

# Identification of new hosts-dependants factors in Bacillus cereus Molecular and functional characterization of IlsA, a surface protein essential for iron acquisition during infection

Nadine Daou

## ▶ To cite this version:

Nadine Daou. Identification of new hosts-dependants factors in Bacillus cereus Molecular and functional characterization of IlsA, a surface protein essential for iron acquisition during infection. Life Sciences [q-bio]. AgroParisTech, 2008. English. NNT: 2008AGPT0068. pastel-00004926

# HAL Id: pastel-00004926 https://pastel.hal.science/pastel-00004926

Submitted on 23 Mar 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.







# THÈSE

pour obtenir le grade de

## Docteur

de

## l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), l'Université Saint Joseph de Beyrouth (USJ)

Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

# Nadine DAOU

# Le 7 novembre 2008

Identification de nouveaux facteurs hôtes-dépendants chez *Bacillus cereus* Caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'IIsA, une protéine de surface essentielle pour l'acquisition du fer au cours de l'infection

> Directeurs de thèse : Christina NIELSEN-LEROUX (France) Mireille KALLASSY AWAD (Liban)

Travail réalisé en cotutelle : INRA, Centre de Versailles-Grignon UR1249 Unité Génétique Microbienne et Environnement, F-78285 Guyancourt Laboratoire de Biotechnologie, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth B.P 11-514 Riad el Solh, Beyrouth 1107 2050, Liban

Devant le jury :

M. Didier LERECLUS, DR, INRA Mme Cécile WANDERSMAN, PR, Institut Pasteur Mme Soulaima CHAMAT, PR, Université Libanaise M. Richard MAROUN, PR associé, Université Saint-Joseph Mme Mireille KALLASSY, PR associé, Université Saint-Joseph Mme Christina NIELSEN-LEROUX, DR, INRA Président Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Examinateur

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







# THÈSE

pour obtenir le grade de

## Docteur

de

## l'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), l'Université Saint Joseph de Beyrouth (USJ)

Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

## Nadine DAOU

## Le 7 novembre 2008

Identification de nouveaux facteurs hôtes-dépendants chez *Bacillus cereus* Caractérisation moléculaire et fonctionnelle d'IIsA, une protéine de surface essentielle pour l'acquisition du fer au cours de l'infection

> Directeurs de thèse : Christina NIELSEN-LEROUX (France) Mireille KALLASSY AWAD (Liban)

Travail réalisé en cotutelle : INRA, Centre de Versailles-Grignon UR1249 Unité Génétique Microbienne et Environnement, F-78285 Guyancourt Laboratoire de Biotechnologie, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth B.P 11-514 Riad el Solh, Beyrouth 1107 2050, Liban

Devant le jury :

M. Didier LERECLUS, DR, INRA Mme Cécile WANDERSMAN, PR, Institut Pasteur Mme Soulaima CHAMAT, PR, Université Libanaise M. Richard MAROUN, PR associé, Université Saint-Joseph Mme Mireille KALLASSY, PR associé, Université Saint-Joseph Mme Christina NIELSEN-LEROUX, DR, INRA Président Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Examinateur

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

#### <u>Remerciements</u>

Je tiens tout d'abord à remercier Didier Lereclus de m'avoir accueillie au sein de son unité et d'avoir accepté de présider le jury. Je vous remercie également pour votre disponibilité et vos conseils précieux.

*J'exprime ma profonde reconnaissance à Mme. Cécile Wandersman, Mme. Soulaima Chamat et M. Richard Maroun d'avoir accepté de juger ce travail.* 

Un grand MERCI à toute l'équipe de la Minière (amis et collègues). Merci pour votre accueil chaleureux durant ces années. Merci pour l'ambiance très sympathique et familiale et pour l'entraide exceptionnelle. Merci aux anciens et aux présents avec qui j'ai partagé d'agréables moments. Merci à Seavly (la passionnée des Mezzés), à Céline (l'experte des westerns blot), à Thomas junior et senior (le Sicilien). Merci à Michel pour les discussions scientifiques et pour les nouilles le soir. Merci à Stéphane (Steph) de m'avoir appris que la précision en biologie moléculaire n'était pas utile (un peu d'ADN avec un peu d'enzyme et ça marche). Merci à Nathalie (Nath) et Catherine pour leur aide et leur énorme gentillesse. Merci à Christophe (notre chanteur) et Elise pour leurs coups de mains précieux et leur grande gentillesse. Merci à Fouping pour les discussions scientifiques et la cuisine chinoise. Merci à mes voisines de paillasse Agnès et Isabelle, pour leur bonne humeur et leur sourire. Merci à Vincent, Eugénie, Nalini, Elizabeth, la petite Isabelle, Josette et Ludovic. Un Merci du cœur, à mon Loran (loulou) qui a su me supporter pendant ces années ©.

Merci à Hélène Bierne et Jasmina Vidic pour leurs aides et leurs collaborations. Merci à Cécile Wandersman pour les conseils et les discussions enrichissantes qui m'ont beaucoup aidés.

J'exprime ma reconnaissance au doyen de la Faculté des Sciences, M. Toufic Rizk, ainsi qu'à tous les collègues, les responsables et les personnels. Je tiens à remercier particulièrement Eddy, toujours prêt à résoudre mes problèmes informatiques . Merci à Ziad pour sa compagnie au labo et son humour.

J'exprime ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à mon directeur de thèse Christina Nielsen Le-Roux, et codirecteur Mireille Kallassy, pour leurs gentillesses, leurs confiances et leurs soutiens pour la réalisation de ce projet.

Merci Christina pour être un chef et plus ;). Ton enthousiasme, ta disponibilité, ton optimisme, tes encouragements et ton sourire ont été un grand soulagement dans les moments les plus difficiles. Merci pour TOUT.

Merci à tous mes amis d'ici et de la France... Lara, Joëlle, Josiane, Nathalie, Nancy, Mira, Aurélie & Tangi, Caffy & Virginie. Merci à la famille Bouillaut (Annie et DD, papi et mamie) pour leur générosité et le leur gentillesse.

Enfin, Merci à ma famille... Un énorme Merci à mes parents, pour leurs soutiens, leurs encouragements et leurs patiences durant ces années de thèse et surtout ces derniers mois.

MERCI à TOUS !

Nadine

# Listes des figures

Figure 1 : Bacille et spore	Page 6
Figure 2 : Schéma de la régulation des facteurs de virulence chez <i>B. cereus</i>	Page 14
<b>Figure 3 :</b> Structure protéique de la transferrine, la lactoferrine et la ferritine humaine	Page 17
Figure 4 : Structure de l'hémoglobine humaine et de l'hème	Page 18
<b>Figure 5 :</b> Architecture de la paroi des bactéries à Gram négatif (A) et positif (B)	Page 23
<b>Figure 6 :</b> Schéma de l'acquisition du fer par l'intermédiaire des sidérophores chez les bactéries à Gram négatif (A) et positif (B)	Page 24
Figure 7 : Modèle d'acquisition de fer chez <i>S. aureus</i> basé sur les protéines de surface	Page 27
<b>Figure 8 :</b> Représentation schématique du locus <i>svpA-srtB</i> de <i>L. monocytogenes</i>	Page 28
<b>Figure 9 :</b> Structure chimique des deux sidérophores : la petrobactine et la bacillibactine	Page 29
Figure 10 : Représentation schématique du locus <i>isdC-srtB</i> de <i>B. anthracis</i>	Page 30
Figure 11 : Schéma du mode d'action du régulateur Fur	Page 32
Figure 12 : Infection et anatomie du modèle Galleria mellonella	Page 37
<b>Figure 13 :</b> Test de compétition entre l'hémoglobine et la ferritine vis-à-vis de IlsA	Page 46
<b>Figure 14 :</b> Test de cytotoxicité (A) et cinétique de croissance (B) de la souche sauvage <i>B. cereus</i> (histogramme en vert) et de la souche mutante <i>B. cereus</i> $\Delta ilsA$ (histogramme en jaune) chez les macrophages J774	Page 48
<b>Figure 15 :</b> Cinétique de croissance dans le sang total de porc de la souche sauvage <i>B. cereus</i> (histogramme en vert) et de la souche mutante <i>B. cereus</i> $\Delta ilsA$ (histogramme en jaune)	Page 48
<b>Figure 16 :</b> Cinétique de croissance dans le plasma sanguin de porc de la souche sauvage <i>B. cereus</i> (histogramme en vert) et de la souche mutante <i>B. cereus</i> $\Delta ilsA$ (histogramme en jaune)	Page 48
Figure 17 : Caractéristiques de la séquence protéique d'IlsB	Page 54
Figure 18 : Analyse de l'expression d' <i>ilsB</i> in vivo	Page 55
<b>Figure 19 :</b> Dosage de l'activité $\beta$ -galactosidase de la fusion p <i>ilsB</i> 'Z dans la souche <i>B. cereus</i> ATCC 14579	Page 55
<b>Figure 20 :</b> Capacité de formation de biofilm sur surface de verre de la souche sauvage <i>B. cereus</i> , des simples mutants <i>B. cereus</i> $\Delta ilsA$ et <i>B. cereus</i> $\Delta ilsB$ et du double mutant B. cereus $\Delta ilsA$ $\Delta ilsB$	Page 56
Figure 21 : Représentation schématique du locus isd chez B. cereus	Page 61
<b>Figure 22 :</b> Modèle représentant le rôle de IlsA dans l'acquisition du fer chez l'hôte	Page 64

# Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> Principaux caractères communs et distinctifs des espècesdu groupe B. cereus sensu lato	Page 7
Tableau II : Liste des gènes régulés par PlcR	Page 14 Page 15
<b>Tableau III :</b> Quelques exemples de récepteurs de la membraneexterne (ME) de type TonB-dépendant chez les bactéries à Gramnégatif	Page 24
Tableau IV : Les gènes potentiellement impliqués dans le transport du fer chez B. anthracis Ames	Page 30
<b>Tableau V :</b> Les gènes potentiellement régulés par Fur chez <i>B. cereus</i> ATCC14579	Page 33
<b>Tableau VI :</b> Liste des gènes de <i>B. cereus</i> potentiellement impliquésdansl'acquisitionduferetlarégulation(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)	Page 65 Page 66

# Table des matières

Table	des r	natières	1
INTR	ODU	CTION	4
Chapi	tre I	– Bacillus cereus. Généralités et Virulence	
1 G	énéra	lités	6
1.1	Hi	storique	6
1.2	Са	ractères généraux	6
1.3	Ph	ylogénie du groupe <i>B. cereus</i>	7
2 L	es fac	teurs de virulence du groupe <i>B. cereus</i>	
2.1	Pa	thogénécité spécifique des espèces du groupe <i>B. cereus</i>	9
2.	1.1	Bacillus anthracis	9
2.	1.2	Bacillus thuringiensis	9
2.	1.3	Bacillus cereus	
2.2	Fa	cteurs de virulence communs au groupe <i>B. cereus</i>	
2.	2.1	Les entérotoxines	
2.	2.2	Les phospholipases	
2.	2.3	Les hémolysines	
2.	2.4	Les protéases	14
2.3	Ré	gulation de l'expression des facteurs de virulences	14
2.4	Αι	tres facteurs de virulence	
Chapi	tre I	- Le fer : transport et régulation chez les bactéries	
1 In	ıtrodu	ction	
2 So	ource	s de fer chez l'hôte	
2.1	Tr	ansferrine et lactoferrine	
2.2	Fe	rritine	
2.3	Ľ'	hème	
2.4	Ľ'	hémoglobine	
2.5	Aı	tres hémoprotéines	
3 R	ôle di	1 fer dans les interactions hôte-bactéries	
3.1	Li	nitation du fer chez les mammifères	
			1

			• •		
	3.2	3.2 Limitation du fer chez l'insecte			
	3.3 Acquisition du fer par les bactéries				
	3.3	.1 Acquisition indirecte	21		
	3.3	.2 Acquisition directe	22		
4	Mé	canismes de transport du fer à travers les membranes biologiques des bactéries	23		
	4.1	Mécanismes de transport du fer chez les bactéries à Gram négatif	23		
	4.2	Mécanismes généraux de transport du fer chez les bactéries à Gram positif	24		
	4.2	1 Mécanismes de transport des sidérophores	24		
	4.2	2 Mécanismes de transport des sources de fer présentes chez l'hôte	25		
5	Exe	emples des systèmes d'acquisition de fer chez les bactéries à Gram positif	25		
	5.1	Staphylococcus aureus	26		
	5.1	.1 Systèmes indirects d'acquisition de fer	26		
	5.1	.2 Systèmes directes d'acquisition de fer	26		
	5.2	Listeria monocytogenes	28		
	5.3	Bacillus anthracis	29		
5.3.1 Systèmes indirects d'acquisition de fer		.1 Systèmes indirects d'acquisition de fer	29		
	5.3	.2 Système direct d'acquisition d'hème comme source de fer	30		
	5.4	Bacillus cereus	30		
6	Rég	gulation et homéostasie du fer chez les bactéries	31		
R	ESUI	/TATS	35		
O	biectit	rs du projet de thèse	36		
0	II	In nouvel outil: le système IVET	37		
1	Ca	actéristiques et principe du système IVET	38		
2	Cri	blage des gènes de $R$ cereus exprimés au cours de l'infection	39		
23	Ide	ntification des gènes notentiellement exprimés au cours de l'infection	40		
5	II	Le gène ivi 20	40 40		
1	II. Cai	actéristiques moléculaires du gène ini20 et de son produit	40 40		
י ר		acteristiques moleculaires du gene 10129 et de son produit	40		
2	NU.	E u IISA <i>in vivo</i>	42		
	2.1	Expression a <i>lisA in vivo</i> en interaction avec le tissu de l'hote	42		
	2.2 mello	Effet a fisa sur la viruience de <i>B. cereus</i> ATCC 145/9 vis-a-vis de Galleria nella	42		
3	Rô	e d'IlsA dans l'acquisition du fer chez l'hôte	43		
-	1.0				

3.1	Régulation d' <i>ilsA</i> par le fer	43
3.2	Identification des sources de fer de l'hôte interagissant avec IlsA	44
3.3	Analyse de l'interaction d'IlsA avec les sources de fer	45
3.4	Localisation d'IlsA à la surface par immunomarquage	46
4 Rá	ble d'IlsA dans la virulence chez les mammifères	47
4.1	Test de cytotoxicité et de cinétique de croissance chez les macrophages J774	47
4.2	Cinétique de croissance dans le sang de porc	48
Article	e 1	49
Article	e 2	50

RESULTATS COMPLEMENTAIRES	
I. Recherche des partenaires bactériens d'IlsA	
1 Pull down	
2 Rôle d'un ABC transporteur situé à proximité d'IlsA	
3 Etude protéomique	
II. Le gène ilsB :	
1 Expression d' <i>ilsB in vivo</i>	
2 Expression d' <i>ilsB in vitro</i> en absence de fer	
3 Effet du gène <i>ilsB</i> sur la virulence chez <i>G. mellonella</i>	
III. Rôle d'IlsA et IlsB dans la formation de biofilm <i>in vitro</i>	56
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	
I. Le système IVET : un nouvel outil génétique chez B. cereus	
II. IlsA, une protéine clé d'un nouvel mécanisme d'acquisition de fer	
1 IIsA et acquisition du fer	59
2 IIsA et transport du fer	61

RE	FERENCES	. 66
Ι	II. <i>B. cereus</i> et fer	.65
4	Modèle représentant le rôle de IIsA dans l'acquisition du fer chez l'hôte	. 63
3	IlsA, adaptation et virulence chez l'hôte	. 62
2	lisa et u'alispoit du lei	. 01

## **INTRODUCTION**

## Chapitre I – Bacillus cereus, Généralités et Virulence

#### Le groupe Bacillus cereus

Le groupe Bacillus cereus sensu lato, est constitué de six espèces taxonomiquement très proches: Bacillus anthracis, Bacillus cereus sensu stricto, Bacillus mycoïdes, Bacillus pseudomycoïdes, Bacillus thuringiensis et Bacillus weihenstephanensis. Ce groupe appartient à la famille des Bacillaceae (section 13 du Bergey's Manual of Systematic Bacteriology). Ce sont des bacilles à coloration de Gram positive, généralement mobiles par ciliature péritriche ou immobiles, produisant des endospores. La plupart des bacilles sont d'une totale innocuité vis-à-vis des organismes vivants, cependant quelques espèces sont pathogènes des insectes, des mammifères, notamment de l'homme. B. anthracis, l'agent étiologique de l'anthrax est responsable de la maladie du charbon chez l'homme et l'animal ; B. thuringiensis est un pathogène des insectes très largement utilisé comme agent de lutte biologique en agriculture ; B. cereus sensu stricto communément appelé B. cereus, est un pathogène opportuniste émergent, généralement associé à des toxi-infections alimentaires ou à des infections locales de l'œil et du parodonte. B. cereus peut être responsable d'infections systémiques parfois très sévères. B. mycoïdes et B. pseudomycoïdes sont caractérisés par l'aspect particulier de leurs colonies rhizoïdes sur milieu nutritif solide (Nakamura, 1998). Jusqu'à présent, aucune activité pathogène ou opportuniste ne leur est attribuée. On les distingue l'une de l'autre par leur composition en acides gras (Kaneshiro et al., 1995). Enfin, B. weihenstephanensis regroupe une grande partie des souches psychrotrophes, capables de se développer à des températures inférieures à 7°C. Cependant, cette caractéristique spécifique est controversée et ne semble pas absolue (Lechner et al., 1998; Stenfors & Granum, 2001). Toutes ces souches possèdent des gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels. La pathogénie résulte de la présence de ces gènes mais également de leur expression ; peut-on alors distinguer un ensemble de souches pathogènes d'un ensemble de souches inoffensives ; ou présentent-elles un caractère ambivalent selon l'environnement qu'elles colonisent? Ce premier chapitre est un tour d'horizon de la physiologie et de la virulence de *B. cereus sensu lato*.



### Figure 1 - Bacille et spore

A. La forme végétative de *B. cereus* observée en microscopie électronique à balayage.

B. Coupe de la spore de *B. thuringiensis* observée en microscopie électronique à transmission.

C. *B. thuringiensis* en fin de phase de sporulation, observé en microscope à contraste de phase. Les cristaux et les spores sont détectés.

#### 1 Généralités

#### 1.1 Historique

*B. anthracis* est la plus ancienne des bactéries appartenant au groupe *B. cereus*. Les premières descriptions présumées de la maladie du charbon datent de l'antiquité et sont évoquées dans la bible (Exode 9, vers 3,9) : Fléau pour les animaux en Egypte. Les symptômes sont décrits par Virgile (71-19 av. J.-C) sous forme de graves lésions cutanées aux points de contact avec des vêtements en laine contaminée. Davaine, en 1863, attribue la maladie à la présence de bâtonnets dans le sang qu'il appelle « bactéridies charbonneuses ». Koch rebaptise cette bactérie *Bacillus anthracis*.

B. cereus a été isolé en 1887 dans une étable par Frankland et Frankland.

*B. thuringiensis* connu sous le nom de *B. sotto* a été isolé en 1901 au Japon par Ishiwata, à partir de larves de vers à soie (*Bombyx mori*) malades (Ishiwata, 1901). Cette bactérie entomopathogène doit son nom à E. Berliner qui isola, en 1911, un bacille similaire à *B. sotto*, à partir de larves de teignes de la farine trouvées mortes dans un moulin près de la ville de Thuringe. La bactérie est alors renommée *B. thuringiensis*.

*B. mycoïdes* et *B. pseudomycoïdes* ont été plus récemment identifiés (Lechner *et al.*, 1998; Nakamura, 1998; Stenfors & Granum, 2001).

#### 1.2 Caractères généraux

Les bactéries du groupe *B. cereus* sont des bactéries ubiquitaires et peuvent être isolées à partir de sols, de végétaux, de tissus animaux et d'aliments. Ce sont des bactéries à coloration de Gram positive aérobies ou anaérobies facultatives, mobiles ou non. Leurs températures optimales de croissance sont généralement situées entre  $25^{\circ}$ C et  $37^{\circ}$ C; cependant, certains membres sont plus tolérants et sont capables de se développer à des températures très élevées ( $75^{\circ}$ C) ou très basses ( $3^{\circ}$ C) (Drobniewski, 1993). L'hétérogénéité extrême au sein de ce groupe est reflétée par la large variété de niches écologiques occupées par ses membres. Au cours de leur croissance, les bactéries du groupe *B. cereus* sont présentes sous deux formes. La première est la forme végétative, elle est observée lorsque les conditions environnementales sont favorables à la multiplication des bacilles. Les bactéries sont alors en forme de bâtonnet de 1 à 3 µm de large pour 3 à 10 µm de long isolées ou organisées en chaînettes plus ou moins longues (Figure 1A). Lorsque les conditions environnementales sont défavorables), la bactérie entame le processus de sporulation qui

	Caractères <sup>a</sup>	B. cereus	B. thuringiensis	B. mycoides	B. anthracis	B. weihenstephanensis	B. pseudomycoides
CC	Lécithinase Utilisation du mannitol Résistance aux lysosymes Fermentation du glucose Réaction VP Réduction des nitrates	+ - + + +	+ - + + + + +	+ - + + + +	+ - + + +	+ - + + + +	+ - + + + ?
	Mobilité	+/-	+/-	-	-	+/-	-
	Hemolyse (sang de mouton)	+	+	(+)	-	+	?
	Croissance à< 7°C en milieu liquide agité et absence de croissance à 43°C Cristal parasporal (endotoxine	-	-	-	-	+	?
CD	pathogène des insectes)	-	+	-	-	-	-
	Lyse par phage gamma	-	-	-	+	-	?
	Sensibilité à la penicilline Plamides pXO1 et pXO2 et Toxine impliquée dans la maladie	-	-	-	+	-	?
	du charbon	-	-	-	+	-	-
	Entérotoxines	+	+	+	?	+	+?

# **Tableau I – Principaux caractères communs et distinctifs des espèces du groupe** *B. cereus sensu lato D'après Guinebretière & Sanchis, 2003*

<sup>a</sup> CC, caractères communs ; CD, caractères distinctifs. +, > 85 % de souches positives ; -, < 15 % positives ; +/-, 50 à 84 % positives ; (+), positives faibles ; ?, absence de données suffisantes.

aboutit à la forme « dormante » résistante, la spore (Figure 1B). Chez *B. cereus sensu lato*, la spore est non déformante et en position centrale à subterminale. Les spores constituent une forme de résistance particulière capable de survivre à la chaleur, à la dessiccation et à de nombreux agents chimiques ; elles représentent par conséquent un moyen de dissémination très efficace. Les principaux caractères phénotypiques communs et distinctifs au sein du groupe *B. cereus sensu lato* sont décrits dans le tableau I.

La composition en base de l'ADN chromosomique de ces espèces est très homogène, le pourcentage en guanine et cytosine est faible, de l'ordre de 35 % (Ivanova *et al.*, 2003).

#### 1.3 Phylogénie du groupe B. cereus

Bien que le groupe B. cereus sensu lato apparaisse assez homogène, la classification des espèces qui le composent est depuis longtemps débattue. Dès 1946, Smith et coll. proposaient que les bactéries du groupe cereus soient considérées comme des variants de l'espèce B. cereus (Smith et al., 1946). Cependant, les enjeux politico-économiques étant défavorables à ce que B. cereus et B. thuringiensis soient considérées comme trop proches de B. anthracis, le statut d'espèce distincte a été maintenu (Gordon et al., 1973). A l'origine, la classification de ces membres était essentiellement basée sur des propriétés phénotypiques évidentes liées, en partie, à des propriétés particulières de virulence. L'aptitude de *B. thuringiensis* à former des inclusions cristallines parasporales composées de protéines insecticides et la présence de la capsule chez B. anthracis responsable de l'anthrax chez les mammifères permet de les distinguer de B. cereus sensu stricto qui est responsable de toxi-infections alimentaires et d'infections locales et systémiques chez l'homme. La perte de l'un de ces caractères les rend phénotypiquement indiscernables de B. cereus sensu stricto. Au début de l'année 1970, les outils de la biologie moléculaire ont largement contribué à la classification des bactéries. Actuellement, deux souches sont considérées d'une même espèce lorsqu'elles présentent généralement plus de 70% de réassociation lors d'une hybridation ADN-ADN et plus de 97 % d'identité de séquences des ARN ribosomaux 16S (Vandamme et al., 1996). Des expériences d'hybridation ADN-ADN (Kaneko et al., 1978; Nakamura, 1994) ainsi que la comparaison des séquences des ARN ribosomaux 16S ou 23S et du gène gyrB (Ash et al., 1991; Ash & Collins, 1992; Awad et al., 2006; Bavykin et al., 2004; Chen & Tsen, 2002) révèlent une forte parenté entre les souches du groupe cereus et ne permettent pas de distinguer les espèces. Beaucoup d'articles décrivent des méthodes d'analyses moléculaires visant à distinguer B. anthracis, B. thuringiensis et B. cereus. Ces analyses regroupent des techniques telles que la MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis) (Carlson et al., 1994; Helgason et al., 1998; Helgason et al., 2000), la MLST (MultiLocus Sequence Typing) (Helgason et al., 2004; Sorokin et al., 2006), la AFLP (fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism) (Hill et al., 2004; Keim et al., 1997; Ticknor et al., 2001) ou encore la rep-PCR fingerprinting (Cherif et al., 2003). Aucune de ces études ne permet de distinguer clairement un B. cereus d'un B. thuringiensis, d'un B. anthracis, mais toutes montrent une diversité génétique importante au sein de ces espèces phylogénétiquement très proches. De plus, ces données confirment que B. anthracis est une espèce monomorphe chez laquelle la diversité entre les isolats ne peut pas être révélée par ces techniques. Cependant, un bon nombre de B. cereus est plus proche de B. anthracis que d'autres souches de B. cereus. Par ailleurs, l'étude comparative des génomes n'apporte pas d'arguments favorables à la distinction d'espèces (Ivanova et al., 2003; Rasko et al., 2004; Rasko et al., 2005). De plus, les caractères phénotypiques spécifiques (comme la synthèse de la capsule ou l'absence d'hémolyse) de B. anthracis peuvent être retrouvés dans certaines souches de B. cereus (Slamti et al., 2004; Sue et al., 2006). Certaines souches de B. cereus possèdent des propriétés insecticides (Perchat et al., 2005) et d'autres, impliquées dans des infections semblables à la maladie du charbon, ont été identifiées (Hoffmaster et al., 2004; Klee et al., 2006). Chaque taxon, difficilement différenciable sur la base de critères scientifiques, conserve son nom d'espèce sur la base de raisons phénotypiques. La classification du groupe cereus est encore source de discussions.

#### 2 Les facteurs de virulence du groupe *B. cereus*

Bien qu'étant génétiquement très proches, les espèces composant le groupe *B. cereus* présentent un large spectre de virulence, tant au niveau de la diversité de leurs hôtes que du degré de sévérité des symptômes développés chez ces derniers.

Une caractéristique souvent rencontrée chez les bactéries pathogènes ou symbiotiques est celle d'héberger sur des plasmides de grande taille des éléments génétiques permettant l'interaction avec l'hôte. Par exemple, les facteurs impliqués dans le pouvoir invasif de *Shigella* et les souches entero-invasives de *Escherichia coli* sont portés par un des plasmides, pINV (Silva *et al.*, 1988). Chez *B. cereus sensu lato*, les gènes codant pour les facteurs de virulence spécifiques de l'hôte sont également portés par de grands plasmides.

#### 2.1 Pathogénécité spécifique des espèces du groupe B. cereus

#### 2.1.1 Bacillus anthracis

La maladie du charbon causée par B. anthracis touche les mammifères, principalement les herbivores (Mock & Fouet, 2001). Suite à l'ingestion ou l'inhalation de spores contenues dans le sol et les fourrages, la germination a lieu, permettant ainsi la prolifération des formes végétatives qui expriment différents facteurs de virulence dans les ganglions lymphatiques et dans le flux sanguin jusqu'à la mort de l'hôte. Après la mort rapide de l'hôte, son sang noir (contenant  $>10^7$  c.f.u/ml) s'échappe par les orifices naturels. Par conséquent, les bactéries sporulent au contact de l'air et sont capables de reconduire un nouveau cycle (Mock & Fouet, 2001). La virulence de B. anthracis est due à la présence de deux plasmides de virulence : pXO1, d'une taille de 181.7 Kb et pXO2 d'une taille de 94.8 Kb. Le plasmide pXO1 code pour trois facteurs toxiques : l'antigène protecteur (PA), le facteur létal (LF) et le facteur oedematogène (EF) (Bhatnagar & Batra, 2001). La combinaison binaire de ces composants forme la toxine oedematogène (PA-EF) et la toxine létale (PA-LF). Le plasmide pXO2 code pour la synthèse de l'acide polyglutamate de la capsule permettant à la bactérie d'échapper à la phagocytose (Candela & Fouet, 2005; Candela et al., 2005; Mock & Fouet, 2001). La perte de ce plasmide rend la bactérie incapable d'établir une infection. Ces souches dépourvues de plasmides sont utilisées pour le développement des vaccins.

#### 2.1.2 Bacillus thuringiensis

*B. thuringiensis* est généralement connu pour ses propriétés pathogènes contre les insectes, par sa capacité à produire des inclusions cristallines (δ-endotoxines) nommées Cry au cours de la sporulation (Angus, 1954; Schnepf *et al.*, 1998). Ces toxines sont codées par les gènes *cry*, localisés sur des plasmides conjugatifs et généralement flanqués d'éléments transposables (Gonzalez *et al.*, 1982; Kronstad & Whiteley, 1984; Lereclus *et al.*, 1984). La présence des cristaux constitue la seule caractéristique phénotypique qui permet de différencier un *B. thuringiensis* d'un *B. cereus sensu stricto*. Ces inclusions cristallines, constituant plus de 25% de la masse sèche des spores, sont responsables de l'activité biopesticide de cette bactérie et de la spécificité de sa cible. A ce jour, 381 toxines Cry caractérisées sont classées en 42 familles en fonction du degré de divergence de leur séquence peptidique (www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil\_Crickmore/Bt, pour revue (Crickmore *et al.*, 19.

1998). Ils sont spécifiquement actifs contre un large spectre d'insectes des ordres Lépidoptère, Diptère, Coléoptère et Nématodes entre autres (Schnepf et al., 1998; Vilas-Boas et al., 2007). Le mode d'action de ces toxines est présumé de la manière suivante : lors de l'ingestion d'un mélange de spores et de cristaux par les insectes sensibles, le pH alcalin de l'intestin entraîne la solubilisation de ces derniers (Koller et al., 1992). Les pro-toxines cry libérées sont ensuite clivées par des protéases intestinales (Miranda et al., 2001) en toxines actives qui vont se fixer spécifiquement sur des récepteurs de l'épithélium intestinal, provoquant la paralysie du tube digestif et la lyse des cellules épithéliales. Les bactéries traversent ainsi la paroi digestive et envahissent alors l'hémocoele de l'insecte, provoquant une septicémie qui s'ajoute à la toxémie. La présence requise de protéases intestinales et de récepteurs spécifiques explique, en grande partie, le spectre relativement restreint de chaque  $\delta$ -endotoxine. Cette spécificité et la totale innocuité de ces toxines vis-à-vis des végétaux, des animaux et de la faune entomologique non cible (abeilles, coccinelles) justifient, depuis de nombreuses années, l'utilisation de B. thuringiensis comme bio-pesticide dans la protection des végétaux contre certains insectes ravageurs (ex : la pyrale du maïs) ou dans le contrôle des insectes vecteurs de graves maladies humaines (ex : le paludisme). Ces toxines sont également utilisées pour la fabrication de plantes transgéniques « insecticides » (coton et maïs « Bt »). En plus des toxines Cry, certaines souches de B. thuringiensis produisent en phase stationnaire de croissance, un autre facteur insecticide : la β-exotoxine (de Barjac & Dedonder, 1965). C'est un composé thermostable, analogue d'un nucléotide (Farkas et al., 1969). Il agit en inhibant le fonctionnement de l'ARN polymérase, par compétition avec l'ATP (Sebesta & Horska, 1970). Mis à part son spectre d'action peu spécifique, ce composé est très peu utilisé en lutte biologique à cause de sa toxicité pour la plupart des organismes testés. D'autres types de toxines insecticides sont également produits par B. thuringiensis. Il s'agit des cytotoxines Cyt et des protéines Vip. Les toxines Cyt peuvent faire partie de la composition de l'inclusion cristalline. A l'heure actuelle 28 gènes codant pour les protéines Cyt sont séquencés (www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil Crickmore/Bt). Ces protéines peuvent s'insérer dans les membranes épithéliales de l'insecte et agir principalement en synergie avec les toxines Cry (Bravo et al., 2007). Les toxines Vip (Vegetative Insecticidal Proteins), découvertes en 1996, sont synthétisées dès la phase exponentielle de croissance. Ces protéines sont classées en trois sous-familles : Vip1, Vip2 et Vip3 (Estruch et al., 1996). Les protéines Vip1 et Vip2 sont des toxines binaires spécifiques des coléoptères, tandis que les protéines Vip3 sont actives contre les lépidoptères insensibles aux toxines Cry (Moellenbeck et al., 2001).

#### 2.1.3 Bacillus cereus

B. cereus est un pathogène opportuniste émergent, fréquemment associé à des toxiinfections alimentaires. Les symptômes provoqués par B. cereus lors de contaminations alimentaires sont généralement ceux d'une gastro-entérite (Granum, 1994) due à la production de toxines émétiques (céreulide) et diarrhéiques (entérotoxine). L'intoxication émétique se déclenche rapidement 1 à 5 heures après ingestion des aliments contaminés indiquant que la toxine est produite dans l'aliment. Dans le cas d'une intoxication diarrhéique, les symptômes surviennent plus tardivement, 8 à 16 heures après ingestion de l'aliment contaminé, indiquant que les entérotoxines sont produites dans l'intestin après l'ingestion des bactéries ou des spores. Les principaux facteurs responsables des intoxications diarrhéiques présents également chez les autres espèces appartenant au groupe B. cereus, seront décrits ultérieurement. La production de la toxine responsable des symptômes émétiques, le céreulide, est restreinte à seulement quelques souches de B. cereus mésophiles très proches les unes des autres (Altayar & Sutherland, 2006; Ehling-Schulz et al., 2005). Le céreulide est un dodecadepsipeptide cyclique fortement hydrophobe, stable à haute température (120°C) et peut persister longtemps après la disparition des bactéries (Agata et al., 1995). Il est synthétisé par une machinerie enzymatique via des peptide-synthases non ribosomales (non-ribosomal peptide synthases, NRPSs). Les gènes ces de cette machinerie sont portés par un mégaplasmide (~270 kb) présentant des similarités avec pXO1 de B. anthracis (Ehling-Schulz et al., 2006; Rasko et al., 2007). Récemment, deux souches de B. weihenstephanensis productrices de céréulide ont été identifiées (Thorsen et al., 2006).

En plus des intoxications alimentaires, *B. cereus* est responsable des infections opportunistes sévères chez les patients immunodéprimés. Ces infections sont de deux types : locales ou systémiques. Les infections locales se manifestent chez les patients ayant des blessures, des brûlures (Drobniewski, 1993). De plus, *B. cereus* peut causer des périodontites et des endophtalmites. En effet, *B. cereus* est connu pour être parmi les bactéries les plus virulentes provoquant l'endophtalmite pouvant entraîner la perte de vue (Callegan *et al.*, 1999; Callegan *et al.*, 2002; Callegan *et al.*, 2005; Callegan *et al.*, 2007). *B. cereus* est également responsable d'infections systémiques comme les endocardites, les septicémies, les bactériémies, les pneumonies et les méningites, souvent après une intervention chirurgicale ou après apposition d'un cathéter ou d'une valvule prosthétique (Drobniewski, 1993; Gaur *et al.*, 2001; Kotiranta *et al.*, 2000).

Une nouvelle souche de *B. cereus* G9241 impliquée dans des infections semblables à la maladie du charbon a été identifiée (Hoffmaster *et al.*, 2004).

Peu d'informations existent sur les facteurs responsables des pathologies occasionnées de *B. cereus*, mais des études ont suggéré qu'il existe une association entre la nature de la maladie causée par *B. cereus* et son contenu plasmidique ; il a été démontré que la plupart des souches causant la périodontite présentent des profiles plasmidiques similaires (Helgason *et al.*, 2000). Toutefois, des analyses moléculaires sont nécessaires afin de déterminer si les facteurs de virulence sont codés par ces plasmides.

#### 2.2 Facteurs de virulence communs au groupe *B. cereus*

Outre les facteurs de virulence spécifiques de *B. anthracis*, de *B. thuringiensis* ou de *B. cereus*, d'autres facteurs communs impliqués dans le pouvoir pathogène de ces bactéries ont été identifiés. La plupart de ces facteurs sont extracellulaires et interviennent probablement dans les pathologies occasionnées de *B. cereus*. Seules les principales activités seront décrites dans ce qui suit.

#### 2.2.1 Les entérotoxines

Trois entérotoxines sont reconnues comme étant la cause des symptômes diarrhéiques : HBL et NHE qui sont des entérotoxines à trois composantes, et Cyt K qui est une simple protéine cytotoxique similaire à la toxine- $\beta$  de *Clostridium perfringens*.

Cyt K ou la cytotoxine K a été isolée d'une souche clinique de *B. cereus* responsable d'intoxication alimentaire. Cette toxine est dermonécrotique et fortement hémolytique contre les érythrocytes de boeuf et de lapin (Lund *et al.*, 2000).

L'entérotoxine HBL ou Hémolysine BL est la toxine la mieux caractérisée chez *B. cereus sensu lato.* Elle est composée de la sous-unité B permettant la liaison de la toxine à la cellule cible et des deux sous-unités lytiques L1 et L2. L'interaction des trois sous-unités est nécessaire pour la formation du pore transmembranaire. En plus de son activité entérotoxique, HBL possède une activité hémolytique et dermonécrotique et provoque en outre l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Beecher *et al.*, 1995; Beecher & Wong, 2000). L'enterotoxine NHE (Non-Hemolytic Enterotoxin), découverte lors d'une épidémie de

gastroentérites est une toxine tripartite non hémolytique (Lund & Granum, 1996). Elle est

aussi cytotoxique que HBL mais elle n'est pas hémolytique. Cependant, des homologies de séquences sont observées entre les sous-unités de HBL et NHE (Lund & Granum, 1997).

#### 2.2.2 Les phospholipases

Chez B. cereus sensu lato, trois phospholipases de spécificités différentes ont été caractérisées : (i) la sphingomyélinase (SM-PLC ou Smase) clive spécifiquement les sphingolipides ; (ii) la phosphatidylcholine phospholipase (PC-PLC) est une métalloprotéine à active phosphatidylcholine, zinc contre la la phosphatidylserine et la phosphatidyléthanolamine; (iii) la phosphatidylinositol phospholipase (PI-PLC) clive par contre, non seulement le phosphatidylinositol mais aussi les glycolipides qui en dérivent (Kupke et al., 1989; Lechner et al., 1989). A l'inverse des hémolysines, les phospholipases provoquent la lyse des cellules grâce à leurs activités enzymatiques et non par la formation de pore. SM-PLC et PC-PLC peuvent s'associer et induire une activité hémolytique sur le sang humain; on parle du complexe céréolysine AB (Gilmore et al., 1989).

#### 2.2.3 Les hémolysines

La Céréolysine O (CLO) chez *B. cereus*, la Thuringolysine O (TLO) chez *B. thuringiensis* et l'Anthrolysin O (ALO) chez *B. anthracis*, sont des hémolysines de la famille des hémolysines à thiol. Cette famille regroupe des cytolysines qui se lient au cholestérol des cellules cibles et causent la formation de larges pores transmembranaires. Ces cytolysines sont retrouvées également chez d'autres pathogènes tels que *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens* ou *Listeria monocytogenes* (Alouf, 2000; Shany *et al.*, 1974).

D'autres hémolysines ont été également identifiées, l'hémolysine II (HlyII). Elle présente une identité avec la famille des toxines «  $\beta$ -barrel pore forming toxins », dont fait partie l' $\alpha$ hémolysine de *Staphylococcus aureus* et Cyt K de *B. cereus* (Baida *et al.*, 1999). L'hémolysine II agit par la formation de pores oligomériques et ceci en trois étapes : la protéine se lie à la surface des érythrocytes et les monomères s'assemblent pour former le pore transmembranaire, menant à la lyse. L'hémolysine II de *B. cereus* est capable de lyser différents types d'érythrocytes, provenant de différentes espèces de mammifères. De plus, elle présente des effets cytotoxiques sur des cellules eucaryotes provenant d'un carcinome du colon, Caco-2 et des cellules neurales humaines, Paju (Andreeva *et al.*, 2006).



**Figure 2 - Schéma de la régulation des facteurs de virulence chez** *B. cereus D'après la thèse de Bouillaut L. 2007.* Le mécanisme est détaillé dans le texte.

ORF (BC#)	Nom des gènes	Fonction	Localisation
3746		Hydrolase putative ou Lipoprotéine acyl-transférase.	Protéine de paroi
0666	inhA2	Métalloprotéase – lipoprotéine	Protéine de paroi
4999		Protéase de la famille de CAAX amino terminal, domaines 6 TM	Protéine de paroi
4511	lppC	Acide phosphatase, lipoprotéine	Protéine de paroi
2552		inconnue, 2 domaines transmembranaires	Protéine de paroi
1713		inconnue, protéine transmembranaire	Protéine de paroi
3527		inconnue, protéine transmembranaire	Protéine de paroi
0361a		inconnue, domaine 1 TM	Protéine de paroi
0362		inconnue, lipoprotéine	Protéine de paroi
0578	yufM	Régulateur d'un système à deux composants	Cytoplasme
2410	tetR	Régulateur, famille TetR	Cytoplasme
1082		Protéine ribosomale alanine acétyl transférase; régulateur	Cytoplasme
5350	plcR	Régulateur transcriptionnel	Cytoplasme
1081	prp2	Inconnue	Cytoplasme

Tableau II - Liste des gènes régulés par PlcR. D'après Gohar et coll., 2008

#### 2.2.4 Les protéases

Un nombre important de protéases a été décrit chez *B. cereus sensu lato*. On trouve notamment InhA1et InhA2, deux métalloprotéases à zinc de la famille des thermolysines. Les séquences peptidiques InhA1 et InhA2 partagent 67% d'homologie et un motif fixateur de l'atome de zinc. Il a été démontré qu'InhA2 participe directement à la virulence par voie orale chez l'insecte *G. mellonella* (Fedhila *et al.*, 2002) et InhA1 permet de contourner le système immunitaire en permettant aux spores de *B. cereus* d'échapper aux macrophages (Ramarao & Lereclus, 2005). De plus, InhA1 est impliquée dans l'inhibition de peptides antimicrobiens (Dalhammar & Steiner, 1984). De nombreuses protéases sont également produites par *B. cereus* telles que NprB et NprA (Gohar *et al.*, 2002; Gohar *et al.*, 2005).

#### 2.3 Régulation de l'expression des facteurs de virulence

En général, l'expression des gènes de virulence est toujours soumise à des systèmes de régulation plus ou moins complexes, pouvant s'exercer aux niveaux transcriptionnel et posttranscriptionnel. Au sein du groupe *B. cereus*, l'expression de la plupart des facteurs de virulence extracellulaires incluant les entérotoxines (HBL, NHE et CytK) et diverses enzymes dégradatives (phospholipases et protéases) est régulée par un système de quorum sensing comprenant un régulateur transcriptionnel pléiotrope PlcR (Phospholipase C Regulator) et un peptide de médiation PapR (Agaisse *et al.*, 1999; Lereclus *et al.*, 1996) (Figure 2). PapR est sécrété, maturé dans le milieu extracellulaire, puis importé à l'intérieur de la bactérie via le système Opp (oligopeptide perméase) où il interagit avec PlcR. Cette interaction spécifique permet la fixation de PlcR à ses séquences d'ADN cible (boîte PlcR) et l'activation du régulon PlcR (Agaisse *et al.*, 1999). Récemment, il a été démontré que la forme maturée de PapR capable d'activer PlcR est de sept acides aminés, qui correspond à l'extrémité carboxy-terminal (Bouillaut *et al.*, 2008). Cependant, l'expression de *plcR* est réprimée par la fixation de Spo0A~P sur les deux boîtes Spo0A (régulateur transcriptionnel essentiel pour la sporulation) qui encadrent la boîte PlcR (Lereclus *et al.*, 2000).

En début de la phase stationnaire, les produits des gènes du régulon PlcR représentent environ 50 % du volume total du protéome extracellulaire (Gohar *et al.*, 2002). Récemment, Gohar et coll., ont établi une liste de 45 gènes régulés par PlcR, en recherchant les boîtes PlcR putatives *in silico*, et en les vérifiant par des études transcriptomiques combinées à des études protéomiques (Gohar *et al.*, 2008) (Tableau II). L'importance du régulon PlcR par rapport aux propriétés opportunistes de *B. thuringiensis* ou *B. cereus* a été mesurée en utilisant différents modèles cellulaires ou animaux. Il a été montré que PlcR joue un rôle primordial dans la

ORF (BC#) Nom des gènes		Fonction	Localisation	
1809	nheA	Entérotoxine	Extracellulaire	
1810	nheB	Entérotoxine	Extracellulaire	
1811	nheC	Entérotoxine	Extracellulaire	
3102	hblB	Entérotoxine	Extracellulaire	
3103	hblL1	Entérotoxine	Extracellulaire	
3104	hblL2	Entérotoxine	Extracellulaire	
5101	clo	Hémolysine I, céréolysine	Extracellulaire	
1110	cytK	Hémolysine, cytotoxine	Extracellulaire	
3761	plcA	Phospholipase (phosphatidylinositol)	Extracellulaire	
0670	plcB	Phospholipase (phosphatidylcholine)	Extracellulaire	
0671	smase	Phospholipase (sphingomyélinase)	Extracellulaire	
2735	nprP2	Protéase	Extracellulaire	
3383	nprC	Protéase	Extracellulaire	
5351	nprB	Protéase	Extracellulaire	
0556	colC	Protéase, collagénase	Extracellulaire	
3161	colA	Protéase, collagénase	Extracellulaire	
3384	mpbE	Protéase, Enhancine	Extracellulaire	
3762	sfp	Protéase, famille des subtilases	Extracellulaire	
5101a	sppc1	Peptide avec une activité anti-bactérienne	Extracellulaire	
2463a	sppc2	Peptide avec une activité anti-bactérienne	Extracellulaire	
3185a	sppc3	Peptide avec une activité anti-bactérienne	Extracellulaire	
5349	papR	Peptide, molécule de signalisation	Extracellulaire	
0576	mcpA	Methyl-accepting chemotaxis transducer protein	Protéine de paroi	
3385	tlpA	Methyl-accepting chemotaxis transducer protein	Protéine de paroi	
0577	yufL	Système à deux composants	Protéine de paroi	
3747		Protéine de la famille GGDEF	Protéine de paroi	
4509		ABC transporteur, perméase	Protéine de paroi	
4510		ABC transporteur, ATPase	Protéine de paroi	
2411		Protéine à efflux des drogues	Protéine de paroi	
3763	cwh	Hydrolase	Protéine de paroi	
0991	slpA	Autolysine	Protéine de paroi	

# Tableau II – Liste des gènes régulés par PlcR (Suite)

virulence de *B. cereus* ou *B. thuringiensis*. En effet, une délétion du gène *plcR* conduit à une forte diminution du pouvoir pathogène de *B. cereus* ou *B. thuringiensis* par ingestion forcée chez l'insecte *G. mellonella* (Salamitou *et al.*, 2000), par instillation nasale chez la souris et par injection intraoculaire chez le lapin (Callegan *et al.*, 2003; Salamitou *et al.*, 2000). Le surnageant de culture d'un mutant *plcR* perd ses propriétés cytotoxiques sur les hémocytes de *G. mellonella* ainsi que sur des lignées cellulaires épithéliales de type HeLa par rapport au surnageant de culture d'une souche sauvage (Ramarao & Lereclus, 2006; Salamitou *et al.*, 2000). La virulence du mutant PlcR a été réduite mais pas abolie, indiquant la présence d'autres facteurs de virulence qui ne sont pas régulés par PlcR mais qui contribuent à la virulence de *B. cereus*.

#### 2.4 Autres facteurs de virulence

La capacité des bactéries à se multiplier, à survivre et à envahir l'hôte nécessite un nombre de réponses adaptatives de leur part. Outre les toxines extracellulaires à action spécifique sur l'hôte, il existe d'autres facteurs qui permettent à la bactérie de contourner le système immunitaire de l'hôte, d'adhérer aux tissus et d'acquérir des nutriments indispensables comme le fer. L'acquisition du fer est l'une des plus importantes réponses adaptatives pour la pathogenèse. Au cours de l'infection, le manque de fer imposé par l'hôte est le premier obstacle que la bactérie doit surmonter afin de coloniser l'hôte. Le fer est un nutriment essentiel pour la multiplication bactérienne du fait qu'il intervient dans de nombreux processus cellulaires vitaux pour la bactérie. L'acquisition du fer par la plupart des bactéries pathogènes constitue une étape cruciale pour l'établissement d'une infection chez l'hôte. Plusieurs systèmes d'acquisition de fer spécifiques à différents substrats sont mis en place par un pathogène. Cette diversité augmente la capacité des bactéries à utiliser un large spectre de sources de fer et favorise par conséquent l'adaptation aux conditions de carence en fer. L'abilité à utiliser des sources de fer variables est spécialement importante chez les pathogènes comme B. cereus capables d'infecter deux type d'hôtes différents, tels que les mammifères et les insectes qui complexent le fer, suite à une infection bactérienne.

Le chapitre II souligne l'importance du fer, son rôle dans les interactions bactéries-hôtes et décrit les principaux mécanismes d'acquisition du fer caractérisés chez les bactéries pathogènes.

## Chapitre II - Le fer : transport et régulation chez les bactéries

#### 1 Introduction

Le fer est un élément essentiel pour la plupart des organismes vivants, y compris les bactéries. Le fer (Fe), peut adopter une des deux formes redox : la forme réduite ferreuse  $(Fe^{2+})$  ou la forme oxydée  $(Fe^{3+})$ . Son potentiel d'oxydo-réduction (potentiel redox) peut varier largement, et ceci, en fonction des molécules auxquelles il est lié. Ces propriétés font du fer un cofacteur majeur pour plusieurs enzymes impliquées dans des processus cellulaires indispensables pour la vie tels que la respiration, la réplication de l'ADN, la synthèse d'acides aminés, le transport d'électrons et la photosynthèse (Andrews et al., 2003; Wandersman & Delepelaire, 2004). Le fer est l'un des éléments les plus abondants sur terre, mais malgré son abondance, il n'est pratiquement pas disponible à l'état libre dans la plupart des environnements. En conditions d'aérobiose et à pH physiologique, le fer existe sous la forme d'hydroxyde ferrique insoluble à une concentration de 10<sup>-9</sup> M (Ratledge & Dover, 2000). De plus, le fer réduit en présence de l'oxygène est extrêmement toxique du fait qu'il intervient dans la réaction de Fenton (Fe<sup>2+</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  $\longrightarrow$  Fe<sup>3+</sup> + OH<sup>-</sup> + OH), conduisant à la réduction partielle de l'oxygène et à la libération des radicaux hydroxyles qui endommagent les cellules (Touati, 2000). Ainsi, l'homéostasie du fer est strictement régulée chez les êtres vivants, afin d'assurer un équilibre entre leur besoin d'acquérir le fer et le maintien d'une concentration en fer non toxique pour les cellules. Par conséquent, le fer sous sa forme libre n'existe pas chez les organismes vivants, il est généralement complexé à des protéines telles que la transferrine, la lactoferrine, et la ferritine par une liaison directe avec les acides aminés, ou bien indirecte par l'intermédiaire de l'hème, dans les hémoprotéines (hémoglobine, myoglobine etc).

Quelque soit l'environnement colonisé par les bactéries, sa concentration en fer est très faible. Face à cette carence en fer, la plupart des bactéries utilisent plusieurs mécanismes visant à acquérir le fer de diverses sources, afin de pouvoir coloniser l'environnement dans lequel elles se trouvent. Ces mécanismes peuvent être séparés en deux mécanismes généraux. Le premier est basé sur des molécules synthétisées par les bactéries et libérées dans le milieu extracellulaire. Ces molécules sont les sidérophores et les hémophores, capables d'acquérir le fer et l'hème respectivement à partir de plusieurs sources. Le deuxième mécanisme est basé sur un contact direct entre la bactérie et les sources de fer exogènes. Ces mécanismes



# Figure 3 - Structure protéique de la transferrine, la lactoferrine et la ferritine humaine

La transferrine, la lactoferrine et la ferritine, sont des sources de fer ferrique. La structure de chacune de ces protéines a été recherchée dans les bases de données des protéines (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Leurs identités sont mentionnées entre 2 parenthèses.

d'acquisition de fer ainsi que les sources de fer potentiellement utilisées par les bactéries seront décrits dans ce chapitre.

#### 2 Sources de fer chez l'hôte

#### 2.1 Transferrine et lactoferrine

La transferrine et la lactoferrine (Figure 3), sont deux glycoprotéines de masse moléculaire de 80 kDa qui présentent une affinité très forte pour le fer ferrique  $Fe^{3+}$  ( $k_a \sim 10^{20}$  M<sup>-1</sup>). Les études structurales montrent que ces deux protéines sont formées des deux lobes globulaires très similaires, dont chacun contient un site de liaison à un atome de fer.

La transferrine est une protéine du sérum sanguin qui assure une double fonction de transport du fer vers les cellules et de protection contre la toxicité du fer. La transferrine n'est pas complètement saturée par le fer, ce qui lui permet de capter le fer quand sa concentration augmente dans le sang ou dans les autres milieux extracellulaires (Ratledge & Dover, 2000). En plus de son rôle de chélation de fer, la lactoferrine est impliquée dans plusieurs fonctions physiologiques (Schryvers & Stojiljkovic, 1999). C'est une protéine de défense naturelle contre les infections. Elle est présente dans les sécrétions mucosales et libérée par les leucocytes au niveau des sites d'inflammation.

#### 2.2 Ferritine

La ferritine est présente chez la plupart des organismes vivants non seulement chez les vertébrés mais aussi chez les insectes, les plantes (phytoferritines) et chez les microorganismes (bactérioferritine). Son rôle principal est le stockage de fer, c'est la protéine majeure de stockage dans tous les organismes. Elle est constituée de 24 sous-unités assemblées en forme de sphère avec un diamètre de ~120Å (Figure 3). Chaque molécule de ferritine de masse moléculaire de 450 000 Da peut fixer 4500 atomes d'ions Fe<sup>3+</sup> (You & Wang, 2005). La ferritine présente une double fonction ; en cas d'excès, elle stocke le fer afin de protéger les cellules de la toxicité de fer et, à l'inverse, elle le libère en cas de carence. Il a été démontré que le stockage de fer dans la ferritine inclut une première étape de liaison du fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) à la ferroxidase suivi d'une étape d'oxydation au sein du centre de la ferroxidase et finalement l'entrée du fer Fe<sup>3+</sup> au centre de la ferritine (Carrondo, 2003). Il existe peu d'études qui montrent l'abilité des bactéries à utiliser la ferritine peut être réduite par *Listeria monocytogenes* à l'aide d'une réductase associée à la surface (Deneer *et al.*, 1995).



## Figure 4 - Structure de l'hémoglobine humaine et de l'hème

L'hémoglobine composée de deux chaînes  $\alpha$  et de deux chaînes  $\beta$  de globines, chacune lié à une molécule d'hème. La structure de l'hémoglobine a été recherchée dans les bases de données des protéines (http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do). Son identité est mentionnée entre 2 parenthèses.

#### 2.3 L'hème

L'hème, issu de l'association d'une protoporphyrine IX et d'un atome de fer est un groupement prosthétique de nombreuses protéines impliquées dans une multitude de fonctions biologiques très importantes (Figure 4). L'hème interagit avec plusieurs protéines apo-hème et les rend des hémoprotéines actives ; par conséquent sa fonction dépendra des protéines auxquelles il se lie (Dawson, 1988). L'hème constituant de l'hémoglobine et de la myoglobine est responsable du transport et du stockage de l'oxygène respectivement, tandis que dans le cytochrome il est responsable du transport d'électrons et de la génération d'énergie. Dans les catalases, il sert à transformer le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en oxygène et dans les peroxydases il catalyse l'oxydation des substrats en présence du peroxyde d'hydrogène. L'hème est donc le site actif de nombreuses protéines qui ont une fonction vitale comme la respiration, la production d'énergie et la résistance au stress oxydatif (Wagener *et al.*, 2003). L'hème est une source importante de fer pour plusieurs bactéries. Il est également une source de protoporphyrine pour les bactréries incapables de synthétiser l'anneau tétrapyrrol, telles que *Enterococcus faecalis, Lactococcus lactis*, and *Haemophilus influenzae* (Wandersman &

Delepelaire, 2004).

#### 2.4 L'hémoglobine

L'hémoglobine présente au sein des érythrocytes joue un rôle principal dans le transport et l'échange de l'oxygène avec les tissus du corps humain et d'autres vertébrés supérieurs. L'hémoglobine est un tétramère constitué de deux chaînes de globine  $\alpha$  et deux chaînes de globine  $\beta$ . Chaque monomère, de masse moléculaire de 16 kDa, lie un groupement d'hème contenant chacun un atome de fer constituant le site actif qui fixe l'oxygène (Figure 4).

Suite à une hémolyse spontanée des érythrocytes, une très faible quantité d'hémoglobine (80-800 nM) se trouve dans le sérum. L'hémoglobine libérée est rapidement complexée à l'haptoglobine, une glycoprotéine du plasma sanguin qui présente une forte affinité pour l'hémoglobine. L'hémoglobine seule, ainsi que le complexe hémoglobine-haptoglobine constituent une source de fer pour plusieurs bactéries (Dryla *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 1999).

#### 2.5 Autres hémoprotéines

L'hème, malgré son importance, est toxique à l'état libre dans le sérum. Il est directement lié à l'hémopexine avec une très forte affinité. L'hémopexine est une glycoprotéine de masse moléculaire de 60 kDa formée de deux domaines similaires qui lient l'hème à l'aide des deux résidus histidine présents dans une poche riche en groupement aromatique (Paoli *et al.*, 1999). Plusieurs bactéries sont capables d'utiliser le complexe hèmehémopexine comme l'espèce *H. influenzae*. Cependant, il n'existe pas d'études qui montrent une utilisation directe et spécifique de ce complexe.

L'albumine est une autre protéine présente dans le plasma qui est capable de lier l'hème. En absence d'études qui montrent la présence de récepteurs spécifiques pour l'albumine, il est très probable que l'hème, lié à l'albumine soit reconnu par les récepteurs de l'hème permettant son transfert passif de l'albumine aux récepteurs (Wandersman & Delepelaire, 2004).

#### **3** Rôle du fer dans les interactions hôte-bactéries

#### 3.1 Limitation du fer chez les mammifères

Le fer libre est extrêmement limité chez l'hôte mammifère, ce qui constitue un obstacle important pour la multiplication des bactéries pathogènes après l'infection. Le corps humain contient 3 à 5 g de fer, cependant 99.9% du fer présent n'est pas accessible aux bactéries (Wandersman & Stojiljkovic, 2000). Il est complexé à des protéines de transport (décrites cidessus) ou réduit sous sa forme ferreuse dans les cellules. Dans le milieu extracellulaire, le fer est lié à la transferrine et à la lactoferrine entraînant une concentration de fer libre en équilibre avec ces protéines de l'ordre de 10<sup>-24</sup> M. Le fer intracellulaire est présent dans l'hémoglobine, l'hème et la ferritine. L'hème est la source de fer la plus abondante chez l'hôte mammifère (78%). Il est présent principalement dans l'hémoglobine emmagasinée dans les érythrocytes ce qui le rend inaccessible aux bactéries. Suite à une lyse des érythrocytes par les bactéries, l'héme et l'hémoglobine se trouvent dans le milieu extracellulaire, où ils sont rapidement liés à l'hémopexine et à l'haptoglobine respectivement, pour être éliminés de la circulation.

Chez les mammifères, la limitation du fer libre dans le sang fait partie de la réponse de la phase aigue de la réaction immunitaire innée de l'hôte pendant la première phase d'infection. Cette réponse peut être induite par les bactéries et leurs produits tel que l'endotoxine. Ceci entraîne une augmentation de la transferrine et de la lactoferrine dans le sang qui vont capter le fer pour le rendre inaccessible aux bactéries.

Si la carence en fer dans le sang limite l'infection, l'excès du fer augmente le risque d'infection. En effet, plusieurs études ont montré que l'injection de fer dans les animaux testés augmente la virulence des bactéries. Une association entre l'excès de fer et l'augmentation des risques d'une bactériémie a été notée chez plusieurs bactéries telles que *Yersinia enterolitica* et *Escherichia coli* (Litwin & Calderwood, 1993).

#### 3.2 Limitation du fer chez l'insecte

Comme chez les vertébrés, l'insecte possède des mécanismes qui stabilisent l'équilibre du fer et limitent son accessibilité. Un certain nombre des protéines mentionnées ci-dessus, pour les mammifères, trouvent leur équivalent chez l'insecte. Cependant, il existe des variations d'une espèce à l'autre ainsi qu'au cours du développement de l'insecte.

La majorité des insectes ne produit pas l'hémoglobine, et la myoglobine n'y est pas présente. L'hémoglobine, quand elle est présente, elle est synthétisée par le corps gras (équivalent du foie) et sécrétée dans l'hémolymphe (équivalent du sang et fluide lymphatique des vertébrés). L'hème, est présent chez certains insectes principalement dans les cytochromes et dans les peroxysomes (oxydase et catalase). La plupart des insectes produisent la transferrine qui joue le rôle de transport du fer, cependant elle est beaucoup moins efficace que la ferritine. Cette dernière existe sous différentes formes (apo et holo), qui sont particulièrement importantes pour l'équilibre du fer chez l'insecte (pour revue, Locke & Nichol, 1992). La ferritine est produite principalement par le corps gras et par les hémocytes (équivalent lymphocytes, macrophages), et souvent secrétée dans l'hémolymphe ou adsorbée par les cellules (Dunkov et al., 2002; Pham et al., 1996). L'holoferritine est liée aux intraorganites (reticulum endoplasmique, golgi, vacuoles) dans les cellules de divers tissus, et sa forme moléculaire peut varier d'un insecte à l'autre. Dans l'hémolymphe, son rôle est de protéger les cellules contre la toxicité du fer en excès. La ferritine et la transferrine présentent d'autres fonctions d'ordre immunitaire, elles servent à limiter l'accessibilité du fer aux pathogènes, comme chez les vertébrés (Yoshiga et al., 1999).

La larve du lépidoptère *Galleria mellonella* du dernier stade larvaire constitue notre modèle d'infection. Chez cet insecte, la ferritine a été identifiée et caractérisé par différents auteurs. Plusieurs sous-unités de 26, 30 et 32 kDa composent la ferritine hémocoelique de 630 kDa. Elle est de 11 nm de diamètre comme celle des mammifères (Kim *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). En plus, une quatrième sous-unité de 34 kDa a été trouvée spécifiquement dans la ferritine présente dans les tissus, sauf dans l'intestin (Yuk *et al.*, 2005). La transferrine est également produite par *G. mellonella* (Seitz *et al.*, 2003).

Des études faites chez *G. mellonella*, montrent que la limitation du fer par les hémocytes est une forme des réponses antimicrobiennes initiales qui limite la croissance et aide à éliminer les bactéries *Xenorhabdas nematophila* et *Bacillus subtilis* de l'hémolymphe (Dunphy *et al.*, 2002).

#### 3.3 Acquisition du fer par les bactéries

Le fer est un facteur de croissance important pour les bactéries pathogènes. Cependant, il existe quelques exceptions, dont les lactobacilles, où le fer est remplacé par le manganèse (Weinberg, 1997), et l'espèce *Borrelia burgdoferi* (agent de la maladie du lyme) qui persiste dans les environnements à basse concentration en fer, du fait qu'elle n'en requiert pas pour sa croissance (moins de dix atomes de fer par cellule). Cette intolérance au fer est due à une perte du locus des gènes qui codent pour les protéines dépendantes du fer de son génome (Posey & Gherardini, 2000).

Pour la majorité des bactéries pathogènes, le fer est un cofacteur indispensable pour le fonctionnement de beaucoup d'enzymes. Une concentration de 10<sup>-7</sup> M à 10<sup>-5</sup> M est nécessaire pour une croissance bactérienne optimale (Andrews *et al.*, 2003; Braun, 2001). Cette concentration est largement supérieure à la concentration de fer disponible chez l'hôte (10<sup>-24</sup> M). Des mécanismes d'acquisition de fer très efficaces sont mis en place par les bactéries pathogènes afin d'acquérir ce nutriment essentiel et d'établir une infection. Ces mécanismes étroitement liés à la virulence, reposent sur une liaison indirecte ou bien directe, entre les bactéries et les sources de fer.

#### 3.3.1 Acquisition indirecte

L'acquisition indirecte est basée sur des molécules synthétisées par les bactéries et sécrétées dans le milieu extracellulaire capables de complexer le fer (sidérophores) ou l'hème (hémophores) de diverses sources.

✓ Les sidérophores, sont des molécules à faible poids moléculaires (< 1000 Da) qui lient le fer ferrique avec une très forte affinité (10<sup>30</sup> M<sup>-1</sup>), permettant sa solubilisation et son extraction du milieu inorganique, ou à partir des protéines de l'hôte (transferrine, lactoferrine, ferritine). Le complexe sidérophore-fer ainsi formé est reconnu par des récepteurs spécifiques présents à la surface de la bactérie. Plus de 500 différents sidérophores produits, aussi bien par les bactéries à Gram positif que Gram négatif sont caractérisés. Ils sont classés en trois principaux groupes sur la base du groupement chimique fonctionnel liant le fer ferrique. On distingue : les hydroxamates (aerobactine et ferrichrome), les catécholates (les entérobactines) et les hydroxyacides (les pyochelines) (Neilands, 1995). L'entérobactine est l'un des plus forts chélateurs de fer. Il présente une constante d'affinité Kd  $\sim 10^{-52}$  M à pH physiologique (Crosa & Walsh, 2002).

✓ Les hémophores sont des protéines capables de chélater l'hème de plusieurs sources d'hémoprotéines avec une forte affinité et permettent sa reconnaissance au niveau des récepteurs spécifiques présents à la surface bactérienne (Cescau et al., 2007; Hanson et al., 1992). L'hémophore HxuA, secrété par Haemophilus influenzae, lui permet d'acquérir l'hème libre ou lié à l'hémopexine. Un deuxième système d'acquisition d'hème basé sur l'hémophore, HasA (heme acquisition system) a été identifié chez plusieurs bactéries, parmi lesquelles Serratia marcescens, Pseudomonas aeruginosa, P. fluorescens, Yersinia pestis, et Y. enterocolitica. HasA, forme une famille de protéines conservées qui ne présente pas d'homologie avec aucunes des autres protéines connues. HasA capte l'hème libre ou extrait l'hème de l'hémoglobine, et le ramène à des récepteurs spécifiques situés au niveau de la membrane externe (Wandersman & Delepelaire, 2004). Les hémophores décrits jusqu'à présent sont produits majoritairement par les bactéries à Gram négatif. Cependant, des protéines secrétées IsdX1 et IsdX2 agissant à la manière d'hémophores ont été récemment identifiées chez Bacillus anthracis. IsdX1 et IsdX2 prélèvent l'hème de l'hémoglobine afin de fournir le fer pour la croissance de *B. anthracis* (Maresso *et al.*, 2008).

#### **3.3.2** Acquisition directe

L'acquisition directe est basée sur un contact direct entre les protéines de surface bactérienne et les sources de fer (transferrine, lactoferrine, ferritine) et d'hème (Hème, hémoprotéines) présentes chez l'hôte. Ce type d'acquisition de fer est mieux caractérisé chez les bactéries à Gram négatif. Chez l'espèce *Neisseria meningitidis*, la transferrine est reconnue par un récepteur composé de deux protéines TbpA/TbpB nécessaires pour l'utilisation du fer de la transferrine (Cornelissen, 2003). De même la lactoferrine est reconnue par un récepteur bi-protéique LbpA / LbpB nécessaire pour l'acquisition du fer de la bactérie par un mécanisme de transport similaire à celui des sidérophores que nous allons détailler ultérieurement.



**Figure 5 - Architecture de la paroi des bactéries à Gram négatif (A) et positif (B)** Brock Biology of Microorganisms, 11th edition, by Madigan and Martinko, Prentice Hall publisher

A. Les bactéries à Gram négatif possèdent deux membranes (externe et cytoplasmique) qui délimitent un espace périplasmique où se situe le peptidoglycane. La surface de beaucoup de bactéries à Gram négatif est recouverte par les chaînes du lipopolysaccharide (LPS). La membrane externe est principalement composée de phospholipides organisés en bicouche et contient des lipoprotéines et de nombreuses protéines intrinsèques notamment les porines. La membrane cytoplasmique est semblable à la membrane externe (excepté le LPS), elle contient de nombreux complexes protéiques vitaux pour la bactérie.

B. Les bactéries à Gram positif possède uniquement une membrane cytoplasmique avec un peptidoglycane plus épais que celui des bactéries à Gram négatif. Le peptidoglycane des bactéries à Gram positif est traversé latéralement par de grande chaînes polymériques qui le relient à la membrane cytoplasmique : les acides lipotéichoïques. D'autre chaînes comme les acides téichoïques sont présentes dans le peptidoglycane et assurent sa stabilité. Beaucoup de protéines sont également associées au peptidoglycane. L'espace périplasmique, beaucoup plus étroit que chez les Gram négatif, se situe entre la couche du peptidoglycane et la membrane plasmique. Chez les bactéries à Gram négatif, la reconnaissance des hémoprotéines au niveau de la surface peut se faire de deux manières. Les pathogènes, *H. influenzae*, et *Yersinia enterolitica* peuvent utiliser l'hème de diverses hémoprotéines à l'aide d'un seul récepteur HmbR et HemR respectivement (Thompson *et al.*, 1999). D'autres bactéries, comme *Neisseria meningitidis* requièrent un récepteur composé de deux protéines HpuA / HpuB, afin d'acquérir l'hème à partir des sources hémoprotéiques.

Chez les bactéries à Gram positif, le système d'acquisition d'hémoprotéines Isd (Ironregulated surface determinant) chez *Staphylococcus aureus* est le mieux caractérisé. Ce système fait intervenir plusieurs protéines de surface qui entrent en contact direct avec les hémoprotéines et l'hème (Maresso & Schneewind, 2006).

#### 4 Mécanismes de transport du fer à travers les membranes biologiques des bactéries

Les bactéries à Gram négatifs et à Gram positifs sont entourées par des membranes cellulaires composées de différents types de molécules dont la composition et la structure constituent des barrières plus ou moins perméables (Figure 5). Le fer, sous ses diverses formes doit franchir ces obstacles spécifiques de surface afin d'accéder au système de transport au niveau de la membrane cytoplasmique pour être ensuite transporté à l'intérieur de la bactérie.

#### 4.1 Mécanismes de transport du fer chez les bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries à Gram négatif, la source de fer doit traverser les deux membranes (externe et cytoplasmique) constituant la paroi cellulaire en passant par le périplasme, afin d'être utilisée par la bactérie. Dans le cas du fer ferreux, le passage à travers la membrane externe peut se faire par l'intermédiaire des porines jusqu'au périplasme. Ensuite, il est transporté dans le cytoplasme par les systèmes de transport FeoABC constitués d'une petite protéine G ayant une activité GTPasique (Hantke, 2003; Kammler *et al.*, 1993).

Par contre, les molécules de tailles plus grandes (sidérophore-Fe<sup>3+</sup>, hémophore, hème) ne peuvent pas traverser la membrane externe par diffusion passive par l'intermédiaire des porines. Elles sont transportées par l'intermédiaire des protéines de la membrane externe de la bactérie appelées récepteurs de type TonB-dépendant (Figure 6A). En général, le transport de fer dans le cytosol suit toujours le même processus indépendamment de la source de fer transportée. Cependant, pour un système de transport particulier, la spécificité des substrats est déterminée par les récepteurs de la membrane externe. Il existe des récepteurs spécifiques pour les différentes sources de fer (Tableau III). Ces récepteurs vont servir à transporter le fer
Récepteurs ME	Substrats	Famille	Organisme	Références
FhuE	Fe <sup>3+</sup> -coprogen	Hydroxamate	Escherichia coli	(Andrews et al., 2003)
FhuA	Fe <sup>3+</sup> -Ferrichrome	Hydroxamate	Escherichia coli	(Andrews et al., 2003)
FoxA	Fe <sup>3+</sup> -Ferrioxamine	Hydroxamate	Yerisinia enterocolitica	(Baumler & Hantke, 1992)
FecA	Fe <sup>3+</sup> -dicitrate	Citrate	Escherichia coli	(Andrews et al., 2003)
FepA	Fe <sup>3+</sup> -enterobactine	Catécholate	Escherichia coli	(Andrews et al., 2003)
Cir	Fe <sup>3+</sup> -dihydroxybenzoyl serine	Catécholate	Escherichia coli	(Andrews et al., 2003)
TbpA/TbpB	Fe <sup>3+</sup> -Transferrine	Glycoprotéine	Neisseria meningitidis	(Cornelissen, 2003)
LbpA/LbpB	Fe <sup>3+</sup> -Lactoferrine	Glycoprotéine	Neisseria meningitidis	(Schryvers & Stojiljkovic, 1999)
HpuA/HpuB	Hémoglobine et/ou Hémoglobine-haptoglobine	Porphyrine	Neisseria meningitidis	(Lewis <i>et al.</i> , 1997)
HemR	Hème/Hémoglobine	Porphyrine	Yerisinia enterocolitica	(Wandersman & Stojiljkovic, 2000)
HmbR	Hémoglobine et/ou Hémoglobine-haptoglobine	Porphyrine	Haemophilus influenzae	(Stojiljkovic <i>et al.</i> , 1996; Wandersman & Stojiljkovic, 2000)
BtuB	Vitamine B12	Porphyrine	Escherichia coli	(Ferguson & Deisenhofer, 2002)
HxuB/C	HxuA-Hème et/ou	Hémophore	Haemophilus influenzae	(Cope et al., 1998)
	HxuA-hème-hémopexine			(Cope et al., 1995)
HasR	HasA-Hème et/ou HasA-hemoglobine, HasA-Hemopexine, HasA- myoglobine	Hémophore	Serratia marcescens Yersinia pestis Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas fluorescens	(Wandersman & Delepelaire, 2004) (Wandersman & Stojiljkovic, 2000) (Letoffe <i>et al.</i> , 1999)

# Tableau III - Quelques exemples de récepteurs de la membrane externe (ME) de type TonB-dépendant chez les bactéries à Gram négatif



# **Figure 6 - Schéma de l'acquisition du fer par l'intermédiaire des sidérophores chez les bactéries à Gram négatif (A) et positif (B).** *D'aprés Wandersman et coll., 2004.*

Les mécanismes sont détaillés dans le texte.

ME : membrane externe, MC : membrane cytoplasmique.

Fe<sup>3+</sup>, libéré de la transferrine et de la lactoferrine, les sidérophores, l'hème ou l'hémophore à travers la membrane externe jusqu'au périplasme. Bien que ces récepteurs soient différents et présentent de faible homologie, ils sont similaires au niveau de leur séquence N-terminale et leurs systèmes de transport sont dépendants du complexe TonB chez *E. coli* et des protéines similaires chez les autres bactéries à Gram négatif. Ce complexe est constitué de trois protéines (TonB, ExbB, ExbD) localisées dans la membrane cytoplasmique qui fournit l'énergie nécessaire à l'internalisation du fer ou de l'hème dans le milieu périplasmique. L'interaction entre ces récepteurs et le complexe TonB se fait au niveau de régions appelées « Boites TonB » composées d'un motif de cinq acides aminés très conservés.

Quand la molécule chargée en fer franchit la membrane externe, elle est reconnue et prise en charge par des protéines du périplasme qui font partie d'un système de transport à travers la membrane cytoplasmique. En général, ce sont les systèmes de type ABC (ATP-binding cassette) transporteurs. Ils sont constitués d'une ou de plusieurs protéines périplasmiques de liaison au substrat, d'une ou deux protéines perméases membranaires et d'une ou deux ATP hydrolases, associées à la membrane cytoplasmique qui fournissent de l'énergie au système (Braun, 2001; Faraldo-Gomez & Sansom, 2003).

Les récepteurs de type TonB sont également utilisés pour faire entrer des molécules comme la vitamine B12 (Ferguson & Deisenhofer, 2002).

#### 4.2 Mécanismes généraux de transport du fer chez les bactéries à Gram positif

À l'inverse des bactéries à Gram négatif, les bactéries à Gram positif n'ont pas de membrane externe, ni de périplasme. Elles possèdent un peptidoglycane épais nettement supérieur à celui des bactéries à Gram négatif constituant 90% de la paroi bactérienne. En plus de son rôle de protection contre la lyse mécanique et osmotique, le peptidoglycane des bactéries à Gram positif sert à l'ancrage des protéines qui sont en contact direct avec le milieu extracellulaire, dans lequel se trouve la bactérie (Koster, 2005; Navarre & Schneewind, 1999). Le fer, sous sa forme ferrique, ou ferreuse, ou faisant partie d'un complexe, doit franchir le peptidoglycane en interaction ou pas avec les protéines qui lui sont associées. Le transport à travers le cytoplasme se fait généralement de la même manière indépendamment de la source de fer à transporter.

#### 4.2.1 Mécanismes de transport des sidérophores

Les molécules de faibles tailles comme les sidérophores, peuvent diffuser à travers le peptidoglycane pour atteindre leurs récepteurs au niveau de la membrane cytoplasmique (Figure 6B). Le transport des sidérophores dans le cytoplasme se fait grâce aux systèmes de type ABC transporteurs. Ces systèmes sont très similaires à ceux des bactéries à Gram négatif excepté que la protéine périplasmique est remplacée par une lipoprotéine ancrée à la membrane cytoplasmique par un motif transmembranaire, qui reconnaît le substrat et le dirige vers le transporteur (Wandersman & Delepelaire, 2004).

#### 4.2.2 Mécanismes de transport des sources de fer présentes chez l'hôte

Les protéines riches en fer de l'hôte (hémoglobine, hème, ferritine, transferrine et lactoferrine) ne peuvent pas diffuser à travers le peptidoglycane. Elles sont prises en charge par des protéines de surface qui lui sont associées. Au cours de l'évolution, les bactéries à Gram positif ont développé plusieurs stratégies d'exposition des protéines à leur surface. Le mécanisme le plus caractérisé est celui de la liaison covalente au peptidoglycane. Des protéines contenant un motif d'ancrage (ex : LPXTG ou NPQTN) du côté carboxy-terminal vont être attachées à la muréine du peptidoglycane (Koster, 2005). L'ancrage de ces protéines se fait à l'aide d'enzymes appelées sortases qui jouent le rôle de transpeptidase. Elles vont cliver la protéine au niveau de son motif d'ancrage par une réaction de transpeptidation et la transférer sur le peptidoglycane en créant des ponts amides entre la protéine et les ponts pentaglycine (Marraffini et al., 2006; Navarre & Schneewind, 1994). En effet, des protéines de surfaces à motif d'ancrage au peptidoglycane jouent le rôle de récepteurs pour l'hème, l'hémoglobine, la transferrine et la lactoferrine entraînant la formation d'un système de transport à travers la paroi (Lei et al., 2002; Mazmanian et al., 2003; Taylor & Heinrichs, 2002). La plupart de ces protéines de surface présentent un à plusieurs domaines conservés appelés NEAT (NEAr iron transporter), essentiels pour l'interaction avec les sources de fer dont principalement l'hème et les hémoprotéines (Grigg et al., 2007; Pilpa et al., 2006).

Une fois le peptidoglycane franchi, le transport du fer ou de l'hème à travers le cytoplasme se fait grâce aux systèmes de type ABC transporteurs similaires à ceux utilisés par les sidérophores.

#### 5 Exemples des systèmes d'acquisition de fer chez les bactéries à Gram positif

Les bactéries à Gram positif contiennent plusieurs systèmes de transport de fer qui utilisent des substrats différents. Il existe peu d'informations concernant les systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram positif, par comparaison à ceux des bactéries à Gram négatif. Ici, seront décrits les systèmes d'acquisition de fer des bactéries pathogènes à Gram positif apparentées à *Bacillus cereus*.

#### 5.1 Staphylococcus aureus

*Staphylococcus aureus* est responsable des infections plus ou moins sévères chez l'homme, allant des infections de peau à d'autres infections plus graves telles que l'endocardite (Fowler *et al.*, 2005) et la septicémie (Brook, 2002). L'abilité de *S. aureus* à acquérir le fer au cours de l'infection est très importante pour sa virulence (Torres *et al.*, 2006). Parmi les bactéries à Gram positif, les mécanismes d'acquisition de fer chez *S. aureus*, sont les plus étudiés. Plusieurs travaux ont permis l'identification et la caractérisation des gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la fixation et le transport du fer à partir des protéines de l'hôte.

#### 5.1.1 Systèmes indirects d'acquisition de fer

En condition de carence en fer, *S. aureus* synthétise des sidérophores qui sont la staphyloferrine A, la staphyloferrine B et les auréochélines lui permettant d'acquérir le fer qui existe dans le milieu extracellulaire (Courcol *et al.*, 1997; Drechsel *et al.*, 1993; Konetschny-Rapp *et al.*, 1990). La staphyloferrine A et la staphyloferrine B appartiennent à la famille des polycarboxylates qui utilisent potentiellement la transferrine comme substrat. Cependant, il a été démontré que la staphyloferrine A purifiée est capable de prélever le fer de la transferrine. Récemment, un nouvel opéron nommé *sbn* a été décrit. Il est composé de neuf gènes qui codent pour la biosynthèse d'un sidérophore jouant un rôle important dans la virulence de *S. aureus* au cours de l'infection (Dale *et al.*, 2004). De plus, *S. aureus* peut utiliser plusieurs sidérophores synthétisés par d'autres bactéries incluant l'enterobactine (sidérophore de la famille des catecholates), la ferrichrome (hydroxamate) et l'aerobactine (hydroxamate).

Le transport du ferric-sidérophore à travers la membrane se fait en général par l'intermédiaire des systèmes ABC transporteurs. Plusieurs ABC transporteurs ont été identifiés dans le génome de *S. aureus*. Ils sont codés par les opérons *sitABC* (Cockayne *et al.*, 1998), *sstABCD* (Morrissey *et al.*, 2000) *fhuCBD/CBG* (Cabrera *et al.*, 2001; Sebulsky *et al.*, 2000) *fhuD1/ fhuD2* (Sebulsky & Heinrichs, 2001) et *sirABC* (Heinrichs *et al.*, 1999). Les substrats transportés par les systèmes *sst* et *sir* sont inconnus tandis que les systèmes FhuCBD avec fhuD1 et fhuD2 sont impliqués dans le transport du complexe Fe<sup>3+</sup>-hydroxamate produit par d'autres bactéries.

#### 5.1.2 Systèmes directs d'acquisition de fer

S. aureus est capable d'interagir directement avec les sources de fer présentes chez l'hôte au cours de l'infection. En plus de la sécrétion des sidérophores, S. aureus possède des



# Figure 7 - Modèle d'acquisition de fer chez *S. aureus* basé sur les protéines de surface

D'après Maresso & Schneewind, 2006

Au cours de l'infection, les conditions de carence en fer entraînent l'expression des gènes *isd*. IsdB se lie à l'hémoglobine (Hb) et IsdH au complexe hémoglobine-haptoglobine (Hb/Hpt) et transfère l'hème chargé en fer (H-Fe) à IsdA, IsdC et finalement au système de transport IsdDEF présent dans la membrane cytoplasmique. Dans le cytoplasme, la monooxygénase IsdG dégrade l'hème et libère le fer qui sera utilisé par la bactérie.

protéines de surface capables de séquestrer le fer. La glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été identifiée en premier comme étant le récepteur de surface de la transferrine (Modun & Williams, 1999). Cette enzyme n'a jamais été connue pour avoir un rôle dans l'acquisition du fer et ne présente pas de similarité avec aucun récepteur de transferrine présent chez les Gram négatif. De plus, il a été démontré qu'une mutation au niveau du gène *gap* codant pour la GAPDH n'affecte pas la liaison à la transferrine. Une autre protéine de surface nommée StbA (staphylococcal transferrin binding protein A), aussi connue sous le nom d'IsdA, est une protéine qui peut lier la transferrine et l'hème (Mazmanian *et al.*, 2003; Taylor & Heinrichs, 2002).

Récemment, il a été démontré que S. aureus utilise préférentiellement l'hème comme source de fer au début de la croissance, au cours de l'initiation de l'infection (Skaar et al., 2004b). Le système Isd (Iron-regulated surface determinant) est le premier système d'acquisition d'hème identifié chez S. aureus (Mazmanian et al., 2002; Mazmanian et al., 2003). Il est constitué de dix gènes exprimés dans les conditions de carence en fer. Ces gènes codent pour quatre protéines de surfaces (IsdA, IsdB, IsdC, IsdH (ou HarA)), un système de transport membranaire (IsdD, IsdE, IsdF), une transpeptidase (SrtB) et deux monooxygénases (IsdG, IsdI). Exceptée la sortase B (SrtB), chaque protéine du système Isd est capable de lier l'hème in vitro. De plus, IsdB et IsdH sont responsables de l'interaction avec l'hémoglobine et le complexe hémoglobine-haptoglobine respectivement (Dryla et al., 2007; Dryla et al., 2003; Torres et al., 2006). Les quatre protéines de surface IsdABCH présentent un à trois domaines NEAT responsables de l'interaction avec l'hème ou les hémoprotéines. De plus IsdA, IsdB et IsdH présentent des motifs LPXTG qui sont ancrés à la surface par l'intermédiaire de la sortase A, tandis que IsdC présente un motif NPQTN ancré par l'intermédiaire de la sortase B (Marraffini & Schneewind, 2005; Mazmanian et al., 2002). A l'inverse des protéines ancrées par la sortase A, IsdC est présente dans la muréine de la paroi de S. aureus et cette position unique est très importante pour le passage de l'hème à travers la paroi (Mazmanian et al., 2003). Sur la base de la localisation potentielle de ces quatre protéines de surface, un modèle pour le transport de l'hème par le système Isd a été proposé (Figure 7). Après la liaison des hémoprotéines aux protéines de surface IsdB et IsdH, l'hème est prélevé par IsdA suivant un mécanisme inconnu jusqu'à présent. L'hème est ensuite transféré directement de IsdA à IsdC à travers la paroi, et transporté à travers la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de l'ABC transporteur IsdDEF (Liu et al., 2008; Muryoi et al., 2008; Pluym et al., 2007). Une fois dans le cytoplasme l'hème est dégradé par les





Les flèches indiquent l'orientation et la taille approximative de la phase ouverte de lecture. Les terminateurs de transcription entourent la région. Les numéros des gènes sont indiqués ainsi que la position et l'identité du gène *svpA* et de la *srtB* sont indiqués sur le locus.

monooxygénases IsdG et IsdI et le fer est ainsi libéré pour être utilisé par la bactérie (Skaar *et al.*, 2004a).

Récemment, un autre système de transport d'hème (Hts) de type ABC transporteur a été identifié. Il est composé de la lipoprotéine (HtsA) et deux perméases (HtsB et HtsC). Ce système est plus utilisé par *S. aureus in vitro* qu'IsdDEF et il joue un rôle important dans la pathogenèse de *S. aureus* chez l'hôte (Skaar *et al.*, 2004b). Les systèmes d'acquisitions d'hème Isd et Hts sont très efficaces. En effet, des observations ont montré que *S. aureus* est saturé par l'hème après 15 min d'incubation avec l'hème exogène (Mazmanian *et al.*, 2003).

#### 5.2 Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes est une bactérie à Gram positif, impliquée dans des infections opportunistes sévères chez les êtres humains et les animaux. C'est un contaminant alimentaire qui cause des infections digestives qui peuvent devenir systémiques chez les sujets immunodéprimés. La capacité de Listeria de survivre au niveau intracellulaire est fondamentale pour sa pathogenèse. La prolifération de L. monocytogenes dans les cellules et sa propagation d'une cellule à l'autre, suggère que cette bactérie utilise le fer présent dans l'environnement intracellulaire (Bierne et al., 2007; Jin et al., 2006). Cependant, L. monocytogenes ne sécrète pas de sidérophores. Elle utilise plutôt les sidérophores ferriques des autres bactéries comme les hydroxamates (ferrichromes, ferrichome A, ferrioxamine B), les catécholates (enterobactine ferrique, corynebactine ferrique) et d'autres composants riches en fer comme les catecholamines (Coulanges et al., 1996; Coulanges et al., 1997; Coulanges et al., 1998; Simon et al., 1995) et le citrate (Adams et al., 1990). L. monocytogenes est capable d'utiliser aussi les protéines de l'hôte (la transferrine, la lactoferrine, la ferritine, l'hémoglobine et l'hème). Des travaux suggèrent la présence d'une réductase localisée à la surface, impliquée dans le transport du fer chez L. monocytogenes (Cowart, 2002; Deneer et al., 1995). Elle reconnaît le fer des différents complexes ferriques, réduit le métal et libère le fer Fe<sup>2+</sup> à l'intérieur des bactéries (Coulanges *et al.*, 1997; Coulanges *et al.*, 1998).

A ce jour, deux systèmes de transport à travers la membrane ont été identifiés chez *L. monocytogenes*. Le premier, codé par l'opéron *fhuCDBG* dont l'expression est fer dépendante permettant le transport des hydroxamates. Le deuxième, codé par l'opéron *hupDGC* est utilisé pour le transport de l'hème et de l'hémoglobine. La délétion du gène *hupC* réduit fortement la virulence de *Listeria* chez la souris (Jin *et al.*, 2006).

Un homologue de l'opéron *isd* de *S. aureus* existe aussi chez *L. monocytogenes*, c'est l'opéron *svpA-srtB* (Figure 8). Cet opéron contient sept gènes qui codent pour des protéines,



Figure 9 - Structure chimique des deux sidérophores : la petrobactine et la bacillibactine

D'après Koppisch et coll., 2005

parmi lesquelles SvpA qui, comme IsdC est ancré au peptidoglycane par l'action de la sortase B sur le motif NAKTN (Bierne *et al.*, 2004; Newton *et al.*, 2005). En aval de *svpA*, il existe trois gènes homologues à l'ABC transporteur du hydroxamate ferrique. SvpA est impliquée dans la virulence de *L. monocytogenes* chez la souris en permettant la sortie des bactéries des phagosomes des macrophages, tandis que la sortase B n'a pas d'effet sur la virulence de *L. monocytogenes* (Bierne *et al.*, 2004; Borezee *et al.*, 2001). De plus, à l'inverse de *S. aureus,* l'opéron *svpA-srtB* ne joue pas de rôle dans l'acquisition de l'hème et l'hémoglobine chez *L. monocytogenes* (Newton *et al.*, 2005).

#### 5.3 Bacillus anthracis

#### 5.3.1 Systèmes indirects d'acquisition de fer

Peu d'études ont été faites sur les mécanismes d'acquisition de fer utilisé par l'agent étiologique de la maladie du charbon, B. anthracis. Il a été démontré que B. anthracis est capable de synthétiser deux types de sidérophores de la famille des catécholates: la bacillibactine (BB) et la pétrobactine (PB) (Figure 9) qui lui permettent d'acquérir le fer dans un environnement carencé en fer (Wilson et al., 2006). Deux opérons codant pour la biosynthèse de la BB et de la PB ont été identifiés dans le génome de B. anthracis (Read et al., 2003). Le premier opéron bacACEBF code pour la synthèse du sidérophore 2,3-acide dihydroxybenzoïque (DHB) et présente 79 % de similarité avec l'opéron dhbACEBF qui code pour la bacillibactine chez B. subtilis. Le deuxième opéron asbABCDEF est nécessaire pour la synthèse du sidérophore 3,4-acid dihydroxybenzoïque (DHB). Les deux gènes asbA et asbB présentent 45% de similarité avec les gènes iucA et iucB respectivement qui sont nécessaires pour la production de l'aérobactine chez E. coli (Koppisch et al., 2005). La sous-unité 2,3-DHB de fixation de fer de la BB est commune à beaucoup de bactéries, tandis que la sous unité 3,4- DHB de la PB est uniquement présente chez B. anthracis et B. cereus. La délétion des gènes bacCEBF et d'asbA a montré, dans les deux cas, une diminution de la synthèse de sidérophore dans un milieu carencé en fer, et seulement la délétion du gène asbA affecte la croissance de B. anthracis. De plus, asbA paraît être nécessaire à la multiplication dans les macrophages ainsi qu'à la virulence de B. anthracis chez la souris. En revanche, une souche de B. anthracis présentant une délétion au niveau des gènes bacCEBF est phénotypiquement identique à la souche sauvage (Cendrowski et al., 2004).

D'autres études ont montré que la PB permet à *B. anthracis* d'échapper au système immunitaire inné du fait qu'elle n'est pas reconnue et fixée par la sidérocaline. En effet, la

ORF (BA #)	Homologues	% de similarité
0349-0351	Ferrichrome perméase (Clostriduim acetobutylicum)	88
	Perméase (Clostriduim acetobutylicum)	82
	Protéine de liaison à la ferrichrome (Bacillus halodurans)	80
0616-0618	Perméase Fe <sup>3+</sup> -dicitrate ( <i>Bacillus subtilis</i> )	75
4595-4597	Tansporteur de ferrichrome (Bacillus subtilis)	71
	ABC transporteur de ferrichrome (Bacillus subtilis)	78
	Protéine de liaison à la ferrichrome (Bacillus halodurans)	71
4766-4767	Protéine de liaison au fer (Bacillus halodurans)	67
	Perméase Fe <sup>3+</sup> -dicitrate ( <i>Bacillus halodurans</i> )	71
4784-4786	ABC transporteur de ferrichrome (Bacillus halodurans)	80
	Perméase de ferrichrome (Bacillus halodurans)	86
	Protéine de liaison à la ferrichrome (Bacillus halodurans)	64
5327-5330	ABC transporteur de fer (Yersinia pestis)	72
	Perméase de transport de fer (Yersinia pestis)	68
	Perméase de transport de fer (Yersinia pestis)	74
	Protéine de liaison au fer Fe <sup>3+</sup> (Neisseria meningitidis)	54

Tableau IV - Les gènes potentiellement impliqués dans le transport du fer chez B.anthracis Ames. D'après Cendrowski et coll., 2004





Les flèches indiquent l'orientation et la taille approximative de la phase ouverte de lecture. Les numéros des gènes et leurs identités sont indiqués sur le locus.

sidérocaline fait partie du système de défense antibactérien chez les mammifères. A l'inverse, la sidérocaline fixe spécifiquement la BB. L'analyse du génome a également permis d'identifier des gènes qui codent pour plusieurs systèmes de transport à travers la membrane cytoplasmique qui peuvent être utilisés potentiellement par *B. anthracis* pour l'acquisition du fer du milieu extracellulaire (Tableau IV). La fonction de ces gènes reste à déterminer. Ces derniers pouvant constituer des cibles potentielles des stratégies thérapeutiques de lutte contre la maladie du charbon.

#### 5.3.2 Système d'acquisition d'hème comme source de fer

Les analyses *in silico* du génome de *B. anthracis*, ont permis d'identifier l'opéron *isd* qui présente des caractéristiques à la fois communes et uniques à *S. aureus* (Figure 10). Comme chez *S. aureus*, cet opéron *isd* inclut les gènes codant pour la protéine de liaison à l'hème IsdC (*isdC*), la sortase (*srtB*), le système de transport de ferrichrome (*isdD*, *isdE*, *isdF*) et l'hème monooxygénase (*isdG*). A l'inverse de *S. aureus*, le locus *isd* chez *B. anthracis* contient les gènes *isdX1* et *isdX2* qui codent pour des protéines secrétées qui sont capable de capter l'hème de l'hémoglobine (Maresso *et al.*, 2008).

Un modèle d'acquisition de l'hème par l'intermédiaire du locus isd-like chez *B. anthracis* a été suggéré. Dans les conditions de carence en fer, *B. anthracis* produit les protéines Isd qui forment un système de relais pour l'import de l'hème à l'intérieur de la bactérie. L'hème de l'hémoglobine capté par IsdX1 et IsdX2 le fournisse à IsdC lié au peptidoglycane. IsdC à son tour le transfère au système de fer-perméase constitué d'IsdD, IsdE et IsdF, qui à son tour, permet son transport à travers la membrane bactérienne. A l'intérieur de la bactérie l'hème est dégradé par la monooxygénase afin de libérer le fer qui sera utilisé par *B. anthracis* (Maresso *et al.*, 2006; Maresso *et al.*, 2008; Skaar *et al.*, 2006).

#### 5.4 Bacillus cereus

Les systèmes d'acquisition de fer chez *B. cereus* sont très peu étudiés. La majorité des recherches ont été centrées sur l'identification des sources de fer qui peuvent être utilisées par *B. cereus* plutôt que sur les bases moléculaires des mécanismes selon lesquels *B. cereus* utilise le fer.

Récemment, il a été démontré que *B. cereus* est capable de synthétiser deux sidérophores de la famille des catécholates : la petrobactine (PB) et la bacillibactine (BB), présents également chez *B. anthracis. B. thuringiensis* sécrète uniquement la bacillibactine. La bacillibactine, semble être caractéristique du groupe *B. cereus*, tandis que la petrobactine

semble être présente uniquement chez les espèces du groupe *B. cereus* pathogènes aux vertébrés (Wilson *et al.*, 2006).

La capacité de B. cereus d'utiliser le fer de la transferrine a été étudiée par deux groupes différents qui ont présenté des résultats controverses. Sato et coll., ont montré que B. cereus n'est capable d'utiliser ni la transferrine ni la lactoferrine pour sa croissance (Sato et al., 1998; Sato et al., 1999b). Cependant, Park et coll., ont montré que B. cereus utilise le fer de la transferrine par l'intermédiaire des sidérophores catécholates dont la production est régulée par la disponibilité du fer libre. De plus, ils ont montré que B. cereus produit une faible quantité de sidérophores, et prélève le fer de la transferrine d'une façon nettement moins efficace, par comparaison à d'autres bactéries comme S. aureus, E. coli et Pseudomonas aeruginosa (Park et al., 2005). Un système d'acquisition du citrate de fer est identifié dans le génome de B. cereus. Ce système présente une fonction potentielle d'ABC transporteur, codé par l'opéron FecABC où FecA code pour la protéine de liaison au substrat, FecB code pour la membrane perméase et FecC pour l'ATPase. Des infections de larves de lépidoptères (Manduca sexta) ont montré que cet opéron joue un rôle dans la virulence de B. cereus. Selon le stade de l'infection, il a été suggéré que la bactérie utilise différentes sources de fer. Il est très probable, que le système d'acquisition de citrate soit plus important durant la phase végétative de croissance dans la lumière intestinale de la larve où le citrate exogène serait disponible (Harvie & Ellar, 2005). Des analyses bioinformatiques ont montré que cet opéron présente de fortes similitudes avec les gènes présents chez S. aureus et L. monocytogenes.

De plus, *B. cereus* sécrète des hémolysines qui permettent la dissociation des érythrocytes afin d'utiliser l'hémoglobine et l'hème comme source de fer pour sa croissance. D'autres hémoprotéines comme le complexe hémoglobine-haptoglobine et hème-albumine peuvent aussi servir à la croissance de *B. cereus* (Sato *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1999a; Sato *et al.*, 1999b). La possession d'un large spectre de systèmes d'acquisition de fer explique, en partie, la capacité d'adaptation de *B. cereus* à différents environnements et constitue par conséquent, un stade vital dans l'évolution de la pathogénèse de *B. cereus*.

#### 6 Régulation et homéostasie du fer chez les bactéries

Les systèmes d'acquisition et de stockage du fer ont pour objectif de maintenir une concentration optimale de fer nécessaire à la survie et à la croissance bactérienne. Cependant, la bactérie doit maintenir cet équilibre tout en évitant les effets néfastes du fer. En effet, le fer



## Figure 11 - Schéma du mode d'action du régulateur Fur

A. Modèle de régulation par la protéine Fur chez *E. coli. D'après Andrews et coll., 2003.*B, C, D. Comparaison des modèles de la séquence consensus reconnue par Fur au niveau de la région promotrice des gènes. Les différents modèles sont détaillés dans le texte. *D'aprés Baichoo & Helmann, 2002*

est potentiellement toxique à l'état ferreux et en excès, pour cela la bactérie doit contrôler sa concentration intracellulaire. L'homéostasie du fer se traduit par une régulation fine des systèmes d'acquisition et de stockage impliquant des protéines régulatrices bien déterminées (Hantke, 2001). Chez les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif à faible pourcentage en GC, la régulation du métabolisme de fer est réalisée par l'intermédiaire du régulateur transcriptionnel Fur (Ferric uptake regulator) qui présente une activité dépendante du fer. Fur fut initialement décrit comme un régulateur transcriptionnel qui agit en réprimant l'expression des gènes. C'est une protéine de faible poids moléculaire, d'environ 17 kDa, capable de former des dimères. Chaque sous-unité de Fur est composée de deux domaines: le domaine N-terminal contenant le motif hélice-tour-hélice lui permettant de se fixer à l'ADN et le domaine C-terminal contenant généralement un motif riche en histidine responsable de l'interaction avec le fer et important pour la dimérisation de la protéine (Stojilikovic & Hantke, 1995). Dans un environnement riche en fer, Fur lie l'ion ferreux au niveau C-terminal et acquiert une conformation qui augmente fortement son affinité pour sa cible d'ADN. La liaison de Fur à l'ADN inhibe la transcription des gènes qui sont réprimés par Fur. Par contre, quand la concentration de fer est faible, Fur libère le fer et quitte l'ADN permettant à l'ARN polymérase d'accéder aux promoteurs et par conséquent les gènes en question seront transcrits (Figure 11A). Fur reconnaît et fixe l'ADN au niveau d'une séquence consensus appelée « boîte fur», située au niveau des régions -35 et -10 des promoteurs (Escolar et al., 1999). La base moléculaire de la séquence d'ADN reconnue par Fur est controversée. A l'origine, les études faites chez E. coli ont mis en évidence une séquence palindromique de 19 pb à répétition inversée (Figure 11B). Cette séquence a été réexaminée par Escolar et coll., qui ont montré qu'il s'agit d'un motif constitué de trois hexamères capables d'interagir avec Fur dont deux identiques GATAAT et le troisième CTATTA à répétition inversée (Figure 11C) (Escolar et al., 1998). Dernièrement, des réinterprétations faites chez Bacillus subtilis ont suggéré que la boîte fur est constituée de 21 pb, formant deux heptamères à répétitions inversées chevauchants dont chacun lie le dimère Fur de part et d'autre de la double hélice et permet par conséquent l'enroulement de Fur autour de l'ADN (Figure 11D) (Baichoo & Helmann, 2002).

Selon les bactéries, cinquante à cent gènes sont réprimés par Fur en milieu riche en fer. En plus de la régulation des gènes impliqués dans l'acquisition, le stockage du fer et la biosynthèse des sidérophores, il a été démontré que Fur régule l'expression des gènes ayant des fonctions cellulaires vitales dont la fonction n'est pas liée directement au fer. Ces gènes

ORF (BC #)	Nom du gène	Fonction	Position de la boîte Fur
1483	fer	Ferredoxine	95
3468	fhuB	Ferrichrome permease ABC transporteur	59
1978	iucA	Biosynthèse de sidérophores	84
1154	hemH	Ferrochélatase	84
1978	dhbA	Synthèse de sidérophore	52
1331	ilsA	Iron regulated surface protein A	65
0552	ilsB	Iron regulated surface protein B	89
4549		Protéine de surface	50
3738	feuA	Protéine de liaison au fer	171
3541		Flavodoxine I	21
3523	hlyII	Hémolysine II	157
0616	yvrc	Protéine de liaison au dicitrate	85

 Tableau V - Les gènes potentiellement régulés par Fur chez B. cereus ATCC14579

peuvent être impliqués dans la respiration, la glycolyse, le chimiotactisme et la réponse au stress oxydatif. Par conséquent, Fur est considéré comme un régulateur global qui coordonne différentes réponses dans la cellule (McHugh *et al.*, 2003).

Chez certaines bactéries telles que *Corybacterium diphteriae* et les Shigelles, Fur régule l'expression des toxines. Un défaut de régulation par Fur entraîne des problèmes majeurs chez les bactéries. Par ailleurs, l'inactivation du gène *fur* dérégule le métabolisme du fer et augmente la sensibilité de la bactérie au stress oxydatif. Cet effet n'est pas réversible après l'ajout de chélateur de fer ou par la surexpression des gènes qui codent pour des protéines de stockage de fer telle que la ferritine. En absence de Fur, l'acquisition du fer et son stockage sont mal équilibrés et le niveau de fer libre devient excessif.

Différentes études ont permis de mettre en évidence l'ensemble des gènes régulés par Fur ou régulon Fur. Ce régulon a été défini par la recherche des boîtes fur consensus dans les génomes séquencés à l'aide des outils bioinformatiques, par l'analyse des puces d'ADN, par des analyses protéomiques et par comparaison entre les organismes (Baichoo *et al.*, 2002; Grifantini *et al.*, 2003; Hantke, 2001; Lee *et al.*, 2004; Panina *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2002).

Chez *B. cereus* ATCC14579, nous avons recherché les gènes du régulon Fur à l'aide des études bioinformatiques, en se basant sur l'étude faite par Harvie et coll., dans laquelle ils ont utilisé la séquence consensus de la boîte Fur identifiée dans la région promotrice du gène *dhbA* chez *B. subtilis* connue pour sa régulation par Fur (Bsat & Helmann, 1999; Harvie & Ellar, 2005). Ces études ont permis de mettre en évidence l'ensemble des gènes potentiellement régulés par Fur (Tableau V).

Par ailleurs, Fur n'est pas le seul régulateur répondant au fer identifié chez les bactéries. Il existe le régulateur DtxR (Diphteria Toxin regulator) présent chez les bactéries à Gram positif à haut pourcentage en GC comme les mycobactéries et les streptomycètes. DtxR régule un spectre de gènes similaires à ceux régulés par Fur incluant les gènes impliqués dans la biosynthèse des sidérophores, dans l'acquisition du fer et dans la réponse au stress oxydatif. Bien qu'il n'existe pas de similarité entre Fur et DtxR au niveau séquence protéique, ils présentent des similarités au niveau de leurs structures (Hantke, 2001).

Après son internalisation dans la bactérie, le fer gagne ses fonctions biologiques. Il joue le rôle de co-facteur d'enzymes seul ou bien incorporé dans des groupements prosthétiques comme l'hème ou fer-soufre (Andrews *et al.*, 2003). Dans le cytoplasme, le fer peut aussi être mis en réserve par l'intermédiaire des bactérioferritines qui correspondent aux

ferritines chez les mammifères ou bien des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif comme Dps (DNA-binding protective stress). Ces molécules de fer sont utilisées par l'organisme quand il en a besoin et en particulier dans le cas de carence en fer.

En conclusion, les bactéries utilisent différentes stratégies pour maintenir leur homéostasie en fer. Elles captent le fer sous ses diverses formes, par l'intermédiaire des systèmes de transport spécifiques dont l'expression est hautement régulée. Elles possèdent des facteurs intracellulaires pour la mise en réserve du fer en excès qui reste à leur disposition en cas de besoin. Elles contrôlent leur consommation en fer en régulant l'expression des protéines qui en sont dépendantes.

## **RESULTATS**

# Objectifs du projet de thèse

Comme nous l'avons déjà vu, les déterminants majeurs de virulence responsables de la persistance, de l'adaptation et de la multiplication de *B. cereus* chez l'hôte sont encore peu connus. Afin de mieux cerner les facteurs d'adaptation, nous avons cherché dans un premier temps à identifier des gènes spécifiquement exprimés au cours de l'infection, pouvant jouer un rôle dans l'interaction avec l'hôte. Ceci a été réalisé en utilisant le système génétique IVET (In Vivo Expression Technology) qui a été mis au point par Sinda Fedhila lors de son projet Post doctoral. Le système a été utilisé en infectant l'insecte *Galleria mellonella*, ce qui a permis l'identification de 20 gènes spécifiquement exprimés. Ensuite, nous avons approfondi l'étude de l'un d'eux, le gène *ilsA*, dont les propriétés moléculaires suggéraient un rôle potentiel dans l'acquisition du fer.

Afin de caractériser le gène *ilsA* et de comprendre son rôle précis dans le pouvoir pathogène de *B. cereus*, nous avons étudié, tout d'abord, les conditions qui permettent son expression *in vitro* et *in vivo* et nous avons évalué son implication dans la virulence chez l'insecte, et chez les macrophages. Ensuite, nous avons analysé le rôle d'IlsA au cours de l'infection, en identifiant les protéines de l'hôte avec lesquelles IlsA interagit. Son rôle dans la formation des biofilms a été également testé.

Les résultats que nous avons obtenus montrent un rôle majeur d'IlsA dans l'acquisition du fer à partir de certaines sources de fer présentes chez l'hôte, ainsi que son importance dans l'adaptation, la survie et la virulence de *B. cereus*.

Lors de ces travaux de thèse, nous avons aussi analysé l'expression et le rôle d'IlsB, une protéine qui présente une certaine homologie avec IlsA.

Les informations que nous avions jusqu'à présent concernant les systèmes d'acquisition de fer chez le groupe *B. cereus* étaient très restreintes. Donc, l'ensemble de nos résultats présentés, principalement dans l'article 1 et 2, aide à mieux comprendre l'adaptation de *B. cereus* chez l'hôte, et par conséquent, à élargir nos connaissances concernant les mécanismes d'acquisition de fer chez *B. cereus* en particulier, et chez les bactéries à Gram positif d'une manière générale. Ceci permet d'élucider une partie des mécanismes d'interactions hôte-pathogène qui sont à ce jour peu connus.



### Figure 12 - Infection et anatomie du modèle Galleria mellonella

A. Chenille *G. mellonella* vivante (claire) et morte (noire, mélanisée) infectée par *B. cereus* depuis 24 heures.

B. G. mellonella disséquée, vue de l'intestin.

C. Schéma d'une coupe longitudinale/latérale de G. mellonella

D. Ingestion forcée par voie orale ou injection dans l'hémocoele des spores ou bactéries végétatives à l'aide d'un micro-injecteur, permettant de déterminer la virulence et le suivi de l'infection et l'expression des gènes *in vivo* 

#### I. Un nouvel outil : le système IVET

Le pouvoir pathogène des bactéries du groupe Bacillus cereus a été généralement associé à leur capacité de sécréter des toxines dont la majorité est régulée par le régulateur transcriptionnel PlcR. Cependant, nous disposons de peu de connaissances sur les autres facteurs qui interviennent dans le pouvoir pathogène de B. cereus, en particulier, ceux qui sont impliqués dans l'adaptation et la multiplication des bactéries chez l'hôte. Le développement d'un système génétique IVET (In Vivo Expression Technology) s'avère une méthode de large potentiel. Ce système constitue un moyen efficace de sélection des promoteurs induits de façon transitoire et conditionnelle, en interaction avec le tissu de l'hôte (Rediers et al., 2005). Cette approche a été développée en premier chez les bactéries à Gram négatif, afin d'identifier les gènes spécifiquement exprimés au cours de la colonisation de l'hôte (Mahan et al., 1993; Osbourn et al., 1987). Par exemple chez Vibrio cholerae, cette méthode a mis en évidence des gènes spécifiquement exprimés chez la souris qui sont nécessaires pour la virulence (Camilli & Mekalanos, 1995). Un système IVET similaire à celui des bactéries à Gram négatif a été développé en premier chez Bacillus subtilis par Salamitou et al (Salamitou et al., 1997). Nous avons choisi de réaliser ce système dans la souche dont le génome est entièrement séquencé, B. cereus ATCC 14579 (Ivanova et al., 2003) et de l'utiliser chez la larve du lépidoptère Galleria mellonella. L'article 1 publié dans Molecular Microbiology, décrit l'adaptation et l'utilisation de ce système pour la première fois chez B. cereus, et l'identification des gènes spécifiquement exprimés lors de l'infection de Galleria mellonella.

#### Le modèle d'infection : Galleria mellonella

Nous avons choisi d'infecter la larve du lépidoptère *G. mellonella* par voie orale afin d'identifier les gènes spécifiquement exprimés au cours du processus infectieux en général, incluant ceux qui sont exprimés spécifiquement au niveau de l'intestin ou dans l'hémocoele. C'est le dernier stade larvaire de l'insecte *G. mellonella* (Lepidoptera. Pyralidae) (un papillon de nuit nommé la teigne des ruches d'abeilles) qui a servi pour nos études (Figure 12). Ce modèle a déjà permis l'identification de nombreux facteurs de virulence pour plusieurs pathogènes de mammifères (*Candida albicans, Pseudomonas aerogiosa, Enterococcus faecalis*) par des infections par voie hémocoelique (Finley 1999 ; Kavagnah & Reeves, 2004). Tandis que, chez les bactéries appartenant au groupe *B. cereus*, ce modèle a permis d'évaluer le rôle des gènes dans la virulence après infection par voie orale suite à une ingestion forcée

avec une dose subléthale de la toxine Cry1C, associée à des doses de spores, ou des bactéries en phase végétative. Les études au laboratoire de Génétique Microbienne et Environnement (GME) ont montré, qu'après infection orale de  $5 \times 10^6$  bactéries et 3 microgrammes de toxine Cry1C, la mort intervient en moyenne entre 16-24 heures post infection, lorsque les bactéries ont franchi les barrières intestinales (Nielsen-Le Roux et Coll.). L'importance du régulateur transcriptionnel PlcR a été mise en évidence par ce modèle (Salamitou et al., 2000) ainsi que le rôle de la métalloprotéase InhA2 et la protéine du corps basal flagellaire, FlhA (Bouillaut et al., 2005; Fedhila et al., 2002). Il a été montré que l'infection de G. mellonella conduisait à des réactions similaires à celles observées chez la souris (Finley 1999 ; Kavagnah & Reeves, 2004). Ces résultats démontraient que l'utilisation des invertébrés pouvait pallier l'absence de modèles mammifères pour étudier le pouvoir pathogène des bactéries. D'autres insectes, comme la drosophile, ont aussi permis d'identifier des facteurs de virulence, et surtout d'analyser des réponses immunitaires innées (Vodovar et al., 2004). Cependant, un avantage de G. mellonella est sa capacité à supporter les températures voisines de 37°C, ce qui permet de réaliser les études à la température du corps d'un mammifère. Sa plus grande taille permet aussi d'infecter avec des doses précises par voie orale et de manipuler l'intestin. Par ailleurs, la physiologie et l'anatomie des cellules intestinales sont très comparables à celles des mammifères (mucus, microvillosités, etc.). De plus, plusieurs composants du système immunitaire inné des vertébrés (peptides antimicrobiens, cellules phagocytaires, système NOS (Nitrogen oxidative species) et ROS (Reactive oxygen species) ont leurs parallèles chez les invertébrés.

#### 1 Caractéristiques et principe du système IVET

Le principe du système IVET est basé sur l'utilisation d'une recombinase site spécifique, TnpI (Figure 1A de l'article 1). Ce système est composé de deux vecteurs navettes qui présentent des sites de réplication spécifiques chez les bactéries à Gram positif.

Le premier vecteur : pHT304-I dérive de pHT304 (Arantes & Lereclus, 1991). Il contient un gène de résistance à l'érythromycine (*erm*), une cassette *tnpI* sans promoteur qui code pour une recombinase, en amont de laquelle se trouve un terminateur de transcription (t) et un site de polyclonage (Salamitou *et al.*, 1997).

Le deuxième vecteur : pHT304-R2 dérive également du pHT304. Il contient deux gènes de résistance à deux antibiotiques : un gène qui confère une résistance à la kanamycine (aphA3), séparé de son promoteur p*aphA3* par un gène de résistance à la spectinomycine (spc) qui, lui même est bordé de deux sites internes de recombinaisons spécifiques *R* reconnus par la recombinase, TnpI. L'ensemble de la cassette R2S (2 sites *R* + gène *spc*) et le gène *aphA3* avec son promoteur constitue l'insert R2SK. Cet insert a été intégré dans le chromosome de *B. cereus* ATTCC 14579 au niveau du locus du gène codant pour la tétracycline générant la souche Bc::R2SK.

Une banque de fragments d'ADN génomique de *B. cereus* ATCC 14579 a été clonée en amont du gène *tnpI* sans promoteur, dans le vecteur pHT304-I. Ce vecteur a été introduit chez *B. cereus* ATCC 14579 contenant l'insert R2SK (Bc::R2SK). Quand un fragment d'ADN contient un promoteur fonctionnel, qui est spécifiquement activé dans les conditions étudiées (ingestion forcée chez l'insecte *G. mellonella*), le gène *tnpI* est exprimé et la recombinase (TnpI) est produite. TnpI va reconnaître les deux sites R, ce qui conduit à la résolution et à l'excision de la casette R2S. Ceci entraîne par conséquent, la perte du gène de résistance à la spectinomycine et l'acquisition d'une nouvelle résistance à la kanamycine. Ce système de sélection positive, nous a permis de détecter des promoteurs activés *in vivo*, de façon transitoire et conditionnelle.

#### 2 Criblage des gènes de *B. cereus* exprimés au cours de l'infection

La souche Bc::R2SK contenant la banque des fragments d'ADN génomique (0.5-1.5 Kb) dans le plasmide pHT304-I, a été inoculée *in vitro* en milieu LB contenant la spectinomycine afin d'éliminer la majorité des promoteurs qui s'expriment dans ces conditions, incluant ceux qui sont régulés par PlcR (Figure 1B de l'article 1). Après ce premier criblage, les bactéries résistantes à la spectinomycine (cassette non résolue) ont été utilisées pour infecter les larves de *G. mellonella* par voie orale en association avec la toxine Cry1C. En parallèle, nous avons inoculé comme contrôle, le milieu LB sans antibiotique, afin d'estimer le nombre de bactéries qui ont échappé au premier criblage. Après 24 heures d'infection, nous avons obtenu 100 fois plus de colonies qui présentent un phénotype de résistance à la Kanamycine (casette résolue) issus des larves mortes par rapport à celles issues du milieu LB.

#### 3 Identification des gènes potentiellement exprimés au cours de l'infection

100 clones Km<sup>R</sup> ont été sélectionnés au hasard afin d'être séquencés. Les fragments d'ADN présents en amont du gène codant la tnpl ont été amplifiés par PCR, séquencés et analysés par comparaison avec les séquences présentes dans les bases de données du génome de B. cereus ATCC 14579 (http://www.integratedgenomics.com). Cette analyse a conduit à l'identification de 37 inserts d'ADN localisés en amont d'une phase ouverte de lecture, ce qui correspond à 37 promoteurs potentiels de gènes induits in vivo que nous avons nommés ivi. Les 37 ivi gènes putatifs ont été analysés individuellement en comparant la fréquence de résolution de leur cassette in vivo et in vitro, afin de vérifier la spécificité de leurs expressions in vivo. Après cette analyse, 20 gènes ivi ont été confirmés comme étant spécifiquement activés au cours du processus infectieux (Figure 2 de l'article 1). Leur résolution in vivo était au moins deux fois plus élevée que celle in vitro. Ces gènes ont été divisés en plusieurs classes selon la fonction des protéines qu'ils codent. Ces protéines présentent, soit des fonctions connues pouvant jouer un rôle dans la régulation, le métabolisme, la division cellulaire, le transport, la virulence et l'adaptation, soit des fonctions inconnues (tableau 1, article 1). Les gènes que nous avons mis en évidence avec le système IVET, sont potentiellement très intéressants et des études plus approfondies semblent nécessaires afin de mieux comprendre leurs rôles dans le processus infectieux causé par B. cereus.

#### II. Le gène ivi29

En premier, nous avons décidé de focaliser notre étude, sur le gène *ivi29* qui avait une très forte induction au cours de l'infection. En effet, ce gène montre une forte résolution *in vivo* (> 90%) par rapport à celle *in vitro* (1%) (Figure 2 de l'article 1). De plus, ce gène code pour une protéine ayant potentiellement une fonction dans l'adaptation et la virulence, suggérant que ce gène fortement exprimé au cours de l'infection chez *G. mellonella*, peut être impliqué dans la virulence de *B. cereus*.

#### 1 Caractéristiques moléculaires du gène *ivi29* et de son produit

En premier lieu, nous avons analysé la séquence nucléotidique de la région promotrice du gène *ivi29* (Figure 3 de l'article 1). L'analyse a montré la présence d'une séquence palindromique (5'-GATAATGA GAT TCATTATC-3'), identique à la séquence consensus de la boite *fur* qui constitue la séquence cible du régulateur Fur sur l'ADN. Fur, est un répresseur transcriptionnel dont l'activité et la liaison à l'ADN dépendent de la concentration du fer dans le milieu. Ceci, suggère que l'expression du gène *ivi29* est régulée par Fur et par conséquent son expression est dépendante du fer.

L'analyse de la séquence protéique codée par le gène ivi29 dans les bases de données des domaines conservés dans NCBI (National Center of Biotechnology Information) a indiqué la présence de trois domaines conservés : un domaine NEAT (NEAr iron transporter) du côté N-terminal, suivi d'une région LRR (leucine-rich-repeat) et trois domaines SLH (S-layer homology) du côté C-terminal. De plus, un peptide signale N-terminal de 28 acides aminés a été identifié avec le programme SIGNALP 3.0 (Figure 4 de l'article 1). Nous avons nommé cette protéine IlsA (Iron-leucine-rich Surface protein). IlsA présente une identité de 22% avec l'internaline A (InIA), une protéine de surface responsable, en grande partie, de la virulence chez Listeria monocytogenes. Cette similarité est surtout due au domaine LRR qui favorise l'entrée de Listeria en interagissant avec les récepteurs E-cadherine (Lecuit et al., 1997; Schubert et al., 2002). Ceci laisse suggérer qu'IlsA de B. cereus pourrait interagir avec les protéines de l'hôte via les domaines LRR responsable des interactions protéine-protéine. À l'inverse des internalines, IlsA possède trois domaines SLH remplaçant le domaine LPXTG présent chez la plupart des internalines incluant l'InIA. Des études ont montré que les protéines présentant les domaines SLH sont liés d'une façon non-covalente au peptidoglycane de la bactérie (Mesnage et al., 2000). La présence du domaine SLH, en plus de la présence d'un peptide signal typique suggère qu'IlsA est une protéine de surface attachée au peptidoglycane par un mécanisme impliquant les domaines SLH. Un troisième domaine très important, caractéristique d'IlsA, est le domaine NEAT (NEAr iron Transporter) attaché du côté extracellulaire de la membrane bactérienne, qui semble impliqué dans le transport du fer (Andrade et al., 2002). Il est rapporté chez S. aureus que les protéines de surface appartenant au système Isd contenant les domaines NEAT forment un système de liaison aux hémoprotéines et de transport de l'hème à travers le peptidoglycane (Mazmanian et al., 2003).

Des études ont montré que les protéines contenant les domaines LRR contribuent à la virulence de plusieurs bactéries invasives telles que IpaH (7.8) de *Shigella flexneri* (Fernandez-Prada *et al.*, 2000) et l'InIA et l'InIB de *L. monocytogenes* (pour revue, (Braun & Cossart, 2000)). De plus, le domaine NEAT est présent généralement chez les bactéries pathogènes et peut donc être associé à la virulence (Andrade *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces observations suggère fortement qu'IlsA pourrait être une protéine impliquée dans l'acquisition du fer à partir des sources présentes chez l'hôte, et qu'elle jouerait un rôle dans la virulence de *B. cereus*.

#### 2 Rôle d'IlsA in vivo

#### 2.1 Expression d'ilsA in vivo en interaction avec le tissu de l'hôte

Le système IVET montre qu'IlsA est fortement exprimée in vivo, mais, il ne nous donne pas d'indication où ce gène est exprimé chez G. mellonella. Afin d'étudier la cinétique d'expression du promoteur du gène *ilsA* et de localiser son expression au cours de l'infection, nous avons réalisé une fusion transcriptionnelle entre le promoteur pilsA et le gène gfp (green fluorescent protein). Le gène gfp, une fois activé par le promoteur du gène ilsA va coder pour une protéine fluorescente, qui va permettre de suivre l'expression du gène *ilsA* dans le tissu de l'hôte, afin de savoir à quel niveau ce gène intervient lors du processus infectieux. L'expression du promoteur pilsA'gfp in vivo a été suivie chez la larve G. mellonella après ingestion forcée d'une dose de  $5 \times 10^6$  spores de la souche *B. cereus* contenant la construction pHT315ΩpilsA-gfp. Après ingestion, les larves ont été disséquées et les bactéries isolées ont été observées à l'aide de la microscopie à épifluorescence (Figure 6 de l'article 2). Nous avons observé que les bactéries isolées à partir de l'intestin des chenilles vivantes, après 9 h d'infection, ne montrent pas de fluorescence. Tandis qu'une très forte fluorescence a été observée chez les bactéries qui ont réussi à franchir la barrière intestinale et qui sont présentes dans l'hémocœle, après 24 h d'infection. Ces résultats montrent que le gène ilsA est fortement exprimé au niveau de l'hémocœle. En fait, des études ont montré que le fer n'est pas accessible pour les bactéries au niveau de l'hémocoele, en raison de la présence de protéines qui lient le fer, telles que la transferrine et la ferritine.

# 2.2 Effet d'IIsA sur la virulence de *B. cereus* ATCC 14579 vis-à-vis de *Galleria mellonella*

Afin de savoir si IlsA est importante et nécessaire pour la pathogénie de *B. cereus*, nous avons construit un mutant *B. cereus*  $\Delta ilsA$  et nous avons effectué des tests de virulence en utilisant notre modèle d'infection *G. mellonella*.

Tout d'abord, nous avons réalisé des tests de virulence dans les mêmes conditions que celles utilisées pour le système IVET : par infection par voie orale. Nous avons utilisé différentes doses de spores  $(5x10^3 \text{ à } 5x10^6)$  de la souche sauvage *B. cereus* et du mutant *B. cereus*  $\Delta ilsA$  associé à 3 microgramme la toxine Cry1C de *B. thuringiensis* (Figure 7 de l'article 1). La mortalité est évaluée après 24 heures d'infection, et les données ont été analysées à l'aide du programme statistique PROBIT, qui nous a permis d'éstimer la DL<sub>50</sub> (dose létale pour 50% de la population) des deux souches, sauvage et mutante. La

comparaison des  $DL_{50}$  a montré que la souche mutante *B. cereus*  $\Delta ilsA$  est 13 fois moins virulente que la souche sauvage, indiquant que ce gène, identifié par le système IVET, est important pour la virulence.

Puisque IIsA est fortement exprimée dans l'hémocœle, nous avons également évalué la virulence après injection dans l'hémocœle. Après 24 h d'infection avec des doses de bactéries végétatives allant de  $10^2$  à  $10^3$  par larve, le nombre de larves mortes a été enregistré. L'analyse Probit a montré que la souche mutante est 2.2 fois moins virulente que la souche sauvage (Figure 7A de l'article 2).

Etant donné que la souche mutante *B. cereus*  $\Delta ilsA$  est moins virulente que la souche sauvage parentale, nous avons voulu savoir si cela était dû à un défaut de croissance. Pour cela, nous avons injecté séparément des bactéries de la souche sauvage et de la souche mutante dans l'hémocoele de *G. melonella*. Une dose de 500 bactéries/chenille a été utilisée et la croissance bactérienne a été suivie à 2 h, 6 h et 24 h après infection. Nous avons observé que la croissance de la souche mutante est significativement affaiblie par rapport à la souche sauvage surtout au niveau de la phase initiale de l'infection (à 2h et 6h post-infection) (Figure 7B de l'article 2). Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'interruption du gène *ilsA* diminue la survie, affecte la croissance et contribue par conséquent à la diminution de la virulence.

#### 3 Rôle d'IlsA dans l'acquisition du fer chez l'hôte

#### 3.1 Régulation d'ilsA par le fer

La présence d'une boîte *fur* dans la région promotrice du gène *ilsA* suggère une régulation dépendante du fer. Afin de mesurer l'effet du fer sur l'expression d'*ilsA* en quantifiant l'activité de son promoteur, nous avons réalisé une fusion transcriptionelle entre le promoteur p*ilsA* (=orf29) et le gène *lacZ* dans le plasmide pHT304-18'Z (Agaisse & Lereclus, 1994). La région promotrice a été amplifiée et insérée en amont du gène *LacZ* et le plasmide résultant pHT-orf29'Z a été introduit dans la souche *B. cereus* ATCC 14579. L'activité β-galactosidase a été mesurée à différentes étapes de la croissance dans le milieu LB (conditions standardes) ou en présence d'un chélateur du fer (le dipyridil) qui diminue la concentration du fer dans le milieu. Une très faible activité β-galactosidase (<180 unités Miller) a été observée en présence du chélateur de fer, le β-galactosidase (9000 unités Miller) a été observée en présence du chélateur de fer, le

dipyridyl. Ces résultats montrent que l'expression du gène *ilsA* est fortement induite par l'absence du fer. Dans le but de vérifier si l'expression d'*ilsA* est due spécifiquement au manque de fer, des ions ferriques (FeCl3) ont été rajouté en excès. Une très faible activité  $\beta$ -galactosidase a été observée quand le fer est ajouté en même temps que le dipyridyl ainsi qu'une chute de l'activité  $\beta$ -galactosidase est observée au moment de l'ajout des ions ferriques, au début de la phase stationnaire de la croissance bactérienne. Ces résultats indiquent que le gène *ilsA* est régulé par le fer et confirment, donc l'hypothèse de sa régulation par le répresseur Fur.

#### 3.2 Identification des sources de fer de l'hôte interagissant avec IIsA

L'abilité de *B. cereus* ATCC 14579 à utiliser les sources de fer présentes chez l'hôte n'a jamais été étudiée. Dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer les sources de fer qui peuvent être utilisées par *B. cereus* au cours de sa croissance chez l'hôte. Pour cela, nous avons réalisé des cinétiques de croissance de la souche *B. cereus* sauvage *in vitro* en milieu carencé en fer et en fournissant soit l'hémoglobine, ou l'hème, ou la ferritine, ou la lactoferrine, ou la transferrine comme source unique de fer. La croissance bactérienne a été suivie en mesurant la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm pendant 10 heures. Nous avons observé que *B. cereus*, incapable de se multiplier en milieu carencé en fer, reprend une croissance normale quand on rajoute l'hémoglobine, l'hème et la ferritine. Par contre, *B. cereus* était incapable de se multiplier en présence de la lactoferrine et de la transferrine (Figure 2 de l'article 2).

Afin de montrer le rôle d'IlsA dans l'acquisition de fer à partir de l'hémoglobine, l'hème et la ferritine, nous avons comparé l'index de croissance de la souche mutée *B. cereus*  $\Delta ilsA$  par rapport à la souche sauvage *B. cereus* en utilisant l'hémoglobine, l'hème et la ferritine comme unique source de fer, après 16 h et 24 h d'incubation. L'index de croissance correspond à la croissance en milieu LB carencé en fer avec ou sans les sources de fer, divisé par la croissance en milieu LB riche en fer.

Les résultats que nous avons obtenus montrent une croissance très faible de la souche mutée qui est significativement différente de la croissance de la souche sauvage en présence de l'hémoglobine, l'hème et la ferritine (Figure 3 de l'article 2). En revanche, en présence du fer ionique inorganique les deux souches présentent la même croissance, ce qui montre qu'IlsA n'est pas nécessaire pour l'acquisition du fer inorganique. Afin de vérifier que ce phénotype est dû spécifiquement à l'absence d'IlsA, nous avons utilisé la souche complémentée *B. cereus*  $\Delta ilsA$  pHT304 $\Omega ilsA$  (la souche mutée à laquelle nous avons rajouté le gène *ilsA* en trans). Nous avons observé une restauration du phénotype de croissance bactérienne en présence de l'hémoglobine, l'hème et la ferritine. Ces résultats indiquent qu'IIsA est nécessaire pour l'acquisition du fer des protéines riches en fer présentes chez l'hôte, et par conséquent, elle est importante pour la croissance et la survie de la bactérie au cours de l'infection.

#### 3.3 Analyse de l'interaction d'IlsA avec les sources de fer

#### IlsA se lie à l'hémoglobine et à la ferritine

Dans le but de savoir si IlsA interagit directement avec l'hémoglobine et la ferritine, nous avons utilisé deux approches.

Dans la première approche, ELISA, l'hémoglobine et la ferritine ont été immobilisées à des concentrations croissantes sur les plaques ELISA et la protéine IIsA purifiée a été rajoutée par-dessus. L'interaction d'IIsA avec ces deux protéines a été détectée à l'aide d'anticorps polyclonaux de lapin anti-IIsA qui, par la suite sont reconnus par l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin marqué à la péroxydase. La liaison d'IIsA est mesurée par la conversion du substrat ortho-phénylènediamine dihydrochloride (OPD) en produit coloré suite à une réaction catalytique induite par la péroxydase. Ce produit coloré est mesuré à une longueur d'onde de 492 nm. L'affinitée de IIsA vis-à-vis de l'hémogoline et de la ferritine a été determinée selon le modèle Michealis qui a permis de calculer la constante de Michaelis (Km), correspondant à la constante de dissocciation. Les résultats obtenus montrent que IIsA possèdent une Km=  $3 \pm 1$  nM pour l'hémoglobine et une Km=  $10 \pm 3$  nM pour la ferritine, indiquant que IIsA a une affinité plus grande pour l'hémoglobine que pour la ferritine (Figure 4A, de l'article 2).

Dans la deuxième approche SPR (Surface Plasmo Resonnance), il s'agit d'une cinétique de liaison en temps réel. Dans ce cas, IlsA est fixée à une concentration de 1000 nM et les sources de fer (hémoglobine, hème, ferritine et transferrine) sont injectées à une concentration de 200 nM. Après un temps d'association de 8 min, la dissociation est enregistrée après 10 min de la fin de l'injection. Les résultats obtenus avec la phase de dissociation nous donnent des indications sur la stabilité du complexe et nous permettent de calculer le nombre de molécules du complexe qui se dissocient en une seconde, d'où les constantes de dissociation K<sub>off</sub> (Figure 4B de l'article 2). La liaison est la moins stable avec la ferritine (1.71 x  $10^{-3}$  s<sup>-1</sup>).



Figure 13 – Test de compétition entre l'hémoglobine et la ferritine vis-à-vis de IIsA

Sensogrammes SPR montrant les interactions spécifiques de l'hémoglobine  $(1 \ \mu M)$  avec IIsA seule (A) ou avec le complexe IIsA-ferritine (C). La flèche rouge indique le même niveau de liaison dans les deux cas.

Sensogrammes SPR montrant les interactions spécifiques de la ferritine  $(1 \ \mu M)$  avec IIsA seule (B) ou avec le complexe IIsA-hémoglobine (D). La flèche rouge indique une augmentation significative de la liaison de la ferritine sur le complexe IIsA-hémoglobine par comparaison à sa liaison sur IIsA seule.

Elle est plus stable avec l'hémoglobine  $(1.48 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1})$  et l'hème  $(1.34 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1})$ . Aucune liaison n'a été détectée avec la transferrine.

En plus des tests d'affinité, nous avons réalisé des tests de compétitions en temps réel afin de savoir si l'hémoglobine et la ferritine utilisent le même site de liaison sur IIsA. Sur IIsA immobilisée par l'intermédiaire de son GST (Glutathione S-Transférase), nous avons injecté la ferritine (1000 nM) d'une part, et l'hémoglobine (1000 nM) d'autre part. Ensuite, sur le complexe IIsA-Ferritine, nous avons injecté l'hémoglobine, et sur le complexe IIsA-hémoglobine, nous avons injecté la ferritine. Nous avons observé une augmentation de la liaison de la ferritine sur le complexe IIsA-hémoglobine indiquant que ces deux protéines n'utilisent pas le même site de liaison sur IIsA (Figure 13). Cependant, la liaison de la ferritine seule est plus faible qu'attendue. Ces résultats sont préliminaires, mais néanmoins très intéressants, car ils suggèrent une éventuelle modification structurale du complexe IIsA-hémoglobine, qui permettrait une meilleure liaison à la ferritine.

#### IlsA lie l'hème

Afin de déterminer si IIsA se lie à l'hème de l'hémoglobine, nous avons incubé l'hème avec la protéine purifiée GST-IIsA ou la GST seule (contrôle négatif). Après séparation du mélange sur gel polyacrylamide, en condition non-dénaturante, et après transfert sur membrane de nitrocellulose, nous avons détecté la liaison de IIsA à l'hème par chémoluminescence en utilisant les propriétés peroxydase de l'hème (Figure 5 de l'article 2). Les résultats montrent que l'hème se lie à la GST-IIsA mais pas à la GST seule.

De plus, l'alignement multiple du domaine NEAT d'IlsA avec les domaines NEAT des protéines Isd de *S. aureus* est en accord avec ce résultat et suggère que cette liaison est due au domaine NEAT. Nous avons observé que les trois résidus d'IsdA : Ser<sup>82</sup>, Tyr<sup>166</sup> et Tyr<sup>170</sup> nécessaires à la liaison avec l'hème et largement conservés chez les protéines liant l'hème (Grigg *et al.*, 2007) sont présents chez IlsA. De plus les résidus hydrophobes (Val<sup>157</sup>, Ile<sup>159</sup>, Val<sup>161</sup>) qui forment la poche de liaison à l'hème chez IsdA sont également présents chez IlsA d'une facon conservée ou remplacée par des acides aminés similaires(Grigg *et al.*, 2007).

#### 3.4 Localisation d'IlsA à la surface par immunomarquage

L'étude de la structure protéique d'IlsA a montré un domaine SLH putatif, suggérant qu'IlsA serait présente à la surface bactérienne, ce qui faciliterait son interaction avec les protéines de l'hôte. Afin de vérifier sa localisation à la surface de *B. cereus*, nous avons réalisé un immunomarquage en utilisant l'anticorps anti-IIsA qui est reconnu par un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome Alexa 488. L'immunomarquage a été fait sur les bactéries de la souche sauvage, *B. cereus*, la souche mutante, *B. cereus*  $\Delta ilsa$  et la souche complémentée, *B. cereus*  $\Delta ilsA$  pHT304 $\Omega ilsA$ . Ces souches ont été cultivées en milieu LB (riche en fer) et en milieu LB carencé en fer (traité avec le chélateur de fer, le dipyridil). La figure 1, de l'article 2 montre qu'IIsA est présente à la surface des bactéries de la souche sauvage, uniquement quand elles sont cultivées en milieu carencé en fer. Par contre, IIsA n'est pas présente à la surface de la souche mutante en milieu carencé en fer, ni à la surface de la souche sauvage en milieu riche en fer. La complémentation de la souche mutante avec le gène *ilsA*, restore la localisation d'IIsA à la surface des bactéries.

#### 4 Rôle d'IlsA dans la virulence chez les mammifères

Nous avons montré le rôle d'IlsA dans un hôte invertébré, notamment son expression et le rôle dans la survie au niveau sanguin de l'insecte. Afin de nous rapprocher d'un hôte mammifère, nous avons conduit des études avec des macrophages de souris et du sang de porc, dans le but d'identifier un éventuel rôle d'IlsA pour la survie de *B. cereus* dans ces conditions.

#### 4.1 Test de cytotoxicité et de cinétique de croissance chez les macrophages J774

Nous avons réalisé des tests de cytotoxicité sur les macrophages murins J774 afin de comparer la souche mutante (*B. cereus*  $\Delta ilsA$ ) à la souche sauvage (*B. cereus*). Les macrophages sont cultivés pendant trois jours en milieu RPMI à 37°C et dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les macrophages sont par la suite détachés, comptés et séparés dans une plaque multi-puits à une concentration de  $3x10^5$  macrophages/puits, et incubés pendant 24h. Les macrophages ainsi séparés sont infectés par la souche *B. cereus* sauvage et la souche mutée *B. cereus*  $\Delta ilsA$  à une dose de  $3x10^4$ ,  $3x10^3$  et  $3x10^2$  bactéries/ml. Après 2 heures d'infection, le bleu de trypan est rajouté, celui-ci va pénétrer dans le cytoplasme des macrophages perméabilisés (morts) et les colorer en bleu. Par contre, les macrophages encore vivants ne laissent pas passer le bleu de trypan et donc restent incolores. Au moins, 300 macrophages sont comptés, par condition, et le pourcentage de cytotoxicité est évalué par la



Figure 14 - Test de cytotoxicité (A) et cinétique de croissance (B) de la souche sauvage *B. cereus* (histogramme en vert) et de la souche mutante *B. cereus*  $\Delta ilsA$  (histogramme en jaune) chez les macrophages J774



Figure 15 - Cinétique de croissance dans le sang total de porc de la souche sauvage *B. cereus* (histogramme en vert) et de la souche mutante *B. cereus*  $\Delta ilsA$  (histogramme en jaune)



Figure 16 - Cinétique de croissance dans le plasma sanguin de porc de la souche sauvage *B. cereus* (histogramme en vert) et de la souche mutante *B. cereus*  $\Delta ilsA$  (histogramme en jaune)

suite. Les résultats obtenus montrent que la souche mutante est 2 fois moins cytotoxique que la souche sauvage (Figure 14A).

En parallèle, nous avons réalisé une cinétique de croissance de la souche mutante et de la sauvage après infection des macrophages avec une dose de  $3 \times 10^3$  bactéries/ml. A différents temps après infection, des étalements sur boîte avec différentes dilutions sont réalisées afin de comparer la croissance de la souche sauvage par rapport à la souche mutée. La figure 14B montre qu'après 3h 30 d'infection, le pourcentage de croissance par rapport au temps 0 d'infection de la souche mutante (5.53x10<sup>4</sup>) est 16 fois plus faible que la souche sauvage (9.23x10<sup>5</sup>). Ces résultats suggèrent que l'interruption d'*ilsA* réduit la croissance et par conséquent contribue à la diminution de la cytotoxicité de *B. cereus* vis-à-vis des macrophages.

#### 4.2 Cinétique de croissance dans le sang de porc

Afin de relier les observations *in vitro* avec les sources de fer à ce qui se passe *in vivo*, des cultures ont été faites en sang total et en plasma sanguin de porc. La croissance de la souche mutante *B. cereus*  $\Delta ilsA$  par rapport à la souche sauvage *B. cereus* a été mesurée à différents temps après incubation à 37°C. A partir d'une culture de nuit de la souche sauvage et de la souche mutante dans un milieu carencé en fer (LB + 0.1 mM de dipyridyl), nous avons inoculé le sang total et le plasma sanguin avec une dose de  $2x10^5$  bactéries/ml de chacune des deux souches séparément. Dans le sang total, la croissance de la souche mutante est atténuée par rapport à la croissance de la souche sauvage, surtout après 2h 30 de culture où le mutant est 5 fois plus atténué que le sauvage (Figure 15).

Dans le plasma, la croissance du mutant semble beaucoup plus affectée que sa croissance dans le sang total. La plus grande différence de croissance entre le mutant et le sauvage a été observée après 6 h de culture où le mutant est 7 fois plus atténué que le sauvage (Figure 16). A l'inverse de sa croissance dans le sang total, la souche mutante dans le plasma n'atteint pas la croissance de la souche sauvage et elle reste 5 fois plus atténuée que la souche sauvage après 24 h. Ces résultats suggèrent que IlsA est aussi importante pour le développement de *B. cereus* chez un hôte mammifère, surtout en milieu de type plasma et au début de croissance dans le sang total.

Article 1

Identification of B. cereus internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects

Molecular Microbiology
# Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects

#### Sinda Fedhila,<sup>1†‡</sup> Nadine Daou,<sup>1,2‡</sup> Didier Lereclus<sup>1\*\*</sup> and Christina Nielsen-LeRoux<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Unité Génétique Microbienne et Environnement, Institut National de la Recherche Agronomique, La Minière, 78285 Guyancourt cedex, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Biotechnologie, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth. B. P 11-514 Riad el Solh, Beirut 1107 2050, Lebanon.

<sup>3</sup>Département de Microbiologie, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724, Paris, France.

#### Summary

Bacillus cereus is an opportunistic bacterium frequently associated with food-borne infections causing gastroenteritis. We developed an in vivo expression technology (IVET), with an insect host, for identification of the B. cereus genes specifically expressed during infection. This IVET-based approach uses site-specific recombinase Tnpl to identify transient promoter activation. We constructed a genomic library of B. cereus ATCC14579 by cloning DNA fragments upstream from tnpl. The library was screened in vivo by oral infection of the insect Galleria mellonella. We selected 100 clones from dead larvae. Sequencing of the inserts followed by a second screen for specific in vivo induction led to the identification of 20 in vivo-induced genes (ivi genes). They belonged to several different functional classes: regulation, metabolism, DNA repair and replication, cell division, transport, virulence and adaptation. A strongly induced gene, ivi29, was further analysed. It encodes an internalin-like protein with four distinct domains: an N-terminal signal peptide for export, a NEAT domain thought to be involved in iron transport, a leucine-rich repeat domain that may interact with host cells, and a

Accepted 31 July, 2006. For correspondence. \*E-mail Christina. Nielsen@jouy.inra.fr; Tel. (+33) 1 30 83 36 42; Fax (+33) 1 30 43 80 97; \*\*E-mail Didier.Lereclus@jouy.inra.fr; Tel. (+33) 1 30 83 36 35; Fax (+33) 1 30 43 80 97. <sup>†</sup>Present address: Unité Protéomie Fonctionnelle et Biopréservation Alimentaire, Institut Supérieur des Sciences Biologiques Appliquées de Tunis. 9, Avenue Zouhaier Essafi, 1006 Tunis, Tunisia. <sup>‡</sup>These authors contributed equally to this work.

© 2006 The Authors Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd C-terminal SLH domain presumably binding the protein to the peptidoglycan. As suggested by a Fur box in the promoter, transcriptional analysis showed *ivi29* expression to be repressed by iron, suggesting that expression was induced *in vivo* due to iron deprivation in the host. This iron-regulated, leucine-rich surface protein was designated IIsA. Disruption of *iIsA* reduced the virulence of the bacteria to the insect larvae indicating its role in the overall pathogenesis of *B. cereus*.

#### Introduction

Bacillus cereus, Bacillus anthracis and Bacillus thuringiensis are Gram-positive spore-forming bacteria that colonize hosts as diverse as insects and mammals (Jensen et al., 2003). These three species, belonging to the Bacillus cereus sensu lato group, are closely related and were originally defined on the basis of characteristic features, such as the presence of a capsule and toxins for B. anthracis, and the presence of insecticidal crystal proteins for B. thuringiensis. The B. anthracis genes specifying the capsule and the toxic factors responsible for anthrax, and the genes encoding the insecticidal toxins of B. thuringiensis are located on large plasmids (Kolstø et al., 2002). In contrast, the genetic determinants required for other aspects of infection (adhesion and colonization) may be common to all three species and located on the chromosome.

*Bacillus cereus (sensu stricto)* is generally regarded as a pathogen causing food-borne gastroenteritis due to the production of diarrhoeal or emetic toxins (Granum and Lund, 1997; Kotiranta *et al.*, 2000). However, rare but serious opportunistic non-gastrointestinal infections, such as endophthalmitis and pneumonia, have been attributed to *B. cereus* (Miller *et al.*, 1997; Callegan *et al.*, 1999; Hilliard *et al.*, 2003). In addition, a *B. cereus* strain was recently found to be responsible for severe infections resembling anthrax (Hoffmaster *et al.*, 2004). The close relationships between the species forming the *B. cereus* group, the widespread presence of *B. thuringiensis* and *B. cereus* in soil and food environments, and the potential emergence of new pathogens in this group of bacteria may pose important public health problems.

The roles of the B. anthracis- and B. thuringiensisspecific toxins and the expression patterns of their genes have been extensively studied and reviewed (Schnepf et al., 1998; Mock and Fouet, 2001). A number of factors have also been implicated in gastrointestinal and nongastrointestinal diseases associated with B. cereus or B. thuringiensis: enterotoxins, haemolysins, cytotoxins and various degradative enzymes (for review, see Granum and Lund, 1997; Kotiranta et al., 2000). Most of these exported virulence factors belong to the PIcR regulon (Lereclus et al., 1996; Agaisse et al., 1999). PIcR is a transcriptional regulator activated, at the onset of stationary phase, by a small signalling peptide (PapR) acting as a quorum-sensing effector (Slamti and Lereclus, 2002). Deletion of *plcR* reduces the virulence of bacteria in various infection models (Salamitou et al., 2000; Callegan et al., 2003). Some PlcR-regulated genes (hbl, nhe, cvtK and inhA2) seem to play a major role in pathogenesis (Beecher et al., 1995; Lund and Granum, 1996; Lund et al., 2000; Fedhila et al., 2002a). However, the deletion of *plcR* decreased, but did not abolish virulence, suggesting that unidentified factors not regulated by PIcR are involved in pathogenesis.

Several genes other than those encoding extracellular toxins and degradative enzymes have been shown to be involved in the adaptation of *B. cereus* or *B. thuringiensis* to the host environment following the injection of these bacteria into the insect haemocoel. These genes, identified by transposition or directed mutagenesis, are the fur gene, encoding a transcriptional repressor controlling genes involved in iron uptake (Harvie et al., 2005), the clpP1 gene, encoding an ATP-dependent Clp protease (Fedhila et al., 2002b), and the yggB, ygfZ genes of unknown function (Fedhila et al., 2004). The factors encoded by these four genes seem to be involved in adaptive responses contributing to the fitness of the bacteria during infection. However, the major virulence determinants involved in the persistence and propagation of B. cereus in an infected host remain unknown.

Genetic systems known as *in vivo* expression technology (IVET) provide an efficient mean of selecting promoters induced during specific growth conditions. This technology was first developed for Gram-negative pathogens, as a mean of identifying the bacterial genes specifically expressed during colonization of a susceptible host (Osbourn *et al.*, 1987; Mahan *et al.*, 1993; Camilli *et al.*, 1994; for review, see Rediers *et al.*, 2005). A similar IVET strategy, based on the site-specific recombinase Tnpl of the *B. thuringiensis* transposon Tn4430 (Mahillon and Lereclus, 1988), was developed for the identification of genes transiently and conditionally expressed in *Bacillus subtilis* (Salamitou *et al.*, 1997). We describe here the adaptation and application of this system to the identification of *B. cereus* genes specifically expressed during infection, following oral inoculation in a susceptible insect, Galleria mellonella. This method was chosen to mimic the gastrointestinal infection and to uncover genes specifically induced during the whole infection cycle, including those interacting with the digestive tract. Lepidopteran models are frequently used for investigating the genetic determinants of bacterial virulence following intrahaemocoelic injection and give results comparable to those from mammalian infection models (Brennan et al., 2002; Kaito et al., 2002). G. mellonella can be used for oral infection and have already permitted to identify various virulence genes of bacteria belonging to the B. cereus group (Salamitou et al., 2000; Fedhila, 2002; Bouillaut et al., 2005). This is the first time that the IVET strategy has been applied to *B. cereus*, and the first time that such a genetic approach has been used to identify virulence genes in an invertebrate host. In addition, we explored one of the strongly induced genes, encoding an internalinlike protein, which was found to have a role in virulence in the insect larvae.

#### Results

#### Construction of the IVET genetic system

An IVET approach was developed to identify B. cereus genes expressed following oral infection of the insect host G. mellonella. The experimental protocol originates in the previously reported IVET genetic system (Salamitou et al., 1997), using the site-specific recombination mediated by the integrase Tnpl (Mahillon and Lereclus, 1988). This system was originally based on the use of two compatible plasmids. The first (pHT1618-I) served as a promoter trap vector, allowing fusions to a promoterless copy of *tnpl*. The second (pHT304-R2) carried two selectable resistance genes: a non-functional aphA3 kanamycin resistance gene and a Cat<sup>R</sup> chloramphenicol resistance cassette, separating the coding sequence and the promoter of the aphA3 gene. The Cat<sup>R</sup> cassette is flanked by two internal resolution sites (designated R in Fig. 1A), at which Tnpl catalyses recombination (Mahillon and Lereclus, 1988). We modified this system in three ways to improve it and to adapt it to B. cereus strain ATCC14579. First, the promoterless copy of the *tnpl* gene and its upstream region were transferred from pHT1618-I to pHT304, to give pHT304-I (Fig. 1A). Second, we replaced the Cat<sup>R</sup> cassette by the *spc* gene in pHT304-R2, conferring spectinomycin resistance, to give pHT304-R2SK. Third, the DNA fragment carrying the aphA3 gene disrupted by the Spc<sup>R</sup> cassette (designated in this study by the R2SK insert) was purified from pHT304-R2SK and integrated into the B. cereus chromosome at the tetB locus (Fig. 1A). These modifications serve three main purposes. First, unlike pHT1618, pHT304 is a low-copy-



Fig. 1. The B. cereus IVET reporter system used in an insect infection model.

A. Description of the IVET reporter system constructed in B. cereus ATCC14579. The chromosomal construct used to report tnpl expression in Bc::R2SK is as follows. The R2S cassette is composed of a spectinomycin resistance gene (spc) flanked by two copies of site-specific recombination sequences (R). The R2SK insert is composed of a non-functional kanamycin resistance aphA3 gene, the coding sequence of which is separated from its promoter by the R2S cassette. pHT304-I is a derivative of pHT304 (Arantes and Lereclus, 1991) carrying an erythromycin resistance gene (erm) and the tnpl cassette containing a promoterless copy of tnpl preceded by a transcriptional terminator (t) and a multicloning site (Salamitou et al., 1997). Integrase Tnpl catalyses site-specific recombination at the R sites, resulting in excision of the spc resistance gene from the chromosome and restoration of a functional aphA3 gene; the progeny of resolved reporter cells thus become Spc<sup>s</sup> and Km<sup>R</sup>.

B. Screening of the B. cereus genomic library in insects. The Spc<sup>R</sup>, Km<sup>S</sup> B. cereus strain Bc::R2SK harbouring the genomic library cloned into pHT304-I was first grown in LB medium (in vitro screening) to eliminate clones carrying promoters expressed in LB medium. We then used 10<sup>6</sup> unresolved Spc<sup>R</sup> bacteria to infect *G. mellonella* larvae via the oral route. A control experiment was performed by growing a similar inoculum in LB medium. The Km<sup>R</sup> resolved bacteria were recovered from brownish and black dead larvae, or from the LB culture.

number plasmid giving a high transformation frequency, and is stably maintained in the progeny bacteria in the absence of selection pressure (Lereclus and Arantes, 1992). Second, unlike the *cat* gene, the Spc<sup>R</sup> cassette is an efficient selection marker in B. cereus. Third, integration of R2SK into the chromosome prevents the coexistence of resolved and unresolved forms of pHT304-R2 within the bacterial cell.

#### Testing the validity of the IVET system in B. cereus

We carried out two control experiments to check that the modified IVET system functioned correctly in B. cereus strain ATCC14579. We first determined the extent of background (promoter-independent) resolution by estimating resolution of the R2S cassette in Bc::R2SK containing pHT304-I without an insert. We did this by determining the percentage of bacteria gaining resistance to kanamycin. No resolution was detected in vitro in B. cereus cells grown for about 10 generations, meaning that no Km<sup>R</sup> colonies were found out of 10<sup>4</sup> screened colonies. We then determined the suitability of pHT304-I for use as a promoter trap vector in *B. cereus* by placing the tnpl coding sequence under the control of a DNA fragment carrying the xylose-inducible xylA promoter and the xyIR repressor of the B. subtilis xyI operon. Expression of the *B. subtilis xyl* operon is dependent on xylose, which binds to the XyIR repressor, releasing it from the operator site upstream from the first xyl operon gene, xylA (Gärtner et al., 1988). The resulting plasmid, pHT304-Pxyl'l, was introduced into Bc::R2SK cells and the response of the system to xylose-dependent induction of xyl promoter was evaluated by quantifying the resolution frequencies of the transformant clones in response to the

A

addition of xylose. The resolution frequency was established after growing the transformant bacteria to stationary phase in HCT medium. This medium was used instead of LB which contains traces of xylose. No resolution was detected in absence of xylose, while the resolution was complete (100% Spc<sup>S</sup>, Km<sup>R</sup> clones) in bacteria cultured in the presence of 1 mM xylose. Thus, this genetic system functions correctly in *B. cereus*, because it detected an active promoter and displayed no background resolution. It can therefore be used to screen for *B. cereus* promoters induced by particular environmental conditions.

# Screening for B. cereus genes expressed during host infection

A library containing random genomic fragments (0.5-1.5 kb) from B. cereus strain ATCC14579 was constructed in pHT304-I and introduced into Bc::R2SK. Bacteria harbouring the genomic library was cultured in LB medium containing spectinomycin in order to remove the majority of promoters expressed under usual culture conditions (including PIcR-regulated genes). Indeed, this step results in an enrichment of promoters which are not functional in vitro (LB medium). After a number of rounds of growth (50 generations) to late stationary phase in this medium, the unresolved (Spc<sup>R</sup>) bacteria were pooled and used to orally inoculate G. mellonella larvae, together with B. thuringiensis Cry1C toxin. This model of pathogenesis is based on the synergistic effects of B. cereus cells on the toxic activity of B. thuringiensis Cry1C. Larvae of the lepidopteran species G. mellonella are susceptible to B. cereus/B. thuringiensis cells and toxin ingested as a mixture but are weakly susceptible to toxins or bacterial cells ingested separately (Li et al., 1987; Salamitou et al., 2000; Fedhila et al., 2002a). Twenty-four hours post infection with the mixture, the bacteria have penetrated the intestinal barriers and invaded the haemocoel resulting in septicaemia and larval death (C. Nielsen-LeRoux, unpubl. data). Preliminary experiments confirmed that B. cereus strain Bc::R2SK was as virulent as the wild-type strain in this infection model.

Larvae were fed with about  $10^6$  vegetative bacterial cells from the genomic library, together with a non-lethal dose of Cry1C protein (3 µg per larva; Fig. 1B) resulting in at least 25% mortality. As a control, a similar inoculum was grown to saturation in LB medium devoid of antibiotics. This made it possible to estimate the number of residual resolved cells that escaped the pre-screening step *in vitro*, or that arose during an additional round in LB medium. Bacterial cells were harvested from both LB medium (used as a control) and dead larvae, and were screened for resistance to kanamycin. From each dead larvae, we recovered about  $10^8$  colony-forming units (cfu) out of which  $10^4$  had switched to the Km<sup>R</sup> phenotype (Fig. 1B). In sharp contrast, only 10<sup>2</sup> of the 10<sup>8</sup> cfu recovered from the LB control were Km<sup>R</sup>. Insect larvae infection experiments were repeated, and the ratio of Km<sup>R</sup> clones was found to be similar (10<sup>4</sup> from dead insect larvae, versus 10<sup>2</sup> from LB medium). This suggested that most of the Km<sup>R</sup> bacteria recovered from dead insect larvae resulted from a resolution event specifically induced during infection.

# Identification of the in vivo expression of selected putative ivi genes

One hundred Km<sup>R</sup> clones were randomly isolated from eight dead larvae resulting from two independent infection assays. The genomic DNA fragments located upstream from tnpl were amplified by PCR, sequenced and analysed by comparison with sequences in the B. cereus genome sequence database (http://www.integratedgenomics. com). This analysis led to the characterization of 37 DNA inserts carrying untranslated regions mapping upstream from a coding sequence, thus suggesting the presence of a promoter. The other 63 clones were discarded: some of them were redundant plasmids and the others harboured DNA fragments corresponding to intragenic regions or located downstream from coding sequences. The 37 putative ivi (in vivo induced) promoters were verified by individual screening in vivo and in vitro. Plasmids from each resolved clone (designated pHT304-ivin'l with n corresponding to the lvi clone number) were isolated and introduced separately into the unresolved Bc::R2SK strain. Transformants, selected on media containing spectinomycin and erythromycin, were analysed for resolution of their R2S cassette in vitro, after growth to saturation in LB medium and in vivo, in orally infected insects (Fig. 2). In 20 of the 37 clones the presence of specifically in vivo induced genes was confirmed, with in vivo resolution exceeding 2% and at least twice as high as in vitro resolution. Table 1 presents the 20 ivi genes. Various functions have been assigned to these genes in the B. cereus genomic sequence database, including transcriptional regulation, cell division, DNA repair and replication, transport systems, metabolism, virulence, adaptation and unknown functions.

To verify that *in vivo* induction of *ivi* genes was specifically due to the host environment and not to the presence of Cry1C toxin, the 20 *ivi* genes were subjected to a second *in vitro* analysis. Resolution of these 20 *ivi* genes was analysed after growth to saturation in LB medium supplemented with 0.3 mg ml<sup>-1</sup> toxin Cry1C. No resolution (< 1%) was detected for the 20 clones grown in LB medium with or without the Cry1C toxin (not shown). This result indicates that induction of the 20 *ivi* genes occurred in response to a host environment signals and not to the toxin.



**Fig. 2.** Resolution analysis of individual lvi clones. Unresolved *Bc*::R2SK bacteria bearing pHT304-*ivin*'l were grown either in LB medium (*in vitro*) or in orally infected insects (*in vivo*). Bacteria were then recovered from stationary-phase cultures in LB medium and from dead larvae, and plated on selective LB media containing antibiotics. The percentage of resolvants (resolution frequencies) was determined by calculating the frequency of Km<sup>R</sup> colonies, as described in *Experimental procedures*. Values are expressed as the mean of at least three measurements obtained from independent experiments. Error bars indicate the standard error of the mean.

One of the strongly expressed *ivi* genes was selected for further analysis. Indeed, the Ivi29 clone was highly active during insect infection (> 90% resolution) and displayed almost no *in vitro* activity (< 1%). This clone was of particular interest because the sequence of the upstream DNA fragment (the *ivi29* insert) controlling *tnpl* expression was found to bear the promoter region of a gene encoding an internalin-like protein. This gene *orf29* was designated RZC04714 in the Integrated Genomics nomenclature (Fig. 3). We hypothesized that the production of Tnpl and subsequent resolution of the Ivi29 clone were linked to the activity of the *orf29* promoter. Given the internalin function assigned to this gene and of the important role played by internalin proteins in the virulence of many pathogenic bacteria, including *Listeria monocytogenes, Yersinia pestis* and *Shigella flexneri* (Leung *et al.*, 1990; Braun and Cossart, 2000; Fernandez-Prada *et al.*, 2000), we decided to focus on the *orf29* gene of *B. cereus*.

#### Molecular features of B. cereus orf29

In the *ivi29* insert, the *orf29* gene is preceded by a 121 bp open reading frame (ORF) encoding a protein of unknown function and by 647 bp corresponding to the 3' terminal region of a gene (*iolR*) encoding a protein belonging to a family of transcriptional regulators of sugar metabolism,

Table 1.	Bacillus	cereus	genes	expressed	specifically	/ during	insect	infection
----------	----------	--------	-------	-----------	--------------	----------	--------	-----------

Clone No.	Gene/ORF <sup>a</sup>	Assigned function <sup>b</sup>
Unknown		
lvi1	RZC02761	Hypothetical exported protein
lvi3	ysoA	TPR repeat protein
Regulatory function	1	
lvi4	RZC05116	Transcriptional regulator, MerR family
lvi5	yaaK	Hypothetical transcriptional regulatory protein
lvi6	yjdl	Regulatory protein
Metabolism		
lvi10	yhfP	Alcohol dehydrogenase
lvi12	argF	Ornithine carbamoyltransferase
lvi14	etfA	Electron transfer flavoprotein alpha-subunit
lvi15	cydA	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I
lvi16	pdhC	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex
lvi18	mmgE	2-Methylcitrate dehydratase/2-methylisocitrate dehydratase
lvi19	RZC04991	HesB-like protein
Cell division		
lvi23	yacA	Cell cycle protein MesJ
Transport systems		
lvi25	RZC02976	Murein hydrolase exporter
Known or predicted	d role in virulence, adaptation a	and survival to suboptimal conditions
lvi28	clpC	ATPase subunit of the Clp ATP-dependent proteases
lvi29	RZC04714	Internalin
lvi31	RZC02452	Transporter, drug/metabolite exporter family
lvi32	yvrC	Ferrichrome-binding protein
lvi35	motA/motB	Chemotaxis MotA/MotB proteins
lvi36	dnaK	Chaperone protein DnaK

a. For certain clones, the insert DNA sequence extending upstream from the *tnpl* fusion point carried more than one putative coding sequence reading in the correct orientation with respect to the integrase gene.

**b.** Genetic nomenclature and relative functions assigned to each lvi clone were as specified in the *B. cereus* genome sequence database (http://www.integratedgenomics.com).

#### © 2006 The Authors Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd, *Molecular Microbiology*, **62**, 339–355



Fig. 3. Chromosomal localization and promoter region of the *ivi29* insert. The location of the *ivi29* insert in the *B. cereus* genome was determined by comparison of the insert DNA sequence with the *B. cereus* genomic database, using BLAST. Potential stem-loop structures are represented. The segments indicate the DNA fragments used to construct the *lacZ* plasmid transcriptional fusions. The ribosome binding site and the translational start codon are indicated in bold letters. The potential Fur box is indicated by head-to-head arrows in the nucleotide sequence.

DeoR (Fig. 3). The *orf29* gene is predicted to encode a protein of 760 amino acids displaying 22% identity to InIA (internalin A) of *L. monocytogenes*. A 28-amino-acid potential N-terminal signal sequence was identified by the SIGNALP 3.0 prediction program (Fig. 4). We subjected the predicted sequence of the protein encoded by *orf29* to analysis with the NCBI conserved domain search programs (PFAM and SMART). Three families of conserved domains were detected: an N-terminal iron transportassociated domain (NEAT domain) followed by a leucine-

rich repeat (LRR) region and three C-terminal S-layer homology (SLH) domains (Fig. 4). All 13 LRRs are 22 residues in length and closely resemble the consensus motif for LRR internalin proteins (Marino *et al.*, 2000; Kobe and Kajava, 2001). Eleven of the 13 LRRs have a conserved asparagine residue known as the Asn ladder (Kobe and Deisenhofer, 1995).

Analysis of the nucleotide sequence of the *orf29* promoter region revealed the presence of a palindromic sequence (5'-GATAATGA GAT TCATTATC-3'), located

-	1	MKKNYMKALVVATTLAIPFATYSTPAL <u>A</u> ALKVEANQSVAAAS				
21	43	DRTYDTEIKIYKDQKDEPSMVSQYIKDPKVTIAAGKKIVTVTMQDSDYFQYLRIEDKNQPGVFHDVKVLSEDKRKNGTKVVQFEIG				
₿L	129	EFEKKHNMQMHILIPAIGYDHKYQVQFEIKDPT				
	162	VGNKETEKPDDNSNSGNTETDNPVDNQNMITDNKLRELVNKKVFNR				
Г	208	KDLNTPITKEDLLQVKDLFLNT				
	230	NEILDYSALKYMPNLKSLTVAN				
	252	AKIKDPSFFANLKQLNHLALRG				
	274	NEFADVTPLVKMDNLESLDLSN				
	296	NKITNVAPLTEMKNVKSLFLSG				
۲.	318	NQIEDVTALAKMEQLDYLNLAN				
51	340	NKITNVAPLSNLKNVTYLTLAG				
_	362	NQIEDIKPLYTLP-LKDLVLTR				
	383	NKVKDLSGIDQLNQLQELWIGK				
	405	NEITDVTPLSKMTQLKILNLPN				
	427	NELKDITPLSSLVNLQKLDLEA				
	449	NYISDLSPVSNLKKLVFLSFVA				
L	471	NEIRDVRPVIELSKTAYINVQN				
	493	$\label{eq:construction} QKVFLEETEVNKEVKVPIYEKDGEISTKIRLKSDNGTYSNGVVKWSTPGEKVYEFGVKDPFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFFGVKDFFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFFGVKDFFGVKDFFADTGIFFTGSVIQNVVESKDGNTSKFGVKDFFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFGVKDFFFFGVKDFFFGVKDFFFFGVKDFFGVKDFFFGVKDFFFGVKDFFFGVKDFFFGVFFFFFGVFFGVVFFFFGVKDFFFFFFFFFF$				
± [	579	EDEKTEVVE <b>FKDVPKGHWSEEAINYLAKEKLFIGYGNGEFGFGDNITRGQVA</b> LLIQRYLKL				
5	640	ENNLEQKTA <b>FTDT-KGNMYETAIDAVVQAGIMTGYGNGMFRPDGVLTRYEM</b> SVVLQRVFQL				
• <u> </u>	700	KENENSAEN <b>FKDVPNGHWAKGYVKALVDNKISKGDGEGNFLGDNFVTREQYA</b> QFLYNAIKK				
		N-L-DLLLL-L				
		LRR consensus				

Fig. 4. Characteristics of the predicted amino acid sequence of Ivi29. The putative signal sequence for secretion is indicated by an arrow. The NEAT and SLH domains are shown in bold typeface. Conserved positions of the LRRs are shaded. The consensus leucine-rich repeat region is indicated.

64 bp upstream from the translation start codon (Fig. 3), and highly similar to the Fur box consensus (5'-GATAATGA TAA TCATTATC-3') (de Lorenzo et al., 1987). Analysis of the B. cereus ATCC14579 genome indicated that orf29 was identical to orf RZC04714, for which a putative Fur box was mentioned (Harvie et al., 2005). This sequence is an operator sequence that binds the Fur regulator (for review, see Litwin and Calderwood, 1993). Fur is a transcriptional repressor of iron-regulated promoters because it displays Fe2+-dependent DNA-binding activity; a decrease in Fe<sup>2+</sup> concentration will consequently induce transcription of genes possessing a Fur box. These findings indicate that orf29 might be a Fur-regulated gene. The presence of a NEAT domain, involved in Fe<sup>3+</sup> siderophore transport (Andrade et al., 2002) in the N-terminal region of the predicted amino acid sequence of the protein encoded by orf29, is consistent with this suggestion.

#### Expression of orf29 is repressed by iron

The effect of iron on orf29 expression was investigated by constructing transcriptional fusions between the lacZ reporter gene and orf29 upstream regions in the lowcopy-number plasmid pHT304-18'Z (Agaisse and Lereclus, 1994). DNA fragments corresponding to the whole ivi29 insert or to the presumed promoter region of orf29 only were amplified by PCR and inserted upstream from the *lacZ* coding sequence to give pHT-ivi29'Z and pHT-orf29'Z respectively (Fig. 3). These plasmids were introduced into *B. cereus* by electroporation, and β-galactosidase activity was monitored at various stages of growth, at 37°C, in standard conditions (LB medium) or in the presence of two iron-specific chelators: dipyridyl and EDDHA. In LB medium, B. cereus cells harbouring the plasmid pHT-orf29'Z displayed β-galactosidase activity inferior to 180 U mg<sup>-1</sup> protein (Fig. 5A). The addition of dipyridyl was immediately followed by a large increase in orf29 transcription (β-galactosidase activity increased to about 9000 U mg<sup>-1</sup> protein), indicating that orf29 expression is induced by iron deprivation. Similar results were obtained after the addition of EDDHA (results not shown). The bacteria harbouring pHT-ivi29'Z gave similar β-galactosidase activities and identical expression profiles (not shown): low levels of expression were observed in LB medium and a strong increase of *lacZ* expression was observed after addition of chelators. Strains harbouring pHT-*ivi29*'Z or pHT-*orf29*'Z gave similar β-galactosidase activities. This indicates that the transcriptional activity of the ivi29 DNA insert was mediated by the orf29 promoter region cloned in pHT-orf29'Z. To verify that orf29 expression was specifically regulated by iron, ferric ions (FeCl<sub>3</sub>) were added in excess to a final concentration of 0.8 mM. Expression of the orf29 promoter was determined at dif-



Fig. 5. Effect of iron on *orf29* transcription. A.  $\beta$ -Galactosidase activity for *B. cereus* ATCC14579 carrying pHT-*orf29*/*Z*. The bacterial cells were grown at 37°C in either LB medium ( $\bigcirc$ ) or LB medium supplemented with the iron chelator dipyridyl (0.2 mM) ( $\square$ ). Dipyridyl was added to the culture 1 h before the onset of stationary phase (time 0). Ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>) in excess (0.8 mM) was added to LB medium supplemented with dipyridyl 1 h before the time 0 ( $\triangle$ ) or at time 0 (\*).

B. Iron-dependent expression of the *ivi29'-tnpl* fusion. Unresolved *Bc*::R2SK bacteria bearing pHT304-*ivi29'*I were grown to late stationary phase either in LB medium or in LB supplemented with EDDHA. Bacteria were recovered from both media and the percentage of bacteria shifting to the Km<sup>R</sup> phenotype was determined. Values are expressed as the mean of three measurements. Error bars indicate the standard error of the mean.

ferent growth stages. A weak  $\beta$ -galactosidase activity was recorded when iron was added at the same time as the dipyridyl (Fig. 5A), and a decrease in  $\beta$ -galactosidase activity was immediately observed after adding ferric ions at the onset of the stationary growth phase. These results indicate clearly that *orf29* is an iron-regulated gene. We therefore named *orf29* '*ilsA*' for gene encoding an iron-



**Fig. 6.** Quantification of *orf29* expression during infection. The  $\beta$ -galactosidase activity was measured in infected larvae at 8 h (alive) and 24 h (dead) for *B. cereus* ATCC14579 carrying pHT-*orf29'Z*, and at 24 h for bacteria carrying pHT304-*18'Z* (control). Values are means of four different larvae and error bars indicate the standard error of the mean.

regulated leucine-rich surface protein. We then investigated whether iron deprivation also induced *tnpl* expression and resolution in the lvi29 clone. We carried out an additional experiment in which *Bc*::R2SK cells carrying pHT304-ivi29'I were cultured to stationary phase in LB medium (control) or dipyridyl and EDDHA-treated LB medium, and analysed for resolution. Iron deprivation resulted in a higher degree of resolution for both chelators than was observed with the control (only results with EDDHA are shown) (Fig. 5B). These results are consistent with the *lacZ* fusion activities obtained. They suggest that *in vivo* resolution of the lvi29 clone resulted from iron deprivation in infected insects.

#### Quantification of ilsA transcription during infection

To determine whether iron deprivation may occur in the infected insects, the in vivo expression of ilsA was assayed by infecting insect larvae with bacteria harbouring pHT-orf29'Z. The β-galactosidase activity was measured from bacteria recovered from the insects at various stages after infection (Fig. 6). Low β-galactosidase activity was found in bacteria recovered from alive larvae. In sharp contrast, B. cereus cells recovered from dead larvae showed a high β-galactosidase activity of about 1000 U mg<sup>-1</sup> protein. *B. cereus* containing the plasmid pHT304-18'Z, without the promoter region, displayed a  $\beta$ -galactosidase activity inferior to 10 U mg<sup>-1</sup> protein. Thus, the orf29-directed lacZ expression confirms the high resolution rate obtained in vivo with the lvi-29 plasmid, which may indicate that free iron is limited during infection.

#### Virulence potential of iIsA in insect infection

It has been demonstrated that the surface internalin proteins (InIA and InIB) of the pathogenic bacterium L. monocytogenes play important roles in the entry into the cultured mammalian cells and are required for the pathogenicity of this bacterium (Dramsi et al., 1997). To determine whether IIsA is essential for the pathogenesis, an ilsA mutant was constructed in B. cereus and its virulence was estimated in G. mellonella by oral infection. After infection with various doses of spores  $(5 \times 10^3 \text{ to})$  $5 \times 10^6$ ) associated with 3 ug of Crv1C toxin, dead and living larvae were recorded. The 50% lethal doses (LD<sub>50s</sub>) of the wild-type strain *B. cereus* ATCC14579 and of the *B. cereus*  $\Delta ilsA$  mutant were evaluated by Probit analysis (Fig. 7). The wild-type strain had a  $LD_{50}$  of  $1.58 \times 10^4$ spores  $(1.47 \times 10^3 \text{ to } 1.5 \times 10^5)$ , and the mutant had a  $LD_{50}$  value of  $2.12 \times 10^5$  spores ( $6.42 \times 10^4$  to  $7.29 \times 10^5$ ). These results indicated that the mutant was significantly less virulent than the wild type: a decrease of 13.4-fold (6.3-28.6 at the 95% confidence limits) was determined by comparing the two dose-response regression lines.

#### Discussion

An IVET genetic system based on site-specific recombination has been developed in *B. subtilis* (Salamitou *et al.*, 1997). In this study, we successfully adapted the system for use in *B. cereus*, for the identification of genes specifically induced during host infection. This screen, based on oral infection of *G. mellonella* larvae by *B. cereus* associated with Cry1C, resulted in the identification of 20 *in vivo* induced clones.

On the basis of similarities to known sequences, we have assigned to these genes various cellular functions



**Fig. 7.** Effect of *ilsA* mutation on virulence against the insect *G. mellonella*. Twenty last-instar larvae were force fed with 3 µg of Cry1C toxin associated with spores (from  $5 \times 10^3$  to  $5 \times 10^6$ ). Dose-mortality responses were observed 24 h after ingestion of *B. cereus* ATCC14579 (bold line, +) and *B. cereus* ATCC14579  $\Delta ilsA$  (dotted line,  $\diamondsuit$ ) and analysed by Probit. Experiments were repeated at least three times. No mortality was obtained in the control (NaPi buffer alone).

such as regulation of gene expression, metabolism, cellular division, transport system, virulence and adaptation determinants, or still unknown functions (Table 1). It is notable that known *B. cereus* virulence genes including haemolysin Clo, enterotoxins Hbl and NhE and cytotoxin CytK were not identified in this study. All these genes belong to the PlcR regulon, which is highly expressed in early stationary phase in LB medium (Lereclus *et al.*, 1996) and were likely removed during the pre-screen in LB medium.

#### Genes regulated by iron

A major part of the present work deals with the ivi29 gene strongly expressed in vivo. It possesses a Fur box in the promoter region and encodes a protein similar to internalins of L. monocytogenes, which we named IIsA, for ironregulated leucine-rich surface protein. IIsA contains a LRR region with conserved leucine and isoleucine residues. LRRs are short sequence motifs (20-29 amino acids) that seem to be involved in protein-protein interactions (Kobe and Deisenhofer, 1995). The IIsA LRR motifs closely resemble those of *L. monocytogenes* internalins. The strongest similarity was found with the InIA protein of L. monocytogenes (data not shown), which is required for entry into human epithelium cells (Gaillard et al., 1991) expressing the InIA receptor E-cadherin (Mengaud et al., 1996). LRRs favour entry by interacting directly with E-cadherin receptors (Lecuit et al., 1997; Schubert et al., 2002). The similarity between IIsA and InIA LRRs suggests that the *B. cereus* internalin interacts with host cells via specific protein receptors. As previously reported, most of the L. monocytogenes internalins, including InIA, have a C-terminal LPXTG, a signature sequence necessary for the sorting and cell wall anchoring of many surface proteins in Gram-positive bacteria (Bierne et al., 2002; Garandeau et al., 2002). Unlike these internalins, IIsA lacks the LPXTG motif. Instead, it has three SLH C-terminal domains. SLH domains are present in S-layer proteins and other cell wall proteins and provide anchorage to peptidoglycans. Previous studies have demonstrated that S-layer domain proteins are non-covalently peptidoglycan-associated anchored to polymers (Mesnage et al., 2000). These findings and the presence of a typical N-terminal signal peptide suggest that IIsA is a surface protein attached to the cell wall via an anchoring mechanism involving the SLH domains.

The N-terminal NEAT motif is another important structural characteristic of IIsA. NEAT domains (for <u>near</u> Fe<sup>3+</sup> siderophore transporter) are anchored to the extracellular side of the bacterial membrane and seem to be involved in iron transport (Andrade *et al.*, 2002). Our data demonstrate that *ilsA* is induced in response to iron starvation. The promoter region of *ilsA* contains a putative Fur box, suggesting that *ilsA* is part of the Fur regulon of *B. cereus*. Indeed, the presence of a Furencoding gene in *B. cereus* 14579 strain was mentioned by Harvie et al. (2005). Fur is a transcriptional repressor of iron-regulated promoters in many bacterial species (Escolar et al., 1999). In Escherichia coli, Fur binds Fe<sup>2+</sup> ions when intracellular concentrations of Fe<sup>2+</sup> exceed a threshold. As a result of this binding. Fur acquires a conformation in which it is able to bind DNA target sequences and to inhibit the transcription of the downstream genes. Fur has been associated with virulence in many pathogenic bacteria. Several virulence genes are repressed by Fur (for review, see Litwin and Calderwood, 1993), and Fur-deficient mutants of Staphylococcus aureus and B. cereus 569 strain were found attenuated in virulence (Horsburgh et al., 2001; Harvie et al., 2005). Then, although Fur-regulated genes are required for virulence, the constitutive expression of the complete Fur regulon (in a fur mutant), does not result in increased virulence. Indeed, the uncontrolled expression of the Fur regulon might result in an increase of intracellular iron and disorder of many cellular functions (Litwin and Calderwood, 1993). Moreover, a fur mutant is more sensitive to the oxidative burst (ROS, reactive oxygen species, and IRC, immune regulated catalase) which are major defence mechanisms of the host in response to infection (Ha et al., 2005; Harvie et al., 2005). It has been suggested that the Fur-dependent expression of virulence factors is triggered by the lack of iron in mammalian host tissues. Similarly, the lack of free iron in insect tissues may be responsible for the high level of ilsA induction during insect infection, as shown by IVET and *lacZ* transcriptional fusions (Figs 2 and 6). Indeed, an increase in levels of insect haemolymph iron-binding proteins (such as transferrin and apoferritin) has been reported in response to infection. This is the case for Aedes aegypti larvae parasitized with nematodes (Beerntsen et al., 1994) and for Drosophila melanogaster infected with E. coli (Yoshiga et al., 1999).

LRR proteins have been reported to contribute to virulence of several invasive bacteria like *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* SIrP (Miao *et al.*, 1999); YopM of *Y. pestis* (Leung *et al.*, 1990), IpaH (7.8) of *Shigella flexneri* (Fernandez-Prada *et al.*, 2000) and InIA and InIB of *L. monocytogenes* (for review, see Braun and Cossart, 2000). The NEAT domain of iron-transport proteins, generally found in pathogenic bacteria, may also be associated with virulence (Andrade *et al.*, 2002). The role of *ilsA* was investigated by assessing the virulence of the deletion mutant *B. cereus*  $\Delta ilsA$  in *G. mellonella* infected orally. The deletion of *ilsA* reduced significantly the virulence of the bacteria: indeed, for the *ilsA*-deficient strain, 13.2-fold more bacteria are required to induce 50% mortality, as compared with the wild type. This suggests that IIsA plays an important role during the infection process. However, *B. cereus* is generally not considered as an intracellular bacterium (Kotiranta *et al.*, 2000), although a few studies have suggested this (Rowan *et al.*, 2001; Minnaard *et al.*, 2004). Thus, LRR domains of IIsA might have a function related to iron acquisition rather than to internalization. Further investigations, of the *iIsA* mutant, related to growth rate and interactions with the insect immune-defence are required to elucidate the role of IIsA.

Additionally, a gene (RZCO5890) also encoding an internalin-like protein and belonging to the Fur regulon was identified in the genome of B. cereus ATCC14579 strain (Harvie et al., 2005). The product of this gene shares similarities with IIsA: in addition to a putative iron regulation, the protein possesses two LRR domains (respectively composed of 10 and 5 conserved LRRs) and a hydrophobic C-terminal region suggesting that it could also be a bacterial surface protein (data not shown). Based on these characteristics, this protein was designated IIsB. The deletion of the iIsB gene did not significantly reduce the virulence of the bacteria against G. mellonella larvae. LD<sub>50</sub> analysis showed that virulence of the *ilsB* mutant strain was only reduced with 2.4-fold, as compared with the wild type (not shown). Although IIsB does not directly affect virulence, a function during the pathogenesis cannot be excluded. The putative role of these two internalin-like proteins in B. cereus iron homeostasis should be investigated.

The importance of iron during infection was assayed by measuring the resolution frequency of the 20 selected ivi clones in response to iron deprivation. The bacterial strains Bc:: R2SK harbouring the selected pHT304-ivin'l plasmids were grown separately in LB medium containing dipyridyl. No significant difference in resolution was observed for 18 ivi genes; however, in addition to ivi29, this experiment permits the detection of a second ivi gene (ivi32) conferring a resolution rate significantly superior to that obtained in the absence of the iron chelator (57% of resolution versus 7%). The ivi32 insert corresponds to the *yvrC* gene identified in the *B. cereus* genome (RZC00545). yvrC is predicted to encode a putative ferrichrome-binding protein involved in a ferric dicitrate uptake channel (Harvie et al., 2005). This is in agreement with our results that showed a high resolution of this ivi gene in response to iron deprivation. The gene yvrC belongs to the fec operon which contains two other members: a membrane permease and an ATPase (Harvie and Ellar, 2005). It has been demonstrated that the virulence of *B. cereus* 569 *Afec* mutant was attenuated in a lepidopteran infection model (Manduca sexta), highlighting the importance of iron uptake systems to the virulence of B. cereus (Harvie and Ellar, 2005).

#### Genes of unknown functions and regulators

The first gene of unknown function, ivi1 (RZC02761), encodes a protein likely to be exported. This gene was found to be located immediately adjacent to genes transcribed in the same orientation and encoding proteins homologous to two two-component system effectors: a putative histidine kinase and a response regulator (data not shown). Two-component signal transduction systems regulate the expression of multiple genes in response to the environment and are known virulence factors in many pathogen bacteria (Hoch, 2000). The product of *ivi1* may be involved in such a system. The second gene of unknown function, vsoA (ivi3), encodes a protein containing tetratrico peptide repeats (TPRs). TPR is a structural motif present in a wide range of proteins, and consists of 3-16 tandem repeats of 34 amino acid residues (Goebl and Yanagida, 1991). TPR domains mediate proteinprotein interactions and the assembly of multiprotein complexes (D'Andrea and Regan, 2003). Proteins containing TPRs have been identified in both prokaryotic and eukaryotic organisms and are involved in diverse biological processes, such as cell cycle regulation, transcriptional control, mitochondrial and peroxisomal protein transport, neurogenesis and protein folding (for review, see Blatch and Lassle, 1999). They are also involved in guorumsensing systems regulating sporulation and competence development in *B. subtilis* (Perego and Brannigan, 2001; Core and Perego, 2003), and virulence gene expression in B. cereus (Slamti and Lereclus, 2002). Interestingly, ysoA gene is located next to lon and clpX, which are known to be involved in stress tolerance, stationary-phase adaptive responses and virulence in various pathogenic organisms (Robertson et al., 2000; Frees et al., 2003). It is possible that YsoA interacts with other proteins in response to stress conditions encountered in the host. Three potential regulators (Ivi4, 5, 6) were identified by the IVET-based screen and confirmed to be strongly expressed in vivo. The role of these regulators and of the two genes of unknown function has to be determined.

#### Genes involved in metabolism and other functions

Some metabolism genes allow the bacteria to develop in particular host environments, and are thus considered as implicated in virulence (Rediers *et al.*, 2005). Two genes (*ivi10* and *ivi15*) playing a role in metabolism, have shown a very strong expression *in vivo. ivi10* encodes an alcohol dehydrogenase involved in glycosyl metabolism of pyruvate. However, it was shown that this enzyme was involved in the response to host-stress conditions in *Pseudomonas aeruginosa* (Finelli *et al.*, 2003) and *Mycobacterium tuberculosis* (Raynaud *et al.*, 1998). The gene *ivi15* encodes a cytochrome *d* ubiquinol oxidase subunit I.

The cytochrome *d* complex is one of the terminal oxidases in the respiratory chain of *E. coli* and predominates when the cells are grown under oxygen limitation (Lorence et al., 1988). This suggests that specific in vivo transcription of ivi10 and ivi15 might respond to the oxidative stress reaction in the host (Finelli et al., 2003; van Schaik et al., 2004; Ha et al., 2005). Two genes (ivi28 and ivi36) weakly but significantly induced in insects were found to encode ubiquitous chaperone proteins (ClpC and DnaK) generally involved in stress responses (Hecker et al., 1996). However, a B. thuringiensis mutant strain lacking the ClpC ATP-dependent protease was previously shown to be normally virulent in G. mellonella (Fedhila et al., 2002b). One chemotaxis/motility gene motA/motB (ivi35) and two genes ivi25 and ivi31 presumably involved in transport were induced in our in vivo screen. This is in line with previous results showing that motility and transport genes are frequently found in IVET studies (Rediers et al., 2005). Among the other genes involved in cell functions (metabolism and cell division), the gene mmgE (ivi18) encoding a 2-methylcitrate dehydratase might be involved in virulence. Indeed, a Legionella pneumophila protein sharing high similarities with MmgE was found implicated in marcrophage infection (Stone et al., 1999).

In conclusion, the IVET strategy we have developed in B. cereus successfully led to identification of genes involved in adaptation to the environment encountered by the bacteria during growth in insect larvae infected with a mixture of bacteria and activated Cry toxins. We have identified several genes specifically expressed in response to host-stress conditions, one of which (ilsA) was involved in virulence and showed new features related to iron acquisition. Our screen also uncovered several genes of unknown function or identified as potential regulators. All of them deserve further attention, as they may inform about new regulatory pathways related to bacterial pathogenesis. The expression of the ivi genes, in terms of infection time and tissue location, needs further investigations. Additionally it would be interesting to correlate the bacterial gene expression with host responses to investigate the host-pathogen cross-talk. Furthermore, the results described in this study suggest that the Tnpl-based IVET system could be efficiently used to detect B. cereus genes specifically expressed in other growth conditions, like biofilms, anaerobiosis and low temperatures.

#### **Experimental procedures**

#### Bacterial strains and growth conditions

*Bacillus cereus* strain ATCC14579 (laboratory stock) was used throughout this study. *E. coli* K12 strain TG1 was used as a host for cloning experiments. Dam<sup>-</sup>, Dcm<sup>-</sup> *E. coli* strains SCS110 (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and ET 12567 (labo-

ratory stock) were used to generate unmethylated DNA for electrotransformation in B. cereus. E. coli and B. cereus strains were transformed by electroporation as previously described (Dower et al., 1988; Lereclus et al., 1989). E. coli and *B. cereus* were cultured in LB (Luria–Bertani) broth, with vigorous shaking (175 r.p.m.) at 37°C. For DNA extraction, B. cereus was grown in BHI (Brain Heart Infusion, Difco) broth. The antibiotic concentrations used for bacterial selection were as follows: ampicillin, 100 µg ml<sup>-1</sup> (for *E. coli*); spectinomycin, 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> (for *E. coli*) and 300  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> (for *B. cereus*); kanamycin, 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; erythromycin, 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>; and tetracycline, 10 µg ml<sup>-1</sup> (for *B. cereus*). If spectinomycin and erythromycin were used in combination, their concentrations were adjusted to 250  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> and 5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> respectively (for B. cereus). Bacteria producing β-galactosidase were identified on LB plates containing X-Gal (40 µg ml<sup>-1</sup>). The xy/A promoter was induced in *B. cereus* by adding xylose (1 mM or 20 mM final concentration) to the HCT culture medium: Tryptone (Difco) 5 g l-1, Bacto casamino acid (Difco) 2 g l-1. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 mM, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.01 mM, ZnSO<sub>4</sub> 0.05 mM, ammonium iron citrate 0.015 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, glucose 0.3%, pH 7.25 (buffered by KOH 10%). The iron chelators. ethylenediamine-N, N1-bis. 2-dihydroxyphenylacetic acid (EDDHA) and Dipyridyl (Sigma) were used at a final concentration of 0.2 mM. The ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>) was used at a final concentration of 0.8 mM.

#### DNA manipulations

Plasmid DNA was extracted from E. coli and B. cereus by a standard alkaline lysis procedure using QIA-Prep spin columns (Qiagen). For *B. cereus*, cells were resuspended in 500 µl of buffer P1 supplemented with 5 mg of lysosyme and incubated at 37°C for 1 h. Chromosomal DNA was extracted from B. cereus cells with the Puregene Kit (Gentra, Minneapolis, USA). Restriction enzymes, T4 DNA ligase and alkaline phosphatase were used according to the manufacturer's instructions (Biolabs New England). Oligonucleotide primers (Table 2) were synthesized by Proligo (Paris, France). PCR was performed with a GeneAmp PCR system 2400 thermal cycler (Perkin-Elmer) with Pwo DNA polymerase (Roche Boehringer). For PCR carried out directly on *B. cereus* cells, we used Super Tag polymerase (ATGC Biotechnologie, France) and 2 µl of a 100 µl cell suspension from an overnight (18 h) colony lysed by heating and freezing in three cycles of 1 min at 95°C and 1 min at -70°C. Amplified DNA fragments were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Digested DNA fragments were separated by electrophoresis and eluted from agarose gels by centrifugation through a filter device (Millipore, Montage Genomics, USA) or with the DNA elution kit from Qiagen.

#### Plasmids and plasmid constructions

pHT304-I was generated by inserting, between the EcoRI and HindIII sites of pHT304 (Arantes and Lereclus, 1991), a 1040 bp EcoRI/HindIII DNA fragment purified from pHT1618-I carrying a promoterless copy of *tnpl* preceded by the transcriptional terminator of bacteriophage  $\lambda$  and a polylinker (Salamitou *et al.*, 1997).

Table 2.	Primer	sequences	used	in	this	study
----------	--------	-----------	------	----	------	-------

Name	Nucleotide sequence	Restriction site (underlined)		
Spc1	5'-CGCGGATCCGGATCTTCACCTAGATCC-3'	BamHI		
Spc3	5'-CGGGGTACCGTTACAAATTGTTTCACTAAATTAAAG-3'	Kpnl		
Xyl2	5'-GCTCTAGATTGAGCCATGTGATTTCCCC-3'	Xbal		
Xyl3	5'-CGGGATCCATGTCACTATTGCTTCAG-3'	BamHI		
M28.9	5'-CCCAAGCTTGATCGTGAAAAGAAGCTG-3'	HindIII		
M28.10	5'-CCCAAGCTTGGGCTTTTTATTTTGTACCT-3'	HindIII		
Tet1	5'-CATGCCATGGCAGTAAGACCTCCATCTC-3'	Ncol		
Tet2	5'-CCGGAATTCGAAACACTTCATCTGTATG-3'	EcoRI		
Tet3	5'-CCCAAGCTTCGTCATTTTAATTGCTGCTC-3'	HindIII		
Tet4	5'-CGCGGATCCTGTTGTTAAGAAGAGATGATCGC-3'	BamHI		
11	5'-CCCTGAACAGTGTTCTCGG-3'			
12	5'-GGCGATTAAGTTGGGTAAC-3'			
M28.5	5'-CCGGAATTCTTTCTTCTCTCTATATG-3'	EcoRI		
M28.6	5'-CATGCCATGGCCGTCCGTGTAAGTCACGGTT-3'	Ncol		
M28.7	5'-CTAGTCTAGAGGCGTGAAAGGGAATTATCG-3'	Xbal		
M28.8	5'-CGCGGATCCGCTTCTTCTCAAACTCGCC-3'	BamHI		

pHT304-Pxyl'I was constructed by ligating, between the Xbal and BamHI sites of pHT304-I, a 1486 bp DNA fragment, carrying the *xy*/*A* gene promoter and the *xy*/*R* gene encoding the transcriptional repressor of *xy*/*A*, amplified by PCR from chromosomal DNA of *B. subtilis* strain 168, using primers Xyl2 and Xyl3 (Table 2). The *xy*/*R* is located upstream of the promoter *xy*/*A* and is transcribed in the opposite direction.

pHT304-R2SK was constructed as follows. A 2.7 kb and a 5.7 kb DNA fragment were obtained by digesting pHT304-R2 (Salamitou *et al.*, 1997) with Kpnl/SnaBI and BamHI/SnaBI respectively. These two DNA fragments were purified and ligated to a 1134 bp Kpnl/BamHI *S. aureus spc* gene conferring resistance to spectinomycin (Murphy, 1985), obtained by PCR amplification using primer pair Spc1–Spc3 (Table 2) and *B. subtilis* strain QB4756 chromosomal DNA (Msadek *et al.*, 1994) as a template.

We constructed *lacZ* transcriptional fusions using HindIII/ Xbal fragments corresponding to the *orf29* upstream regions and generated by PCR with oligonucleotide pairs M28.9-I1 and M28.10-I1 and pHT304-*ivi29*I as the template. These fragments were inserted between the HindIII and Xbal sites of pHT304-18'Z (Agaisse and Lereclus, 1994) to give plasmids pHT-*ivi29'Z* and pHT-*orf29'Z* respectively. Plasmids were produced in *E. coli*, and then used to electroporate *B. cereus*.

# Construction of a chromosomal reporter B. cereus strain (Bc::R2SK) of tnpl expression

The R2SK insert was purified from pHT304-R2SK digested with HindIII and EcoRI. A 856 bp Ncol/EcoRI DNA fragment and a 1009 bp HindIII/BamHI DNA fragment, corresponding to the chromosomal regions located immediately upstream and downstream from the *tetB* gene, respectively, were generated by PCR using *B. cereus* strain ATCC14579 chromosomal DNA as a template and oligonucleotide pairs Tet1–Tet2 and Tet3–Tet4 respectively (Table 2). The amplified DNA fragments and the R2SK insert were digested with the appropriate enzymes and inserted between the Ncol and BamHI sites of the thermosensitive plasmid pMAD, conferring resistance

to erythromycin and carrying a thermostable  $\beta$ -galactosidase gene (Arnaud *et al.*, 2004). The resulting plasmid was checked by restriction mapping and used to transform *B. cereus*. Integrants resistant to spectinomycin, but sensitive to erythromycin and white on LB agar medium supplemented with X-Gal, arose through double-cross-over events, as previously described (Lereclus *et al.*, 1995). A first cross-over results in the integration of the recombinant thermosensitive plasmid at the *tetB* locus; the second leads to the replacement of the chromosomal wild-type copy of *tetB* by the R2SK insert. The chromosomal allele exchange was checked by PCR, using appropriate oligonucleotide primers. The corresponding mutant strain was named *Bc*::R2SK.

# Construction of the B. cereus genomic library in pHT304-I

Genomic DNA obtained from B. cereus strain ATCC14579 was partially digested with Sau3A and size-fractionated by agarose gel electrophoresis. We extracted several micrograms of DNA fragments ranging from 0.5 to 1.5 kb in size. These fragments were ligated to BamHI-digested alkaline phosphatase-treated pHT304-I, and the resulting construct was used to electroporate E. coli strain TG1. The electroporated bacteria were plated on LB agar containing ampicillin, and incubated at 37°C for 24 h. At least 105 transformant clones were recovered and pooled for plasmid DNA extraction. The diversity of this plasmid library was verified as follows. The inserts upstream from the *tnpl* coding sequence were amplified by PCR, using primers complementary to the 5' end of *tnpl* and to the EcoRI end of pHT304-I (I1 and I2, respectively, Table 2) which resulted in a smear of DNA fragments ranging from about 0.5 to 1.5 kb. Additionally, plasmids from 22 isolated colonies were analysed by PCR, using the primers I1 and I2: all the PCR fragments had different sizes. The plasmid-borne DNA library was transferred to and amplified in E. coli strain SCS110 to produce unmethylated plasmid DNA, which was then introduced into Bc::R2SK by electroporation. Transformants were selected at 37°C on LB medium containing spectinomycin and erythromycin. More than 10<sup>4</sup> *Bc*::R2SK transformants carrying recombinant pHT304-I plasmids were recovered to constitute the *B. cereus* genomic library used for the IVET strategy.

#### Insects and infection experiments

Galleria melonella eggs were hatched at 25°C and the larvae reared on beeswax and pollen (Naturalim). Trypsin-activated Cry1C toxin was prepared from the asporogenic B. thuringiensis strain 407  $\triangle sigK$  (Bravo et al., 1996) transformed with pHT1C (Sanchis et al., 1996). Crystals were purified on a 67-72% sucrose gradient. They were solubilized in NaCO<sub>3</sub> in carbonate buffer (pH 10.3), dialysed against phosphatebuffered saline (pH 8.5), and activated by incubation with trypsin (2% protein w/w) for 3 h at 37°C. For the infection experiments, last instar G. mellonella larvae, weighing about 200 mg, were force-fed vegetative cell/Cry1C suspensions in sterile water (10 µl larva<sup>-1</sup>) via a 0.5-by-25 mm needle (Burckard Manufacturing) and a microinjector (Burckard Scientific). The larvae in the control group were fed sterile water. The larvae were kept in individual boxes at 37°C and mortality was recorded. Bacteria were recovered from eight infected and dead larvae, 24 h post inoculation. Each dead larva was surface-sterilized by rinsing briefly in 70% ethanol, crushed and homogenized in 2 ml of sterile water, using a Polytron homogenizer (Kinematica, Switzerland). Serial dilutions were plated on LB medium containing appropriate antibiotics.

#### Screening of the genomic library for ivi genes

The Bc::R2SK cells bearing the genomic library in pHT304-I were grown to late stationary phase in 20 ml of LB medium supplemented with erythromycin and spectinomycin. This step was repeated seven times, diluting the culture (1/100) in fresh medium each time. The culture (1 ml of a suspension with an  $OD_{600} \sim 1.5$ , about 10<sup>8</sup> bacteria) was centrifuged at 4000 g for 10 min and the pellet was washed twice in sterile distilled water, and resuspended in a 400 µl solution containing 100  $\mu$ g of activated Cry1C toxin. Ten microlitres of mixture (10<sup>6</sup> bacteria and 2.5 µg toxin) were fed to 30 G. mellonella larvae, as described above. After 24 h of incubation at 37°C, bacteria were recovered from eight dead larvae and various dilutions of the bacterial suspension were plated on LB medium supplemented with kanamycin (to select clones that resolved in vivo) or with erythromycin (for counting all bacterial cells in dead larvae). We then assessed the sensitivity to spectinomycin of 100-200 Km<sup>R</sup> clones isolated from each dead larva. One hundred Km<sup>R</sup>, Spc<sup>S</sup> clones (presumed *ivi* clones) were randomly isolated for characterization of the DNA inserts. The DNA regions cloned upstream from tnpl were amplified by PCR, performed directly on resolved cell colonies, using primers complementary to the 5' end of tnpl and to the EcoRI end of pHT304-I (I1 and I2, respectively, Table 2). Nucleotide sequences were determined from recombinant plasmids extracted from 100 PCR-positive clones by Genome Express (Montreuil, France) using primers I1 and I2 (Table 2).

#### Computer sequence analysis

DNA sequences were aligned, using the *B. cereus* ATCC14579 genome sequence database (http://www.

integratedgenomics.com). The SIGNALP V3.0 prediction program was used to identify the location of potential signal peptide cleavage sites (http://www.cbs.dtu.dk/services/ SignalP/). Conserved domains were identified by subjecting the predicted amino acid sequence to the National Center of Biotechnology Information (NCBI) conserved domain database.

#### Resolution frequencies of the R2S reporter cassette

We assessed the validity of the IVET system in *B. cereus*, by culturing Bc::R2SK cells carrying pHT304-Pxyl'l overnight at 37°C in HCT medium containing ervthromycin and spectinomycin. The cells were then diluted 1/500 in fresh HCT medium supplemented with erythromycin and grown for eight generations. One hour after the onset of stationary phase, an aliquot was taken (before induction), diluted and plated on LB agar supplemented with erythromycin. The rest of the bacterial culture was divided into three subcultures, incubated overnight following the addition of various concentrations of xvlose (0 mM, 1 mM and 20 mM). The bacterial cells of each subculture were then diluted and plated on LB supplemented with erythromycin. We then transferred 100 Em<sup>R</sup> colonies to LB plates supplemented with erythromycin, spectinomycin or kanamycin. Resolution frequency was defined as the percentage of Em<sup>R</sup> colonies that were also Spc<sup>s</sup> or Km<sup>R</sup>.

We determined the rates of R2S cassette resolution by the promoter activities of ivi genes by extracting recombinant pHT304-I derivatives from ivi clones and using them to electroporate Bc::R2SK bacteria. In vitro, the resolution frequencies were evaluated in three different conditions. Transformants were grown to stationary phase at 37°C in LB medium devoid of antibiotic, supplemented either with 0.3 mg ml<sup>-1</sup> Cry1C toxin or with 0.2 mM of the iron chelator, dipyridyl. Serial dilutions were plated on LB medium supplemented with erythromycin, spectinomycin or kanamycin and grown overnight at 37°C. Resolution frequencies were determined as described above. Resolution frequencies in vivo were determined by force-feeding G. mellonella larvae with unresolved Bc::R2SK cells containing pHT304-I derivatives, as described for the in vivo screening experiments. Cells were recovered from dead larvae and propagated on LB plus erythromycin, spectinomycin or kanamycin, then counted and scored for resolution.

#### Construction of the B. cereus mutant strain

Bacillus cereus  $\Delta ilsA$  gene was constructed as follows. A 1035 bp Ncol/EcoRI DNA fragment and a 965 bp BamHI/ Xbal DNA fragment, corresponding to the chromosomal regions located immediately upstream and downstream from the *ilsA* gene (*orf29*), respectively, were generated by PCR, using *B. cereus* strain ATCC14579 chromosomal DNA as a template and oligonucleotide pairs M28.6–M28.5 and M28.7–M28.8 respectively (Table 2). A Tet<sup>R</sup> cassette, conferring resistance to tetracycline, was purified from pHTS2 (Sanchis *et al.*, 1996) as a 1.6 kb EcoRI/Xbal fragment carrying the *tet* gene from *B. cereus*. The amplified DNA fragments and the Tet<sup>R</sup> cassette were digested with the appropriate enzymes and inserted between the Ncol and BamHI sites of the thermosensitive plasmid pMAD (as described above). The resulting plasmid was checked by restriction mapping and used to transform the wild-type *B. cereus* strain. Integrants resistant to tetracycline, sensitive to erythromycin and white on LB agar medium supplemented with X-Gal, arose through a double-cross-over event, in which the chromosomal wild-type copy of *ilsA* coding sequence was deleted and replaced by the Tet<sup>R</sup> cassette. The chromosomal allele exchange was checked by PCR, using appropriate oligonucleotide primers.

#### $\beta$ -Galactosidase assays in the insect

Bacillus cereus harbouring pHT-orf29'Z or pHT304-18'Z, as a control, were grown in LB medium at  $37^{\circ}$ C. Doses of  $5 \times 10^{6}$ mid-log phase bacteria mixed with 3 µg of activated Cry1C toxin were used to force feed larvae weighing around 200 mg. Four larvae were recovered after 8 h (alive larvae) and 24 h (dead larvae). Each larva was crushed, homogenized separately in 2 ml of phosphate buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O 60 mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 40 mM; KCI 10 mM; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 mM; DTT, 1 mM) and centrifuged for 10 min at 13 000 r.p.m. at 4°C. The fatty layer and supernatant was removed and the pellet was resuspended with 1 ml of phosphate buffer. The suspension (100 µl) was diluted and plated onto LB agar containing erythromycin (10 µg ml<sup>-1</sup>) in order to estimate the number of bacteria present in the larvae. The bacteria remaining in 900 µl were broken with 0.2 g of glass beads (212-300 microns, Sigma) using a Fast-Prep 120 (Savant). The bacterial extract was obtained after centrifugation for 10 min at 13 000 r.p.m. at 4°C and β-galactosidase activities were measured as previously described (Bouillaut et al., 2005).

#### Virulence assays

The virulence-related properties of *ilsA* were assessed by comparing the killing effect of the wild type and the ilsA mutant B. cereus strains by oral infection in fifth-instar G. mellonella larvae. Groups of 20-30 last-instar larvae weighing about 200 mg were force fed with 10  $\mu$ l of a mixture containing various doses of spores ( $5 \times 10^3$  to  $5 \times 10^6$ ) and 3 µg of activated Cry1C toxin. Each dose was repeated three times on at least 20 larvae. Infected larvae were kept in individual boxes at 37°C and mortality was recorded over 48 h. The  $LD_{50s}$  values were estimated by Probit analysis (Finney, 1971; Raymond et al., 1993). This program tests for the linearity of dose-mortality curves, provides lethal doses and the slope of each dose-mortality line. It tests the parallelism of two or more dose-mortality lines and determines the virulence ratio between the bacterial strains. The ratio is considered to be significantly different from 1 (P < 0.05) when the confidence limits do not include this value.

#### Acknowledgements

We would like to thank Nalini Ramarao for helpful discussions and for critical reading of the manuscript and Christophe Buisson for technical assistance with insect bioassays. We are also thankful for all the valuable comments from anonymous referees. This work was supported by research funds from the Institut National de la Recherche Agronomique (Microbiologie et Chaîne Alimentaire and Santé des Plantes et Environnement departments; AIP microbiologie n°P 00244 and Project n°0071-2001-02: colonisation du biotope insecte par des bactéries pathogènes) and from the Agence Nationale de la Recherche (PNRA 013-04). S.F. was supported by a grant from the Institut National de la Recherche Agronomique and N.D. with a grant from the Research Council University Saint Joseph of Beirut.

#### References

- Agaisse, H., and Lereclus, D. (1994) Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the *cryIIIA* toxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* **13**: 97–107.
- Agaisse, H., Gominet, M., Økstad, O.A., Kolstø, A.B., and Lereclus, D. (1999) PIcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis. Mol Microbiol* **32:** 1043–1053.
- Andrade, M.A., Ciccarelli, F.D., Perez-Iratxeta, C., and Bork, P. (2002) NEAT: a domain duplicated in genes near the components of a putative Fe3+ siderophore transporter from Gram-positive pathogenic bacteria. *Genome Biol* **3**: research 0047.1–0047.5.
- Arantes, O., and Lereclus, D. (1991) Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* **108**: 115–119.
- Arnaud, M., Chastanet, A., and Débarbouillé, M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887–6891.
- Beecher, D.J., Schoeni, J.L., and Wong, A.C. (1995) Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 63: 4423–4428.
- Beerntsen, B.T., Severson, D.W., and Christensen, B.M. (1994) Aedes aegypti: characterization of a hemolymph polypeptide expressed during melanotic encapsulation of filarial worms. *Exp Parasitol* **79:** 312–321.
- Bierne, H., Mazmanian, S.K., Trost, M., Pucciarelli, M.G., Liu, G., Dehoux, P., *et al.* (2002) Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol Microbiol* **43**: 869–881.
- Blatch, G.L., and Lassle, M. (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein–protein interactions. *Bioessays* 21: 932–939.
- Bouillaut, L., Ramarao, N., Buisson, C., Gilois, N., Gohar, M., Lereclus, D., and Nielsen-LeRoux, C. (2005) FlhA influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene transcription, protein production, and virulence. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8903–8910.
- Braun, L., and Cossart, P. (2000) Interactions between *Listeria monocytogenes* and host mammalian cells. *Microbes Infect* **2:** 803–811.
- Bravo, A., Agaisse, H., Salamitou, S., and Lereclus, D. (1996) Analysis of *cryIAa* expression in *sigE* and *sigK* mutants of *Bacillus thuringiensis. Mol Gen Genet* **250**: 734–741.
- Brennan, M., Thomas, D.Y., Whiteway, M., and Kavanagh, K. (2002) Correlation between virulence of *Candida albicans*

© 2006 The Authors

mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol* **34:** 153–157.

- Callegan, M.C., Booth, M.C., Jett, B.D., and Gilmore, M.S. (1999) Pathogenesis of gram-positive bacterial endoph-thalmitis. *Infect Immun* **67:** 3348–3356.
- Callegan, M.C., Kane, S.T., Cochran, D.C., Gilmore, M.S., Gominet, M., and Lereclus, D. (2003) Relationship of PIcRregulated factors to *Bacillus* endophthalmitis virulence. *Infect Immun* **71**: 3116–3124.
- Camilli, A., Beattie, D.T., and Mekalanos, J.J. (1994) Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **91:** 2634–2638.
- Core, L., and Perego, M. (2003) TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49:** 1509–1522.
- D'Andrea, L.D., and Regan, L. (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* **28**: 655–662.
- Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16:** 6127–6145.
- Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P.L., and Cossart, P. (1997) Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun* **65:** 1615–1625.
- Escolar, L., Perez-Martin, J., and de Lorenzo, V. (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**: 6223–6229.
- Fedhila, S. (2002) Contribution des métalloprotéases InhA et des protéines de choc thermique Clp à la virulence de *Bacillus thuringiensis*. PhD Thesis. Paris: Institut National Agronomique Paris-Grignon.
- Fedhila, S., Nel, P., and Lereclus, D. (2002a) The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *J Bacteriol* **184:** 3296–3304.
- Fedhila, S., Msadek, T., Nel, P., and Lereclus, D. (2002b) Distinct *clpP* genes control specific adaptive responses in *Bacillus thuringiensis. J Bacteriol* **184:** 5554–5562.
- Fedhila, S., Guillemet, E., Nel, P., and Lereclus, D. (2004) Characterization of two *Bacillus thuringiensis* genes identified by *in vivo* screening of virulence factors. *Appl Environ Microbiol* **70:** 4784–4791.
- Fernandez-Prada, C.M., Hoover, D.L., Tall, B.D., Hartman, A.B., Kopelowitz, J., and Venkatesan, M.M. (2000) *Shigella flexneri* IpaH (7.8) facilitates escape of virulent bacteria from the endocytic vacuoles of mouse and human macrophages. *Infect Immun* **68**: 3608–3619.
- Finelli, A., Gallant, C.V., Jarvi, K., and Burrows, L.L. (2003) Use of in-biofilm expression technology to identify genes involved in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* **185**: 2700–2710.
- Finney, D.J. (1971) *Probit Analysis*. London: Cambridge University Press.
- Frees, D., Qazi, S.N., Hill, P.J., and Ingmer, H. (2003) Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Mol Microbiol* **48**: 1565– 1578.
- 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.

- Garandeau, C., Reglier-Poupet, H., Dubail, I., Beretti, J.L., Berche, P., and Charbit, A. (2002) The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence. *Infect Immun* **70**: 1382–1390.
- Gärtner, D., Geissendorfer, M., and Hillen, W. (1988) Expression of the *Bacillus subtilis xyl* operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. *J Bacteriol* **170:** 3102–3109.
- Goebl, M., and Yanagida, M. (1991) The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem Sci* **16**: 173–177.
- Granum, P.E., and Lund, T. (1997) Bacillus cereus and its food poisoning toxins. FEMS Microbiol Lett 157: 223–228.
- Ha, E.M., Oh, C.T., Ryu, J.H., Bae, Y.S., Kang, S.W., Jang, I.H., *et al.* (2005) An antioxidant system required for host protection against gut infection in *Drosophila. Dev Cell* 8: 125–132.
- Harvie, D.R., and Ellar, D.J. (2005) A ferric dicitrate uptake system is required for the full virulence of *Bacillus cereus*. *Curr Microbiol* **50**: 246–250.
- Harvie, D.R., Vilchez, S., Steggles, J.R., and Ellar, D.J. (2005) *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology* **151**: 569–577.
- Hecker, M., Schumann, W., and Volker, U. (1996) Heatshock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**: 417–428.
- Hilliard, N.J., Schelonka, R.L., and Waites, K.B. (2003) Bacillus cereus bacteremia in a preterm neonate. J Clin Microbiol 41: 3441–3444.
- Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3:** 165–170.
- Hoffmaster, A.R., Ravel, J., Rasko, D.A., Chapman, G.D., Chute, M.D., De Marston, C.K.B.K., *et al.* (2004) Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8449–8454.
- Horsburgh, M.J., Ingham, E., and Foster, S.J. (2001) In *Sta-phylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J Bacteriol* **183**: 468–475.
- Jensen, G.B., Hansen, B.M., Eilenberg, J., and Mahillon, J. (2003) The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ Microbiol* **5:** 631–640.
- Kaito, C., Akimitsu, N., Watanabe, H., and Sekimizu, K. (2002) Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. *Microb Pathog* **32**: 183– 190.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1995) Proteins with leucinerich repeats. *Curr Opin Struct Biol* **5:** 409–416.
- Kobe, B., and Kajava, A.V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* **11:** 725– 732.
- Kolstø, A.B., Lereclus, D., and Mock, M. (2002) Genome structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *Curr Top Microbiol Immunol* **264:** 95–108.
- Kotiranta, A., Lounatmaa, K., and Haapasalo, M. (2000) Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect* **2:** 189–198.

Journal compilation © 2006 Blackwell Publishing Ltd, Molecular Microbiology, 62, 339-355

- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J., and Cossart, P. (1997) Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* **65**: 5309–5319.
- Lereclus, D., and Arantes, O. (1992) *spbA* locus ensures the segregational stability of pHT1030, a novel type of Grampositive replicon. *Mol Microbiol* **7:** 35–46.
- Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J., and Lecadet, M.-M. (1989) Transformation and expression of a cloned ∂-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis. FEMS Microbiol Lett* **60:** 211–218.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., and Chaufaux, J. (1995) Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis spo0A* mutant. *Bio/ Technology* **13:** 67–71.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salamitou, S., and Sanchis, V. (1996) Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J Bacteriol* **178**: 2749–2756.
- Leung, K.Y., Reisner, B.S., and Straley, S.C. (1990) YopM inhibits platelet aggregation and is necessary for virulence of *Yersinia pestis* in mice. *Infect Immun* **58**: 3262–3271.
- Li, R.S., Jarrett, P., and Burges, H.D. (1987) Importance of spores, crystals, and ∂-endotoxins in the pathogenicity of different varieties of *Bacillus thuringiensis* in *Galleria mellonela* and *Pieris brassicae*. *J Invertebr Pathol* **50**: 277–284.
- Litwin, C.M., and Calderwood, S.B. (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6:** 137–149.
- Lorence, R.M., Carter, K., Gennis, R.B., Matsushita, K., and Kaback, H.R. (1988) Trypsin proteolysis of the cytochrome *d* complex of *Escherichia coli* selectively inhibits ubiquinol oxidase activity while not affecting N,N,N',N'-tetramethylp-phenylenediamine oxidase activity. *J Biol Chem* **263**: 5271–5276.
- de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M., and Neilands, J.B. (1987) Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid CoIV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J Bacteriol* **169**: 2624–2630.
- Lund, T., and Granum, P.E. (1996) Characterization of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol Lett* 141: 151–156.
- Lund, T., DeBuyser, M.-L., and Granum, P.E. (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* **38**: 254–261.
- Mahan, M.J., Slauch, J.M., and Mekalanos, J.J. (1993) Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**: 686–688.
- Mahillon, J., and Lereclus, D. (1988) Structural and functional analysis of Tn*4430*: identification of an integrase-like protein involved in the co-integrate-resolution process. *EMBO J* **7**: 1515–1526.
- Marino, M., Braun, L., Cossart, P., and Ghosh, P. (2000) A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria* internalins. *Proc Natl Acad Sci USA* **97:** 8784–8788.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., and Cossart, P. (1996) E-cadherin is the receptor for internalin,

a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84:** 923–932.

- Mesnage, S., Fontaine, T., Mignot, T., Delepierre, M., Mock, M., and Fouet, A. (2000) Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J* **19**: 4473–4484.
- Miao, E.A., Scherer, C.A., Tsolis, R.M., Kingsley, R.A., Adams, L.G., Baumler, A.J., and Miller, S.I. (1999) Salmonella typhimurium leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. Mol Microbiol 34: 850–864.
- Miller, J.M., Hair, J.G., Hebert, M., Hebert, L., Roberts, F.J., Jr, and Weyant, R.S. (1997) Fulminating bacteremia and pneumonia due to *Bacillus cereus*. J Clin Microbiol 35: 504–507.
- Minnaard, J., Lievin-Le Moal, V., Coconnier, M.H., Servin, A.L., and Perez, P.F. (2004) Disassembly of F-actin cytoskeleton after interaction of *Bacillus cereus* with fully differentiated human intestinal Caco-2 cells. *Infect Immun* **72**: 3106–3112.
- Mock, M., and Fouet, A. (2001) Anthrax. *Annu Rev Microbiol* **55:** 647–671.
- Msadek, T., Kunst, F., and Rapoport, G. (1994) MecB of *Bacillus subtilis*, a member of the ClpC ATPase family, is a pleiotropic regulator controlling competence gene expression and growth at high temperature. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5788–5792.
- Murphy, E. (1985) Nucleotide sequence of a spectinomycin adenyltransferase AAD(9) determinant from *Staphylococcus aureus* and its relationship to AAD(3') (9). *Mol Gen Genet* **200**: 33–39.
- Osbourn, A.E., Barber, C.E., and Daniels, M.J. (1987) Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid. *EMBO J* **6:** 23–28.
- Perego, M., and Brannigan, J.A. (2001) Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides* 22: 1541–1547.
- Raymond, M., Prato, G., and Ratsira, D. (1993) PROBIT analysis of mortality assays displaying quantal response. Saint Georges d'Orgue, France: PRAXEME.
- Raynaud, C., Etienne, G., Peyron, P., Laneelle, M.A., and Daffe, M. (1998) Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis. Microbiology* **144:** 577–587.
- Rediers, H., Rainey, P.B., Vanderleyden, J., and De Mot, R. (2005) Unraveling the secret lives of bacteria: use of *in vivo* expression technology and differential fluorescence induction promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 69: 217–261.
- Robertson, G.T., Kovach, M.E., Allen, C.A., Ficht, T.A., and Roop, R.M., 2nd (2000) The *Brucella abortus* Lon functions as a generalized stress response protease and is required for wild-type virulence in BALB/c mice. *Mol Microbiol* **35**: 577–588.
- Rowan, N.J., Deans, K., Anderson, J.G., Gemmell, C.G., Hunter, I.S., and Chaithong, T. (2001) Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3873–3881.

- Salamitou, S., Agaisse, H., and Lereclus, D. (1997) A genetic system that reports transient activation of genes in *Bacillus. Gene* **202:** 121–126.
- Salamitou, S., Ramisse, F., Brehélin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M., *et al.* (2000) The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology* **146**: 2825–2832.
- Sanchis, V., Agaisse, H., Chaufaux, J., and Lereclus, D. (1996) Construction of new insecticidal *Bacillus thuringiensis* recombinant strains by using the sporulation non-dependent expression system of *cryIIIA* and a site specific recombination vector. *J Biotechnol* **48**: 81–96.
- van Schaik, W., Zwietering, M.H., de Vos, W.M., and Abee, T. (2004) Identification of sigmaB-dependent genes in *Bacillus cereus* by proteome and *in vitro* transcription analysis. *J Bacteriol* **186:** 4100–4109.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., *et al.* (1998) *Bacillus thuringiensis* and its

pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62:** 775–806.

- Schubert, W.D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M.P., Domann, E., *et al.* (2002) Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* **111**: 825–836.
- Slamti, L., and Lereclus, D. (2002) A cell-cell signaling peptide activates the PIcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J* 21: 4550–4559.
- Stone, B.J., Brier, A., and Kwaik, Y.A. (1999) The *Legionella pneumophila prp* locus required during infection of macrophages and amoebae. *Microb Pathog* 27: 369–376.
- Yoshiga, T., Georgieva, T., Dunkov, B.C., Harizanova, N., Ralchev, K., and Law, J.H. (1999) *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. *Eur J Biochem* **260**: 414–420.

Article 2

IlsA, a unique surface protein of Bacillus cereus required for iron acquisition from heme, hemoglobin and ferritin

En préparation pour soumission à Plos Pathogen

IlsA, a unique surface protein of *Bacillus cereus* required for iron acquisition from heme, hemoglobin and ferritin

Daou, N<sup>1,2</sup>., Buisson C<sup>1</sup>., Gohar M<sup>1</sup>., Vidic J<sup>3</sup>., Kallassy M<sup>2</sup>., Lereclus, D<sup>1</sup>., Nielsen-LeRoux, C<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Unité Génétique Microbienne et Environnement, INRA, La Minière, Guyancourt, France.

<sup>2</sup>Laboratoire de Biotechnologie, Université Saint-Joseph, Beyrouth, Liban.

<sup>3</sup>Unité de Biologie Physico-chimique des Prions, Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, Domaine de Vilvert, Jouy en Josas, France.

# Abstract

The human opportunistic pathogen, Bacillus cereus, belongs to the B. cereus group that includes bacteria with a broad host spectrum. The ability of these bacteria to colonize diverse hosts is reliant to the presence of adaptation factors most of which remains unknown. Previously, an extensive search for *in vivo* expressed *B. cereus* factors led to identify a novel protein (IIsA, Iron-regulated leucine rich surface protein) highly and specifically expressed in the insect host or under iron restrictive conditions in vitro. The analysis of the protein sequence of IIsA suggests that it may interact with host iron rich sources. Here, we show that IIsA is exposed on the surface of B. cereus and hence has the potential to interact with host proteins. We report that B. cereus can utilize hemoglobin, heme and ferritin, but not transferrin and lactoferrin as iron sources for its growth. The inactivation of *ilsA* drastically decreases the ability of B. cereus to utilize hemoglobin, heme and ferritin, indicating that IIsA is essential for iron acquisition from these molecules. In addition, affinity tests revealed that IlsA interacts with both hemoglobin and ferritin, with highest affinity for hemoglobin. Furthermore, we show that IIsA directly binds heme. This is in agreement with the strong similarity between the NEAT domain sequence of IIsA and those of other iron-regulated surface proteins (Isd) found in some Gram positive bacteria. Interestingly, interaction with ferritin has never been reported for NEAT-domain molecules before. The mutant lacking ilsA displays reduction in growth and in virulence of B. cereus in insect larvae. Thus, our results indicate that IIsA is a key factor in a new iron acquisition system, being an important part of the general virulence strategy adapted by *B. cereus* to colonize susceptible infected hosts.

# Introduction

Iron is an essential element for most organisms including bacteria, because it is involved in many cellular processes including aerobic respiration, amino acid and nucleotide biosynthesis (Braun, 2001; Wandersman & Delepelaire, 2004). Since free iron is highly toxic for the cells, its homeostasis is strictly regulated in living organisms. Protection against iron is achieved by iron sequestration into carrier proteins such as transferrin lactoferrin, ferritin or by binding to the heme in hemoproteins. Thus, the lack of free iron is an obstacle that bacteria must overcome, while invading a host. In order to scavenge iron from the host iron-binding proteins, bacteria have developed two principal high affinity iron-uptake systems, which are also considered to be important virulence factors. One system is based on the secretion of siderophores that capture iron from iron-binding proteins by the virtue of a superior binding strength (Crosa & Walsh, 2002; Ratledge & Dover, 2000). The second system is dedicated to bind directly to host iron binding proteins via specific bacterial surface receptors. This system has been more studied in Gram-negative bacteria compared to Gram-positive (Genco & Dixon, 2001; Lewis et al., 1998; Stojiljkovic et al., 1996; Wandersman & Stojiljkovic, 2000). The majority of these iron-uptake systems are under the control of the repressor Fur (Ferric uptake regulator) (Ratledge & Dover, 2000).

In Gram-postive bacteria, the best characterized system relying on bacterial surface protein is the iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*. The Isd system based on cell wall proteins that act as hemoproteins receptor (Mazmanian *et al.*, 2002; Mazmanian *et al.*, 2003), due to the presence of several copies of the conserved NEAT domains (for NEAr iron Transport) which play a key role in heme and hemoproteins binding and transport (Grigg *et al.*, 2007; Pilpa *et al.*, 2006). Isd system has been also studied in *B. anthracis*. In addition to cell wall proteins, the *B. anthracis* Isd system relies also on NEAT domains secreted proteins

acting as hemophore which serve to acquire heme from hemoglobin (Maresso *et al.*, 2008)(Gat *et al.*, 2008).

The Gram-positive, sporeforming and human opportunistic pathogen, Bacillus cereus, belongs to the Bacillus cereus group, which also includes the entomopathogen, Bacillus thuringiensis, and the etiological agent of anthrax among mammals, *Bacillus anthracis*. These three closely related species share a large number of chromosomal determinants, while their host-specific toxins are carried on plasmids (Hacker & Kaper, 2000; Helgason et al., 2000; Kolsto et al., 2002; Vilas-Boas et al., 2007). Bacillus cereus is generally regarded as a pathogen causing food borne gastroenteritis due to the production of two forms of food poisoning: the diarrhea and the emetic toxins (Stenfors Arnesen et al., 2008). However, B. cereus can also cause serious infections such as endophthalmitis, pneumonia and meningitis (Callegan et al., 1999; Hilliard et al., 2003; Miller et al., 1997). In addition, a new B. cereus species able to cause severe respiratory illness resembling anthrax was identified (Hoffmaster *et al.*, 2004). To date, most studies related to the virulence of B. cereus have been ascribed to different extra cellular factors that are under the control of the pleiotropic regulator PlcR, which is part of a quorum sensing system (Gohar et al., 2008; Slamti & Lereclus, 2002). The PlcR regulon is important for virulence in both mice (intra nasal) and insects (Salamitou et al., 2000), but, other factors are needed to fulfill pathogenesis of B. cereus. Indeed, little research has been carried out on virulence genes involved in the adaptation and the persistence of *B. cereus* in the host and specifically on genes involved in iron acquisition.

The ability of *B. cereus*, to acquire iron from host iron-rich sources, has only received little attention; two independent research groups have reported controversial results on the capacity of *B. cereus* to use transferrin (Park *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 1998). Thus, it remains unsolved whether *B. cereus* can utilize iron from this protein. In addition other studies reported that *B. cereus* can use hemoglobin, hemin and other hemoproteins such as hemoglobin-haptoglobin

and hemin-albumin for its growth (Sato *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1999a; Sato *et al.*, 1999b). The majority of these studies focused on the identification of the iron sources that can be used by *B. cereus* while the mechanism used by *B. cereus* to scavenge iron from host and specially those involving surface proteins has not been reported yet.

In a previous study, an IVET strategy (In Vivo Expression Technology) led to identify a *B. cereus* gene specifically expressed in insect larvae infected via the oral route (Fedhila *et al.*, 2006). It was shown that the transcription of this gene was induced in response to iron restrictive conditions due to the presence of a Fur-binding box in its promoter region. In agreement with this regulation, the corresponding protein contains a NEAT domain presumably involved in iron transport. This protein was designated IIsA, for Iron regulated leucine-rich surface protein. Moreover, IIsA was involved in the virulence of *B. cereus* in the lepidopteran *G. mellonella* (Fedhila *et al.*, 2006).

Here, we demonstrate that IIsA is a surface protein absolutely required for iron uptake from several host proteins: hemoglobin, hemin and from ferritin, by its direct binding to them. This is the first time that a NEAT domain protein has been shown to be involved in iron uptake from ferritin. Furthermore, we show that IIsA is involved in the virulence of *B. cereus* which is correlated to *in vivo* growth. Our results suggest that IIsA is an important adaptation factor required for the development of *B. cereus* in the host. Moreover, these findings provide new insights about the ecology of this bacterial group able to colonize hosts as diverse as mammals and insects.

# **Materials and Methods**

# **Bacterial stains and growth conditions**

Bacillus cereus strain ATCC14579 (laboratory stock) was used throughout this study.

The mutant *B. cereus* ATCC14579  $\Delta ilsA$  was previously constructed by allelic exchange through a double-cross-over event by introducing a tetracycline resistant cassette (Fedhila et al., 2006). E. coli K12 strain TG1 was used as a host for cloning experiments. Dam-, Dcm-E. coli strains ET 12567 (laboratory stock) were used to generate unmethylated DNA for electrotransformation in B. cereus. For electrotransformation, B. cereus was grown in BHI (Brain Heart Infusion, Difco) broth. E. coli and B. cereus AilsA mutant strains were transformed by electroporation as previously described (Dower et al., 1988; Lereclus et al., 1989). E. coli BL-21 [F, ompT, HsdS (r<sub>B</sub>, m<sub>B</sub>), gal] strain was used for expression and purification of Glutathione S-transferase (GST) fusion protein (GST-IIsA). E. coli and B. cereus were cultured in LB (Luria-Bertani) broth, with vigorous shaking (175 rpm) at 37°C. Antibiotics for bacterial selection were used at the following concentrations: ampicillin (100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> for *E. coli*), erythromycin (10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> for *B. cereus*) and tetracycline (10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> for *B.* cereus). The iron chelator, Dipyridyl and the iron sources: hemoglobin, hemin, ferritin, transferrin and lactoferrin, were obtained from Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France. The iron sources were used at a concentration that permits the growth of *B. cereus*. The ferric chloride (FeCl<sub>3</sub>) was used at a final concentration of 0.2 mM. All iron solutions were sterilized by passage through 0.22 µm pore size filter.

## **DNA** manipulations

Chromosomal DNA was extracted from *B. cereus* cells with the Puregene DNA Purification Kit (Gentra, Minneapolis, USA). Plasmid DNA was extracted from *E. coli* and *B. cereus* using QIAprep spin columns (QIAgen, France). For *B. cereus*, 5 mg ml<sup>-1</sup> of lysosyme were added and cells were incubated at 37°C for 1 h. Oligonucleotide primers were synthesized by Proligo (Paris, France). PCRs were performed in a thermocycler PTC-100<sup>TM</sup> (MJ-Research, Inc., USA) Amplified fragments were purified using the QIAquick PCR purification Kit (QIAgen). Restriction enzymes (New England Biolabs, USA) and T4 DNA ligase (Invitrogen, USA) were used as recommended by the manufacturer. Digested DNA fragments were separated by electrophoresis on 1% agarose gels and extracted from gels using the QIAquick gel extraction Kit (QIAgen).

# **Complementation of the IIsA mutant strain**

The genetic complementation of strain *B. cereus*  $\Delta ilsA$  was carried out as follows. A DNA fragment corresponding to the gene *ilsA* was amplified by PCR using the *B. cereus* ATCC14579 genomic DNA as a template and the primers *ilsA*-forward (5'-AA<u>CTGCAG</u>GGGCTTTTTTATTTTGTACC-3') and *ilsA*-reverse (5'-CG<u>GAATTC</u>GTGAGGGCTACTAATCAGTTG-3'). The PCR product was restricted with EcoRI and Pst1 and inserted into the plasmid pHT304 (Arantes & Lereclus, 1991). The resulting plasmid (pHT304 $\Omega ilsA$ ) was amplified in *E. coli* and then introduced into the mutant strain *B. cereus*  $\Delta ilsA$  by electroporation.

# IIsA purification and antibody production

Glutathione S-transferase (GST) and GST-IIsA were purified as recombinant proteins from E. coli. The expression plasmid pgst-ilsA was constructed by PCR amplification of ilsA sequence from the В. *ilsA*-forward-2 cereus genome using the primer pair (5'-CGGAATTCTTGAAAAAAAATTATATGAAGG-3') and ilsA-reverse-2 (5'-CCCTCGAGTTATTCTTTATTGCATTATAC-3'). The DNA fragment was digested with EcoRI/XhoI, cloned into pGEX6P1 (Amersham Biosciences) restricted with the same enzymes and electroporated into E. coli Bl-21. E. coli Bl-21 strain harboring pGEX6P1-ilsA was grown to log phase in LB medium with ampicillin at 37°C. The expression of the fusion protein GST-IIsA was induced by adding IPTG (isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside) to a final concentration of 1 mM and the cultures were incubated for 3 hours at 30°C. The bacteria were sedimented by centrifugation at 7700 rpm for 15 min in 50 ml tubes and suspended in 1X PBS containing 1% Triton X-100. Bacteria were broken on ice by sonication using a Branson sonifier 250. Bacterial lysate was centrifuged at 8,000  $\times$  g for 15 min at 4°C, and the pellet containing the fusion protein IIsA-GST was further solubilized in 50 mM Tris (pH 8.0) containing 8 M urea. After solubilization in 8 M urea overnight at 4°C, the insoluble pellet was removed by centrifugation at 13000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant containing the solubilized protein was dialyzed against buffer containing Tris 50 mM (pH 8.0) and 1 M urea, for about 5 hours under stirring at 4°C to remove the residual detergent. The solubilized and dialyzed fusion protein was loaded onto a glutathione Sepharose 4B column equilibrated with 1X PBS. After binding the fusion protein, column was washed with PBS 1X and the target protein GST-IIsA was eluted with 10 mM reduced glutathione.

Purified GST-IIsA was then dialyzed against the PreScission protease buffer (50 mM Tris HCl pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) at 4°C overnight, the GST was then cleaved using the PreScission protease at a concentration of 2 Units  $\mu$ l<sup>-1</sup> for 4 hours at 5°C. After digestion, the mix was separated on a 10% gel SDS PAGE and the IIsA band was cut from the gel and used to raise rabbit polyclonal anti-iIsA antibodies (Proteogenix, Oberhausbergen, France).

The GST was prepared using the strain *E. coli* Bl21 harboring the plasmid pGEX6P1. After induction, bacteria were broken by sonication and GST present in the cytosol of the bacteria was purified using the glutathione Sepharose 4B column as described above.

## Immunofluorescence analysis.

For analysis of IIsA localization at the bacterial surface, overnight cultures of *B. cereus* wildtype, *B. cereus*  $\Delta i lsA$  and the complemented strain *B. cereus*  $\Delta i lsA$  pHT304 $\Omega i lsA$  were grown in LB medium or in LB medium treated with 150  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl at 37°C and used immediately. 10<sup>9</sup> stationary phase culture bacteria (concentrated in 50  $\mu$ l) were washed twice in phosphate buffered saline (PBS 1X) and fixed with 4% paraformaldhehyde dissolved in PBS 1X on a cover slip. After fixation, bacteria were washed in PBS and then labeled with an anti-IIsA polyclonal antibody diluted at 1:500 in 1% BSA, followed by an anti-rabbit secondary antibody Alexa 488-conjugated at a dilution of 1:500 in 1% BSA. Bacterial DNA was also labeled with the Dapi at a dilution of 1:300 in 1% BSA. Labeled bacteria were then sticked with the Mowiol on a glass slide and dried at 37°C for 30 min. Preparations were observed with Zeiss Axiovert 135 microscope. Image acquisition from the Zeiss microscope was carried out with a cooled charge-coupled device camera (Princeton), and the images were processed with Metamorph software (Universal Imaging Corporation).

# **Growth assay**

*B. cereus* cultures were grown overnight under low-iron conditions by inoculating strains in LB medium supplemented with 200  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl. Overnight cultures were centrifuged and washed twice in LB medium treated with 500  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl. Washed bacteria were then inoculated to a final optical density (OD) of about 0.01 into LB medium containing the 2,2'-dipyridyl (450  $\mu$ M) only or supplemented with hemoglobin (2  $\mu$ M), hemin (16.5  $\mu$ M), ferritin (0.3  $\mu$ M), transferrin (1.5  $\mu$ M) or lactoferrin (1.5  $\mu$ M). Cultures were grown at 37°C with aeration, and bacterial growth was monitored by measuring the optical density at 600 nm over 10 hours.

# **Growth index**

*B. cereus* wild-type strain, the mutant strain *B. cereus*  $\Delta ilsA$  and the complemented strain *B. cereus*  $\Delta ilsA$  pHT304 $\Omega ilsA$  were inoculated into LB medium supplemented with 200  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl and grown overnight. Overnight cultures were inoculated into LB medium treated with 200  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl at a final OD of 0.1. After incubation for 8 hours at 37°C, the resulting cultures were washed with 500  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl and inoculated at an OD of about 0.01 into fresh iron-free LB containing the appropriate antibiotics in the presence of 450  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl with or without either hemoglobin (2  $\mu$ M), or hemin (16.5  $\mu$ M), or ferritin (0.3  $\mu$ M) or FeCl<sub>3</sub> (200  $\mu$ M) as a positive control. After 24 h of incubation, bacterial growth was recorded by measuring the absorbance at 600 nm (OD<sub>600nm</sub>) and the data were generated as the growth index (growth in iron-free LB with or without the iron sources divided by growth in iron-rich LB).

# Enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA)

The binding assay was performed by using increasing amounts of hemoglobin (0 - 180 nM) and ferritin (0 - 180 nM) for coating a 24 wells ELISA plates in coating buffer (0.1 M phosphate buffer pH 7.4). After incubation for 18 hours at 4°C, wells were blocked with 1% BSA dissolved in the coating buffer for 1 h at 37°C. After blocking and between each further step, wells were washed three times with 0.15 M NaCl dissolved in the coating buffer which contain 0.1% Tween 20. Purified IIsA was added at a concentration of 30 nM and incubated with hemoglobin and ferritin for 2 hours at 37°C. Interactions between hemoglobin and IIsA or ferritin and IIsA were detected with the polyclonal anti-IIsA antibody at a 1:500 dilution and horseradish peroxidase-labeled secondary anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) at a dilution of 1:10 000. Binding of IIsA to its partner was quantified by measuring the conversion of the chromogenic substrate, otho-phenylendiamine dihydrochloride (OPD), to the colored product based on optical density readings at 492 nm. Generated values were transformed and used for estimation of Michaelis constant (Km) by the Michaelis Model.

# Surface plasmo resonnance (SPR)

Real time binding kinetics experiments were conducted on a BIAcore 3000 (GE Healthcare Europe). GST-IIsA fusion protein was immobilized via its GST-tag in a flow cell of a CM5 sensor chip. For this purpose, a goat anti-GST antibody was first immobilized on the sensor chip using amine-coupling chemistry. The surface was activated for 7 min with a mixture of 0.05 M NHS and 0.2 M EDC. Anti-GST was then covalently linked to the surface giving up to 8000 resonance units (RU). Ethanolamine (1 M, pH 8.5) was injected for 7 min to block the remaining activated groups. Capture of GST–IIsA (1  $\mu$ M) was performed at an injection flow of 5  $\mu$ l min<sup>-1</sup> in 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4), until stabilization of the immobilization

level (6–8 min). For binding kinetics, a concentration of 200 nM of each IIsA ligand (hemoglobin, hemin, ferritin, and transferrin) was injected on the captured IIsA for 8 min and dissociation was registered for 10 min after the end of injections. Regeneration of the anti-GST capture antibody was achieved by a 2 min injection of glycine buffer (pH 2.2). The sensorgram resulted from a cell with immobilized GST-IIsA was corrected by subtracting the response resulted from a cell with immobilized anti-GST only (reference surface) and normalized to a baseline of 0 RU. All measurements were performed at 20°C. Sensorgrams were analyzed using BIAevaluation Software.

# Heme detection by chemiluminescence

Hemin was dissolved immediately before use in a minimal volume of 0.1 M NaOH and diluted with phosphate buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, pH 7.4) to a concentration of  $10^{-4}$  M. Twenty microliters of purified GST-IIsA (2.5x10<sup>-7</sup> M) were incubated with heme or with only the buffer at room temperature for 30 min. Purified GST was also used as negative control. Mixtures were separated by non denaturing 8% PAGE in the absence of SDS at 4°C and the proteins were electrotransferred to a nitrocellulose membrane. The presence of heme complexed to IIsA was detected by chemiluminescence due to the heme peroxidase activity (Vargas *et al.*, 1993), using the Pierce ECL Super signal system.

# *In vivo* expression using the *gfp* reporter gene

In order to follow the expression of *ilsA in vivo*, we constructed a plasmid carrying the *pilsA-gfp* transcriptional fusion. The plasmid pHT315-*gfp* was obtained by cloning the gene *gfp-mut1* into the plasmid pHT315 (Arantes & Lereclus, 1991) between *Xba*I and *Hind*III 12

restriction sites. gfp-mutl was amplified from the template plasmid pNF8 of Listeria monocytogenes and using the primers F-gfp (5'-GCTCTAGAGAAAGGAGGTTATTAAAATGAGTAAAGGAGAAGAACTT-3') and R-gfp (5'-CCCAAGCTTTTATTTGTATAGTTCATCCATGCCA-3') (Fortinau et al. 2000). The ilsA promoter region (pilsA) was generated by PCR with oligonucleotide pairs Fw-pilsagfp (5'-CCGGAATTCGGGCTTTTTTTTTTTTTTGTACC-3') and Rv-I1 (5'-CCCTGAACAGTGTTCTCGG-3') using the pHT304-pivi29'-I from the IVET screen (Fedhila et al., 2006) as a template. The PCR fragments were digested by EcoRI and XbaI and were inserted between the EcoRI and XbaI restriction sites of pHT315-gfp plasmid to give the plasmid pHT315-pilsA'-gfp. The resulting plasmid pHT315-pilsA'-gfp was cloned in E. coli and was then used to transform B. cereus. The strain harboring the plasmid pHT315-pilsA'gfp was used to infect the lepidopteran larvae G. mellonella orally in order to follow the kinetics of *ilsA* expression *in vivo*. The insect larvae were infected with  $5 \times 10^6$  mid-log phase bacteria ( $OD_{600} \sim 1$ ) in association with 3 µg of Cry1C toxin and incubated at 37°C, according to the protocol previously described (Fedhila et al., 2002). Larvae were dissected and bacteria were recovered from the insect gut at 9 hours after infection and from the hemocoel at 24 hours after infection. The bacteria were then subjected to bright field (DIC) and epifluoresence microscopical observation (NIKON Eclipse E600 equipped with UV mercury disposal and observed with an FITC filter). We used, as a positive control, the B. cereus strain harboring the plasmid pHT315-paphA3'-gfp that contains a transcriptional fusion between the constitutive promoter paphA3 and the gfp gene (C. Nielsen-LeRoux, unpublished data).

## Virulence assays

The virulence properties of IIsA were assessed by comparing the killing effect of the wildtype and the *ilsA* mutant *B. cereus* strains after injecting them separately into the hemocoel of the *G. mellonella* larvae. Last-instar larvae weighing about 200 mg was injected with 10  $\mu$ l of mid-log phase bacteria using the microinjector (Buckard Scientific, UK.) as described (Fedhila *et al.*, 2002). Various doses of *B. cereus* wild-type and the *ilsA* mutant (10<sup>3</sup> to 10<sup>2</sup> bacteria / larvae) were used and each dose was repeated three times on at least 20 larvae. Infected larvae were kept at 37 °C and mortality was recorded after 24 hours. The LD<sub>50s</sub> values were estimated using the Probit analysis (Finney, 1971; Raymond, 1993). This program tests for the linearity of dose-mortality curves, provides lethal doses and the slope of each dose-mortality line. It tests the parallelism of two or more dose-mortality lines and determines the virulence ratio between the bacterial strains. The ratio is considered to be significantly different from 1 (*P* < 0.05) when the confidence limits do not include this value.

## Growth kinetics of *B. cereus* in the hemocoel of *G. mellonella*

The growth (number of bacteria) was assessed at 2, 6 and 24 hours after injecting doses of 500 mid-log phase bacteria of the wild type and the *ilsA* mutant strains into the hemocoel of the larvae *G. mellonella* separately. At each time-point, three alive larvae were recovered, surface-sterilized by rinsing briefly in 70% ethanol, crushed, and homogenized separately using a polytron homogenizer (Kinematica, Switzerland) in 10 ml Phosphate buffered saline pH 7.4. Serial dilutions were plated on LB medium containing the appropriate antibiotics, in order to estimate the number of bacteria present in the larvae. At each time point, the results are the means of nine independent larvae from three independent tests.



# Figure 1 - Localization of IIsA on the surface of *B. cereus*.

The wild-type grown in LB medium (panels A-C) and in LB+150  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl medium (panels D-F), the mutant  $\Delta ilsA$  grown in LB+150  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl medium (panels G-I), and the complemented  $\Delta ilsA$ +pHT304 $\Omega ilsA$  strains grown in LB+150  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl medium (panels J-L), were analyzed by light microscopy with phase contrast (panels A,D,G,J) and immunofluorescence (panel B,E,H,K) using the IIsA polyclonal antibody. The merged images (panels C,F,I,L) show the DAPI stained DNA stained in red and IIsA in green. IIsA is localized at the bacterial surface of the wild-type and only in iron depleted condition (panels E,F). Interruption of *ilsA* abolished the presence of IIsA on the bacterial surface (panels H,I) and the complementation of the mutation restored the localisation (panel K,L). White bar represent 2  $\mu$ m.

# Results

# Localization of IIsA on the bacterial surface

The analysis of the IIsA sequence indicated a possible SLH-domain (S-Layer Homology) presumably binding the protein to the peptidoglycan (Fedhila *et al.*, 2006). To determine the localization of IIsA, we analysed its presence on the bacterial surface by immunofluorescence using the polyclonal antibody anti-IIsA (Fig. 1). IIsA was detected on the surface of *B. cereus* wild-type grown in iron depleted condition (LB supplemented with iron chelator) (Fig. 1D-F), whereas IIsA was not present on the surface of neither the wild-type strain grown in LB medium (standard condition) (Fig. 1A-C) nor the mutant strain *B. cereus*  $\Delta ilsA$  grown in iron depleted medium (Fig. 1G-I). Transformation of the *B. cereus*  $\Delta ilsA$  mutant with the plasmid pHT304-*ilsA* restored the production of IIsA on the apical and on the division site of the bacteria. These results indicate that IIsA is present on the surface of the bacteria and only in iron limited condition which is in agreement with the iron-regulated expression of *ilsA* (Fedhila *et al.*, 2006).

# B. cereus uses hemoglobin, hemin and ferritin as iron sources

The ability of *B. cereus* to utilize host iron sources has not been investigated earlier. To determine which iron sources *B. cereus* is able to use, we measured its ability to grow on hemoglobin, hemin, ferritin, transferrin and lactoferrin, in iron depleted LB medium (Fig. 2). *B. cereus* growth was very weak in iron depleted condition, but the addition of either hemoglobin, or hemin, or ferritin to the iron depleted medium increased significantly the



Figure 2 - Growth kinetic of *B. cereus* wild-type using iron-rich host proteins as sole iron sources.

*B. cereus* was grown in LB medium treated with 2,2'-dipyridyl without addition of iron sources ( $\blacksquare$ ) or supplemented with hemoglobin ( $\diamond$ ), or hemin ( $\blacklozenge$ ), or ferritin ( $\blacklozenge$ ) or transferrine ( $\triangle$ ) or lactoferrine ( $\square$ ). Bacterial growth was determined by measuring the optical density (OD) at 600 nm. Curves are representative of three independent experiments.



# Figure 3 - Growth index phenotype of *B. cereus* wild-type strain and the mutant *B. cereus* $\Delta ilsA$ using iron-rich host proteins as the sole iron sources.

*B. cereus* wild-type, the mutant  $\Delta ilsA$  and the complemented  $\Delta ilsA$ +pHT304 $\Omega ilsA$  strains were grown in iron free-medium treated with 2,2'-dipyridyl (450 µM) or supplemented with host iron sources: hemoglobin (2 µM) or hemin (16.5 µM) or ferritine (0.3 µM) for 24h. Ferric chloride (200 µM) was used as control for inorganic iron source. The optical density was recorded at 600 nm and the growth index was quantified (growth in indicated conditions, compared to growth in LB (iron-rich) medium). The mutant  $\Delta ilsA$  strain was unable to grow in the presence of any of the tested host iron sources and complementation of *ilsA* to the mutant strain  $\Delta ilsA$  restores the bacterial growth phenotype. The mutant  $\Delta ilsA$  strain was able to grow with ferric chloride. Results are the means of three independent experiments and error bars indicate the standard deviations of the mean. growth kinetics of *B. cereus*. In contrast, the addition of transferrin and lactoferrin to the iron depleted medium showed a growth of *B. cereus* that is similar to its growth in iron depleted medium. This result indicates that *B. cereus* is able to use hemoglobin, hemin and ferritin as iron sources for growth, whereas transferrin and lactoferrin can not be used.

# IIsA is required for efficient iron acquisition from hemoglobin, hemin and ferritin

To test the hypothesis that IIsA is important for iron scavenging from the host iron sources used by *B. cereus*, the growth rates of the wild-type and *ilsA* mutant strains were compared after inoculation in iron depleted medium where hemoglobin, hemin or ferritin were provided as the sole iron source. Bacterial growth was measured by spectrophotometric analysis of culture samples at an optical density of 600nm (OD<sub>600</sub>) (Fig. 3). Iron depleted LB did not support the growth of the wild-type and the  $\Delta ilsA$  strains, confirming that iron is an essential nutrient for B. cereus growth. In contrast, the wild-type strain grew well in iron depleted LB that had been supplemented with hemoglobin, hemin or ferritin, while B. cereus lacking ilsA show significant growth defects in these medium. However, the mutant strain grew as the wild-type when iron was provided in its inorganic form (FeCl<sub>3</sub>). Therefore, IlsA is not required for the uptake of inorganic iron. To verify that this phenotype was specifically due to ilsA, the mutant strain was complemented with a plasmid harboring ilsA. The growth phenotype was restored to the wild-type level when hemoglobin, hemin or ferritin were added to iron depleted LB. These data indicate that IIsA is very important for efficient growth of B. cereus under iron restricted conditions; they suggest that IIsA is necessary for iron acquisition from the host during infection.


## Figure 4 - IlsA binds hemoglobin and ferritin

A- Binding of purified GST-IIsA to hemoglobin and ferritin was performed in an ELISA based assay. Hemoglobin  $(\Box)$  and ferritin ( $\blacksquare$ ) were coated on ELISA plates at increasing amounts, and IIsA was added at 3 pmole. Binding was quantified by measuring the absorbance after incubation with anti-IIsA and the secondary antibody perroxydase-labelled. Data shown are the mean of three independent experiments.

B- Real-time kinetics of interaction between heme, ferritin, hemoglobin and transferrin with GST-IIsA fusion protein. Overlay plot of sensorgrams corresponding to interaction of these various proteins with GST-IIsA fusion protein. GST-IIsA fusion protein was first captured to saturation by anti-GST antibody linked covalently to the carboxymethyldextran chip. Then various molecules (200 nM) were injected for 8 min after which dissociation was followed. Note the absence of transferrin binding.

#### IlsA binds hemoglobin and ferritin

To address the question whether IIsA can directly interact with hemoglobin and ferritin, we performed binding studies using the purified recombinant protein GST-IIsA. In these assays, increasing amounts of hemoglobin and ferritin were immobilized in ELISA plates, and IIsA was added. The amount of bound IIsA was detected using anti-IIsA polyclonal antibody. By comparing the signal intensities generated by the binding of IIsA to the different proteins, we detected a significantly higher binding of IIsA to hemoglobin (Km =  $3 \pm 1$  nM) relative to ferritin (Km =  $10 \pm 3$  nM) (Fig. 4A).

To investigate whether binding also occurs in a real time interaction, we used the Surface Plasmo Resonance (SPR) system. The interaction between dextran-chips immobilized GST-IIsA and different host iron-rich molecules (hemin, hemoglobin, ferritin and transferrin) under flow conditions shows typical SPR curves. Computational analyses led to a complex model of interaction resulting probably from the protein multivalencies and potential steric hindrance. Quantitative information about the relative stability of the complex was deduced from the dissociation phases (independent from the analyte concentration). Assuming a simplified kinetics scheme, indicative kinetic dissociation constants ( $k_{off}$ , expressed in s<sup>-1</sup>) were calculated:  $1.71 \times 10^{-3}$  for ferritin,  $1.48 \times 10^{-3}$  for hemoglobin and  $1.34 \times 10^{-3}$  for hemin. The results are in accordance with the ELISA experiments showing that soluble ferritin and hemoglobin bound to immobilised IIsA, but not transferrin (result not shown). The lack of direct interaction between IIsA and transferrin could be expected since the growth experiment indicated that this protein was not used by *B. cereus* as an iron source (Fig. 2).



## Figure 5 - Hemin binding analysis of purified IIsA.

(A) Chemoluminescent detection showing binding of GST-IIsA to hemin (He). Purified GST-IIsA or GST incubated either with hemin (+) or without (-) as indicated on the top of the lane, were migrated on nondenaturing PAGE and electrotransfered to a nitrocellulose membrane. Phosphate buffer alone was also incubated with hemin (+) as a control. After reaction with an ECL reagent system, proteins with hemin-binding properties are detected on chemoluminescent-sensitive film. Upper arrow corresponds to GST-IIsA binding to hemin and lower arrows to hemin alone.

(B) Multiple sequence alignments of NEAT domains of IlsA from *B. cereus* and Isd proteins from *S. aureus*. Positions shaded in yellow are identical in 100% of the aligned sequence, blue and green are identical or similar, respectively, in at least 50% of the aligned sequences. The first four letters of the sequence identifier represent the protein identity. Numbers 1 to 3 represent the NEAT domain numbered from the N-terminus out of the total number of NEAT domains in that protein. The accession numbers of Isd proteins from *S. aureus* are as follows: IsdH (Q99TD3), IsdB (Q7A656), IsdA (Q7A655), IsdC (Q7A654). The accession number of IlsA from *B. cereus* 14579 is NP\_831113. NEAT domains were identified in the Pfam database (Sonnhammer *et al.*, 1997). Alignments were generated in vector NTI advance 10 (Invitrogen), using a BLOSUM matrix with gap opening and extension penalties of 15 and 2, respectively.

### **IlsA binds heme**

To determine whether IIsA in solution binds to the heme or another component of hemoglobin, we have incubated purified GST-IIsA and GST (negative control) with hemin (10<sup>-4</sup> M) and analyzed the binding reaction on a nondenaturing polyacrylamide gel system (Fig. 5A). This allows the separation of free heme, purified proteins and heme-loaded proteins without dissociating heme from the proteins. Proteins were transferred to a nitrocellulose filter, and heme perroxidase activity was detected by chemiluminescence. This method is the most sensitive test available for detecting heme bound to proteins (Vargas et al., 1993). Our results showed that GST-IIsA can bind heme-iron, whereas GST alone did not. This is in agreement with the result of the multiple sequence alignment of the NEAT domain of IlsA with those found in Isd proteins of S. aureus (Fig. 5B). Indeed, this comparison indicates that the three conserved residues (Ser<sup>82</sup>, Tyr<sup>166</sup> and Tyr<sup>170</sup> present in IsdA) which are essential for heme interaction (Grigg et al., 2007; Pilpa et al., 2006) are also present in IIsA. Furthermore, the residues Val<sup>157</sup>, Ile<sup>159</sup> and Val<sup>161</sup> that form the hydrophobic heme-pocket in IsdA are either conserved in IIsA or replaced with similar hydrophobic amino acids. The conservation in IIsA NEAT domain of amino acid residues known to interact with heme, suggests that IIsA bind heme through the NEAT domain.

### ilsA is strongly expressed in the hemocoel of the infected larvae

The IVET screen showed that *ilsA* was strongly expressed during infection of the insect larvae (Fedhila *et al.*, 2006). However, it was not determined at which stage of the infection and in which tissue *ilsA* expression occurred. To determine where *ilsA* is expressed *in vivo*, larvae were infected with *B. cereus* harboring a plasmid which contains a transcriptional fusion



# Figure 6 - Analysis of *ilsA* expression *in vivo*.

Microscopical observations by Bright-field DIC (panels A,B) and epifluorescence (panels C-F) were performed on *B. cereus* carrying pHT315-p*ilsA*'*gfp* isolated at 9 hours after infection from the intestine of alive larvae (panels A-C) and at 24 hours after infection from the hemocoel of dead larvae (panels B-D). Green bacteria indicate expression of *gfp* due to the activation of the *ilsA* promoter. *B. cereus* carrying pHT315-p*apha3*'*gfp* was used as a control for its constitutive expression of GFP (panels E,F)

between the promoter *pilsA* and the *gfp* reporter gene. Bacteria recovered from the larvae at various times post infection were subjected to bright field (Fig. 6A-B) and epifluoresence microscopy observations (Fig. 6C-F). No fluorescence was observed on bacteria isolated from the intestine of alive larvae after nine hours of infection (Fig. 6C). In sharp contrast, *B. cereus* bacteria isolated from the hemocoel of dead larvae after 24 hours of infection, showed a strong fluorescence (Fig. 6D), thus indicating that *ilsA* is highly expressed in the hemocoel. Indeed, iron is not accessible for bacteria in the hemocoel due to the presence of proteins that bind iron such as transferrin and ferritin (Locke, 1992; Yuk, 2005). *B. cereus* containing the plasmid (pHT315-p*aphA3'-gfp*) with the constitutively expressed *gfp* gene, showed a strong expression in both intestine and hemocoel of the infected larvae (Fig. 6E-F).

#### IIsA is required for full virulence of *B. cereus* in *Galleria melonella*

It was previously shown that *ilsA* disruption significantly decreased virulence of *B. cereus* in insect larvae infected via the oral route (Fedhila *et al.*, 2006). To better inquire into the role of IlsA during pathogenesis, we analyzed the effect of the *ilsA* mutation on virulence when the bacteria are directly injected in the hemocoel of *G. mellonella*. After 24 hours of infection with various doses of mid-log phase bacteria ( $10^2$  to  $10^3$ ) the number of dead larvae was recorded (Fig. 7A). The 50% lethal doses ( $LD_{50s}$ ) of the wild-type and of the *\Delta ilsA* mutant strains were assessed by Probit analysis and shown as histograms. The wild-type strain had an  $LD_{50}$  of 2.2 x  $10^2$  (confidence limits between  $1.8 \times 10^2$  and  $2.6 \times 10^2$ ) bacteria per larvae and the mutant showed a  $LD_{50}$  value of  $4.8 \times 10^2$  (confidence limits between  $4.1 \times 10^2$  and  $5.7 \times 10^2$ ) bacteria per larvae. These results indicated that the mutant was significantly less virulent than the wild type specifically at low doses of bacteria. A decrease of 2.2-fold (range 1.59 to



Figure 7 - IIsA is required for *B. cereus* infection in the model *G. mellonella*.

(A) Effect of *ilsA* mutation on the virulence after intra hemocoelic injection in *G. mellonella*. Last-instar larvae were injected with various doses  $(10^2 \text{ to } 10^3)$  of log-phase bacteria. Mortality was evaluated after 24 h of injection of *B. cereus* wild-type (bold histogram) and *B. cereus*  $\Delta ilsA$  (grey histogram). Results are mean values of four independent experiments and error bars indicate the standard errors of the means.

B) Effect of *ilsA* mutation on the growth of *B. cereus* after inta hemocoelic injection in *G. mellonella*. Wild-type and the mutant  $\Delta ilsA$  strains were injected separately into the hemocoel of last-instar larvae at a dose of  $5x10^2$  log-phase bacteria. Bacteria were counted at various times after injection (2, 6 or 24h) from living larvae. Time 0 h is the real dose of each strain injected in the hemocoel. Results are the mean of bacterial counts from three different larvae and error bars indicate standard errors of the means. Y Axis are cut from (8e+2 cfu) to (2e+6 cfu) and X axis are cut from (6 hours) to (24 hours).

3.07 at the 5% confidence level) was determined by comparing the two dose-response regression lines.

## IIsA is important for bacterial growth in the hemocoel

Growth of the wild-type and  $\Delta ilsA$  mutant strains was assessed by homogenization of the whole larvae, at several time points after injection into the hemocoel of *G. mellonella* (Fig. 7B). A dose of ~ 500 mid-log phase bacteria (estimated as colonies forming units (cfu)) was injected and was used as the start point. After 2 hours of injection, the number of the  $\Delta ilsA$  bacteria in the insect larvae decreased drastically (75.5 cfu), while the number of the wild-type bacteria was slightly increased (530 cfu). After 6 hours, *B. cereus*  $\Delta ilsA$  had a growth about 10-fold less (39.4 x 10<sup>3</sup> cfu) than the *B. cereus* wild-type strain (50.3 x 10<sup>4</sup> cfu). After 24 hours, the growth of the mutant strain was still affected (18.5 x10<sup>5</sup> cfu) but only 2.5-fold less than *B. cereus* (50.7 x 10<sup>5</sup> cfu). This suggests that the virulence decrease of the mutant strain may be due to a growth and the survival of *B. cereus* in the hemocoel, when the bacteria enter this compartment of the larvae after disruption the intestinal barrier or after direct penetration following injection.

## Discussion

The ability to sequester free iron is not only necessary for protection against its toxicity but it is also an innate resistance mechanism of hosts (mammals or insects) to fight infections (Bullen et al., 2006; Dunphy et al., 2002). Iron incorporated into heme is the most abundant iron source in mammalian host being mainly associated with the oxygen-carrying molecule, hemoglobin, sequestered within erythrocytes. Ferritin, a large molecule containing about 4500 Ferric ions atoms, is present not only in mammals but also in almost all living organisms such as insects, plants (phytoferritin) and bacteria (bacterioferritin). It is the major iron storage in all organisms, playing a central role in the maintenance of cellular iron homeostasis by sequestering intracellular iron in a non toxic form (You & Wang, 2005). In insects, notably in G. mellonella, ferritin is present in high amounts in the hemocoel and cells and may play a role in iron transport in addition to iron storage (Kim et al., 2001; Yuk, 2005). In the host, the availability of iron is strictly limited. Thus, bacteria must be able to chelate and actively take up any available iron in order to grow and successfully infect the host. It has been shown that expression of the majority of genes involved in iron acquisition and iron metabolism such as surface receptors, transport proteins and some hemolysins and cytotoxins are controlled by the repressor Fur (Braun, 2001; Ratledge & Dover, 2000). IlsA belonging to Fur regulon plays the role of surface receptor for heme, hemoglobin and ferritin exclusively in an iron depleted environment. But, hemoglobin and ferritin are intracellular iron rich proteins and must be released from cells in order to be used by *B. cereus* for its growth. It has been shown that *B*. cereus produces a large variety of cytotoxic proteins (Hbl, Nhe, CytK, Clo and HlyII) able to lyse various eukaryotic cells including erythrocytes. Expression of these cytotoxic proteins with the exception of hemolysin II (HlyII) is regulated by the pleiotropic regulator PlcR (Agaisse et al., 1999; Gohar et al., 2008). However, the hemolysin II seems to be an iron regulated protein through the putative Fur box present in its promoter region (Harvie et al., 2005). This hemolysin II has been shown to have a cytolytic activity on erythrocytes from various kinds of mammals and on eukaryotic cells (Andreeva et al., 2006). Being also a part of the Fur regulon this might suggest that hemolysin II is expressed under the same condition as IIsA allowing the release of hemoglobin, heme and ferritin from cells. Heme, hemoglobin and ferritin can be captured on the surface of *B. cereus* and used for its growth by binding to the surface iron receptor, IIsA. In fact, purified recombinant IIsA can bind hemoglobin and ferritin in vitro with a higher affinity for hemoglobin. In addition, we showed that IIsA can bind heme, suggesting that the interaction between IIsA and the hemoglobin is due to its interaction with the heme. How IIsA binds heme is currently unknown; however studies from other NEAT proteins have identified conserved tyrosine residues and hydrophobic residues that form the heme pocket which mediates heme binding (Grigg et al., 2007; Pilpa et al., 2006). These residues are also present in the IIsA NEAT domain, suggesting that IIsA mediate heme binding through this domain. Therefore, binding of IIsA to hemoglobin may be realized through its NEAT domain. The interaction with ferrtin is much less evident, although it was previously reported that the NEAT protein IsdA in S. aureus binds to several non heme host proteins, including the ferric iron carrier transferrin (Taylor & Heinrichs, 2002), several matrix and plasma protein (Clarke et al., 2004). However, IlsA is a more complex protein than IsdA as it has LRR domains. Thus, it is tempting to speculate that the LRR domains could be involved in this binding, since LRR domains are known to be responsible of proteinprotein interaction (Kobe & Kajava, 2001).

These results make IIsA a key protein of a new iron/heme acquisition system in *B. cereus*. In order to achieve the transport of iron and heme across the cell wall and the cytoplasmic membrane into the cytoplasm, IIsA might interact with other bacterial partners.



### Figure 8- Model for iron acquisition in *B. cereus*.

In the host, *B. cereus* is in iron restrictive environment. This will lead expression of IIsA and the Isd-like proteins. IIsA binds heme (H-Fe) directly from hemoglobin (Hb) or indirectly through Bc4548. Heme will then be transfer to Bc4547, Bc4549 and finally to the ABC transport system (Bc4544-45-46) located in the plasma membrane. Once heme is present in the cytoplasm, the monooxygenase (Bc4542) catalyze the degradation of the heme and the released iron can be used for *B. cereus* growth. Arrows indicate the orientation and approximate sizes of the open reading frames. Potential transcription terminators are represented. The putative *fur box* in the promoter region upstream of *IlsA* (BC1331) and *Isd-like operon* is indicated. Each cylinder indicates a NEAT domain. CW = cell wall, PM = plasma membrane, CY = cytoplasm.

IIsA like HarA in *S. aureus* seems to be an exception, since the gene does not cluster with an iron ABC transporter gene on the chromosome, unlike IsdB, IsdA and IsdC of the iron-regulated surface determinants (Isd) system identified in *Stapylococcus aureus* which are in the vicinity of the IsdDEF iron transporter ABC system (Mazmanian *et al.*, 2002; Mazmanian *et al.*, 2003). Homologs of the *isd* locus encoding for the heme acquisition system in *S. aureus*, were also identified in other Gram positive bacteria including *B. anthracis* and *Listeria monocytogenes*. In *B. anthracis*, the Isd system was shown to be implicated in heme uptake but not in *L. monocytogenes* (Maresso *et al.*, 2006; Newton *et al.*, 2005). Unlike *S. aureus* which relies on cell wall anchored Isd proteins for heme scavenging, *B. anthracis* seems to have evolved NEAT domain proteins (IsdX1, IsdX2) secreted in the extracellular environment and in the bacterial envelope IsdC in order to provide heme transfer to the ABC transporter (IsdE1E2F) (Maresso *et al.*, 2008). But other study in B. antracis reported that only IsdX1 is secreted, while IsdX2 and IsdC are sortase B substrate and therefore are located in the bacterial envelope (Gat *et al.*, 2008).

*In silico* analysis of *B. cereus* genome revealed several genes (Bc4547, Bc4548, Bc4549) encoding NEAT domain proteins. Bc4548 the homolog of IsdX1 of *B. anthracis* will act as a hemophore, while Bc4547 and Bc4549 with the sorting motif NSKTA and NPKTG respectively are the substrate of the putative sortase B (Bc4543) and they will be located in variable position throughout the peptidoglycan. These genes are clustered with genes (Bc4544, Bc4545, Bc4546) encoding an ABC iron transporter system and a monooxygenase putative (Bc4542). Thus, on the basis of our studies and those done on other Gram positive bacteria, we propose a model (Fig. 8) wich suggest that IIsA may interact with these NEAT proteins described above. But, the presence of IIsA is crucial since its interruption abolish the ability of *B. cereus* to grow in the presence of hemoglobin or hemin or ferritin. The important

role of IIsA can be explained by the presence of SLH domains that bind IIsA to the S-layer which is the outermost component of the cell envelope (Navarre & Schneewind, 1999). Thus, IIsA will be the first protein that interacts with molecules in the extracellular environment.

To determine at which stages during the infection *ilsA* is expressed, we used the *gfp* fusion. The observations showed that IIsA is highly expressed in the hemocoel. Studies have shown that iron is not accessible for bacteria in the hemocoel, due to the presence of proteins that bind iron such as ferritin (Yuk, 2005). Thus, expression of *ilsA* could be initiated in response to iron depleted conditions and/or due to its interaction with ferritin in order to capture iron and provide it to *B. cereus* for its growth and survival within *G. mellonella*. Further, we determined the contribution of IIsA to the pathogenesis of B. cereus after injection in the hemocoel of G. mellonnella. Disruption of IIsA decreases the virulence and the growth of B. cereus and thus indicates that IIsA is an important factor required for full virulence and adaptation within an insect host especially in the early stages of infection, before iron ions may be released from degraded tissue. Unfortunately, there is no reliable animal model of the human opportunistic pathogen *B. cereus* in order to assess the role of IlsA in virulence in the most realistic manner. However, growth defects of the *ilsA* mutant compared to the *B. cereus* wild-type were observed in contact with both murin marcrophages and in pork blood (results not shown), indicating that IIsA is also important in mammalian conditions. Thus, IIsA is the first host iron receptor in B. cereus shown to contribute to in vitro growth on hemoglobin, heme and ferritin as an iron source, as well as virulence in vivo. In this study, we provide evidence that IIsA is necessary and sufficient to mediate binding and permitting iron acquisition from these iron-binding proteins. Future investigations are needed for the complete understanding of the mechanism of iron uptake through IIsA. The first deals with the study of the structural determinants of IIsA that allow its interaction with various ligands and especially with ferritin. The second major point concerns the partners with whom IIsA interact to transfer heme and ferric iron across the cell wall and the cytoplasmic membrane into the cytoplasm. Finally, it would be interesting to determine which iron source is used preferentially by *B. cereus* and at which stages of the infection. Detailed description of the mechanism by which IIsA allows *B. cereus* to acquire iron from the hemoglobin, heme and ferritin will provide a better understanding of not only *B. cereus* pathogenesis but also for infections caused by other Gram-positive bacteria.

In conclusion, our investigations show, how a bacterial adaptation factor can be directly correlated with virulence; furthermore they give insight into the understanding of host adaptation and evolutionary ecology of *B. cereus* group bacteria, including the mammal pathogen *B. anthracis* and the invertebrate bio-pesticide *B. thuringiensis*. Finally, our results are of novelty since they show the first steps of a new and unique mechanism of iron acquisition, which is specifically adapted for interaction with two different iron-rich host proteins.

# Acknowledgments

We thank Cécile Wandersman from Pasteur Institute for helpful discussions and for critical reading of the manuscript. We also thank Hélène Biern for precious help in immunofluorescence experiments at Pasteur Institute. We acknowledge funding supports from the Institut National de la Recherche Agronomique and from the Conseil de la recherche de l'Université Saint Joseph de Beyrouth.

# References

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

Andreeva, Z. I., Nesterenko, V. F., Yurkov, I. S., Budarina, Z. I., Sineva, E. V. & Solonin, A. S. (2006). Purification and cytotoxic properties of Bacillus cereus hemolysin II. *Protein Expr Purif* **47**, 186-193.

Arantes, O. & Lereclus, D. (1991). Construction of cloning vectors for Bacillus thuringiensis. *Gene* 108, 115-119.

Braun, V. (2001). Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* 291, 67-79.

Bullen, J. J., Rogers, H. J., Spalding, P. B. & Ward, C. G. (2006). Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. *J Med Microbiol* 55, 251-258.

Callegan, M. C., Booth, M. C., Jett, B. D. & Gilmore, M. S. (1999). Pathogenesis of grampositive bacterial endophthalmitis. *Infect Immun* 67, 3348-3356.

Clarke, S. R., Wiltshire, M. D. & Foster, S. J. (2004). IsdA of Staphylococcus aureus is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. *Mol Microbiol* 51, 1509-1519.

Crosa, J. H. & Walsh, C. T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 223-249.

**Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988).** High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-6145.

**Dunphy, G. B., Niven, D. F. & Chadwick, J. S. (2002).** Iron contributes to the antibacterial functions of the haemolymph of Galleria mellonella. *J Insect Physiol* **48**, 903-914.

Fedhila, S., Nel, P. & Lereclus, D. (2002). The InhA2 metalloprotease of Bacillus thuringiensis strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *J Bacteriol* 184, 3296-3304.

Fedhila, S., Daou, N., Lereclus, D. & Nielsen-LeRoux, C. (2006). Identification of Bacillus cereus internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. *Mol Microbiol* 62, 339-355.

Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. . London: Cambridge University Press.

Gat, O., Zaide, G., Inbar, I., Grosfeld, H., Chitlaru, T., Levy, H. & Shafferman, A. (2008). Characterization of Bacillus anthracis iron-regulated surface determinant (Isd) proteins containing NEAT domains. *Mol Microbiol* **70**, 983-999.

Genco, C. A. & Dixon, D. W. (2001). Emerging strategies in microbial haem capture. *Mol Microbiol* **39**, 1-11.

Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Okstad, O. A., Gominet, M., Kolsto, A. B. & Lereclus, D. (2008). The PlcR virulence regulon of Bacillus cereus. *PLoS ONE* 3, e2793.

Grigg, J. C., Vermeiren, C. L., Heinrichs, D. E. & Murphy, M. E. (2007). Haem recognition by a Staphylococcus aureus NEAT domain. *Mol Microbiol* 63, 139-149.

Hacker, J. & Kaper, J. B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54, 641-679.

Harvie, D. R., Vilchez, S., Steggles, J. R. & Ellar, D. J. (2005). Bacillus cereus Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology* 151, 569-577.

Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. & Kolsto, A. B. (2000). Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis--one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 66, 2627-2630.

Hilliard, N. J., Schelonka, R. L. & Waites, K. B. (2003). Bacillus cereus bacteremia in a preterm neonate. *J Clin Microbiol* **41**, 3441-3444.

Hoffmaster, A. R., Ravel, J., Rasko, D. A. & other authors (2004). Identification of anthrax toxin genes in a Bacillus cereus associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8449-8454.

Kim, B. S., Lee, C. S., Yun, C. Y., Yeo, S. M., Park, W. M. & Kim, H. R. (2001). Characterization and immunological analysis of ferritin from the hemolymph of Galleria mellonella. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**, 501-509.

Kobe, B. & Kajava, A. V. (2001). The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11, 725-732.

Kolsto, A. B., Lereclus, D. & Mock, M. (2002). Genome structure and evolution of the Bacillus cereus group. *Curr Top Microbiol Immunol* 264, 95-108.

Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J. & Lecadet, M. (1989). Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in Bacillus thuringiensis. *FEMS Microbiol Lett* **51**, 211-217.

Lewis, L. A., Sung, M. H., Gipson, M., Hartman, K. & Dyer, D. W. (1998). Transport of intact porphyrin by HpuAB, the hemoglobin-haptoglobin utilization system of Neisseria meningitidis. *J Bacteriol* 180, 6043-6047.

Locke, M. N., H. (1992). Iron economy in insects: transport, metabolism, and storage. *Annu Rev Entomol* 37, 195-215.

Maresso, A. W., Chapa, T. J. & Schneewind, O. (2006). Surface protein IsdC and Sortase B are required for heme-iron scavenging of Bacillus anthracis. *J Bacteriol* 188, 8145-8152.

Maresso, A. W., Garufi, G. & Schneewind, O. (2008). Bacillus anthracis secretes proteins that mediate heme acquisition from hemoglobin. *PLoS Pathog* 4, e1000132.

Mazmanian, S. K., Ton-That, H., Su, K. & Schneewind, O. (2002). An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during Staphylococcus aureus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2293-2298.

Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. (2003). Passage of heme-iron across the envelope of Staphylococcus aureus. *Science* 299, 906-909.

Miller, J. M., Hair, J. G., Hebert, M., Hebert, L., Roberts, F. J., Jr. & Weyant, R. S. (1997). Fulminating bacteremia and pneumonia due to Bacillus cereus. *J Clin Microbiol* 35, 504-507.

Navarre, W. W. & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 174-229.

Newton, S. M., Klebba, P. E., Raynaud, C., Shao, Y., Jiang, X., Dubail, I., Archer, C., Frehel, C. & Charbit, A. (2005). The svpA-srtB locus of Listeria monocytogenes: furmediated iron regulation and effect on virulence. *Mol Microbiol* 55, 927-940.

Park, R. Y., Choi, M. H., Sun, H. Y. & Shin, S. H. (2005). Production of catecholsiderophore and utilization of transferrin-bound iron in Bacillus cereus. *Biol Pharm Bull* 28, 1132-1135.

Pilpa, R. M., Fadeev, E. A., Villareal, V. A., Wong, M. L., Phillips, M. & Clubb, R. T. (2006). Solution structure of the NEAT (NEAr Transporter) domain from IsdH/HarA: the human hemoglobin receptor in Staphylococcus aureus. *J Mol Biol* 360, 435-447.

Ratledge, C. & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54, 881-941.

**Raymond, M., Prato, G., and Ratsira, D. (1993).** PROBIT analysis of mortality assays displaying quantal response. *Saint Georges d'Orgue, France: PRAXEME*.

Salamitou, S., Ramisse, F., Brehelin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M., Hernandez, E. & Lereclus, D. (2000). The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus in mice and insects. *Microbiology* 146 (Pt 11), 2825-2832.

Sato, N., Kurotaki, H., Watanabe, T., Mikami, T. & Matsumoto, T. (1998). Use of hemoglobin as an iron source by Bacillus cereus. *Biol Pharm Bull* 21, 311-314.

Sato, N., Ikeda, S., Mikami, T. & Matsumoto, T. (1999a). Bacillus cereus dissociates hemoglobin and uses released heme as an iron source. *Biol Pharm Bull* 22, 1118-1121.

Sato, N., Kurotaki, H., Ikeda, S., Daio, R., Nishinome, N., Mikami, T. & Matsumoto, T. (1999b). Lactoferrin inhibits Bacillus cereus growth and heme analogs recover its growth. *Biol Pharm Bull* 22, 197-199.

Slamti, L. & Lereclus, D. (2002). A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the Bacillus cereus group. *EMBO J* 21, 4550-4559.

Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* 32, 579-606.

Stojiljkovic, I., Larson, J., Hwa, V., Anic, S. & So, M. (1996). HmbR outer membrane receptors of pathogenic Neisseria spp.: iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. *J Bacteriol* **178**, 4670-4678.

**Taylor, J. M. & Heinrichs, D. E. (2002).** Transferrin binding in Staphylococcus aureus: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol Microbiol* **43**, 1603-1614.

Vargas, C., McEwan, A. G. & Downie, J. A. (1993). Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. *Anal Biochem* 209, 323-326.

Vilas-Boas, G. T., Peruca, A. P. & Arantes, O. M. (2007). Biology and taxonomy of Bacillus cereus, Bacillus anthracis, and Bacillus thuringiensis. *Can J Microbiol* 53, 673-687.

Wandersman, C. & Stojiljkovic, I. (2000). Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* 3, 215-220.

Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58, 611-647.

You, S. A. & Wang, Q. (2005). Ferritin in atherosclerosis. Clin Chim Acta 357, 1-16.

Yuk, J. E., Seo, D.H., Choi, C.W., HAN, J., Choi, H.K., PARK, J.B., Hwang, S.Y., Koh,S.K., and Yun, C.Y. (2005). Characterization of Tissue-Ferritin Purified from Wax Moth,. *Entomol Reaserch* 35, 227-234.

**RESULTATS COMPLEMENTAIRES** 

### I. Recherche des partenaires bactériens d'IlsA

Plusieurs démarches ont été adoptées afin d'identifier les protéines avec lesquelles IIsA interagit pour transporter le fer à l'intérieur de la bactérie. Mais malheureusement aucune n'a abouti à un résultat positif.

#### 1 Pull down

Nous venons d'identifier les sources de fer qui interagissent avec IlsA. Cependant, IlsA a besoin d'autres protéines pour transporter le fer à l'intérieur de la bactérie. Comme IlsA est une protéine de surface, certainement, associée au peptidoglycane, nous nous sommes intéressés en premier, aux protéines localisées à la surface. Dans le but d'identifier les partenaires bactériens d'IlsA, nous avons réalisé un pull down. Cette technique consiste à construire une protéine de fusion GST-IIsA qui sera exprimée dans E. coli avec une étiquette GST qui permet la fixation de la protéine IIsA à la colonne de gluthatione sépharose. Après fixation d'IlsA sur la colonne, nous l'avons incubée avec les protéines extracellulaires issues d'une culture bactérienne à T+2 (2h après la phase stationnaire) en milieu carencé en fer, afin de favoriser l'expression des protéines qui s'expriment dans ces conditions. Les protéines de surface ont été traitées avec la mutanolysine qui est une enzyme qui permet de couper le peptidoglycane libérant les protéines qui sont ancrées dans le peptidoglycane (paroi bactérienne). Après incubation, la colonne est lavée et les protéines sont éluées à l'aide d'un tampon qui permet de décrocher la GST (IlsA + éventuellement son partenaire) de la colonne. Suite à l'élution, les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide afin d'identifier les protéines qui sont présentes avec IIsA. Avec cette technique nous n'avons pas pu obtenir un résultat concluant.

## 2 Rôle d'un ABC transporteur situé à proximité d'IlsA

En général, la plupart des protéines de surface impliquées dans l'acquisition du fer sont en opéron avec d'autres protéines qui interagissent entre elles et des systèmes ABC transporteur qui assurent le transport de la source de fer à l'intérieur de la bactérie. Les études bioinformatiques *in silico* montrent qu'IIsA est présente entre deux terminateurs de transcription, mais, à proximité d'IIsA se trouve un système ABC transporteur constitué des gènes BC 1323, BC 1324 et BC 1325 (Figure 1A de l'article 2) qui codent pour une protéine de liaison, une ATPase et une membrane perméase respectivement. Afin de savoir si ce système ABC transporteur interagit avec IIsA, l'interruption des deux gènes BC 1324 et BC

1325 a été réalisée et le phénotype d'acquisition de fer à partir de l'hémoglobine, l'hème et la ferritine a été analysé. Ce travail a été réalisé par Elise Abi-Khalil, dans le cadre de son projet de Master II. Les résultats que nous avons obtenus ne montrent pas une différence significative de croissance entre la souche sauvage *B. cereus* et la souche mutée *B. cereus*  $\Delta ABC$ . Ceci suggère que ce système n'est pas, à priori, un partenaire d'IlsA. Cependant, la possibilité qu'un autre système d'ABC transporteur compense le système délété n'est pas exclue.

## **3** Etude protéomique

L'étude du protéome, nous permet d'identifier l'ensemble des protéines qui sont exprimées par le génome de la bactérie à un temps donné, et dans des conditions bien déterminées. Donc, cette technique a été utilisée afin d'identifier les protéines bactériennes de surface qui sont exprimées avec IIsA dans les conditions de carence en fer, ce qui pourra nous indiquer ses possibles partenaires. La première étape consiste à extraire et à solubiliser les protéines issues des cultures bactériennes (culots) de la souche sauvage *B. cereus* et de la souche mutante *B. cereus Ailsa*. Ces cultures sont faites en milieu LB riche en fer et en milieu LB carencé en fer, afin de comparer le protéome de ces deux souches dans ces deux conditions. La deuxième étape, consiste à séparer les protéines en combinant deux électrophorèses : 1- l'isoélectrofocalistaion (IEF) qui permet de séparer les protéines en fonction de leurs points isoélectriques (pI), 2- l'électrophorèse en SDS-PAGE qui permet de séparer les protéines en fonction de leurs masses moléculaires (MW). Les gels ainsi obtenus sont colorés au nitrate d'argent pour permettre la visualisation des protéines et étudiés par un logiciel d'analyse informatique. Les protéines ainsi séparées sont découpées du gel et analysées par spectrométrie de masse afin de les identifier.

L'analyse des gels nous a permis d'identifier des protéines qui s'expriment d'une façon différentes en milieu carencé en fer par rapport au milieu LB. Les résultats ont montré beaucoup de contamination de protéines cytoplasmique, qui, à priori, ne semble pas très intéressants. IlsA a été identifiée dans le protéome analysé dans les conditions de carence en fer. L'analyse n'a pas montré la présence des protéines du système Isd ni des protéines du système ABC transporteur ou d'autres qui pourraient être des possibles candidats.



## Figure 17 - Caractéristiques de la séquence protéique d'IlsB.

Les acides aminés conservés des domaines Leucine Rich Repeat (LRR) sont colorés en gris. Les deux régions du motif LRRs consensus sont indiquées. Le motif LGATG du coté C-terminal est marqué en rouge.

## II. Le gène ilsB :

Un deuxième gène (BC 0552), que nous avons nommé *ilsB* codant pour une protéine internaline-like de 864 aa ( $\approx$  2500 pb) a été identifié dans le génome de *B. cereus* ATCC 14579. Ce gène présente une boite Fur dans sa région promotrice (5'-GATAATGA AAA TCATTATC-3') identique à la séquence consensus. La protéine codée par le gène *ilsB* présente une similarité de 20 % avec IIsA. En plus de sa régulation par le fer, cette protéine présente des domaines LRRs responsables des interactions protéine-protéine et un motif Cterminal « LGATG » hydrophobe, suggérant la liaison de cette protéine à la surface de la bactérie (Figure 17). Ces observations suggèrent que l'expression du gène *ilsB* est régulée comme *ilsA* par le répresseur Fur. L'étude d'IlsB nous a paru intéressante, afin de savoir s'il existe une éventuelle interaction entre les deux internalines, d'une part, et afin d'obtenir des informations plus large sur le rôle des deux protéines de types internalines (IlsA et IlsB) chez *B. cereus* d'autre part.

### 1 Expression d'ilsB in vivo

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si *ilsB* s'exprime préférentiellement *in vivo* au cours de l'infection. Pour cela, nous avons cloné la région promotrice du gène p*ilsB* en amont du gène qui code pour la recombinase site spécifique *tnpI* dans le plasmide pHT304-I du système IVET. Après transformation de la souche Bc::R2SK par le plasmide pHT304*pilsB*, nous avons comparé la fréquence de résolution de la cassette RES *in vivo* (chez l'insecte après infection par voie orale) par rapport à sa résolution *in vitro* (en milieu LB). Les résultats que nous avons obtenus montrent que le gène *ilsB* est surexprimé *in vivo* (93%) au cours de l'infection par rapport à son expression *in vitro* (23%).

Ensuite nous avons suivi l'expression du gène *ilsB* en interaction avec le tissu de l'hôte, afin de savoir où ce gène est exprimé *in vivo*. La région promotrice *pilsB* a été clonée en fusion transcriptionelle avec le gène codant pour la *gfp* dans le vecteur pHT315. La cinétique d'expression a été suivie après infection par voir orale de *G. mellonella* avec *B. cereus* contenant la construction pHT315-*pilsB'gfp*. La figure 18 montre une très faible fluorescence des bactéries isolées à partir de l'hémocœle après 24 h d'infection, tandis que les bactéries isolées de l'intestin ne présentent pas de fluorescence. Ces résultats suggèrent qu'*ilsB* est exprimé dans l'hémocœle, mais à l'inverse d'*ilsA* son expression est beaucoup plus faible.



## Figure 18 - Analyse de l'expression d'ilsB in vivo

Des observations microscopiques ont été faite sous lumière blanche et ultraviolet sur *B. cereus* contenant le plasmide pHT315-p*ilsB*'gfp, isolées de l'intestin des larves vivantes et de l'hémocoele des larves mortes. Les bactéries vertes indiquent l'expression de la gfp due à l'expression du promoteur p*ilsB*.



Figure 19 - Dosage de l'activité  $\beta$ -galactosidase de la fusion p*ilsB*'Z dans la souche *B. cereus* ATCC 14579

Les bactéries ont été cultivées en milieu LB (triangles verts) ou en milieu LB supplémenté avec le chélateur de fer, le dipyridyl (0.2mM). Le dipyridyl a été rajouté avant 30 minutes de la rentrée en phase stationnaire (Temps 0).

### 2 Expression d'ilsB in vitro en absence de fer

Pour mesurer l'effet du fer sur l'expression d'*ilsB*, une fusion transcriptionelle a été faite entre le promoteur p*ilsB* et le gène rapporteur *lacZ* dans le plasmide pHT304-18'Z. Le fragment d'ADN qui correspond à la région promotrice a été amplifié par PCR et inséré en amont de la séquence codante du gène *lacZ* pour donner le plasmide pHT-*pilsB*'Z. Ce plasmide a été introduit dans *B. cereus* par électroporation et l'activité  $\beta$ -galactosidase a été mesurée à différentes étapes de la croissance à 37°C dans le milieu LB et en présence d'une concentration de 0.2 mM du chélateur de fer, le dipyridil. Une faible activité  $\beta$ -galactosidase (<100 unités Miller) a été observée en milieu LB alors qu'une très forte activité  $\beta$ -galactosidase (2000 unités Miller) a été observée en absence de fer (LB+dipyridil) (Figure 19). Toutefois, son niveau d'expression reste inférieur à celui d'*ilsA* (9000 unités Miller) et il s'exprime plus tardivement que le gène *ilsA*. Ces résultats confirment la régulation d'*ilsB* par Fur et les observations faites *in vivo* avec la fusion gfp.

### 3 Effet du gène *ilsB* sur la virulence chez G. mellonella

L'interruption a été faite en utilisant le plasmide intégratif et thermosensible pMAD avec la cassette de résistance à la Kanamycine. Des fragments de 900- 1000 pb du début et de la fin du gène *ilsB* ont été cloné de part et d'autre de la cassette kanamycine. Ensuite, ces trois fragments ont été insérés dans le vecteur thermosensible pMAD (vecteur couramment utilisé pour l'interruption de gènes chez les bactéries à Gram positif (Arnaud *et al.*, 2004). L'inactivation d'*ilsB* a été faite par double recombinaison homologue pour créer la souche mutante *B. cereus*  $\Delta ilsB$ . Après la construction du mutant *B. cereus*  $\Delta ilsB$ , son rôle dans la virulence a été évalué après infection par voie orale de la larve *G. mellonella*. Les résultats que nous avons obtenus n'ont pas montré une diminution significative de la virulence de la souche mutante par rapport à la souche sauvage. Ces résultats montrent qu'IlsB n'intervient pas d'une façon significative dans la virulence, cependant un rôle durant le processus infectieux ne peut être exclu.

Nous avons également construit le double mutant *B. cereus*  $\Delta ilsA\Delta ilsB$ , où les gènes des deux internalines IIsA et IIsB sont interrompus. Les tests de virulence ont été faits par voie orale et les résultats ont montrés que la virulence de la souche double mutante est moins affectée que le simple mutant *B. cereus*  $\Delta ilsA$ . Ceci pourrait indiquer que d'autres gènes prennent le relais lorsque les deux gènes *ilsA* et *ilsB* sont absents.



Figure 20 - Capacité de formation de biofilm sur surface de verre de la souche sauvage *B. cereus*, des simples mutants *B. cereus*  $\Delta ilsA$  et *B. cereus*  $\Delta ilsB$  et du double mutant B. cereus  $\Delta ilsA$   $\Delta ilsB$ 

La souche sauvage et les différents mutants ont été incubé pour 36 heures en milieu HCT riche en fer (A) et en milieu HCT additionné avec le chélateur de fer, le dipyridyl (0.1 mM) (B).

## III. Rôle d'IlsA et IlsB dans la formation de biofilm in vitro

Le rôle de fer dans la formation des biofilms a été démontré pour différentes espèces bactériennes (Banin *et al.*, 2005). Puisque nous avons montré qu'IlsA a un rôle important dans l'acquisition du fer pour *B. cereus*, nous avons comparé la capacité de formation de biofilms *in vitro* sur surface de verre des différents mutants: *B. cereus*  $\Delta ilsA$ , *B. cereus*  $\Delta ilsB$  et *B. cereus*  $\Delta ilsA \Delta ilsB$ . Les résultats préliminaires montrent que le mutant *B. cereus*  $\Delta ilsA$  et le double mutant *B. cereus*  $\Delta ilsA \Delta ilsB$  sont clairement affectés dans la formation du biofilm en milieu carencé en Fer (Figure 20). Ces résultats sont très intéressants et des expériences supplémentaires sont nécessaires afin d'affiner le rôle d'IlsA dans la formation du biofilm et de démontrer à quel niveau du biofilm IlsA serait le plus fortement exprimé. Ceci est possible en faisant des études par microscopie confocale en utilisant les constructions avec le gène rapporteur de la *gfp*. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans cette thèse s'intègrent dans le cadre de l'identification des facteurs de virulence majeurs impliqués dans l'adaptation et la croissance de *B. cereus* chez l'hôte, en utilisant le système génétique IVET (In Vivo Expression Technology). Un des facteurs essentiels pour l'adaptation des bactéries chez l'hôte, que nous avons souhaité abordé, concerne le fer et les mécanismes de son acquisition chez *B. cereus*.

La caractérisation du gène *ilsA*, identifié par le système IVET, et l'étude de son rôle au cours de l'infection, nous ont apporté des informations concernant l'utilisation du fer par *B*. *cereus* à partir des sources présentes chez l'hôte. Ceci est en effet, indispensable à la compréhension de la capacité de *B. cereus* à s'adapter à deux systèmes d'hôtes différents : les mammifères et les insectes.

## I. Le système IVET : un nouvel outil génétique chez B. cereus

Chez B. cereus, les facteurs de virulence majeurs impliqués dans son adaptation et sa croissance chez l'hôte sont encore inconnus. Le développement du système IVET et son utilisation pour la première fois chez B. cereus ATCC 14579, a contribué avec succès à l'identification de nouveaux gènes impliqués dans l'adaptation de la bactérie aux différents changements environnementaux rencontrés au cours de l'infection chez Galleria mellonella. La plupart des gènes que nous avons identifiés ont été spécifiquement exprimés en réponse aux conditions de stress imposés par l'hôte. Parmis ces gènes, le gène ilsA impliqué dans l'acquisition du fer a constitué la suite de notre étude. En plus d'ilsA, notre criblage a permis l'identification du gène yvrc (ivi32) qui fait parti d'un système d'acquisition du dicitrate ferrique. Le rôle de ce système dans la virulence de B. cereus 569 vis-à-vis de la larve Manduca sexta a été démontré, mettant en évidence l'importance des systèmes d'acquisition de fer au cours de l'infection (Harvie & Ellar, 2005). Deux autres gènes codant pour la sousunité I du cytochrome d ubiquinol oxidase (ivi15) et pour l'alcool déshydrogénase (ivi10), ont montré une forte expression in vivo. Le complexe cytochrome d est utilisé principalement chez E. coli quand la quantité d'oxygène est faible et l'alcool déshydrogénase joue un rôle dans les conditions de stress chez Pseudmonas aeruginosa (Finelli et al., 2003). Ceci suggère que ces deux gènes sont exprimés en réponse aux conditions de stress oxydative chez l'hôte (Lorence et al., 1988). Notre criblage a également conduit à l'identification de plusieurs gènes codant pour des régulateurs potentiels, ainsi que pour des protéines de fonctions inconnues. Parmi ces gènes, on distingue, le gène ivil présent à côté d'un système à deux composants qui régule les gènes en réponse aux conditions environnementaux. De tels gènes sont responsables de la virulence des bactéries pathogènes (Hoch, 2000). Un autre gène ysoA (ivi3) de fonction inconnue, code pour une protéine qui présente les motifs TPRs (tetratrico peptide repeats). Chez B. cereus, des protéines à motifs TPRs peuvent être impliquées dans les systèmes de régulation de type quorum-sensing, responsables de l'expression des gènes de virulence (Slamti & Lereclus, 2002). Une future étude de l'ensemble des gènes que nous avons identifiés, mènera à une meilleure compréhension du pouvoir pathogène de B. cereus. Par ailleurs, les résultats obtenus dans cette étude suggèrent que le système IVET basé sur l'activité de la recombinase TnpI est un moyen de sélection efficace et pertinent, qui permet de détecter des gènes spécifiquement exprimés dans des conditions bien déterminées et de façon transitoire. L'adaptation de ce système chez B. cereus ouvre de nouvelles perspectives sur son utilisation dans d'autres conditions. Jusqu'à présent, ce système a été utilisé dans notre laboratoire, afin de détecter des gènes qui sont induits dans les conditions de formation des biofilms, dans des conditions de basses températures et au cours de l'infection chez les macrophages. L'importance d'un tel système génétique réside également dans la possibilité de son utilisation chez d'autres bactéries pathogènes apparentées à *B. cereus*.

### II. IlsA, une protéine clé d'un nouvel mécanisme d'acquisition de fer

### 1 IIsA et acquisition du fer

Suite à une infection par un pathogène, il est communément reconnu que la séquestration du fer par l'hôte est un mécanisme de défense innée, qui lui permet de résister et de lutter contre cette infection. Afin de surmonter cette carence en fer, et de pouvoir se développer chez l'hôte, les bactéries ont développé deux principaux mécanismes qui leur permettent d'acquérir le fer de l'hôte. Le premier, fait intervenir les sidérophores, qui sont des molécules sécrétées, qui entrent en compétition avec les protéines de l'hôte liant le fer ferrique tels que, la transferrine, la lactoferrine et la ferritine. Le deuxième, inclut l'expression des protéines de surface qui permet une interaction directe avec les sources de fer, principalement les hémoprotéines.

Chez *B. cereus*, il existe très peu d'études concernant l'acquisition de fer à partir des sources présentes chez l'hôte. Cependant, des travaux faites par deux groupes de recherche différents concernant la capacité de *B. cereus* d'acquérir le fer à partir de la transferrine via les sidérophores ont montré des résultats controverses (Park *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 1999a).

Donc, il n'était toujours pas clair, si *B. cereus* est capable d'utiliser la transferrine comme source de fer pour sa croissance. Cependant, il n'avait jamais été reporté l'implication des protéines de surface chez *B. cereus* dans l'acquisition du fer à partir des sources de l'hôte.

Au cours de notre étude, nous avons identifié une protéine localisée à la surface de B. cereus qui est essentielle pour l'acquisition du fer de l'hémoglobine, l'hème et la ferritine. Nous avons démontré qu'IlsA est présente au niveau de la surface et exclusivement dans les conditions de carence en fer. D'ailleurs, la présence de la boite fur dans sa région promotrice est en accord avec cette observation. Par comparaison, à la structure des protéines de surface déjà étudiées comme étant des récepteurs aux sources de fer présentes chez l'hôte, IlsA présente une certaine originalité. En plus de son domaine NEAT qui est présent dans la majorité des protéines de surface Isd de S. aureus et de B. anthracis, responsable de l'interaction avec les hémoprotéines, IlsA présente un domaine SLH assurant sa liaison à la surface bactérienne au niveau du peptidoglycane et un domaine LRRs suggérant une interaction protéine-protéine. Ces observations suggèrent qu'IlsA, exprimée dans les conditions de carence en fer (au cours de l'infection) est impliquée dans l'acquisition du fer en interagissant avec les sources de fer présentes chez l'hôte. En effet, nos résultats ont montré que l'absence d'IlsA empêche la croissance de B. cereus in vitro en présence de l'hémoglobine, l'hème et la ferritine comme source unique de fer. Ceci suggérait une interaction directe entre IIsA et ces trois sources de fer. En effet, les tests d'analyses d'affinités (ELISA et Biacore) entre IlsA et l'hémoglobine d'une part, et la ferritine d'autre part, montrent qu'il existe une interaction directe avec ces deux protéines. Toutefois, l'affinité d'IlsA pour l'hémoglobine est plus élevée que son affinité avec la ferritine. De plus, Les résultats avec le test de chémoluminescence et la Biacore montrent une liaison directe d'IlsA à l'hème. Ce résultat est en accord avec l'alignement multiple du domaine NEAT d'IlsA avec ceux des différentes protéines de surface Isd de S. aureus. Cet alignement indique la présence des résidus tyrosines conservés (Tyr<sup>166</sup>, Tyr<sup>170</sup> dans IsdA) essentiel pour la liaison à l'hème (Pilpa et al., 2006). Donc, l'interaction d'IlsA avec l'hémoglobine peut être due à sa liaison avec l'hème par l'intermédiaire du domaine NEAT. Toutefois, des études structurales de IIsA d'une part et des complexes IIsA-hémoglobine, IIsA-hème et IIsA-ferritine d'autres parts, sont nécessaires afin d'élucider, le rôle exacte, du domaine NEAT et du domaine LRR dans ces interactions. Il est très important de noter que nos travaux ont identifié pour la premiere fois une protéine de surface capable d'intéragir avec la ferritine. Ici, nous avons choisi d'étudier l'affinité entre IIsA et l'hémoglobine qui est la source d'hème la plus abondante présente chez



# Figure 21 - Représentation schématique du locus isd chez B. cereus

Les flèches indiquent l'orientation et la taille approximative de la phase ouverte de lecture. Les numéros des gènes et les protéines putatives sont indiqués en dessous et en dessus des flèches respectivement. Les motifs NPKTG et NSKTA des protéines codées par Bc4549 et Bc4547 respectivement, sont les substrats de la sortase B putative (Bc4543). Le système ABC transporteur est constitué de la protéine de liaison au ferrichrome (Bc4546), une perméase fhuB (Bc4545) et d'une ATPase fhuC (Bc4544). La séquence nucléotidique conservée de la boîte Fur est également indiquée. Les cylindres jaunes symbolisent les domaines NEAT.

l'hôte. L'affinité à d'autres sources d'hèmes comme le complexe hémoglobine-haptoglobine ou hémopexine peut être également testée. En outre, nos résultats démontrent, pour la première fois, l'existence d'une protéine qui, en plus de sa structure originale, semble avoir la possibilité de lier des molécules différentes, ayant en commun leur liaison au fer.

### 2 IlsA et transport du fer

Chez les bactéries à Gram positif tels que S. aureus, les systèmes d'acquisition d'hème font intervenir plusieurs protéines de surface, un système de transport à travers la membrane cytoplasmique et une monooxygénase qui dégrade l'hème et libère le fer pour être utilisé par la bactérie (Maresso & Schneewind, 2006). Chez B. anthracis, les systèmes d'acquisition d'hème font intervenir des protéines secrétées capables de capturer l'hème en plus des différents composants qui existent chez S.aureus (Maresso et al., 2008). En général, les gènes qui codent pour l'ensemble de ces protéines sont transcrits en opéron. Nos études in silico concernant l'organisation génétique de la région située à proximité du gène ilsA, suggèrent que ce gène est situé entre deux terminateurs de transcription. Par ailleurs, nous avons observé qu'il existe un système ABC transporteur à proximité d'ilsA suggérant que ce système peut servir au transport de la source fer captée par IlsA à l'intérieur de la bactérie. Cependant, la délétion de la perméase et de l'ATPase de ce système a montré un phénotype similaire à la souche sauvage dans les conditions de carence en fer, en fournissant l'hème, l'hémoglobine et la ferritine comme source unique de fer. Ce résultat montre qu'à priori ce système n'est pas utilisé pour faire rentrer la source de fer (hème / fer) de la surface vers l'intérieur de la bactérie. Cependant, la possibilité que ce système soit compensé par un autre ne peut pas être exclue.

Les partenaires d'IlsA restent toujours à identifier, que ça soit au niveau de la surface bactérienne, s'ils existent, et au niveau de la membrane cytoplasmique. Nous disposons actuellement de plusieurs candidats, parmi lesquels le système Isd-like que nous avons identifié dans le génome de *B. cereus* (Figure 21). Le système d'acquisition d'hème, Isd (iron regulated surface determinant) a été identifié et étudié chez *S. aureus*, *L. monocytogenes*, et chez *B. anthracis* (Maresso *et al.*, 2006; Mazmanian *et al.*, 2002; Newton *et al.*, 2005). Son implication dans l'acquisition de l'hème a été démontrée chez *S. aureus* et *B. anthracis*. Par contre, chez *L. monocytogenes*, le système Isd n'est pas utilisé pour l'acquisition de l'hème. Nos résultats ont montré que l'inactivation d'*ilsA* empêche la croissance de *B. cereus* si l'hème, l'hémoglobine et la ferritine sont présents comme sources uniques de fer. Ceci inspire

deux possibilités, ou bien le système Isd chez *B. cereus* n'est pas fonctionnel comme chez *L. monoc*ytogenes, ou bien IlsA interagit avec les protéines de surface de ce système afin de transporter la source de fer à travers la surface de *B. cereus* et à travers le cytoplasme. D'ailleurs, ce système est régulé par Fur, ce qui suggère qu'il sera exprimé dans les conditions de carence en fer, en même temps qu'*ilsA*.

La recherche des partenaires de IIsA peut se faire en utilisant le système IVET dans les conditions de carence en fer en fournissant l'hémoglobine, l'hème et la ferritine comme sources de fer unique. Cette étude combinée à des études protéomiques de *B. cereus* dans ces mêmes conditions devrait apporter de précieuses informations.

#### 3 IlsA, adaptation et virulence chez l'hôte

Il est communément reconnu que le fer est important pour l'établissement des infections par les bactéries pathogènes (Ratledge & Dover, 2000). La capacité d'acquérir le fer de l'hôte, où les concentrations en fer sont très contrôlées et limitées, est un facteur d'adaptation très important contribuant à la virulence des bactéries. Les bactéries pathogènes possèdent des systèmes d'acquisition de fer leur permettant de capter et d'utiliser les sources de fer de leur hôte et par conséquent de se multiplier et causer très probablement la maladie.

La forte expression d'IlsA au cours de l'infection chez l'insecte a suggéré une implication de ce gène dans la virulence. La fusion entre le promoteur pilsA et le gène de la gfp, nous a permis de déterminer par la suite que ce gène est spécifiquement exprimé au niveau de l'hémocoele de l'insecte. L'hémocoele est l'équivalent du système sanguin humain. Dans l'hémocoele de G. mellonella, le fer n'est pas disponible sous sa forme libre due à la présence de protéines qui captent le fer, tels que la ferritine et la transferrine (Yuk et al., 2005 ; Seitz et al., 2003). Donc, l'expression d'IlsA peut être due d'une part en réponse à une carence en fer et d'autre part à la présence de la ferritine afin de fournir le fer à B. cereus. Il paraît que plusieurs systèmes d'acquisition de fer sont régulés positivement par leurs sources de fer correspondantes (Wandersman & Delepelaire, 2004). Ceci, corrobore avec nos expériences préliminaires, indiquant une activation du promoteur pilsA en fusion transcriptionelle avec le gène *lacZ*, en présence des sources de fer. Par ailleurs, l'interruption d'IlsA diminue la survie de B. cereus dans l'hémocoele, surtout au début de l'infection, entraînant une diminution de la virulence de B. cereus vis-à-vis de G. mellonella. Etant donné que B. cereus est également un pathogène humain, et comme nous ne disposons pas de modèles mammifères pour tester l'effet d'IlsA sur la virulence de B. cereus, nous avons

utilisé les macrophages murins et le sang du porc. Dans les 2 cas nous avons observé que le mutant était affecté au niveau de sa croissance et sa virulence. Ces résultats montrent qu'IlsA est un facteur important pour l'adaptation de B. cereus chez les deux hôtes insecte et mammifère, et qu'elle est nécessaire pour sa virulence. Il a été démontré que les systèmes d'acquisition de fer ne sont pas tous exprimés simultanément en réponse à la carence en fer mais en fonction de la source de fer également. Ceci indique que différentes sources de fer sont utilisées à différents stades d'infection, suggérant une notion de spécificité et également d'adaptation à l'hôte. Par exemple chez S. aureus, l'hème est la source utilisée préférentiellement au début de l'infection, tandis que la transferrine l'emporte à la fin (Skaar et al., 2004b). Il serait intéressant de déterminer quelle source de fer est utilisée préférentiellement par B. cereus et de le corréler au stade d'infection. Par ailleurs, du fait que nous travaillons avec un modèle simple (l'insecte) il serait intéressant d'analyser, en détail, s'il y a une régulation d'ilsA, au niveau de l'hémocœle, qui serait tissu dépendante. Par exemple, est-ce que l'expression serait plus forte en contact avec les hémocytes qu'avec des lipocytes du corps gras. Est-ce qu'une chenille traitée avec du fer empêcherait l'expression d'ilsA? Est-ce qu'un silencing (par la technique RNAi) de l'expression de la ferritine, diminuera l'expression d'ilsA ? etc.

## 4 Modèle représentant le rôle de IIsA dans l'acquisition du fer chez l'hôte

Chez l'hôte mammifère ou insecte, l'homéostasie du fer est strictement contrôlée de façon à ce que le fer à l'état libre n'existe pas, et ceci en raison de son effet toxique qui endommage les cellules vivantes. Chez les mammifères, le fer est complexé à des protéines tels que la ferritine, la transferrine et la lactoferrine et à l'hème dans les hémoprotéines dont l'hémoglobine est la plus abondante. Chez les insectes, et en particulier chez *G. mellonella*, on retrouve principalement la ferritine qui peut être présente dans l'hémolymphe et dans les cellules.

Après infection par *B. cereus*, l'hôte (insectes ou mammifères) réagit en augmentant, en premier, l'expression des protéines qui lient le fer afin de limiter au maximum la croissance de la bactérie (Bullen *et al.*, 2006; Dunphy *et al.*, 2002). *B. cereus* se trouve dans un milieu carencé en fer entraînant par conséquent l'expression des gènes régulés par Fur. Parmi ces gènes, l'hémolysine II qui présente une boîte *fur* dans sa région promotrice va être exprimée, permettant la libération (par lyse des cellules hôtes) des protéines intracellulaires tels que l'hémoglobine et la ferritine (Figure 22). Des études ont montré que cette hémolysine


Figure 22 – Modèle représentant le rôle de IIsA dans l'acquisition du fer chez l'hôte

Le mécanisme est détaillé dans le texte.

produite par *B. cereus* est capable de lyser les érythrocytes et la membrane plasmique des cellules eucaryotes (Andreeva *et al.*, 2006). En parallèle, IIsA va être également exprimée en réponse aux conditions de carence en fer due à la présence de la boîte *fur* dans sa région promotrice. IIsA va se retrouver à la surface ancrée d'une façon covalente au peptidoglycane par l'intermédiaire de son domaine SLH. La localisation d'IIsA au niveau de la surface de *B. cereus* va faciliter son interaction avec les différentes sources de fer, lui permettant de capter par la suite le fer de l'hémoglobine, de l'hème et de la ferritine. IIsA va interagir directement avec l'hémoglobine et l'hème par l'intermédiaire de son domaine NEAT. Probablement le domaine LRR sera impliqué dans l'interaction de IIsA avec la ferritine. Nous suggèrons que l'intéraction entre le domaine LRR de IIsA et la ferritine peut entraîner des modifications dans la structure de cette derniere et libérer par conséquent le fer ferrique. Le fer ainsi libéré pourrait intéragir avec des sidérophores ou avec d'autres systèmes d'acquisitions de fer ferriques présentent chez *B. cereus*. La source de fer (ferrique ou hème) captée par IIsA doit être transportée à l'intérieur de la bactérie afin d'être utilisée par cette dernière.

Une hypothèse générale concernant le transport de l'hème à travers la paroi et la membrane cytoplasmique, dérive de la combinaison de nos études avec les travaux réalisés sur les autres bactéries à Gram positif apparentés à B. cereus. Nous suggérons, que IIsA interagisse avec le système Isd que nous avons identifié chez B. cereus afin d'assurer le transport de l'hème. Mais, il est clair que le rôle de IlsA est crucial dans ce système d'acquisition de fer, du fait que son interruption abolie la croissance de B. cereus en présence de l'hémoglobine, l'hème et la ferritine comme unique source de fer. En effet, IlsA avec son domaine SLH (S-layer homology) va se lier à la couche S située à la périphérie du peptidoglycane (Navarre & Schneewind, 1999). Ceci suggère que c'est IlsA qui va entrer en contact en premier avec les différentes sources de fer et les transmettre par la suite aux autres protéines Isd. La protéine codée par Bc4548 contient un domaine NEAT, et un peptide signal, mais l'absence d'un motif d'ancrage à la paroi de la bactérie suggère que cette protéine sera sécrétée, et peut agir à la manière d'un hémophore. Les deux autres protéines Bc4547 présentant le motif d'ancrage NSKTA et Bc4549 présentant le motif NPKTG, seront ancrées par la sortase B putative au peptidoglycane. La protéine Bc4549 présente une identité de 98% avec IsdC (BAS4444) de B. anthracis. Chez B. anthracis, l'ancrage de IsdC par la sortase B au peptidoglycane se fait via le carboxyl de la thréonine. De plus, il a été proposé que IsdC occupe une position critique qui permet le transfert de l'hème au système ABC transporteur. De la même manière, on propose que la protéine codée par le gène Bc4549 transmette la

ORF (BC #)	Fonction	% de similarité avec <i>B. anthracis</i> <i>Ames</i>
0381-0383	Système de transport du ferrichrome - permease (fhuG)	98
	Système de transport du ferrichrome - permease (fhuB)	97
	Protéine de liaison au ferrichrome	98
0616-0619	Protéine de liaison au Fe <sup>3+</sup> -dicitrate	98
	Système de transport du Fe <sup>3+</sup> -dicitrate – permease (fecD)	97
	Système de transport du Fe <sup>3+</sup> -dicitrate - ATPase (fecE)	98
4361-4363	Système de transport du ferrichrome - ATPase (fhuC)	97
	Système de transport du ferrichrome - perméase (fhuB)	96
	Protéine de liaison au ferrichrome	93
4528	Protéine de liaison au ferrichrome	99
4544-4546	Système de transport du ferrichrome - ATPase (fhuC)	91
	Système de transport du ferrichrome - perméase (fhuB)	97
	Protéine de liaison à la ferrichrome	95
5103-5106	Système de transport du Fe <sup>3+</sup> -anguibactine - ATPase	99
	Système de transport du Fe <sup>3+</sup> -anguibactine - perméase (fatC)	98
	Système de transport du Fe <sup>3+</sup> -anguibactine - perméase (fatD)	95
	Protéine de liaison au Fe <sup>3+</sup> -anguibactine	95
5380-5383	Protéine de liaison au ferrichrome	95
	Système de transport du ferrichrome - ATPase (fhuC)	98
	Système de transport du ferrichrome - perméase (fhuG)	98
	Système de transport du ferrichrome - perméase (fhuB)	
3466-3468	Protéine de liaison au ferrichrome	97
	Système de transport du ferrichrome - perméase (fhuG)	96
	Système de transport du ferrichrome - perméase (fhuB)	95
3735-3738	Système de transport du Fe <sup>3+</sup> -dicitrate - ATPase (fecE)	97
	Système de transport du Fe <sup>3+</sup> -dicitrate - permease (fecC)	97
	Système de transport du Fe <sup>3+</sup> -dicitrate - permease (fecD)	97
	Protéine de liaison au Fe <sup>3+</sup> -dicitrate	-

Tableau VI - Liste des gènes de B. cereus potentiellement impliqués dansl'acquisition du fer et la régulation (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

source de fer au système ABC transporteur constitué d'une protéine de liaison (Bc4546), d'une perméase, fhuB (Bc4545) et d'une ATP-ase, fhuC (Bc4544). Une fois à l'intérieur de la bactérie, l'hème va être dégradé par la monooxygénase et le fer va être utilisé par *B. cereus*.

Pour la ferritine, le mécanisme de transport à travers le peptidoglycane et la membrane cytoplasmique est moins évident, laissant suggérer qu'IlsA interviendrait dans un autre mécanisme d'acquisition de fer différent de celui employé pour utiliser l'hème. Peut-être s'agit-il d'un mécanisme qui « extrait » le fer de la ferritine encore présente à la surface.

#### III. B. cereus et fer

Au cours de notre étude, nous avons montré que le fer est important pour le développement de *B. cereus*. De plus, notre analyse du génome de *B. cereus* a indiqué la présence de plusieurs systèmes de transport du ferrichrome, du dicitrate, un système de transport du fer ferreux, trois régulateurs type-Fur et une ferritine (Tableau VI). La présence des gènes codant pour 2 types de sidérophores a été également identifiée. D'ailleurs, la capacité de *B. cereus* à produire les sidérophores de type catécholates a été reportée, toutefois l'efficacité de prélever le fer de la transferrine est nettement plus faible que ceux produits par *S. aureus, E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (Park *et al.*, 2005). Etant donné que la majorité des bactéries y compris *B. cereus*, ont besoin de fer comme un nutriment essentiel pour pouvoir se développer et devenir virulentes. Il serait intéressant de rechercher de façon globale les facteurs régulés par la quantité de fer ou par la nature de la source de fer présente dans le milieu de culture. Une analyse transcriptomique entre un mutant *fur* et la souche sauvage, contribuerait très certainement à la compréhension globale des mécanismes d'acquisition de fer chez *B. cereus*.

L'étude de ces différents mécanismes d'acquisition semble être une piste prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour lutter contre les infections causées par *B. cereus*.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence une protéine IIsA qui joue un rôle cruciale dans un nouvel mécanisme d'acquisition de fer, conférant ainsi à *B. cereus* la capacité de coloniser deux hôtes différents (mammifères et invertébrés). Ces résultats apportent des informations permettant une meilleure compréhension de l'adaptation et de l'écologie évolutive du groupe *B. cereus* et constitue par conséquent, une base pour la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques.

<b>ORF (BC #)</b>	Fonction	% de similarité
		avec B. anthracis
0707-0709	Protéine B de transport du fer ferreux	-
	Protéine B de transport du fer ferreux	· ·
	Protéine A de transport du fer ferreux	97
1978-1983	Siderophore biosynthesis protein	92
	Siderophore biosynthesis protein	84
	acyl-CoA synthetase	92
	acyl carrier protein	95
	hypotetical protein	91
	hypothetical Cytosolic Protein	88
2302-2306	2,3-dihydroxybenzoate-2,3-dehydrogenase	90
	isochorismate synthase DhbC	92
	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase 94%	94
	Isochorismatase 91%	91
	Glycine-AMP BC2306 ligase	89
0518	Peroxide operon regulator	100
4091	ferric uptake regulation protein	99
4277	Zinc-specific metalloregulatory protein	98
5048	Ferritin	99

Tableau VI - Liste des gènes de *B. cereus* potentiellement impliqués dans l'acquisition du fer et la régulation (Suite)

# **REFERENCES**

Adams, T. J., Vartivarian, S. & Cowart, R. E. (1990). Iron acquisition systems of Listeria monocytogenes. *Infect Immun* 58, 2715-2718.

**Agaisse, H. & Lereclus, D. (1994).** Structural and functional analysis of the promoter region involved in full expression of the cryIIIA toxin gene of Bacillus thuringiensis. *Mol Microbiol* **13**, 97-107.

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

Agata, N., Ohta, M., Mori, M. & Isobe, M. (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of Bacillus cereus. *FEMS Microbiol Lett* **129**, 17-20.

Alouf, J. E. (2000). Cholesterol-binding cytolytic protein toxins. Int J Med Microbiol 290, 351-356.

Altayar, M. & Sutherland, A. D. (2006). Bacillus cereus is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *J Appl Microbiol* 100, 7-14.

Andrade, M. A., Ciccarelli, F. D., Perez-Iratxeta, C. & Bork, P. (2002). NEAT: a domain duplicated in genes near the components of a putative Fe3+ siderophore transporter from Gram-positive pathogenic bacteria. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0047.

Andreeva, Z. I., Nesterenko, V. F., Yurkov, I. S., Budarina, Z. I., Sineva, E. V. & Solonin, A. S. (2006). Purification and cytotoxic properties of Bacillus cereus hemolysin II. *Protein Expr Purif* **47**, 186-193.

Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27, 215-237.

Angus, T. A. (1954). A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. *Nature* 173, 545-546.

Arantes, O. & Lereclus, D. (1991). Construction of cloning vectors for Bacillus thuringiensis. *Gene* 108, 115-119.

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

Ash, C., Farrow, J. A., Dorsch, M., Stackebrandt, E. & Collins, M. D. (1991). Comparative analysis of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 343-346.

Ash, C. & Collins, M. D. (1992). Comparative analysis of 23S ribosomal RNA gene sequences of Bacillus anthracis and emetic Bacillus cereus determined by PCR-direct sequencing. *FEMS Microbiol Lett* **73**, 75-80.

Awad K.M., Saadaoui, I., Rouis, S., Tounsi, S., Jaoua, S. (2006). Differentiation Between B. thuringiensis Strains by gyrB PCR-Sau3AI Fingerprinting. *Mol. Biotechnol* **35**, 1-7 Baichoo, N. & Helmann, J. D. (2002). Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**, 5826-5832.

#### B

Baichoo, N., Wang, T., Ye, R. & Helmann, J. D. (2002). Global analysis of the Bacillus subtilis Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol Microbiol* **45**, 1613-1629.

Baida, G., Budarina, Z. I., Kuzmin, N. P. & Solonin, A. S. (1999). Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from Bacillus cereus. *FEMS Microbiol Lett* 180, 7-14.

Banin, E., Vasil, M. L. & Greenberg, E. P. (2005). Iron and Pseudomonas aeruginosa biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci US A* 102, 11076-11081.

Baumler, A. J. & Hantke, K. (1992). Ferrioxamine uptake in Yersinia enterocolitica: characterization of the receptor protein FoxA. *Mol Microbiol* 6, 1309-1321.

Bavykin, S. G., Lysov, Y. P., Zakhariev, V., Kelly, J. J., Jackman, J., Stahl, D. A. & Cherni, A. (2004). Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of Bacillus cereus group microorganisms. *J Clin Microbiol* **42**, 3711-3730.

Beecher, D. J., Schoeni, J. L. & Wong, A. C. (1995). Enterotoxic activity of hemolysin BL from Bacillus cereus. *Infect Immun* 63, 4423-4428.

**Beecher, D. J. & Wong, A. C. (2000).** Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single Bacillus cereus isolate. *Microbiology* **146** (**Pt 6**), 1371-1380.

Bhatnagar, R. & Batra, S. (2001). Anthrax toxin. Crit Rev Microbiol 27, 167-200.

Bierne, H., Garandeau, C., Pucciarelli, M. G., Sabet, C., Newton, S., Garcia-del Portillo, F., Cossart, P. & Charbit, A. (2004). Sortase B, a new class of sortase in Listeria monocytogenes. *J Bacteriol* 186, 1972-1982.

Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N. & Cossart, P. (2007). Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in Listeria monocytogenes. *Microbes Infect* 9, 1156-1166.

Borezee, E., Pellegrini, E., Beretti, J. L. & Berche, P. (2001). SvpA, a novel surface virulence-associated protein required for intracellular survival of Listeria monocytogenes. *Microbiology* **147**, 2913-2923.

Bouillaut, L., Ramarao, N., Buisson, C., Gilois, N., Gohar, M., Lereclus, D. & Nielsen-Leroux, C. (2005). FlhA influences Bacillus thuringiensis PlcR-regulated gene transcription, protein production, and virulence. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8903-8910. Bouillaut, L., Perchat, S., Arold, S., Zorrilla, S., Slamti, L., Henry, C., Gohar, M., Declerck, N. & Lereclus, D. (2008). Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic Acids Res* **36**, 3791-3801.

**Bouillaut, L.** *Bases moléculaires d'un système de communication cellulaire chez Bacillus cereus.* 170 p. Thèse : Microbiologie : AgroParisTech : 2008.

Braun, L. & Cossart, P. (2000). Interactions between Listeria monocytogenes and host mammalian cells. *Microbes Infect* 2, 803-811.

Braun, V. (2001). Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *Int J Med Microbiol* 291, 67-79.

Bravo, A., Gill, S. S. & Soberon, M. (2007). Mode of action of Bacillus thuringiensis Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49, 423-435.

Brook, I. (2002). Secondary bacterial infections complicating skin lesions. *J Med Microbiol* 51, 808-812.

**Bsat, N. & Helmann, J. D. (1999).** Interaction of Bacillus subtilis Fur (ferric uptake repressor) with the dhb operator in vitro and in vivo. *J Bacteriol* **181**, 4299-4307.

Bullen, J. J., Rogers, H. J., Spalding, P. B. & Ward, C. G. (2006). Natural resistance, iron and infection: a challenge for clinical medicine. *J Med Microbiol* 55, 251-258.

# С

Cabrera, G., Xiong, A., Uebel, M., Singh, V. K. & Jayaswal, R. K. (2001). Molecular characterization of the iron-hydroxamate uptake system in Staphylococcus aureus. *Appl Environ Microbiol* 67, 1001-1003.

Callegan, M. C., Booth, M. C., Jett, B. D. & Gilmore, M. S. (1999). Pathogenesis of grampositive bacterial endophthalmitis. *Infect Immun* 67, 3348-3356.

Callegan, M. C., Cochran, D. C., Kane, S. T., Gilmore, M. S., Gominet, M. & Lereclus, D. (2002). Contribution of membrane-damaging toxins to Bacillus endophthalmitis pathogenesis. *Infect Immun* 70, 5381-5389.

Callegan, M. C., Kane, S. T., Cochran, D. C., Gilmore, M. S., Gominet, M. & Lereclus, D. (2003). Relationship of plcR-regulated factors to Bacillus endophthalmitis virulence. *Infect Immun* **71**, 3116-3124.

Callegan, M. C., Kane, S. T., Cochran, D. C., Novosad, B., Gilmore, M. S., Gominet, M. & Lereclus, D. (2005). Bacillus endophthalmitis: roles of bacterial toxins and motility during infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3233-3238.

Callegan, M. C., Gilmore, M. S., Gregory, M., Ramadan, R. T., Wiskur, B. J., Moyer, A. L., Hunt, J. J. & Novosad, B. D. (2007). Bacterial endophthalmitis: therapeutic challenges and host-pathogen interactions. *Prog Retin Eye Res* 26, 189-203.

Camilli, A. & Mekalanos, J. J. (1995). Use of recombinase gene fusions to identify Vibrio cholerae genes induced during infection. *Mol Microbiol* 18, 671-683.

Candela, T. & Fouet, A. (2005). Bacillus anthracis CapD, belonging to the gammaglutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Mol Microbiol* 57, 717-726.

Candela, T., Mock, M. & Fouet, A. (2005). CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for Bacillus anthracis polyglutamate capsule synthesis. *J Bacteriol* **187**, 7765-7772.

Carlson, C. R., Caugant, D. A. & Kolsto, A. B. (1994). Genotypic Diversity among Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis Strains. *Appl Environ Microbiol* 60, 1719-1725.

Carrondo, M. A. (2003). Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint. *EMBO J* 22, 1959-1968.

Cendrowski, S., MacArthur, W. & Hanna, P. (2004). Bacillus anthracis requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol Microbiol* **51**, 407-417.

Cescau, S., Cwerman, H., Letoffe, S., Delepelaire, P., Wandersman, C. & Biville, F. (2007). Heme acquisition by hemophores. *Biometals* 20, 603-613.

Chen, M. L. & Tsen, H. Y. (2002). Discrimination of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis with 16S rRNA and gyrB gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites. *J Appl Microbiol* 92, 912-919.

Cherif, A., Brusetti, L., Borin, S., Rizzi, A., Boudabous, A., Khyami-Horani, H. & Daffonchio, D. (2003). Genetic relationship in the 'Bacillus cereus group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a Bacillus anthracis-specific rep-PCR fragment. *J Appl Microbiol* 94, 1108-1119.

**Cockayne, A., Hill, P. J., Powell, N. B., Bishop, K., Sims, C. & Williams, P. (1998).** Molecular cloning of a 32-kilodalton lipoprotein component of a novel iron-regulated Staphylococcus epidermidis ABC transporter. *Infect Immun* **66**, 3767-3774.

**Cope, L. D., Yogev, R., Muller-Eberhard, U. & Hansen, E. J. (1995).** A gene cluster involved in the utilization of both free heme and heme:hemopexin by Haemophilus influenzae type b. *J Bacteriol* **177**, 2644-2653.

Cope, L. D., Thomas, S. E., Hrkal, Z. & Hansen, E. J. (1998). Binding of heme-hemopexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by Haemophilus influenzae. *Infect Immun* 66, 4511-4516.

**Cornelissen, C. N. (2003).** Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria. *Front Biosci* **8**, d836-847.

Coulanges, V., Andre, P. & Vidon, D. J. (1996). Esculetin antagonizes iron-chelating agents and increases the virulence of Listeria monocytogenes. *Res Microbiol* 147, 677-685.

Coulanges, V., Andre, P., Ziegler, O., Buchheit, L. & Vidon, D. J. (1997). Utilization of iron-catecholamine complexes involving ferric reductase activity in Listeria monocytogenes. *Infect Immun* 65, 2778-2785.

Coulanges, V., Andre, P. & Vidon, D. J. (1998). Effect of siderophores, catecholamines, and catechol compounds on Listeria spp. Growth in iron-complexed medium. *Biochem Biophys Res Commun* 249, 526-530.

Courcol, R. J., Trivier, D., Bissinger, M. C., Martin, G. R. & Brown, M. R. (1997). Siderophore production by Staphylococcus aureus and identification of iron-regulated proteins. *Infect Immun* 65, 1944-1948.

Cowart, R. E. (2002). Reduction of iron by extracellular iron reductases: implications for microbial iron acquisition. *Arch Biochem Biophys* **400**, 273-281.

Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. & Dean, D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the Bacillus thuringiensis pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 807-813.

Crosa, J. H. & Walsh, C. T. (2002). Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 223-249.

# D

**Dale, S. E., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G. & Heinrichs, D. E. (2004).** Role of siderophore biosynthesis in virulence of Staphylococcus aureus: identification and characterization of genes involved in production of a siderophore. *Infect Immun* **72**, 29-37.

**Dalhammar, G. & Steiner, H. (1984).** Characterization of inhibitor A, a protease from Bacillus thuringiensis which degrades attacins and cecropins, two classes of antibacterial proteins in insects. *Eur J Biochem* **139**, 247-252.

**Dawson, J. H. (1988).** Probing structure-function relations in heme-containing oxygenases and peroxidases. *Science* **240**, 433-439.

**de Barjac, H. & Dedonder, R. (1965).** [Isolation of an identifiable nucleotide from the "thermostable toxin" of Bacillus thuringiensis var. Berliner]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **260**, 7050-7053.

Deneer, H. G., Healey, V. & Boychuk, I. (1995). Reduction of exogenous ferric iron by a surface-associated ferric reductase of Listeria spp. *Microbiology* 141 (Pt 8), 1985-1992.

**Drechsel, H., Freund, S., Nicholson, G., Haag, H., Jung, O., Zahner, H. & Jung, G.** (1993). Purification and chemical characterization of staphyloferrin B, a hydrophilic siderophore from staphylococci. *Biometals* 6, 185-192.

Drobniewski, F. A. (1993). Bacillus cereus and related species. *Clin Microbiol Rev* 6, 324-338.

**Dryla, A., Gelbmann, D., von Gabain, A. & Nagy, E. (2003).** Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Mol Microbiol* **49**, 37-53.

Dryla, A., Hoffmann, B., Gelbmann, D., Giefing, C., Hanner, M., Meinke, A., Anderson, A. S., Koppensteiner, W., Konrat, R., von Gabain, A. & Nagy, E. (2007). High-affinity binding of the staphylococcal HarA protein to haptoglobin and hemoglobin involves a domain with an antiparallel eight-stranded  $\beta$ -Barrel fold. *J Bacteriol* **189**, 254-64.

Dunkov, B. C., Georgieva, T., Yoshiga, T., Hall, M. & Law, J. H. (2002). Aedes aegypti ferritin heavy chain homologue: feeding of iron or blood influences message levels, lengths and subunit abundance. *J Insect Sci* 2, 7.

**Dunphy, G. B., Niven, D. F. & Chadwick, J. S. (2002).** Iron contributes to the antibacterial functions of the haemolymph of Galleria mellonella. *J Insect Physiol* **48**, 903-914.

# E

Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Guinebretiere, M. H. & other authors (2005). Emetic toxin formation of Bacillus cereus is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology* **151**, 183-197.

Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M. & Scherer, S. (2006). Cereulide synthetase gene cluster from emetic Bacillus cereus: structure and location on a mega virulence plasmid related to Bacillus anthracis toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiol* **6**, 20.

**Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1998).** Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of Escherichia coli to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* **283**, 537-547.

Escolar, L., Perez-Martin, J. & de Lorenzo, V. (1999). Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* 181, 6223-6229.

Estruch, J. J., Warren, G. W., Mullins, M. A., Nye, G. J., Craig, J. A. & Koziel, M. G. (1996). Vip3A, a novel Bacillus thuringiensis vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5389-5394.

# F

Faraldo-Gomez, J. D. & Sansom, M. S. (2003). Acquisition of siderophores in gramnegative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 105-116.

Farkas, J., Sebesta, K., Horska, K., Samek, Z., Dolijs, J. & Sorm, F. (1969). The structure of exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. *Collect Czech Chem Commun* 34, 1118-1120.

Fedhila, S., Nel, P. & Lereclus, D. (2002). The InhA2 metalloprotease of Bacillus thuringiensis strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *J Bacteriol* 184, 3296-3304.

Ferguson, A. D. & Deisenhofer, J. (2002). TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1565, 318-332.

Fernandez-Prada, C. M., Hoover, D. L., Tall, B. D., Hartman, A. B., Kopelowitz, J. & Venkatesan, M. M. (2000). Shigella flexneri IpaH(7.8) facilitates escape of virulent bacteria from the endocytic vacuoles of mouse and human macrophages. *Infect Immun* **68**, 3608-3619.

Finelli, A., Gallant, C. V., Jarvi, K. & Burrows, L. L. (2003). Use of in-biofilm expression technology to identify genes involved in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. *J Bacteriol* **185**, 2700-2710.

Finlay, B.B. (1999). Bacterial disease in diverse hosts. Cell. 96 (3), 315-318.

Fowler, V. G., Jr., Miro, J. M., Hoen, B. & other authors (2005). Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA* 293, 3012-3021.

# G

Gaur, A. H., Patrick, C. C., McCullers, J. A., Flynn, P. M., Pearson, T. A., Razzouk, B. I., Thompson, S. J. & Shenep, J. L. (2001). Bacillus cereus bacteremia and meningitis in immunocompromised children. *Clin Infect Dis* 32, 1456-1462.

Gilmore, M. S., Cruz-Rodz, A. L., Leimeister-Wachter, M., Kreft, J. & Goebel, W. (1989). A Bacillus cereus cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. *J Bacteriol* 171, 744-753.

Gohar, M., Okstad, O. A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolsto, A. B. & Lereclus, D. (2002). Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of Bacillus cereus reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* 2, 784-791.

Gohar, M., Gilois, N., Graveline, R., Garreau, C., Sanchis, V. & Lereclus, D. (2005). A comparative study of Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis and Bacillus anthracis extracellular proteomes. *Proteomics* 5, 3696-3711.

Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Okstad, O. A., Gominet, M., Kolsto, A. B. & Lereclus, D. (2008). The PlcR virulence regulon of Bacillus cereus. *PLoS ONE* 3, e2793.

Gonzalez, J. M., Jr., Brown, B. J. & Carlton, B. C. (1982). Transfer of Bacillus thuringiensis plasmids coding for delta-endotoxin among strains of B. thuringiensis and B. cereus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6951-6955.

Gordon, R. E., Haynes, W. C. & Pang, H.-N. (1973). The genus *Bacillus*. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.

Granum, P. E. (1994). Bacillus cereus and its toxins. Soc Appl Bacteriol Symp Ser 23, 61S-66S.

Grifantini, R., Sebastian, S., Frigimelica, E., Draghi, M., Bartolini, E., Muzzi, A., Rappuoli, R., Grandi, G. & Genco, C. A. (2003). Identification of iron-activated and - repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of Neisseria meningitidis group B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9542-9547.

Grigg, J. C., Vermeiren, C. L., Heinrichs, D. E. & Murphy, M. E. (2007). Haem recognition by a Staphylococcus aureus NEAT domain. *Mol Microbiol* 63, 139-149.

Guinebretière, M. H. & Sanchis, V. (2003). *Bacillus cereus sesu lato*. Bulletin de la société française de microbiologie 18, 95-103

#### Η

Hanson, M. S., Pelzel, S. E., Latimer, J., Muller-Eberhard, U. & Hansen, E. J. (1992). Identification of a genetic locus of Haemophilus influenzae type b necessary for the binding and utilization of heme bound to human hemopexin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1973-1977.

Hantke, K. (2001). Iron and metal regulation in bacteria. Curr Opin Microbiol 4, 172-177.

Hantke, K. (2003). Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol* 11, 192-195.

Harvie, D. R. & Ellar, D. J. (2005). A ferric dicitrate uptake system is required for the full virulence of Bacillus cereus. *Curr Microbiol* 50, 246-250.

Heinrichs, J. H., Gatlin, L. E., Kunsch, C., Choi, G. H. & Hanson, M. S. (1999). Identification and characterization of SirA, an iron-regulated protein from Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* 181, 1436-1443.

Helgason, E., Caugant, D. A., Lecadet, M. M., Chen, Y., Mahillon, J., Lovgren, A., Hegna, I., Kvaloy, K. & Kolsto, A. B. (1998). Genetic diversity of Bacillus cereus/B. thuringiensis isolates from natural sources. *Curr Microbiol* 37, 80-87.

Helgason, E., Okstad, O. A., Caugant, D. A., Johansen, H. A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I. & Kolsto, A. B. (2000). Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis--one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol* 66, 2627-2630.

Helgason, E., Tourasse, N. J., Meisal, R., Caugant, D. A. & Kolsto, A. B. (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the Bacillus cereus group. *Appl Environ Microbiol* 70, 191-201.

Hill, K. K., Ticknor, L. O., Okinaka, R. T. & other authors (2004). Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis isolates. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1068-1080.

Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* 3, 165-170.

Hoffmaster, A. R., Ravel, J., Rasko, D. A. & other authors (2004). Identification of anthrax toxin genes in a Bacillus cereus associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8449-8454.

#### Ι

Ishiwata, S. (1901). On a kind of severe flacherie (sotto diseases). *Dainihon Sanshi Kaiho* 114, 1-5.

Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I. & other authors (2003). Genome sequence of Bacillus cereus and comparative analysis with Bacillus anthracis. *Nature* 423, 87-91.

#### J

Jin, B., Newton, S. M., Shao, Y., Jiang, X., Charbit, A. & Klebba, P. E. (2006). Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in Listeria monocytogenes. *Mol Microbiol* **59**, 1185-1198.

### Κ

Kammler, M., Schon, C. & Hantke, K. (1993). Characterization of the ferrous iron uptake system of Escherichia coli. *J Bacteriol* 175, 6212-6219.

Kaneko, T., Nozaki, R. & Aizawa, K. (1978). Deoxyribonucleic acid relatedness between Bacillus anthracis, Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis. *Microbiol Immunol* 22, 639-641.

Kaneshiro, T., Nakamura, L. K. & Bagby, M. O. (1995). Oleic acid transformations by selected strains of Sphingobacterium thalpophilum and Bacillus cereus from composted manure. *Curr Microbiol* **31**, 62-67.

Kavagnah K., Reeves, E.P. (2004). Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 28(1), 101-12.

Keim, P., Kalif, A., Schupp, J. & other authors (1997). Molecular evolution and diversity in Bacillus anthracis as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J Bacteriol* 179, 818-824.

Kim, B. S., Lee, C. S., Yun, C. Y., Yeo, S. M., Park, W. M. & Kim, H. R. (2001). Characterization and immunological analysis of ferritin from the hemolymph of Galleria mellonella. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **129**, 501-509.

Kim, B. S., Lee, C. S., Seol, J. Y., Yun, C. Y. & Kim, H. R. (2002). Cloning and expression of 32 kDa ferritin from Galleria mellonella. *Arch Insect Biochem Physiol* 51, 80-90.

Klee, S. R., Ozel, M., Appel, B. & other authors (2006). Characterization of Bacillus anthracis-like bacteria isolated from wild great apes from Cote d'Ivoire and Cameroon. *J Bacteriol* 188, 5333-5344.

Koller, C. N., Bauer, L. S. & Hollingworth, R. M. (1992). Characterization of the pHmediated solubility of Bacillus thuringiensis var. san diego native delta-endotoxin crystals. *Biochem Biophys Res Commun* 184, 692-699.

Konetschny-Rapp, S., Jung, G., Meiwes, J. & Zahner, H. (1990). Staphyloferrin A: a structurally new siderophore from staphylococci. *Eur J Biochem* 191, 65-74.

Koppisch, A. T., Browder, C. C., Moe, A. L., Shelley, J. T., Kinkel, B. A., Hersman, L. E., Iyer, S. & Ruggiero, C. E. (2005). Petrobactin is the primary siderophore synthesized by Bacillus anthracis str. Sterne under conditions of iron starvation. *Biometals* 18, 577-585.

Koster, W. (2005). Cytoplasmic membrane iron permease systems in the bacterial cell envelope. *Front Biosci* 10, 462-477.

Kotiranta, A., Lounatmaa, K. & Haapasalo, M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of Bacillus cereus infections. *Microbes Infect* 2, 189-198.

Kronstad, J. W. & Whiteley, H. R. (1984). Inverted repeat sequences flank a Bacillus thuringiensis crystal protein gene. *J Bacteriol* 160, 95-102.

Kupke, T., Lechner, M., Kaim, G. & Gotz, F. (1989). Improved purification and biochemical properties of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from Bacillus thuringiensis. *Eur J Biochem* 185, 151-155.

# L

Lechner, M., Kupke, T., Stefanovic, S. & Gotz, F. (1989). Molecular characterization and sequence of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of Bacillus thuringiensis. *Mol Microbiol* **3**, 621-626.

Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Pruss, B. M., Kaplan, T., Wiessner-Gunkel, E., Stewart, G. S. & Scherer, S. (1998). Bacillus weihenstephanensis sp. nov. is a new psychrotolerant species of the Bacillus cereus group. *Int J Syst Bacteriol* **48** Pt **4**, 1373-1382.

Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J. & Cossart, P. (1997). Internalin of Listeria monocytogenes with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect Immun* **65**, 5309-5319.

Lee, H. W., Choe, Y. H., Kim, D. K., Jung, S. Y. & Lee, N. G. (2004). Proteomic analysis of a ferric uptake regulator mutant of Helicobacter pylori: regulation of Helicobacter pylori gene expression by ferric uptake regulator and iron. *Proteomics* **4**, 2014-2027.

Lei, B., Smoot, L. M., Menning, H. M., Voyich, J. M., Kala, S. V., Deleo, F. R., Reid, S. D. & Musser, J. M. (2002). Identification and characterization of a novel heme-associated cell surface protein made by Streptococcus pyogenes. *Infect Immun* **70**, 4494-4500.

Lereclus, D., Ribier, J., Klier, A., Menou, G. & Lecadet, M. M. (1984). A transposon-like structure related to the delta-endotoxin gene of Bacillus thuringiensis. *EMBO J* **3**, 2561-2567.

Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salamitou, S. & Sanchis, V. (1996). Identification of a Bacillus thuringiensis gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J Bacteriol* **178**, 2749-2756.

Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S. & Gominet, M. (2000). Regulation of toxin and virulence gene transcription in Bacillus thuringiensis. *Int J Med Microbiol* **290**, 295-299.

Letoffe, S., Nato, F., Goldberg, M. E. & Wandersman, C. (1999). Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor HasR. *Mol Microbiol* 33, 546-555.

Lewis, L. A., Gray, E., Wang, Y. P., Roe, B. A. & Dyer, D. W. (1997). Molecular characterization of hpuAB, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of Neisseria meningitidis. *Mol Microbiol* 23, 737-749.

Litwin, C. M. & Calderwood, S. B. (1993). Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 6, 137-149.

Liu, M., Tanaka, W. N., Zhu, H., Xie, G., Dooley, D. M. & Lei, B. (2008). Direct hemin transfer from IsdA to IsdC in the Isd heme acquisition system of staphylococcus aureus. *J Biol Chem*.

Locke, M. & Nichol, H. (1992). Iron economy in insects: transport, metabolism, and storage. *Annu. Rev. Entomol.*, **37**, 195-215.

Lorence, R. M., Carter, K., Gennis, R. B., Matsushita, K. & Kaback, H. R. (1988). Trypsin proteolysis of the cytochrome d complex of Escherichia coli selectively inhibits ubiquinol oxidase activity while not affecting N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine oxidase activity. *J Biol Chem* 263, 5271-5276.

Lund, T. & Granum, P. E. (1996). Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from Bacillus cereus isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiol Lett* 141, 151-156.

Lund, T. & Granum, P. E. (1997). Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of Bacillus cereus. *Microbiology* 143 (Pt 10), 3329-3336.

Lund, T., De Buyser, M. L. & Granum, P. E. (2000). A new cytotoxin from Bacillus cereus that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* 38, 254-261.

Mahan, M. J., Slauch, J. M. & Mekalanos, J. J. (1993). Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* 259, 686-688.

Maresso, A. W., Chapa, T. J. & Schneewind, O. (2006). Surface protein IsdC and Sortase B are required for heme-iron scavenging of Bacillus anthracis. *J Bacteriol* 188, 8145-8152.

Maresso, A. W. & Schneewind, O. (2006). Iron acquisition and transport in Staphylococcus aureus. *Biometals* **19**, 193-203.

Maresso, A. W., Garufi, G. & Schneewind, O. (2008). Bacillus anthracis secretes proteins that mediate heme acquisition from hemoglobin. *Plos Pathog* **4**, e1000132.

Marraffini, L. A. & Schneewind, O. (2005). Anchor structure of staphylococcal surface proteins. V. Anchor structure of the sortase B substrate IsdC. *J Biol Chem* 280, 16263-16271.

Marraffini, L. A., Dedent, A. C. & Schneewind, O. (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 192-221.

Mazmanian, S. K., Ton-That, H., Su, K. & Schneewind, O. (2002). An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during Staphylococcus aureus pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2293-2298.

Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D. M. & Schneewind, O. (2003). Passage of heme-iron across the envelope of Staphylococcus aureus. *Science* 299, 906-909.

McHugh, J. P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E. & Andrews, S. C. (2003). Global iron-dependent gene regulation in Escherichia coli. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* 278, 29478-29486.

Mesnage, S., Fontaine, T., Mignot, T., Delepierre, M., Mock, M. & Fouet, A. (2000). Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *EMBO J* **19**, 4473-4484.

**Miranda, R., Zamudio, F. Z. & Bravo, A. (2001).** Processing of Cry1Ab delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis by Manduca sexta and Spodoptera frugiperda midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochem Mol Biol* **31**, 1155-1163.

Mock, M. & Fouet, A. (2001). Anthrax. Annu Rev Microbiol 55, 647-671.

Modun, B. & Williams, P. (1999). The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Infect Immun* 67, 1086-1092.

Moellenbeck, D. J., Peters, M. L., Bing, J. W. & other authors (2001). Insecticidal proteins from Bacillus thuringiensis protect corn from corn rootworms. *Nat Biotechnol* 19, 668-672.

Morrissey, J. A., Cockayne, A., Hill, P. J. & Williams, P. (2000). Molecular cloning and analysis of a putative siderophore ABC transporter from Staphylococcus aureus. *Infect Immun* 68, 6281-6288.

Morton, D. J., Whitby, P. W., Jin, H., Ren, Z. & Stull, T. L. (1999). Effect of multiple mutations in the hemoglobin- and hemoglobin-haptoglobin-binding proteins, HgpA, HgpB, and HgpC, of Haemophilus influenzae type b. *Infect Immun* 67, 2729-2739.

Muryoi, N., Tiedemann, M. T., Pluym, M., Cheung, J., Heinrichs, D. E. & Stillman, M. J. (2008). Demonstration of the iron-regulated surface determinant heme transfer pathway in Staphylococcus aureus. *J Biol Chem* 283, 28125-36

#### Ν

Nakamura, L. K. (1994). DNA relatedness among Bacillus thuringiensis serovars. *Int J Syst Bacteriol* 44, 125-129.

Nakamura, L. K. (1998). Bacillus pseudomycoides sp. nov. Int J Syst Bacteriol 48 Pt 3, 1031-1035.

Navarre, W. W. & Schneewind, O. (1994). Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 14, 115-121.

Navarre, W. W. & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 174-229.

Neilands, J. B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270, 26723-26726.

Newton, S. M., Klebba, P. E., Raynaud, C., Shao, Y., Jiang, X., Dubail, I., Archer, C., Frehel, C. & Charbit, A. (2005). The svpA-srtB locus of Listeria monocytogenes: furmediated iron regulation and effect on virulence. *Mol Microbiol* 55, 927-940.

# 0

**Osbourn, A. E., Barber, C. E. & Daniels, M. J. (1987).** Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen Xanthomonas campestris pathovar campestris using a promoter-probe plasmid. *EMBO J* **6**, 23-28.

# P

Panina, E. M., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2001). Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res* 29, 5195-5206.

Paoli, M., Anderson, B. F., Baker, H. M., Morgan, W. T., Smith, A. & Baker, E. N. (1999). Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains. *Nat Struct Biol* **6**, 926-931.

Park, R. Y., Choi, M. H., Sun, H. Y. & Shin, S. H. (2005). Production of catecholsiderophore and utilization of transferrin-bound iron in Bacillus cereus. Biol Pharm Bull 28, 1132-1135.

Perchat, S., Buisson, C., Chaufaux, J., Sanchis, V., Lereclus, D. & Gohar, M. (2005). Bacillus cereus produces several nonproteinaceous insecticidal exotoxins. J Invertebr Pathol 90, 131-133.

Pham, D.Q., Zhang, D., Hufnagel, D.H., Winzerling, J.J. (1996). Manduca sexta hemolymph ferritin: cDNA sequence and mRNA expression. Gene. 172(2), 255-9.

Pilpa, R. M., Fadeev, E. A., Villareal, V. A., Wong, M. L., Phillips, M. & Clubb, R. T. (2006). Solution structure of the NEAT (NEAr Transporter) domain from IsdH/HarA: the human hemoglobin receptor in Staphylococcus aureus. J Mol Biol 360, 435-447.

Pluym, M., Muryoi, N., Heinrichs, D. E. & Stillman, M.J. (2008). Heme binding in the NEAT domains of IsdA and IsdC of Staphylococcus aureus. J Inorg Biochem 102, 480-8.

Posey, J. E. & Gherardini, F. C. (2000). Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. Science 288, 1651-1653.

# R

Ramarao, N. & Lereclus, D. (2005). The InhA1 metalloprotease allows spores of the B. cereus group to escape macrophages. Cell Microbiol 7, 1357-1364.

Ramarao, N. & Lereclus, D. (2006). Adhesion and cytotoxicity of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. Microbes Infect 8, 1483-1491.

Rasko, D. A., Ravel, J., Okstad, O. A. & other authors (2004). The genome sequence of Bacillus cereus ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to Bacillus anthracis pXO1. Nucleic Acids Res 32, 977-988.

Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S. & Ravel, J. (2005). Genomics of the Bacillus cereus group of organisms. FEMS Microbiol Rev 29, 303-329.

Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Okstad, O. A., Fouts, D. E., Jiang, L., Cer, R. Z., Kolsto, A. B., Gill, S. R. & Ravel, J. (2007). Complete sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal Bacillus cereus isolates reveals a common evolutionary history among the B. cereus-group plasmids, including Bacillus anthracis pXO1. J Bacteriol 189, 52-64.

Ratledge, C. & Dover, L. G. (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. Annu Rev *Microbiol* **54**, 881-941.

Read, T. D., Peterson, S. N., Tourasse, N. & other authors (2003). The genome sequence of Bacillus anthracis Ames and comparison to closely related bacteria. Nature 423, 81-86.

Rediers, H., Rainey, P. B., Vanderleyden, J. & De Mot, R. (2005). Unraveling the secret lives of bacteria: use of in vivo expression technology and differential fluorescence induction

promoter traps as tools for exploring niche-specific gene expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 217-261.

#### S

Salamitou, S., Agaisse, H. & Lereclus, D. (1997). A genetic system that reports transient activation of genes in Bacillus. *Gene* 202, 121-126.

Salamitou, S., Ramisse, F., Brehelin, M., Bourguet, D., Gilois, N., Gominet, M., Hernandez, E. & Lereclus, D. (2000). The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus in mice and insects. *Microbiology* 146 (Pt 11), 2825-2832.

Sato, N., Kurotaki, H., Watanabe, T., Mikami, T. & Matsumoto, T. (1998). Use of hemoglobin as an iron source by Bacillus cereus. *Biol Pharm Bull* 21, 311-314.

Sato, N., Ikeda, S., Mikami, T. & Matsumoto, T. (1999a). Bacillus cereus dissociates hemoglobin and uses released heme as an iron source. *Biol Pharm Bull* 22, 1118-1121.

Sato, N., Kurotaki, H., Ikeda, S., Daio, R., Nishinome, N., Mikami, T. & Matsumoto, T. (1999b). Lactoferrin inhibits Bacillus cereus growth and heme analogs recover its growth. *Biol Pharm Bull* 22, 197-199.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. & Dean, D. H. (1998). Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 775-806.

Schryvers, A. B., Bonnah, R., Yu, R. H., Wong, H. & Retzer, M. (1998). Bacterial lactoferrin receptors. *Adv Exp Med Biol* 443, 123-133.

Schryvers, A. B. & Stojiljkovic, I. (1999). Iron acquisition systems in the pathogenic Neisseria. *Mol Microbiol* 32, 1117-1123.

Stojiljkovic, I., Larson, J., Hwa, V., Anic, S. & So, M. (1996). HmbR outer membrane receptors of pathogenic Neisseria spp.: iron-regulated, hemoglobin-binding proteins with a high level of primary structure conservation. *J Bacteriol* 178, 4670-4678.

Schubert, W. D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M. P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T. & Heinz, D. W. (2002). Structure of internalin, a major invasion protein of Listeria monocytogenes, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* 111, 825-836.

Sebesta, K. & Horska, K. (1970). Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of Bacillus thuringiensis. *Biochim Biophys Acta* 209, 357-376.

Sebulsky, M. T., Hohnstein, D., Hunter, M. D. & Heinrichs, D. E. (2000). Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* 182, 4394-4400.

Sebulsky, M. T. & Heinrichs, D. E. (2001). Identification and characterization of fhuD1 and fhuD2, two genes involved in iron-hydroxamate uptake in Staphylococcus aureus. *J Bacteriol* 183, 4994-5000.

Seitz, V., Clermont, A., Wedde, M., Hummel, M., Vilcinskas, A., Schlatterer, K., Podsiadlowski, L. (2003). Identification of immunorelevant genes from greater wax moth (Galleria mellonella) by a subtractive hybridization approach. *Dev. Comp. Immunol.*, 27(3):207-15.

Shany, S., Bernheimer, A. W., Grushoff, P. S. & Kim, K. S. (1974). Evidence for membrane cholesterol as the common binding site for cereolysin, streptolysin O and saponin. *Mol Cell Biochem* **3**, 179-186.

Silva, R. M., Saadi, S. & Maas, W. K. (1988). A basic replicon of virulence-associated plasmids of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli is homologous with a basic replicon in plasmids of IncF groups. *Infect Immun* 56, 836-842.

Simon, N., Coulanges, V., Andre, P. & Vidon, D. J. (1995). Utilization of exogenous siderophores and natural catechols by Listeria monocytogenes. *Appl Environ Microbiol* 61, 1643-1645.

Skaar, E. P., Gaspar, A. H. & Schneewind, O. (2004a). IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of Staphylococcus aureus. *J Biol Chem* 279, 436-443.

Skaar, E. P., Humayun, M., Bae, T., DeBord, K. L. & Schneewind, O. (2004b). Ironsource preference of Staphylococcus aureus infections. *Science* 305, 1626-1628.

Skaar, E. P., Gaspar, A. H. & Schneewind, O. (2006). Bacillus anthracis IsdG, a hemedegrading monooxygenase. *J Bacteriol* 188, 1071-1080.

Slamti, L. & Lereclus, D. (2002). A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the Bacillus cereus group. *EMBO J* 21, 4550-4559.

Slamti, L., Perchat, S., Gominet, M. & other authors (2004). Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the Bacillus cereus group are nonhemolytic. *J Bacteriol* 186, 3531-3538.

Smith, N. R., Gordon, R. E. & Clark, F. E. (1946). Aerobic mesophilic spore forming bacteria. United States Department of Agriculture Micellaneous Publication n°559. Washington, DC: USDA.

Sorokin, A., Candelon, B., Guilloux, K., Galleron, N., Wackerow-Kouzova, N., Ehrlich, S. D., Bourguet, D. & Sanchis, V. (2006). Multiple-locus sequence typing analysis of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1569-1578.

Stenfors, L. P. & Granum, P. E. (2001). Psychrotolerant species from the Bacillus cereus group are not necessarily Bacillus weihenstephanensis. *FEMS Microbiol Lett* **197**, 223-228.

Stojiljkovic, I. & Hantke, K. (1995). Functional domains of the Escherichia coli ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet* 247, 199-205.

Sue, D., Hoffmaster, A. R., Popovic, T. & Wilkins, P. P. (2006). Capsule production in Bacillus cereus strains associated with severe pneumonia. *J Clin Microbiol* 44, 3426-3428.

#### Т

Taylor, J. M. & Heinrichs, D. E. (2002). Transferrin binding in Staphylococcus aureus: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol Microbiol* **43**, 1603-1614.

**Thompson, D. K., Beliaev, A. S., Giometti, C. S. & other authors (2002).** Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (fur) mutant of Shewanella oneidensis: possible involvement of fur in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. *Appl Environ Microbiol* **68**, 881-892.

Thompson, J. M., Jones, H. A. & Perry, R. D. (1999). Molecular characterization of the hemin uptake locus (hmu) from Yersinia pestis and analysis of hmu mutants for hemin and hemoprotein utilization. *Infect Immun* 67, 3879-3892.

Thorsen, L., Hansen, B. M., Nielsen, K. F., Hendriksen, N. B., Phipps, R. K. & Budde, B. B. (2006). Characterization of emetic Bacillus weihenstephanensis, a new cereulide-producing bacterium. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5118-5121.

Ticknor, L. O., Kolsto, A. B., Hill, K. K., Keim, P., Laker, M. T., Tonks, M. & Jackson, P. J. (2001). Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis Soil Isolates. *Appl Environ Microbiol* 67, 4863-4873.

Torres, V. J., Pishchany, G., Humayun, M., Schneewind, O. & Skaar, E. P. (2006). Staphylococcus aureus IsdB is a hemoglobin receptor required for heme iron utilization. *J Bacteriol* **188**, 8421-8429.

Touati, D. (2000). Iron and oxidative stress in bacteria. Arch Biochem Biophys 373, 1-6.

#### V

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60, 407-438.

Vilas-Boas, G. T., Peruca, A. P. & Arantes, O. M. (2007). Biology and taxonomy of Bacillus cereus, Bacillus anthracis, and Bacillus thuringiensis. *Can J Microbiol* 53, 673-687.

Vodovar, N., Acosta, C., Lemaitre, B. & Boccard, F. (2004). Drosophila: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. *Trends Microbiol* 12, 235-242.

Wagener, F. A., Volk, H. D., Willis, D., Abraham, N. G., Soares, M. P., Adema, G. J. & Figdor, C. G. (2003). Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev* 55, 551-571.

Wandersman, C. & Stojiljkovic, I. (2000). Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Curr Opin Microbiol* **3**, 215-220.

Wandersman, C. & Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* 58, 611-647.

Weinberg, E. D. (1997). The Lactobacillus anomaly: total iron abstinence. *Perspect Biol Med* 40, 578-583.

Wilson, M. K., Abergel, R. J., Raymond, K. N., Arceneaux, J. E. & Byers, B. R. (2006). Siderophores of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and Bacillus thuringiensis. *Biochem Biophys Res Commun* 348, 320-325.

# Y

Yoshiga, T., Georgieva, T., Dunkov, B.C., Harizanova, N., Ralchev, K., and Law, J.H. (1999). *Drosophila melanogaster* transferrin. Cloning, deduced protein sequence, expression during the life cycle, gene localization and up-regulation on bacterial infection. *Eur. J. Biochem.* 260, 414-420

You, S. A. & Wang, Q. (2005). Ferritin in atherosclerosis. Clin Chim Acta 357, 1-16.

Yuk, J.E., Seo, D.H., Choi, C.W., HAN, J., Choi, H.K., PARK, J.B., Hwang, S.Y., Koh,S.K., and Yun, C.Y. (2005). Characterization of Tissue-Ferritin Purified from Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Entomol. Reaserch.*, **35**, 227-234.

#### Abstract

*Bacillus cereus* is frequently associated with food-borne gastroenteritis and can be responsible for severe opportunistic infections. Adaptation factors involved in the pathogenicity of *B. cereus* are still unknown. The ability to acquire ion during infection, is an important adaptation factor that allow bacteria to overcome the lack of iron imposed by the host.

Our work has led to the identification of new factors involved in the adaptation of *B. cereus* in the host and to the characterization of a novel protein IIsA (Iron regulated leucinerich surface protein) highly expressed in the host. These factors were identified using the IVET (In Vivo Expression Technology) system, which was adapted to the strain *B. cereus* ATCC 14579 and screened after infection in the insect larvae *Galleria mellonella*. This system detects transient activated promoters.

The protein structure analysis of IIsA shows four distinct domains: an N-terminal signal peptide for export, a NEAT domain thought to be involved in iron transport, a leucinerich repeat domain that may interact with host cells, and an SLH domain presumably binding the protein to the bacterial surface. The presence of a *fur* box in the promoter region of *ilsA* suggests an iron dependent regulation. Indeed, the transcriptional analysis showed that *ilsA* is expressed under iron restricted conditions *in vitro* and *in vivo*. In addition, we have shown that IIsA is located on the bacterial surface and that is required for iron acquisition from the host proteins: hemoglobin, heme and ferritin, by direct binding to them. Furthermore, the protein sequence of the NEAT domain of IIsA, suggests that it could be responsible for the interaction with the heme. Disruption of *ilsA* reduced the survival and the virulence of *B. cereus* in the insect and in a mice macrophage cell line.

Our results indicate that IIsA is an adaptation factor that play an essential role in iron acquisition during infection and thus contribute to the pathogenesis of B. *cereus* in both invertebrates and vertebrates.

Key words : *Bacillus cereus*, IVET system, adaptations factors, infection, surface protein, iron acquisition, iron sources, *Galleria mellonella*.

#### Résumé

*Bacillus cereus* est fréquemment associé à des toxi-infections alimentaires et peut être responsable de pathologies opportunistes sévères. Les facteurs d'adaptations de *B. cereus* chez l'hôte, liés à son pouvoir pathogène, sont encore inconnus. La capacité d'acquérir le fer lors d'une infection, est une importante réponse adaptative des bactéries, leur permettant de surmonter le manque de fer imposé par l'hôte.

Nos travaux ont permis l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans l'adaptation de *B. cereus* chez l'hôte, ainsi que la caractérisation d'une nouvelle protéine IIsA (Iron regulated leucine-rich surface protein) fortement exprimée *in vivo*. L'identification de ces facteurs a été réalisée à l'aide du système IVET (In Vivo Expression Technology), adapté à la souche *B. cereus* ATCC 14579 et analysé après infection chez la larve du lépidoptère *Galleria mellonella*. Ce système permet la détection des promoteurs activés de façon transitoire.

L'analyse de la structure protéique d'IlsA, montre quatre domaines conservés: un peptide signal d'export N-terminal, un domaine NEAT potentiellement impliqué dans le transport du fer, suivi d'une région riche en leucine (LRR) susceptible d'interagir avec les protéines de l'hôte, et un domaine SLH de liaison à la surface bactérienne. La présence d'une boîte *fur* dans la région promotrice d'*ilsA* suggère une régulation dépendante du fer. Les analyses transcriptionnelles ont montré qu'*ilsA* est en effet, exprimé dans les conditions de carence en fer *in vitro* et *in vivo*. De plus, nous avons démontré qu'IlsA est localisée à la surface et qu'elle est nécessaire pour l'acquisition de fer à partir des protéines présentes chez l'hôte : l'hémoglobine, l'hème et la ferritine, et ceci en se liant directement avec elles. En outre, l'étude de la séquence protéique du domaine NEAT d'IlsA, suggère qu'il serait responsable de l'interaction avec l'hème. Par ailleurs, nous avons montré que l'inactivation d'*ilsA* affecte la survie et la virulence de *B. cereus* chez l'insecte, et chez les macrophages murins.

Nos résultats indiquent qu'IlsA est un facteur d'adaptation essentiel pour l'acquisition de fer au cours de l'infection, contribuant à la pathogénie de *B. cereus chez les invertébrés et vertébrés*.

Discipline : Microbiologie

Mots clés : *Bacillus cereus*, système IVET, facteurs d'adaptations, infection, protéine de surface, acquisition du fer, sources de fer, *Galleria mellonella*.

Adresse des laboratoires : INRA, Centre de Versailles-Grignon, UR1249 Unité Génétique Microbienne et Environnement, F-78285 Guyancourt / Laboratoire de Biotechnologie, Faculté des Sciences, Université Saint-Joseph, Riad el Solh, Beyrouth 1107 2050, Liban