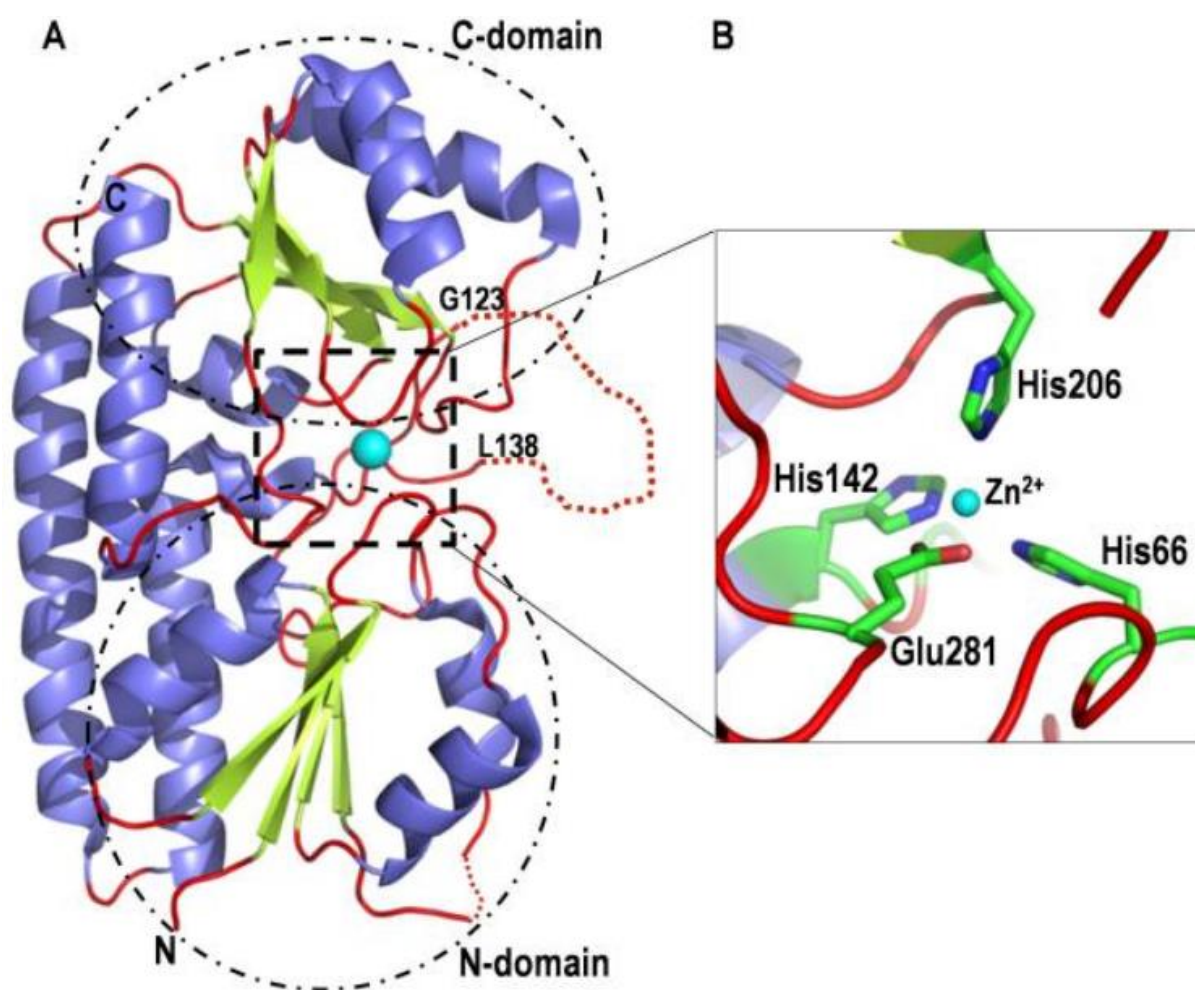
chez 20% des souches d'origine animale suggérant son importance dans l'adaptation et/ou la pathologie à l'Homme (Franken *et al.*, 2001). Parmi les streptocoques, cet îlot génomique est retrouvé chez *S. pyogenes*. En amont de l'opéron *lbp-htpA* de *S. pyogenes*, un gène codant une C5a peptidase est présent avec une seule séquence d'insertion présente en amont de ce gène (Figure 15B) (Shao *et al.*, 2013).

### C) Structure des protéines de fixation du substrat (SBP) des transporteurs de type Adc

La protéine AdcA a tout d'abord été identifiée en 1997 chez *S. pneumoniae* comme une lipoprotéine fixatrice de métaux à l'origine d'une nouvelle famille de SBP représentant le cluster 9 puis le cluster A-1 en 2010 (Dintilhac *et al.*, 1997; Berntsson *et al.*, 2010). Par homologie avec la protéine AdcA, cette famille inclue notamment les protéines fixatrices de zinc suivantes : la protéine AdcAII de *S. pneumoniae*, la protéine ZnuA d'*E. coli*, la protéine TroA de *Treponema pallidum* ou les protéines Lmb et Lbp (Lsp) de *S. agalactiae* et *S. pyogenes* respectivement (Spellerberg *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Yatsunyk *et al.*, 2008; Loisel *et al.*, 2008; Linke *et al.*, 2009).

Chez *S. pneumoniae*, la localisation des SBP du transporteur ABC de zinc a été étudiée pour la protéine AdcAII. L'analyse de sa séquence protéique a mis en évidence un motif spécifique des lipoprotéines, la « lipobox » LxxC (où x est un acide aminé quelconque). Des expériences de fractionnement sub-cellulaire suivi de Western blot ainsi qu'une localisation de la protéine par immunofluorescence ont confirmé la localisation membranaire de la protéine AdcAII. Cette liaison à la membrane a également été caractérisée pour les protéines Lmb et Lbp de *S. agalactiae* et *S. pyogenes* (Spellerberg *et al.*, 1999; Linke *et al.*, 2009).

L'analyse cristallographique de la protéine AdcA de *S. pneumoniae* a révélé la présence d'un site de fixation du zinc composé de trois histidines associées à un acide glutamique en N-terminal (Figure 16) (Plumtre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014). Ce site de fixation a également été caractérisé pour les protéines AdcAII, ZnuA, TroA, Lbp et Lmb (Lee *et al.*, 1999; Yatsunyk *et al.*, 2008; Loisel *et al.*, 2008; Linke *et al.*, 2009; Ragunathan *et al.*, 2013).



**Figure 17. Structure cristallographique de la protéine Lmb de *S. agalactiae*.** (D'après Ragunathan *et al.*, 2013)

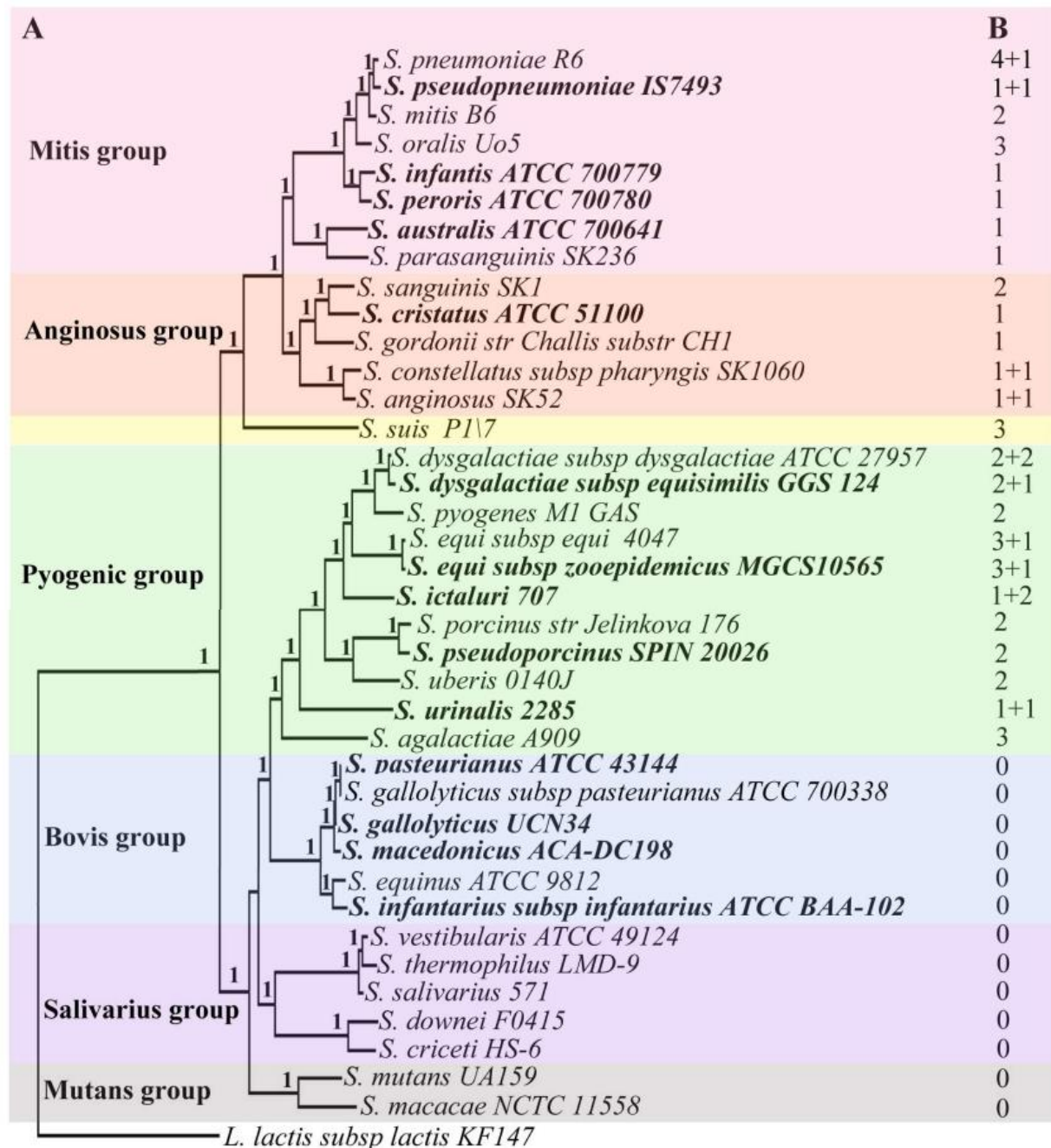
A) La protéine Lmb est constituée de deux domaines, le domaine N-terminal et le domaine C-terminal. Ces deux domaines sont reliés par une hélice rigide. La sphère bleue correspond à la fixation d'un atome de zinc à l'interface des deux domaines. Une longue boucle désordonnée est présente à proximité du site de liaison du zinc entre la glycine en position 123 et la leucine en position 138 (pointillés rouges).

B) Agrandissement de la zone de liaison du zinc. Le motif de fixation du zinc se compose des histidines en position 66, 142 et 206 ainsi que de l'acide glutamique en position 281.

La protéine AdcA possède également deux motifs supplémentaires de fixation du zinc : une boucle riche en histidine située après le premier motif de fixation du zinc et un domaine de fixation du zinc retrouvé chez la protéine ZinT (YodA) situé en C-terminal (domaine ZinT-like) (Figure 16) (David *et al.*, 2003; Falconi *et al.*, 2011; Plumptre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014). L'affinité pour le zinc du premier domaine à trois histidines et du domaine ZinT-like a été déterminée par titration calorimétrique isotherme (ITC). Cette analyse a montré que ces deux domaines sont capables de fixer un atome de zinc mais avec une affinité presque cent fois supérieure pour le premier domaine à trois histidines ( $K_d = 2,4 \pm 0,1$  nM) (Plumptre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014). Une analyse par ICP-MS a également montré que la protéine n'est capable de fixer que le zinc contrairement à la protéine PsaA du même cluster A-1 de la famille des SBP. Cette protéine, faisant partie du transporteur ABC de manganèse de *S. pneumoniae*, a en effet été décrite comme fixant du manganèse mais également du zinc (McDevitt *et al.*, 2011; Couñago *et al.*, 2014).

La protéine Lmb de *S. agalactiae*, par homologie de séquence protéique, a tout d'abord été classée dans la famille des adhésines LraI (lipoprotein receptor antigen I). Elle présente notamment 27% d'identité protéique avec la protéine PsaA de *S. pneumoniae* (Spellerberg *et al.*, 1999). Dans cette famille d'adhésines, quatre motifs structuraux sont conservés : une séquence signal composée de vingt acide-aminés hydrophobes et contenant la lipobox LxxC, deux domaines transmembranaires B1 et B2, et une région d'hélice  $\alpha$  (Jenkinson, 1994). Ces motifs sont retrouvés chez la protéine Lmb mais avec une lipobox modifiée (IxxC). De plus, la région  $\alpha$  de la protéine Lmb présente 50% d'homologie avec la chaîne B2 de la laminine humaine (Spellerberg *et al.*, 1999). La séparation des fractions cytoplasmique et membranaire de SGB par ultracentrifugation suivi d'un Western blot ont également montré la présence de la protéine Lmb au niveau de la membrane (Spellerberg *et al.*, 1999). La protéine Lmb est ainsi bien une lipoprotéine ancrée à la membrane plasmique au moyen d'une ancre lipidique.

L'analyse de la structure de la protéine réalisée en 2009, a entraîné un reclassement de la protéine Lmb au niveau de la superfamille des transporteurs ABC et dans la famille des SBP au niveau du cluster 3.A.1.15 (les SBP fixant le manganèse, zinc ou fer). Elle présente notamment une identité protéique de 35 et 67% avec les protéines AdcA et AdcAII de *S. pneumoniae* de la même famille. La protéine Lmb possède la même structure que les protéines fixatrices de zinc décrites au niveau de son cluster. Elle se compose de deux domaines globulaires qui s'assemblent pour former une poche où est présent un site de fixation du zinc (Figure 17). Ce motif de fixation du zinc, qui se compose d'une triade



**Figure 18. Distribution des gènes de type *pht* identifiés parmi 38 souches de streptocoques.** (D'après Shao *et al.*, 2013)

A) Analyse phylogénétique de 38 souches représentatives des différents sous-groupes de streptocoques basée sur les séquences de 530 protéines orthologues.

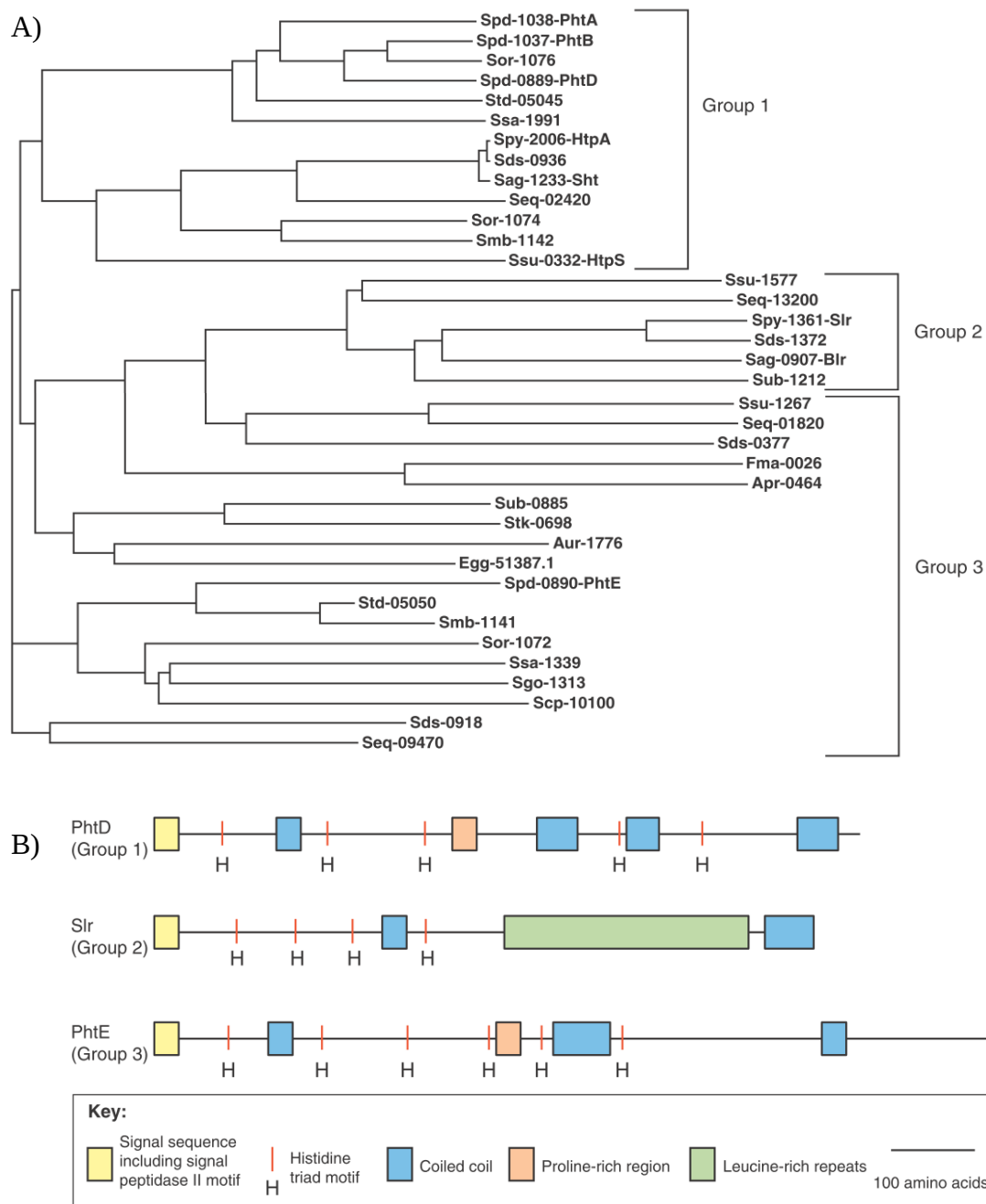
B) Le nombre de copies des gènes de type *pht* présent dans chaque génome est indiqué avec le gène retrouvé en entier + le nombre de pseudogènes identifiés.

d'histidine ainsi qu'un acide glutamique, est identique à celui décrit chez les protéines AdcA et AdcAII de *S. pneumoniae*. Chaque domaine globulaire se compose de quatre feuillets  $\beta$  reliés par des hélices  $\alpha$  et sont assemblés au moyen d'une longue boucle désordonnée (Yatsunyk *et al.*, 2008; Loisel *et al.*, 2008; Ragunathan *et al.*, 2009). L'étude du site de fixation du zinc a ensuite montré son importance dans le maintien de la structure de la protéine Lmb, la mutation de ce site rendant la protéine insoluble (Ragunathan *et al.*, 2013).

#### D) Structure des protéines Pht

Les protéines Pht pour « Polyhistidine triad protein » ou « Pneumococcal histidine triad protein », le plus souvent au nombre de quatre chez *S. pneumoniae* (PhtA, PhtB, PhtD et PhtE), sont des protéines de 96 à 115 kDa. Ces quatre protéines ont été découvertes indépendamment chez *S. pneumoniae* en étudiant une protéine non identifiée (PhtA) ayant une activité protéasique sur le C3 ou en recherchant des séquences codant des putatives protéines de surface avec un motif reconnu par la peptidase signal II et qui pourraient être utilisées comme vaccin (Adamou *et al.*, 2001; Wizemann *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Hamel *et al.*, 2004). Ces études ont montré que les protéines Pht sont des protéines de surface, très conservées parmi les souches de *S. pneumoniae* et qu'elles partagent entre 32 et 87% d'identité protéique. La particularité des protéines Pht est de posséder un motif de fixation du zinc composé d'une triade d'histidine HxxHxH (où x est un acide aminé quelconque), appelé motif HT (Histidine Triad). Les protéines Pht possèdent entre cinq (PhtA, PhtB, PhtD) et six de ces motifs (PhtE) (Adamou *et al.*, 2001).

Des homologues de ces protéines ont ensuite été découverts chez d'autres espèces de streptocoques : les protéines Slr et HtpA de *S. pyogenes*, les protéines Blr et Sht de *S. agalactiae* ou les protéines HtpS (HtpsA), HtpsB de *S. suis* (Reid *et al.*, 2003; Waldemarsson *et al.*, 2006; Kunitomo *et al.*, 2008; Maruvada *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015). Des recherches sur les génomes séquencés ont montré que les gènes *pht* sont présents chez pratiquement tous les streptocoques en une à cinq copies. Ces gènes semblaient déjà présents à l'origine du genre *Streptococcus* et auraient été perdus pour les groupes Bovis, Mutans et Salivarius (Figure 18) (Plumptre *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2013). Le gène *pht* a également été retrouvé en une ou deux copies chez certaines souches séquencées de d'autres genres bactériens comme *Gemella sanguis*, *Enterococcus faecalis* ou *Aerococcus urinae*. L'hypothèse de la présence de ces gènes chez ces bactéries serait un récent transfert



**Figure 19. Relation structurale et génétique des protéines Pht (polyhistidine triad).**  
(D'après Plumptre *et al.*, 2012)

A) Les protéines Pht (polyhistidine triad) sont divisées en trois groupes en se basant sur leur identité de séquence. Les protéines d'une seule souche représentative de chaque espèce sont représentées ici. Les protéines sont nommées avec le code à trois lettres de l'organisme auquel elles appartiennent, le numéro de leur gène selon l'encyclopédie de Kyoto des gènes et génomes (KEGG) suivi du nom donné à la protéine lors de sa découverte.

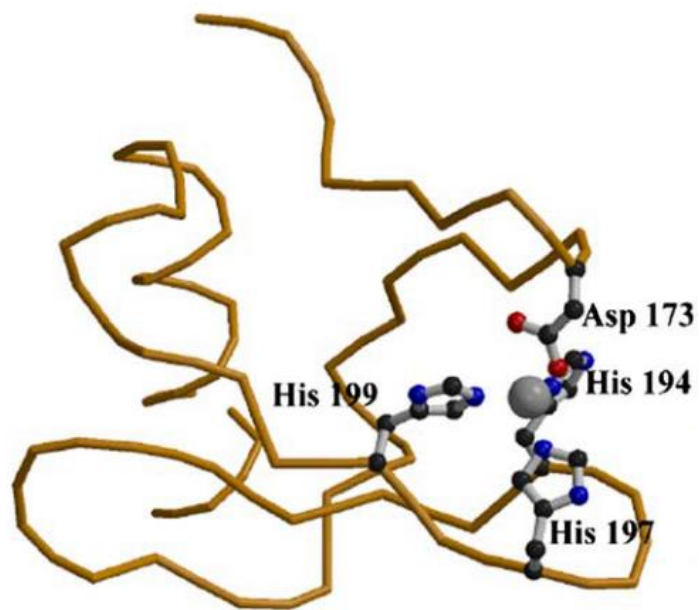
B) Arrangements des motifs de triade d'histidine et structure secondaire des éléments de la protéine Pht type des groupes 1 à 3. L'extrémité N-terminale des protéines est située du côté gauche du schéma.

Abbreviations : Apr, *Anaerococcus prevotii* DSM 20548; Aur, *Aerococcus urinae* ACS-120-V-Col10a; Egg, *Enterococcus faecalis* TX1467; Fma, *Finagoldia magna* ATCC 29328; Sag, *Streptococcus agalactiae* 2603 (serotype V); Scp, *Streptococcus parasanguinis* ATCC 15912; Sds, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* GGS\_124; Seq, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* H70; Sgo, *Streptococcus gordonii* Challis; Smb, *Streptococcus mitis* B6; Sor, *Streptococcus oralis* Uo5; Spd, *Streptococcus pneumoniae* D39; Spy, *Streptococcus pyogenes* SF370 (serotype M1); Ssa, *Streptococcus sanguinis* SK36; Ssu, *Streptococcus suis* 05ZYH33; Std, *Streptococcus pseudopneumoniae* IS7493; Stk, *Streptococcus parauberis* KCTC 11537; Sub, *Streptococcus uberis* 0140J.

horizontal entre bactéries infectant l'Homme (Plumptre *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2013). En 2012, Plumptre et collaborateurs ont classé les protéines Pht décrites en trois groupes selon la présence ou l'absence de domaines répétés riches en leucine (LRR domain) (Figure 19). Le premier groupe comprend notamment les protéines PhtA, PhtB, PhtD, Sht, HtpS (HtpsA), HtpsB et HtpA dont la plupart possèdent cinq motifs de triade d'histidine. Ces protéines présentent une forte homologie de séquence au niveau de leur région N-terminale et plusieurs d'entre elles ont été décrites comme fixant le zinc. Le deuxième groupe comprenant par exemple, les protéines Blr, Slr, et HtpsC de *S. pyogenes*, *S. agalactiae* et *S. suis* respectivement (Li *et al.*, 2015). Ce groupe est constitué de protéines à domaine LRR homologue à celui des internalines InlA et InlB de *Listeria monocytogenes* (Gaillard *et al.*, 1991). Ces domaines reconnaissent une grande variété de ligands et sont impliqués notamment dans l'adhérence cellulaire ou dans les interactions protéine-protéine pour la transduction d'un signal (Kobe and Kajava, 2001). Les triades d'histidine (entre 4 et 5 motifs HT) des protéines du groupe 2 sont regroupées au niveau du domaine N-terminal des protéines. Malgré la présence de ces histidines, les rôles décrits pour ces protéines (adhésines, échappement à la phagocytose) ne semblent pas avoir de lien avec le zinc (Waldemarsson *et al.*, 2006; Areschoug *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2015). Le troisième groupe comprend la protéine PhtE (6 motifs de triade d'histidine) et les protéines de type Pht retrouvées dans les autres espèces bactériennes et dont le rôle n'a pas été décrit.

Plusieurs études ont essayé d'obtenir sans succès la structure entière des protéines Pht. Cependant les structures ont été déterminées pour le premier motif HT de la protéine PhtD et le second motif de la protéine PhtA montrant que ces motifs sont capables de fixer le zinc (Figure 20) (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2004; Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2005; Loisel *et al.*, 2011). Une récente étude a également montré par calorimétrie que la protéine PhtD ne lie pas le manganèse mais uniquement le zinc, et que seulement trois motifs HT (sans identifier lesquels) sont accessibles pour fixer du zinc contrairement à une précédente étude décrivant 5 atomes de zinc par protéine PhtD (Loisel *et al.*, 2011; Ausar *et al.*, 2017).

Des expériences de fractionnement cellulaire ont montré que la protéine PhtD est majoritairement présente au niveau de la paroi mais son mécanisme d'ancrage reste cependant encore inconnu (Loisel *et al.*, 2011). La comparaison des séquences protéiques des quatre protéines Pht a montré une forte conservation de leur domaine N-terminal avec la présence d'un peptide signal contenant la lipobox LxxC (où x est un acide aminé quelconque). Cette



**Figure 20. Représentation du motif de fixation du zinc retrouvé entre les résidus 166 à 220 de la protéine PhtA de *S. pneumoniae*. (D'après Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2005)**

Les quatre acides aminés formant le site de fixation du zinc sont indiqués.

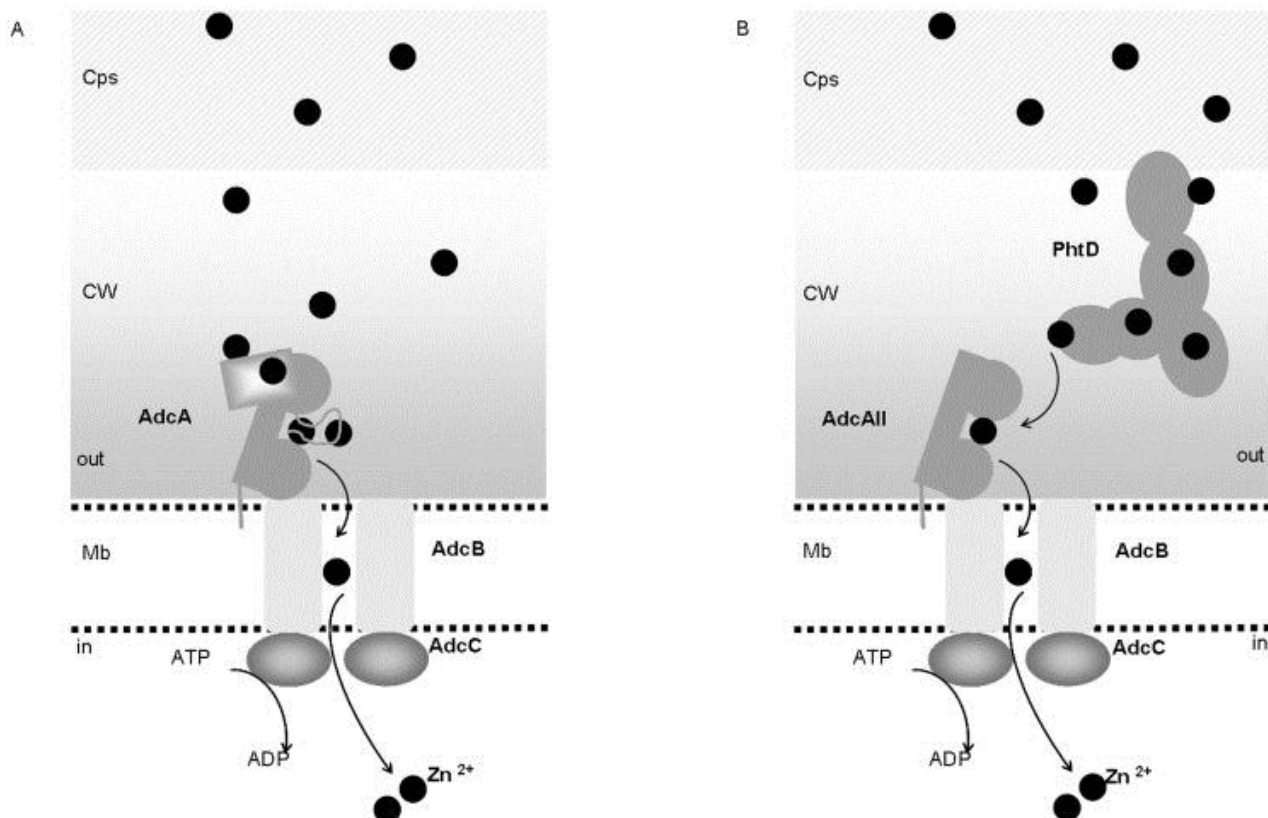
lipobox est cependant non fonctionnelle, la souche mutante pour la peptidase signal II donnant une protéine PhtD de la même taille que celle de la souche sauvage (Loisel *et al.*, 2011). Des analyses par cytométrie de flux ont également montré que le domaine C-terminal des protéines est plus accessible aux anticorps suggérant que le domaine N-terminal de la protéine est orienté vers la membrane et le domaine C-terminal vers l'extérieur (Adamou *et al.*, 2001; Hamel *et al.*, 2004).

La protéine Sht de *S. agalactiae* pour « Streptococcal histidine triad protein » appartient au premier groupe de la famille des protéines à motif de triade d'histidine. Elle présente en effet cinq motifs HT, une séquence signal de reconnaissance par la peptidase signal II et notamment 52% d'identité protéique avec la protéine PhtD du même groupe. Bien que des motifs de triade d'histidine aient été identifiés au niveau de la protéine Sht, leur potentiel rôle dans la fixation de zinc n'a pas été étudié. En recherchant des homologues de la protéine Sht nous avons identifié une protéine que nous avons nommé ShtII, présentant 43% d'identité protéique avec la protéine Sht. Le rôle de cette protéine n'a actuellement pas été déterminé.

### 3) Rôles des transporteurs de type Adc

#### A) Rôle des transporteurs de type Adc dans l'import de zinc

Le rôle des transporteurs de type Adc dans le transport du zinc a été bien caractérisé chez *S. pneumoniae*. En 1997 Dintilhac et collaborateurs ont mis en évidence que l'import du zinc chez *S. pneumoniae* était assuré par un transporteur ABC de zinc composé de la perméase AdcB, de l'ATPase AdcC et de la protéine de fixation du substrat AdcA (Dintilhac and Claverys, 1997; Dintilhac *et al.*, 1997). Une étude a ensuite mis en évidence que ce transporteur comportait une autre SBP, AdcAII (Loisel *et al.*, 2008). Une redondance a ensuite été mise en évidence dans le transport du zinc entre les protéines AdcA et AdcAII, chacune des protéines étant capable d'importer suffisamment de zinc pour la bactérie. En effet, les souches simples mutants  $\Delta adcA$  et  $\Delta adcAII$  ont une croissance similaire à la souche sauvage dans un milieu chimiquement défini carencé en zinc contrairement à la souche  $\Delta adcA/adcAII$  incapable de se développer (Bayle *et al.*, 2011; Plumptre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014). A l'inverse, les protéines Lmb et AdcA de *S. pyogenes* ne semblent pas jouer de rôle redondant dans la capture de zinc, les souches simples mutants  $\Delta lmb$  et  $\Delta adcA$  étant incapables de croître dans un milieu restreint en zinc (Weston *et al.*, 2009; Tedde *et al.*, 2016).



**Figure 21. Modèle de l'import de zinc chez *S. pneumoniae*.** (D'après Bersch *et al.*, 2013)

Chez *S. pneumoniae* la capture de zinc est assurée par deux mécanismes différents

A) La protéine AdcA, ancrée à la membrane, capture le zinc du milieu extérieur pour le transmettre au translocon AdcCB assurant l'entrée de zinc dans la bactérie par l'hydrolyse de l'ATP. La fixation de zinc par la protéine AdcA est assurée par trois domaines décrits : un motif situé en N-terminal composé d'une triade d'histidine et d'un acide glutamique, une boucle riche en histidine et un domaine Zin T-like situé en C-terminal.

B) La protéine PhtD retrouvée au niveau de la paroi capture le zinc du milieu extérieur pour le transmettre à la protéine AdcAII ancrée au niveau de la membrane. La protéine PhtD possède cinq motifs pouvant potentiellement fixer le zinc. La protéine AdcAII fixe le zinc grâce à un motif situé en N-terminal composé d'une triade d'histidine et d'un acide glutamique. Le zinc fixé à la protéine AdcAII est ensuite transféré au translocon AdcCB.

Cps, capsule ; CW, paroi ; Mb, membrane

L'étude des protéines Pht a permis d'ajouter de nouveaux composants à l'ABC transporteur de zinc de *S. pneumoniae* et a mis en évidence deux mécanismes différents d'acquisition du zinc par les SBP : la protéine AdcA est capable de capturer le zinc indépendamment de la présence des protéines Pht notamment grâce à ses trois motifs de fixation du zinc décrits précédemment. Par contre, la protéine AdcAII, ne possédant qu'un motif de fixation du zinc nécessite la présence des protéines Pht (Figure 21). Pour appuyer cela différentes observations ont été réalisées :

i) La souche mutante  $\Delta phtA/phtB/phtD/phtE/adcA$  (ne possédant que la protéine AdcAII comme SBP) est incapable de croître dans un milieu carencé en zinc contrairement à la souche  $\Delta adcA$  (Plumtre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014).

ii) Des mesures de la concentration intracellulaire en zinc, chez la souche  $\Delta adcA$  mutée pour un des quatre gènes *pht*, ont montré que n'importe laquelle des protéines Pht est suffisante pour délivrer le zinc à la protéine AdcAII (Plumtre, Hughes, *et al.*, 2014).

iii) Les gènes *adcAII* et *phtD* sont co-transcrits et co-régulés selon la concentration en zinc et des expériences d'immunoprécipitation ont montré que les protéines AdcAII et PhtD interagissent ensemble (Loisel *et al.*, 2011; Bersch *et al.*, 2013).

iv) La mesure de l'affinité du zinc pour les protéines AdcAII et PhtD (affinité du 1<sup>er</sup> motif HT) par microcalorimétrie a montré que la protéine PhtD a une affinité plus faible pour le zinc que AdcAII ce qui faciliterait le passage du zinc de la protéine PhtD à la protéine AdcAII (Loisel *et al.*, 2011).

L'importance des cinq motifs HT dans le transport de zinc a été étudiée chez la protéine PhtD par la mutation de chacun des motifs. Des expériences de croissance en milieu carencé en zinc ainsi que des mesures de la concentration intracellulaire en zinc chez les souches mutées pour les différents motifs HT ont montré une hiérarchisation de ces motifs (Eijkelkamp *et al.*, 2015). Le premier motif situé au niveau N-terminal de la protéine joue un rôle majeur dans la capture de zinc contrairement au cinquième motif situé en C-terminal. Les motifs HT 2 à 4 ont des rôles intermédiaires. Les protéines Pht possédant plusieurs motifs HT, il a été suggéré qu'elles pourraient servir de réservoir de zinc pour la bactérie ou intervenir en cas d'excès de zinc comme la métallochaperonne YciC de *B. subtilis* (Gaballa and Helmann, 1998; Rioux *et al.*, 2011). Cette fixation de plusieurs atomes de zinc par les protéines Pht ne



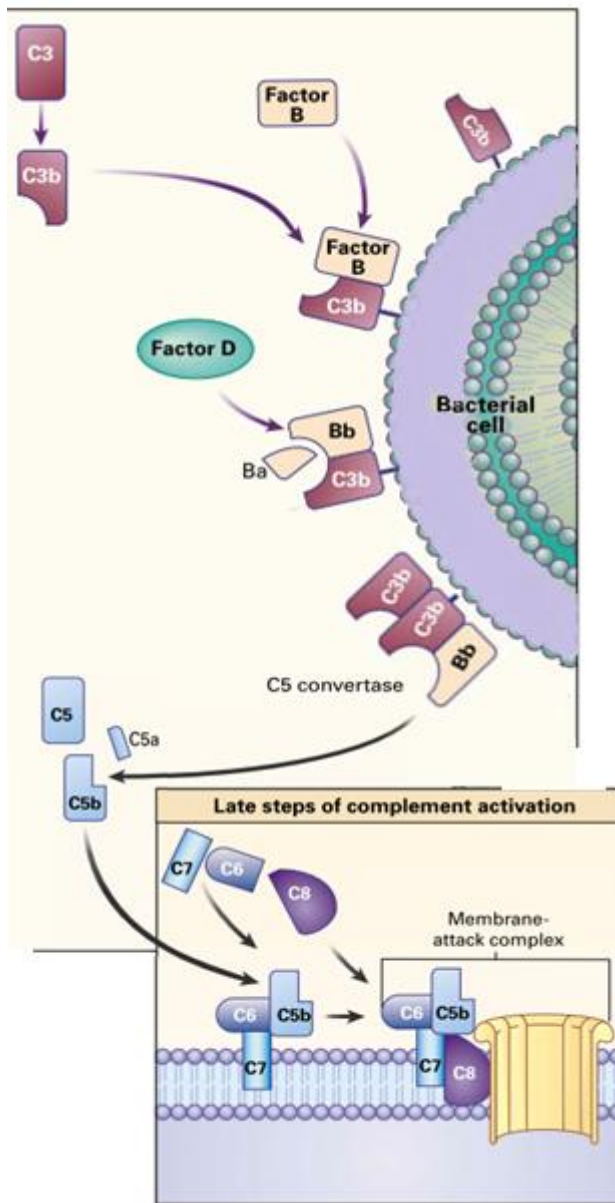
joue cependant aucun rôle dans la résistance à la toxicité en zinc chez *S. pneumoniae* (Plumptre, Hughes, *et al.*, 2014).

## B) Rôle des transporteurs de type Adc dans la virulence

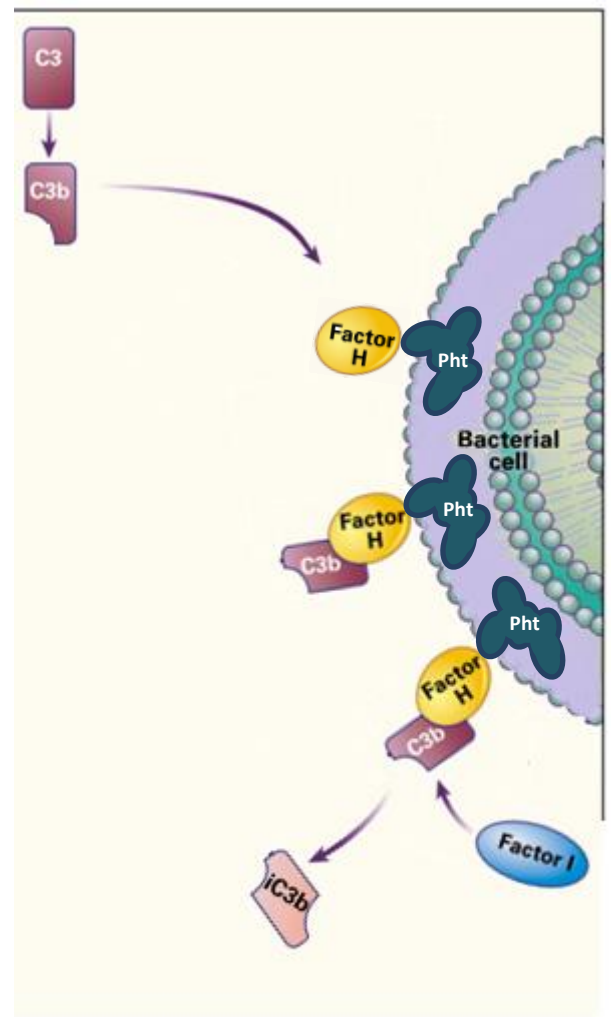
L'étude du fonctionnement des transporteurs de type Adc a mis en évidence l'importance du zinc pour la morphologie et la virulence des bactéries ainsi que la nécessité de posséder un système d'import efficace. L'observation en microscopie électronique de la souche  $\Delta\text{adcA}/\text{adcAII}$  de *S. pneumoniae* en milieu chimiquement défini carencé en zinc a notamment montré une morphologie cellulaire anormale (Bayle *et al.*, 2011). Cette morphologie peut en partie s'expliquer par un mauvais fonctionnement d'une enzyme impliquée dans le renouvellement de la paroi, la L,D-carboxypeptidase DacB dont il a été montré qu'elle nécessite une molécule de zinc pour son fonctionnement (Abdullah *et al.*, 2014). Le zinc joue ainsi un rôle indirect dans la division cellulaire. Des expériences *in vivo* ont également montré un rôle du zinc et du transporteur ABC dans la virulence de *S. pneumoniae* et *S. pyogenes*. La souche  $\Delta\text{adcA}/\text{adcAII}$  de *S. pneumoniae* est en effet avirulente dans les modèles murins d'infection pulmonaire et de septicémie (Bayle *et al.*, 2011). La présence des deux protéines AdcA et AdcAII est également nécessaire pour assurer une colonisation optimale du nasopharynx par *S. pneumoniae* (Plumptre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014). Cependant la protéine AdcAII semble y jouer un rôle plus important (Brown *et al.*, 2016). Selon l'environnement rencontré, les protéines AdcA et AdcAII ne joueraient ainsi pas forcément le même rôle et expliquerait le fait que *S. pneumoniae* possède deux copies de la même protéine. Chez *S. pyogenes*, la souche mutante  $\Delta\text{lsp}$  se trouve être moins virulente que la souche WT dans un modèle murin d'infection sous-cutanée (Weston *et al.*, 2009).

Le rôle des protéines Pht de *S. pneumoniae* dans la virulence de la bactérie a également été étudié. Bien qu'elles semblent avoir un rôle redondant dans la capture de zinc *in vitro*, la présence des quatre protéines Pht est nécessaire *in vivo* (Plumptre, Hughes, *et al.*, 2014). De plus, la hiérarchisation des motifs HT des protéines Pht *in vivo* semble plus complexe que celle observée *in vitro* avec notamment un rôle prépondérant et similaire pour les premier et dernier motifs HT (Eijkelkamp *et al.*, 2015).

A)



B)



**Figure 22. La résistance au complément de *S. pneumoniae*.** (D'après Walport, 2001)

A) Lors d'une infection bactérienne la voie alterne du complément est activée pour l'élimination du pathogène. Cette voie permet au final la formation du complexe d'attaque membranaire au niveau de la bactérie entraînant sa lyse. La première étape consiste à la fixation du complément C3b au niveau de la bactérie puis le recrutement du facteur B. L'ensemble va former une enzyme, la C5 convertase qui va cliver une autre molécule du complément le C5 en C5b et C5a. La molécule de C5b intervient, avec d'autres molécules du complément, dans la formation du complexe d'attaque membranaire permettant la lyse de la bactérie.

B) Pour résister au complément, *S. pneumoniae* détourne une molécule de l'hôte à son avantage. La bactérie va diminuer le dépôt de C3b à sa surface en recrutant le facteur H de l'hôte grâce à ses protéines de type Pht. Le facteur H est une protéine régulatrice de la voie alterne du complément qui agit notamment comme cofacteur du facteur I dégradant le C3b en une molécule inactive iC3b.

## C) Autres rôles des transporteurs de type Adc

### a) Les SBP et protéines de type Pht : des adhésines ?

Le nom de la protéine Lmb de *S. agalactiae* pour « Laminin binding protein » date de 1999 où elle fut décrite pour la première fois comme une adhésine se liant à un composant de la matrice extracellulaire, la laminine (Spellerberg *et al.*, 1999). Des tests de liaison réalisés à partir de la protéine purifiée Lmb ont montré qu'elle est capable de fixer de la laminine humaine ou de souris mais qu'elle ne se fixe ni au collagène de type IV ni à la fibronectine (Spellerberg *et al.*, 1999; Ragunathan *et al.*, 2013). La protéine Lbp de *S. pyogenes* a également été décrite comme une adhésine en fixant la laminine *in vitro* et jouant un rôle dans l'adhérence à des cellules épithéliales pulmonaires et laryngées (Terao *et al.*, 2002; Elsner *et al.*, 2002; Linke *et al.*, 2009). Malgré la forte homologie de séquence protéique avec Lmb, la protéine AdcAII de *S. pneumoniae* ne joue aucun rôle dans la fixation à la laminine (Brown *et al.*, 2016). La protéine Lmb a également été décrite comme jouant un rôle dans l'invasion des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique mais étonnement aucun rôle dans l'adhérence à ces mêmes cellules n'a été observé (Tenenbaum *et al.*, 2007).

De même, les protéines Pht auraient un rôle dans l'adhérence aux cellules épithéliales de l'hôte. Deux études ont ainsi montré un rôle variable des protéines Pht de *S. pneumoniae*, selon la souche utilisée, dans l'adhérence *in vitro* à des lignées d'épithéliums pulmonaires et nasopharyngées (Khan and Pichichero, 2012; Kallio *et al.*, 2014). Le fait que la bactérie possède plusieurs copies des protéines Pht pourrait ainsi s'expliquer par la non redondance de ces protéines dans l'adhérence.

### b) Les protéines de type Pht et la résistance au complément

En parallèle de l'étude du rôle des protéines Pht de *S. pneumoniae* dans l'homéostasie du zinc, plusieurs études ont mis en évidence un rôle joué par les protéines Pht dans la résistance au complément. En effet, les protéines Pht diminuent le dépôt de la protéine C3b du complément à la surface bactérienne grâce au recrutement d'un composant de l'hôte, le facteur H. Or le C3b est une des molécules permettant la formation du complexe d'attaque membranaire pour la lyse de la bactérie (Figure 22). Le C3b est également un ligand aux récepteurs du C3b présents au niveau des macrophages et neutrophiles responsables de la phagocytose des bactéries. Le facteur H est un régulateur de l'activation du complément en



contrôlant l'amplification du C3 via la voie alterne de deux manières. Premièrement il entre en compétition avec le facteur B dans la fixation du C3 prévenant la formation de molécules de C3b. Deuxièmement il diminue la quantité de molécules C3b en agissant comme cofacteur du facteur I qui convertit les molécules de C3b en molécules inactives iC3b (Figure 22). Une analyse par cytométrie de flux a montré un dépôt de C3b significativement plus important à la surface de la souche  $\Delta phtA/phtB/phtD/phtE$  en comparaison à la souche sauvage. Des expériences d'ELISA et de Western blot ont confirmé une liaison directe de facteur H humain aux protéines purifiées PhtA, PhtB, PhtD et PhtE (Ogunniyi *et al.*, 2009). Le rôle des protéines Pht dans la résistance au complément est cependant controversé. Melin et collaborateurs ont en effet observé un dépôt de C3 à la surface bactérienne du mutant  $\Delta phtA/phtB/phtD/phtE$  significativement plus important pour seulement une des cinq souches testées de *S. pneumoniae* (Melin *et al.*, 2010). Des analyses par cytométrie en flux n'ont également pas montré de différence significative de liaison du facteur H entre cinq souches WT et leur souche mutante  $\Delta phtA/phtB/phtD/phtE$  (Melin *et al.*, 2010). La résistance au complément dépendrait ainsi du fond génétique des souches et ne serait pas due majoritairement aux protéines Pht mais plutôt à la présence d'autres protéines, comme la protéine PspC décrite comme fixant fortement le facteur H (Dave *et al.*, 2001; Duthy *et al.*, 2002; Melin *et al.*, 2010).

Ce rôle potentiel dans la résistance au complément par diminution du dépôt de C3 à la surface bactérienne a cependant été observé chez d'autres streptocoques avec les protéines HtpS (HtpsA) et Sht de *S. suis* et *S. agalactiae* respectivement (Maruvada *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2011). Actuellement aucune étude n'a été réalisée pour déterminer un potentiel lien entre la fixation de zinc et le recrutement du facteur H par les protéines Pht.

### **c) Les protéines Pht, des cibles vaccinales ?**

Les protéines Pht étant retrouvées à la surface bactérienne, leur pouvoir immunogène a largement été étudié. L'immunisation par la protéine PhtD de *S. pneumoniae* s'est montrée être protectrice dans un modèle murin d'infection invasive ainsi que chez des singes macaques rhésus après l'infection par *S. pneumoniae* (Adamou *et al.*, 2001; Hamel *et al.*, 2004; Denoël *et al.*, 2011). La protéine PhtD entière a été utilisée lors d'essais cliniques de phase I où elle a été jugée sans danger et conférant un pouvoir immunogène lorsqu'elle était administrée avec des sels d'aluminium comme adjuvants en vaccin monovalent ou vaccin



bivalent (Bologa *et al.*, 2012; Seiberling *et al.*, 2012). L'utilisation combinée des protéines PhtD et PhtE comme vaccin prévient également l'adhérence de *S. pneumoniae* aux cellules épithéliales pharyngées D562 (Khan and Pichichero, 2012). Une récente étude a montré que le zinc augmente la stabilité de la protéine PhtD en présence d'aluminium comme adjuvant suggérant ainsi l'ajout de zinc dans la composition des vaccins (Ausar *et al.*, 2017). Concernant la prévention des infections à *S. suis*, l'utilisation d'anticorps anti-HtpS *in vitro* a montré une augmentation du dépôt de C3 à la surface de la bactérie suivi d'une élimination plus importante de la bactérie dans le sang en comparaison au sang n'ayant pas reçu cet anticorps. Cet anticorps confère également une protection contre l'infection à *S. suis* dans un modèle murin (Shao *et al.*, 2011). De la même manière l'immunisation de souris avec des anticorps anti-HtpA de *S. pyogenes* apporte une protection durable contre l'infection à *S. pyogenes* (Kunitomo *et al.*, 2008).



# **OBJECTIFS DE L'ETUDE**



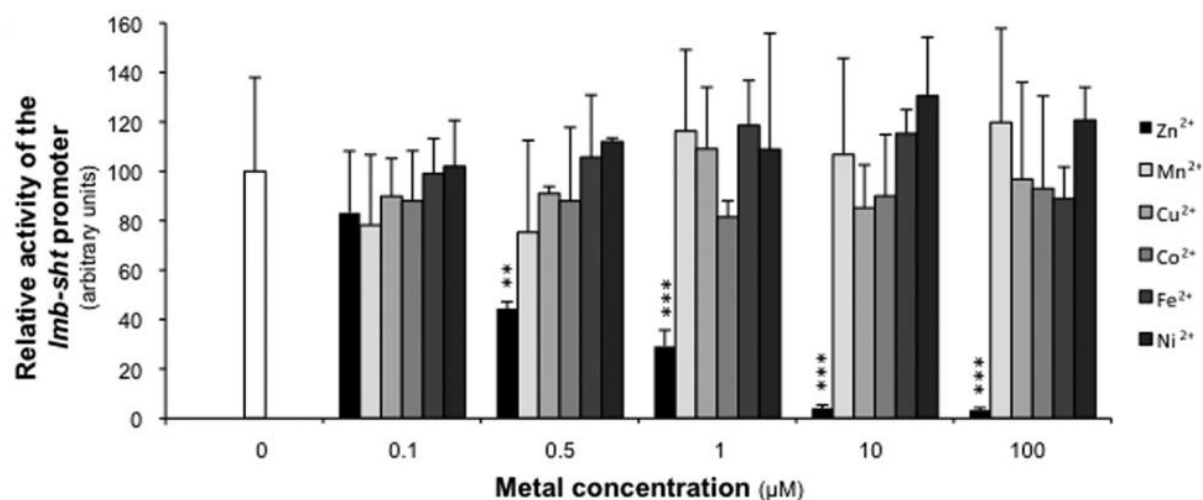
# Introduction

*S. agalactiae* est une bactérie responsable d'infections invasives sévères chez les nouveau-nés, les personnes âgées ou immunodéprimées (septicémie, méningite, arthrite...) (Phares *et al.*, 2008; Skoff *et al.*, 2009; Edmond *et al.*, 2012). Le tropisme de la bactérie pour différents organes suggère une capacité d'adaptation de la bactérie à divers milieux où la disponibilité en nutriments peut être très limitée. Pour assurer sa croissance *S. agalactiae* doit être capable d'importer efficacement ses nutriments comme les ions métalliques. Parmi les métaux utilisés par les bactéries, le zinc est un élément essentiel en servant notamment de cofacteur à diverses métalloenzymes ou facteurs de transcription (Andreini *et al.*, 2006b; Jacobsen *et al.*, 2011). Chez *S. agalactiae* le système d'acquisition du zinc ainsi que son importance sur la physiologie bactérienne n'ont pas encore été étudiés.

## Données préliminaires

Une des thématiques de recherche du laboratoire est la mise en évidence des facteurs assurant à la bactérie une capacité d'adaptation à différentes niches écologiques. Parmi ces facteurs, l'équipe s'est intéressée à la protéine Lmb dont le gène est présent au sein d'un îlot génomique retrouvé majoritairement au niveau des souches humaines. Cette protéine a auparavant été décrite par une autre équipe comme une adhésine à la laminine (Spellerberg *et al.*, 1999). Cependant, par homologie de séquence, elle est classée dans la superfamille des transporteurs ABC et dans la famille des SBP fixatrices de manganèse, zinc et fer. Cet aspect n'ayant jamais été mis en avant, les travaux de l'équipe se sont ainsi orientés sur un second rôle potentiel de la protéine Lmb dans la fixation et le transport de métaux. La protéine Lmb présente, en effet, 35 et 67% d'identité protéique avec les protéines AdcA et AdcAII de *S. pneumoniae*, classées dans la même famille que la protéine Lmb, et décrites comme des protéines fixatrices de zinc (Bayle *et al.*, 2011). Chez *S. pneumoniae*, les protéines AdcA et AdcAII font partie d'un transporteur ABC de zinc composé également d'une perméase AdcB, d'une ATPase AdcC ainsi que de quatre protéines PhtA, PhtB, PhtD et PhtE indispensables à la protéine AdcAII dans l'acquisition du zinc (Figure 14A) (Dintilhac and Claverys, 1997; Bayle *et al.*, 2011; Plumtre, Hughes, *et al.*, 2014).

En partant de l'hypothèse que la protéine Lmb serait une protéine fixatrice de zinc, une recherche sur les génomes séquencés des souches de *S. agalactiae* a été effectuée pour identifier des gènes pouvant coder les autres constituants de l'ABC transporteur de zinc. Des



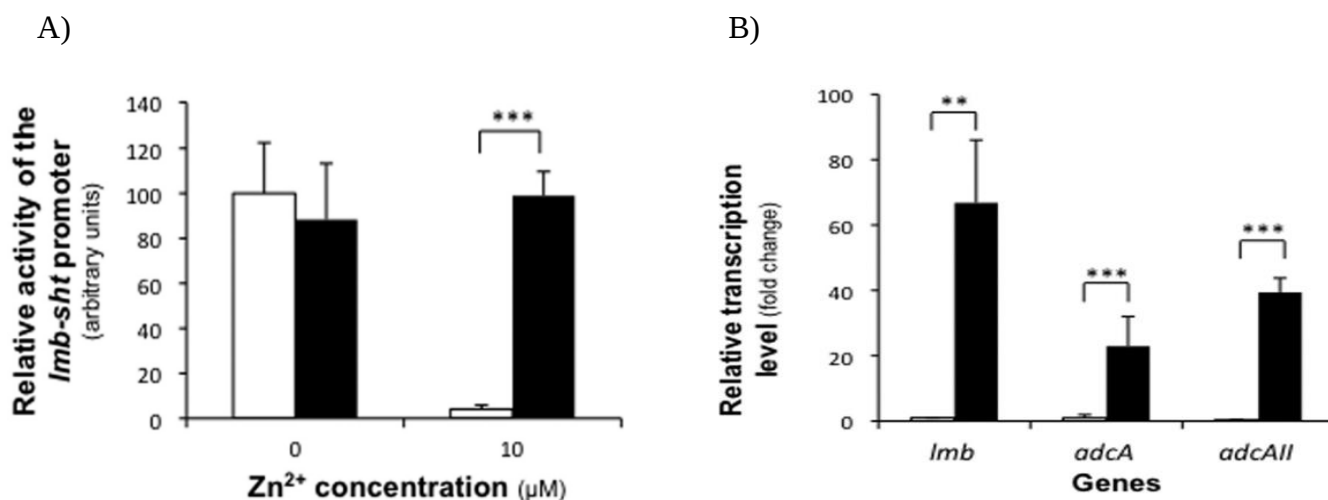
**Figure 23. La régulation de l'opéron *lmb-sht* est dépendante du zinc.** (D'après Moulin *et al.*, 2016)

L'activité du promoteur de l'opéron *lmb-sht* a été mesurée en MCD carencé en zinc auquel différentes concentrations de métaux (0 à 100 μM) ont été ajoutées. Les bactéries ont été cultivées jusqu'à mi-phase exponentielle de croissance ( $DO_{600}$ , 0,5) et des dosages de l'activité  $\beta$ -galactosidase ont été réalisés comme décrit dans le Matériels et Méthodes. La valeur de référence (100%) correspond à l'activité du promoteur de l'opéron *lmb-sht* des cellules cultivées en MCD (0 μM  $Zn^{2+}$  ; barre blanche). Les autres activités ont été calculées en se basant sur cette valeur de référence. Les valeurs présentées sont les moyennes de trois expériences indépendantes avec les barres représentant les écarts-types. Les astérisques correspondent aux valeurs des Plue-value P obtenues avec le test *t* de Student pour échantillons non appariés en comparant les cellules cultivées en MCD carencé en zinc avec celles cultivées avec différentes concentrations de zinc. \*\*,  $P < 0,01$  ; \*\*\*,  $P < 0,001$

gènes, *adcCB*, codant potentiellement le complexe perméase-ATPase ont ainsi pu être mis en évidence. Ces gènes sont en opéron avec un gène codant une protéine régulatrice AdcR mais cet opéron ne possède aucun gène codant de SBP. En revanche, en plus de la protéine Lmb, deux autres SBP ont été identifiées. Nous les avons nommées AdcA et AdcAII par analogie avec les protéines AdcA et AdcAII de *S. pneumoniae*. Chez *S. agalactiae*, le gène *adcAII*, comme pour l'opéron *lmb-sht*, est organisé en opéron avec un gène que nous avons nommé *shtII* par homologie avec le gène *sht*. Les gènes *sht* et *shtII* codent des protéines homologues aux protéines de type Pht de *S. pneumoniae* et le gène *adcA* est monocistronique (Figure 15C). L'hypothèse émise est que les protéines Lmb, AdcA et AdcAII constitueraient les SBP du transporteur ABC de zinc et seraient aidées par les protéines Sht et ShtII dans la capture de zinc. L'ensemble de ces protéines fonctionnerait avec le complexe AdcCB pour former le transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae*.

Les travaux de l'équipe se sont alors focalisés sur la régulation des gènes codant le transporteur ABC putatif. Les SBP de ce transporteur étant classées dans la famille des protéines de liaison du fer, zinc et manganèse, la régulation des gènes codant le transporteur a été étudiée selon la concentration en métaux du milieu. En effet, chez les autres bactéries comme *S. pneumoniae*, l'expression du transporteur ABC de zinc est dépendante de la concentration en zinc du milieu (Plumptre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014). L'expression du promoteur de l'opéron *lmb-sht* a été mesurée en présence de différentes concentrations de métaux par fusion transcriptionnelle *lacZ*. Pour cela, un milieu chimiquement défini (MCD) a été mis au point. Il permet de contrôler les composants du milieu et assure une croissance de la bactérie comparable à celle obtenue en milieux riches comme le milieu TH. Le MCD ne contient pas de métaux dans sa composition (à part du  $MgCl_2$ ) mais il a été nécessaire d'y ajouter de l'EDTA (500  $\mu M$ ) pour chélater les traces de cations et obtenir un milieu sans métaux. Dans la suite de l'étude ce milieu est nommé MCD carencé en zinc. L'activité du promoteur de *lmb-sht* a été mesurée à mi-phase exponentielle de croissance, ce dernier étant exprimé de la même manière quelque soit la phase de croissance. Ce promoteur a montré une diminution de son activité proportionnelle à l'augmentation de la concentration de zinc ajouté dans le MCD avec une activité minimale de l'opéron dès 10  $\mu M$  de zinc ajouté dans le milieu. Cette répression de l'opéron est spécifique du zinc, l'ajout d'autres métaux ( $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  ou  $Ni^{2+}$ ) n'influençant pas l'activité du promoteur de l'opéron *lmb-sht* (Figure 23).

Chez *S. pneumoniae* la régulation par le zinc des gènes codant le transporteur ABC de zinc est médiée par la protéine AdcR (Shafeeq *et al.*, 2011). Chez *S. agalactiae*, le gène



**Figure 24. La protéine AdcR est nécessaire pour la répression par le zinc des gènes *lmb*, *adcA* et *adcAll*.** (D'après Moulin *et al.*, 2016)

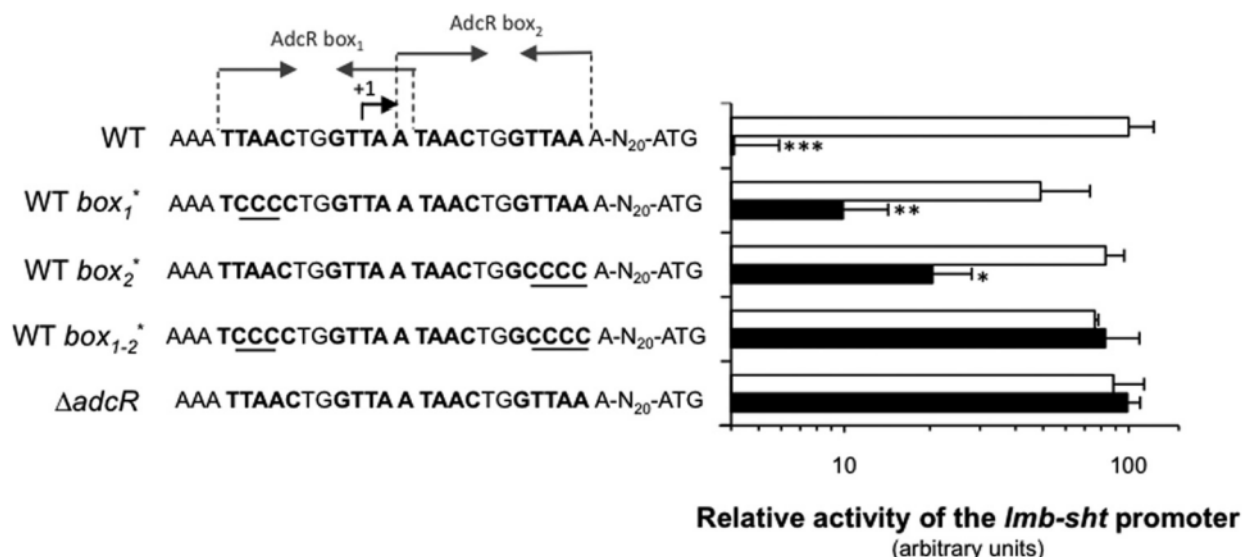
(A) Les souches A909 WT (barre blanche) ou mutante  $\Delta adcR$  (barre noire) ont été cultivées en MCD carencé en zinc ou MCD supplémenté avec 10 μM Zn<sup>2+</sup> jusqu'à mi-phase exponentielle de croissance (DO<sub>600</sub>, 0,5). Les dosages de l'activité β-galactosidase ont été réalisés comme décrit dans le Matériels et Méthodes. La valeur de référence (100) correspond à l'activité du promoteur des cellules cultivées en MCD carencé en zinc. Les résultats sont présentés comme le rapport à cette valeur de référence. Les valeurs présentées sont les moyennes de trois expériences indépendantes avec les barres représentant les écarts-types. (B) Les souches A909 WT (barre blanche) ou mutante  $\Delta adcR$  (barre noire) ont été cultivées en MCD supplémenté avec 10 μM Zn<sup>2+</sup> jusqu'à mi-phase exponentielle de croissance (DO<sub>600</sub>, 0,5). Le niveau d'expression de chaque gène a été normalisé en utilisant le gène *recA*. La valeur de référence (1) correspond au niveau de transcrits du gène *lmb* de la souche WT. L'expression de chaque gène est présentée comme le rapport à cette valeur de référence. Les valeurs obtenues sont les moyennes de trois expériences indépendantes avec les barres représentant les écarts-types. Les astérisques correspondent aux valeurs des Plue-value P obtenues avec le test *t* de Student pour échantillons non appariés pour comparer l'activité du promoteur (A) ou l'expression des gènes (B) des souches WT et  $\Delta adcR$ . \*\*, P < 0,01 ; \*\*\*, P < 0,001

codant ce régulateur est retrouvé en opéron avec les gènes *adcCB*. Pour voir si les gènes du transporteur ABC de zinc sont régulés par la protéine AdcR, la souche mutante  $\Delta adcR$  a été construite. L'activité du promoteur de l'opéron *lmb-sht* a ensuite été mesurée par dosage de l'activité  $\beta$ -galactosidase chez les souches WT et  $\Delta adcR$  après culture en MCD carencé en zinc ou avec 10  $\mu$ M de zinc ajouté. Lorsque la protéine AdcR est absente, la présence de zinc n'a plus d'effet sur l'activité du promoteur de l'opéron *lmb-sht* (Figure 24A). Les mêmes résultats ont été observés par RT-qPCR pour les gènes *adcA* et *adcAII* chez la souche  $\Delta adcR$  (Figure 24B). Ces résultats ont ainsi montré que l'expression des gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* est dépendante du zinc et est régulée par la protéine AdcR. Des recherches *in silico*, ont ensuite identifié la présence d'une ou plusieurs copies d'une séquence palindromique, nommée « AdcR box », au niveau de la région promotrice du gène *adcA* et des opérons *lmb-sht*, *adcAII-shtII*, *adcRCB* pouvant constituer le site de fixation de la protéine AdcR. Pour caractériser ces séquences, des mutations ponctuelles au niveau des deux AdcR box, situées dans la région promotrice de l'opéron *lmb-sht*, ont ensuite été réalisées et l'activité de ce promoteur a été mesurée par dosage  $\beta$ -galactosidase. La modification des AdcR box montre une absence de régulation de l'activité de l'opéron *lmb-sht* en MCD carencé ou avec 10  $\mu$ M de zinc ajouté (Figure 25). Ces résultats nous indiquent qu'en présence d'une concentration suffisante de zinc dans le milieu, le régulateur AdcR vient se fixer au niveau des séquences TTAACNNGTTAA de la région promotrice et bloque la transcription des gènes, ceci paraissant cohérent, la bactérie n'ayant plus besoin d'importateur de zinc. A l'inverse, lors d'une carence de zinc le régulateur AdcR se détache des AdcR box et déréprime les gènes du transporteur de zinc permettant à la bactérie d'importer de nouveau du zinc.

## Objectifs du travail de thèse

L'étude sur la régulation et l'expression des opérons *lmb-sht*, *adcAII-shtII*, *adcCB* et du gène *adcA* confortent l'hypothèse que ces gènes codent des protéines ayant un lien avec le transport de zinc. Les objectifs de ce travail de thèse ont donc été les suivants :

Le premier objectif a consisté à mettre en évidence une implication éventuelle de l'ensemble de ces protéines dans le transport du zinc et de comprendre l'organisation et le fonctionnement de ce transporteur. L'hypothèse émise est en effet que ce transporteur serait composé du complexe perméase-ATPase AdcCB, de trois SBP Lmb, AdcA et AdcAII aidées



**Figure 25. Les deux AdcR box au niveau de la région promotrice de l'opéron *lmb-sht* sont nécessaires pour une répression efficace dépendante du zinc.** (D'après Moulin *et al.*, 2016)

Des fusions transcriptionnelles *lacZ* ont été construites avec la région du promoteur de l'opéron *lmb-sht* portant des mutations ponctuelles qui modifient la séquence palindromique de la première AdcR box (box<sub>1</sub>\*), de la deuxième AdcR box putative (box<sub>2</sub>\*), ou des deux AdcR box (box<sub>1-2</sub>\*). Les fusions *lacZ* contenant les versions native ou modifiée de la région promotrice de l'opéron *lmb-sht* ont été introduites dans la souche WT. La version native de la région promotrice de l'opéron *lmb-sht* a également été introduite dans la souche mutante  $\Delta$ *adcR*. Les dosages de l'activité  $\beta$ -galactosidase ont été réalisés comme décrit dans le Matériels et Méthodes. L'activité relative du promoteur a été mesurée suite à la culture des bactéries contenant 0 (barres blanches) ou 10  $\mu$ M (barres noires) de zinc. La valeur de référence (100) correspond à l'activité du promoteur de l'opéron *lmb-sht* de la souche WT cultivée en MCD carencé en zinc. Les résultats présentés représentent le rapport à cette valeur de référence. Les valeurs obtenues sont les moyennes de trois expériences indépendantes avec les barres représentant les écarts-types. Les positions des AdcR box ont été numérotées en respectant le codon start. Le site d'initiation de la transcription (petite flèche noire) est indiqué avec le +1. Les nucléotides les moins pertinent ont été remplacés par la lettre N. Les nucléotides en gras représentent les deux sites putatifs de fixation de la protéine AdcR. Les nucléotides soulignés correspondent aux mutations ponctuelles effectuées. Les astérisques correspondent aux valeurs des Plue-value P obtenues avec le test *t* de Student pour échantillons non appariés pour comparer l'activité du promoteur de la souche WT cultivée en MCD carencé en zinc avec les autres souches et conditions. \*,  $P < 0,5$  ; \*\*,  $P < 0,01$  ; \*\*\*,  $P < 0,001$

dans la capture de zinc par les protéines Sht et ShtII. Nous avons alors cherché à savoir si l'ensemble de ces protéines est fonctionnel et si elles ont le même impact sur l'import du zinc. Pour étudier ce rôle, des souches mutées pour les différents gènes du transporteur ont été construites et leur croissance en MCD avec différentes concentrations de zinc a été suivie en comparaison avec celle de la souche WT. Les mutations ont été réalisées par délétion propre sans insertion de cassette de résistance permettant de réaliser des délétions multiples.

Le second objectif a été d'étudier l'importance du transporteur et le rôle du zinc sur la physiologie de la bactérie. En utilisant une souche mutante pour les gènes codant le transporteur de zinc nous avons pu observer les effets d'une carence de zinc sur la physiologie de la bactérie et ainsi déterminer quelques fonctions biologiques dans lequel le zinc est impliqué. Le choix des phénotypes à observer s'est basé sur des rôles décrits du zinc pour le fonctionnement d'enzymes chez différentes bactéries. Des milieux biologiques humains ont également été utilisés et choisis parmi ceux où la bactérie est retrouvée lors d'infections.

Le dernier objectif a été de déterminer si les protéines du transporteur ont un second rôle. La protéine Lmb ainsi que sa protéine homologue Lbp chez *S. pyogenes* ont, en effet, été décrites comme des adhésines (Spellerberg *et al.*, 1999; Terao *et al.*, 2002). Les protéines AdcA et AdcAII de *S. agalactiae* présentant une forte identité protéique avec la protéine Lmb, nous avons étudié le rôle de ces protéines dans l'adhérence. Les protéines de type Pht de *S. pneumoniae* et la protéine HtpS (HtpsA) de *S. suis* ont été décrites comme jouant un rôle dans la résistance au complément en diminuant le dépôt de C3b à la surface bactérienne grâce au recrutement du facteur H (Ogunniyi *et al.*, 2009; Shao *et al.*, 2011). Ce rôle a également été décrit pour la protéine Sht de *S. agalactiae* mais n'a pas été étudié pour son homologue ShtII (Maruvada *et al.*, 2009). Nous avons ainsi purifié les protéines Sht et ShtII de *S. agalactiae* et observé leur fixation au facteur H au moyen de tests ELISA. La résistance au complément a également été étudiée en comparant la survie de différentes souches mutées pour les gènes *sht* et *shtII* à la souche WT dans du sang versus du sang décomplémenté.

Pour cette étude la souche de référence A909 de *S. agalactiae* a été utilisée. Cette souche de sérotype Ia a été isolée d'un nouveau-né atteint de septicémie. Elle est ainsi un exemple des souches retrouvées en pathologie humaine et présente l'avantage d'avoir son génome séquencé et annoté (Tettelin *et al.*, 2005).



Les résultats obtenus ont été partagés en deux publications. La première étude publiée s'est intéressée à la caractérisation des protéines Lmb, AdcA et AdcAII et du complexe AdcCB en étudiant la régulation de leurs gènes, leur rôle dans le transport du zinc et l'importance du zinc dans la physiologie de la bactérie. La deuxième publication, en cours de préparation, se focalise sur les protéines Sht et ShtII en étudiant leur implication dans le transport du zinc ainsi que leur second rôle. Pour la suite du manuscrit, les résultats présentés suivent le plan de ces deux publications :

- I) Le système Adc/Lmb assure le transport de zinc chez *S. agalactiae* et contribue à la croissance et la survie de la bactérie (Publication 1).
- II) Les protéines streptococciques à triade d'histidine Sht et ShtII participent à l'acquisition du zinc au sein du transporteur Adc/Lmb et contribuent à la résistance au complément (Publication 2).



# RESULTATS



# **I) Le système Adc/Lmb assure le transport de zinc chez *S. agalactiae* et contribue à la croissance et la survie de la bactérie**

La protéine Lmb, bien que décrite comme une adhésine à la laminine, est classée dans la famille des SBP fixatrices de zinc, fer ou manganèse. Elle présente également une forte identité protéique avec la protéine AdcAII de *S. pneumoniae*, décrite comme une SBP du transporteur ABC de zinc. Nous avons émis l'hypothèse que la protéine Lmb ferait partie du transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae* en association avec les protéines suivantes : deux SBP supplémentaires, AdcA et AdcAII, le complexe perméase-ATPase AdcCB et les protéines Sht et ShtII.

L'objectif de ce travail a ainsi été de caractériser le transporteur ABC de zinc identifié chez *S. agalactiae* et d'étudier son importance ainsi que le rôle du zinc dans la physiologie de la bactérie. Pour répondre à ces objectifs, l'étude s'est décomposée en trois parties.

## **1) Etude de l'expression et de la régulation des gènes codant le transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae***

Chez de nombreuses bactéries, l'expression des gènes codant leur transporteur de zinc est dépendante de la concentration en zinc du milieu (Ma *et al.*, 2009; Shafeeq *et al.*, 2011). Pour les streptocoques cette régulation par le zinc est médiée au moyen du métallorégulateur AdcR (Manzoor, Shafeeq, Afzal, *et al.*, 2015; Sanson *et al.*, 2015).

L'expression des gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* du transporteur a été étudiée par fusion transcriptionnelle *lac-Z* et qRT-PCR à partir de la souche A909 WT de *S. agalactiae* cultivée en MCD avec différentes concentrations de métaux. Une partie de ces expériences a été réalisée au préalable au laboratoire puis ces expériences ont été finalisées lors de ce travail de thèse. Ces résultats ont montré que les gènes codant les SBP du transporteur sont réprimés par le zinc et que leur expression est minimale dès que 10  $\mu$ M de zinc sont ajoutés dans le milieu (Moulin *et al.*, 2016). Ces mêmes techniques appliquées à la souche mutante  $\Delta$ *adcR* ont mis



en évidence que cette répression par le zinc se réalise via la protéine AdcR. Enfin nous avons identifié les séquences de fixation de la protéine AdcR au niveau des régions promotrices des opérons *adcRCB*, *lmb-sht*, *adcAII-shtII* et du gène *adcA* du transporteur (Moulin *et al.*, 2016). L'ensemble de ces résultats va ainsi dans le sens de l'hypothèse que ces gènes coderaient un transporteur ABC de zinc.

## 2) Implication du complexe AdcCB et des SBP Lmb, AdcA et AdcAII dans l'acquisition de zinc

Pour étudier l'implication de chacune des protéines identifiées dans l'acquisition de zinc, nous avons réalisé la construction de différentes combinaisons de souches mutées pour les gènes *adcCB*, *lmb*, *adcA* et *adcAII*. Leur croissance a ensuite été comparée à celle de la souche A909 WT dans un MCD contenant différentes concentrations de métaux. Nous avons observé que la souche  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  est incapable de croître dans un milieu MCD carencé en zinc indiquant une redondance fonctionnelle des protéines Lmb, AdcA et AdcAII dans l'acquisition du zinc (Moulin *et al.*, 2016). Les trois protéines doivent en effet être absentes pour observer un phénotype différent de la souche WT. Une absence de croissance a également été observée pour les souches  $\Delta adcCB$  et  $\Delta adcCB/lmb/adcA/adcAII$  en MCD carencé en zinc montrant que les trois SBP Lmb, AdcA et AdcAII forment ainsi, avec le complexe AdcCB, le transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae*. Enfin, la croissance de ces souches est restaurée en ajoutant du zinc dans le milieu, mais pas par l'ajout d'autres métaux, indiquant l'implication des protéines dans le transport spécifique de zinc.

## 3) Rôle du zinc dans la physiologie de *S. agalactiae*

Dans cette dernière partie, l'importance du zinc et l'impact du transporteur Adc/Lmb sur la physiologie de *S. agalactiae* ont ensuite été étudiés. Le zinc est connu pour être un cofacteur de nombreuses enzymes dont certaines intervenant dans la synthèse de la paroi et la division cellulaire (Sun *et al.*, 2011; Andreini and Bertini, 2012). Nous avons ainsi observé par microscopie optique, les souches WT et mutantes  $\Delta adcCB$ ,  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  suite à leur culture en MCD carencé en zinc. Lorsque le transporteur de zinc n'est pas fonctionnel (souches  $\Delta adcCB$  ou  $\Delta lmb/adcA/adcAII$ ) les bactéries sont retrouvées sous forme de simples coques, de diplocoques ou d'agrégats contrairement à la souche WT formant des chainettes



(Moulin *et al.*, 2016). Nous avons ainsi montré que le zinc est essentiel pour assurer une morphologie normale de la bactérie.

Par des expériences de compétition entre les souches WT et  $\Delta adcCB$  ou  $\Delta lmb/adcA/adcAII$ , nous avons également pu observer que le transporteur de zinc participe à la survie de la bactérie en milieux biologiques humains, dans lesquels la bactérie est retrouvée lors d'infections, et qu'il constitue, dans les conditions testées de forte carence en zinc, le principal système d'acquisition du zinc de *S. agalactiae* (Moulin *et al.*, 2016).

Ces travaux sont développés dans la publication qui suit.



# PUBLICATION N°1

## **The Adc/Lmb System Mediates Zinc Acquisition in *Streptococcus agalactiae* and Contributes to Bacterial Growth and Survival**

**Pauline Moulin**, Kévin Patron, Camille Cano, Mohamed Amine Zorgani, Emilie Camiade, Elise Borezée-Durant, Agnès Rosenau, Laurent Mereghetti, Aurélia Hiron

J Bacteriol. 2016 ; 198:3265–3277

PMID : 27672194



# The Adc/Lmb System Mediates Zinc Acquisition in *Streptococcus agalactiae* and Contributes to Bacterial Growth and Survival

Pauline Moulin,<sup>a</sup> Kévin Patron,<sup>a</sup> Camille Cano,<sup>a</sup> Mohamed Amine Zorgani,<sup>a</sup> Emilie Camiade,<sup>a</sup> Elise Borezée-Durant,<sup>b</sup> Agnès Rosenau,<sup>a,c</sup> Laurent Mereghetti,<sup>a,c</sup> Aurélia Hiron<sup>a</sup>

ISP, Université François Rabelais Tours, INRA, UMR1282, Tours, France<sup>a</sup>; Micalis institute, AgroParis Tech, Université Paris-Saclay, Jouy en Josas, France<sup>b</sup>; CHRU de Tours, Service de Bactériologie-Virologie et Hygiène, Tours, France<sup>c</sup>

## ABSTRACT

The Lmb protein of *Streptococcus agalactiae* is described as an adhesin that binds laminin, a component of the human extracellular matrix. In this study, we revealed a new role for this protein in zinc uptake. We also identified two Lmb homologs, AdcA and AdcAII, redundant binding proteins that combine with the AdcCB translocon to form a zinc-ABC transporter. Expression of this transporter is controlled by the zinc concentration in the medium through the zinc-dependent regulator AdcR. Triple deletion of *lmb*, *adcA*, and *adcAII*, or that of the *adcCB* genes, impaired growth and cell separation in a zinc-restricted environment. Moreover, we found that this Adc zinc-ABC transporter promotes *S. agalactiae* growth and survival in some human biological fluids, suggesting that it contributes to the infection process. These results indicated that zinc has biologically vital functions in *S. agalactiae* and that, under the conditions tested, the Adc/Lmb transporter constitutes the main zinc acquisition system of the bacterium.

## IMPORTANCE

A zinc transporter, composed of three redundant binding proteins (Lmb, AdcA, and AdcAII), was characterized in *Streptococcus agalactiae*. This system was shown to be essential for bacterial growth and morphology in zinc-restricted environments, including human biological fluids.

*Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus [GBS]) is a Gram-positive commensal bacterium of the human gastrointestinal and uro-genital tracts. GBS carriage is mostly asymptomatic in healthy adults, and this bacterium is detected in the vagina of approximately 30% of pregnant women. Maternal carriage is the main source of transmission to neonates, in which *S. agalactiae* can cause invasive infections (pneumonia, septicemia, and meningitis), with an overall mortality rate of approximately 10% (1, 2). GBS is also an emergent pathogen among the elderly and in adults with underlying diseases (1, 3).

The ability of GBS to colonize different niches and cause infection is multifactorial, and many virulence-associated proteins have been identified (4, 5). Binding of GBS adhesins to components of the extracellular matrix constitutes a crucial first step in the process of infection (6–9). Among them, the Lmb protein has been identified as a GBS receptor for laminin, a glycosylated multidomain protein found in all human tissues (10). The gene encoding Lmb is located on a transposon with the *scpB* and *sht* genes, which encode a C5a peptidase and a histidine triad protein, respectively (11, 12). The *lmb* promoter region is a hot spot for the integration of two mobile genetic elements. One of them is associated with increased expression of *lmb*, resulting in increased binding of strains harboring the transposon to laminin (13). It has also been shown that Lmb may promote bacterial invasion in human brain microvascular endothelial cell lines (14).

Lmb is clustered by sequence homology as a metal-binding receptor. Indeed, Lmb has strong homology with the zinc-binding proteins AdcA and Lbp of other streptococcal species (15, 16). The crystal structure of Lmb has also been resolved and revealed the presence of a bound zinc in a metal-binding crevice (17, 18). Until now, studies have only been focused on its function as an adhesin,

despite evidence suggesting that Lmb may be involved in zinc uptake.

Zinc (Zn<sup>2+</sup>) is a trace element that is essential for most living cells. It is a cofactor for a number of essential prokaryotic enzymes and transcriptional regulators (19). In the human body, the zinc concentration varies from 1.5 μM in cerebrospinal fluid to over 100 μM in lung tissue (20, 21). Pathogenic bacteria must adapt zinc transport mechanisms to accommodate these differences to both avoid toxicity and meet their requirements for this metal. An important determinant of resistance against elevated levels of Zn in *Streptococcus pneumoniae* is the CzCD-SczA system, which is conserved among *Streptococcus* species (22). In contrast, during starvation zinc acquisition in streptococci is mostly performed by an ATP-binding cassette (ABC) transporter. It is composed of one or several metal-binding proteins (AdcA, Lbp, or Lmb), an integral membrane component (AdcB), and an ATPase (AdcC) (21). The streptococcal AdcR repressor, a MarR family regulatory protein, is involved in the regulation of zinc uptake genes (23). In the

Received 12 August 2016 Accepted 16 September 2016

Accepted manuscript posted online 26 September 2016

Citation Moulin P, Patron K, Cano C, Zorgani MA, Camiade E, Borezée-Durant E, Rosenau A, Mereghetti L, Hiron A. 2016. The Adc/Lmb system mediates zinc acquisition in *Streptococcus agalactiae* and contributes to bacterial growth and survival. J Bacteriol 198:3265–3277. doi:10.1128/JB.00614-16.

Editor: A. M. Stock, Rutgers University Robert Wood Johnson Medical School

Address correspondence to Aurélia Hiron, aurelia.hiron@univ-tours.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00614-16>.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.



presence of adequate intracellular zinc concentrations, AdcR binds to its target genes and inhibits their expression. AdcR repression is relieved during zinc starvation, allowing bacteria to efficiently adapt the expression of zinc acquisition systems to their needs for this metal (24–27).

In several pathogenic streptococci, deletion of one or several components of the Adc zinc-ABC transporter results in lower growth under zinc-restricted conditions as well as decreased virulence, adhesion, and biofilm formation, underlining the importance of zinc metabolism during colonization and infection (16, 21, 28–30). Concerning *S. agalactiae*, the role of zinc is still poorly documented, and no zinc transporter has yet been characterized.

In this study, we show that Lmb, together with the AdcA, AdcAII-binding proteins, and the AdcCB translocon, compose a zinc transporter. The expression and the role of this transporter in the bacterium's physiology were examined.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** The reference wild-type (WT) GBS strain used in this study was strain A909, a sequence type 7 (ST7), clonal complex 7 (CC7), serotype IA clinical isolate from a human case of septicemia. The *Escherichia coli* and *S. agalactiae* strains used in this study are listed in Table S1 in the supplemental material. *E. coli* strains were routinely grown in Luria-Bertani (LB) medium (catalog number 1005317; MP, Solon, OH, USA) at 37°C with agitation (220 rpm) or on LB agar plates (1.5% agar). *S. agalactiae* strains were routinely grown in Todd-Hewitt (TH) broth (catalog number T1438; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 37°C without agitation and on TH agar or brain heart infusion agar (BHI agar; catalog number EAB140102; AES, Bruz, France). When necessary, *E. coli* and *S. agalactiae* strains were grown with erythromycin (150 µg/ml for *E. coli* and 10 µg/ml for *S. agalactiae*).

**Growth of bacteria in chemically defined medium.** *S. agalactiae* strains were cultured in a liquid chemically defined medium (CDM; 8.3 g/liter Dulbecco's modified Eagle medium base [catalog number D5030; Sigma-Aldrich], 1× BME vitamins, 74 µM adenine, 89.2 µM uracil, 65.7 µM xanthine, 66.2 µM guanine, 1123.5 µM D,L-alanine, 757 µM L-asparagine, 1,127 µM L-aspartic acid, 684.5 µM L-glutamine, 1,019.5 µM L-glutamic acid, 868.6 µM L-proline, 734.9 µM L-tryptophan, 4,125.4 µM L-cysteine, 12 µM lipoic acid, 1 µM pyruvate; pH 7.4). All CDM components were from Sigma-Aldrich.

To obtain zinc-restricted CDM, 500 µM EDTA (catalog number E5134; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a chelating agent, was added to remove residual traces of metal ions. Addition of EDTA had no discernible effect on *S. agalactiae* growth compared to growth in CDM without EDTA or growth in CDM with a mix of metals (17.4 µM ZnSO<sub>4</sub>, 10.5 µM CoCl<sub>2</sub>, 0.4 µM CuSO<sub>4</sub>, 147.9 µM MnSO<sub>4</sub>).

Bacterial growth experiments were performed in 96-well microtiter plates (Greiner Bio-One; Cellstar) (300-µl culture volume). A bacterial overnight culture grown in TH was used to inoculate a zinc-restricted CDM culture (optical density at 600 nm [OD<sub>600</sub>], 0.005) grown for 8 h that was then used to inoculate wells (OD<sub>600</sub>, 0.005) containing zinc-restricted CDM with various ZnSO<sub>4</sub> concentrations (from 0 to 100 µM). Before each inoculation, cells were pelleted and washed in Milli-Q water. Plates were incubated for 18 h at 37°C in an Eon thermo-regulated spectrophotometer plate reader (BioTek Instruments). The OD<sub>600</sub> was measured every hour after double orbital shaking of the plate for 5 s.

**Chromosomal and plasmidic DNA purification.** Chromosomal DNA of *S. agalactiae* cultured overnight without agitation in TH (37°C) was purified as previously described (31). *E. coli* plasmids were purified with a NucleoSpin plasmid kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration was measured with a NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo Scientific). The ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm was used to assess purity.

**DNA sequencing.** PCR products purified with the NucleoSEQ kit (Macherey-Nagel) were sequenced on both strands by using the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and the ABI Prism 310 genetic analyzer.

**PCR.** Oligonucleotides (Eurogentec and Sigma-Aldrich) used in this study are listed in Table 1. Analytical PCR used standard OneTaq polymerase (New England BioLabs [NEB]) and PCR for cloning or sequencing was carried out with Q5 high-fidelity DNA polymerase (NEB). The resulting PCR fragments were purified with a NucleoSpin gel and PCR cleanup kit (Macherey-Nagel), according to the manufacturer's instructions.

**RNA extraction.** Total RNA was extracted from mid-exponential-phase cells (OD<sub>600</sub> of 0.5) growing in CDM. The bacteria were lysed mechanically with glass beads in a FastPrep-24 instrument, and total RNAs were extracted with a phenol/TRIZOL-based purification method previously described (32). The concentration and purity of RNA were assessed with a NanoDrop Lite spectrophotometer (Thermo Scientific) and analysis of the A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratio. A DNase (Turbo DNA-free DNase; Ambion) treatment of the purified RNAs was then realized. Control PCR mixtures, with 50 µg of purified RNAs, were performed to check for DNA contamination. (Primer pairs are detailed in Table 1.)

### Reverse transcription and quantitative reverse transcriptase PCR.

For reverse transcription and quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR), the RNAs were reverse transcribed by using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. Primers were selected with Primer3web software (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) in order to design 100- to 200-bp amplicons (Table 1 lists the primer sequences). qRT-PCRs were performed in a 20-µl reaction volume containing 40 ng of cDNA, 0.5 µl of gene-specific primers (10 µM), and 1× LightCycler 480 SYBR green I mix (Roche). PCR amplification, detection, and analysis were performed with the LightCycler 480 PCR detection system and LightCycler 480 software (Roche). PCR conditions included an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by a 40-cycle amplification (95°C for 10 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 20 s). The specificity of the amplified product and the absence of primer dimer formation were verified by generating a melting curve (65°C to 98°C, continuous increase). The crossing point (C<sub>p</sub>) was defined for each sample. The expression levels of the tested genes were normalized using the *gyrB* (primers OLM021 and OLM022) or *recA* (primers OLM321 and OLM322) genes ("reference genes" in the first equation below) of *S. agalactiae* as internal standards whose transcript levels did not vary under our experimental conditions (see Table 1 for the primer sequences). The fold change in the transcript level was calculated using the following equations:  $\Delta C_p = C_{p(\text{target gene})} - C_{p(\text{reference gene})}$ ;  $\Delta\Delta C_p = \Delta C_{p(\text{reference condition})} - \Delta C_{p(\text{test condition})}$ ; ratio =  $2^{-\Delta\Delta C_p}$ . Each assay was performed in duplicate and repeated with at least three independent RNA samples.

**5'-RACE PCR.** *S. agalactiae* strain A909 was grown in zinc-restricted CDM at 37°C without agitation until the mid-exponential phase of growth (OD<sub>600</sub>, 0.5). Total RNAs of growing cells were extracted as described above, and the 5' end of the *lmb-shf* operon mRNA was determined using a 5'/3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR kit (second generation; Roche Applied Science). Two *lmb* antisense specific primers (OAH068 and OAH069) were designed (Table 1) to produce cDNAs. Control RT-PCRs, omitting reverse transcriptase, were performed to check for DNA contamination of the RNA preparation with appropriate primers (Table 1).

**Construction of *lmb*, *adcA*, *adcAII*, *adcCB*, and *adcR* deletion mutants.** *S. agalactiae* A909Δ*lmb* is a nonpolar mutant of strain A909 with a deletion of the entire coding sequence of *lmb* (*sak\_1319*) that was achieved via allelic exchange. Upstream and downstream flanking regions of *lmb* were amplified by PCR with primer pairs OAH024/OAH025 and OAH026/OAH027, respectively. A recombination cassette, consisting of a fusion between these two regions, was obtained by using splicing-by-overlap extension PCR with primers OAH024 and OAH027 (Table 1). To



TABLE 1 Oligonucleotides used in this study

| Primer use and name              | Sequence <sup>a</sup>                          |
|----------------------------------|------------------------------------------------|
| Deletion of <i>adcR</i>          |                                                |
| OAH003                           | TTAATCGAATTCGGAATCTTCAAATGGACTATG              |
| OAH004                           | ATGATTACCCCTTCTAGTTCTAAACTGTCATATA<br>TACCTC   |
| OAH005                           | TGACAGTTTTAGAACTAGAAGGGTAATCATGCGA<br>TAT      |
| OAH006                           | ACATTGGGATCCCGCCATGGTAAAGATTGGTTCC             |
| Deletion of <i>adcCB</i>         |                                                |
| OAH074                           | ATGACAGAATTCGAACAAAAATTAGACCATTAG<br>TGAG      |
| OAH015                           | TGCGAAGCAAGCCTACGCATGATTACCCTTCTAA<br>TTCTCT   |
| OAH016                           | AAGGGTAATCATGCGTAGGCTTGCTTCGCAAACG<br>TTAA     |
| OAH075                           | ATACTGGATCCCAGATACAAATAATGTAGCTC<br>CCC        |
| Deletion of <i>lmb</i>           |                                                |
| OAH024                           | AGGCTGGAATTCCTGGAAGGCGCTACTGTTCC               |
| OAH025                           | CTCCTTTACTTCAACCTTTTTCATAGTACCTC<br>CTCAATT    |
| OAH026                           | TACTATGAAAAAGGGTTGAAGTAAAGGAGATT<br>ATTAGTGAAG |
| OAH027                           | GGCTTGGGATCCAGCTAGCTCACTTGGAGAC                |
| Deletion of <i>adcAII</i>        |                                                |
| OAH040                           | AAAATCGAATTCACCGTGTTAATCAAGCAAGTG              |
| OAH062                           | TAAAGGTACCTCCGTATCCTTTTCATTAAACCTCC            |
| OAH063                           | TTAGGTACCTAGGTAGTTATATAAAGAAAGGACG             |
| OAH043                           | TACTAAGGATCCATCTCCCATGTCATCAATGAC              |
| Deletion of <i>adcA</i>          |                                                |
| OAH086                           | AATCGTGGTACCGCAGCTCTAGCAGATCCACAC              |
| OAH076                           | ATAAAGCTTGAAATTTCTTTCTCATTTTCTCC               |
| OAH077                           | ATGAAGCTTCATTAATATTTAAAGATGATAT<br>CGG         |
| OAH087                           | CATCCAGGATCCCGTCCAGTTGTTTCTTAGA<br>TAC         |
| Complementation of <i>lmb</i>    |                                                |
| OAH115                           | TAAATTAGATCTGGAGGTACTATGAAAAA                  |
| OAH102                           | TAATAACTGCAGTTACTTCAACTGTTGATAGAGC             |
| Complementation of <i>adcAII</i> |                                                |
| OAH119                           | AAAATAAGATCTGGAGGTTAATGAAAAGG                  |
| OAH104                           | TTATATCTGCAGCTATTGATTTAACGATTTG                |
| Complementation of <i>adcA</i>   |                                                |
| OAH120                           | GTTAAAAGATCTGGAGGAAAAATGAGAAAG                 |
| OAH121                           | ATCTTTTCTAGATTAATGAGACATAAGGTC                 |
| Transcriptional fusion           |                                                |
| OAH122                           | TAGTTAGAATTCCTTTCTTCTGGGATTAGTAGC              |
| OAH009                           | TTCCGATCCCTCCTCAATTATAATTAAACAGT<br>TATTAAC    |

TABLE 1 (Continued)

| Primer use and name  | Sequence <sup>a</sup>                      |
|----------------------|--------------------------------------------|
| OAH034               | GGTCTCGCCAGTTAATTTACTCCTTTATCAA<br>TGC     |
| OAH035               | GGTCTCGCTGGCCATAACTGGTTAAATTATAA<br>TTGAGG |
| OAH022               | GGTCTCGCCCCCAGTTATTAACCAGTTAA              |
| OAH023               | GGTCTCGGGGATTATAATTGAGGAGGTACTATG          |
| 5'-RACE PCR          |                                            |
| OAH068               | GCACCTGATTGGATCATCCTCAC                    |
| OAH069               | GCTGGTTACAACCTGACATGCCTTG                  |
| qRT-PCR              |                                            |
| OAH053 <i>lmb</i>    | TAGTAATGATAGCAGGGTGTGATAAGTC               |
| OAH054 <i>lmb</i>    | AGATACTTCTTTTGTGCATCGCATACATT              |
| OAH047 <i>adcA</i>   | TTGGGATTACAAAGCTAAATCTAAAAA                |
| OAH048 <i>adcA</i>   | ATCTTGATTGATTCTACGTCAGTCTTG                |
| OAH051 <i>adcAII</i> | GCATAAAATCATAGGAAAGCATATCAA                |
| OAH052 <i>adcAII</i> | GCTAAGTATGAGAATGCTGTATGTGAAG               |
| OLM321 <i>recA</i>   | CTGGTGGTCTGCTTTTGAAA                       |
| OLM322 <i>recA</i>   | TATGCTCACCAGTCCCCTTG                       |
| OLM021 <i>gyrB</i>   | GCTCACATCAGAACTTTACTTTTAACTC               |
| OLM022 <i>gyrB</i>   | TTTAATCTCACTTCTACTTTTGACACC                |

<sup>a</sup> Added restriction site sequences are shown in bold.

carry out chromosomal gene inactivation, appropriate PCR fragments (overlap extension) were cloned into the EcoRI/BamHI restriction sites of the thermo-sensitive shuttle plasmid pG+host1 (see Table S1 in the supplemental material).

The same cloning strategy was applied to obtain the  $\Delta$ *adcA* (*sak*<sub>0685</sub>), the  $\Delta$ *adcAII* (*sak*<sub>1898</sub>), the  $\Delta$ *adcCB* (*sak*<sub>0218</sub> and *sak*<sub>0219</sub>), and the  $\Delta$ *adcR* (*sak*<sub>0217</sub>) mutant strains, except that fusion between upstream and downstream regions of *adcAII* was obtained using the PstI restriction site. Upstream and downstream regions of *adcA* were amplified by PCR with primer pairs OAH086/OAH076 and OAH077/OAH087, respectively. Upstream and downstream regions of *adcAII* were amplified by PCR with primer pairs OAH040/OAH062 and OAH063/OAH043, respectively. Upstream and downstream regions of *adcR* were amplified by PCR with primer pairs OAH003/OAH004 and OAH005/OAH006, respectively. Upstream and downstream regions of *adcCB* were amplified by PCR with primer pairs OAH074/OAH015 and OAH016/OAH075, respectively.

The recombinant plasmids were electroporated in *E. coli* cells for amplification and then purified and electroporated in strain A909 (see Table S1 in the supplemental material). Allelic exchange was performed as previously described (33). Deletions of genes were confirmed by PCR and sequencing.

#### Generation of *lmb*, *adcA*, and *adcAII* complementation constructs.

To complement the  $\Delta$ *lmb* mutant strain, the entire coding sequence of *lmb* was amplified by PCR with primers OAH115 and OAH102. The PCR fragment was cloned into the PstI/BglIII restriction sites of the pTCV-P<sub>Tet</sub> plasmid, a derivative of the shuttle vector pTCV and carrying a constitutively expressed Gram-positive promoter sequence (34) (see Table S1 in the supplemental material). In the same way, the  $\Delta$ *adcA* mutant strain was complemented using primers OAH120 and OAH121 and cloned with the XbaI/BglIII restriction sites. The  $\Delta$ *adcAII* mutant strain was complemented using primers OAH119 and OAH104 and cloned with the BglIII/PstI restriction sites.

The recombinant pTCV-P<sub>Tet</sub> plasmids were electroporated in *E. coli* cells for amplification and purified, and then gene sequences were confirmed before electroporation in the A909 strain.



**Construction of *lacZ* transcriptional fusions.** Plasmid pTCV-*lac*, which carries a promoterless *lacZ* gene (35), was used to construct transcriptional *lacZ* reporter fusions (see Table S1 in the supplemental material). The promoter region of *lmb* was amplified by PCR using primers OAH122 and OAH009, and the PCR fragment was cloned into the EcoRI/BamHI restriction sites of the plasmid pTCV-*lac* (Table 1).

The sequence of the conserved 10-bp palindromic motif potentially constituting the AdcR-binding site (AdcR box) was obtained from the RegPrecise database maintained by the Lawrence Berkeley National Laboratory (<http://regprecise.lbl.gov/>). Site-tagged mutagenesis was performed to obtain the *adcR box*<sub>1</sub>\* and *adcR box*<sub>2</sub>\* coding sequences, in which 3 nucleotides for *adcR box*<sub>1</sub>\* and 4 nucleotides *adcR box*<sub>2</sub>\* were replaced so as to destroy the palindromic operator sequence without disturbing RNA polymerase fixation. For each construction, two DNA fragments were generated by PCR using primer pairs OAH122/OAH034 and OAH035/OAH009 for the *adcR box*<sub>1</sub>\* mutation or OAH122/OAH022 and OAH023/OAH009 for the *adcR box*<sub>2</sub>\* mutation. The point mutations were obtained using oligonucleotides containing 3 or 4 mismatches (OAH035 and OAH023) and also carrying BsaI restriction sites; the type IIS restriction endonuclease, which cleaves after its restriction site, generated DNA fragments with tetranucleotide cohesive ends (Table 1). Following digestion with BsaI (2 h at 50°C), the two fragments were purified with a NucleoSpin PCR cleanup kit (Macherey-Nagel) and ligated using the sticky-end instant ligase (NEB), seamlessly fusing the fragments together without adding any nucleotides. The resulting fragments were reamplified by PCR using the external oligonucleotides OAH122 and OAH009 (Table 1) and cloned in the pTCV-*lac* plasmid.

**Electroporation.** Electrocompetent *E. coli* and *S. agalactiae* cells were produced as previously described (36, 37). Both bacterial species were then transformed by electroporation using the Micropulser (Bio-Rad) and the Ec2 conditions (2.5 kV) with 1 to 2 µg of appropriate plasmids, respectively. Transformants were selected on LB agar (*E. coli*) or on 5% horse blood tryptic soy (TSH) agar plates (bioMérieux) (*S. agalactiae*), with the appropriate antibiotics.

**β-Galactosidase assays.** For β-galactosidase assays, bacteria were grown in CDM and harvested (10-ml samples) during the mid-exponential phase of growth (OD<sub>600</sub>, 0.5). Cells were resuspended in 500 µl of Z buffer (38) and lysed mechanically with glass beads in a FastPrep-24 instrument, and cell debris were eliminated by centrifugation (5 min; 8,000 × g). Supernatant was incubated with 0.5 U/ml DNase I (NEB) at 37°C for 30 min and used for assays. Assays were performed as previously described, and β-galactosidase specific activities were expressed in arbitrary units per milligram of protein (38). Protein concentrations were determined using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA). All experiments were carried out in triplicate.

**Cell size and quantification of chain length.** Bacteria were grown in CDM containing 1 or 10 µM zinc. At mid-exponential phase, bacteria were deposited onto glass slides and examined under bright-field conditions at ×1,000 magnification with the Nikon Eclipse 80i optical microscope. Image acquisition and processing were performed using the NIS-Elements D software. Cell sizes (in micrometers squared) of 100 bacteria from three different pictures of three independent experiments were measured. To determine the bacteria chain length, 100 chains of three different pictures of three independent experiments were counted. Chain length values were calculated as percentages of all counted chains.

**Competition assays in human biological fluids.** To easily discriminate the wild-type and mutant strains in mixed cultures, we used the pTCV-*lac* vector, which carries a promoterless *lacZ* gene, or the pTCV-*lac*-P<sub>Cyl</sub> vector, with a *lacZ* gene under the control of the strong and constitutively active promoter P<sub>Cyl</sub> (34) (see Table S1 in the supplemental material). When plated on TH agar containing erythromycin (10 µg/ml) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-Gal; 60 µg/ml), cells carrying the pTCV-*lac*-P<sub>Cyl</sub> vector appeared as blue colonies, while cells carrying pTCV-*lac* remained white.

Each strain was transformed with pTCV-*lac* and pTCV-*lac*-P<sub>Cyl</sub> plas-

mids. Mixed cultures were inoculated alternately with a combination of the wild-type strain carrying a pTCV-*lac* and a mutant strain carrying pTCV-*lac*-P<sub>Cyl</sub> or a combination of the wild-type strain carrying pTCV-*lac*-P<sub>Cyl</sub> and a mutant strain carrying pTCV-*lac*, to ensure that plasmids had no deleterious effect on bacterial growth. All strains were grown during 8 h in TH with erythromycin at 10 µg/ml and then in zinc-restricted CDM with erythromycin t 10 µg/ml overnight, and mixed cultures were inoculated with approximately 5 × 10<sup>5</sup> CFU/ml of each strain in human biological fluids supplemented with erythromycin at 10 µg/ml. Bacterial growth was monitored during 48 h, and wild-type and mutant strains were discriminated by plating culture dilutions on TH agar containing erythromycin (10 µg/ml) and X-Gal (60 µg/ml). For each competition experiment between the WT and a mutant strain, both combinations (WT pTCV-*lac*/ΔpTCV-*lac*-P<sub>Cyl</sub> or WT pTCV-*lac*-P<sub>Cyl</sub>/ΔpTCV-*lac*) were tested. Each experiment was repeated at least three times.

Human plasma was obtained from healthy donors of the Etablissement Français du Sang (EFS Centre Atlantique, France). It was decontaminated by heating at 56°C during 30 min. Amniotic fluid and cerebrospinal fluid (CSF) were collected in the Bretonneau University Hospital (Tours, France) from, respectively, 2 and 3 donors who were not taking medications that would influence the analysis, such as antimicrobial agents.

**Macrophage survival assays.** For macrophage survival assays, bacteria were grown in zinc-restricted CDM overnight. Cultures were washed in PBS and adjusted to the desired inoculum in RPMI 1640 medium (Gibco), and CFU counts were verified by plating serial dilutions on TH plates. Macrophage RAW 264.7 cells, grown to confluence in RPMI–10% fetal calf serum (Gibco), were counted and incubated with bacteria (multiplicity of infection [MOI], ~10) in RPMI 1640 at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> for 1 h to allow bacterial phagocytosis. Cells were then incubated in RPMI–10% fetal calf serum–gentamicin (500 µg/ml)–streptomycin (100 µg/ml)–penicillin (100 U/ml) in order to kill extracellular bacteria during 2 h, which represented the time zero (*T*<sub>0</sub>) of the assay. At the indicated times (6 and 24 h after *T*<sub>0</sub>), infected macrophages were washed once with RPMI and then lysed by incubation in 1 ml of ice-cold Milli-Q water for 30 min. CFU counts were determined by plating serial dilutions on TH plates. Assays were performed in duplicate and were repeated three times.

**Statistical analyses.** Data are presented as the mean ± standard error of the mean. Statistical analyses were performed using the unpaired Student *t* test. A probability value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

**Two homologs of the Lmb protein are present in *Streptococcus agalactiae*.** *lmb* is located on a 16-kb composite transposon containing the *scpB*, *lmb*, and *sht* genes (11, 12). We performed BLASTN searches on available genomic DNA sequences of *S. agalactiae* (*n* = 271) and identified the presence of the *lmb*-containing transposon in 96.8% of the 187 human isolates and only 26.7% of the 84 animal isolates (mainly fish and cattle), in agreement with previous observations for 30 human and 38 bovine strains (11).

We performed BLASTP searches on the *S. agalactiae* A909 genome and identified two putative homologs of Lmb (SAK\_1319). We named them AdcA (SAK\_0685) and AdcAII (SAK\_1898), based on sequence and functional homology with *S. pneumoniae* proteins. The Lmb and AdcAII proteins are very similar, sharing 58% identity. The *lmb* and *adcAII* genes exhibit the same transcriptional organization, as they are each cotranscribed with a gene encoding the histidine triad proteins Sht (SAK\_1318) and ShtII (SAK\_1897), respectively (Fig. 1). The AdcA protein shares only 34% identity with Lmb, and its corresponding gene is monocistronic (Fig. 1). In contrast to *lmb*, which is more specific to human isolates, the *adcA* and *adcAII* genes are highly conserved



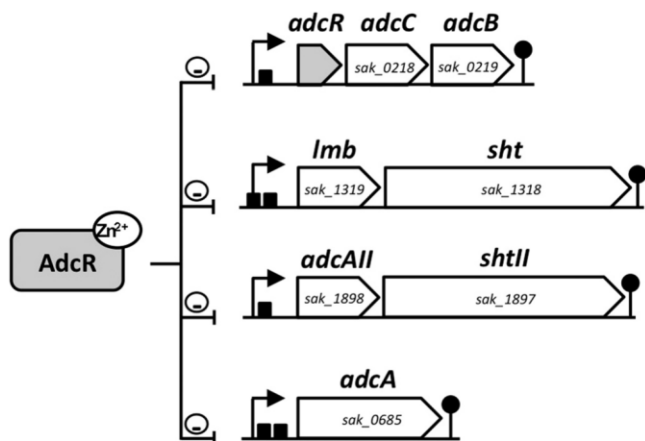


FIG 1 Transcriptional organization of the *lmb*, *adcA*, *adcAII*, and *adRCB* genes and a model of Zn-dependent regulation by AdcR in *Streptococcus agalactiae*. In the presence of  $Zn^{2+}$ , AdcR can bind to the AdcR-binding motifs (TTAACNNGTTAA) located in the promoter regions of the *lmb-sht*, *adcAII-shtII*, and *adRCB* operons and the *adcA* gene, causing repression of their expression. On the left of each sequence diagram is the promoter; the symbol on the right is the transcriptional terminator; black boxes are AdcR-binding boxes; the small circle with the dash inside it, prior to the sequence itself, indicates repression.

(at least 98% identity) in all of the 271 available *S. agalactiae* genomes.

The AdcA/Lmb family proteins are conserved among most streptococci and share a high degree of homology with zinc-binding proteins, in particular the AdcA and AdcAII proteins of *S. pneumoniae* (Table 2), whose role in zinc transport has been extensively studied (16, 39, 40). Following sequence alignment, we observed that the residues forming the  $Zn^{2+}$  ion-containing binding site of Lmb (His66, His142, His206, and Glu281) are conserved in the AdcA and AdcAII proteins (18) (Fig. 2). Analysis of the structure-based alignment between the proteins also revealed that AdcA possesses a histidine-rich loop and an extended C-terminal region exhibiting homology with the *Escherichia coli* ZinT protein and containing three conserved histidine residues that could potentially form a supplementary Zn-binding site (Fig. 2). The histidine-rich loop and ZinT domain of the *S. pneumoniae* AdcA homolog have been suggested to aid in recruiting  $Zn^{2+}$  (40). The structural differences between *S. agalactiae* AdcA and Lmb/AdcAII proteins are similar to those observed between *S. pneumoniae* AdcA and AdcAII proteins and correspond to distinct zinc acquisition mechanisms (40, 41).

**Regulation of the *lmb-sht*, *adcA*, and *adcAII-shtII* gene operons is  $Zn^{2+}$  dependent.** Zinc-binding proteins in other bacteria are upregulated under zinc limitation (26). We therefore examined *lmb-sht* expression in the presence of various concentrations of extracellular zinc, using a transcriptional *lacZ* fusion approach. We grew the *S. agalactiae* A909 strain in a metal-restricted CDM containing no zinc in its formulation and named here zinc-restricted CDM. This medium was supplemented with up to 100  $\mu M$   $Zn^{2+}$ . *S. agalactiae* A909 grew equally under all conditions (see Fig. S1 in the supplemental material). We measured *lmb-sht* promoter activity during mid-exponential growth, as there were no significant growth phase-dependent differences under all tested conditions (data not shown). In contrast,  $\beta$ -galactosidase

activity was significantly and gradually repressed in the presence of 0.5 to 100  $\mu M$   $Zn^{2+}$  ( $P < 0.01$ ) (Fig. 3A); *lmb-sht* promoter activity was totally repressed in the presence of 10  $\mu M$  added  $Zn^{2+}$  (approximately 20-fold less activity than in zinc-restricted CDM). It was also fully repressed in rich medium (Todd-Hewitt or brain heart infusion), in which the  $Zn^{2+}$  concentration is approximately 20  $\mu M$  (data not shown). The repression of *lmb* expression by zinc appeared to be specific to this metal, as supplementation with various concentrations of  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ , or  $Co^{2+}$  did not change *lmb-sht* promoter activity (Fig. 3A).

Using qRT-PCR, we confirmed the strong repression of *lmb* in the presence of 10  $\mu M$  extracellular  $Zn^{2+}$ , as well as that of the *adcA* and *adcAII* genes, suggesting that these genes are coregulated (Fig. 3B). The *lmb* gene also appeared to be the most highly expressed gene relative to *adcA* and *adcAII* when bacteria were grown in zinc-restricted CDM, but the difference was significant only with *adcA* (about 4-fold more highly expressed;  $P < 0.05$ ) (Fig. 3B).

**$Zn^{2+}$  repression of the *lmb-sht*, *adcA*, and *adcAII-shtII* gene operons is mediated by AdcR.** We have shown that the expression of the *lmb*, *adcA*, and *adcAII* genes is zinc dependent.  $Zn^{2+}$ -dependent regulation is mediated in *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* by the AdcR regulator (26, 27, 42). *S. pneumoniae* AdcR has a unique effector in zinc, and its crystal structure revealed the presence of two metal-binding sites (43). A putative AdcR protein (SAK\_0217; 53% identity with its pneumococcal homolog) containing the conserved metal-binding residues, is also present in *S. agalactiae* (see Fig. S2 in the supplemental material). The AdcR-encoding gene is present in all *S. agalactiae* sequenced genomes within an *adRCB* operon (Fig. 1). We obtained a mutant of the *adcR* gene ( $\Delta adcR$ ) in *S. agalactiae* A909 and measured the effect of this mutation on *lmb-sht* promoter activity in a  $\beta$ -galactosidase assay. In the absence of AdcR, *lmb-sht* promoter activity was no longer repressed by zinc (Fig. 4A). The same results were confirmed for *lmb* and observed for the *adcA* and *adcAII* genes by qRT-PCR (Fig. 4B).

Our results indicate that the expression of the three putative zinc-binding proteins is controlled by AdcR. We thus analyzed their promoter regions to identify AdcR operator sites (TTAACNNGTTAA) (23, 42). One conserved 10-bp palindromic motif was present in the promoter region of the *adcAII-shtII* and *adRCB* operons, and two overlapping copies were also present upstream from the *lmb-sht* and *adcA* genes (Fig. 1). We performed RACE-PCR to identify the transcription start site of the *lmb-sht* operon. We found it to be preceded by appropriately spaced  $-10$  and  $-35$  promoter regions, which are included in the first putative AdcR-binding motif (AdcR box) (Fig. 5). We introduced point mutations, designed to destruct the palindromic operator sequence

TABLE 2 Identity between the Lmb, AdcA, and AdcAII proteins of *Streptococcus agalactiae* and the AdcA and AdcAII proteins of *Streptococcus pneumoniae*

| <i>S. agalactiae</i> protein | % identity with <i>S. pneumoniae</i> protein |        |
|------------------------------|----------------------------------------------|--------|
|                              | AdcA                                         | AdcAII |
| Lmb                          | 35                                           | 67     |
| AdcA                         | 62                                           | 37     |
| AdcAII                       | 37                                           | 61     |



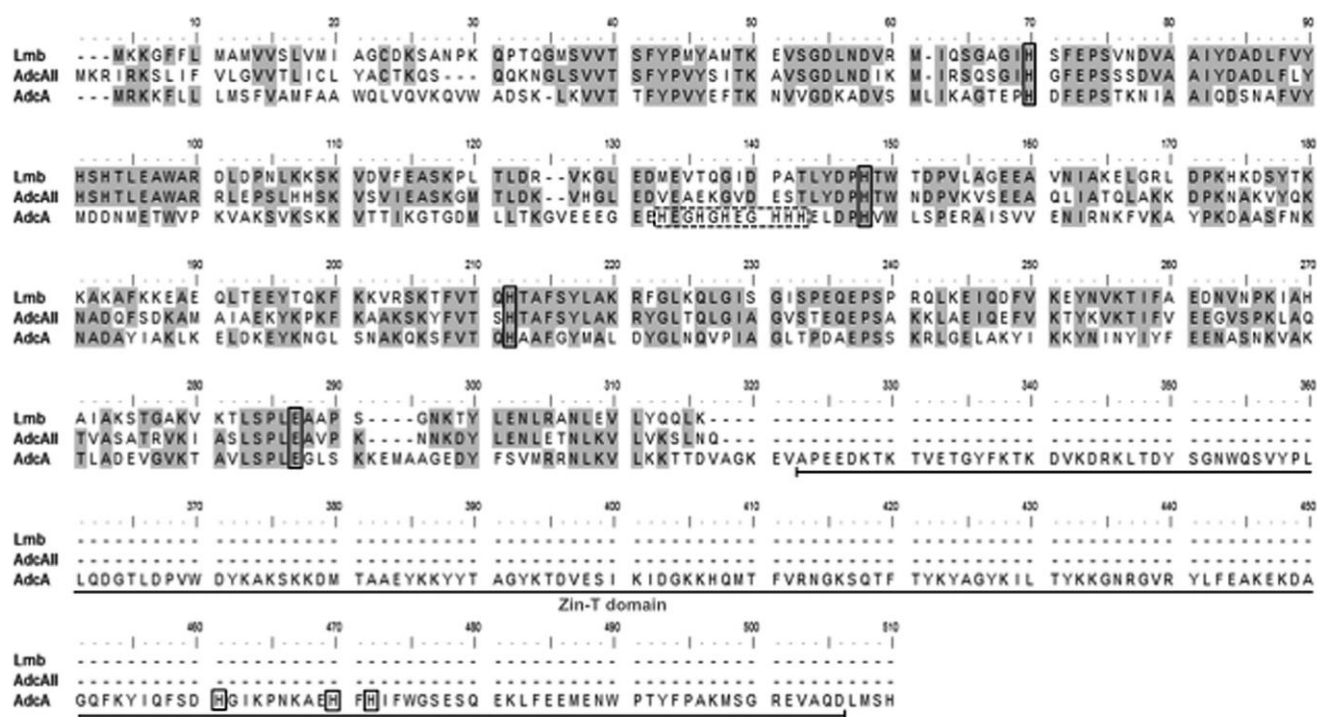


FIG 2 Amino acid sequence alignment of Lmb, AdcA, and AdcAII proteins of *Streptococcus agalactiae*. Identical residues are highlighted in gray. Potential zinc-binding residues are boxed in black. The His-rich loop of AdcA, which has been suggested to aid in recruiting  $Zn^{2+}$ , is boxed by the black dotted lines. The Zin-T domain of AdcA, which may contain a supplementary zinc-binding site, is underlined. Sequence alignment was performed using the BioEdit program.

without disturbing RNA polymerase fixation, by PCR-mediated site-tagged mutagenesis, into each or both putative AdcR boxes. Mutation of either AdcR box led to weaker repression of *lmb-sht* promoter activity by zinc, indicating that both boxes are necessary for optimal AdcR fixation (Fig. 5). When both boxes were mutated, *lmb-sht* promoter activity was completely derepressed in the presence of zinc, as observed in the *ΔadcR* strain (Fig. 5). Altogether, these results strongly suggest that  $Zn^{2+}$ -dependent repression of the *lmb-sht* promoter is mediated by the AdcR regulator, which binds to the TTAACNNGTTAA target sequence in the presence of zinc.

We used this sequence to identify potential AdcR-regulated genes in *S. agalactiae* by using the search pattern function of the SagaList software (<http://genolist.pasteur.fr/SagaList>). In addition to genes encoding the Adc/Lmb system, we found a perfect AdcR box in the promoter region (400 bp upstream from the start codon) of 7 supplementary genes or operons (Table 3), in particular, upstream of the *adh* gene (*sak\_0087*), encoding a potential zinc-containing alcohol dehydrogenase, which has already been identified to be a direct binding target of AdcR in *S. pneumoniae* (26, 42).

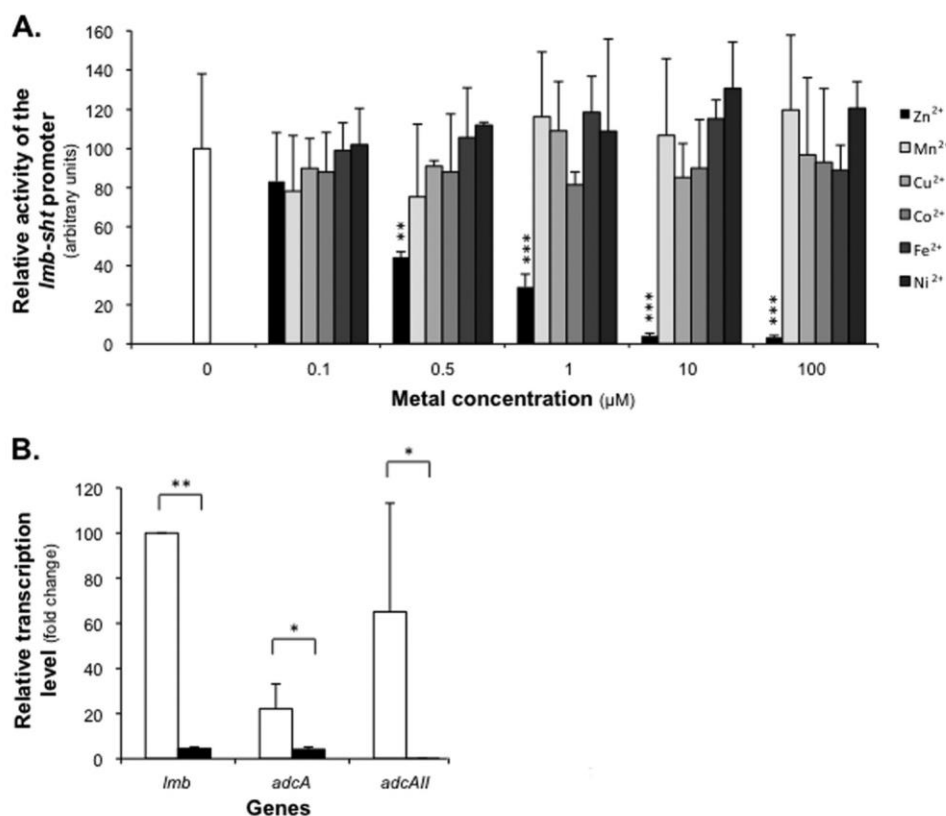
**Lmb, AdcA, and AdcAII are involved in zinc acquisition.** We constructed mutant strains containing single and combined deletions of each gene encoding a putative zinc-binding protein in *S. agalactiae* A909 to evaluate the relative contributions of Lmb, AdcA, and AdcAII in zinc transport. Bacteria in which the *lmb*, *adcA*, and *adcAII* genes were fully expressed were grown in zinc-restricted CDM (Fig. 3B). The growth of all single and double mutant strains was similar to that of the wild-type strain (see Fig. S3 in the supplemental material). In contrast, we observed almost

no growth for the triple mutant of the binding proteins ( $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$ ) (Fig. 6A). We cloned the *lmb*, *adcA*, and *adcAII* genes downstream of the constitutive promoter  $P_{Tet}$  (34) to generate complementing vectors (see Table S1 in the supplemental material). We introduced each construction in the  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$  triple mutant strain, and complemented bacteria were grown in zinc-restricted CDM. Recombinant plasmids expressing any of the three proteins fully restored the growth of the  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$  triple mutant, suggesting that the three proteins are redundant as zinc suppliers (see Fig. S4 in the supplemental material).

We then added increasing concentrations of  $Zn^{2+}$ , from 0.5 to 100  $\mu M$ , to the medium. We observed no difference in growth for the wild-type strain (see Fig. S1 in the supplemental material), but the growth of the  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$  mutant strain was gradually restored by  $Zn^{2+}$  addition, reaching a maximum restored growth rate from a concentration of 10  $\mu M$  (Fig. 6A). The addition of 10 or 100  $\mu M$   $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , or  $Co^{2+}$  had no impact on growth (see Fig. S5 in the supplemental material), suggesting that the detrimental effect observed in the triple mutant is specifically due to zinc deprivation.

**Lmb, AdcA, and AdcAII use the same AdcCB translocon.** Lmb, AdcA, and AdcAII belong to the metal binding receptor class of proteins that classically associate with an AdcCB translocon, consisting of a permease, called AdcB (SAK\_0219), and an ATPase, AdcC (SAK\_0218), to form an ABC transporter. In all sequenced *S. agalactiae* strains, genes encoding a putative AdcCB translocon are present within an *adcRCB* operon which lacks a substrate-binding protein-encoding gene (Fig. 1). We constructed the mutant strain of the translocon  $\Delta adcCB$  to test whether Lmb,





**FIG 3** Regulation of the *Streptococcus agalactiae* *lmb*, *adcA*, and *adcAII* genes is Zn dependent. (A) *lmb-sht* operon promoter activity was measured in Zn-restricted CDM supplemented with various amounts of added metals (0 to 100  $\mu$ M). A909 cells were grown until the mid-exponential phase of growth ( $OD_{600}$ , 0.5), and  $\beta$ -galactosidase assays were performed as described in Materials and Methods. The reference value (100%) is the *lmb-sht* promoter activity of cells grown in zinc-restricted CDM (0  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  added; white bar), and activities were calculated based on this reference. The values shown are mean results  $\pm$  standard deviations. The asterisks indicate *P* values obtained using unpaired Student's *t* test, comparing promoter activity of wild-type (WT) cells grown in zinc-restricted CDM and cells grown in CDM with the various added  $Zn^{2+}$  concentrations. \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001. (B) *lmb*, *adcA*, and *adcAII* expression levels were measured in zinc-restricted CDM containing 0 (white bars) or 10  $\mu$ M added  $Zn^{2+}$  (black bars). qRT-PCR was performed on RNA extracts of *S. agalactiae* A909 grown until the mid-exponential phase. The amount of transcripts of each gene was normalized against *recA* transcript levels. The reference value (100%) is the level of *lmb* transcripts after growth in zinc-restricted CDM (0  $\mu$ M added  $Zn^{2+}$ ). Gene expression is presented as the fold change. Results are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three independent experiments. The asterisks indicate *P* values obtained using an unpaired Student *t* test to compare gene expression of cells grown in zinc-restricted CDM versus cells grown with 10  $\mu$ M added  $Zn^{2+}$ . \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01.

*AdcA*, and *AdcAII* all use the *AdcCB* proteins to import zinc. The  $\Delta$ *adcCB* mutant was unable to grow in zinc-restricted CDM, but its growth was gradually restored by the addition of  $Zn^{2+}$  (Fig. 6B). The growth of the  $\Delta$ *lmb*  $\Delta$ *adcA*  $\Delta$ *adcAII* triple mutant and that of the  $\Delta$ *adcCB* mutant were similar for all tested  $Zn^{2+}$  concentrations. This was also the case for the mutant strain of the entire putative transporter  $\Delta$ *adcCB*  $\Delta$ *lmb*  $\Delta$ *adcA*  $\Delta$ *adcAII* (data not shown). Altogether, these results strongly suggest that the three binding proteins use the same translocon to transport zinc.

**The absence of the Adc/Lmb zinc transporter affects cell morphology.** In bacteria, several proteins involved in cell division, cell wall synthesis, and remodeling, including peptidoglycan deacetylases and metalloproteases, use zinc as a cofactor (21, 44). We examined whether the absence of the *Lmb*/*AdcA*/*AdcAII* zinc-binding proteins or the *AdcCB* translocon affected cell morphology and/or chain formation. We cultured *S. agalactiae* strains in zinc-restricted CDM with 1 or 10  $\mu$ M added zinc, examined them by optical microscopy, and calculated the size of individual bacteria and the number of cells per chain for each strain. We observed no significant difference between the individual cell size for any

strain (data not shown). However, under low zinc concentrations (1  $\mu$ M  $Zn^{2+}$ ), the  $\Delta$ *lmb*  $\Delta$ *adcA*  $\Delta$ *adcAII* and  $\Delta$ *adcCB* mutant strains formed aggregates (clumps) or were mostly in the form of single cells, whereas the wild-type strain formed chains of mostly 2 to 4 cells per chain (Fig. 7). In the presence of 10  $\mu$ M added zinc in the medium, the  $\Delta$ *lmb*  $\Delta$ *adcA*  $\Delta$ *adcAII* and  $\Delta$ *adcCB* strains regained the capacity to form chains with a size distribution comparable to that of the wild-type strain, indicating that the observed abnormal cell morphology was due to zinc deficiency (Fig. 7).

**The Adc/Lmb zinc transporter does not promote bacterial survival in murine macrophages.** Phagocytic cells sequester iron to improve the clearance of pathogens, including bacteria (45). Other transition metals, specifically manganese and zinc, are also actively sequestered by the host during infection in order to hinder bacterial growth (46), and a  $Mn^{2+}/Fe^{2+}$  transporter has been shown to play a role in GBS intracellular survival in macrophages (47). We compared the survival of the *S. agalactiae* wild-type strain and its isogenic  $\Delta$ *lmb*  $\Delta$ *adcA*  $\Delta$ *adcAII* mutant strain in the widely used murine macrophage cell line RAW 264.7. This phago-



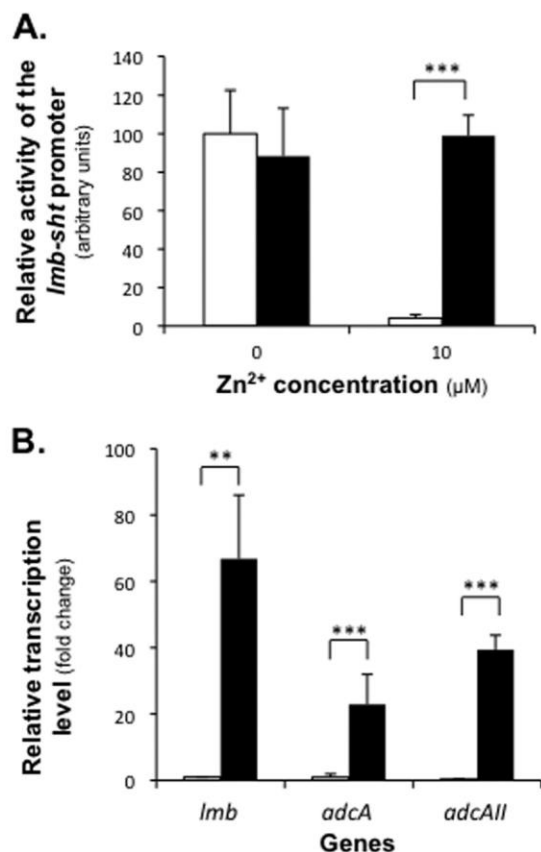


FIG 4 AdcR is required for Zn-dependent repression of the *lmb*, *adcA*, and *adcAII* genes. (A) WT A909 (white bars) or its isogenic  $\Delta$ *adcR* mutant (black bars) were grown either in zinc-restricted CDM or in medium supplemented with 10  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> until reaching the mid-exponential phase (OD<sub>600</sub>, 0.5).  $\beta$ -Galactosidase assays were performed as described in Materials and Methods. The reference value (100) is the *lmb-sht* promoter activity of WT cells grown in zinc-restricted CDM, and the results are presented as the fold change compared to this reference. The values shown are the means  $\pm$  standard deviations of three independent assays. (B) WT A909 (white bars) or its isogenic  $\Delta$ *adcR* mutant (black bars) strains were grown in zinc-restricted CDM supplemented with 10  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> until reaching the mid-exponential phase (OD<sub>600</sub>, 0.5). The amount of transcript of each gene was normalized against *recA* transcript levels. The reference value (1) is the level of *lmb* transcript of the wild-type strain. Gene expression is presented as the fold change. Results are presented as means  $\pm$  standard deviations of three independent experiments. The asterisks indicate *P* values obtained using an unpaired Student *t* test to compare promoter activity (A) or gene expression (B) of the WT strain and that of its isogenic  $\Delta$ *adcR* mutant. \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001.

cytic cell line efficiently killed *S. agalactiae* with both strains, displaying similar survival kinetics (Fig. 8). This result indicates that the Adc/Lmb zinc transporter has no significant role in bacterial survival in macrophages.

**The Adc/Lmb zinc transporter supports growth and survival of *Streptococcus agalactiae* in two human biological fluids.** During infection, *S. agalactiae* has to cross or colonize several human anatomic sites that have variable zinc concentrations: approximately 1.5  $\mu$ M in the amniotic fluid, more than 14  $\mu$ M in plasma, and 2.3  $\mu$ M in CSF (21, 48, 49). We thus examined the effect of the Adc/Lmb transporter on the ability of the bacteria to develop and survive in these human biological fluids. We performed a competition assay between the  $\Delta$ *lmb*  $\Delta$ *adcA*  $\Delta$ *adcAII* or  $\Delta$ *adcCB* mutant

strains and their wild-type parent by inoculating human biological fluids (amniotic fluid, plasma, or CSF) with equal amounts and monitoring the proportion of each strain. Both mutant strains were clearly outcompeted by the wild-type strain in CSF and amniotic fluid. Indeed, the decrease of the mutant strains began during the growth phase and was accentuated during the persistence stage, until they constituted less than 10% of the global *S. agalactiae* population after 48 h (Fig. 9). In contrast, the wild-type/mutant strain ratio remained relatively unchanged after growth in plasma, suggesting that the Adc/Lmb zinc transporter is dispensable in this biological fluid (Fig. 9).

The *lmb* gene appears to be specific to human isolates. We thus performed a competition assay between the wild-type and simple  $\Delta$ *lmb* mutant strain in human cerebrospinal and amniotic fluids. There was no significant difference in their growth (see Fig. S6 in the supplemental material), indicating that the Lmb and AdcA/AdcAII proteins were also redundant in these human biological fluids.

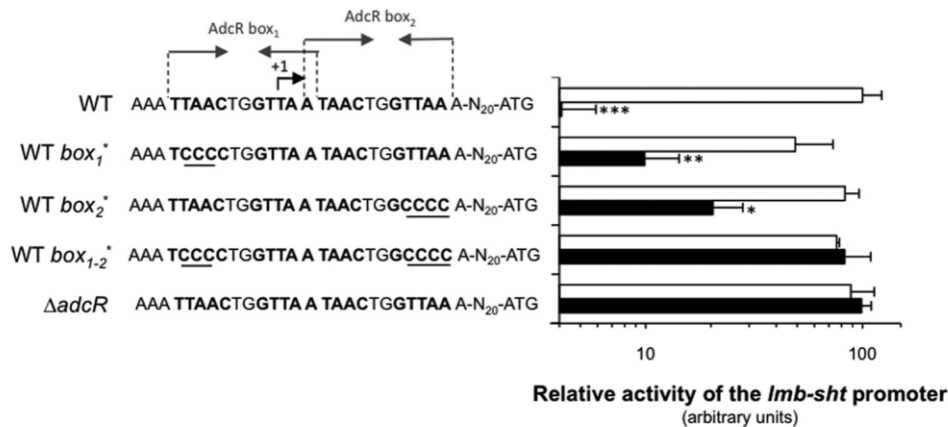
## DISCUSSION

In this study, we identified the Lmb/AdcA/AdcAII lipoproteins and the AdcCB translocon as components of a zinc transporter in *Streptococcus agalactiae*. We showed that expression of the *lmb*, *adcA*, and *adcAII* genes is controlled by the zinc concentration of the medium through the zinc-dependent regulator AdcR. Bacteria were unable to grow in zinc-restricted chemically defined medium in the absence of the Adc/Lmb transporter. To our knowledge, this is the first time that this metal has been shown to be essential for optimal growth of *S. agalactiae*. Zinc is a cofactor for a number of prokaryotic enzymes. In bacteria, there are several important enzymes that are zinc-containing proteins, including alcohol dehydrogenase, peptidoglycan deacetylase, metalloprotease, and ribosomal proteins (21, 44). Homologs of these proteins are present in *S. agalactiae* and are also likely to require zinc for their proper activity. Thus, a severe zinc restriction could impair the structure and function of essential proteins, explaining the growth delay observed for the Adc/Lmb zinc transporter mutant strains and the abnormal cell division. Indeed, the  $\Delta$ *lmb*  $\Delta$ *adcA*  $\Delta$ *adcAII* and  $\Delta$ *adcCB* mutant strains only formed aggregates or very short chains under zinc-restricted conditions. The origin of this defect is still unknown and may be related to mismetallation or undermetallation of a key enzyme(s) involved in cell division. For example, the L,D-carboxypeptidase DacB of *Streptococcus pneumoniae*, which is essential for peptidoglycan turnover and crucial to preserve cell shape, contains a mononuclear Zn<sup>2+</sup> catalytic center (50). A homolog of this enzyme is present in *S. agalactiae*, and an alteration of its activity may explain part of the division phenotype and of the observed growth deficiency.

Bacteria without the Adc/Lmb transporter grew similarly to the wild-type strain when 10  $\mu$ M zinc was added to the medium, suggesting the presence of one or several secondary zinc transporters with lower affinity. A good candidate may be the MtsA manganese transporter, whose encoding gene is present in the *S. agalactiae* genome and which has been shown to bind zinc with low affinity in *S. pneumoniae* (51, 52).

We showed that the growth and survival of the  $\Delta$ *lmb*  $\Delta$ *adcA*  $\Delta$ *adcAII* and  $\Delta$ *adcCB* mutant strains in human cerebrospinal and amniotic fluids were clearly impaired. These biological fluids represent potential infection sites. In contrast, we observed no significant role of the zinc transporter in human plasma. The variable





**FIG 5** Both putative AdcR boxes within the *lmb-sht* operon promoter are required for full Zn-dependent promoter repression. Transcriptional *lacZ* fusions with the *lmb-sht* promoter region carrying point mutations that destroyed an inverted repeat of the first putative AdcR-box (*box*<sub>1</sub>\*), or point mutations that destroyed an inverted repeat of the second putative AdcR-box (*box*<sub>2</sub>\*), or combined mutations (*box*<sub>1-2</sub>\*), were constructed. *lacZ* fusions containing the native *lmb-sht* promoter region and its derivatives were introduced into the WT strain. The native *lmb-sht* promoter region was also introduced in a *ΔadcR* mutant strain. β-Galactosidase assays were performed as described in Materials and Methods. The relative activity of the promoters was measured in zinc-restricted CDM containing 0 (white bars) or 10 μM added Zn<sup>2+</sup> (black bars). The reference value (100) is the *lmb-sht* promoter activity of WT cells grown in zinc-restricted CDM, and the results are presented as the fold change against this reference. The values shown are the means ± standard deviations of three independent assays. The positions are numbered with respect to the start codon, and the transcription initiation site (with small right arrow) is labeled +1. Less relevant nucleotides are replaced with an N. Nucleotides in bold represent the two putative AdcR-binding sites, and underlined nucleotides indicate the introduced point mutations. The asterisks indicate *P* values obtained using an unpaired Student *t* test to compare promoter activity of the WT strain grown in zinc-restricted CDM and the other tested strains and conditions. \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001.

importance of the Adc/Lmb transporter, depending on the human biological fluid, could be easily correlated with the zinc content. Indeed, the zinc concentration in plasma varies between 12 and 16 μM, which is much higher than that usually observed in amniotic and cerebrospinal fluids (approximately 1.5 and 2.3 μM, respectively). Thus, the Adc/Lmb zinc transporter may be dispensable in plasma because zinc concentrations are high enough to allow import by secondary transporters. Moreover, recent studies pointed out that vertebrates can sequester zinc upon bacterial infection, in particular by the action of the human calprotectin released from neutrophils (46). This strategy has been shown to efficiently inhibit microbial growth inside abscessed tissues and contributes to host defense by rendering bacterial pathogens more sensitive to host immune effectors (53, 54). Thus, *in vivo*, available zinc concentrations in a defined host compartment could vary during infection. Under these conditions, the presence of a high-affinity zinc uptake system such as the Adc/Lmb transporter of *S. agalac-*

*tiae* could be essential for the bacteria, and this opens interesting perspectives for future studies.

Our results support the concept that the Adc/Lmb zinc transporter is composed of three binding proteins, Lmb, AdcA, and AdcAII, that all use the same AdcCB translocon. This multiplicity of substrate-binding proteins is common among ABC transporters. In the three pathogenic streptococci, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, and *S. gordonii*, the Adc system is composed of one AdcCB translocon and two zinc-binding proteins, the genes of which are found either within an *adcRCBA* operon or independently of the *adc* cluster (21). In *S. pneumoniae*, either AdcA or AdcAII is sufficient for zinc acquisition during growth *in vitro* and for systemic virulence *in vivo*, but both are necessary for optimal nasopharynx colonization (40). A recent study, again in *S. pneumoniae*, showed that the absence of AdcAII but not AdcA negatively affected early colonization of the nasopharynx (55). These results suggest that during infection, *S. pneumoniae* encounters environments with

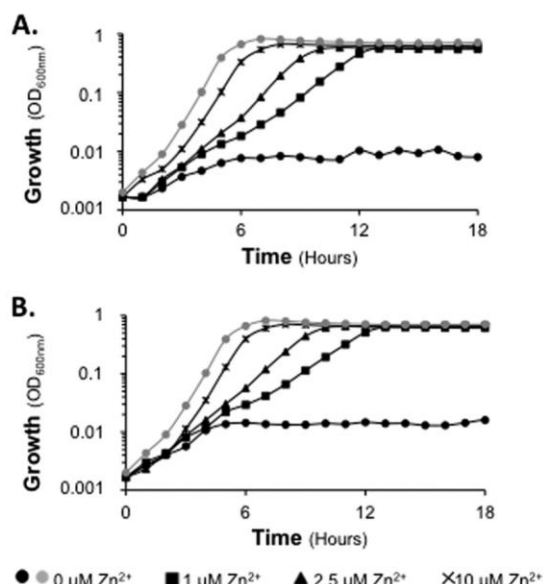
**TABLE 3** Identification of potential AdcR regulon members based on *in silico* *Streptococcus agalactiae* A909 genome scanning

| Position(s) <sup>a</sup> | Gene ID and/or name     | Function(s)                                                   | Pattern sequence <sup>b</sup>     |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| –126                     | <i>sak_0087; adh</i>    | Alcohol dehydrogenase                                         | TTAAAGATTAAACCAGTTAAGAATA         |
| –28                      | <i>sak_0217; adcR</i>   | Repressor, zinc metabolism                                    | TATAATTTACTGGTTAACAAAA            |
| –96                      | <i>sak_0252</i>         | Binding protein, peptide/nickel ABC transporter               | TCTAATTAACCAGTTAAGTAAT            |
| –28 and –39              | <i>sak_0685; adcA</i>   | Binding protein, zinc ABC transporter                         | AAATATTAACCGGTAATAACGGGTTAAATAAA  |
| –50                      | <i>sak_0693</i>         | Similar to surface proteins (LPXTG motif)                     | AAAACCTTAACCGGTTAATTATT           |
| –42                      | <i>sak_1023</i>         | Similar to histidine triad protein, putative internalin       | TATAATTAAGTAACTAACTAAA            |
| –32 and –43              | <i>sak_1319; lmb</i>    | Binding protein, zinc ABC transporter                         | TAAAATTAAGTGGTTAATAACTGGTTAAATTAT |
| –52                      | <i>sak_1468</i>         | Similar to flavoprotein, involved in K <sup>+</sup> transport | TATTGTTAACTGGTTAAGTATT            |
| –39                      | <i>sak_1469</i>         | Similar to ammonium transporter                               | AATACTTAACCAGTTAACAATA            |
| –340                     | <i>sak_1542</i>         | Binding protein, peptide/nickel ABC transporter               | TATACTTAAGTGGTTAAGTATA            |
| –38                      | <i>sak_1898; adcAII</i> | Binding protein, zinc ABC transporter                         | AAATGTTAACTGGTTAAGTATT            |

<sup>a</sup> Nucleotide numbering is from the start codon of the gene to the end of the putative AdcR binding site.

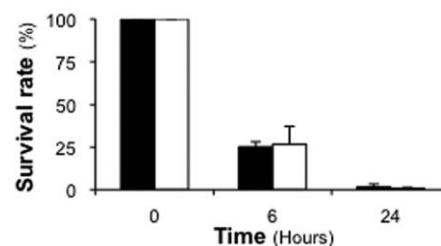
<sup>b</sup> Nucleotides in bold indicate the putative AdcR binding site.





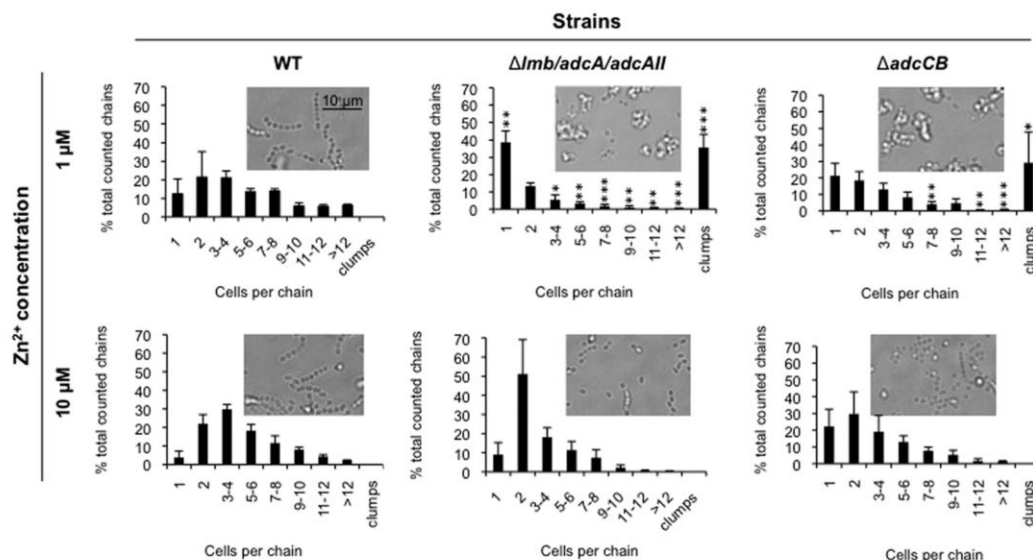
**FIG 6** The Lmb, AdcA, and AdcAII proteins are involved in zinc acquisition in association with the AdcCB translocon. A909 WT (gray) and  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$  mutant (black) strains (A) or WT (gray) and  $\Delta adcCB$  mutant strains (B) were grown in zinc-restricted CDM with various amounts of added Zn<sup>2+</sup> (from 0 to 10  $\mu$ M). The growth was monitored by assessing the OD<sub>600</sub> at 1-h intervals during 18 h. Data are representative mean OD<sub>600</sub> measurements from three independent experiments.

various zinc concentrations and that, in specific niches and conditions, the bacteria benefit from having two distinct zinc-binding proteins. The particularity of the *S. agalactiae* Adc/Lmb transporter is the presence of an additional binding protein, Lmb, which is almost specific to human isolates. In *S. agalactiae*, Lmb,



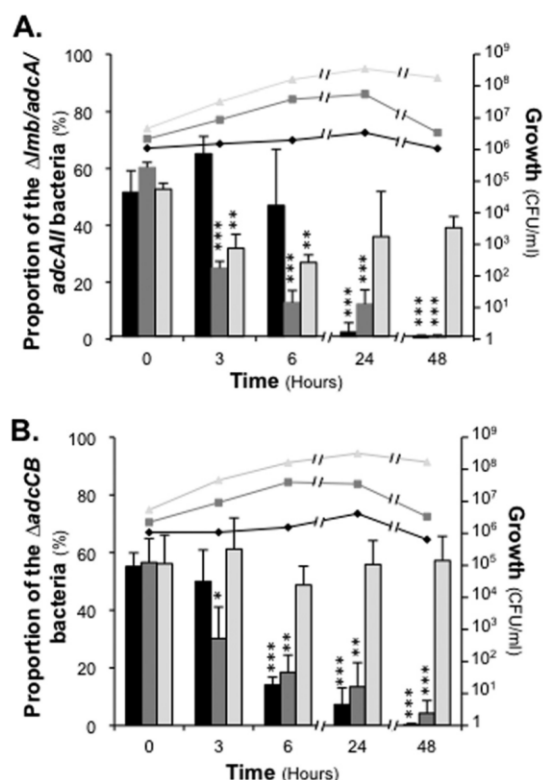
**FIG 8** Intracellular survival of *Streptococcus agalactiae* in RAW 264.7 macrophages. RAW 264.7 cells were infected with A909 WT (black bars) or  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$  (white bars) strains at an MOI of 10, and phagocytosis was allowed to proceed for 1 h. Antibiotics were then added, and the cells were incubated for a period of 2 h to kill the extracellular bacteria. This initial antibiotic treatment, which represents time zero of the experiment, was extended for different times up to 24 h, and the cells were lysed to quantify the intracellular survival rates of the bacteria. Results are presented as the means  $\pm$  standard deviations of three independent experiments performed in triplicate for each strain.

AdcA, and AdcAII are redundant for zinc acquisition in chemically defined medium, which is consistent with what was observed in *S. pneumoniae* (40). In human biological fluids, bacterial growth was not affected by the loss of the Lmb protein alone, whereas the  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$  mutant strain was clearly out-competed by the wild-type strain in cerebrospinal and amniotic fluids. Thus, the three *S. agalactiae* zinc-binding proteins were redundant under the conditions we tested. However, we cannot exclude that, in specific environments or when in competition with other bacteria, Lmb, AdcA, and AdcAII could be complementary, and possessing three copies of these zinc-binding proteins could give an advantage to *S. agalactiae*. *In vivo* experiments would be useful to answer these questions.



**FIG 7** The Adc/Lmb zinc transporter affects cell morphology. Bacterial chain length of the A909 wild-type,  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$ , and  $\Delta adcCB$  mutant strains was observed after growth in zinc-restricted CDM with 1  $\mu$ M (top) or 10  $\mu$ M (bottom) added zinc. Visualization of chain length was performed at a magnification of  $\times 1,000$ . Cells were collected during the mid-exponential phase. Images were captured from three separate experiments, and at least 100 chains were counted from each set, for a total of 300 or more chains counted for each strain. Chain length values were distributed between arbitrarily set numerical categories and calculated as percentages of all counted chains. Results are presented as the means  $\pm$  standard deviations for three independent counts. The asterisks indicate P values obtained using an unpaired Student t test to compare chain-length counts of the WT strain and the  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$  and  $\Delta adcCB$  mutant strains. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .





**FIG 9** The Adc/Lmb zinc transporter is beneficial for *Streptococcus agalactiae* survival in two human biological fluids. A909 WT and  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$  mutant strains (A) or WT and  $\Delta adcCB$  mutant strains (B) were inoculated in equivalent numbers into human cerebrospinal fluid (diamonds and black bars), amniotic fluid (squares and dark gray bars), or plasma (triangles and light gray bars). Cocultures were incubated at 37°C for 48 h without agitation, the CFU were counted, and the growth curves were traced. The proportion of each strain was monitored by plating diluted cultures on TH agar containing erythromycin (10  $\mu$ g/ml) and X-Gal (60  $\mu$ g/ml) (see Materials and Methods). Results are presented as the means  $\pm$  standard deviations for three independent cocultures. The asterisks indicate *P* values obtained using an unpaired Student *t* test to compare the proportion of the strain at T0 and its proportion at the indicated times. \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01; \*\*\*, *P* < 0.001.

Another explanation for the multiplicity of these proteins may be that they have a secondary function beyond their involvement in zinc transport. Indeed, Lmb is a laminin-binding adhesin (10, 18). We expected to observe a difference between the binding of wild-type and  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$  mutant strains to laminin because of the strong homology between Lmb and AdcAII (73% similarity) and because we determined conditions (zinc-restricted CDM) in which these proteins were optimally expressed. We performed binding assays with immobilized human laminin, fibrinogen, or collagen and did not observe any significant difference between the wild-type strain,  $\Delta lmb$ , or  $\Delta lmb \Delta adcA \Delta adcAII$  mutant strains after bacterial growth in zinc-restricted CDM or TH broth (data not shown). There was also no effect on bacterial adhesion to A549 human alveolar basal epithelial cells (data not shown). These results do not agree with previous observations (10, 18). An explanation may be that we did not use the same *S. agalactiae* genetic background that was used in previous studies and that, despite strong conservation of the Lmb sequence, the ability to bind laminin may be strain dependent. It may be infor-

mative to test purified recombinant Lmb, AdcA, and AdcAII proteins for their binding ability, as previously done for the Lmb protein of *S. agalactiae* or Lbp of *S. pyogenes* (15, 18, 56). However, a recent study on Lmb homologs of *S. pneumoniae* also failed to show any binding to laminin (55).

Both the *S. agalactiae* *lmb* and *adcAII* genes are encoded within an operon containing the *sht* and *shtII* genes. These genes encode polyhistidine triad proteins, and *S. agalactiae* Sht has been shown to promote complement degradation by binding to factor H (12). In *S. pneumoniae*, the Sht homologs, called pht proteins, aid in zinc delivery to the ABC transporter substrate-binding protein AdcAII (40, 41) and play a role in pneumococcal adhesion to the respiratory epithelium (57). The involvement of *S. agalactiae* Sht proteins in zinc transport, their interaction with the Adc/Lmb system components, and their putative redundancy are now under study and should provide new insights to better understand mechanisms of zinc acquisition in *S. agalactiae*.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Patrick Trieu-Cuot's team and in particular to Elise Caliot and Shaynoor Dramsi for providing us pG+host1 and pTCV-*lac*. We give special thanks to Arnaud Firon for pTCV-P<sub>Tet</sub> and pTCV-*lac*-P<sub>Cyt</sub> plasmids and for helpful discussions. We also thank Vanessa Rong and Daniel Niquet for technical assistance, Julien Gaillard for assistance in microscopy, and Eric Morello for providing us the RAW 264.7 cell line.

Pauline Moulin received a Ph.D. fellowship from the Région Centre.

## REFERENCES

- Verani JR, McGee L, Schrag SJ. 2010. Prevention of perinatal group B streptococcal disease—revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep* 59:1–36.
- Edmond KM, Kortsalioudaki C, Scott S, Schrag SJ, Zaidi AKM, Cousens S, Heath PT. 2012. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet* 379: 547–556. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61651-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61651-6).
- Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER, Schuchat A, Schrag SJ. Active Bacterial Core Surveillance/Emerging Infections Program Network. 2008. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. *JAMA* 299:2056–2065. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.299.17.2056>.
- Tazi A, Bellais S, Tardieux I, Dramsi S, Trieu-Cuot P, Poyart C. 2012. Group B streptococcus surface proteins as major determinants for meningeal tropism. *Curr Opin Microbiol* 15:44–49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.12.002>.
- Rosa-Fraile M, Dramsi S, Spellerberg B. 2014. Group B streptococcal haemolysin and pigment, a tale of twins. *FEMS Microbiol Rev* 38:932–946. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12071>.
- Schubert A, Zakikhany K, Pietrocola G, Meinke A, Speziale P, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ. 2004. The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infect Immun* 72:6197–6205. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.11.6197-6205.2004>.
- Rosenau A, Martins K, Amor S, Gannier F, Lanotte P, van der Meer-Marquet N, Mereghetti L, Quentin R. 2007. Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fbsA* and *fbsB* genes. *Infect Immun* 75:1310–1317. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00996-06>.
- Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, Dramsi S, Mistou M-Y, Khun H, Mechler C, Tardieux I, Trieu-Cuot P, Lecuit M, Poyart C. 2010. The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J Exp Med* 207: 2313–2322. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20092594>.
- Buscetta M, Firon A, Pietrocola G, Biondo C, Mancuso G, Midiri A, Romeo L, Galbo R, Venza M, Venza I, Kaminski P-A, Gominet M, Teti



- G, Speziale P, Trieu-Cuot P, Beninati C. 2016. PbsP, a cell wall-anchored protein that binds plasminogen to promote hematogenous dissemination of group B streptococcus. *Mol Microbiol* 101:27–41. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.13357>.
10. Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heymann J, Schnitzler N, Lütticken R, Podbielski A. 1999. Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect Immun* 67:871–878.
  11. Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heymann J, Martin S, Lämmler C, Podbielski A, Lütticken R, Spellerberg B. 2001. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. *Mol Microbiol* 41:925–935. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02563.x>.
  12. Maruvada R, Prasadarao NV, Rubens CE. 2009. Acquisition of factor H by a novel surface protein on group B streptococcus promotes complement degradation. *FASEB J* 23:3967–3977. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.09-138149>.
  13. Al Safadi R, Amor S, Hery-Arnaud G, Spellerberg B, Lanotte P, Mereghetti L, Gannier F, Quentin R, Rosenau A. 2010. Enhanced expression of *lmb* gene encoding laminin-binding protein in *Streptococcus agalactiae* strains harboring IS1548 in *scpB-lmb* intergenic region. *PLoS One* 5:e10794. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0010794>.
  14. Tenenbaum T, Spellerberg B, Adam R, Vogel M, Kim KS, Schrotten H. 2007. *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes Infect* 9:714–720. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2007.02.015>.
  15. Linke C, Caradoc-Davies TT, Young PG, Proft T, Baker EN. 2009. The laminin-binding protein Lbp from *Streptococcus pyogenes* is a zinc receptor. *J Bacteriol* 191:5814–5823. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00485-09>.
  16. Bayle L, Chimalapati S, Schoehn G, Brown J, Vernet T, Durmort C. 2011. Zinc uptake by *Streptococcus pneumoniae* depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. *Mol Microbiol* 82:904–916. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07862.x>.
  17. Ragunathan P, Spellerberg B, Ponnuraj K. 2009. Structure of laminin-binding adhesin (Lmb) from *Streptococcus agalactiae*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 65:1262–1269. <http://dx.doi.org/10.1107/S0907444909038359>.
  18. Ragunathan P, Sridaran D, Weigel A, Shabayek S, Spellerberg B, Ponnuraj K. 2013. Metal binding is critical for the folding and function of laminin binding protein, Lmb of *Streptococcus agalactiae*. *PLoS One* 8:e67517. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0067517>.
  19. Andreini C, Bertini I. 2012. A bioinformatics view of zinc enzymes. *J Inorg Biochem* 111:150–156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.020>.
  20. Jacobsen FE, Kazmierczak KM, Lisher JP, Winkler ME, Giedroc DP. 2011. Interplay between manganese and zinc homeostasis in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Metallomics* 3:38–41. <http://dx.doi.org/10.1039/C0MT00050G>.
  21. Shafeeq S, Kuipers OP, Kloosterman TG. 2013. The role of zinc in the interplay between pathogenic streptococci and their hosts. *Mol Microbiol* 88:1047–1057. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12256>.
  22. Kloosterman TG, van der Kooi-Pol MM, Bijlsma JJE, Kuipers OP. 2007. The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn<sup>2+</sup> stress by activation of the Zn<sup>2+</sup>-resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 65:1049–1063. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05849.x>.
  23. Panina EM, Mironov AA, Gelfand MS. 2003. Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9912–9917. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1733691100>.
  24. Aranda J, Garrido ME, Cortés P, Llagostera M, Barbé J. 2008. Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions. *Infect Immun* 76:1590–1598. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00987-07>.
  25. Ogunniyi AD, Grabowicz M, Mahdi LK, Cook J, Gordon DL, Sadlon TA, Paton JC. 2009. Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn<sup>2+</sup>-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. *FASEB J* 23:731–738. <http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-119537>.
  26. Shafeeq S, Kloosterman TG, Kuipers OP. 2011. Transcriptional response of *Streptococcus pneumoniae* to Zn<sup>2+</sup> limitation and the repressor/activator function of AdcR. *Metallomics* 3:609–618. <http://dx.doi.org/10.1039/c1mt00030f>.
  27. Sanson M, Makthal N, Flores AR, Olsen RJ, Musser JM, Kumaraswami M. 2015. Adhesin competence repressor (AdcR) from *Streptococcus pyogenes* controls adaptive responses to zinc limitation and contributes to virulence. *Nucleic Acids Res* 43:418–432. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gku1304>.
  28. Loo CY, Mitrakul K, Voss IB, Hughes CV, Ganeshkumar N. 2003. Involvement of the *adc* operon and manganese homeostasis in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *J Bacteriol* 185:2887–2900. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.185.9.2887-2900.2003>.
  29. Weston BF, Brenot A, Caparon MG. 2009. The metal homeostasis protein, Lsp, of *Streptococcus pyogenes* is necessary for acquisition of zinc and virulence. *Infect Immun* 77:2840–2848. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01299-08>.
  30. Tedde V, Rosini R, Galeotti CL. 2016. Zn<sup>2+</sup> uptake in *Streptococcus pyogenes*: characterization of *adcA* and *lmb* null mutants. *PLoS One* 11:e0152835. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0152835>.
  31. Patron K, Gilot P, Camiade E, Mereghetti L. 2015. An homolog of the Frz phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is encoded on a genomic island in specific lineages of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Genet Evol* 32:44–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2015.02.019>.
  32. Lamy M-C, Zouine M, Fert J, Vergassola M, Couve E, Pellegrini E, Glaser P, Kunst F, Msadek T, Trieu-Cuot P, Poyart C. 2004. CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol* 54:1250–1268. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04365.x>.
  33. Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E. 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 175:3628–3635.
  34. Firon A, Tazi A, Da Cunha V, Brinster S, Sauvage E, Dramsi S, Golenbock DT, Glaser P, Poyart C, 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 Pathog* 9:e1003179. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003179>.
  35. Poyart C, Trieu-Cuot P. 1997. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 156:193–198. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00423-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00423-0).
  36. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16:6127–6145. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>.
  37. Ricci ML, Manganelli R, Berneri C, Orefici G, Pozzi G. 1994. Electrotransformation of *Streptococcus agalactiae* with plasmid DNA. *FEMS Microbiol Lett* 119:47–52. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb06865.x>.
  38. Miller JH. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
  39. Loisel E, Jacquamet L, Serre L, Bauvois C, Ferrer JL, Vernet T, Di Guilmi AM, Durmort C. 2008. AdcAII, a new pneumococcal Zn-binding protein homologous with ABC transporters: biochemical and structural analysis. *J Mol Biol* 381:594–606. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.05.068>.
  40. Plumtre CD, Eijkelkamp BA, Morey JR, Behr F, Couñago RM, Ogunniyi AD, Kobe B, O'Mara ML, Paton JC, McDevitt CA. 2014. AdcA and AdcAII employ distinct zinc acquisition mechanisms and contribute additively to zinc homeostasis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 91:834–851. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12504>.
  41. Bersch B, Bougault C, Roux L, Favier A, Vernet T, Durmort C. 2013. New insights into histidine triad proteins: solution structure of a *Streptococcus pneumoniae* PhtD domain and zinc transfer to AdcAII. *PLoS One* 8:e81168. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0081168>.
  42. Reyes-Caballero H, Guerra AJ, Jacobsen FE, Kazmierczak KM, Cowart D, Koppolu UMK, Scott RA, Winkler ME, Giedroc DP. 2010. The metalloregulatory zinc site in *Streptococcus pneumoniae* AdcR, a zinc-activated MarR family repressor. *J Mol Biol* 403:197–216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2010.08.030>.
  43. Guerra AJ, Dann CE, Giedroc DP. 2011. Crystal structure of the zinc-dependent MarR family transcriptional regulator AdcR in the Zn(II)-bound state. *J Am Chem Soc* 133:19614–19617. <http://dx.doi.org/10.1021/ja2080532>.
  44. Sun X, Xiao C, Ge R, Yin X, Li H, Li N, Yang X, Zhu Y, He X, He Q-Y. 2011. Putative copper- and zinc-binding motifs in *Streptococcus pneu-*



- moniae* identified by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* 11:3288–3298. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201000396>.
45. Weinberg ED. 2009. Iron availability and infection. *Biochim Biophys Acta* 1790:600–605. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.07.002>.
  46. Kehl-Fie TE, Skaar EP. 2010. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol* 14:218–224. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.11.008>.
  47. Shabayek S, Bauer R, Mauere S, Mizaikoff B, Spellerberg B. 2016. A streptococcal NRAMP homologue is crucial for the survival of *Streptococcus agalactiae* under low pH conditions. *Mol Microbiol* 100:589–606. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.13335>.
  48. Meret S, Henkin RI. 1971. Simultaneous direct estimation by atomic absorption spectrophotometry of copper and zinc in serum, urine, and cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 17:369–373.
  49. Tamura GS, Kuypers JM, Smith S, Raff H, Rubens CE. 1994. Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect Immun* 62:2450–2458.
  50. Abdullah MR, Gutiérrez-Fernández J, Pribyl T, Gisch N, Saleh M, Rohde M, Petruschka L, Burchhardt G, Schwudke D, Hermoso JA, Hammerschmidt S. 2014. Structure of the pneumococcal L,D-carboxypeptidase DacB and pathophysiological effects of disabled cell wall hydrolases DacA and DacB. *Mol Microbiol* 93:1183–1206. <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12729>.
  51. Bray BA, Sutcliffe IC, Harrington DJ. 2009. Expression of the MtsA lipoprotein of *Streptococcus agalactiae* A909 is regulated by manganese and iron. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95:101–109. <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-008-9291-6>.
  52. McDevitt CA, Ogunniyi AD, Valkov E, Lawrence MC, Kobe B, McEwan AG, Paton JC. 2011. A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. *PLoS Pathog* 7:e1002357. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002357>.
  53. Corbin BD, Seeley EH, Raab A, Feldmann J, Miller MR, Torres VJ, Anderson KL, Dattilo BM, Dunman PM, Gerads R, Caprioli RM, Nacken W, Chazin WJ, Skaar EP. 2008. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* 319:962–965. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1152449>.
  54. Kehl-Fie TE, Chitayat S, Hood MI, Damo S, Restrepo N, Garcia C, Munro KA, Chazin WJ, Skaar EP. 2011. Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense, enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 10:158–164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2011.07.004>.
  55. Brown LR, Gunnell SM, Cassella AN, Keller LE, Scherkenbach LA, Mann B, Brown MW, Hill R, Fitzkee NC, Rosch JW, Tuomanen EI, Thornton JA. 2016. AdcAII of *Streptococcus pneumoniae* affects pneumococcal invasiveness. *PLoS One* 11:e0146785. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146785>.
  56. Terao Y, Kawabata S, Kunitomo E, Nakagawa I, Hamada S. 2002. Novel laminin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, Lbp, is involved in adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* 70:993–997. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.2.993-997.2002>.
  57. Kallio A, Sepponen K, Hermand P, Denoël P, Godfroid F, Melin M. 2014. Role of Pht proteins in attachment of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells. *Infect Immun* 82:1683–1691. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00699-13>.

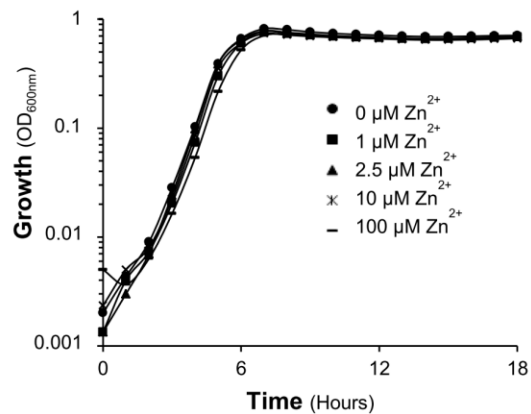


## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study**

| Strain or plasmid                                                | Genotype or description                                                                                                                                                                                             | Source or reference |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <b><u>Escherichia coli strain</u></b>                            |                                                                                                                                                                                                                     |                     |
| XL1-blue                                                         | <i>endA1 gyrA96 (Nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) F' [::Tn10 (Tet<sup>R</sup>) proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> ZΔM15]</i>               | Stratagene          |
| <b><u>Streptococcus agalactiae strains</u></b>                   |                                                                                                                                                                                                                     |                     |
| A909 (WT)                                                        | Isolated from a septic human neonate in 1934                                                                                                                                                                        | (1)                 |
| A909Δ <i>lmb</i>                                                 | Isogenic <i>lmb</i> ( <i>sak_1319</i> ) deletion mutant of A909                                                                                                                                                     | This study          |
| A909Δ <i>lmb</i> -pTCV-P <sub>Tet</sub> :: <i>lmb</i>            | <i>lmb</i> ( <i>sak_1319</i> ) plasmid complementation of A909Δ <i>lmb</i> /Δ <i>adcA</i> /Δ <i>adcAll</i>                                                                                                          | This study          |
| A909Δ <i>adcA</i>                                                | Isogenic <i>adcA</i> ( <i>sak_0685</i> ) deletion mutant of A909                                                                                                                                                    | This study          |
| A909Δ <i>adcA</i> -pTCV-P <sub>Tet</sub> :: <i>adcA</i>          | <i>adcA</i> ( <i>sak_0685</i> ) plasmid complementation of A909Δ <i>lmb</i> /Δ <i>adcA</i> /Δ <i>adcAll</i>                                                                                                         | This study          |
| A909Δ <i>adcAll</i>                                              | Isogenic <i>adcAll</i> ( <i>sak_1898</i> ) deletion mutant of A909                                                                                                                                                  | This study          |
| A909Δ <i>adcAll</i> -pTCV-P <sub>Tet</sub> :: <i>adcAll</i>      | <i>adcAll</i> ( <i>sak_1898</i> ) plasmid complementation of A909Δ <i>lmb</i> /Δ <i>adcA</i> /Δ <i>adcAll</i>                                                                                                       | This study          |
| A909Δ <i>lmb</i> /Δ <i>adcA</i>                                  | Isogenic <i>lmb</i> and <i>adcA</i> deletion double mutant of A909                                                                                                                                                  | This study          |
| A909Δ <i>lmb</i> /Δ <i>adcAll</i>                                | Isogenic <i>lmb</i> and <i>adcAll</i> deletion double mutant of A909                                                                                                                                                | This study          |
| A909Δ <i>adcA</i> /Δ <i>adcAll</i>                               | Isogenic <i>adcA</i> and <i>adcAll</i> deletion double mutant of A909                                                                                                                                               | This study          |
| A909Δ <i>lmb</i> /Δ <i>adcA</i> /Δ <i>adcAll</i>                 | Isogenic <i>lmb</i> , <i>adcA</i> and <i>adcAll</i> deletion triple mutant of A909                                                                                                                                  | This study          |
| A909Δ <i>adcR</i>                                                | Isogenic <i>adcR</i> ( <i>sak_0217</i> ) deletion mutant of A909                                                                                                                                                    | This study          |
| A909Δ <i>adcCB</i>                                               | Isogenic <i>adcCB</i> ( <i>sak_0218</i> and <i>sak_0219</i> ) deletion double mutant of A909                                                                                                                        | This study          |
| A909Δ <i>lmb</i> /Δ <i>adcA</i> /Δ <i>adcAll</i> /Δ <i>adcCB</i> | Isogenic <i>lmb</i> , <i>adcA</i> , <i>adcAll</i> and <i>adcCB</i> deletion quintuple mutant of A909                                                                                                                | This study          |
| <b><u>Plasmids</u></b>                                           |                                                                                                                                                                                                                     |                     |
| pG+host1 <sup>TS</sup>                                           | Replication-thermosensitive shuttle ( <sup>TS</sup> ) plasmid, Ery <sup>R</sup>                                                                                                                                     | (2)                 |
| pTCV-P <sub>Tet</sub>                                            | Mob+(IncP); <i>oriR</i> <i>pACYC184</i> ; <i>oriR</i> <i>pAM_1</i> ; complementation vector, promoter P <sub>Tet</sub>                                                                                              | (3)                 |
| pTCV-P <sub>Tet</sub> :: <i>lmb</i>                              | <i>lmb</i> complementation vector, promoter P <sub>Tet</sub>                                                                                                                                                        | This study          |
| pTCV-P <sub>Tet</sub> :: <i>adcA</i>                             | <i>adcA</i> complementation vector, promoter P <sub>Tet</sub>                                                                                                                                                       | This study          |
| pTCV-P <sub>Tet</sub> :: <i>adcAll</i>                           | <i>adcAll</i> complementation vector, promoter P <sub>Tet</sub>                                                                                                                                                     | This study          |
| pTCV- <i>lac</i>                                                 | Promoter probe plasmid carrying a <i>lacZ</i> gene devoided of a promoter and the <i>ermB</i> gene (Ery <sup>R</sup> )                                                                                              | (4)                 |
| pTCV- <i>lac</i> -P <sub>Cyl</sub>                               | Plasmid carrying a <i>lacZ</i> gene under the control of the constitutive promoter P <sub>Cyl</sub>                                                                                                                 | (3)                 |
| pTCV- <i>lac</i> :: <i>lmb</i> <sup>IR</sup>                     | pTCV/ <i>lac</i> containing the entire intergenic region ( <sup>IR</sup> ) of the <i>S. agalactiae</i> A909 <i>lmb</i> - <i>sht</i> operon in the <i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i> site upstream of the <i>lacZ</i> gene | This study          |
| pTCV- <i>lac</i> :: <i>lmb</i> <sup>IR-box1*</sup>               | pTCV- <i>lac</i> :: <i>lmb</i> <sup>IR</sup> with 3 nucleotide substitutions in the AdcR box <sub>1</sub> .                                                                                                         | This study          |
| pTCV- <i>lac</i> :: <i>lmb</i> <sup>IR-box2*</sup>               | pTCV- <i>lac</i> :: <i>lmb</i> <sup>IR</sup> with 4 nucleotide substitutions in the AdcR box <sub>2</sub> .                                                                                                         | This study          |
| pTCV- <i>lac</i> :: <i>lmb</i> <sup>IR-box1*box2*</sup>          | pTCV- <i>lac</i> :: <i>lmb</i> <sup>IR</sup> with combined AdcR box <sub>1</sub> and box <sub>2</sub> nucleotide substitutions.                                                                                     | This study          |

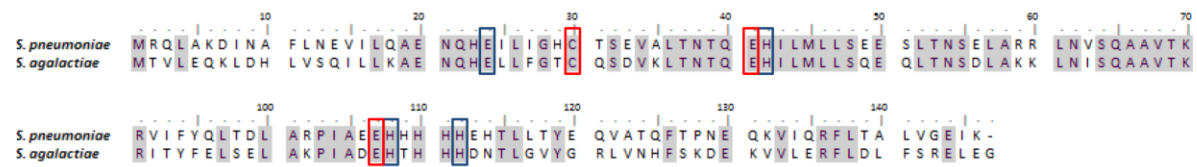




**Figure S1. Zinc concentration in the medium does not affect wild type growth**

The A909 WT strain was grown in CDM with various amounts of added  $\text{Zn}^{2+}$  (from 0 to 100  $\mu\text{M}$ ). Growth was monitored by taking  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  measurements at 1 h intervals during 18 h. Data are representative mean  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  measurements from three independent experiments.

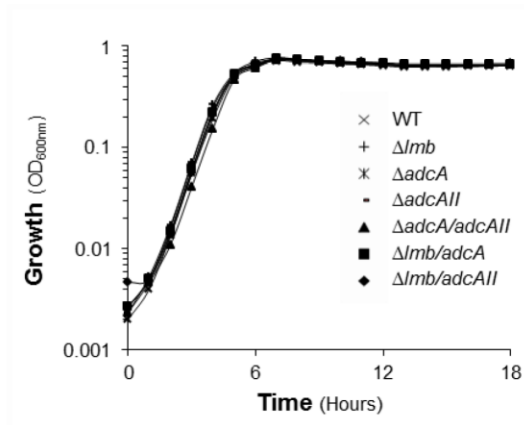




**Figure S2. Amino acid sequence alignment of AdcR proteins of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus agalactiae***

Identical residues are highlighted in grey. Conserved metal-binding residues of primary sensing site 1 are boxed in blue, residues forming the second site are boxed in red. Sequence alignment was performed using the BioEdit program.

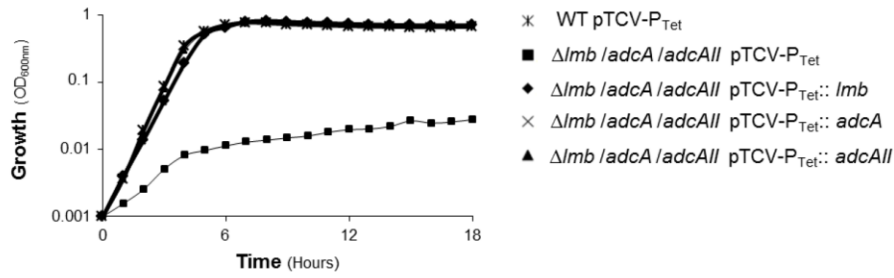




**Figure S3. Absence of one or two of the zinc-binding proteins Lmb, AdcA, or AdcAll does not affect bacterial growth in zinc-restricted conditions**

A909 WT and mutant strains were grown in zinc-restricted CDM. Growth was monitored by taking OD<sub>600nm</sub> measurements at 1 h intervals during 18 h. Data are representative mean OD<sub>600nm</sub> measurements from three independent experiments.



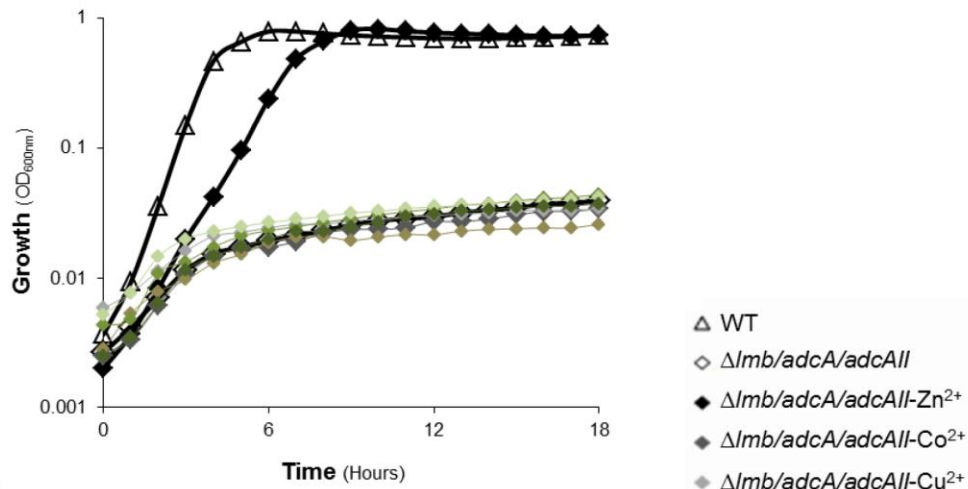


**Figure S4. Expression of any of the three binding-proteins fully restored the growth of the  $\Delta lmb/adcA/adcAll$  triple mutant.**

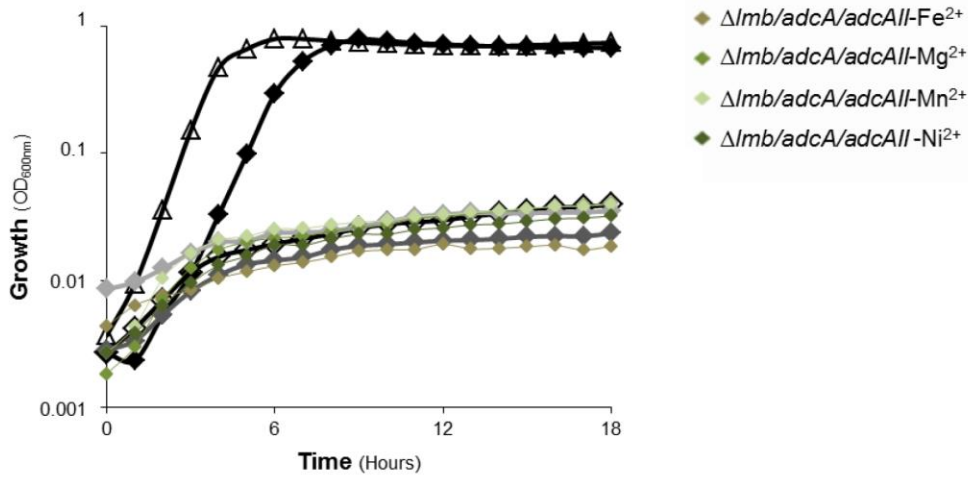
A909 WT and mutant strains carrying either the empty pTCV-P<sub>Tet</sub> plasmid or the pTCV-P<sub>Tet</sub> expressing *lmb*, *adcA* or *adcAll* were grown in zinc-restricted CDM with 10  $\mu$ g/ml erythromycin. Growth was monitored by taking OD<sub>600nm</sub> measurements at 1 h intervals during 18 h. Data are representative mean OD<sub>600nm</sub> measurements from three independent experiments.



**A.**



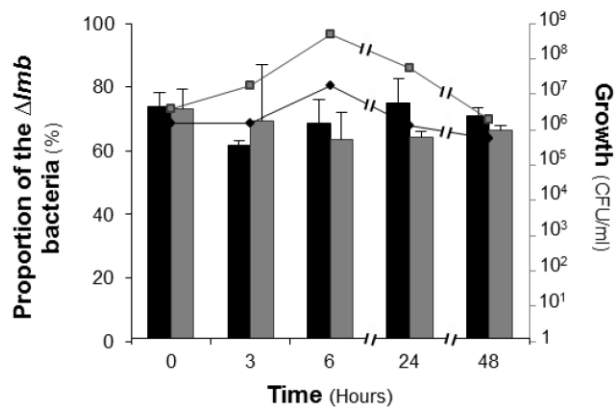
**B.**



**Figure S5. Growth of the *S. agalactiae*  $\Delta lmb/adcA/adcAll$  is not restored by addition of metals, except zinc.**

A909 cells WT (triangles) or  $\Delta lmb/adcA/adcAll$  mutant strain (diamonds) were grown in CDM with 10  $\mu M$  (A) or 100  $\mu M$  (B) of various added metals. The growth was monitored by assessing  $OD_{600nm}$  at 1 h intervals during 18 h. Data are representative mean  $OD_{600nm}$  measurements from three independent experiments.





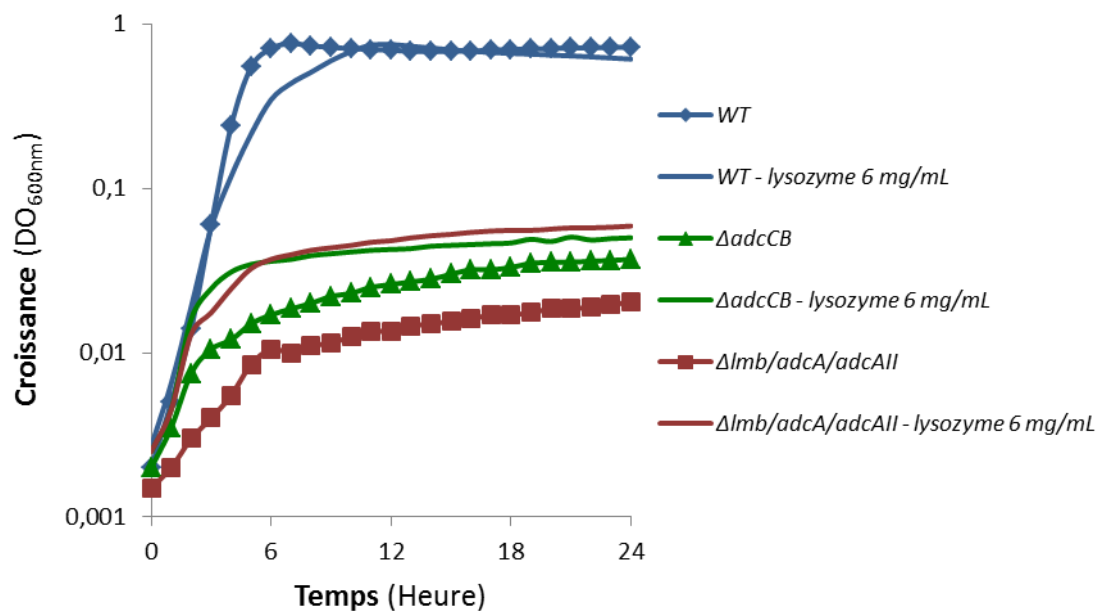
**Figure S6. Absence of the Lmb protein does not impair *Streptococcus agalactiae* survival in two human biological fluids**

A909 cells WT and  $\Delta lmb$  mutant strains were inoculated in equivalent numbers into human cerebrospinal fluid (black bars and curve with black diamond symbols) or amniotic fluid (dark grey bars and curve with dark grey square symbols). Co-cultures were incubated at 37°C for 48 h without agitation, the CFU counted, and the growth curves traced. The proportion of each strain was monitored by plating diluted cultures on TH agar containing erythromycin (10  $\mu$ g/ml) and X-Gal (60  $\mu$ g/ml) (see Experimental procedures section). Results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation for three independent co-cultures.



## REFERENCES

1. **Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJB, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM.** 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:13950–13955.
2. **Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E.** 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **175**:3628–3635.
3. **Firon A, Tazi A, Da Cunha V, Brinster S, Sauvage E, Dramsi S, Golenbock DT, Glaser P, Poyart C, 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 Pathog* **9**:e1003179.
4. **Poyart C, Trieu-Cuot P.** 1997. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to beta-galactosidase in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **156**:193–198.



**Figure 26. Résistance des souches A909 WT et mutantes  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  et  $\Delta adcCB$  au lysozyme.**

Suite à une pré-culture de 12h en MCD carencé en zinc, les souches A909 WT et mutantes  $\Delta adcCB$  et  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  ont été mises en culture en MCD carencé en zinc ou MCD carencé en zinc avec une concentration sub-inhibitrice de lysozyme (6 mg/mL). La Densité optique a été lue à 600 nm toutes les heures pendant 24h. Les résultats présentés sont les moyennes de trois expériences indépendantes.

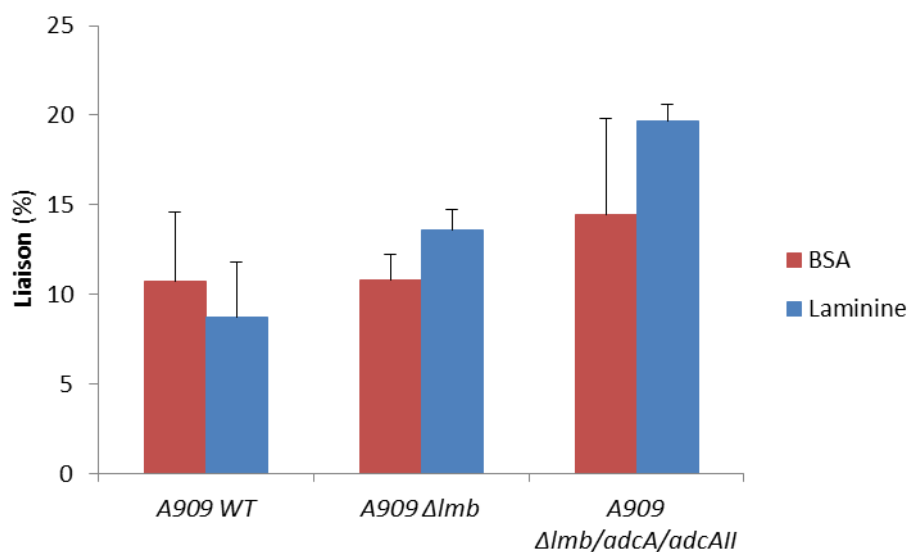
# Résultats complémentaires de la Publication 1

Dans cette partie nous présenterons des résultats non publiés complétant la Publication 1. Dans un premier temps nous avons voulu savoir si le zinc joue un rôle dans la résistance au lysozyme. Nous avons ensuite étudié un second rôle potentiel joué par les protéines AdcA et AdcAII dans l'adhérence.

## 1) Le zinc est-il impliqué dans la résistance au lysozyme ?

Parmi les métalloenzymes nécessitant du zinc pour leur fonctionnement, nous retrouvons la protéine SpPgdA de *S. pneumoniae* (Blair *et al.*, 2005). Cette enzyme est une déacétylase peptidoglycane intervenant dans la structure du peptidoglycane. La délétion du gène *pgdA* entraîne une hypersensibilité au lysozyme et la lyse de *S. pneumoniae* par l'absence de modifications du site de reconnaissance du lysozyme (absence de dé-N-acétylation des résidus du peptidoglycane) (Vollmer and Tomasz, 2000). Le lysozyme est une glycoside hydrolase présente dans plusieurs sécrétions comme les larmes, le mucus ou la salive qui intervient dans la défense contre les infections bactériennes en catalysant l'hydrolyse du peptidoglycane de la paroi des bactéries à Gram + (Cole *et al.*, 2002). Le lysozyme est sécrété par de nombreux épithéliums dont l'épithélium pulmonaire et représente un composant majeur de diverses cellules phagocytaires comme les neutrophiles (Welsh and Spitznagel, 1971; Cramer and Breton-Gorius, 1987). Chez *S. agalactiae* un homologue de la protéine SpPgdA est présent avec 36% d'identité protéique mais n'a pas été décrit. Une carence en zinc chez *S. agalactiae* pourrait donc modifier l'action de l'enzyme SpPgdA, rendant la bactérie plus sensible au lysozyme. Pour tester cette hypothèse nous avons suivi la croissance des souches A909 WT et mutantes  $\Delta adcCB$  et  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  en MCD carencé en zinc en présence d'une concentration sub-inhibitrice de lysozyme.

La croissance des souches mutantes  $\Delta adcCB$  et  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  est affectée de la même manière en MCD carencé en zinc en présence ou absence de lysozyme suggérant que le zinc n'intervient pas dans la résistance au lysozyme (Figure 26). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que la résistance de *S. agalactiae* au lysozyme repose principalement sur d'autres



**Figure 27. Liaison à la laminine humaine immobilisée des souches A909 WT et mutantes  $\Delta lmb$ ,  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  de *S. agalactiae*.**

Les souches A909 WT et mutantes  $\Delta lmb$ ,  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  de *S. agalactiae* ont été mises en contact avec 10  $\mu\text{g/mL}$  de laminine ou BSA, immobilisées sur microplaque, pendant 1h30 à 37°C. Après lavages et décollement, les bactéries ont été dénombrées sur gélose TH. Le pourcentage de liaison représente le ratio entre le nombre de bactéries adhérentes et l'inoculum. Les résultats présentés sont les moyennes de trois expériences indépendantes  $\pm$  l'écart-type.

protéines qui ne sont pas des métalloenzymes comme cela a été décrit par exemple avec l'O-acétyltransférase peptidoglycane ou l'opéron *dlt* chez *S. pneumoniae* et *S. aureus* respectivement (Peschel *et al.*, 1999; Crisóstomo *et al.*, 2006).

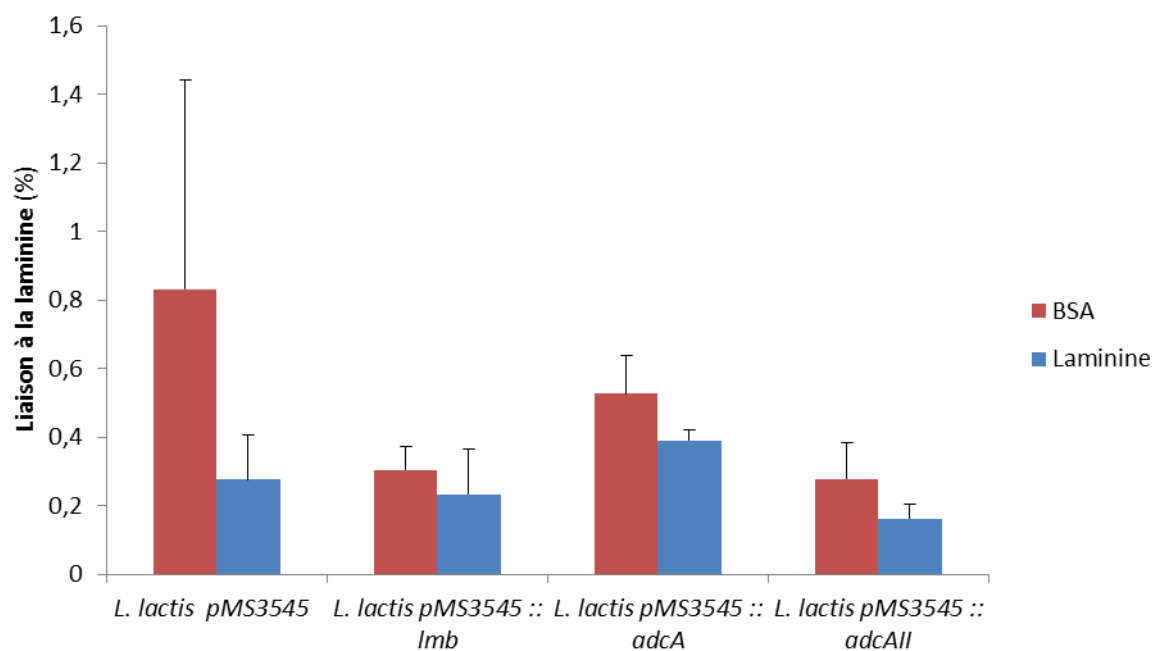
## 2) Les protéines AdcA et AdcAII jouent-elles un rôle dans l'adhérence de *S. agalactiae* ?

La protéine Lmb de *S. agalactiae* fut initialement décrite comme une adhésine permettant la fixation d'un composant de la matrice extracellulaire de l'hôte, la laminine (Spellerberg *et al.*, 1999). Ce rôle a également été décrit chez son homologue Lbp de *S. pyogenes* (Elsner *et al.*, 2002). *S. agalactiae* possède également deux homologues de la protéine Lmb, AdcA et AdcAII dont le rôle d'adhésine n'a pas été étudié. Tout d'abord, nous avons voulu confirmer l'adhérence de la protéine Lmb, en se plaçant dans des conditions où le gène *lmb* est surexprimé (MCD carencé en zinc). Nous avons ensuite étudié la liaison des protéines AdcA et AdcAII à la laminine.

### A) Test de liaison de *S. agalactiae* à la laminine

Pour confirmer le rôle d'adhésine à la laminine de la protéine Lmb, nous avons comparé la liaison des souches A909 WT et  $\Delta lmb$  à la laminine immobilisée sur microplaque. Pour chercher à accentuer cette différence d'adhérence, les souches ont été cultivées en MCD carencé en zinc, milieu dans lequel les gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* sont surexprimés (Figure 3B, Publication 1).

Une liaison de la souche WT à la laminine a été observée, cependant cette liaison apparaît non spécifique, le pourcentage de liaison au contrôle négatif (BSA) étant du même ordre de grandeur (Figure 27). Etonnement nous n'avons pas retrouvé de liaison plus faible à la laminine avec la souche mutante  $\Delta lmb$ . Pour se replacer dans les mêmes conditions que la publication où la liaison de la protéine Lmb avait été observée, les souches WT et  $\Delta lmb$  ont été cultivées en TH, un des composants de ce milieu pouvant être nécessaire à la liaison de la laminine (Spellerberg *et al.*, 1999). De manière similaire aux résultats précédents, aucune différence de liaison n'a été observée entre les deux souches WT et  $\Delta lmb$  (résultats non montrés). Ces résultats pourraient s'expliquer par la redondance des protéines Lmb, AdcA et AdcAII dans la liaison à la laminine.



**Figure 28. Liaison à la laminine humaine immobilisée des souches de *L. lactis* subsp *cremoris* NZ9000 transformées avec le vecteur pMS3545 vide ou contenant les gènes *lmb*, *adcA* ou *adcAII*.**

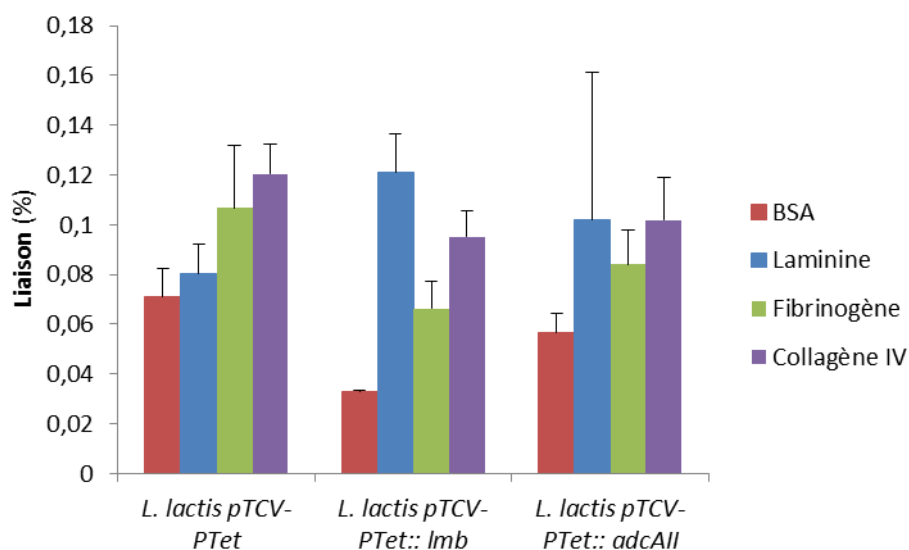
Les souches de *L. lactis* transformées avec le vecteur pMS3545 vide ou contenant les gènes *lmb*, *adcA* ou *adcAII* ont été mises en contact avec 10 µg/mL de laminine ou BSA, immobilisées sur microplaque, pendant 1h30 à 30°C. Après lavages et décollement, les bactéries ont été dénombrées sur gélose TH + Ery 10 µg/mL. Le pourcentage de liaison représente le ratio entre le nombre de bactéries adhérentes et l'inoculum. Les résultats présentés sont les moyennes de trois expériences indépendantes ± l'écart-type.

En absence de la protéine Lmb, les protéines AdcA et AdcAII pourraient prendre le relais dans la fixation à la laminine. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons comparé la liaison à la laminine des souches A909 WT et  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  de *S. agalactiae* suite à leur culture en MCD carencé en zinc. Nous avons observé que la souche  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  est deux fois plus adhérente à la laminine que la souche WT mais cette adhérence est, de la même manière que la souche WT, non spécifique (Figure 27). L'absence de fixation de la protéine Lmb à la laminine pourrait s'expliquer par le fait que nous avons utilisé une souche (A909) ayant un fond génétique différent de la souche de la publication de 1999 (O90R) et que malgré la conservation de la séquence de la protéine Lmb au sein des souches de *S. agalactiae*, la liaison à la laminine dépende d'un autre élément en plus de la protéine Lmb, présent dans la souche O90R (Spellerberg *et al.*, 1999). Cependant, une absence de fixation de la laminine par la protéine AdcAII de *S. pneumoniae*, présentant 67% d'identité protéique avec la protéine Lmb de *S. agalactiae*, a été décrite, allant dans le même sens que nos résultats (Brown *et al.*, 2016).

## B) Test de liaison à différents composants de la matrice extracellulaire par expression hétérologue chez *L. lactis*

A partir de tests d'adhérence réalisés sur bactéries entières, aucun rôle des protéines Lmb, AdcA et AdcAII n'a été observé. Nous avons ainsi utilisé un autre protocole expérimental en utilisant un système d'expression hétérologue de nos protéines. Cette expérience consiste à utiliser une bactérie non adhérente, ici *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000, à laquelle a été incorporé le vecteur inducible à la nisine pMSP3545 contenant le gène *lmb*, *adcA* ou *adcAII* de *S. agalactiae* (Bryan *et al.*, 2000). De fait, si le gène incorporé dans la bactérie code une adhésine à la laminine, nous devrions observer une adhérence spécifique à ce composant. L'expression hétérologue du gène *fbsA* de *S. agalactiae* chez la souche *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 a notamment permis de montrer le rôle d'adhésine au fibrinogène de la protéine FbsA (Schubert *et al.*, 2004).

La souche *L. lactis* transformée avec le vecteur pMS3545 vide montre une très faible liaison non spécifique à la laminine (<0,5%) (Figure 28). Cette liaison n'est ainsi pas jugée comme de l'adhérence et cette souche peut être considérée comme un témoin négatif satisfaisant. Une absence d'adhérence a également été observée pour les souches de *L. lactis* transformées avec le vecteur pMS3545::*lmb*, pMS3545::*adcA* ou pMS3545::*adcAII*.



**Figure 29. Liaison à différents composants de la matrice extracellulaire des souches de *L. lactis subsp cremoris* NZ9000 transformées avec le vecteur pTCV-P<sub>Tet</sub> vide ou contenant les gènes *lmb* ou *adcAII*.**

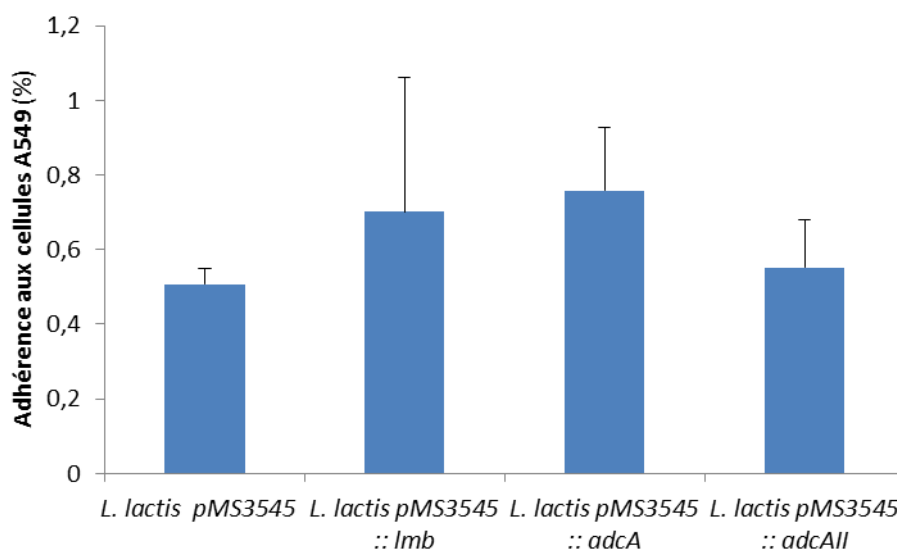
Les souches de *L. lactis* transformées avec le vecteur pTCV-P<sub>Tet</sub> vide ou contenant les gènes *lmb*, ou *adcAII* ont été mises en contact avec 10 µg/mL de laminine, de fibrinogène, de collagène de type IV ou de BSA, immobilisés sur microplaque, pendant 1h30 à 30°C. Après lavage et décollement, les bactéries ont été dénombrées sur gélose TH + Ery 10 µg/mL. Le pourcentage de liaison représente le ratio entre le nombre de bactéries adhérentes et l'inoculum. Les résultats présentés sont les moyennes de trois expériences indépendantes ± l'écart-type.

Avec ce modèle nous n'avons donc pas observé de rôle dans la liaison à la laminine en surexprimant les protéines Lmb, AdcA et AdcAII avec le vecteur pMS3545. Or ce vecteur a été utilisé pour des expériences de complémentation de la souche triple mutante  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  de *S. agalactiae*. Une complémentation imparfaite a été observée pour les trois gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* (résultats non montrés). L'expression de ces gènes par le vecteur pMS3545 après induction dans la souche  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  de *S. agalactiae* a été vérifiée par qRT-PCR. Nous avons mesuré une expression des gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* représentant 80, 12 et 28% respectivement de la valeur retrouvée chez la souche WT de *S. agalactiae* (résultats non montrés). Ces valeurs expliquent la complémentation partielle observée et pourraient expliquer l'absence d'adhérence de la souche *L. lactis* à la laminine. Nous avons ainsi utilisé un autre plasmide pTCV-P<sub>Tet</sub> possédant un promoteur constitutif fort (Firon *et al.*, 2013). Ce vecteur a permis une complémentation de la souche triple mutante  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  de *S. agalactiae* par les gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* (Figure S4, Publication 1). Ce vecteur a donc été introduit chez *L. lactis* pour réaliser des tests d'adhérence.

Les trois souches de *L. lactis* montrent des pourcentages de liaison aux différents composants de la matrice extracellulaire inférieurs à 0,2 % indiquant une absence d'adhérence de ces souches (Figure 29). Les protéines Lmb et AdcAII ne sont donc pas impliquées dans la liaison à la laminine, au fibrinogène et au collagène de type IV. Bien que l'expression des gènes *lmb* et *adcAII*, clonés dans le vecteur pTCV-P<sub>Tet</sub>, ait été confirmée dans la bactérie *L. lactis* (résultats non montrés), il serait nécessaire de vérifier la bonne localisation des protéines Lmb et AdcAII au niveau de la membrane plasmique de *L. lactis* par des expériences d'ultracentrifugation puis Western blot.

### C) Test d'adhérence de *L. lactis* à la lignée cellulaire humaine A549

La lignée cellulaire A549 d'adénocarcinome de poumons humains a été utilisée comme autre modèle d'étude de l'adhérence des protéines Lmb, AdcA et AdcAII de *S. agalactiae*. Ces cellules ont été décrites comme exprimant à leur surface de la laminine 10/11. De plus, cette laminine 10/11 est constituée, entre autres, de la chaîne  $\alpha 5$  retrouvée au niveau du cœur, des muscles squelettiques mais également au niveau des poumons et du placenta (Kikkawa *et al.*, 1998). Les deux derniers organes cités étant des lieux de colonisation de *S. agalactiae*, les cellules A549 représentent un bon modèle d'étude pour l'adhérence de *S. agalactiae*. Enfin, la protéine Lbp de *S. pyogenes*, homologue de la protéine Lmb de *S. agalactiae*, a été décrite



**Figure 30. Adhérence aux cellules A549 des souches de *L. lactis subsp cremoris* NZ9000 transformées avec le vecteur pMS3545 vide ou contenant les gènes *lmb*, *adcA* ou *adcAII*.**

Les souches de *L. lactis* transformées avec le vecteur pMS3545 vide ou contenant les gènes *lmb*, *adcA* ou *adcAII* ont été mises en contact avec les cellules A549 pendant 1h30 à 30°C. Après lavages et décollement, les bactéries ont été dénombrées sur gélose TH + Ery 10 µg/mL. Le pourcentage d'adhérence représente le ratio entre le nombre de bactéries adhérentes et l'inoculum. Les résultats présentés sont les moyennes de deux expériences indépendantes  $\pm$  l'écart-type.

comme jouant un rôle dans l'adhérence aux cellules A549 (Elsner *et al.*, 2002). Les souches transformées avec le vecteur pMS3545 vide, ou avec les gènes *adcA* ou *adcAII* montrent un pourcentage d'adhérence inférieur à 1% (Figure 30). La souche de *L. lactis* exprimant le gène *lmb*, a également un pourcentage d'adhérence très faible, inférieur à 1,2%. L'expression hétérologue des gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* ne confère pas à la souche *L. lactis* une capacité d'adhérence aux cellules A549. Les protéines Lmb, AdcA et AdcAII ne jouent ainsi aucun rôle dans l'adhérence aux cellules A549.

Différents modèles et techniques ont été utilisés pour étudier le rôle des protéines Lmb, AdcA et AdcAII dans l'adhérence. Ces expériences n'ont pas mis en évidence d'implication des protéines AdcA et AdcAII dans la liaison à la laminine. De plus, le rôle d'adhésine à la laminine, initialement décrit pour la protéine Lmb, n'a pas été retrouvé.

### 3) Matériels et Méthodes

#### A) Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches A909 WT et mutantes de *S. agalactiae* ont été utilisées pour réaliser des tests de résistance au lysozyme ainsi que des expériences de liaison à la laminine. Les souches ont été cultivées en milieu TH liquide pendant 6h à 37°C avant d'êtreensemencées en MCD carencé en zinc pendant 12h à 37°C. Cette pré-culture en MCD a ensuite servi pour les expériences de résistance au lysozyme et les tests de liaison à la laminine. La souche *L. lactis* subsp. *cremoris* NZ9000 a été utilisée pour les tests d'expression hétérologue. Cette bactérie a été transformée avec les vecteurs, pMSP3545 ou pTCV-P<sub>Tet</sub>, vides ou contenant le gène *lmb*, *adcA* ou *adcAII* de *S. agalactiae* (Bryan *et al.*, 2000; Firon *et al.*, 2013). L'expression des gènes clonés dans le vecteur pMSP3545 ou le vecteur pTCV-P<sub>Tet</sub> est induite par de la nisine (50 ng/mL, Sigma-Aldrich) ou sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort respectivement. Ces bactéries ont été cultivées à 30°C sans agitation en milieu liquide TH additionné de 10 µg/mL d'Ery jusqu'à mi-phase exponentielle de croissance (DO<sub>600 nm</sub> = 0,5). L'expression des gènes clonés dans le vecteur pMSP3545 a été induite avec de la nisine pendant 1h30 à 30°C. Les bactéries ont ensuite été utilisées pour les tests d'adhérence.



## B) Résistance au lysozyme

A partir d'une pré-culture en MCD carencé en zinc, les souches A909 WT et mutantes  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  et  $\Delta adcCB$  ont été ensemencées à une densité optique (DO) de 0,005 en MCD carencé en zinc ou MCD carencé en zinc avec une concentration sub-inhibitrice de lysozyme (6 mg/mL, Sigma-Aldrich). La DO a ensuite été mesurée à 600 nm toutes les heures pendant 24h et les courbes de croissance comparées. Les résultats donnés représentent les moyennes de trois expériences indépendantes.

## C) Liaison à différents composants de la matrice extracellulaire

De la laminine placentaire humaine (Sigma-Aldrich), du collagène de type IV (Sigma-Aldrich) ou du fibrinogène (Sigma-Aldrich), ont été déposés sur microplaque 96 puits à une concentration de 10 µg/ml puis laissés à température ambiante pendant 12h. De la BSA (10 µg/mL, Sigma-Aldrich) a également été utilisée pour servir de témoin négatif d'adhérence. Les bactéries ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) ont ensuite été mises en contact avec ces protéines pendant 1h30 à 37°C (*S. agalactiae*) ou 30°C (*L. lactis*). Après lavages de la microplaque au PBS 1X puis décollement des bactéries à la protéase (100 µg/mL, Sigma-Aldrich), les bactéries ont été dénombrées sur gélose TH (*S. agalactiae*) ou gélose TH additionnée de 10 µg/mL d'Ery (*L. lactis*). Le pourcentage de liaison donné correspond au ratio du nombre de bactéries adhérentes sur le nombre de bactéries présentes dans l'inoculum de trois expériences indépendantes.

## D) Adhérence aux cellules A549

Les cellules A549 (ATCC CCL-185) ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> en milieu MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) additionné de 10% de sérum de veau fœtal (Gibco, Thermo Fisher Scientific), avant d'être déposées sur plaque 24 puits ( $4 \times 10^5$  cellules/mL). La culture des différentes souches transformées de *L. lactis* puis l'induction des gènes clonés ont été réalisées comme décrit dans la partie A. Ces bactéries ont ensuite été mises en contact avec les cellules A549 avec une MOI de 15 pendant 1h30 à 30°C. Après lavages au PBS 1X les cellules A549 ont été décrochées avec du triton (0,25%, Sigma-Aldrich) et les bactéries adhérentes dénombrées sur gélose TH + Ery 10 µg/mL. Le pourcentage d'adhérence a été



calculé en faisant le ratio des bactéries adhérentes sur l'inoculum pour deux expériences indépendantes.



## **II) Les protéines streptococciques à triade d'histidine Sht et ShtII participent à l'acquisition du zinc au sein du transporteur Adc/Lmb et contribuent à la résistance au complément**

Chez *S. pneumoniae*, en plus des protéines de fixation AdcA et AdcAII et du translocon AdcCB, le transporteur ABC de zinc est constitué également de protéines de type Pht nécessaires à AdcAII dans le recrutement de zinc (Plumtre, Hughes, *et al.*, 2014). Un rôle dans la résistance au complément a également été mis en évidence pour les protéines Pht (Ogunniyi *et al.*, 2009). Chez *S. agalactiae* deux homologues de ses protéines, nommés Sht et ShtII, sont présents. Initialement, la protéine Sht a été décrite comme jouant un rôle dans la résistance au complément mais cette fonction n'a pas été étudiée pour la protéine ShtII (Maruvada *et al.*, 2009). De plus, l'implication de ces deux protéines dans la capture de zinc n'a pas été recherchée. Nous avons ainsi supposé que les protéines Sht et ShtII feraient partie du transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae*, aideraient les protéines Lmb, AdcA et AdcAII dans l'acquisition de zinc et auraient un rôle dans la résistance au complément.

L'objectif de ce travail a ainsi été d'étudier le rôle de ces deux protéines dans la capture de zinc et de comprendre leur fonctionnement et leur interaction avec les autres membres du transporteur. Nous nous sommes également intéressés à un potentiel rôle secondaire joué par ces protéines dans la résistance au complément.

### **1) Rôle des protéines Sht et ShtII dans l'acquisition de zinc de *S. agalactiae***

Chez *S. agalactiae*, les deux gènes *sht* et *shtII*, codant des protéines de type Pht, sont en opéron avec les gènes *lmb* et *adcAII* respectivement. Dans notre précédente étude nous avons



mis en évidence que les opérons *lmb-sht* et *adcAII-shtII* sont réprimés par le zinc via le métallorégulateur AdcR (Moulin *et al.*, 2016). La mesure des transcrits des gènes *sht* et *shtII* par qRT-PCR chez les souches A909 WT et  $\Delta$ *adcR* cultivées en MCD avec différentes concentrations de zinc a montré que ces gènes situés en deuxième position de leur opéron sont réprimés par le zinc via la protéine AdcR de la même manière que les gènes *lmb* et *adcAII* (résultats non montrés).

Pour étudier l'implication des deux protéines Sht et ShtII dans l'acquisition du zinc, différentes combinaisons des souches mutantes pour les gènes *sht* et *shtII* mais également pour les gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* ont été réalisées. La croissance de ces souches a été comparée à la souche A909 WT en MCD avec différentes concentrations de zinc. Ces expériences ont montrées que les protéines Sht et ShtII sont impliquées dans la capture de zinc (Publication N°2). Nous avons également mis en évidence deux mécanismes distincts d'acquisition du zinc par le transporteur selon la SBP utilisée. Les deux protéines Sht et ShtII sont ainsi nécessaires aux protéines Lmb et AdcAII dans le recrutement de zinc mais pas pour la protéine AdcA (Publication N°2). Enfin nous avons observé que la protéine ShtII peut fonctionner indifféremment avec les protéines Lmb et AdcAII. Le fonctionnement de la protéine Sht avec les protéines Lmb et AdcAII est actuellement en cours d'étude au laboratoire.

## 2) Rôle des protéines Sht et ShtII dans la résistance au complément

Parmi les réponses immunitaires mises en place lors d'une infection bactérienne, l'hôte utilise la voie alterne du complément. Cette voie implique la fixation de molécules C3b à la surface bactérienne qui va conduire au final à la lyse de la bactérie par la formation d'un complexe d'attaque membranaire (Figure 22A). Pour échapper en particulier à cette voie, *S. pneumoniae* utilise notamment ses protéines Pht (Ogunniyi *et al.*, 2009). La résistance au complément de la bactérie est médiée par le recrutement d'un composant de l'hôte le facteur H par les protéines Pht (Figure 22B). La fixation de facteur H permet de diminuer le dépôt des molécules C3b à la surface bactérienne, ce dernier avec le facteur I transformant les molécules de C3b en molécules inactives iC3b. Initialement la protéine Sht de *S. agalactiae* a été décrite comme jouant un rôle dans la résistance au complément en fixant le facteur H de l'hôte (Maruvada *et al.*, 2009). La protéine ShtII partageant 43% d'identité protéique avec la protéine Sht, il est possible que ces deux protéines partagent le même rôle. Pour étudier le rôle de la protéine ShtII dans la résistance au complément, la fixation du facteur H par les



protéines purifiées ShtII et Sht (témoin positif) a été mesurée par des tests ELISA. Ces expériences ont montrées que les deux protéines Sht et ShtII sont impliquées dans la fixation du facteur H (Publication N°2). La résistance au complément a également été testée pour la protéine ShtII en comparant la survie dans le sang de la souche A909 WT aux simples et double mutants pour les gènes *sht* et *shtII*. Les résultats obtenus suggèrent un rôle mineur des protéines Sht et ShtII dans la résistance au complément avec une redondance de deux protéines (Publication N°2).

Les résultats obtenus sont représentés sous forme d'un article pour présenter le plan de la deuxième publication. Cette publication, en préparation, comprendra des expériences supplémentaires, non effectuées actuellement, décrites dans les perspectives.



# **PUBLICATION N°2**

**The Streptococcal histidine triad proteins Sht and ShtII are zinc suppliers of the Adc/Lmb transporter that contribute to the bacterial resistance against complement**

**Pauline Moulin,** Vanessa Rong, Laurent Mereghetti, Aurélia Hiron

Article en préparation



The Streptococcal histidine triad proteins Sht and ShtII are zinc suppliers of the Adc/Lmb transporter that contribute to the bacterial resistance against complement

**Pauline Moulin<sup>1</sup>, Vanessa Rong<sup>1</sup>, Laurent Mereghetti<sup>1,2</sup>, and Aurélia Hiron<sup>1,#</sup>**

<sup>1</sup> ISP, Université François Rabelais Tours, INRA, UMR1282, F-37032 Tours, France

<sup>2</sup> CHRU de Tours, Service de Bactériologie-Virologie et Hygiène, F-37044 Tours, France

# For correspondence

E-mail: aurelia.hiron@univ-tours.fr

Tel: (+33) 2 47 36 61 97

Running title: Characterization of the streptococcal histidine triad proteins of *Streptococcus agalactiae*



## ABSTRACT

The Sht protein of *Streptococcus agalactiae* is described as having a role in the resistance of complement through the factor H binding. In this study, we highlighted a new role for this protein in zinc uptake. We identified a Sht homolog, named ShtII which also is involved in zinc acquisition. We showed that the Sht and ShtII proteins belong to the Adc/Lmb zinc transporter which is composed of an AdcCB permease-ATPase complex and three zinc-binding proteins Lmb, AdcA and AdcAII. Using single and combined deletions of the different genes encoding this transporter we revealed two distinct zinc acquisition modes of the Adc/Lmb transporter. Thus, the Sht and the ShtII proteins are necessary for zinc acquisition through the Lmb and AdcAII proteins but not for the AdcA protein. We showed that the ShtII protein indifferently works with both the Lmb and AdcAII proteins. The role of the ShtII protein in factor H binding was analyzed and revealed that both the Sht and ShtII proteins bind the factor H. Nevertheless, this binding appeared to confer a minor role in the resistance of complement *ex vivo*, in whole human blood survival assays.

## INTRODUCTION

*Streptococcus agalactiae*, also named group B streptococcus (GBS), is an opportunistic pathogenic bacterium that can infect a large diversity of hosts ranging from humans to fishes (1, 2). The bacterium causes invasive infections like septicemia, pneumonia and meningitis in human neonates. Despite antibiotics prophylaxis that permit to reduce the mortality rate of infected newborns, the bacterium is still the leading cause of neonatal invasive infections in many industrialized countries (3, 4). *S. agalactiae* is also an emerging cause of severe pathologies (bacteremia, osteoarticular infections, endocarditis...) in elderly and immunocompromised adults (5, 6).



In order to cause deep infections and to survive in the host, *S. agalactiae* possesses numerous factors allowing the bacterium to evade immune defenses and especially to resist of the complement system (7–9). Among them, the Streptococcal histidine triad protein Sht was described as a surface protein involved in complement degradation (10). The proposed mechanism is that Sht binds Factor H, a human regulator promoting C3b inactivation and thus helps bacteria to escape from lysis by the membrane attack complex (MAC). The gene encoding the Sht protein is organized in an operon with the *lmb* gene. The *lmb-sht* operon is found on a mobile genetic element, specific to the human strains, suggesting its importance in the adaptation and/or virulence in Humans (11, 12). A homologue of the Sht protein, named ShtII, and sharing 43 % of protein identity with Sht, is encoded on the *adcAII-shtII* operon, and is present in all sequenced *S. agalactiae* strains.

The Sht and ShtII proteins possesses multiple specific motifs of Histidine Triad (HT motif) that classify them in the histidine triad family protein (13). This family of proteins is found in almost all of the streptococci groups with the exception of the Bovis, Mutans and Salivarius groups (14). Among the proteins of this family, the Sht and ShtII proteins exhibit respectively 52% and 37% of protein identity with the PhtD protein of *Streptococcus pneumoniae*. The PhtD and its three homologs (PhtA, PhtB and PhtE) were described as having a role in zinc acquisition, and form, in association with a translocon (AdcCB) and two lipoproteins (AdcA and AdcAII), a zinc-ABC transporter (15, 16). Pht proteins are predominantly cell wall-associated proteins (17). Flow cytometric analyses showed that the C-terminal region of the PhtD protein is more exposed to exogenous antibodies suggesting that the amino region of the protein is oriented towards the membrane (18, 19). PhtD has been shown to bind zinc through its five HT motifs, and predominantly through its first HT motif (17, 20). The current model is that PhtD could transfer the metal to the AdcAII lipoprotein by direct interaction for transport into the bacterial cell (21). Consistent with the



high level of similarity between PhtD and its homologs PhtA, PhtB and PhtE, it has been shown that each of the four proteins contribute to AdcAII-mediated zinc acquisition, with overlapping functionality (15). In *S. agalactiae*, a similar zinc ABC transporter has been described. This transporter is composed of three substrate binding proteins (SBP), Lmb, AdcA and AdcAII which deliver zinc to the permease-ATPase complex AdcCB (12). The high protein identity between the Sht, ShtII and PhtD proteins and the co-regulation of the *lmb-sht*, and *adcAII-shtII* genes strongly suggest that the Sht and ShtII proteins could work with the Adc/Lmb system to transport zinc. Despite these further evidences, the implication of the Sht and ShtII proteins in zinc acquisition has not been studied yet.

In this study we examined the impact of the Sht and ShtII proteins in zinc transport through the Adc/Lmb system. Our results revealed a major role of the Sht and ShtII proteins to ensure zinc acquisition via the Lmb and AdcAII proteins. Thus, to transport zinc, the Adc/Lmb transporter employs different and functionally redundant systems of zinc acquisition, governed by a complex network of interaction between the constitutive proteins. We also studied the *S. agalactiae* resistance towards the complement system and extended data previously observed for Sht, to ShtII, highlighting a double function in zinc transport and in escape to immune system for both proteins.

## **MATERIALS AND METHOD**

### **Bacterial strains and culture conditions**

*S. agalactiae* (GBS) and *E. coli* strains used in this study are listed in the Table S1 of the supplemental material. *E. coli* XL1-blue served as the host for recombinant plasmid pG+host1<sup>TS</sup> and *E. coli* BL21 was used for the expression of recombinant protein from plasmid pET28a. *S. agalactiae* strains were cultured on 5% horse blood trypticase soy (TSH) agar plates (1.5% agar) (bioMérieux), on Todd-Hewitt broth (TH) agar (catalog number

**Table 1. Oligonucleotides used in this study**

| Name                                                        | Sequence <sup>a</sup>                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Primers used for the deletion of <i>sht</i></b>          |                                                                                                                 |
| OAH 107                                                     | TTTGTT <b>GGTACCC</b> ATTACATACCTTAGAAGC                                                                        |
| OAH 108                                                     | ATATGT <b>CCATGG</b> CACTAATAATCTCCTTTACTTC                                                                     |
| OAH 109                                                     | CAACA <b>CCATGG</b> CCTTAACCAAAAGAAGATCTC                                                                       |
| OAH 110                                                     | ATGTCT <b>CCCGGG</b> GGAACACCTGCAGATAATGCCTG                                                                    |
| <b>Primers used for the deletion of <i>shtII</i></b>        |                                                                                                                 |
| OAH 123                                                     | ACTCTAG <b>AATTC</b> CTGTAATTGAAGCTTCAAAAG                                                                      |
| OAH 124                                                     | TTTACG <b>GGTACCC</b> CTCGCTCCTTTCTTTATATA                                                                      |
| OAH 125                                                     | CTAGC <b>AGGTAC</b> CAATAATAAAAGAGTTGAGTA                                                                       |
| OAH 126                                                     | TCAAC <b>ACCCGGG</b> CTTATCCTTGTAGGAGGAGAA                                                                      |
| <b>Primers used for the complementation of <i>sht</i></b>   |                                                                                                                 |
| OAH 248                                                     | TTTTTT <b>AGATCT</b> GGAGGTACTGTGAAGAAAACATATGGT                                                                |
| OAH 225                                                     | CTTCAAAATCACCGTAACTTGCTTT <b>CTGCAG</b> AAAAAAGCTTTG<br>AGCAATTTGCTCAAAGTTTTTTTAAGGGTTTATTTGTTGAA<br>GTGTCTTGAT |
| <b>Primers used for the complementation of <i>shtII</i></b> |                                                                                                                 |
| OAH 249                                                     | TTTTTT <b>GGATCC</b> GGAGGTACTATGAATCGTAAAAAACAG<br>TT                                                          |
| OAH 241                                                     | TTT <b>GCATG</b> CAAAAACTTTGAGCAATTTGCTCAAAGTTTTT<br>TTATTTCACTTCTGCTAGTGTTTTAATATC                             |
| <b>Primers used for the deletion of <i>lmb</i></b>          |                                                                                                                 |
| OAH 24                                                      | AGGCTG <b>GAATTC</b> TGGAAGGCGCTACTGTTCC                                                                        |
| OAH 25                                                      | CTCCTTTACTTCAACCCTTTTTTCATAGTACCTCCTCAATT                                                                       |
| OAH 26                                                      | TACTATGAAAAAAGGGTTGAAGTAAAGGAGATTATTAGTG<br>AAG                                                                 |
| OAH 27                                                      | GGCTT <b>GGATCC</b> AGCTAGCTCACTTGGAGAC                                                                         |
| <b>Primers used for the deletion of <i>adcAll</i></b>       |                                                                                                                 |
| OAH 40                                                      | AAAATC <b>GAATTC</b> CAACGTGTTAATCAAGCAAGTG                                                                     |
| OAH 62                                                      | TAAG <b>GTACCT</b> CCGTATCCTTTTCATTAAACCTCC                                                                     |
| OAH 63                                                      | TTAG <b>GTACCT</b> AGGTAGTTATATAAAGAAAGGACG                                                                     |
| OAH 43                                                      | TACTAAG <b>ATCC</b> ATCTCCCATGTCATCAATGAC                                                                       |
| <b>Primers used for the deletion of <i>adcA</i></b>         |                                                                                                                 |
| OAH 86                                                      | AATCGT <b>GGTACCG</b> CAGCTCTAGCAGATCCACAC                                                                      |
| OAH 76                                                      | ATA <b>AAGCTT</b> GAAATTTCTTTCTCATTTTTCTCC                                                                      |
| OAH 77                                                      | ATGA <b>AAGCTT</b> CATTAATATTTAAAGATGATATCGG                                                                    |
| OAH 87                                                      | CATCCAG <b>GATCCC</b> GTCAGTTGTTTTCTTAGATAC                                                                     |
| <b>Primers used for recombinant proteins expression</b>     |                                                                                                                 |
| OAH 173 Sht                                                 | CATATT <b>GAATTC</b> TACCAACTTGGTAAGCATCATATGGGT                                                                |
| OAH 174 Sht                                                 | ATCTTC <b>GTCGACTT</b> A AGGGTTTATTTGTTGAAGTGT                                                                  |
| OAH 175 ShtII                                               | TACCA <b>GAATTC</b> AGCTATAATGCCCAAAAATCAGAC                                                                    |
| OAH 176 ShtII                                               | TCA ACT <b>GTCGACTT</b> ATTTCACTTCTGCTAG                                                                        |
| OAH 177 Lmb                                                 | GGGTGT <b>GAATTC</b> CAGCAAACCCCAACAGCCT                                                                        |
| OAH 178 Lmb                                                 | TAATAAG <b>TGCACTT</b> ACTTCAACTGTTGATAGAGCAC                                                                   |

<sup>a</sup> Added restriction site sequences are shown in bold

T1438; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or in liquid TH medium at 37°C without agitation. Complemented mutant strains harboring pTCV-P<sub>Tet</sub> plasmid were maintained in medium containing 10 µg/ml of erythromycin (Ery). *E. coli* strains were cultured on Luria-Bertani (LB) agar plates (catalog number 1005317;MP, Solon, OH, USA) or in liquid LB medium at 37°C with agitation (220 rpm). *E. coli* strains harboring pG+host1<sup>TS</sup> or pTCV-P<sub>Tet</sub> plasmids were maintained in medium containing 150 µg/ml of Ery. *E. coli* strains harboring pET28a plasmid were maintained in medium containing 25 µg/ml of kanamycin and 25 µg/ml of chloramphenicol.

### **Construction of deletion and complemented mutants**

Nonpolar deletion mutants strains of A909 *S. agalactiae* with a single or combined deletions of the entire coding sequence of the *lmb*, *adcA*, *adcAII*, *sht* or *shtII* genes had been generated as previously described (12). PCR and DNA sequencing were used to confirm that the desired mutations had been introduced. Primers (Eurogentec and Sigma-Aldrich) used to generate mutants strains are listed in Table 1. To complement the  $\Delta sht/shtII/adcA$  mutant strain the entire coding sequence of *sht* or *shtII* gene was cloned into the pTCV-P<sub>Tet</sub> vector using appropriate restriction sites as previously described (12). The cloned sequences into the pTCV-P<sub>Tet</sub> vectors were confirmed by PCR and DNA sequencing. Oligonucleotides (Eurogentec and Sigma-Aldrich) used for the complementation constructs are shown in Table 1.

### **GBS culture in chemically defined medium**

*S. agalactiae* strains were cultured in zinc-restricted chemically defined medium (CDM) as previously described (12). Briefly, a zinc-restricted CDM preculture of 8h containing glucose 0.2% (wt/vol) (D-(+)-Glucose, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) was made from an overnight TH culture. Preculture was then used to inoculate a zinc-restricted CDM



containing glucose 1% (wt/vol) and various ZnSO<sub>4</sub> concentrations (from 0 to 100 µM). Bacterial growth was monitored on microplates during 12h at 37°C.

#### **Purification of His-tagged Sht, ShtII and Lmb proteins.**

A909 *S. agalactiae* DNA was used to amplify by PCR the *sht*, *shtII* and *lmb* genes with the Q5 High-Fidelity DNA polymerase (New England BioLabs [NEB]). The *sht*, *shtII* and *lmb* genes were amplified using the OAH173-174, OAH175-176 and OAH177-178 primers respectively. These primers were designed to remove the sequence signal of each proteins (residues 1-23 for Sht ; 1-27 for ShtII and 1-22 for Lmb). PCR amplifications were cloned into pET28a (+) vector (EMD Biosciences) in *E. coli* BL21 codon + (DE3)-RIL (Novagen, Madison, Wis) for high-level expression and purification over Ni<sup>2+</sup> column. *E. coli* BL21 strains harboring the corresponding plasmids were cultured in LB medium until a OD<sub>600</sub> of 0.5, and protein expression was induced by 1 mM of isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) for 5h; cells were pelleted, resuspended in 1 ml of lysis buffer (20 mM Tris base, 300 mM NaCl, glycerol 10% [pH 8.0]) and subjected to sonication. Recombinant proteins were purified from lysed *E. coli* cells by passage over a commercial nickel affinity matrix (His-Select Nickel Affinity gel, Sigma-Aldrich) and eluted under native conditions according to the manufacturer's instructions. The eluates were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide (SDS-PAGE) gel electrophoresis and colored as Coomassie blue for purity estimation, as described by Laemmli (22).

#### **Factor H binding to Sht and ShtII proteins.**

A 96 well micro test plate (SARSTEDT, Germany) was coated at concentration of 10 µg/mL with purified recombinant proteins (Sht, ShtII or Lmb) and air dried at 37°C. The wells were washed three times with 200 µL of PBS containing 1% of skim milk (wt/vol) and 0.05% Tween 20 (wash buffer) and then blocked with 200 µL of PBS containing 5% of skim milk (wt/vol) and 0.05% Tween 20 (blocking buffer) for 1h at 37°C. Decomplemented human



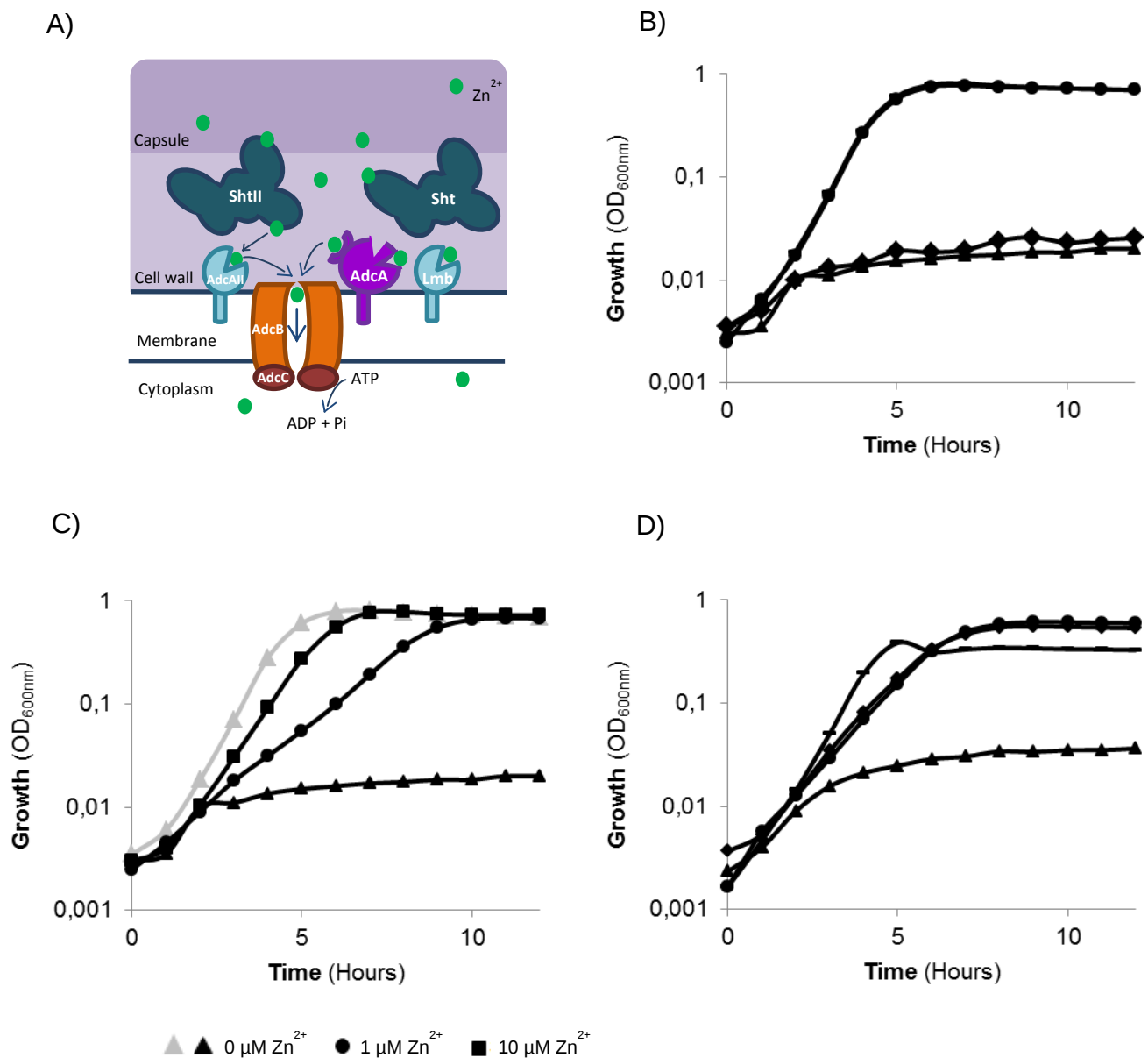
serum 30 min at 56°C, providing of two healthy donors who were not taking medications, was used as a source of FH. After washing, 200 µL of decomplexed serum were added in the wells during 2h at 37°C. The wells were then washed three times with the wash buffer and incubated with 100 µL of mouse antibody factor H (1:5000 (vol/vol) in PBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) during 1h at 37°C. After three washing of the wells, 100 µL of peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (1:20,000 (vol/vol) in 0,05 M carbonate-bicarbonate Buffer, PH 9.6; Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) were added and the plate was incubated 1h at 37°C. The wells were finally washed before adding 200 µL of Sigma Fast OPD substrate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) and the OD<sub>450</sub> was read. ELISA assays were repeated three times in duplicate and the mean and standard deviations were determined.

#### **Factor H binding to whole bacteria.**

To compare binding of FH to the WT and  $\Delta sht/shtII$  mutant strains, decomplexed human serum 30 min at 56°C, providing of two healthy donors who were not taking medications, was used as a source of FH. Bacteria were grown in TH for 8h and then cultured in zinc-restricted CDM (OD<sub>600</sub>, 0.005) during 12 hours. Cells were harvested by centrifugation and the cell pellet was resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) to 10<sup>9</sup> cfu/ml. 100 µL of this suspension was then added into microplate and the plate was air dried at 37°C. The ELISA assays were then performed as described above.

#### **Complement resistance assays in human whole blood or in decomplexed human whole blood.**

Whole human blood was used as a source of complement. It provided from one healthy donor, who was not taking medications. A part of blood was inactivated during 30 min at 56°C. A culture of the WT and mutant strains in TH during 8 hours was used to inoculate a zinc-restricted CDM culture (OD<sub>600</sub>, 0,005) during 12 hours. Cells were washed



**Fig 1.** The Sht and ShtII proteins are involved in zinc acquisition through the Adc/Lmb transporter. (A) Schema of the Adc/Lmb system. The transporter is composed of the AdcCB permease-ATPase complex in association with the three zinc-binding proteins Lmb, AdcA and AdcAII. This transporter would also possess the Sht and ShtII proteins, found in the cell wall, to recruit zinc. (B) The A909 WT (line) and the  $\Delta sht/shtII/adcA$  (triangles),  $\Delta lmb/sht/adcAII/shtII$  (circles),  $\Delta lmb/sht/adcAII/shtII/adcA$  (diamonds) mutant strains were grown in zinc-restricted CDM. (C) The A909 WT (gray) and the  $\Delta sht/shtII/adcA$  (dark) mutant strains were grown in zinc-restricted CDM with various amounts of added Zn<sup>2+</sup> (from 0 to 10  $\mu$ M). (D) The A909 WT (line) containing the empty pTCV-P<sub>Tet</sub> vector and the  $\Delta sht/shtII/adcA$  mutant strains containing the empty pTCV-P<sub>Tet</sub> (triangles) or the pTCV-P<sub>Tet</sub>::*sht* (diamonds) or the pTCV-P<sub>Tet</sub>::*shtII* (circles) vectors were grown in zinc-restricted CDM with 10  $\mu$ g/mL erythromycin. The growths were monitored by OD<sub>600</sub> measurements every hour during 12h. Data are representative mean OD<sub>600</sub> measurements from three independent experiments.

and resuspended in PBS to inoculate 1 mL of blood or decomplexed blood at a concentration of  $10^6$  cfu/mL then incubated for 3h at 37°C with gentle agitation. The number of cfu was determined by plating dilutions on TH agar. Experiments were realized at a list of three times.

### **Statistical evaluation.**

Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean. Statistical analyses were performed using the non-parametric Student *t* test (unpaired). Tests were conducted using the Biosta TGV online software. P values of  $< 0.05$  were considered to indicate a statistically significant difference.

## **RESULTS**

### **The Sht and ShtII proteins are zinc suppliers of the Adc/Lmb system**

We hypothesized that Sht and ShtII proteins of *S. agalactiae* may be a part of the Adc/Lmb zinc transporter comprising three binding proteins and the AdcCB translocon (Fig. 1A). To examine the role of the Sht and ShtII proteins in zinc recruitment, single or double deletions of the *sht* and *shtII* genes, in isolation or in combination with the *lmb*, *adcA* and *adcAII* genes, were constructed. Growths of the mutant strains were performed in a zinc-restricted chemically defined medium (zinc-restricted CDM) where the Adc/Lmb transporter has been shown to be essential for the bacterium development (12). The mutant strains lacking one or both of the *sht* and *shtII* genes presented a similar growth to the WT strain (Fig. S1). This is also the case for the  $\Delta lmb/sht/adcAII/shtII$  mutant strain, indicating that AdcA, as the unique zinc-binding protein, is sufficient to confer a normal growth of the bacterium (Fig. 1B). However, growth was strongly impaired with the  $\Delta sht/shtII/adcA$  strain. This growth deficiency is similar to that observed in the  $\Delta lmb/sht/adcAII/shtII/adcA$  mutant strain lacking all the cell-surface components of the transporter (Fig. 1B). These results



indicated that, in absence of AdcA and in metal restricted-conditions, the Sht and ShtII proteins are necessary for zinc acquisition via the Lmb and AdcAII proteins.

Then we confirmed that the failing of growth of the  $\Delta sht/shtII/adcA$  strain was specifically due to a lack of zinc, as the growth of the  $\Delta sht/shtII/adcA$  was gradually restored by addition of increasing concentration of zinc (Fig. 1C) but not by addition of other metals (Fig. S2).

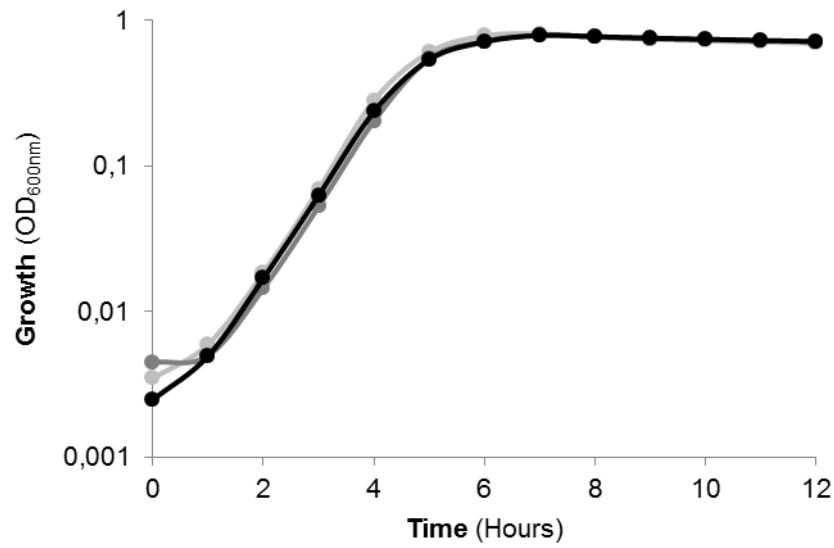
Finally, to ensure growth phenotypes and to compare the efficiency of the Sht and ShtII proteins in zinc recovery, the  $\Delta sht/shtII/adcA$  mutant strain was transformed with a vector whose the *sht* or *shtII* genes were under the control of a constitutive promoter  $P_{Tet}$  (23). The growth of the  $\Delta sht/shtII/adcA$  mutant strain containing the pTCV- $P_{Tet}::sht$  or the pTCVP $_{Tet}::shtII$  construction was compared to that of the WT and of the  $\Delta sht/shtII/adcA$  mutant strain with the empty pTCV- $P_{Tet}$  vector in a zinc-restricted CDM. Both strains containing either the pTCV- $P_{Tet}::sht$  or the pTCVP $_{Tet}::shtII$  complementing constructs, showed a similar growth to the WT (Fig. 1D). Thus, in the tested conditions, the Sht and ShtII proteins present overlapping functionality and efficiency as zinc suppliers.

Taken together, these data indicate that the Adc/Lmb transporter of *S. agalactiae* employs two systems permitting zinc delivery: on one side, the AdcA protein that is sufficient to import zinc alone, and on the other side the Lmb and AdcAII proteins that are dependent upon the Sht and ShtII proteins to permit zinc recruitment. This is in agreement with previous studies in *S. pneumoniae* that also highlighted distinct zinc acquisition mechanisms (21, 24).

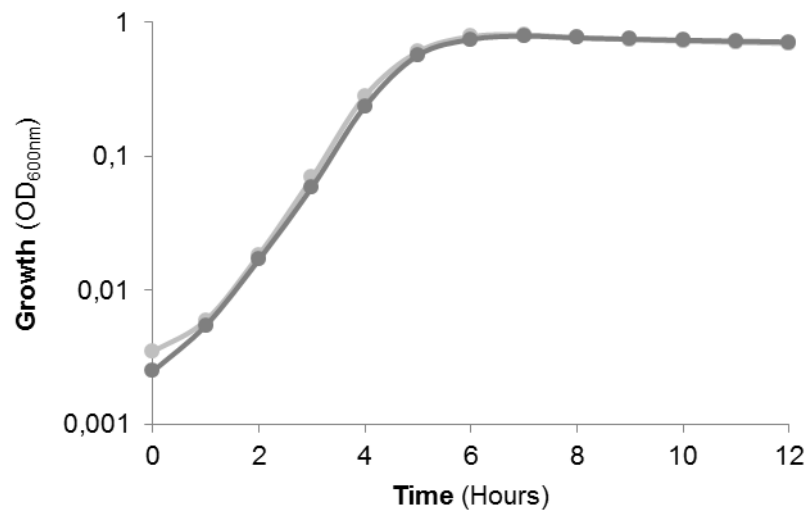
### **Role of the 5 Histidine Triad motifs of Sht and ShtII proteins in zinc acquisition**

Amino acid alignment between the Sht, ShtII and PhtD proteins showed that as well as their pneumococcal ortholog, the Sht and ShtII proteins contain five HT motifs (Fig. 2). The N-terminal region is the most conserved part of the three proteins and their three first HT are perfectly aligned. To examine their respective role in zinc acquisition, the three histidine

A)



B)



**Fig 3.** Study of the functioning of the Sht and ShtII proteins with the Lmb and AdcAII proteins in zinc acquisition. (A) The WT (light gray),  $\Delta adcAII/sht/adcA$  (dark gray),  $\Delta lmb/sht/adcA$  (black) (B) and the WT (light gray),  $\Delta adcAII/shtII/adcA$  (dark gray) mutant strains were grown in zinc-restricted CDM. The growth was monitored by OD<sub>600</sub> measurements every hour during 12h. Data are representative mean OD<sub>600</sub> measurements from three independent experiments.

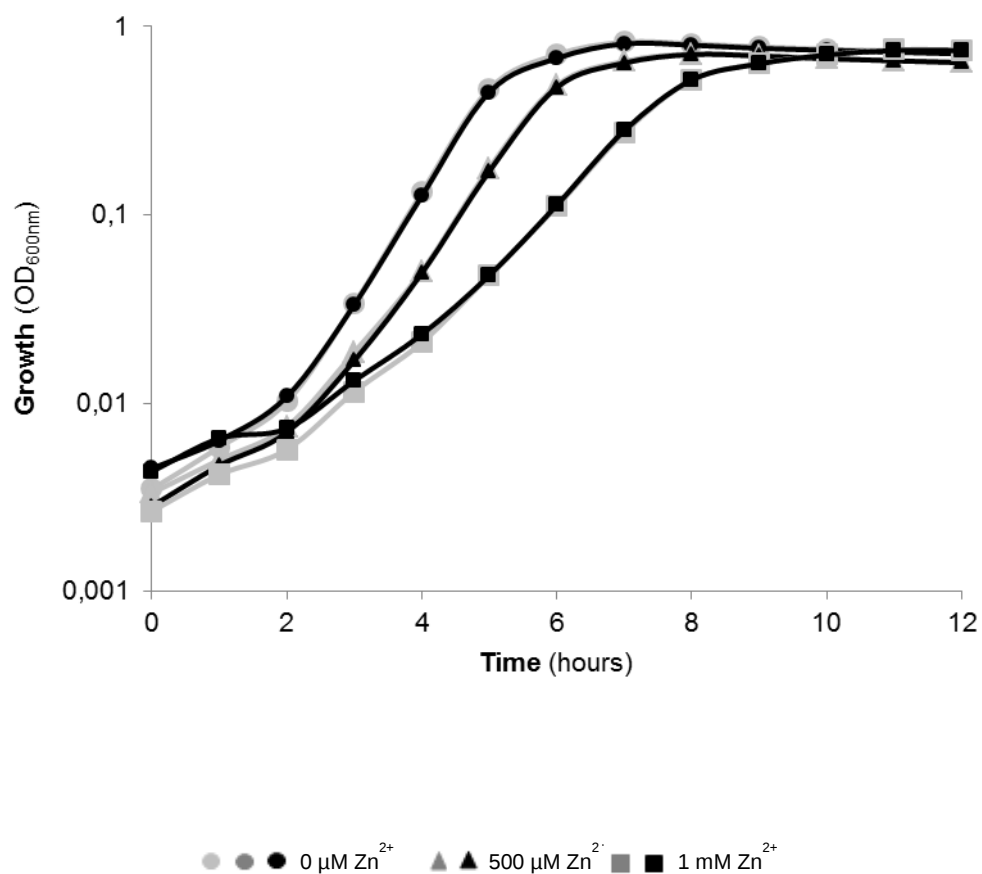
residu (HxxHXXH) of each HT motif of the Sht and ShtII was replaced by phenylalanine. These mutations have been shown to remove zinc binding capacities of the HT motif while maintaining a similar steric bulk of the PhtD protein (20). The mutated alleles of the *sht* and *shtII* genes were introduced in the complementation pTCV-P<sub>Tet</sub> vector and transformed into the  $\Delta sht/shtII/adcA$  strain. Growth of the resulting strains, named *sht* $\Delta$ HT\* and *shtII* $\Delta$ HT\* was compared to that of the  $\Delta sht/shtII/adcA$  strain complemented with the parental allele of the *sht* and *shtII* genes.

### **The ShtII protein indifferently works with the Lmb and AdcAII proteins**

We showed that the Lmb and AdcAII proteins needed the Sht and ShtII proteins to acquire zinc in the absence of the AdcA protein. Then we studied if the Sht and ShtII proteins can indifferently serve to the Lmb and AdcAII proteins in zinc transport. We constructed different combinations of deletion of the *lmb*, *adcAII*, *sht* and *shtII* genes in a  $\Delta adcA$  genetical background. The growth of each resulting strains was compared to that of the WT strain in zinc-restricted CDM. Both  $\Delta adcAII/sht/adcA$  or  $\Delta lmb/sht/adcA$  strains, only containing for zinc capture either the Lmb / ShtII or the AdcAII / ShtII couple of proteins, were able to grow similarly to the WT (Fig. 3A). These results suggest that the ShtII protein serves indifferently as a zinc supplier to the Lmb and AdcAII proteins. In the same way the growth of the  $\Delta adcAII/shtII/adcA$  strain only containing for zinc capture the Lmb / Sht couple of proteins was measured. A similar growth was observed between the WT and the  $\Delta adcAII/shtII/adcA$  mutant strain (Fig. 3B), suggesting that the Sht protein works with the Lmb protein.

### **The Sht and ShtII proteins do not protect against zinc excess**

The Sht protein is a protein found in the bacterial cell wall containing five histidine triad motifs whose each motif can potentially bind a zinc molecule (10). Therefore this protein could be a zinc reservoir for the bacterium which could be used during a zinc deficiency

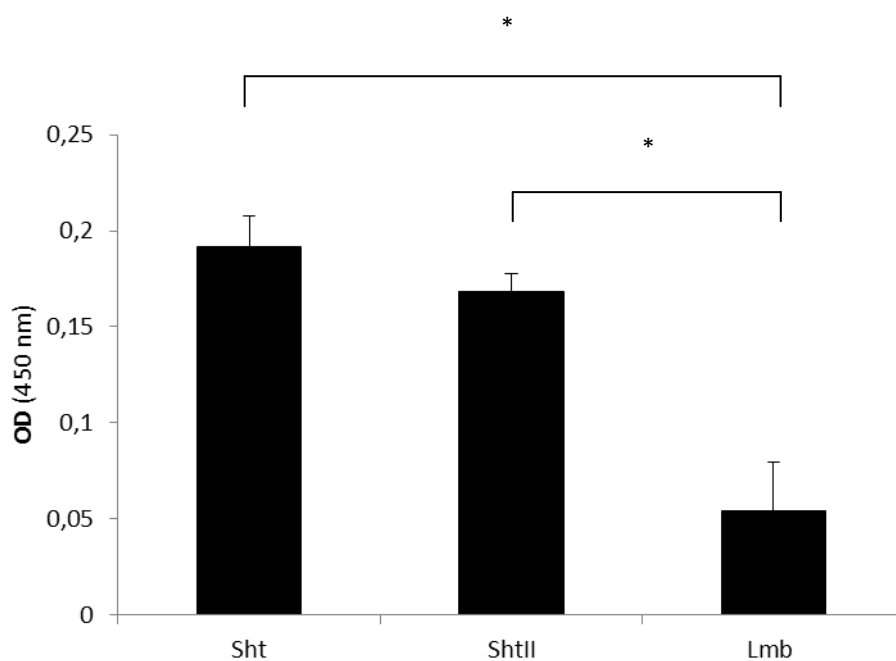


**Fig 4.** Growth comparison of the A909 WT and  $\Delta\text{sht/shtII}$  mutant strain under extracellular zinc excess. The growth of the WT (light gray) and the  $\Delta\text{sht/shtII}$  (black) mutant strains in zinc-restricted CDM with various amounts of added  $\text{Zn}^{2+}$  (from 0 to 1mM) was monitored by assessing the  $\text{OD}_{600}$  at 1h intervals during 12h. Data are representative mean  $\text{OD}_{600}$  measurements from three independent experiments.

period. Nevertheless during infection the zinc concentration can increase in a toxicity manner for bacteria : 100-120  $\mu\text{M}$  in the lungs and brain and 650  $\mu\text{M}$  in the blood (25). In a zinc excess environment these five histidine triad motifs could be used to limit the entry of zinc into the bacterium by secondary transporters. We compared the growth of the WT strain and the double  $\Delta\text{sht}/\text{shtII}$  mutant strain in a CDM with an excess of zinc. The double mutant strain tolerated the zinc toxicity similarly to the WT strain showing that the Sht and ShtII proteins are not involved in the resistance of zinc stress (Fig. 4). In the presence of zinc toxic concentrations, some bacteria could use their metallochaperones like YciC or ZinT to chelate the excess of zinc from their cytoplasm (26, 27). The SBP AdcA of the Adc/Lmb transporter of *S. agalactiae* possesses a ZinT-like domain whose its homologs in *S. pneumoniae* was described to bind zinc (12, 24). The role of the AdcA protein in zinc excess environment was analyzed using the  $\Delta\text{sht}/\text{shtII}/\text{adcA}$  mutant strain. Similar growths were observed between the WT and the  $\Delta\text{sht}/\text{shtII}/\text{adcA}$  mutant strains in a CDM with zinc toxic concentrations indicating that the AdcA protein does not play a role in zinc excess stress (data not shown).

### **Both the Sht and ShtII proteins have a role in the fixation of factor H**

The Sht protein was first described as a protein that binds the factor H, a negative regulator of the alternative pathway of complement system (10). This regulatory protein with the factor I degrade the C3b molecule of complement into an inactive iC3b molecule. The recruitment of the factor H by the bacterium permits to decrease the C3b on its surface and to avoid its lysis by the formation of the membrane attack complex. We investigated if the ShtII protein was also able to bind the factor H by ELISA from a ShtII purified protein. We also purified the Sht and Lmb proteins and used them as positive and negative controls to factor H binding respectively. To our knowledge, the Lmb protein has not been described as binding the factor H. For experiments decomplexed serum was used as a source of factor H. The background OD of wells coated with the same purified protein but not incubated with serum was

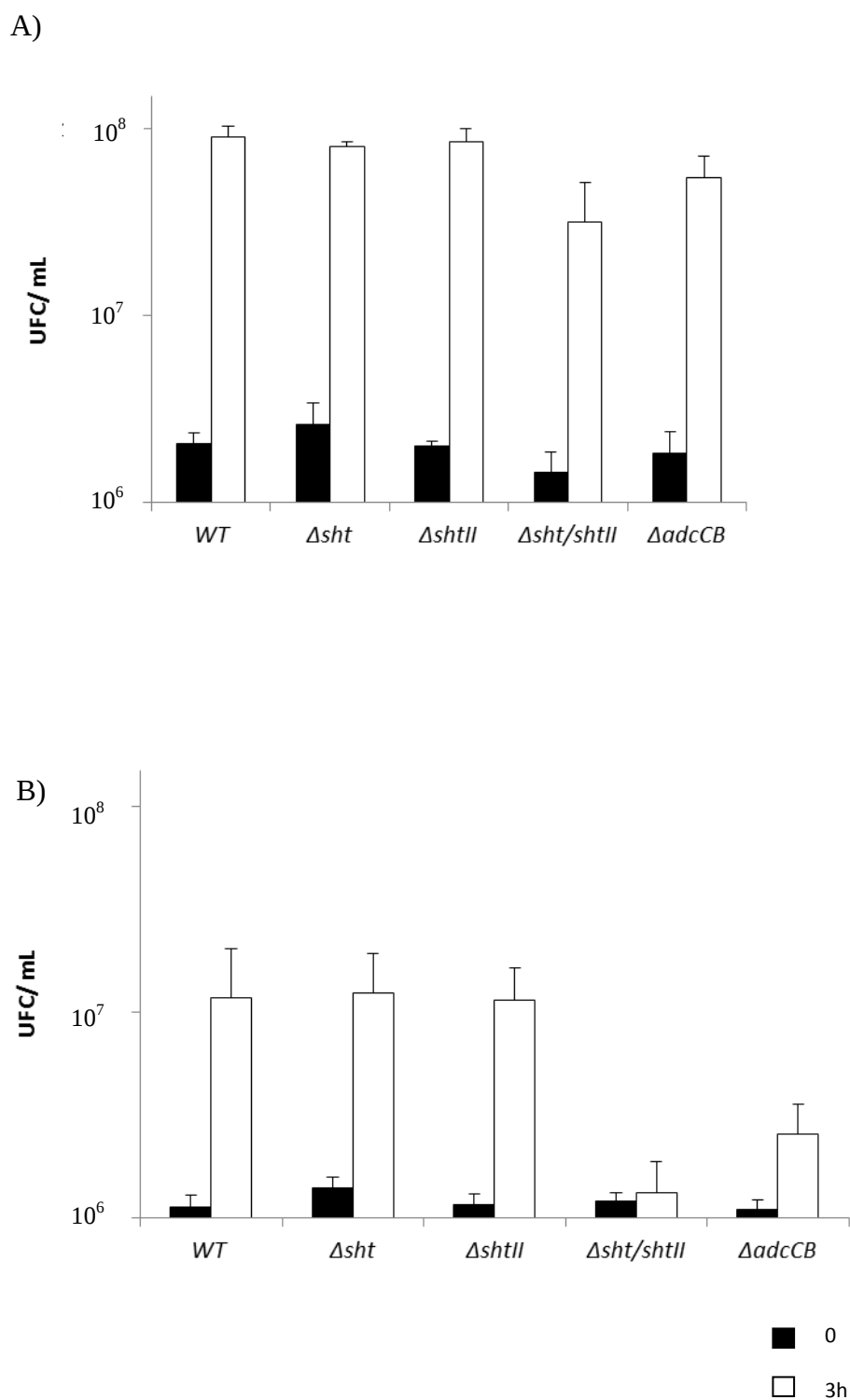


**Fig 5.** Both the Sht and ShtII proteins bind the factor H. Factor H binding to Lmb, Sht and ShtII purified proteins was measured by ELISA. Decomplemented human serum, as a source of factor H, was put into contact of the Lmb, Sht and ShtII immobilized proteins (10  $\mu\text{g/mL}$ ) during 2h and the binding was measured reading the OD at 450nm. OD measurments correspond to the mean  $\pm$  standard deviations of three independents experiments. The asterisks indicate P values obtained using an unpaired Student *t* test to compare factor H binding by the Sht or ShtII proteins with the factor H binding by the Lmb protein. \*,  $P < 0,05$

soustracted to the OD measured for the proteins in contact with serum. As negative control the Lmb protein did not show binding to factor H contrary to the Sht and ShtII proteins which showed a binding to factor H (Fig. 5). To know if the Sht and ShtII proteins are redundant in factor H binding and to determine their importance into the bacterium we performed whole-cell ELISA using the A909 WT and  $\Delta sht/shtII$  strains. Before to plate bacteria into wells, the strains were grown in zinc-restricted CDM in which the *sht* and *shtII* genes were fully expressed (data not shown). No difference of factor H binding was observed between the WT and  $\Delta sht/shtII$  strains (data not shown).

### **The Sht and ShtII proteins have a redundant minor role in the resistance of complement in whole human blood**

To evaluate the impact of the binding of factor H by the Sht and ShtII proteins in bacteria we realized survival assays in blood. The WT,  $\Delta sht$ ,  $\Delta shtII$  and  $\Delta sht/shtII$  strains were put into contact with whole human blood or in decompemented blood during 3 hours and the number of CFU/mL was recovered. To observe if zinc could play a role in the resistance of complement, we also analyzed the resistance of complement of the  $\Delta adcCB$  mutant strain. As shown in the figure 6A all strains were able to grow in the absence of complement and the elimination of one or two of the Sht and ShtII proteins did not affect the growth of the mutant strains. On the other hand, the development of the WT strain in whole human blood was less important (Fig. 6B). In this biological fluid the bacterium had to resist to complement and a part of bacteria were killed by the complement. Furthermore the  $\Delta sht$  and  $\Delta shtII$  mutant strains presented similar growth to that of the WT strain. The  $\Delta sht/shtII$  mutant strain did not develop, but the difference with the WT is not significant, suggesting a minor redundant role of the Sht and ShtII proteins in the resistance of complement (Fig. 6B). The  $\Delta adcCB$  mutant strain presented a less high, but not significant, resistance of complement than the WT strain indicating a weak involvement of zinc in the resistance of complement (Fig. 6B).



**Fig 6.** The Sht and ShtII proteins have a redundant minor role in the resistance of complement. Number of CFU / mL of WT,  $\Delta sht$ ,  $\Delta shtII$ ,  $\Delta sht\Delta shtII$  and  $\Delta adcCB$  strains was recovered after 3 hours of culture in decompemented whole human blood (A) or in whole human blood (B). Results are the means  $\pm$  standard deviations of the three independent cultures.

## DISCUSSION

In this study we determined the implication of the Sht and ShtII proteins in zinc acquisition. We showed that the Sht and ShtII proteins belong to the Adc/Lmb transporter as zinc suppliers of the Lmb and AdcAII SBP. We highlighted that the zinc acquisition by the Adc/Lmb transporter is mediated by two distinct mechanisms using the AdcA protein or the Lmb-Sht, AdcAII-ShtII proteins. These two zinc acquisition modes were previously described for the ABC transporter of *S. pneumoniae* and could be explained by the structural difference between the AdcA and the AdcAII proteins (21, 24). The Lmb and AdcAII proteins of *S. agalactiae* possess one zinc binding motif composed of a triad histidine and a glutamic acid (12, 28). The AdcA protein has the same zinc motif as the Lmb and AdcAII proteins but it also possesses a histidine-rich loop and a ZinT-like domain that potentially bind zinc as described for its homolog of *S. pneumoniae* (12, 21, 24). The AdcA protein having three potential zinc binding motifs, it does not need the Sht and ShtII proteins to capture zinc contrary to the Lmb and AdcAII proteins. This hypothesis is also confirmed by the fact that some streptococci as *Streptococcus thermophilus* have only one copy of the SBP, the AdcA protein, in their zinc-ABC transporter. The presence of one or two copies of the AdcAII type protein, in addition of the AdcA protein, in some human pathogenic streptococci such as *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* or *S. agalactiae* could be explained by different roles played between the AdcA and the AdcAII proteins *in vivo*. In *S. pneumoniae* both the AdcA and AdcAII proteins are necessary for an optimal nasopharynx colonization but the AdcAII protein appeared to have a more important role (29).

We observed that the couples of proteins Lmb-Sht and AdcAII-ShtII are redundant and as efficient as the AdcA protein to import zinc. The Sht-ShtII and Lmb-AdcAII having a high protein identity, we hypothesized that the Sht and ShtII proteins could function as zinc suppliers indifferently for the Lmb and AdcAII proteins. We showed that the ShtII protein



works indifferently with both the AdcAII and the Lmb proteins. The functioning of the Sht protein with the AdcAII or the Lmb protein is actually under study and will allow to determine if the Sht protein works indifferently with the AdcAII and the Lmb proteins as it is the case for the ShtII protein. These growth phenotypes would give us indirect proofs of the functioning of the Sht and ShtII proteins with the AdcAII and Lmb proteins. Experiments of direct interaction between native or modified Sht / ShtII and AdcAII / Lmb proteins would permit to confirm these results and to determine a potential interaction site between these proteins.

The Sht and ShtII proteins are composed of five HT motifs which potentially bind zinc. In *S. pneumoniae*, the importance of the five HT motifs of the PhtD protein was studied and revealed a non redundant role of these motifs *in vitro*. Analyses to determine the role in zinc-binding of each HT motifs of the Sht and ShtII proteins of *S. agalactiae* are ongoing and will tell us if there is a hierarchy of these motifs to capture zinc.

During infection, a strategy of the host to fight bacteria is to increase the zinc concentration at toxic level in several organs (25, 30). To maintain homeostasis bacteria as *E. coli* or *Bacillus subtilis* could use metallochaperones like ZinT to bind zinc surplus of the cytoplasm (27, 31). Among their role in zinc-binding during zinc deficiency period, we hypothesized that the AdcA protein, which has a ZinT-like domain, and the Sht and ShtII proteins, which have several zinc-binding motifs, could also be used by *S. agalactiae* to capture the zinc excess of cytoplasm. No difference in the resistance of zinc excess was observed between the WT and the  $\Delta sht/shtII/adcA$  mutant strain. In the presence of sufficient zinc concentration in the medium we previously showed that genes encoding the Adc/Lmb transporter were repressed (12). Thus the basal level of the *adcA*, *sht* and *shtII* genes does not play a role in the resistance of zinc toxicity. Nevertheless, the WT and  $\Delta sht/shtII/adcA$  mutant



strains were able to grow despite the zinc toxicity concentration of the medium suggesting that *S. agalactiae* possesses efficient zinc efflux systems. In *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* the CzcD and PmtA zinc efflux systems were described respectively (32, 33). In *S. agalactiae* homologs of these proteins are present and could explain the resistance of the bacterium in zinc toxicity.

Human strains of *S. agalactiae* possess two copies of the Streptococcal histidine triad protein, the Sht and ShtII proteins, which both have a redundant role in zinc acquisition in association with the Lmb and AdcAII proteins respectively. The Sht protein was initially described as playing a role in the resistance of complement by recruiting a component of the host, the factor H which permit to stop the alternative pathway of the complement (10). The Sht and ShtII proteins sharing 43% of protein identity, we analyzed the fixation of the factor H by the ShtII purified protein. We observed a factor H binding by the Sht and ShtII proteins. However, to have an idea of the importance of this binding, the binding of factor H by the Sht and ShtII proteins should be compare to the binding of a protein described as binding the factor H. The  $\beta$  protein of *S. agalactiae* or the PspC protein of *S. pneumoniae* were notably described as binding the factor H (9, 34). The factor H binding was also studied from whole bacteria comparing the binding of factor H between the WT and the  $\Delta sht/shtII$  strains. No significant difference in the factor H binding was observed. In our experiments, the Sht and ShtII proteins of the WT strain could be masked by the capsule. The factor H binding by the bacterium could also be principally due to others proteins as the  $\beta$  protein (Bac protein) which was described to bind the factor H (9). The comparison of factor H binding between the  $\Delta sht/shtII$  and the  $\Delta sht/shtII/bac$  mutant strains would determine if the three proteins Sht, ShtII and  $\beta$  would play a synergic effect in factor H binding. The importance of the Sht and the ShtII proteins in the resistance of complement was also studied comparing the survival of the WT and the  $\Delta sht$ ,  $\Delta shtII$ ,  $\Delta sht/shtII$  mutant strains in whole human blood and



decomplemented human blood. A redundant role of the Sht and ShtII proteins was observed. Nevertheless, we did not observe a significant difference of survival between the WT and the  $\Delta sht/shtII$  strains indicating that the resistance of complement is not the major role played by the Sht and ShtII proteins. The comparison of the resistance of complement between the  $\Delta sht/shtII$  and the  $\Delta sht/shtII/bac$  mutant strains would determine, as mentioned before, if the three Sht, ShtII and  $\beta$  proteins would play a synergic effect in factor H binding.

A role of the Sht and ShtII proteins in the resistance of complement was suggested in this study. This role is now under study and could give more information of the strategies used by the bacterium to evade the immune system.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Elise Caliot, Shaynoor Dramsi and Arnaud Firon are acknowledged for providing plasmids. We also thank Daniel Niquet for technical assistance. Pauline Moulin was supported by a doctoral fellowship of the Région Centre (France).

## REFERENCES

1. **Fry RM.** 1938. Fatal infections by haemolytic streptococcus group B. *The Lancet* **231**:199–201.
2. **Evans JJ, Klesius PH, Pasnik DJ, Bohnsack JF.** 2009. Human *Streptococcus agalactiae* isolate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Emerg Infect Dis* **15**:774–776.
3. **Joubrel C, Tazi A, Six A, Dmytruk N, Touak G, Bidet P, Raymond J, Trieu Cuot P, Fouet A, Kernéis S, Poyart C.** 2015. Group B streptococcus neonatal invasive infections, France 2007-2012. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **21**:910–916.
4. **Schrag SJ, Verani JR.** 2013. Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. *Vaccine* **31** Suppl 4:D20-26.
5. **Phares CR, Lynfield R, Farley MM, Mohle-Boetani J, Harrison LH, Petit S, Craig AS, Schaffner W, Zansky SM, Gershman K, Stefonek KR, Albanese BA, Zell ER,**



**Schuchat A, Schrag SJ.** 2008. Epidemiology of Invasive Group B Streptococcal Disease in the United States, 1999-2005. *JAMA* **299**:2056–2065.

6. **Tazi A, Morand PC, Réglier-Poupet H, Dmytruk N, Billoët A, Antona D, Trieu-Cuot P, Poyart C.** 2011. Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007–2010). *Clin Microbiol Infect* **17**:1587–1589.

7. **Bohnsack JF, Mollison KW, Buko AM, Ashworth JC, Hill HR.** 1991. Group B streptococci inactivate complement component C5a by enzymic cleavage at the C-terminus. *Biochem J* **273** ( Pt 3):635–640.

8. **Santi I, Scarselli M, Mariani M, Pezzicoli A, Masignani V, Taddei A, Grandi G, Telford JL, Soriani M.** 2007. BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B Streptococcus survival in human blood. *Mol Microbiol* **63**:754–767.

9. **Areschoug T, Stålhammar-Carlemalm M, Karlsson I, Lindahl G.** 2002. Streptococcal  $\beta$  Protein Has Separate Binding Sites for Human Factor H and IgA-Fc. *J Biol Chem* **277**:12642–12648.

10. **Maruvada R, Prasadarao NV, Rubens CE.** 2009. Acquisition of factor H by a novel surface protein on group B Streptococcus promotes complement degradation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **23**:3967–3977.

11. **Franken C, Haase G, Brandt C, Weber-Heynemann J, Martin S, Lämmler C, Podbielski A, Lütticken R, Spellerberg B.** 2001. Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. *Mol Microbiol* **41**:925–935.

12. **Moulin P, Patron K, Cano C, Zorgani MA, Camiade E, Borezée-Durant E, Rosenau A, Mereghetti L, Hiron A.** 2016. The Adc/Lmb System Mediates Zinc Acquisition in *Streptococcus agalactiae* and Contributes to Bacterial Growth and Survival. *J Bacteriol* **198**:3265–3277.

13. **Plumptre CD, Ogunniyi AD, Paton JC.** 2012. Polyhistidine triad proteins of pathogenic streptococci. *Trends Microbiol* **20**:485–493.

14. **Shao Z-Q, Zhang Y-M, Pan X-Z, Wang B, Chen J-Q.** 2013. Insight into the evolution of the histidine triad protein (HTP) family in Streptococcus. *PloS One* **8**:e60116.

15. **Plumptre CD, Hughes CE, Harvey RM, Eijkelkamp BA, McDevitt CA, Paton JC.** 2014. Overlapping functionality of the Pht proteins in zinc homeostasis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **82**:4315–4324.

16. **Bayle L, Chimalapati S, Schoehn G, Brown J, Vernet T, Durmort C.** 2011. Zinc uptake by *Streptococcus pneumoniae* depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. *Mol Microbiol* **82**:904–916.

17. **Loisel E, Chimalapati S, Bougault C, Imberty A, Gallet B, Di Guilmi AM, Brown J, Vernet T, Durmort C.** 2011. Biochemical characterization of the histidine triad protein PhtD as a cell surface zinc-binding protein of pneumococcus. *Biochemistry (Mosc)* **50**:3551–3558.



18. **Adamou JE, Heinrichs JH, Erwin AL, Walsh W, Gayle T, Dormitzer M, Dagan R, Brewah YA, Barren P, Lathigra R, Langermann S, Koenig S, Johnson S.** 2001. Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis. *Infect Immun* **69**:949–958.
19. **Hamel J, Charland N, Pineau I, Ouellet C, Rioux S, Martin D, Brodeur BR.** 2004. Prevention of pneumococcal disease in mice immunized with conserved surface-accessible proteins. *Infect Immun* **72**:2659–2670.
20. **Eijkelkamp BA, Pederick VG, Plumtre CD, Harvey RM, Hughes CE, Paton JC, McDevitt CA.** 2015. The First Histidine Triad Motif of PhtD Is Critical for Zinc Homeostasis in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **84**:407–415.
21. **Bersch B, Bougault C, Roux L, Favier A, Vernet T, Durmort C.** 2013. New insights into histidine triad proteins: solution structure of a *Streptococcus pneumoniae* PhtD domain and zinc transfer to AdcAII. *PloS One* **8**:e81168.
22. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
23. **Firon A, Tazi A, Da Cunha V, Brinster S, Sauvage E, Dramsi S, Golenbock DT, Glaser P, Poyart C, 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 Pathog* **9**:e1003179.
24. **Plumtre CD, Eijkelkamp BA, Morey JR, Behr F, Couñago RM, Ogunniyi AD, Kobe B, O'Mara ML, Paton JC, McDevitt CA.** 2014. AdcA and AdcAII employ distinct zinc acquisition mechanisms and contribute additively to zinc homeostasis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **91**:834–851.
25. **McDevitt CA, Ogunniyi AD, Valkov E, Lawrence MC, Kobe B, McEwan AG, Paton JC.** 2011. A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. *PLoS Pathog* **7**:e1002357.
26. **Gaballa A, Wang T, Ye RW, Helmann JD.** 2002. Functional analysis of the *Bacillus subtilis* Zur regulon. *J Bacteriol* **184**:6508–6514.
27. **Graham AI, Hunt S, Stokes SL, Bramall N, Bunch J, Cox AG, McLeod CW, Poole RK.** 2009. Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins. *J Biol Chem* **284**:18377–18389.
28. **Ragunathan P, Spellerberg B, Ponnuraj K.** 2009. Structure of laminin-binding adhesin (Lmb) from *Streptococcus agalactiae*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**:1262–1269.
29. **Brown LR, Gunnell SM, Cassella AN, Keller LE, Scherkenbach LA, Mann B, Brown MW, Hill R, Fitzkee NC, Rosch JW, Tuomanen EI, Thornton JA.** 2016. AdcAII of *Streptococcus pneumoniae* Affects Pneumococcal Invasiveness. *PloS One* **11**:e0146785.



30. **Hood MI, Skaar EP.** 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* **10**.
31. **Gaballa A, Helmann JD.** 1998. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**:5815–5821.
32. **Brenot A, Weston BF, Caparon MG.** 2007. A PerR-regulated metal transporter (PmtA) is an interface between oxidative stress and metal homeostasis in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **63**:1185–1196.
33. **Kloosterman TG, van der Kooi-Pol MM, Bijlsma JJE, Kuipers OP.** 2007. The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn<sup>2+</sup> stress by activation of the Zn<sup>2+</sup>-resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **65**:1049–1063.
34. **Ogunniyi AD, Grabowicz M, Mahdi LK, Cook J, Gordon DL, Sadlon TA, Paton JC.** 2009. Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn<sup>2+</sup>-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **23**:731–738.



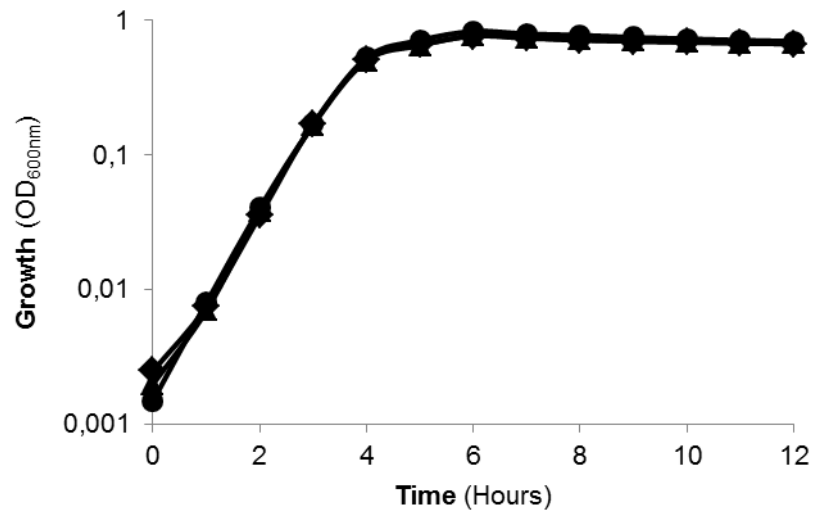
## SUPPLEMENTAL MATERIAL

**Table S1. Bacterial strains and plasmids used in this study**

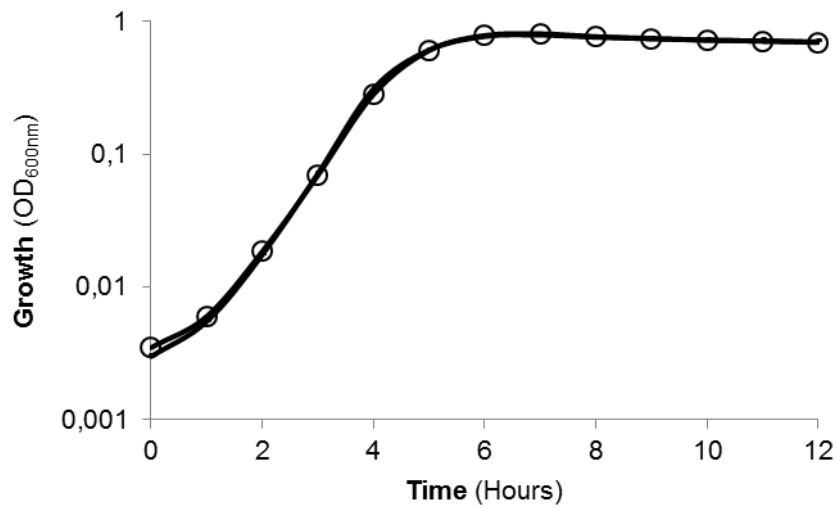
| Strain or plasmid                                          | Genotype or description                                                                                                                                                                                                                                        | Source or reference |
|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <u><i>Escherichia coli</i> strain</u>                      |                                                                                                                                                                                                                                                                |                     |
| XL1-blue                                                   | <i>endA1 gyrA96</i> (Nal <sup>R</sup> ) <i>thi-1 recA1 relA1 lac glnV44</i><br><i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>F'</i> [::Tn10 (Tet <sup>R</sup> ) <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15] | Stratagene          |
| BL21 codon + (DE3)-RIL                                     | <i>F- dcm ompT hsdS</i> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> - ) <i>gal</i> [ <i>malB</i> <sup>+</sup> ] <sub>K-12</sub> ( $\lambda$ <sup>S</sup> )                                                                                                                | Novagen             |
| <u><i>Streptococcus agalactiae</i> strains</u>             |                                                                                                                                                                                                                                                                |                     |
| A909 (WT)                                                  | Isolated from a septic human neonate in 1934                                                                                                                                                                                                                   | (1)                 |
| A909 $\Delta$ adcCB                                        | Isogenic <i>adcCB</i> ( <i>sak_0218</i> and <i>sak_0219</i> ) deletion double mutant of A909                                                                                                                                                                   | (2)                 |
| A909 $\Delta$ sht                                          | Isogenic <i>sht</i> ( <i>sak_1318</i> ) deletion mutant of A909                                                                                                                                                                                                | This study          |
| A909 $\Delta$ shtII                                        | Isogenic <i>shtII</i> ( <i>sak_1897</i> ) deletion mutant of A909                                                                                                                                                                                              | This study          |
| A909 $\Delta$ sht/shtII                                    | Isogenic <i>sht</i> and <i>shtII</i> deletion double mutant of A909                                                                                                                                                                                            | This study          |
| A909 $\Delta$ sht/shtII/adcA                               | Isogenic <i>adcA</i> ( <i>sak_0685</i> ), <i>sht</i> and <i>shtII</i> deletion triple mutant of A909                                                                                                                                                           | This study          |
| A909 $\Delta$ sht/shtII/adcA-pTCV-P <sub>Tet</sub> ::sht   | <i>sht</i> ( <i>sak_1318</i> ) plasmid complementation of A909 $\Delta$ sht/shtII/adcA                                                                                                                                                                         | This study          |
| A909 $\Delta$ sht/shtII/adcA-pTCV-P <sub>Tet</sub> ::shtII | <i>shtII</i> ( <i>sak_1897</i> ) plasmid complementation of A909 $\Delta$ sht/shtII/adcA                                                                                                                                                                       | This study          |
| A909 $\Delta$ lmb/sht/adcAII/shtII                         | Isogenic <i>lmb</i> ( <i>sak_1319</i> ), <i>sht</i> , <i>adcAII</i> ( <i>sak_1898</i> ) and <i>shtII</i> deletion quadruple mutant of A909                                                                                                                     | This study          |
| A909 $\Delta$ lmb/sht/adcAII/shtII/adcA                    | Isogenic <i>lmb</i> , <i>sht</i> , <i>adcAII</i> , <i>shtII</i> and <i>adcA</i> deletion quintuple mutant of A909                                                                                                                                              | This study          |
| A909 $\Delta$ adcAII/shtII/adcA                            | Isogenic <i>adcAII</i> , <i>shtII</i> and <i>adcA</i> deletion triple mutant of A909                                                                                                                                                                           | This study          |
| A909 $\Delta$ adcAII/sht/adcA                              | Isogenic <i>adcAII</i> , <i>sht</i> and <i>adcA</i> deletion triple mutant of A909                                                                                                                                                                             | This study          |
| A909 $\Delta$ lmb/sht/adcA                                 | Isogenic <i>lmb</i> , <i>sht</i> and <i>adcA</i> deletion triple mutant of A909                                                                                                                                                                                | This study          |
| <u>Plasmids</u>                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                |                     |
| pG+host1 <sup>TS</sup>                                     | Replication-thermosensitive shuttle ( <sup>TS</sup> ) plasmid, Ery <sup>R</sup>                                                                                                                                                                                | (3)                 |
| pTCV-P <sub>Tet</sub>                                      | Mob+(IncP); <i>oriR</i> <i>pACYC184</i> ; <i>oriR</i> <i>pAM_1</i> ; complementation vector, promoter P <sub>Tet</sub>                                                                                                                                         | (4)                 |
| pTCV-P <sub>Tet</sub> ::sht                                | <i>sht</i> complementation vector, promoter P <sub>Tet</sub>                                                                                                                                                                                                   | This study          |
| pTCV-P <sub>Tet</sub> ::shtII                              | <i>shtII</i> complementation vector, promoter P <sub>Tet</sub>                                                                                                                                                                                                 | This study          |
| pET28a                                                     | Vector for expression of His-Tagged proteins, Kan <sup>R</sup>                                                                                                                                                                                                 | EMD Biosciences     |
| pET28a ::sht                                               | pET28a containing the <i>sht</i> gene of <i>S. agalactiae</i> A909 in the EcoRI/Sall sites                                                                                                                                                                     | This study          |
| pET28a ::shtII                                             | pET28a containing the <i>shtII</i> gene of <i>S. agalactiae</i> A909 in the EcoRI/Sall sites                                                                                                                                                                   | This study          |
| pET28a ::lmb                                               | pET28a containing the <i>lmb</i> gene of <i>S. agalactiae</i> A909 in the EcoRI/Sall sites                                                                                                                                                                     | This study          |



A)

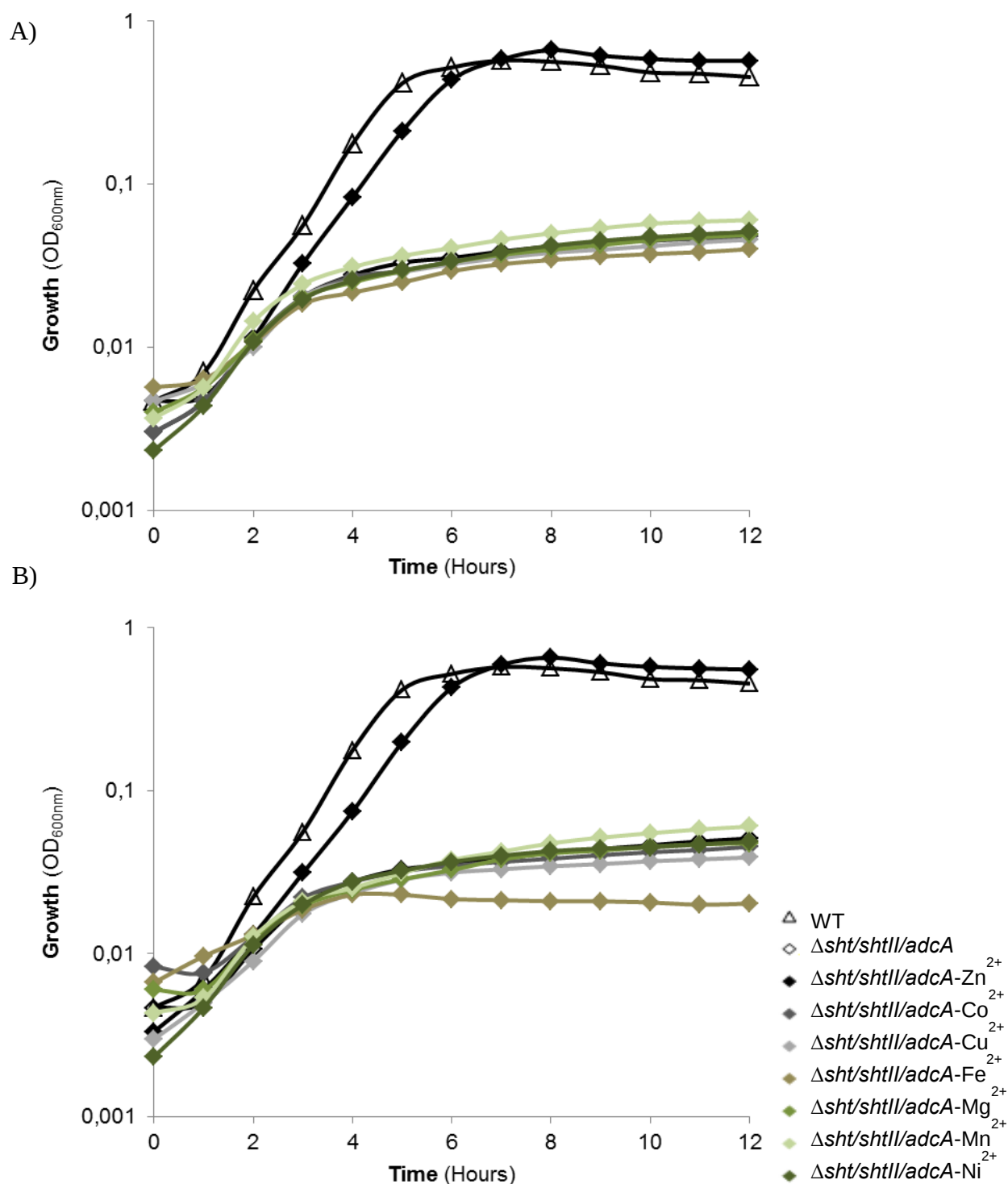


B)



**Fig S1.** The Sht and ShtII proteins are redundant in zinc acquisition. The A909 WT (circles),  $\Delta sht$  (diamonds),  $\Delta shtII$  (triangles) mutant strains (A) and the A909 WT (circles),  $\Delta sht/shtII$  (line) mutant strains (B) were grown in zinc-restricted CDM. The growth was monitored by OD<sub>600</sub> measurements every hour during 12h. Data are representative mean OD<sub>600</sub> measurements from three independent experiments.





**Fig S2.** The absence of growth of the  $\Delta sht/shtII/adcA$  mutant strain is specifically due to a lack of zinc. The growths of the A909 WT and  $\Delta sht/shtII/adcA$  mutant strains in CDM with 10  $\mu M$  (A) or 100  $\mu M$  (B) of various metals were monitored by OD<sub>600</sub> measurements every hour during 12h. Data are representative mean OD<sub>600</sub> measurements from three independent experiments.



## REFERENCES

1. Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Davidsen TM, Mora M, Scarselli M, Margarit y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJB, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:13950–13955.
2. Moulin P, Patron K, Cano C, Zorgani MA, Camiade E, Borezée-Durant E, Rosenau A, Mereghetti L, Hiron A. 2016. The Adc/Lmb System Mediates Zinc Acquisition in *Streptococcus agalactiae* and Contributes to Bacterial Growth and Survival. *J Bacteriol* **198**:3265–3277.
3. Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E. 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **175**:3628–3635.
4. Firon A, Tazi A, Da Cunha V, Brinster S, Sauvage E, Dramsi S, Golenbock DT, Glaser P, Poyart C, 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 Pathog* **9**:e1003179.



# **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**



La protéine Lmb de *S. agalactiae* a été décrite pour la première fois comme une adhésine à la laminine. De plus, elle appartient à la famille des protéines fixatrices de zinc, manganèse et fer. Une recherche *in silico* a mis en évidence deux homologues de cette protéine nommés AdcA et AdcAII. Par alignement de séquence nous avons observé une forte identité protéique entre les protéines Lmb, AdcA et AdcAII de *S. agalactiae* et les protéines AdcA et AdcAII de *S. pneumoniae*. Chez *S. pneumoniae*, ces deux protéines correspondent aux SBP du transporteur de zinc composé également d'une perméase AdcB, d'une ATPase AdcC et de quatre protéines de type Pht aidant la protéine AdcAII dans le recrutement du zinc. Chez *S. agalactiae*, des protéines homologues à chaque constituant du transporteur ont été identifiées. En plus des trois protéines de fixation du zinc Lmb, AdcA et AdcAII, nous avons retrouvé une perméase AdcB, une ATPase AdcC et deux protéines de type Pht nommées Sht et ShtII. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'ensemble de ces protéines formeraient le transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae*.

La première partie de cette étude s'est intéressée à l'implication des protéines Lmb, AdcA, AdcAII, AdcB et AdcC dans le transport du zinc, à l'impact de ce transporteur dans la physiologie de la bactérie ainsi qu'au second rôle potentiel des protéines Lmb, AdcA et AdcAII. Tout d'abord nous avons regardé la prévalence des gènes codant le transporteur au sein des souches disponibles de *S. agalactiae* sur la base de données NCBI. Les opérons *adcRCB*, *adcAII-shtII* et le gène *adcA* ont été retrouvés chez toutes les souches de *S. agalactiae* contrairement à l'opéron *lmb-sht*. Cet opéron se trouve au sein d'un îlot génomique contenant le gène *scpB* codant une C5a peptidase responsable également de la liaison à la fibronectine (Figure 15C) (Chmouryguina *et al.*, 1996; Beckmann *et al.*, 2002). Nous avons, en effet, retrouvé cet îlot chez 96,8% des souches d'origine humaine et 26,7% des isolats animaux, nous suggérant ainsi que cette structure n'est pas essentielle pour les infections animales mais qu'elle a en revanche son importance dans l'adaptation à l'Homme (Moulin *et al.*, 2016). Chez les streptocoques des groupes C et G, cet îlot est également retrouvé uniquement au niveau des souches humaines et se retrouve chez *S. pyogenes*, bactérie spécifique de l'Homme, appuyant ainsi l'hypothèse du rôle joué par cet îlot chez l'Homme (Franken *et al.*, 2001). Malgré le fait que *S. agalactiae* possède un homologue des gènes *scpB* et *lmb* au sein de son génome (*scpA* et *adcAII*), les protéines ScpB et Lmb sont importantes pour la bactérie. La mutation du gène *scpB* ou *lmb* a en effet montré une diminution de liaison à la fibronectine par la bactérie ou une diminution de l'invasion des cellules de la barrière hémato-encéphalique respectivement (Beckmann *et al.*, 2002;



Tenenbaum *et al.*, 2007). Ces résultats constituent donc une preuve supplémentaire de l'importance de cet ilot pour les infections humaines.

La régulation des gènes codant le transporteur ABC de zinc a ensuite été étudiée. Nous avons montré que les gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* sont réprimés par le zinc via la protéine régulatrice AdcR (Moulin *et al.*, 2016). La séquence de fixation de cette protéine (AdcR box) a été identifiée et retrouvée en une copie au niveau des régions promotrices des opérons *adcAII-shtII* et *adcRCB* et en deux copies au niveau du promoteur du gène *adcA* et de l'opéron *lmb-sht* (Moulin *et al.*, 2016). Une AdcR box a également été observée au niveau de la région promotrice de gènes codant des protéines nécessitant du zinc pour leur fonctionnement dont le gène codant l'alcool déshydrogénase ou les SBP du transporteur ABC de peptides et nickel (Moulin *et al.*, 2016). La régulation de ces gènes par la protéine AdcR serait ainsi à confirmer pour voir si ces gènes sont activés ou réprimés selon la concentration en zinc milieu. Ceci permettrait d'avoir une meilleure compréhension de l'homéostasie du zinc ainsi que son importance dans la physiologie de la bactérie.

Chez *S. pyogenes* il a été montré qu'en présence d'une concentration suffisante de zinc pour la bactérie, la protéine AdcR exerce une plus forte répression des gènes du transporteur ABC de zinc possédant deux AdcR box au niveau de leur promoteur (*adcA* et *adcAII*) par rapport aux gènes ne possédant qu'une AdcR box (*adcRCB* et *htpA*) (Sanson *et al.*, 2015). De plus, les gènes avec deux AdcR box sont dérèprimés dès la présence d'une déficience en zinc dans le milieu alors que les gènes avec une AdcR box ne sont dérèprimés qu'en présence d'une carence sévère de zinc dans le milieu. La régulation de la protéine AdcR agit ainsi à deux niveaux. Lors d'une déficience en zinc, des systèmes ne consommant pas d'énergie comme les protéines AdcA et AdcAII sont mobilisés pour stocker le zinc présent. Le complexe AdcCB, système plus énergivore pour la bactérie, est quant à lui mobilisé en cas de forte carence de zinc. Chez *S. agalactiae*, ce mécanisme de régulation ne semble pas être retrouvé. En présence de zinc, le gène *adcAII*, possédant une AdcR box, est en effet plus réprimé que les gènes *lmb* et *adcA* possédant deux AdcR box (Moulin *et al.*, 2016). La présence des deux box au niveau de la région promotrice du gène *lmb* est cependant nécessaire pour une répression optimale du gène suggérant un intérêt à la présence des deux box (Moulin *et al.*, 2016). Pour mieux comprendre le mécanisme de régulation exercé par la protéine AdcR, l'étude de la régulation de l'opéron *lmb-sht*, par des mutations ponctuelles au niveau de ses deux AdcR box, devrait être étendue à l'ensemble du régulon de la protéine



AdcR. De plus, des mesures plus fines, effectuées en fonction du temps et en présence de différentes concentrations de zinc permettraient d'obtenir une cinétique de régulation de ces gènes par le zinc. Le nombre de protéine AdcR fixée au niveau des promoteurs possédant deux AdcR box pourrait être déterminé, par des expériences de mobilité sur gel, pour comprendre également le mécanisme de régulation de la protéine AdcR. Enfin, nous ne pouvons pas exclure l'influence d'un autre régulateur qui pourrait expliquer que le mécanisme de régulation observé pour l'opéron *lmb-sht* ne corresponde pas à celui de *S. pyogenes*. Cet autre régulateur répondrait à l'adaptation de d'autres facteurs que le zinc et agirait sur la protéine AdcR ou directement au niveau de la région promotrice des gènes du transporteur ABC de zinc.

L'implication des protéines Lmb, AdcA et AdcAII dans le transport du zinc a ensuite été étudiée en comparant la croissance des souches A909 WT et différentes combinaisons de souches mutantes pour les gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* en MCD avec différentes concentrations de zinc. Ces phénotypes de croissance ont montré une redondance fonctionnelle des trois SBP dans le transport du zinc (Moulin *et al.*, 2016). Ces expériences constituent cependant des preuves indirectes du rôle des trois protéines dans le transport du zinc. Des mesures de la concentration intracellulaire de zinc par ICP-MS permettraient de mesurer directement et plus finement l'import de zinc par ces protéines. Ces expériences permettraient également de voir si une des protéines fixe plus efficacement le zinc. Pour ce dernier objectif, la mesure de l'affinité pour le zinc des trois SBP pourrait être déterminée par microcalorimétrie.

En comparant les phénotypes de croissance des souches  $\Delta adcCB$  et  $\Delta adcCB/lmb/adcA/adcAII$  nous avons indirectement mis en évidence que les trois protéines Lmb, AdcA et AdcAII fonctionnent avec le système AdcCB et que l'ensemble constitue le transporteur de zinc de *S. agalactiae* (Moulin *et al.*, 2016). Le fait que les souches  $\Delta adcCB$ ,  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  ou  $\Delta adcCB/lmb/adcA/adcAII$  soient incapables de croître en MCD carencé en zinc contrairement à la souche WT, nous indique que, sous les conditions testées, c'est-à-dire en forte carence de zinc, ce transporteur représente le principal système d'acquisition du zinc de la bactérie. Néanmoins, nous avons observé que la croissance de ces souches est restaurée par l'ajout de 10  $\mu$ M de zinc dans le milieu (Moulin *et al.*, 2016). Il semblerait donc qu'à partir d'une concentration seuil en zinc, celui-ci soit pris en charge par un autre transporteur moins efficace. Parmi les candidats possibles, nous pouvons citer les transporteurs ABC de manganèse PsaBCA de *S. pneumoniae* et MtsABC de *S. pyogenes* dont



les lipoprotéines PsaA et MtsA ont été décrites comme pouvant fixer du zinc avec une faible affinité (Janulczyk *et al.*, 1999; Janulczyk *et al.*, 2003; McDevitt *et al.*, 2011). Chez ces deux bactéries, le transport du zinc et du manganèse semblent être en étroite association. Chez *S. pyogenes*, l'expression du transporteur ABC de manganèse est en effet régulée selon la concentration en manganèse du milieu mais elle est également différentiellement régulée lors d'une carence de zinc (Sanson *et al.*, 2015). De même chez *S. pneumoniae*, les gènes régulés par le métallorégulateur PsaR (dont les gènes du transporteur ABC de manganèse) sont différentiellement exprimés en présence d'une forte concentration de zinc dans le milieu (Kloosterman *et al.*, 2008; Jacobsen *et al.*, 2011). Chez *S. agalactiae*, le transporteur de manganèse MtsACB a été décrit et pourrait ainsi transporter le zinc comme substrat secondaire, lorsque celui-ci est en concentration suffisante dans le milieu (Bray *et al.*, 2009).

Chez les bactéries, le zinc a été décrit comme ayant un rôle structural pour certaines protéines ou intervenant comme cofacteur de nombreuses enzymes (Andreini *et al.*, 2006b; Sun *et al.*, 2011). Parmi ces protéines, la protéine DacB de *S. pneumoniae* intervient dans le renouvellement du peptidoglycane ainsi que la structure de la cellule (Abdullah *et al.*, 2014). Chez *S. agalactiae* un homologue de cette protéine est présent. En présence d'une faible concentration de zinc dans le milieu une absence de métallisation ou une mauvaise métallisation de cette protéine chez les souches  $\Delta adcCB$  ou  $\Delta lmb/adcA/adcAII$  pourrait en partie expliquer le retard de croissance observé ainsi que la formation d'agrégats ou de courtes chainettes (Moulin *et al.*, 2016).

En utilisant un MCD avec différentes concentrations de zinc, nous avons pu mettre en évidence l'importance du transporteur Adc/Lmb pour la croissance de la bactérie en milieu carencé en zinc. Pour chercher à se rapprocher de conditions physiologiques, nous avons utilisés des milieux biologiques humains *ex vivo* dans lesquels la bactérie est retrouvée lors d'infections. Parmi ces milieux biologiques humains, nous avons observé l'importance du transporteur ABC de zinc pour la survie de la bactérie dans le liquide amniotique et le LCR mais pas dans le plasma (Moulin *et al.*, 2016). Ce résultat peut être expliqué par la concentration de zinc de chaque milieu. Dans le sang, la concentration de zinc (12-16  $\mu\text{M}$ ) est suffisante pour que ce métal soit importé par des transporteurs secondaires moins spécifiques. Par contre, les concentrations de zinc du liquide amniotique (1,5  $\mu\text{M}$ ) et du LCR (2,3  $\mu\text{M}$ ) étant trop faibles, l'import du zinc nécessite le transporteur ABC de zinc de haute affinité (Meret and Henkin, 1971; Tamura *et al.*, 1994; Rink, 2000). Cependant ces phénotypes ayant été obtenus dans un système fermé, les stratégies antimicrobiennes de l'hôte ne sont pas prises



en compte. Au niveau du site d'infection, une immunité nutritionnelle (séquestration de zinc par les calprotectines notamment) peut en effet être mise en place carençant fortement le milieu en zinc (Kehl-Fie and Skaar, 2010). Des expériences *in vivo*, avec les souches WT et  $\Delta adcCB$  permettraient de voir dans quel organe le transporteur de zinc serait important pour le développement de la bactérie.

Lors de ce travail nous avons montré que le transporteur ABC de zinc de *S. agalactiae* est composé de trois SBP (Lmb, AdcA et AdcAII) ayant une redondance fonctionnelle dans l'acquisition du zinc, *in vitro*, en MCD (Moulin *et al.*, 2016). Chez *S. pneumoniae* ce transporteur possède deux SBP (AdcA et AdcAII) également redondantes dans le transport du zinc *in vitro*. Cependant, ces deux protéines ont montré des rôles différents *in vivo* selon l'organe, la protéine AdcAII jouant par exemple un rôle plus important dans la colonisation du nasopharynx que la protéine AdcA (Brown *et al.*, 2016). *S. agalactiae* possède une particularité par rapport à *S. pneumoniae* en possédant une SBP supplémentaire spécifique des souches humaines (Lmb). Cette particularité nous suggère l'importance de la protéine Lmb chez l'Homme ainsi qu'un potentiel rôle différent par rapport aux protéines AdcA et AdcAII. Cette hypothèse est notamment appuyée par le fait que la souche mutée pour le gène *lmb* montre une invasion des cellules de la barrière hémato-encéphalique significativement moins importante que la souche WT (Tenenbaum *et al.*, 2007). De plus, la souche mutée pour la même protéine chez *S. pyogenes* se trouve être moins virulente que la souche WT dans un modèle murin d'infection sous-cutanée (Weston *et al.*, 2009). En milieux biologiques humains (plasma, liquide amniotique et LCR), une survie identique a été observée entre les souches WT et  $\Delta lmb$ , ne permettant pas dans ce modèle d'observer un rôle spécifique de la protéine Lmb (Moulin *et al.*, 2016). En comparant la survie et le développement des souches WT et mutées pour les gènes *lmb*, *adcA* ou *adcAII* de *S. agalactiae*, *in vivo*, au sein de différents organes, nous pourrions déterminer si les trois SBP possèdent la même redondance fonctionnelle que celle observée *in vitro*. Ces expériences permettraient peut être d'expliquer pourquoi, contrairement aux autres streptocoques infectant l'Homme comme *S. pneumoniae* et *S. pyogenes*, *S. agalactiae* possède trois SBP (Lmb, AdcA et AdcAII).

Initialement la protéine Lmb a été décrite comme une adhésine fixant la laminine humaine (Spellerberg *et al.*, 1999). Les protéines AdcA et AdcAII ayant une forte identité protéique avec la protéine Lmb, la liaison de ces deux protéines a été étudiée vis-à-vis de la laminine, du fibrinogène, du collagène de type IV ou des cellules épithéliales pulmonaires A549. Ces



expériences n'ont pas mis en évidence de rôle d'adhésine pour les protéines AdcA et AdcAII. Étonnement aucune liaison à la laminine par la protéine Lmb n'a été observée, ce qui devait constituer notre témoin positif d'adhérence. Ce résultat pourrait s'expliquer par une différence de fond génétique entre notre souche (A909) et la souche de l'auteur (O90R) avec par exemple, une différence de capsule masquant plus ou moins la protéine Lmb. Cependant, l'expression hétérologue du gène *lmb* chez la souche non adhérente *L. lactis* ne lui confère pas d'adhérence. Pour cette expérience, la bonne localisation de la protéine Lmb au niveau de la membrane de *L. lactis* pourrait être vérifiée, pour confirmer les résultats obtenus. Néanmoins, l'ensemble de nos résultats vont dans le sens que les protéines Lmb, AdcA et AdcAII ne sont pas des adhésines majeures de *S. agalactiae*. Enfin, un autre résultat, confortant notre conclusion est que la protéine AdcAII de *S. pneumoniae*, qui partage 67% d'identité protéique avec la protéine Lmb de *S. agalactiae*, a été décrite comme ne fixant pas la laminine (Brown *et al.*, 2016).

La seconde partie de l'étude s'est focalisée sur la caractérisation des protéines Sht et ShtII dans l'acquisition du zinc ainsi que leur second rôle potentiel. La croissance normale des souches mutantes  $\Delta sht$ ,  $\Delta shtII$ ,  $\Delta sht/shtII$  et  $\Delta lmb/sht/adcAII/shtII$  en MCD carencé en zinc montre que la protéine AdcA seule est suffisante pour assurer une capture optimale de zinc (Publication N°2). À l'inverse, la souche mutante  $\Delta sht/shtII/adcA$  s'avère incapable de croître en MCD carencé en zinc indiquant la nécessité des protéines Sht et ShtII pour le recrutement de zinc par les protéines Lmb et AdcAII lorsque la protéine AdcA est absente (Publication N°2). Ces résultats mettent en évidence deux mécanismes distincts d'acquisition du zinc par les SBP du transporteur. Ces deux mécanismes ont déjà été décrits chez *S. pneumoniae* et s'expliquent par la différence de structure entre les protéines AdcA et AdcAII (Bersch *et al.*, 2013; Plumptre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014). Les trois protéines Lmb, AdcA et AdcAII de *S. agalactiae* possèdent un motif de fixation du zinc composé de trois histidines et d'un acide glutamique au niveau de leur région N-terminale (Moulin *et al.*, 2016). La protéine AdcA comporte également une boucle riche en histidine ainsi qu'un motif ZinT-like pour la fixation de zinc. Les protéines Lmb et AdcAII ne possédant qu'un motif de fixation du zinc, les protéines Sht et ShtII leur viennent en aide dans le recrutement de zinc. La protéine AdcA possédant trois motifs de fixation du zinc, la présence des protéines Sht et ShtII n'est pas nécessaire. De plus, le transporteur ABC de zinc de certains streptocoques comme *S. thermophilus*, n'est doté que de la protéine AdcA comme SBP pour son fonctionnement, indiquant que chez ces espèces, cette protéine est suffisante pour la capture de zinc. Le fait



que *S. agalactiae* et d'autres streptocoques pathogènes de l'Homme comme *S. pneumoniae* et *S. pyogenes* possèdent en plus de la protéine AdcA, une ou deux copies des protéines de type AdcAII pourrait s'expliquer par des rôles non redondants des protéines AdcA et AdcAII *in vivo* qui aideraient la bactérie dans la mise en place de l'infection chez l'Homme. Comme cité précédemment, des rôles différents des protéines AdcA et AdcAII ont été observés *in vivo* chez *S. pneumoniae* (Brown *et al.*, 2016).

Nous avons observé que les protéines Sht et ShtII sont nécessaires pour la capture de zinc des protéines Lmb et AdcAII (Publication N°2). Les protéines Sht/ShtII et Lmb/AdcAII ayant une forte identité protéique entre elles, les protéines Lmb et AdcAII pourraient fonctionner de manière indifférente avec les protéines Sht et ShtII. Nous avons réalisé différentes combinaisons de souches mutées pour les gènes *lmb*, *adcAII*, *sht* et *shtII* à partir de la souche  $\Delta adcA$  puis comparé leur croissance en MCD carencé en zinc. Les couples de protéines ShtII / AdcAII (souche  $\Delta lmb/sht/adcA$ ), ShtII / Lmb (souche  $\Delta adcAII/sht/adcA$ ) et Sht / Lmb (souche  $\Delta adcAII/shtII/adcA$ ) permettent une capture de zinc donnant une croissance de ces souches similaire à celle de la souche WT (Publication N°2). La souche  $\Delta lmb/shtII/adcA$  est en cours de construction au laboratoire (couple de protéines Sht / AdcAII) et permettra de définir si la protéine Sht, tout comme la protéine ShtII, est capable de fonctionner indifféremment avec les protéines Lmb et AdcAII. L'interaction entre les couples de protéine ShtII / AdcAII, ShtII / Lmb et Sht / Lmb a été déduite de phénotypes de croissance et nécessite cependant d'être confirmée par d'autres techniques. L'interaction des protéines Sht et ShtII avec les protéines Lmb et AdcAII pourrait être analysée par co-immunoprécipitation ou interférométrie, à partir de nos protéines purifiées possédant une étiquette (TAG). Si des liaisons protéiques sont bien observées, ces techniques pourraient également être utilisées pour déterminer les sites d'interactions entre ces protéines en utilisant des protéines purifiées dont les sites d'interactions supposés ont été mutés.

Les protéines Sht et ShtII sont composées de cinq motifs HT pouvant potentiellement fixer le zinc (Publication N°2). Chez *S. pneumoniae* le premier motif HT de la protéine PhtD a été décrit comme essentiel pour le transport du zinc *in vitro* (Eijkelkamp *et al.*, 2015). L'importance de chacun des motifs HT des protéines Sht et ShtII de *S. agalactiae* est actuellement en cours d'étude au laboratoire. La modification des deux premiers motifs HT, par remplacement des résidus histidine par des phénylalanine, a été obtenue pour les protéines Sht et ShtII. Les phénotypes de croissance en MCD carencé en zinc ont montré l'importance



de ces motifs pour le transport de zinc (résultats non montrés). Bien que cette modification d'acides aminés ne soit pas censée perturber la structure tridimensionnelle de la protéine, il faudrait vérifier que la protéine modifiée se retrouve toujours au niveau de la paroi chez la bactérie. Les différentes fractions de la bactérie (cytoplasme, membrane et paroi) pourraient être séparées par ultracentrifugation puis la localisation des protéines Sht et ShtII déterminée par Western blot. Si la bonne localisation (à la paroi) des protéines Sht et ShtII modifiées est confirmée, le rôle de chaque motif HT dans l'interaction avec les protéines AdcAII et Lmb pour la fixation de zinc pourrait être étudiée par interférométrie.

Au cours de l'infection, la concentration en zinc au sein des organes peut augmenter de manière à devenir toxique pour la bactérie (McDevitt *et al.*, 2011). En réponse à ce stress, les bactéries utilisent par exemple des métallochaperonnes et de petites molécules chélatrices de zinc comme le glutathion ou les métallothionéines pour fixer l'excédent de zinc présent dans la bactérie (Maret, 1994; Potter *et al.*, 2012). La protéine AdcA possède notamment un motif de fixation du zinc retrouvé chez les métallochaperonnes de zinc ZinT de diverses bactéries (Petrarca *et al.*, 2010; Plumptre, Eijkelkamp, *et al.*, 2014). De plus, les protéines Sht et ShtII possèdent chacune cinq motifs HT pouvant potentiellement fixer le zinc (Publication N°2). Les protéines AdcA, Sht et ShtII pourraient ainsi jouer un rôle dans la fixation de l'excès de zinc. Les phénotypes de croissance des souches  $\Delta sht/shtII$  et  $\Delta sht/shtII/adcA$  en MCD avec des concentrations toxiques de zinc, n'ont pas montré d'implication des protéines AdcA, Sht et ShtII dans la résistance à l'excès de zinc (Publication N°2). En présence de fortes concentrations de zinc, nous avons observé que les gènes *adcA*, *sht* et *shtII* sont fortement réprimés. L'expression minimale des protéines AdcA, Sht et ShtII n'a donc pas de rôle significatif dans la fixation de l'excédent de zinc. Ce résultat peut également s'expliquer par le fait que l'excédent de zinc au sein de la bactérie est pris en charge par deux systèmes d'efflux efficaces comme les protéines CzcD et PmtA décrites chez *S. pneumoniae* et *S. pyogenes* respectivement et dont des protéines homologues ont été retrouvées chez *S. agalactiae* (Brenot *et al.*, 2007; Kloosterman *et al.*, 2007).

Initialement la protéine Sht a été mise en évidence comme protéine jouant un rôle dans la résistance au complément en permettant de diminuer le dépôt de molécule C3b du complément à la surface de la bactérie. Pour cela, la bactérie recrute le facteur H de l'hôte rendant les molécules de C3b inactives (Maruvada *et al.*, 2009). Nous avons étudié la fixation du facteur H par la protéine ShtII, homologue à la protéine Sht, par des tests ELISA à partir



de protéines purifiées. Les protéines Sht et ShtII sont toutes les deux capables de fixer le facteur H mais avec une liaison qui semble faible (Publication N°2). Afin d'avoir une idée de l'importance de cette liaison il serait nécessaire d'utiliser en témoin une protéine décrite comme jouant un rôle majeur dans la liaison au facteur H. La protéine  $\beta$  (ou protéine Bac) de *S. agalactiae* ou la protéine PspC de *S. pneumoniae* ont notamment été décrites comme fixant le facteur H (Areschoug *et al.*, 2002; Ogunniyi *et al.*, 2009; Melin *et al.*, 2010).

La liaison du facteur H a également été étudiée sur bactéries entières en comparant la fixation de facteur H entre les souches WT et mutante  $\Delta sht/shtII$  par ELISA. Aucune différence significative dans la liaison au facteur H n'a été observée (Publication N°2). Dans ce contexte, il est possible que les protéines Sht et ShtII soient masquées par la capsule ou que la liaison du facteur H par la bactérie ne soit pas majoritairement due aux protéines Sht et ShtII mais à d'autres protéines comme la protéine  $\beta$  (protéine Bac). La comparaison de la liaison du facteur H par les souches WT et mutantes  $\Delta sht/shtII$ ,  $\Delta bac$ ,  $\Delta sht/shtII/bac$  permettrait de voir si la fixation du facteur H est assurée principalement par la protéine  $\beta$ , s'il n'y a pas d'effet synergique entre les protéines Sht/ShtII/ $\beta$  pour la liaison du facteur H ou si d'autres protéines lient également le facteur H.

Pour évaluer l'importance des protéines Sht et ShtII dans la résistance au complément, la survie des souches WT et mutantes  $\Delta sht$ ,  $\Delta shtII$  et  $\Delta sht/shtII$ , dans le sang versus le sang décomplémenté, a été comparée. Nous avons observé une survie plus faible de la souche  $\Delta sht/shtII$  en comparaison aux souches WT et mutantes  $\Delta sht$ ,  $\Delta shtII$  suggérant une redondance des protéines Sht et ShtII dans la résistance au complément (Publication N°2). Cependant cette différence est non significative indiquant que le rôle dans la résistance au complément n'est pas la principale fonction des protéines Sht et ShtII. La comparaison de la survie dans le sang des souches WT et mutantes  $\Delta sht/shtII$ ,  $\Delta bac$ ,  $\Delta sht/shtII/bac$  permettrait de voir comme cité précédemment si la résistance au complément par la fixation du facteur H est assurée principalement par la protéine  $\beta$ , s'il n'y a pas d'effet synergique entre les protéines Sht/ShtII/ $\beta$  ou si d'autres protéines assurent également cette fonction.

La survie de la souche mutante  $\Delta adcCB$  dans le sang a également été étudiée pour déterminer un potentiel rôle du zinc dans la résistance au complément. Dans le sang décomplémenté, la souche mutante  $\Delta adcCB$  est capable de se développer, en accord avec ce que nous avons déjà observé dans le plasma, suggérant un apport de zinc par des transporteurs secondaires (Moulin *et al.*, 2016). Dans le sang, cette souche survie moins bien



que la souche WT mais là encore avec une différence non significative ne mettant pas en évidence de rôle majeur du zinc dans la résistance au complément (Publication N°2).

Chez *S. pneumoniae*, l'importance des premier et dernier motifs HT a été étudiée et confirmée *in vivo* (Eijkelkamp *et al.*, 2015). Le premier motif serait impliqué dans la fixation de zinc alors que le cinquième motif plus proche du milieu extérieur pourrait jouer un rôle dans la résistance au complément en fixant le facteur H. Si le rôle dans la liaison au facteur H par les protéines Sht et ShtII est confirmé, par les expériences complémentaires citées précédemment, le rôle des motifs HT des protéines Sht et ShtII dans la fixation au facteur H pourrait ainsi être étudié par ELISA à partir des protéines purifiées Sht et ShtII dont un des motifs HT est modifié.



# **CONCLUSION**

## **GENERALE**



*S. agalactiae* représente la première cause d'infections materno-fœtales dans les pays développés. L'étude de la physiopathologie de ces infections apparaît primordiale afin de développer des stratégies ciblées de défense contre ces infections. Au sein du laboratoire, une des thématiques de recherche est l'étude des facteurs assurant à la bactérie une capacité d'adaptation à différentes niches écologiques. Parmi ces facteurs, l'équipe s'est intéressée à la lipoprotéine Lmb qui est responsable de la liaison à la laminine (Spellerberg *et al.*, 1999). Cette protéine est cependant classée dans la famille des SBP fixatrices de fer, manganèse et zinc suggérant ainsi un second rôle à la protéine.

En étudiant la protéine Lmb, deux protéines homologues, non décrites, ont été mises en évidence et nommées AdcA et AdcAII par analogie avec les mêmes protéines de *S. pneumoniae* qui font partie d'un transporteur ABC de zinc. Les autres potentiels gènes codant le transporteur ABC de zinc ont été retrouvés chez *S. agalactiae*. En analysant les phénotypes de croissance des différentes souches mutantes pour les potentiels gènes du transporteur nous avons montré que les trois SBP Lmb, AdcA, AdcAII avec les deux protéines Sht et ShtII forment, en association avec le complexe perméase-ATPase AdcCB, le transporteur de zinc de *S. agalactiae*. Deux mécanismes, distincts et redondants, d'acquisition du zinc par ce transporteur ont été mis en évidence avec la protéine AdcA et ses trois motifs de fixation du zinc ou les protéines Lmb et AdcAII aidées par les protéines Sht et ShtII dans la capture de zinc.

La suite de notre étude a permis d'apporter des connaissances sur le rôle du zinc dans la physiologie de la bactérie. Le zinc est ainsi un élément trace essentiel pour la croissance et la morphologie de *S. agalactiae* et notamment en milieux biologiques humains dans lesquels la bactérie est retrouvée lors d'infections. De plus, dans des conditions de forte carence en zinc, le transporteur Adc/Lmb constitue le principal système d'acquisition du zinc de *S. agalactiae*.

Des expériences, initiées lors de cette étude, ont mis en évidence un second rôle des protéines Sht et ShtII dans la liaison au facteur H. L'importance des protéines Sht et ShtII dans la résistance au complément ainsi qu'un potentiel lien de ce rôle avec le zinc reste à confirmer ouvrant ainsi de nouvelles perspectives d'études.



# **REFERENCES**

# **BIBLIOGRAPHIQUES**



**Abdullah, M.R., Gutiérrez-Fernández, J., Pribyl, T., Gisch, N., Saleh, M., Rohde, M., et al.** (2014) Structure of the pneumococcal l,d-carboxypeptidase DacB and pathophysiological effects of disabled cell wall hydrolases DacA and DacB. *Mol Microbiol* **93**: 1183–1206.

**Adamou, J.E., Heinrichs, J.H., Erwin, A.L., Walsh, W., Gayle, T., Dormitzer, M., et al.** (2001) Identification and characterization of a novel family of pneumococcal proteins that are protective against sepsis. *Infect Immun* **69**: 949–958.

**Ahn, B.-E., Cha, J., Lee, E.-J., Han, A.-R., Thompson, C.J., and Roe, J.-H.** (2006) Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **59**: 1848–1858.

**Ali, S.R., Fong, J.J., Carlin, A.F., Busch, T.D., Linden, R., Angata, T., et al.** (2014) Siglec-5 and Siglec-14 are polymorphic paired receptors that modulate neutrophil and amnion signaling responses to group B Streptococcus. *J Exp Med* **211**: 1231–1242.

**Al-Maani, A., Streitenberger, L., Clarke, M., Yau, Y.C.W., Kovach, D., Wray, R., and Matlow, A.** (2014) Nosocomial transmission of group B streptococci proven by positive environmental culture. *Oman Med J* **29**: 376–379.

**Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A.** (2006a) Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J Proteome Res* **5**: 196–201.

**Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., and Rosato, A.** (2006b) Zinc through the three domains of life. *J Proteome Res* **5**: 3173–3178.

**Andreini, C., and Bertini, I.** (2012) A bioinformatics view of zinc enzymes. *J Inorg Biochem* **111**: 150–156.

**Andrews, S.C., Robinson, A.K., and Rodríguez-Quñones, F.** (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 215–237.

**Anonyme** (1996) Prevention of perinatal group B streptococcal disease: a public health perspective. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep* **45**: 1–24.

**Anonyme** (2001) Prévention anténatale du risque infectieux bactérien néonatal précoce. Recommandations pour la pratique clinique. [Https://www.has-Santefr](https://www.has-sante.fr)

**Anthony, B.F., Okada, D.M., and Hobel, C.J.** (1978) Epidemiology of group B Streptococcus: longitudinal observations during pregnancy. *J Infect Dis* **137**: 524–530.

**Aranda, J., Garrido, M.E., Cortés, P., Llagostera, M., and Barbé, J.** (2008) Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions. *Infect Immun* **76**: 1590–1598.

**Aranda, J., Garrido, M.E., Fittipaldi, N., Cortés, P., Llagostera, M., Gottschalk, M., and Barbé, J.** (2009) Protective capacities of cell surface-associated proteins of *Streptococcus suis* mutants deficient in divalent cation-uptake regulators. *Microbiol Read Engl* **155**: 1580–1587.



**Areschoug, T., Stålhammar-Carlemalm, M., Karlsson, I., and Lindahl, G.** (2002) Streptococcal  $\beta$  Protein Has Separate Binding Sites for Human Factor H and IgA-Fc. *J Biol Chem* **277**: 12642–12648.

**Areschoug, T., Waldemarsson, J., and Gordon, S.** (2008) Evasion of macrophage scavenger receptor A-mediated recognition by pathogenic streptococci. *Eur J Immunol* **38**: 3068–3079.

**Argüello, J.M., Eren, E., and González-Guerrero, M.** (2007) The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **20**: 233–248.

**Arrieta, M.-C., Stiemsma, L.T., Dimitriu, P.A., Thorson, L., Russell, S., Yurist-Doutsch, S., et al.** (2015) Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med* **7**: 307ra152.

**Ausar, S.F., Jayasundara, K., Akawi, L., Roque, C., Sheung, A., Hu, J., et al.** (2017) Biophysical Characterization and Thermal Stability of Pneumococcal Histidine Triad Protein D (PhtD) in the presence of Zinc and Manganese. *J Pharm Sci* . **106**:2979-2987.

**Aydemir, T.B., Liuzzi, J.P., McClellan, S., and Cousins, R.J.** (2009) Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFN-gamma expression in activated human T cells. *J Leukoc Biol* **86**: 337–348.

**Azad, M.B., Bridgman, S.L., Becker, A.B., and Kozyrskyj, A.L.** (2014) Infant antibiotic exposure and the development of childhood overweight and central adiposity. *Int J Obes* **38**: 1290–1298.

**Badri, M.S., Zawaneh, S., Cruz, A.C., Mantilla, G., Baer, H., Spellacy, W.N., and Ayoub, E.M.** (1977) Rectal colonization with group B streptococcus: relation to vaginal colonization of pregnant women. *J Infect Dis* **135**: 308–312.

**Baker, C.J.** (1997) Group B streptococcal infections. *Clin Perinatol* **24**: 59–70.

**Baker, J.R., and Pritchard, D.G.** (2000) Action pattern and substrate specificity of the hyaluronan lyase from group B streptococci. *Biochem J* **348 Pt 2**: 465–471.

**Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Finney, L.A., Outten, C.E., and O'Halloran, T.V.** (2002) A new zinc-protein coordination site in intracellular metal trafficking: solution structure of the Apo and Zn(II) forms of ZntA(46-118). *J Mol Biol* **323**: 883–897.

**Banerjee, A., Kim, B.J., Carmona, E.M., Cutting, A.S., Gurney, M.A., Carlos, C., et al.** (2011) Bacterial Pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration. *Nat Commun* **2**: 462.

**Barcaite, E., Bartusevicius, A., Tameliene, R., Kliucinskas, M., Maleckiene, L., and Nadisauskiene, R.** (2008) Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstet Gynecol Scand* **87**: 260–271.

**Baron, M.J., Bolduc, G.R., Goldberg, M.B., Aupérin, T.C., and Madoff, L.C.** (2004) Alpha C protein of group B Streptococcus binds host cell surface glycosaminoglycan and enters cells by an actin-dependent mechanism. *J Biol Chem* **279**: 24714–24723.



- Baron, M.J., Filman, D.J., Prophete, G.A., Hogle, J.M., and Madoff, L.C.** (2007) Identification of a glycosaminoglycan binding region of the alpha C protein that mediates entry of group B Streptococci into host cells. *J Biol Chem* **282**: 10526–10536.
- Bayle, L., Chimalapati, S., Schoehn, G., Brown, J., Vernet, T., and Durmort, C.** (2011) Zinc uptake by *Streptococcus pneumoniae* depends on both AdcA and AdcAII and is essential for normal bacterial morphology and virulence. *Mol Microbiol* **82**: 904–916.
- Beard, S.J., Hashim, R., Membrillo-Hernández, J., Hughes, M.N., and Poole, R.K.** (1997) Zinc(II) tolerance in *Escherichia coli* K-12: evidence that the *zntA* gene (o732) encodes a cation transport ATPase. *Mol Microbiol* **25**: 883–891.
- Beckmann, C., Waggoner, J.D., Harris, T.O., Tamura, G.S., and Rubens, C.E.** (2002) Identification of novel adhesins from Group B streptococci by use of phage display reveals that C5a peptidase mediates fibronectin binding. *Infect Immun* **70**: 2869–2876.
- Begg, S.L., Eijkelkamp, B.A., Luo, Z., Couñago, R.M., Morey, J.R., Maher, M.J., et al.** (2015) Dysregulation of transition metal ion homeostasis is the molecular basis for cadmium toxicity in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Commun* **6**: 6418.
- Begum, N.A., Kobayashi, M., Moriwaki, Y., Matsumoto, M., Toyoshima, K., and Seya, T.** (2002) *Mycobacterium bovis* BCG cell wall and lipopolysaccharide induce a novel gene, BIGM103, encoding a 7-TM protein: identification of a new protein family having Zn-transporter and Zn-metalloprotease signatures. *Genomics* **80**: 630–645.
- Bellais, S., Six, A., Fouet, A., Longo, M., Dmytruk, N., Glaser, P., et al.** (2012) Capsular Switching in Group B Streptococcus CC17 Hypervirulent Clone: A Future Challenge for Polysaccharide Vaccine Development. *J Infect Dis* **206**: 1745–1752.
- Bernardini, R., Aufieri, R., Detcheva, A., Recchia, S., Cicconi, R., Amicosante, M., et al.** (2016) Neonatal protection and preterm birth reduction following maternal group B streptococcus vaccination in a mouse model. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet* 1–7.
- Berner, R.** (2004) Significance, management and prevention of *Streptococcus agalactiae* infection during the perinatal period. *Expert Rev Anti Infect Ther* **2**: 427–437.
- Berntsson, R.P.-A., Smits, S.H.J., Schmitt, L., Slotboom, D.-J., and Poolman, B.** (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett* **584**: 2606–2617.
- Bersch, B., Bougault, C., Roux, L., Favier, A., Vernet, T., and Durmort, C.** (2013) New insights into histidine triad proteins: solution structure of a *Streptococcus pneumoniae* PhtD domain and zinc transfer to AdcAII. *PloS One* **8**: e81168.
- Biemans-Oldehinkel, E., Doeven, M.K., and Poolman, B.** (2006) ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. *FEBS Lett* **580**: 1023–1035.
- Bishop, E.J., Shilton, C., Benedict, S., Kong, F., Gilbert, G.L., Gal, D., et al.** (2007) Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus porosus* caused by *Streptococcus agalactiae*: an outbreak and review of the animal and human literature. *Epidemiol Infect* **135**: 1248–1255.



- Blair, D.E., Schüttelkopf, A.W., MacRae, J.I., and Aalten, D.M.F. van** (2005) Structure and metal-dependent mechanism of peptidoglycan deacetylase, a streptococcal virulence factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 15429–15434.
- Blancas, D., Santin, M., Olmo, M., Alcaide, F., Carratala, J., and Gudiol, F.** (2004) Group B streptococcal disease in nonpregnant adults: incidence, clinical characteristics, and outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* **23**: 168–173.
- Blue, C.E., Paterson, G.K., Kerr, A.R., Bergé, M., Claverys, J.P., and Mitchell, T.J.** (2003) ZmpB, a novel virulence factor of *Streptococcus pneumoniae* that induces tumor necrosis factor alpha production in the respiratory tract. *Infect Immun* **71**: 4925–4935.
- Bohnsack, J.F., Mollison, K.W., Buko, A.M., Ashworth, J.C., and Hill, H.R.** (1991) Group B streptococci inactivate complement component C5a by enzymic cleavage at the C-terminus. *Biochem J* **273** ( Pt 3): 635–640.
- Bokulich, N.A., Chung, J., Battaglia, T., Henderson, N., Jay, M., Li, H., et al.** (2016) Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med* **8**: 343ra82.
- Bolduc, G.R., Baron, M.J., Gravekamp, C., Lachenauer, C.S., and Madoff, L.C.** (2002) The alpha C protein mediates internalization of group B Streptococcus within human cervical epithelial cells. *Cell Microbiol* **4**: 751–758.
- Bolduc, G.R., and Madoff, L.C.** (2007) The group B streptococcal alpha C protein binds alpha1beta1-integrin through a novel KTD motif that promotes internalization of GBS within human epithelial cells. *Microbiol Read Engl* **153**: 4039–4049.
- Bologa, M., Kamtchoua, T., Hopfer, R., Sheng, X., Hicks, B., Bixler, G., et al.** (2012) Safety and immunogenicity of pneumococcal protein vaccine candidates: monovalent choline-binding protein A (PcpA) vaccine and bivalent PcpA-pneumococcal histidine triad protein D vaccine. *Vaccine* **30**: 7461–7468.
- Bradley, A.J., Leach, K.A., Breen, J.E., Green, L.E., and Green, M.J.** (2007) Survey of the incidence and aetiology of mastitis on dairy farms in England and Wales. *Vet Rec* **160**: 253–257.
- Bray, B.A., Sutcliffe, I.C., and Harrington, D.J.** (2009) Expression of the MtsA lipoprotein of *Streptococcus agalactiae* A909 is regulated by manganese and iron. *Antonie Van Leeuwenhoek* **95**: 101–109.
- Brenot, A., Weston, B.F., and Caparon, M.G.** (2007) A PerR-regulated metal transporter (PmtA) is an interface between oxidative stress and metal homeostasis in *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* **63**: 1185–1196.
- Brodersen, D.E., Nyborg, J., and Kjeldgaard, M.** (1999) Zinc-binding site of an S100 protein revealed. Two crystal structures of Ca<sup>2+</sup>-bound human psoriasin (S100A7) in the Zn<sup>2+</sup>-loaded and Zn<sup>2+</sup>-free states. *Biochemistry (Mosc)* **38**: 1695–1704.



- Brown, L.R., Gunnell, S.M., Cassella, A.N., Keller, L.E., Scherkenbach, L.A., Mann, B., et al.** (2016) AdcAII of *Streptococcus pneumoniae* Affects Pneumococcal Invasiveness. *PloS One* **11**: e0146785.
- Brown, N.L., Stoyanov, J.V., Kidd, S.P., and Hobman, J.L.** (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 145–163.
- Brown, W.V., and Collins, E.B.** (1977) End products and fermentation balances for lactic streptococci grown aerobically on low concentrations of glucose. *Appl Environ Microbiol* **33**: 38–42.
- Bryan, E.M., Bae, T., Kleerebezem, M., and Dunny, G.M.** (2000) Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. *Plasmid* **44**: 183–190.
- Bryan, J.D., Liles, R., Cvek, U., Trutschl, M., and Shelper, D.** (2008) Global transcriptional profiling reveals *Streptococcus agalactiae* genes controlled by the MtaR transcription factor. *BMC Genomics* **9**: 607.
- Buscetta, M., Firon, A., Pietrocola, G., Biondo, C., Mancuso, G., Midiri, A., et al.** (2016) PbsP, a cell wall-anchored protein that binds plasminogen to promote hematogenous dissemination of group B Streptococcus. *Mol Microbiol* **101**: 27–41.
- Buscetta, M., Papasergi, S., Firon, A., Pietrocola, G., Biondo, C., Mancuso, G., et al.** (2014) FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes *Streptococcus agalactiae*-host cell interactions. *J Biol Chem* **289**: 21003–21015.
- Calmettes, C., Ing, C., Buckwalter, C.M., El Bakkouri, M., Chieh-Lin Lai, C., Pogoutse, A., et al.** (2015) The molecular mechanism of Zinc acquisition by the neisserial outer-membrane transporter ZnuD. *Nat Commun* **6**: 7996.
- Capdevila, D.A., Wang, J., and Giedroc, D.P.** (2016) Bacterial Strategies to Maintain Zinc Metallostasis at the Host-Pathogen Interface. *J Biol Chem* **291**: 20858–20868.
- Carey, A.J., Tan, C.K., Mirza, S., Irving-Rodgers, H., Webb, R.I., Lam, A., and Ulett, G.C.** (2014) Infection and cellular defense dynamics in a novel 17 $\beta$ -estradiol murine model of chronic human group B streptococcus genital tract colonization reveal a role for hemolysin in persistence and neutrophil accumulation. *J Immunol Baltim Md 1950* **192**: 1718–1731.
- Castor, M.L., Whitney, C.G., Como-Sabetti, K., Facklam, R.R., Ferrieri, P., Bartkus, J.M., et al.** (2008) Antibiotic Resistance Patterns in Invasive Group B Streptococcal Isolates. *Infect Dis Obstet Gynecol*
- Cerasi, M., Ammendola, S., and Battistoni, A.** (2013) Competition for zinc binding in the host-pathogen interaction. *Front Cell Infect Microbiol* **3**: 108.
- Chmouryguina, I., Suvorov, A., Ferrieri, P., and Cleary, P.P.** (1996) Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infect Immun* **64**: 2387–2390.
- Choby, J.E., and Skaar, E.P.** (2016) Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. *J Mol Biol* **428**: 3408–3428.



- Christie, K., Atkins, N., and Munch-Petersen, E.** (1944) Immunology and Cell Biology - Abstract of article: a note on a lytic phenomenon shown by group B streptococci. *Aust J Exp Biol Med* **22**: 197–200.
- Cole, A.M., Liao, H.-I., Stuchlik, O., Tilan, J., Pohl, J., and Ganz, T.** (2002) Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. *J Immunol Baltim Md 1950* **169**: 6985–6991.
- Colvin, R.A., Holmes, W.R., Fontaine, C.P., and Maret, W.** (2010) Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Met Integr Biometal Sci* **2**: 306–317.
- Coudray, N., Valvo, S., Hu, M., Lasala, R., Kim, C., Vink, M., et al.** (2013) Inward-facing conformation of the zinc transporter YiiP revealed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 2140–2145.
- Couñago, R.M., Ween, M.P., Begg, S.L., Bajaj, M., Zuegg, J., O'Mara, M.L., et al.** (2014) Imperfect coordination chemistry facilitates metal ion release in the Psa permease. *Nat Chem Biol* **10**: 35–41.
- Cramer, E.M., and Breton-Gorius, J.** (1987) Ultrastructural localization of lysozyme in human neutrophils by immunogold. *J Leukoc Biol* **41**: 242–247.
- Crisóstomo, M.I., Vollmer, W., Kharat, A.S., Inhülsen, S., Gehre, F., Buckenmaier, S., and Tomasz, A.** (2006) Attenuation of penicillin resistance in a peptidoglycan O-acetyl transferase mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **61**: 1497–1509.
- Cuthbertson, L., and Nodwell, J.R.** (2013) The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **77**: 440–475.
- Dave, S., Brooks-Walter, A., Pangburn, M.K., and McDaniel, L.S.** (2001) PspC, a Pneumococcal Surface Protein, Binds Human Factor H. *Infect Immun* **69**: 3435–3437.
- David, G., Blondeau, K., Schiltz, M., Penel, S., and Lewit-Bentley, A.** (2003) YodA from *Escherichia coli* is a metal-binding, lipocalin-like protein. *J Biol Chem* **278**: 43728–43735.
- De Gregorio, P. r., Juárez Tomás, M. s., Leccese Terraf, M. c., and Nader-Macías, M. e. f.** (2015) Preventive effect of *Lactobacillus reuteri* CRL1324 on Group B Streptococcus vaginal colonization in an experimental mouse model. *J Appl Microbiol* **118**: 1034–1047.
- Denoël, P., Philipp, M.T., Doyle, L., Martin, D., Carletti, G., and Poolman, J.T.** (2011) A protein-based pneumococcal vaccine protects rhesus macaques from pneumonia after experimental infection with *Streptococcus pneumoniae*. *Vaccine* **29**: 5495–5501.
- Deutscher, M., Lewis, M., Zell, E.R., Taylor, T.H., Van Beneden, C., Schrag, S., and Active Bacterial Core Surveillance Team.** (2011) Incidence and severity of invasive *Streptococcus pneumoniae*, group A Streptococcus, and group B Streptococcus infections among pregnant and postpartum women. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **53**: 114–123.



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

**Díaz-Mireles, E., Wexler, M., Sawers, G., Bellini, D., Todd, J.D., and Johnston, A.W.B.** (2004) The Fur-like protein Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a Mn(2+)-responsive transcriptional regulator. *Microbiol Read Engl* **150**: 1447–1456.

**Dillon, H.C., Gray, E., Pass, M.A., and Gray, B.M.** (1982) Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J Infect Dis* **145**: 794–799.

**Dintilhac, A., Alloing, G., Granadel, C., and Claverys, J.P.** (1997) Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* **25**: 727–739.

**Dintilhac, A., and Claverys, J.P.** (1997) The *adc* locus, which affects competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*, encodes an ABC transporter with a putative lipoprotein homologous to a family of streptococcal adhesins. *Res Microbiol* **148**: 119–131.

**Djoko, K.Y., Ong, C.Y., Walker, M.J., and McEwan, A.G.** (2015) The Role of Copper and Zinc Toxicity in Innate Immune Defense against Bacterial Pathogens. *J Biol Chem* **290**: 18954–18961.

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

**Dramsi, S., Morello, E., Poyart, C., and Trieu-Cuot, P.** (2012) Epidemiologically and clinically relevant Group B Streptococcus isolates do not bind collagen but display enhanced binding to human fibrinogen. *Microbes Infect* **14**: 1044–1048.

**Duarte, R.S., Barros, R.R., Facklam, R.R., and Teixeira, L.M.** (2005) Phenotypic and genotypic characteristics of *Streptococcus porcinus* isolated from human sources. *J Clin Microbiol* **43**: 4592–4601.

**Duthy, T.G., Ormsby, R.J., Giannakis, E., Ogunniyi, A.D., Stroehner, U.H., Paton, J.C., and Gordon, D.L.** (2002) The human complement regulator factor H binds pneumococcal surface protein PspC via short consensus repeats 13 to 15. *Infect Immun* **70**: 5604–5611.

**Edmond, K.M., Kortsalioudaki, C., Scott, S., Schrag, S.J., Zaidi, A.K.M., Cousens, S., and Heath, P.T.** (2012) Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *Lancet Lond Engl* **379**: 547–556.

**Edwards, M.S., and Baker, C.J.** (2005) Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **41**: 839–847.

**Eickhoff, T.C., Klein, J.O., Daly, A.K., Ingall, D., and Finland, M.** (1964) Neonatal sepsis and other infections due to group B beta-hemolytic streptococci. *N Engl J Med* **271**: 1221–1228.



- Eijkelkamp, B.A., Morey, J.R., Ween, M.P., Ong, C.Y., McEwan, A.G., Paton, J.C., and McDevitt, C.A.** (2014) Extracellular zinc competitively inhibits manganese uptake and compromises oxidative stress management in *Streptococcus pneumoniae*. *PloS One* **9**: e89427.
- Eijkelkamp, B.A., Pederick, V.G., Plumptre, C.D., Harvey, R.M., Hughes, C.E., Paton, J.C., and McDevitt, C.A.** (2015) The First Histidine Triad Motif of PhtD Is Critical for Zinc Homeostasis in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **84**: 407–415.
- Eldar, A., Bejerano, Y., Livoff, A., Horovitz, A., and Bercovier, H.** (1995) Experimental streptococcal meningo-encephalitis in cultured fish. *Vet Microbiol* **43**: 33–40.
- Elhaig, M.M., and Selim, A.** (2015) Molecular and bacteriological investigation of subclinical mastitis caused by *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in domestic bovids from Ismailia, Egypt. *Trop Anim Health Prod* **47**: 271–276.
- Elliott, J.A., Facklam, R.R., and Richter, C.B.** (1990) Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish. *J Clin Microbiol* **28**: 628–630.
- Ellison, D.W., and Miller, V.L.** (2006) Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Curr Opin Microbiol* **9**: 153–159.
- Elsner, A., Kreikemeyer, B., Braun-Kiewnick, A., Spellerberg, B., Buttaró, B.A., and Podbielski, A.** (2002) Involvement of Lsp, a member of the LraI-lipoprotein family in *Streptococcus pyogenes*, in eukaryotic cell adhesion and internalization. *Infect Immun* **70**: 4859–4869.
- Evans, J.J., Bohnsack, J.F., Klesius, P.H., Whiting, A.A., Garcia, J.C., Shoemaker, C.A., and Takahashi, S.** (2008) Phylogenetic relationships among *Streptococcus agalactiae* isolated from piscine, dolphin, bovine and human sources: a dolphin and piscine lineage associated with a fish epidemic in Kuwait is also associated with human neonatal infections in Japan. *J Med Microbiol* **57**: 1369–1376.
- Evans, J.J., Pasnik, D.J., Klesius, P.H., and Al-Ablani, S.** (2006) First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *J Wildl Dis* **42**: 561–569.
- Falconi, M., Oteri, F., Di Palma, F., Pandey, S., Battistoni, A., and Desideri, A.** (2011) Structural-dynamical investigation of the ZnuA histidine-rich loop: involvement in zinc management and transport. *J Comput Aided Mol Des* **25**: 181–194.
- Fallon, R.J.** (1974) The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic streptococci. *J Clin Pathol* **27**: 902–905.
- Farley, M.M.** (2001) Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **33**: 556–561.
- Feil, E.J., Li, B.C., Aanensen, D.M., Hanage, W.P., and Spratt, B.G.** (2004) eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* **186**: 1518–1530.



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

**Firon, A., Tazi, A., Da Cunha, V., Brinster, S., Sauvage, E., Dramsi, S., et al.** (2013) The Abi-domain protein Abx1 interacts with the CovS histidine kinase to control virulence gene expression in group B *Streptococcus*. *PLoS Pathog* **9**: e1003179.

**Fischer Walker, C., and Black, R.E.** (2004) Zinc and the risk for infectious disease. *Annu Rev Nutr* **24**: 255–275.

**Franken, C., Haase, G., Brandt, C., Weber-Heynemann, J., Martin, S., Lämmle, C., et al.** (2001) Horizontal gene transfer and host specificity of beta-haemolytic streptococci: the role of a putative composite transposon containing *scpB* and *lmb*. *Mol Microbiol* **41**: 925–935.

**Gaballa, A., and Helmann, J.D.** (1998) Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **180**: 5815–5821.

**Gaballa, A., Wang, T., Ye, R.W., and Helmann, J.D.** (2002) Functional analysis of the *Bacillus subtilis* Zur regulon. *J Bacteriol* **184**: 6508–6514.

**Gabbianelli, R., Scotti, R., Ammendola, S., Petrarca, P., Nicolini, L., and Battistoni, A.** (2011) Role of ZnuABC and ZinT in *Escherichia coli* O157:H7 zinc acquisition and interaction with epithelial cells. *BMC Microbiol* **11**: 36.

**Gagneur, A., Héry-Arnaud, G., Croly-Labourdette, S., Gremmo-Feger, G., Vallet, S., Sizun, J., et al.** (2009) Infected breast milk associated with late-onset and recurrent group B streptococcal infection in neonatal twins: a genetic analysis. *Eur J Pediatr* **168**: 1155–1158.

**Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P.** (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**: 1127–1141.

**Gao, X.-Y., Zhi, X.-Y., Li, H.-W., Klenk, H.-P., and Li, W.-J.** (2014) Comparative Genomics of the Bacterial Genus *Streptococcus* Illuminates Evolutionary Implications of Species Groups. *PLoS ONE* **9**.

**Gebhardt, C., Németh, J., Angel, P., and Hess, J.** (2006) S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol* **72**: 1622–1631.

**Gendrin, C., Vornhagen, J., Ngo, L., Whidbey, C., Boldenow, E., Santana-Ufret, V., et al.** (2015) Mast cell degranulation by a hemolytic lipid toxin decreases GBS colonization and infection. *Sci Adv* **1**: e1400225.

**Geng, Y., Wang, K.Y., Huang, X.L., Chen, D.F., Li, C.W., Ren, S.Y., et al.** (2012) *Streptococcus agalactiae*, an emerging pathogen for cultured ya-fish, *Schizothorax prenanti*, in China. *Transbound Emerg Dis* **59**: 369–375.

**Gilston, B.A., Wang, S., Marcus, M.D., Canalizo-Hernández, M.A., Swindell, E.P., Xue, Y., et al.** (2014) Structural and mechanistic basis of zinc regulation across the *E. coli* Zur regulon. *PLoS Biol* **12**: e1001987.



- Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., et al.** (2002) Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol* **45**: 1499–1513.
- Godambe, S., Shah, P.S., and Shah, V.** (2005) Breast milk as a source of late onset neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* **24**: 381–382.
- Graham, A.I., Hunt, S., Stokes, S.L., Bramall, N., Bunch, J., Cox, A.G., et al.** (2009) Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins. *J Biol Chem* **284**: 18377–18389.
- Grass, G., Fan, B., Rosen, B.P., Franke, S., Nies, D.H., and Rensing, C.** (2001) ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 4664–4667.
- Grass, G., Franke, S., Taudte, N., Nies, D.H., Kucharski, L.M., Maguire, M.E., and Rensing, C.** (2005) The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J Bacteriol* **187**: 1604–1611.
- Grass, G., Otto, M., Fricke, B., Haney, C.J., Rensing, C., Nies, D.H., and Munkelt, D.** (2005) FieF (YiiP) from *Escherichia coli* mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress. *Arch Microbiol* **183**: 9–18.
- Grass, G., Wong, M.D., Rosen, B.P., Smith, R.L., and Rensing, C.** (2002) ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 864–866.
- Grove, A.** (2017) Regulation of Metabolic Pathways by MarR Family Transcription Factors. *Comput Struct Biotechnol J* **15**: 366–371.
- Guerra, A.J., Dann, C.E., and Giedroc, D.P.** (2011) Crystal structure of the zinc-dependent MarR family transcriptional regulator AdcR in the Zn(II)-bound state. *J Am Chem Soc* **133**: 19614–19617.
- Gutekunst, H., Eikmanns, B.J., and Reinscheid, D.J.** (2003) Analysis of RogB-controlled virulence mechanisms and gene repression in *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* **71**: 5056–5064.
- Gutekunst, H., Eikmanns, B.J., and Reinscheid, D.J.** (2004) The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. *Infect Immun* **72**: 3495–3504.
- Hamel, J., Charland, N., Pineau, I., Ouellet, C., Rioux, S., Martin, D., and Brodeur, B.R.** (2004) Prevention of pneumococcal disease in mice immunized with conserved surface-accessible proteins. *Infect Immun* **72**: 2659–2670.
- Haney, C.J., Grass, G., Franke, S., and Rensing, C.** (2005) New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**: 215–226.
- Hansen, S.M., Uldbjerg, N., Kilian, M., and Sørensen, U.B.S.** (2004) Dynamics of *Streptococcus agalactiae* colonization in women during and after pregnancy and in their infants. *J Clin Microbiol* **42**: 83–89.



- Harlyk, C., Mccourt, J., Bordin, G., Rodriguez, A.R., and Eeckhout, A. van der** (1997) Determination of copper, zinc and iron in broncho-alveolar lavages by atomic absorption spectroscopy. *J Trace Elem Med Biol Organ Soc Miner Trace Elem GMS* **11**: 137–142.
- Heath, P.T.** (2016) Status of vaccine research and development of vaccines for GBS. *Vaccine* **34**: 2876–2879.
- Helbig, K., Bleuel, C., Krauss, G.J., and Nies, D.H.** (2008) Glutathione and transition-metal homeostasis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 5431–5438.
- Herbert, M.A., Beveridge, C.J.E., McCormick, D., Aten, E., Jones, N., Snyder, L.A.S., and Saunders, N.J.** (2005) Genetic islands of *Streptococcus agalactiae* strains NEM316 and 2603VR and their presence in other Group B streptococcal strains. *BMC Microbiol* **5**: 31.
- Higgins, C.F., Hiles, I.D., Salmond, G.P., Gill, D.R., Downie, J.A., Evans, I.J., et al.** (1986) A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature* **323**: 448–450.
- Hillerton, J.E., and Berry, E.A.** (2003) The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **19**: 157–169.
- Hoch, E., Lin, W., Chai, J., Hershfinkel, M., Fu, D., and Sekler, I.** (2012) Histidine pairing at the metal transport site of mammalian ZnT transporters controls Zn<sup>2+</sup> over Cd<sup>2+</sup> selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 7202–7207.
- Holland, I.B., and Blight, M.A.** (1999) ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *J Mol Biol* **293**: 381–399.
- Hood, M.I., and Skaar, E.P.** (2012) Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol* **10**.
- Izaki, K., Kiuchi, K., and Arima, K.** (1966) Specificity and mechanism of tetracycline resistance in a multiple drug resistant strain of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **91**: 628–633.
- Jacobsen, F.E., Kazmierczak, K.M., Lisher, J.P., Winkler, M.E., and Giedroc, D.P.** (2011) Interplay between manganese and zinc homeostasis in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Met Integr Biometal Sci* **3**: 38–41.
- Jacobsson, K.** (2003) A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. *Vet Microbiol* **96**: 103–113.
- Jafar, Q.A., Sameer, A.-Z., Salwa, A.-M., Samee, A.-A., Ahmed, A.-M., and Al-Sharifi, F.** (2008) Molecular investigation of *Streptococcus agalactiae* isolates from environmental samples and fish specimens during a massive fish kill in Kuwait Bay. *Pak J Biol Sci PJBS* **11**: 2500–2504.
- Jain, N.C.** (1979) Common mammary pathogens and factors in infection and mastitis. *J Dairy Sci* **62**: 128–134.



- Janulczyk, R., Pallon, J., and Björck, L.** (1999) Identification and characterization of a *Streptococcus pyogenes* ABC transporter with multiple specificity for metal cations. *Mol Microbiol* **34**: 596–606.
- Janulczyk, R., Ricci, S., and Björck, L.** (2003) MtsABC Is Important for Manganese and Iron Transport, Oxidative Stress Resistance, and Virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **71**: 2656–2664.
- Jelínková, J., and Motlová, J.** (1985) Worldwide distribution of two new serotypes of group B streptococci: type IV and provisional type V. *J Clin Microbiol* **21**: 361–362.
- Jenkinson, H.F.** (1994) Cell surface protein receptors in oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett* **121**: 133–140.
- Jensen, N.E.** (1979) Production and evaluation of antisera for serological type determination of group-B streptococci by double diffusion in agarose gel. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* **87B**: 77–83.
- Jiang, S., Park, S.E., Yadav, P., Paoletti, L.C., and Wessels, M.R.** (2012) Regulation and Function of Pilus Island 1 in Group B Streptococcus. *J Bacteriol* **194**: 2479–2490.
- Jiang, S., and Wessels, M.R.** (2014) BsaB, a novel adherence factor of group B Streptococcus. *Infect Immun* **82**: 1007–1016.
- Jiang, S.-M., Cieslewicz, M.J., Kasper, D.L., and Wessels, M.R.** (2005) Regulation of virulence by a two-component system in group B streptococcus. *J Bacteriol* **187**: 1105–1113.
- Jones, N., Bohnsack, J.F., Takahashi, S., Oliver, K.A., Chan, M.-S., Kunst, F., et al.** (2003) Multilocus sequence typing system for group B streptococcus. *J Clin Microbiol* **41**: 2530–2536.
- Joubert, L., Dagieu, J.-B., Fernandez, A., Derré-Bobillot, A., Borezée-Durant, E., Fleurot, I., et al.** (2017) Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*. *Sci Rep* **7**: 40435.
- Joubrel, C., Tazi, A., Six, A., Dmytruk, N., Touak, G., Bidet, P., et al.** (2015) Group B streptococcus neonatal invasive infections, France 2007-2012. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* **21**: 910–916.
- Kalimuddin, S., Chen, S.L., Lim, C.T.K., Koh, T.H., Tan, T.Y., Kam, M., et al.** (2017) 2015 Epidemic of Severe *Streptococcus agalactiae* Sequence Type 283 Infections in Singapore Associated With the Consumption of Raw Freshwater Fish: A Detailed Analysis of Clinical, Epidemiological, and Bacterial Sequencing Data. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **64**: S145–S152.
- Kallio, A., Sepponen, K., Hermand, P., Denoël, P., Godfroid, F., and Melin, M.** (2014) Role of Pht proteins in attachment of *Streptococcus pneumoniae* to respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **82**: 1683–1691.



- Kapetanovic, R., Bokil, N.J., Achard, M.E.S., Ong, C.-L.Y., Peters, K.M., Stocks, C.J., et al.** (2016) Salmonella employs multiple mechanisms to subvert the TLR-inducible zinc-mediated antimicrobial response of human macrophages. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **30**: 1901–1912.
- Kawahara, M., Arispe, N., Kuroda, Y., and Rojas, E.** (1997) Alzheimer's disease amyloid beta-protein forms Zn(2+)-sensitive, cation-selective channels across excised membrane patches from hypothalamic neurons. *Biophys J* **73**: 67–75.
- Keefe, G.P.** (1997) *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can Vet J Rev Veterinaire Can* **38**: 429–437.
- Kehl-Fie, T.E., and Skaar, E.P.** (2010) Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol* **14**: 218–224.
- Khan, M.N., and Pichichero, M.E.** (2012) Vaccine candidates PhtD and PhtE of *Streptococcus pneumoniae* are adhesins that elicit functional antibodies in humans. *Vaccine* **30**: 2900–2907.
- Kikkawa, Y., Sanzen, N., and Sekiguchi, K.** (1998) Isolation and characterization of laminin-10/11 secreted by human lung carcinoma cells. laminin-10/11 mediates cell adhesion through integrin  $\alpha 3 \beta 1$ . *J Biol Chem* **273**: 15854–15859.
- Kilkinen, A., Virtanen, S.M., Klaukka, T., Kenward, M.G., Salkinoja-Salonen, M., Gissler, M., et al.** (2006) Use of antimicrobials and risk of type 1 diabetes in a population-based mother-child cohort. *Diabetologia* **49**: 66–70.
- King, L.E., Frentzel, J.W., Mann, J.J., and Fraker, P.J.** (2005) Chronic zinc deficiency in mice disrupted T cell lymphopoiesis and erythropoiesis while B cell lymphopoiesis and myelopoiesis were maintained. *J Am Coll Nutr* **24**: 494–502.
- Kloosterman, T.G., Kooi-Pol, M.M. van der, Bijlsma, J.J.E., and Kuipers, O.P.** (2007) The novel transcriptional regulator SczA mediates protection against Zn<sup>2+</sup> stress by activation of the Zn<sup>2+</sup>-resistance gene *czcD* in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **65**: 1049–1063.
- Kloosterman, T.G., Witwicki, R.M., Kooi-Pol, M.M. van der, Bijlsma, J.J.E., and Kuipers, O.P.** (2008) Opposite effects of Mn<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> on PsaR-mediated expression of the virulence genes *pcpA*, *prtA*, and *psaBCA* of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **190**: 5382–5393.
- Kobayashi, M., Schrag, S.J., Alderson, M.R., Madhi, S.A., Baker, C.J., Sobanjo-ter Meulen, A., et al.** (2016) WHO consultation on group B *Streptococcus* vaccine development: Report from a meeting held on 27–28 April 2016. *Vaccine*
- Kobe, B., and Kajava, A.V.** (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* **11**: 725–732.
- Kolaj-Robin, O., Russell, D., Hayes, K.A., Pembroke, J.T., and Soulimane, T.** (2015) Cation Diffusion Facilitator family: Structure and function. *FEBS Lett* **589**: 1283–1295.



- Kolar, S.L., Kyme, P., Tseng, C.W., Soliman, A., Kaplan, A., Liang, J., et al.** (2015) Group B Streptococcus Evades Host Immunity by Degrading Hyaluronan. *Cell Host Microbe* **18**: 694–704.
- Krohn, M.A., Hillier, S.L., and Baker, C.J.** (1999) Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization. *J Infect Dis* **179**: 1410–1415.
- Kunitomo, E., Terao, Y., Okamoto, S., Rikimaru, T., Hamada, S., and Kawabata, S.** (2008) Molecular and biological characterization of histidine triad protein in group A streptococci. *Microbes Infect Inst Pasteur* **10**: 414–423.
- Lagartera, L., González, A., Hermoso, J.A., Saíz, J.L., García, P., García, J.L., and Menéndez, M.** (2005) Pneumococcal phosphorylcholine esterase, Pce, contains a metal binuclear center that is essential for substrate binding and catalysis. *Protein Sci Publ Protein Soc* **14**: 3013–3024.
- Lämmle, C., Abdulmawjood, A., and Weiss, R.** (1998) Properties of serological group B streptococci of dog, cat and monkey origin. *Zentralblatt Vet Reihe B J Vet Med Ser B* **45**: 561–566.
- Lamy, M.-C., Zouine, M., Fert, J., Vergassola, M., Couve, E., Pellegrini, E., et al.** (2004) CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence. *Mol Microbiol* **54**: 1250–1268.
- Lancefield, R.C.** (1933) A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med* **57**: 571–595.
- Lancefield, R.C., and Freimer, E.H.** (1966) Type-specific polysaccharide antigens of group B streptococci. *J Hyg (Lond)* **64**: 191–203.
- Lang, S., and Palmer, M.** (2003) Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J Biol Chem* **278**: 38167–38173.
- Langdon, A., Crook, N., and Dantas, G.** (2016) The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med* **8**: 39.
- Lawn, J.E., Gravett, M.G., Nunes, T.M., Rubens, C.E., Stanton, C., and GAPPS Review Group.** (2010) Global report on preterm birth and stillbirth (1 of 7): definitions, description of the burden and opportunities to improve data. *BMC Pregnancy Childbirth* **10 Suppl 1**: S1.
- Lee, Y.H., Deka, R.K., Norgard, M.V., Radolf, J.D., and Hasemann, C.A.** (1999) *Treponema pallidum* TroA is a periplasmic zinc-binding protein with a helical backbone. *Nat Struct Biol* **6**: 628–633.
- Lehmann K. B., Neumann R.** 1896. Atlas und grundriss der bakteriologie und lehrbuch der speciellen bakteriologischen diagnostik I and II. **1st ed.** J.F. Lehmann, München.
- Li, M., Shao, Z.-Q., Guo, Y., Wang, L., Hou, T., Hu, D., et al.** (2015) The type II histidine triad protein HtpsC is a novel adhesion with the involvement of *Streptococcus suis* virulence. *Virulence* **6**: 631–641.



- Libster, R., Edwards, K.M., Levent, F., Edwards, M.S., Rench, M.A., Castagnini, L.A., et al.** (2012) Long-term Outcomes of Group B Streptococcal Meningitis. *Pediatrics* peds.2011-3453.
- Lin, W.-J., Walthers, D., Connelly, J.E., Burnside, K., Jewell, K.A., Kenney, L.J., and Rajagopal, L.** (2009) Threonine phosphorylation prevents promoter DNA binding of the Group B Streptococcus response regulator CovR. *Mol Microbiol* **71**: 1477–1495.
- Linke, C., Caradoc-Davies, T.T., Young, P.G., Proft, T., and Baker, E.N.** (2009) The laminin-binding protein Lbp from *Streptococcus pyogenes* is a zinc receptor. *J Bacteriol* **191**: 5814–5823.
- Liu, G.Y., Doran, K.S., Lawrence, T., Turkson, N., Puliti, M., Tissi, L., and Nizet, V.** (2004) Sword and shield: linked group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 14491–14496.
- Liuzzi, J.P., Lichten, L.A., Rivera, S., Blanchard, R.K., Aydemir, T.B., Knutson, M.D., et al.** (2005) Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 6843–6848.
- Loisel, E., Chimalapati, S., Bougault, C., Imbert, A., Gallet, B., Di Guilmi, A.M., et al.** (2011) Biochemical characterization of the histidine triad protein PhtD as a cell surface zinc-binding protein of pneumococcus. *Biochemistry (Mosc)* **50**: 3551–3558.
- Loisel, E., Jacquamet, L., Serre, L., Bauvois, C., Ferrer, J.L., Vernet, T., et al.** (2008) AdcAII, a new pneumococcal Zn-binding protein homologous with ABC transporters: biochemical and structural analysis. *J Mol Biol* **381**: 594–606.
- Lu, M., and Fu, D.** (2007) Structure of the zinc transporter YiiP. *Science* **317**: 1746–1748.
- Lucarelli, D., Russo, S., Garman, E., Milano, A., Meyer-Klaucke, W., and Pohl, E.** (2007) Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **282**: 9914–9922.
- Lund, P.A., and Brown, N.L.** (1989) Regulation of transcription in *Escherichia coli* from the *mer* and *merR* promoters in the transposon Tn501. *J Mol Biol* **205**: 343–353.
- Lund, P.A., Ford, S.J., and Brown, N.L.** (1986) Transcriptional regulation of the mercury-resistance genes of transposon Tn501. *J Gen Microbiol* **132**: 465–480.
- Ma, L., Terwilliger, A., and Maresco, A.W.** (2015) Iron and Zinc Exploitation during Bacterial Pathogenesis. *Met Integr Biometal Sci* **7**: 1541–1554.
- Ma, Z., Chandrangsu, P., Helmann, T.C., Romsang, A., Gaballa, A., and Helmann, J.D.** (2014) Bacillithiol is a major buffer of the labile zinc pool in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **94**: 756–770.
- Ma, Z., Jacobsen, F.E., and Giedroc, D.P.** (2009) Metal Transporters and Metal Sensors: How Coordination Chemistry Controls Bacterial Metal Homeostasis. *Chem Rev* **109**: 4644–4681.



**MacFarquhar, J.K., Jones, T.F., Woron, A.M., Kainer, M.A., Whitney, C.G., Beall, B., et al.** (2010) Outbreak of late-onset group B *Streptococcus* in a neonatal intensive care unit. *Am J Infect Control* **38**: 283–288.

**Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., et al.** (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3140–3145.

**Maione, D., Margarit, I., Rinaudo, C.D., Massignani, V., Mora, M., Scarselli, M., et al.** (2005) Identification of a universal Group B streptococcus vaccine by multiple genome screen. *Science* **309**: 148–150.

**Makthal, N., Nguyen, K., Do, H., Gavagan, M., Chandrangsu, P., Helmann, J.D., et al.** (2017) A Critical Role of Zinc Importer AdcABC in Group A *Streptococcus*-Host Interactions During Infection and Its Implications for Vaccine Development. *EBioMedicine* **21**: 131–141.

**Manning, S., Tallman, P., and Foxman, B.** (2000) Prevalence and co-colonization with group b streptococcus (Gbs) Among heterosexual college couples. *Ann Epidemiol* **10**: 472.

**Manzoor, I., Shafeeq, S., Afzal, M., and Kuipers, O.P.** (2015) The Regulation of the AdcR Regulon in *Streptococcus pneumoniae* Depends Both on Zn(2+)- and Ni(2+)-Availability. *Front Cell Infect Microbiol* **5**: 91.

**Manzoor, I., Shafeeq, S., Kloosterman, T.G., and Kuipers, O.P.** (2015) Co(2+)-dependent gene expression in *Streptococcus pneumoniae*: opposite effect of Mn(2+) and Co(2+) on the expression of the virulence genes *psaBCA*, *pcpA*, and *prtA*. *Front Microbiol* **6**: 748.

**Manzoor, I., Shafeeq, S., and Kuipers, O.P.** (2015) Ni<sup>2+</sup>-Dependent and PsaR-Mediated Regulation of the Virulence Genes *pcpA*, *psaBCA*, and *prtA* in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* **10**: e0142839.

**Maret, W.** (1994) Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 237–241.

**Martin, J.E., Edmonds, K.A., Bruce, K.E., Campanello, G.C., Eijkelkamp, B.A., Brazel, E.B., et al.** (2017) The zinc efflux activator SczA protects *Streptococcus pneumoniae* serotype 2 D39 from intracellular zinc toxicity. *Mol Microbiol* **104**: 636–651.

**Martin, J.E., and Giedroc, D.P.** (2016) Functional Determinants of Metal Ion Transport and Selectivity in Paralogous Cation Diffusion Facilitator Transporters CzcD and MntE in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **198**: 1066–1076.

**Maruvada, R., Prasadaraao, N.V., and Rubens, C.E.** (2009) Acquisition of factor H by a novel surface protein on group B *Streptococcus* promotes complement degradation. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **23**: 3967–3977.

**McDevitt, C.A., Ogunniyi, A.D., Valkov, E., Lawrence, M.C., Kobe, B., McEwan, A.G., and Paton, J.C.** (2011) A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc. *PLoS Pathog* **7**: e1002357.

**Mee-Marquet, N. van der, Fourny, L., Arnault, L., Domelier, A.-S., Salloum, M., Lartigue, M.-F., and Quentin, R.** (2008) Molecular characterization of human-colonizing



*Streptococcus agalactiae* strains isolated from throat, skin, anal margin, and genital body sites. *J Clin Microbiol* **46**: 2906–2911.

**Melin, M., Di Paolo, E., Tikkanen, L., Jarva, H., Neyt, C., Käyhty, H., et al.** (2010) Interaction of pneumococcal histidine triad proteins with human complement. *Infect Immun* **78**: 2089–2098.

**Meret, S., and Henkin, R.I.** (1971) Simultaneous direct estimation by atomic absorption spectrophotometry of copper and zinc in serum, urine, and cerebrospinal fluid. *Clin Chem* **17**: 369–373.

**Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., et al.** (2003) *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 385–410.

**Meyn, L.A., Krohn, M.A., and Hillier, S.L.** (2009) Rectal colonization by group B *Streptococcus* as a predictor of vaginal colonization. *Am J Obstet Gynecol* **201**: 76.e1-7.

**Meyn, L.A., Moore, D.M., Hillier, S.L., and Krohn, M.A.** (2002) Association of sexual activity with colonization and vaginal acquisition of group B *Streptococcus* in nonpregnant women. *Am J Epidemiol* **155**: 949–957.

**Mian, G.F., Godoy, D.T., Leal, C. a. G., Yuhara, T.Y., Costa, G.M., and Figueiredo, H.C.P.** (2009) Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia. *Vet Microbiol* **136**: 180–183.

**Mistou, M.-Y., Dramsi, S., Brega, S., Poyart, C., and Trieu-Cuot, P.** (2009) Molecular Dissection of the secA2 Locus of Group B *Streptococcus* Reveals that Glycosylation of the Srr1 LPXTG Protein Is Required for Full Virulence. *J Bacteriol* **191**: 4195–4206.

**Mitchell, K., Brou, L., Bhat, G., Drobek, C.O., Kramer, M., Hill, A., et al.** (2013) Group B *Streptococcus* colonization and higher maternal IL-1 $\beta$  concentrations are associated with early term births. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet* **26**: 56–61.

**Monari, F., Gabrielli, L., Gargano, G., Annessi, E., Ferrari, F., Rivasi, F., and Facchinetti, F.** (2013) Fetal bacterial infections in antepartum stillbirth: a case series. *Early Hum Dev* **89**: 1049–1054.

**Moroz, O.V., Antson, A.A., Grist, S.J., Maitland, N.J., Dodson, G.G., Wilson, K.S., et al.** (2003) Structure of the human S100A12-copper complex: implications for host-parasite defence. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 859–867.

**Moroz, O.V., Burkitt, W., Wittkowski, H., He, W., Ianoul, A., Novitskaya, V., et al.** (2009) Both Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> are essential for S100A12 protein oligomerization and function. *BMC Biochem* **10**: 11.

**Motlová, J., Wagner, M., and Jelínková, J.** (1986) A search for new group-B streptococcal serotypes. *J Med Microbiol* **22**: 101–105.



- Moulin, P., Patron, K., Cano, C., Zorgani, M.A., Camiade, E., Borezée-Durant, E., et al.** (2016) The Adc/Lmb System Mediates Zinc Acquisition in *Streptococcus agalactiae* and Contributes to Bacterial Growth and Survival. *J Bacteriol* **198**: 3265–3277.
- Nagano, Y., Nagano, N., Takahashi, S., Murono, K., Fujita, K., Taguchi, F., and Okuwaki, Y.** (1991) Restriction endonuclease digest patterns of chromosomal DNA from group B beta-haemolytic streptococci. *J Med Microbiol* **35**: 297–303.
- Natori, Y., Nanamiya, H., Akanuma, G., Kosono, S., Kudo, T., Ochi, K., and Kawamura, F.** (2007) A fail-safe system for the ribosome under zinc-limiting conditions in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **63**: 294–307.
- Nies, D.H.** (1995) The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**: 2707–2712.
- Nocard, E., and Mollereau, R.** (1887) Sur une mammite contagieuse des vaches laitières. *Ann Inst Pasteur* **1**: 109–126.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T.J., and Buchanan, S.K.** (2010) TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annu Rev Microbiol* **64**: 43–60.
- Ogunniyi, A.D., Grabowicz, M., Mahdi, L.K., Cook, J., Gordon, D.L., Sadlon, T.A., and Paton, J.C.** (2009) Pneumococcal histidine triad proteins are regulated by the Zn<sup>2+</sup>-dependent repressor AdcR and inhibit complement deposition through the recruitment of complement factor H. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* **23**: 731–738.
- O'Halloran, T.V., Frantz, B., Shin, M.K., Ralston, D.M., and Wright, J.G.** (1989) The MerR heavy metal receptor mediates positive activation in a topologically novel transcription complex. *Cell* **56**: 119–129.
- Oliver, S.P., and Mitchell, B.A.** (1984) Prevalence of mastitis pathogens in herds participating in a mastitis control program. *J Dairy Sci* **67**: 2436–2440.
- Ong, C.Y., Gillen, C.M., Barnett, T.C., Walker, M.J., and McEwan, A.G.** (2014) An antimicrobial role for zinc in innate immune defense against group A streptococcus. *J Infect Dis* **209**: 1500–1508.
- Ortiz, L., Ruiz, F., Pascual, L., and Barberis, L.** (2014) Effect of Two Probiotic Strains of *Lactobacillus* on *In Vitro* Adherence of *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus agalactiae*, and *Staphylococcus aureus* to Vaginal Epithelial Cells. *Curr Microbiol* **68**: 679–684.
- Outten, C.E., and O'Halloran, T.V.** (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**: 2488–2492.
- Outten, C.E., Tobin, D.A., Penner-Hahn, J.E., and O'Halloran, T.V.** (2001) Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein. *Biochemistry (Mosc)* **40**: 10417–10423.
- Palmer, L.D., and Skaar, E.P.** (2016) Transition Metals and Virulence in Bacteria. *Annu Rev Genet* **50**: 67–91.



- Panina, E.M., Mironov, A.A., and Gelfand, M.S.** (2003) Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9912–9917.
- Papasergi, S., Galbo, R., Lanza-Cariccio, V., Domina, M., Signorino, G., Biondo, C., et al.** (2013) Analysis of the *Streptococcus agalactiae* exoproteome. *J Proteomics* **89**: 154–164.
- Patras, K. A., Rösler, B., Thoman, M.L., and Doran, K.S.** (2015) Characterization of host immunity during persistent vaginal colonization by Group B Streptococcus. *Mucosal Immunol* **8**: 1339–1348.
- Patras, K.A., Wang, N.-Y., Fletcher, E.M., Cavaco, C.K., Jimenez, A., Garg, M., et al.** (2013) Group B Streptococcus CovR regulation modulates host immune signalling pathways to promote vaginal colonization. *Cell Microbiol* **15**: 1154–1167.
- Patras, K.A., Wescombe, P.A., Rösler, B., Hale, J.D., Tagg, J.R., and Doran, K.S.** (2015) *Streptococcus salivarius* K12 Limits Group B Streptococcus Vaginal Colonization. *Infect Immun* **83**: 3438–3444.
- Pereira, U.P., Mian, G.F., Oliveira, I.C.M., Benchetrit, L.C., Costa, G.M., and Figueiredo, H.C.P.** (2010) Genotyping of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fish, human and cattle and their virulence potential in Nile tilapia. *Vet Microbiol* **140**: 186–192.
- Permina, E.A., Kazakov, A.E., Kalinina, O.V., and Gelfand, M.S.** (2006) Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in Eubacteria. *BMC Microbiol* **6**: 49.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R.W., Kalbacher, H., Jung, G., and Götz, F.** (1999) Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem* **274**: 8405–8410.
- Petrarca, P., Ammendola, S., Pasquali, P., and Battistoni, A.** (2010) The Zur-regulated ZinT protein is an auxiliary component of the high-affinity ZnuABC zinc transporter that facilitates metal recruitment during severe zinc shortage. *J Bacteriol* **192**: 1553–1564.
- Phares, C.R., Lynfield, R., Farley, M.M., Mohle-Boetani, J., Harrison, L.H., Petit, S., et al.** (2008) Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999–2005. *JAMA* **299**: 2056–2065.
- Piepers, S., De Meulemeester, L., Kruif, A. de, Opsomer, G., Barkema, H.W., and De Vliegher, S.** (2007) Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *J Dairy Res* **74**: 478–483.
- Pierno, M., Maravigna, L., Piazza, R., Visai, L., and Speziale, P.** (2006) FbsA-driven fibrinogen polymerization: a bacterial “deceiving strategy.” *Phys Rev Lett* **96**: 028108.
- Pietzsch, J., and Hoppmann, S.** (2009) Human S100A12: a novel key player in inflammation? *Amino Acids* **36**: 381–389.
- Plumptre, C.D., Eijkelkamp, B.A., Morey, J.R., Behr, F., Couñago, R.M., Ogunniyi, A.D., et al.** (2014) AdcA and AdcAII employ distinct zinc acquisition mechanisms and contribute additively to zinc homeostasis in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **91**: 834–851.



**Plumptre, C.D., Hughes, C.E., Harvey, R.M., Eijkelkamp, B.A., McDevitt, C.A., and Paton, J.C.** (2014) Overlapping functionality of the Pht proteins in zinc homeostasis of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **82**: 4315–4324.

**Plumptre, C.D., Ogunniyi, A.D., and Paton, J.C.** (2012) Polyhistidine triad proteins of pathogenic streptococci. *Trends Microbiol* **20**: 485–493.

**Póntigo, F., Moraga, M., and Flores, S.V.** (2015) Molecular phylogeny and a taxonomic proposal for the genus *Streptococcus*. *Genet Mol Res GMR* **14**: 10905–10918.

**Potter, A.J., Trappetti, C., and Paton, J.C.** (2012) *Streptococcus pneumoniae* Uses Glutathione To Defend against Oxidative Stress and Metal Ion Toxicity. *J Bacteriol* **194**: 6248–6254.

**Poutrel, B.** (2015) Prévalence en France des pathogènes impliqués dans les mammites bovines selon leur sévérité. *Bull GTV*.

**Poyart, C., Pellegrini, E., Gaillot, O., Boumaila, C., Baptista, M., and Trieu-Cuot, P.** (2001) Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* **69**: 5098–5106.

**Poyart, C., Réglier-Poupet, H., Tazi, A., Billoët, A., Dmytruk, N., Bidet, P., et al.** (2008) Invasive group B streptococcal infections in infants, France. *Emerg Infect Dis* **14**: 1647–1649.

**Pritzlaff, C.A., Chang, J.C., Kuo, S.P., Tamura, G.S., Rubens, C.E., and Nizet, V.** (2001) Genetic basis for the beta-haemolytic/cytolytic activity of group B *Streptococcus*. *Mol Microbiol* **39**: 236–247.

**Puopolo, K.M., Madoff, L.C., and Eichenwald, E.C.** (2005) Early-onset group B streptococcal disease in the era of maternal screening. *Pediatrics* **115**: 1240–1246.

**Ragunathan, P., Spellerberg, B., and Ponnuraj, K.** (2009) Structure of laminin-binding adhesin (Lmb) from *Streptococcus agalactiae*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**: 1262–1269.

**Ragunathan, P., Sridaran, D., Weigel, A., Shabayek, S., Spellerberg, B., and Ponnuraj, K.** (2013) Metal binding is critical for the folding and function of laminin binding protein, Lmb of *Streptococcus agalactiae*. *PloS One* **8**: e67517.

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

**Rajendram, P., Mar Kyaw, W., Leo, Y.S., Ho, H., Chen, W.K., Lin, R., et al.** (2016) Group B *Streptococcus* Sequence Type 283 Disease Linked to Consumption of Raw Fish, Singapore. *Emerg Infect Dis* **22**: 1974–1977.

**Ramaswamy, S.V., Ferrieri, P., Flores, A.E., and Paoletti, L.C.** (2006) Molecular Characterization of Nontypeable Group B *Streptococcus*. *J Clin Microbiol* **44**: 2398–2403.

**Reid, S.D., Montgomery, A.G., Voyich, J.M., DeLeo, F.R., Lei, B., Ireland, R.M., et al.** (2003) Characterization of an extracellular virulence factor made by group A *Streptococcus*



with homology to the *Listeria monocytogenes* internalin family of proteins. *Infect Immun* **71**: 7043–7052.

**Reyes-Caballero, H., Guerra, A.J., Jacobsen, F.E., Kazmierczak, K.M., Cowart, D., Koppolu, U.M.K., et al.** (2010) The metalloregulatory zinc site in *Streptococcus pneumoniae* AdcR, a zinc-activated MarR family repressor. *J Mol Biol* **403**: 197–216.

**Riboldi-Tunnicliffe, A., Bent, C.J., Isaacs, N.W., and Mitchell, T.J.** (2004) Expression, purification and X-ray characterization of residues 18-230 from the pneumococcal histidine triad protein A (PhtA) from *Streptococcus pneumoniae*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**: 926–928.

**Riboldi-Tunnicliffe, A., Isaacs, N.W., and Mitchell, T.J.** (2005) 1.2 Angstroms crystal structure of the *S. pneumoniae* PhtA histidine triad domain a novel zinc binding fold. *FEBS Lett* **579**: 5353–5360.

**Richards, V.P., Palmer, S.R., Pavinski Bitar, P.D., Qin, X., Weinstock, G.M., Highlander, S.K., et al.** (2014) Phylogenomics and the Dynamic Genome Evolution of the Genus *Streptococcus*. *Genome Biol Evol* **6**: 741–753.

**Rink, L., and Gabriel, P.** (2000) Zinc and the immune system. *Proc Nutr Soc* **59**: 541–552.

**Rioux, S., Neyt, C., Di Paolo, E., Turpin, L., Charland, N., Labbé, S., et al.** (2011) Transcriptional regulation, occurrence and putative role of the Pht family of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiol Read Engl* **157**: 336–348.

**Rivera, J., Vannakambadi, G., Höök, M., and Speziale, P.** (2007) Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. *Thromb Haemost* **98**: 503–511.

**Robinson, J.A., and Meyer, F.P.** (1966) Streptococcal fish pathogen. *J Bacteriol* **92**: 512.

**Rosenau, A., Martins, K., Amor, S., Gannier, F., Lanotte, P., Mee-Marquet, N. van der, et al.** (2007) Evaluation of the ability of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from genital and neonatal specimens to bind to human fibrinogen and correlation with characteristics of the *fbsA* and *fbsB* genes. *Infect Immun* **75**: 1310–1317.

**Rýc, M., Jelínková, J., Motlová, J., and Wagner, M.** (1988) Immuno-electronmicroscopic demonstration of capsules on group-B streptococci of new serotypes and type candidates. *J Med Microbiol* **25**: 147–149.

**Saier, M.H., Tam, R., Reizer, A., and Reizer, J.** (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* **11**: 841–847.

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

**Sanson, M., Makthal, N., Flores, A.R., Olsen, R.J., Musser, J.M., and Kumaraswami, M.** (2015) Adhesin competence repressor (AdcR) from *Streptococcus pyogenes* controls adaptive responses to zinc limitation and contributes to virulence. *Nucleic Acids Res* **43**: 418–432.



**Santi, I., Grifantini, R., Jiang, S.-M., Brettoni, C., Grandi, G., Wessels, M.R., and Soriani, M.** (2009) CsrRS regulates group B *Streptococcus* virulence gene expression in response to environmental pH: a new perspective on vaccine development. *J Bacteriol* **191**: 5387–5397.

**Santi, I., Scarselli, M., Mariani, M., Pezzicoli, A., Masignani, V., Taddei, A., et al.** (2007) BibA: a novel immunogenic bacterial adhesin contributing to group B *Streptococcus* survival in human blood. *Mol Microbiol* **63**: 754–767.

**Schrag, S.J., and Verani, J.R.** (2013) Intrapartum antibiotic prophylaxis for the prevention of perinatal group B streptococcal disease: experience in the United States and implications for a potential group B streptococcal vaccine. *Vaccine* **31 Suppl 4**: D20–26.

**Schubert, A., Zakikhany, K., Pietrocola, G., Meinke, A., Speziale, P., Eikmanns, B.J., and Reinscheid, D.J.** (2004) The fibrinogen receptor FbsA promotes adherence of *Streptococcus agalactiae* to human epithelial cells. *Infect Immun* **72**: 6197–6205.

**Schubert, A., Zakikhany, K., Schreiner, M., Frank, R., Spellerberg, B., Eikmanns, B.J., and Reinscheid, D.J.** (2002) A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol Microbiol* **46**: 557–569.

**Schuchat, A.** (1998) Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin Microbiol Rev* **11**: 497–513.

**Schwartz, D.C., and Cantor, C.R.** (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67–75.

**Seiberling, M., Bologa, M., Brookes, R., Ochs, M., Go, K., Neveu, D., et al.** (2012) Safety and immunogenicity of a pneumococcal histidine triad protein D vaccine candidate in adults. *Vaccine* **30**: 7455–7460.

**Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., and Whittam, T.S.** (1986) Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* **51**: 873–884.

**Seo, H.S., Minasov, G., Seepersaud, R., Doran, K.S., Dubrovskaya, I., Shuvalova, L., et al.** (2013) Characterization of fibrinogen binding by glycoproteins Srr1 and Srr2 of *Streptococcus agalactiae*. *J Biol Chem* **288**: 35982–35996.

**Shabayek, S., Bauer, R., Maurer, S., Mizaikoff, B., and Spellerberg, B.** (2016) A streptococcal NRAMP homologue is crucial for the survival of *Streptococcus agalactiae* under low pH conditions. *Mol Microbiol* **100**: 589–606.

**Shafeeq, S., Kloosterman, T.G., and Kuipers, O.P.** (2011) Transcriptional response of *Streptococcus pneumoniae* to Zn<sup>2+</sup> limitation and the repressor/activator function of AdcR. *Met Integr Biometal Sci* **3**: 609–618.

**Shao, Z., Pan, X., Li, X., Liu, W., Han, M., Wang, C., et al.** (2011) HtpS, a novel immunogenic cell surface-exposed protein of *Streptococcus suis*, confers protection in mice. *FEMS Microbiol Lett* **314**: 174–182.



- Shao, Z.-Q., Zhang, Y.-M., Pan, X.-Z., Wang, B., and Chen, J.-Q.** (2013) Insight into the evolution of the histidine triad protein (HTP) family in *Streptococcus*. *PloS One* **8**: e60116.
- Sheen, T.R., Jimenez, A., Wang, N.-Y., Banerjee, A., Sorge, N.M. van, and Doran, K.S.** (2011) Serine-rich repeat proteins and pili promote *Streptococcus agalactiae* colonization of the vaginal tract. *J Bacteriol* **193**: 6834–6842.
- Shin, J.-H., and Helmann, J.D.** (2016) Molecular logic of the Zur-regulated zinc deprivation response in *Bacillus subtilis*. *Nat Commun* **7**: 12612.
- Shin, J.-H., Jung, H.J., An, Y.J., Cho, Y.-B., Cha, S.-S., and Roe, J.-H.** (2011) Graded expression of zinc-responsive genes through two regulatory zinc-binding sites in Zur. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 5045–5050.
- Singh, V.K., Xiong, A., Usgaard, T.R., Chakrabarti, S., Deora, R., Misra, T.K., and Jayaswal, R.K.** (1999) ZntR is an autoregulatory protein and negatively regulates the chromosomal zinc resistance operon *znt* of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **33**: 200–207.
- Six, A., Bellais, S., Bouaboud, A., Fouet, A., Gabriel, C., Tazi, A., et al.** (2015) Srr2, a multifaceted adhesin expressed by ST-17 hypervirulent Group B *Streptococcus* involved in binding to both fibrinogen and plasminogen. *Mol Microbiol* **97**: 1209–1222.
- Six, A., Joubrel, C., Tazi, A., and Poyart, C.** (2014) Maternal and perinatal infections to *Streptococcus agalactiae*. *Presse Medicale Paris Fr* **1983** **43**: 706–714.
- Skoff, T.H., Farley, M.M., Petit, S., Craig, A.S., Schaffner, W., Gershman, K., et al.** (2009) Increasing burden of invasive group B streptococcal disease in nonpregnant adults, 1990–2007. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **49**: 85–92.
- Slotved, H.-C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., and Gilbert, G.L.** (2007) Serotype IX, a Proposed New *Streptococcus agalactiae* Serotype. *J Clin Microbiol* **45**: 2929–2936.
- Smith, A.T., Barupala, D., Stemmler, T.L., and Rosenzweig, A.C.** (2015) A new metal binding domain involved in cadmium, cobalt and zinc transport. *Nat Chem Biol* **11**: 678–684.
- Smith, A.T., Ross, M.O., Hoffman, B.M., and Rosenzweig, A.C.** (2017) Metal Selectivity of a Cd-, Co-, and Zn-Transporting P1B-type ATPase. *Biochemistry (Mosc)* **56**: 85–95.
- Smith, P.C., Karpowich, N., Millen, L., Moody, J.E., Rosen, J., Thomas, P.J., and Hunt, J.F.** (2002) ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell* **10**: 139–149.
- Soriani, M., Santi, I., Taddei, A., Rappuoli, R., Grandi, G., and Telford, J.L.** (2006) Group B *Streptococcus* crosses human epithelial cells by a paracellular route. *J Infect Dis* **193**: 241–250.
- Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-Heynemann, J., and Lütticken, R.** (2002) *rgf* encodes a novel two-component signal transduction system of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* **70**: 2434–2440.



**Spellerberg, B., Rozdzinski, E., Martin, S., Weber-Heynemann, J., Schnitzler, N., Lütticken, R., and Podbielski, A.** (1999) Lmb, a protein with similarities to the LraI adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect Immun* **67**: 871–878.

**Stafford, S.L., Bokil, N.J., Achard, M.E.S., Kapetanovic, R., Schembri, M.A., McEwan, A.G., and Sweet, M.J.** (2013) Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep* **33**.

**Stork, M., Bos, M.P., Jongerius, I., Kok, N. de, Schilders, I., Weynants, V.E., et al.** (2010) An outer membrane receptor of *Neisseria meningitidis* involved in zinc acquisition with vaccine potential. *PLoS Pathog* **6**: e1000969.

**Stringer, J.** (1980) The development of a phage-typing system for group-B streptococci. *J Med Microbiol* **13**: 133–143.

**Sun, X., Xiao, C., Ge, R., Yin, X., Li, H., Li, N., et al.** (2011) Putative copper- and zinc-binding motifs in *Streptococcus pneumoniae* identified by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Proteomics* **11**: 3288–3298.

**Tamura, G.S., Kuypers, J.M., Smith, S., Raff, H., and Rubens, C.E.** (1994) Adherence of group B streptococci to cultured epithelial cells: roles of environmental factors and bacterial surface components. *Infect Immun* **62**: 2450–2458.

**Tan, S., Lin, Y., Foo, K., Koh, H.F., Tow, C., Zhang, Y., et al.** (2016) Group B Streptococcus Serotype III Sequence Type 283 Bacteremia Associated with Consumption of Raw Fish, Singapore. *Emerg Infect Dis* **22**: 1970–1973.

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

**Tazi, A., Morand, P.C., Réglier-Poupet, H., Dmytruk, N., Billoët, A., Antona, D., et al.** (2011) Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007–2010). *Clin Microbiol Infect* **17**: 1587–1589.

**Tedde, V., Rosini, R., and Galeotti, C.L.** (2016) Zn<sup>2+</sup> Uptake in *Streptococcus pyogenes*: Characterization of *adcA* and *lmb* Null Mutants. *PloS One* **11**: e0152835.

**Tenenbaum, T., Bloier, C., Adam, R., Reinscheid, D.J., and Schroten, H.** (2005) Adherence to and Invasion of Human Brain Microvascular Endothelial Cells Are Promoted by Fibrinogen-Binding Protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun* **73**: 4404–4409.

**Tenenbaum, T., Spellerberg, B., Adam, R., Vogel, M., Kim, K.S., and Schroten, H.** (2007) *Streptococcus agalactiae* invasion of human brain microvascular endothelial cells is promoted by the laminin-binding protein Lmb. *Microbes Infect Inst Pasteur* **9**: 714–720.

**Tenhagen, B.-A., Köster, G., Wallmann, J., and Heuwieser, W.** (2006) Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *J Dairy Sci* **89**: 2542–2551.



**Terao, Y., Kawabata, S., Kunitomo, E., Nakagawa, I., and Hamada, S.** (2002) Novel laminin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, Lbp, is involved in adhesion to epithelial cells. *Infect Immun* **70**: 993–997.

**Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M.J., Donati, C., Medini, D., Ward, N.L., et al.** (2005) Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome.” *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 13950–13955.

**Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M.J., Eisen, J.A., Peterson, S., Wessels, M.R., et al.** (2002) Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12391–12396.

**Thompson, T., and Facklam, R.** (1997) Cross-reactions of reagents from streptococcal grouping kits with *Streptococcus porcinus*. *J Clin Microbiol* **35**: 1885–1886.

**Tomii, K., and Kanehisa, M.** (1998) A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Res* **8**: 1048–1059.

**Verani, J.R., McGee, L., Schrag, S.J., and Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (2010) Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep Cent Dis Control* **59**: 1–36.

**Vollmer, W., and Tomasz, A.** (2000) The *pgdA* gene encodes for a peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **275**: 20496–20501.

**Vornhagen, J., Adams Waldorf, K.M., and Rajagopal, L.** (2017) Perinatal Group B Streptococcal Infections: Virulence Factors, Immunity, and Prevention Strategies. *Trends Microbiol* **25**:919-931.

**Vornhagen, J., Quach, P., Boldenow, E., Merillat, S., Whidbey, C., Ngo, L.Y., et al.** (2016) Bacterial Hyaluronidase Promotes Ascending GBS Infection and Preterm Birth. *mBio* **7**: e00781-16.

**Waldemarsson, J., Areschoug, T., Lindahl, G., and Johnsson, E.** (2006) The Streptococcal Blr and Slr Proteins Define a Family of Surface Proteins with Leucine-Rich Repeats: Camouflaging by Other Surface Structures. *J Bacteriol* **188**: 378–388.

**Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J.** (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945–951.

**Walport, M.J.** (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* **344**: 1058–1066.

**Wang, N.-Y., Patras, K.A., Seo, H.S., Cavaco, C.K., Rösler, B., Neely, M.N., et al.** (2014) Group B Streptococcal Serine-Rich Repeat Proteins Promote Interaction With Fibrinogen and Vaginal Colonization. *J Infect Dis* **210**: 982–991.

**Weindling, A.M., Hawkins, J.M., Coombes, M.A., and Stringer, J.** (1981) Colonisation of babies and their families by group B streptococci. *Br Med J Clin Res Ed* **283**: 1503–1505.



**Welsh, I.R., and Spitznagel, J.K.** (1971) Distribution of lysosomal enzymes, cationic proteins, and bactericidal substances in subcellular fractions of human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **4**: 97–102.

**Welsh, J., and McClelland, M.** (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* **18**: 7213–7218.

**Weston, B.F., Brenot, A., and Caparon, M.G.** (2009) The metal homeostasis protein, Lsp, of *Streptococcus pyogenes* is necessary for acquisition of zinc and virulence. *Infect Immun* **77**: 2840–2848.

**Whidbey, C., Harrell, M.I., Burnside, K., Ngo, L., Becraft, A.K., Iyer, L.M., et al.** (2013) A hemolytic pigment of Group B Streptococcus allows bacterial penetration of human placenta. *J Exp Med* **210**: 1265–1281.

**Whittaker, P.** (1998) Iron and zinc interactions in humans. *Am J Clin Nutr* **68**: 442S–446S.

**Wilkens, S.** (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime Rep* **7**: 14.

**Wilkinson, S.P., and Grove, A.** (2006) Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr Issues Mol Biol* **8**: 51–62.

**Winram, S.B., Jonas, M., Chi, E., and Rubens, C.E.** (1998) Characterization of group B streptococcal invasion of human chorion and amnion epithelial cells In vitro. *Infect Immun* **66**: 4932–4941.

**Wizemann, T.M., Heinrichs, J.H., Adamou, J.E., Erwin, A.L., Kunsch, C., Choi, G.H., et al.** (2001) Use of a whole genome approach to identify vaccine molecules affording protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Infect Immun* **69**: 1593–1598.

**Xiong, A., and Jayaswal, R.K.** (1998) Molecular characterization of a chromosomal determinant conferring resistance to zinc and cobalt ions in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **180**: 4024–4029.

**Xu, F.F., and Imlay, J.A.** (2012) Silver(I), mercury(II), cadmium(II), and zinc(II) target exposed enzymic iron-sulfur clusters when they toxify *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3614–3621.

**Yamamoto, Y., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., Gruss, A., and Gaudu, P.** (2006) Roles of environmental heme, and menaquinone, in *Streptococcus agalactiae*. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **19**: 205–210.

**Yatsunyk, L.A., Easton, J.A., Kim, L.R., Sugarbaker, S.A., Bennett, B., Breece, R.M., et al.** (2008) Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem JBIC Publ Soc Biol Inorg Chem* **13**: 271–288.

**Yildirim, A.O., Lämmle, C., and Weiss, R.** (2002) Identification and characterization of *Streptococcus agalactiae* isolated from horses. *Vet Microbiol* **85**: 31–35.

**Yow, M.D., Leeds, L.J., Thompson, P.K., Mason, E.O., Clark, D.J., and Beachler, C.W.** (1980) The natural history of group B streptococcal colonization in the pregnant woman and her offspring. I. Colonization studies. *Am J Obstet Gynecol* **137**: 34–38.



**Zalewski, P.D., Truong-Tran, A.Q., Grosser, D., Jayaram, L., Murgia, C., and Ruffin, R.E.** (2005) Zinc metabolism in airway epithelium and airway inflammation: basic mechanisms and clinical targets. A review. *Pharmacol Ther* **105**: 127–149.

**Zhang, Y., Masi, A.W., Barniak, V., Mountzouros, K., Hostetter, M.K., and Green, B.A.** (2001) Recombinant PhpA protein, a unique histidine motif-containing protein from *Streptococcus pneumoniae*, protects mice against intranasal pneumococcal challenge. *Infect Immun* **69**: 3827–3836.



# **ANNEXES**



## Communications affichées

**Moulin P**, Cano C, Mereghetti L, Rosenau A, Hiron A. Etude fonctionnelle des protéines de type « Lmb » chez *Streptococcus agalactiae*. Poster présenté au 27<sup>e</sup> colloque Biotechnocentre. Seillac, 9-10 Octobre 2014.

**Moulin P**, Cano C, Mereghetti L, Hiron A, Rosenau A. Zinc uptake by the three Lmb proteins of *Streptococcus agalactiae*. Poster affiché au XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Buenos Aires, 9-12 Novembre 2014. Poster présenté à la Journée de la Recherche Tours-Poitiers-Limoges. Tours, 5 Décembre 2014.

**Moulin P**, Cano C, Mereghetti L, Rosenau A, Hiron A. Characterization of the Lmb proteins of *Streptococcus agalactiae*. Poster présenté au 28<sup>e</sup> colloque Biotechnocentre. Seillac, 15-16 Octobre 2015. Poster affiché à la Journée de la Recherche Tours-Poitiers-Limoges. Limoges, 15 Janvier 2016.

**Moulin P**, Rosenau A, Mereghetti L, Hiron A. 2017. Characterization of a zinc ABC transporter of *Streptococcus agalactiae*. Poster présenté au congrès de la « Federation of European Microbiological Societies » FEMS. Valencia, 9-13 Juillet 2017.

## Communication orale

**Moulin P**, Cano C, Mereghetti L, Rosenau A, Hiron A. Characterization of a zinc ABC transporter of *Streptococcus agalactiae*. Communication orale au 29<sup>e</sup> colloque Biotechnocentre. Seillac, 13-14 Octobre 2016.



# Etude fonctionnelle des protéines de type « Lmb » chez *Streptococcus agalactiae*



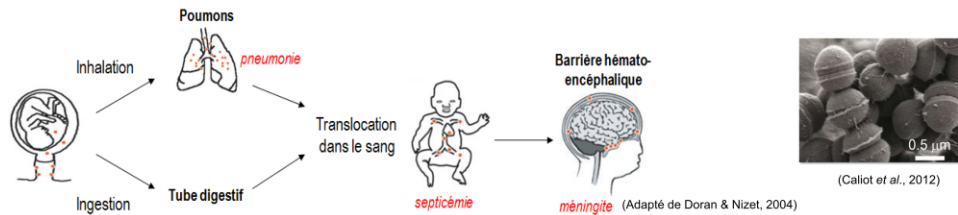
Pauline Moulin<sup>1,2\*</sup>, Laurent Mereghetti<sup>1,2</sup>, Agnès Rosenau<sup>1,2</sup>, Aurélia Hiron<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université François Rabelais de Tours, UMR 1282 ISP, Equipe 5 "Bactéries et Risque Materno-Fœtal", 37200 Tours

<sup>2</sup> INRA, UMR 1282 ISP, Equipe 5 "Bactéries et Risque Materno-Fœtal", 37380 Nouzilly

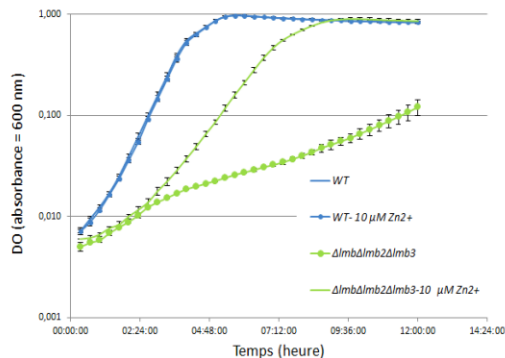
## Introduction

*Streptococcus agalactiae* est une bactérie à Gram + commensale des tracts génital et intestinal de l'adulte en bonne santé qui peut être responsable d'infections invasives chez les nouveau-nés, les personnes âgées ou immunodéprimées.



Parmi les facteurs de virulence de la bactérie, nous nous intéressons plus particulièrement à la lipoprotéine Lmb (laminin binding) dont les rôles décrits actuellement sont la liaison à la laminine humaine ainsi que l'invasion *in vitro* des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. Par analogie de séquence, cette protéine a été classée dans la famille des ABC transporteurs de zinc (métal essentiel au fonctionnement de nombreuses métallo-enzymes et aux facteurs de transcription à motifs en doigts de zinc) mais son rôle dans l'utilisation du zinc reste encore à démontrer. Cette protéine possède également deux homologues, Lmb2 et Lmb3 dont les rôles sont à définir. Afin d'étudier l'implication des diverses protéines Lmb dans le transport du zinc et la liaison à la laminine, la construction de simples, doubles et triple mutants pour les gènes *lmb*, *lmb2* et *lmb3* a été réalisée et les propriétés des mutants ont été comparées.

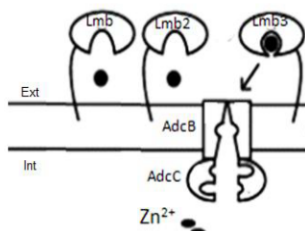
## Les protéines Lmb et le transport du zinc



Croissance des souches WT et du triple mutant pour les gènes *lmb*, *lmb2* et *lmb3* en milieu chimiquement défini carencé ou non en zinc

En absence de zinc, seule la souche mutée à la fois pour les gènes *lmb*, *lmb2* et *lmb3* montre un retard de croissance restauré par l'ajout de 10 µM de zinc :

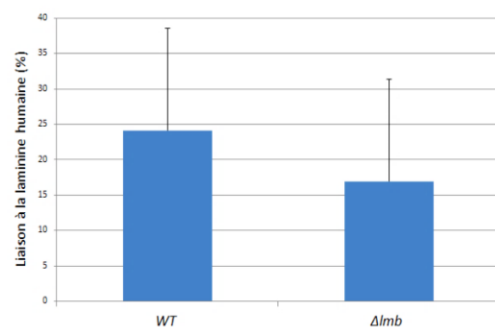
- Les protéines Lmb sont importantes pour le développement de la bactérie dans un milieu carencé en zinc.
- Redondance fonctionnelle des protéines Lmb dans l'utilisation de zinc.



Modèle proposé de l'ABC transporteur de zinc de *S. agalactiae*

Les protéines Lmb, Lmb2 et Lmb3 fixent le zinc du milieu extérieur et le transmettent au translocon composé des protéines AdcB et AdcC qui vont permettre l'entrée du zinc à l'intérieur de la bactérie.

## Les protéines Lmb et la liaison à la laminine



Liaison des souches WT et *Δlmb* à la laminine humaine immobilisée

Aucune différence significative de liaison à la laminine n'est observée entre les souches WT et *Δlmb* de *S. agalactiae* :

- Résultats à confirmer.
- Test de liaison du triple mutant *ΔlmbΔlmb2Δlmb3* à la laminine.
- Test de complémentarité hétérologue chez *Lactococcus lactis*, bactérie naturellement non adhérente.

## Conclusion et Perspectives

Les tests de croissance en milieu chimiquement défini carencé en zinc des mutants de *S. agalactiae* ont permis de montrer l'implication et la redondance fonctionnelle des protéines Lmb dans l'utilisation du zinc. En perspective les tests suivant pourraient être réalisés :

- Tests de complémentarité.
- Tests de croissance en milieux biologiques (sang, LCR, liquide amniotique...) où la bactérie est retrouvée lors d'infection à *S. agalactiae*.
- Tests d'adhérence à différents composants de la lame basale (fibrinogène, fibronectine...), ainsi qu'à diverses lignées cellulaires (cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique, cellules d'épithélium vaginal) proches des cellules naturellement infectées.



## Annexe 2. Poster pour le congrès Lancefield et la Journée de la Recherche Tours-Poitiers-Limoges (2014)

P 208



### ZINC UPTAKE BY THE THREE LMB PROTEINS OF *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Pauline MOULIN<sup>1</sup>, Camille CANO<sup>1</sup>, Laurent MEREGHETTI<sup>1,2</sup>, Aurélie HIRON<sup>1</sup>, Agnès ROSENAU<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Université François Rabelais de Tours, UMR 1282 ISP, Bactéries et Risque Materno-Fœtal, Tours, France

<sup>2</sup> CHRU de Tours, Service de Bactériologie-Virologie, Tours, France

<sup>3</sup> CHRU de Tours, Service de Bactériologie et Hygiène Hospitalière, Tours, France



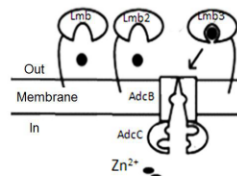
#### Introduction

➤ *S. agalactiae*, a commensal bacterium of the human digestive and genital tracts, is the leading cause of invasive infections in neonates and an emerging pathogen in the immunocompromised and the elderly adults.

➤ Lmb is a lipoprotein that :

- Binds to human laminin (Spellerberg *et al.*, 1999).
- Mediates, *in vitro*, the bacterial invasion of human brain microvascular endothelial cells (Tenenbaum *et al.*, 2007).
- Belongs to the zinc ABC transporters family (Ragunathan *et al.*, 2009).
- Has two homologous proteins named Lmb2 and Lmb3 not yet studied.

➤ AdcR is a transcriptional regulator of the *adcRCBA* operon in zinc limitation in *Streptococcus pneumoniae* (Shafeeq *et al.*, 2011).



Model proposed for the ABC transporter of *S. agalactiae*

In association with a nucleotide-binding domain protein and a transmembrane protein, named AdcB, the three Lmb zinc-binding proteins form an ABC transporter that mediates extracellular metal import.

#### Objectives

To study the role of the three Lmb proteins in zinc transport.

#### Methods

➤ *In silico* search of sequence homology in *S. agalactiae* A909 genome → Identification of *adcR* (SAK\_0217), *adcC* (SAK\_0218), *adcB* (SAK\_0219) homologs and of three putative zinc-binding proteins genes *lmb* (SAK\_1319), *lmb2* (SAK\_1898) and *lmb3* (SAK\_0685).

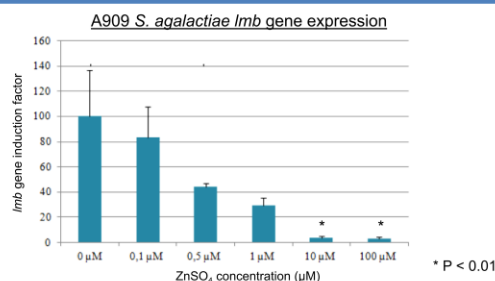
➤ Construction of deletion mutants by double crossing over technique using the thermosensitive vector pG1 and without resistance cassette insertion → Simple, double, triple, quadruple mutants for the *lmb*, *lmb2*, *lmb3*, *adcB*, *adcC* and *adcR* genes.

➤ *lac-Z* transcriptional fusion using the pTCV-*lac* vector in mid-log growth phase in a chemically defined medium with various zinc concentrations → Link between *lmb*, *lmb2* and *lmb3* gene expression and zinc metabolism.

➤ A909 WT and mutants growth in zinc-deficient medium → Determination of Lmb proteins role in zinc uptake.

#### Results

##### 1) The three Lmb proteins are negatively repressed by zinc



The value of the *lmb* gene induction factor was obtained by β-galactosidase assay using the reference value (100) obtained for the culture without ZnSO<sub>4</sub>.

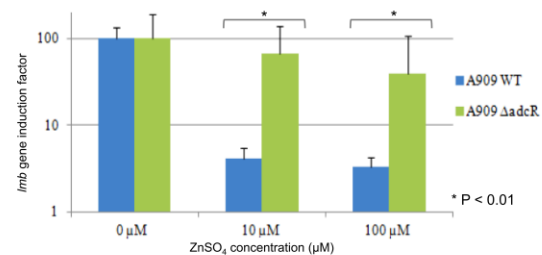
➤ The *lmb* gene expression is significantly repressed ( $P < 0.01$ ) when the medium contains more than 10 µM of zinc.

➤ The *lmb2* and *lmb3* genes show a similar repression (data not shown).

➤ The *lmb*, *lmb2* and *lmb3* repression is zinc specific → *lmb*, *lmb2* and *lmb3* expression is not modified by addition of 0.5 to 100 µM of manganese, copper or cobalt (data not shown).

##### 2) The three Lmb proteins are negatively regulated by AdcR

A909 *S. agalactiae* *lmb* gene expression



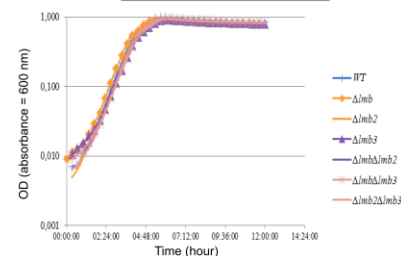
The value of the *lmb* gene induction factor was obtained by β-galactosidase assay using the reference value (100) obtained for the culture without ZnSO<sub>4</sub>.

➤ In the presence of a zinc sufficient amount, the *lmb* gene repression occurs by the AdcR regulator that controls zinc metabolism in Gram-positive bacteria.

➤ Similar results are observed for *lmb2* and *lmb3* genes (data not shown).

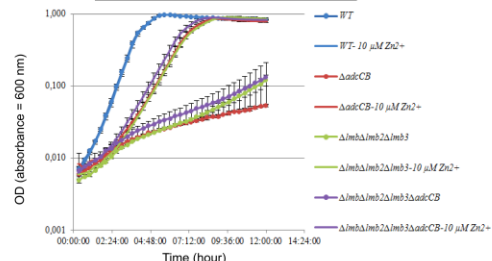
##### 3) The three Lmb proteins have overlapping functionality concerning *in vitro* zinc uptake

Growth of A909 WT and mutants of *S. agalactiae* in chemically defined medium without zinc



➤ The growth of the simple and double mutants for the *lmb*, *lmb2* and *lmb3* genes is not affected by zinc deficiency.

Growth of A909 WT and mutants of *S. agalactiae* in chemically defined medium with or without zinc



➤ In zinc-deficient medium, the *ΔlmbΔlmb2Δlmb3* triple mutant displays an important delay of growth that is mostly recovered after zinc supplementation → The three Lmb proteins are functionally redundant in zinc uptake.

➤ Similar results are observed for the *ΔadcCB*, and the *ΔlmbΔlmb2Δlmb3ΔadcCB* mutants.

#### Conclusion and Perspectives

➤ The three Lmb proteins are negatively regulated by AdcR protein and have overlapping functionality concerning *in vitro* zinc uptake.

➤ Quantitative PCR will be used to determine if deletion of one or two of the Lmb-coding genes is balanced by surexpression of the remaining *lmb* gene(s).

➤ The link between laminin binding and zinc uptake will be explored, and the respective role of the three Lmb proteins will be determined.



## Annexe 3. Poster pour le congrès Biotechnocentre (2015) et la Journée de la Recherche Tours-Poitiers-Limoges (2016)



### Characterization of the Lmb proteins of *Streptococcus agalactiae*



Pauline Moulin<sup>1,2\*</sup>, Camille Cano<sup>1,2</sup>, Laurent Mereghetti<sup>1,2</sup>, Agnès Rosenau<sup>1,2</sup>, Aurélia Hiron<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université François Rabelais de Tours, UMR 1282 ISP, Equipe 5 "Bactéries et Risque Materno-Fœtal", 37200 Tours

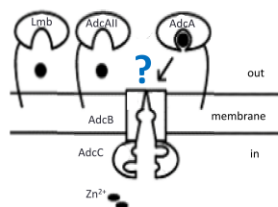
<sup>2</sup> INRA, UMR 1282 ISP, Equipe 5 "Bactéries et Risque Materno-Fœtal", 37380 Nouzilly

#### Introduction

*Streptococcus agalactiae* is a Gram positive bacterium. This commensal of the human digestive and genital tracts is the leading cause of invasive infections in neonates and an emerging pathogen in the immunocompromised and the elderly adults. Among the virulence factor of this bacterium we are particularly interested in the Lmb (Laminin binding) protein. By sequenced analogy the Lmb protein is classified in the zinc ABC transporter family and *in silico* search on *S. agalactiae* sequenced genomes revealed the presence of two unknown homologs we named AdcA and AdcAll.

#### Objectives

The objectives of the study are to define the role of the Lmb, AdcA and AdcAll proteins in zinc transport and to explain their redundancy in *S. agalactiae* A909 strain.

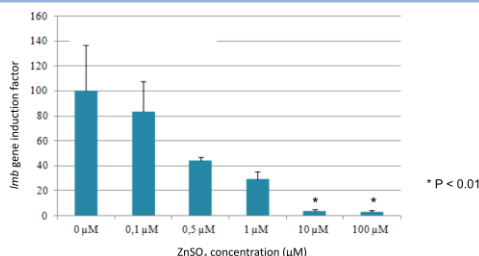


Model proposed for the ABC transporter of *S. agalactiae*

In association with a nucleotide-binding domain protein and a transmembrane protein, named AdcCB, the three Lmb zinc-binding proteins form an ABC transporter that mediates extracellular zinc import.

#### Results

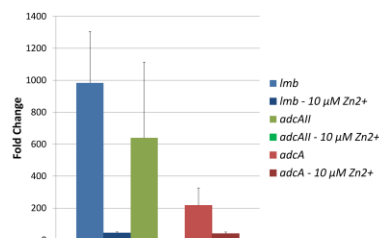
##### The *lmb*, *adcAll* and *adcA* genes are negatively repressed by zinc



##### A909 *S. agalactiae* *lmb* gene expression

The *lmb* gene expression was measured by β-galactosidase assay.

➤ The *lmb* gene expression is significantly repressed ( $P < 0.01$ ) when the medium contains more than 10 μM of zinc.



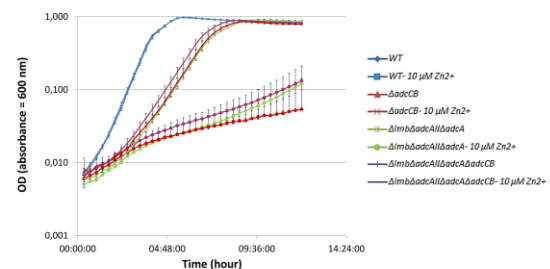
##### A909 *S. agalactiae* *lmb*, *adcA* and *adcAll* gene expression

The value of the *lmb*, *adcA* and *adcAll* fold change was obtained by qPCR.

➤ As the *lmb* gene, the *adcA* and *adcAll* genes expression is repressed by zinc.

➤ The *lmb*, *adcA* and *adcAll* repression is zinc specific → *lmb*, *adcA* and *adcAll* expression is not modified by addition of 0.5 to 100 μM of manganese, copper or cobalt (data not shown).

##### The three Lmb proteins are redundant for zinc uptake



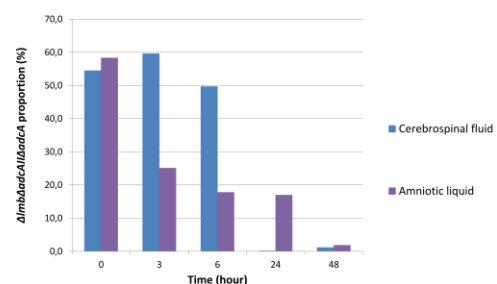
##### Growth of A909 WT and mutants of *S. agalactiae* in chemically defined medium with or without zinc

➤ The growth of the simple and double mutants for the *lmb*, *adcA* and *adcAll* genes is not affected by zinc deficiency.

➤ In zinc-deficient medium, the  $\Delta lmb \Delta adcAll \Delta adcA$  mutant displays an important delay of growth that is mostly recovered after zinc supplementation.

➤ Similar results are observed for the  $\Delta adcCB$ , and the  $\Delta lmb \Delta adcAll \Delta adcA \Delta adcCB$  mutants.

##### The three Lmb proteins are important to survive in biological media



##### A909 WT and $\Delta lmb \Delta adcAll \Delta adcA$ competition assay in biological media

The WT and the triple mutant of *S. agalactiae* were cultured together in the same biological medium. The figure presents the proportion of the triple mutant strain.

➤ The  $\Delta lmb \Delta adcAll \Delta adcA$  mutant has a disadvantage for surviving in amniotic liquid and cerebrospinal fluid where the bacterium is found during infection.

#### Conclusion

In this study we have shown that the three *lmb* genes are specifically regulated by zinc and that the three Lmb proteins have a redundant role in zinc uptake. Future *in vivo* experiments will permit us to confirm the phenotypes observed in biological media and to conclude on the potential role of the zinc ABC transporter in *S. agalactiae* virulence.

\* PhD funding by the Région Centre



## Annexe 4. Poster pour le congrès FEMS (2017)



# Characterization of a zinc ABC transporter of *Streptococcus agalactiae*



Pauline Moulin<sup>1\*</sup>, Agnès Rosenau<sup>1,2</sup>, Laurent Mereghetti<sup>1,3</sup>, Aurélia Hiron<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR 1282 Université de Tours/INRA - ISP, Bactéries et Risque Materno-Fœtal, Tours, France

<sup>2</sup>Hôpital Trousseau-CHRU de Tours, Service de Bactériologie et Hygiène Hospitalière, Tours, France

<sup>3</sup>Hôpital Bretonneau-CHRU de Tours, Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène Hospitalière, Tours, France



## Introduction

*Streptococcus agalactiae*, a commensal of the human digestive and genital tracts, is the leading cause of invasive infections in neonates with a mortality rate of 10%. Usually the bacterium is transmitted from mother to newborns by ingestion or inhalation of contaminated amniotic fluid that can lead to pneumonia, septicemia or meningitis.

To colonize different niches and to cause infection, the bacterium must develop efficient systems to import essential nutrients like transition metals from the surrounding environment. Among them, zinc is an essential trace metal ion for most microorganisms as it is a cofactor of numerous metalloenzymes or transcriptional regulators. In *Streptococcus pneumoniae* a zinc ABC-transporter was well characterized and has been shown to be essential for the virulence of the bacterium.

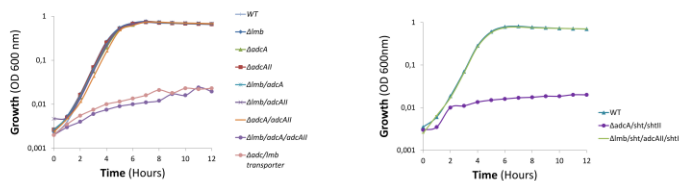
## Objectives

To study the impact of zinc on bacterial metabolism and the role of the Adc/Lmb transporter in *S. agalactiae*

## Results

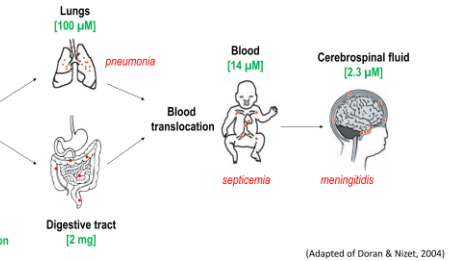
### Role of the Adc/Lmb transporter proteins in zinc acquisition

Growth of the A909 WT and mutants strains in chemically defined medium with zinc restriction



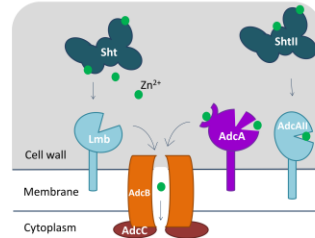
- The Lmb, AdcA and AdcAll proteins are redundant as zinc suppliers
- The Adc/Lmb transporter is essential for bacterial growth in zinc-restricted environment

- The Sht and ShtII proteins are essential zinc suppliers for the Lmb and AdcAll proteins



(Adapted of Doran & Nizet, 2004)

Schema of the zinc ABC transporter of *S. agalactiae*

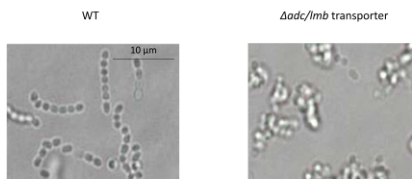


Zinc extracellular import in *S. agalactiae* is mediated by an ABC transporter composed of :

- Sht and ShtII : secreted proteins helping Lmb and AdcAll in zinc acquisition
- Lmb, AdcA and AdcAll : zinc importers anchored to the membrane
- AdcB : permease ; AdcC : ATPase

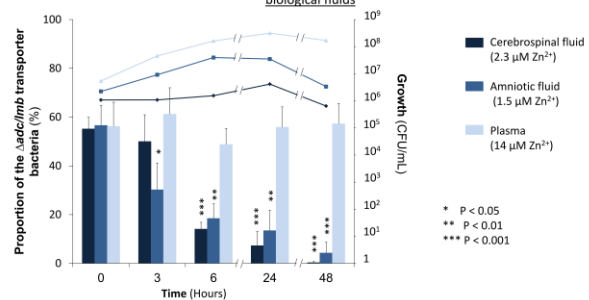
### Importance of the Adc/Lmb transporter in zinc-restricted environments

A909 WT and  $\Delta$ adc/lmb transporter morphology in chemically defined medium with zinc restriction



- The absence of the Adc/Lmb transporter affects cell morphology
- This abnormal cell morphology could be related to mis-metallation of key enzyme(s) involved in cell division

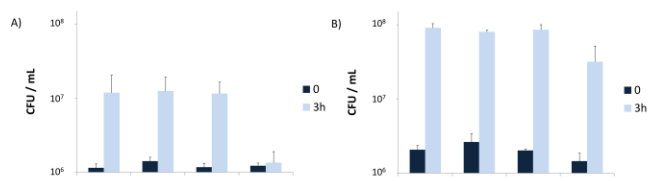
A909 WT and  $\Delta$ adc/lmb transporter competition assay in human biological fluids



- The Adc/Lmb transporter supports growth and survival of *S. agalactiae* in two human biological fluids

## Conclusion and Perspectives

A909 WT and mutant strains growth in whole human blood (A) and in decomplexed whole human blood (B)



- The Sht and ShtII proteins have a redundant role in the resistance of complement system

These results showed that zinc is essential for normal morphology and growth of *S. agalactiae*. In zinc-restricted environments including human biological fluids, zinc transport is mainly due to the Adc/Lmb transporter which is composed of three redundant proteins in zinc binding (Lmb, AdcA and AdcAll).

In other part we are studying a second role described of the Sht protein in the resistance to complement system. Experiments to determine if there is a link between the Sht and ShtII proteins as zinc suppliers and in the resistance to complement system are ongoing.

\*Pauline Moulin is a predoctoral fellow of the INRA (ISP) / Centre Val de Loire (France)





# Caractérisation du transporteur de zinc Adc/Lmb de *Streptococcus agalactiae*

## Résumé

Dans cette étude, le transporteur ABC de zinc de *Streptococcus agalactiae*, première cause d'infections materno-fœtale en France, a été caractérisé. Nous avons montré que ce transporteur se compose, du complexe perméase-ATPase AdcCB, associé à trois protéines membranaires Lmb, AdcA et AdcAII redondantes dans la fixation de zinc. Ce transporteur comporte également deux protéines Sht et ShtII, retrouvées au niveau de la paroi, et nécessaires aux protéines Lmb et AdcAII pour la capture de zinc. L'absence d'un transporteur fonctionnel, par la triple délétion des gènes *lmb*, *adcA* et *adcAII* ou du complexe *adcCB*, a révélé une inhibition de la croissance et une perturbation de la division de la bactérie lorsqu'elle se trouve dans un environnement carencé en zinc. De plus, nous avons montré que ce transporteur de zinc participe à la survie de la bactérie en milieux biologiques humains, comme le liquide amniotique ou le LCR, où la bactérie est retrouvée lors d'infections, suggérant l'importance du transporteur lors du processus infectieux. Ces résultats ont mis en évidence, pour la première fois, que le zinc assure des fonctions biologiques vitales pour *S. agalactiae* et que, dans des conditions de forte carence en zinc, le transporteur Adc/Lmb représente le principal système d'acquisition de zinc de la bactérie.

**Mots-clés :** *Streptococcus agalactiae*, transporteur ABC, homéostasie du zinc, protéine fixatrice de métaux

## Abstract

In this study, the zinc-ABC transporter of *Streptococcus agalactiae*, the first cause of materno-foetal infections in France, was characterized. We showed that this transporter is composed of an AdcCB permease-ATPase complex in association with three membrane-associated proteins Lmb, AdcA and AdcAII, which are redundant in zinc-binding. This transporter also possesses two proteins Sht and ShtII, which are associated to the cell wall, and that are necessary for the Lmb and AdcAII proteins for zinc capture. The absence of a functional transporter, by the triple deletion of the *lmb*, *adcA* and *adcAII* genes or the *adcCB* complex, revealed a growth inhibition and a disruption of the division of the bacterium when it is in a zinc-restricted environment. Furthermore, we showed that the zinc-ABC transporter contributes to the survival of the bacterium in human biological fluids, as the amniotic fluid or the cerebrospinal fluid, where the bacterium is found during infections, suggesting the importance of the transporter during the infectious process. These results highlighted, for the first time, that zinc has biologically vital functions in *S. agalactiae* and that, under high zinc deficiency conditions, the Adc/Lmb transporter is the main zinc acquisition system of the bacterium.

**Keywords :** *Streptococcus agalactiae*, ABC transporter, zinc homeostasis, metal-binding protein