



HAL
open science

Mécanismes d'acquisition du fer chez *Bacillus cereus* : rôles d'IlsA, du système Isd et des sidérophores dans l'assimilation du fer à partir de l'hème et de la ferritine

Elise Abi Khalil

► **To cite this version:**

Elise Abi Khalil. Mécanismes d'acquisition du fer chez *Bacillus cereus* : rôles d'IlsA, du système Isd et des sidérophores dans l'assimilation du fer à partir de l'hème et de la ferritine. Microbiologie et Parasitologie. AgroParisTech; Université Saint-Joseph (Beyrouth). Faculté des Sciences, 2013. Français. NNT : 2013AGPT0039 . tel-03580649

HAL Id: tel-03580649

<https://pastel.hal.science/tel-03580649>

Submitted on 18 Feb 2022

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.

Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de docteur délivré par

**L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de
l'Environnement (AgroParisTech),
l'Université Saint Joseph de Beyrouth (USJ)**

Spécialité : Microbiologie et Biochimie des protéines

présentée et soutenue publiquement par

Elise Abi Khalil

Le 26 Avril 2013

**Mécanismes d'acquisition du fer chez *Bacillus cereus* :
rôles d'IlsA, du système Isd et des sidérophores dans l'assimilation du fer
à partir de l'hème et de la ferritine**

Directeurs de thèse : **Christina Nielsen-LeRoux (France)**

Mireille Kallassy Awad (Liban)

Jury

M. Frédéric Barras, PR, Université Aix Marseille, France

Mme Cécile Wandersman, PR, Institut Pasteur, France

M. Zouhair Attieh, PR associé, American University of Science and Technology, Liban

M. Fadi Bou Abdallah, PR associé, SUNY, Potsdam, NY, USA

Mme Mireille Kallassy Awad, PR, Université Saint Joseph, Liban

Mme Christina Nielsen-LeRoux, DR2, INRA, France

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

INRA

Institut MICALIS

Domaine de Vilvert – 78350 JOUY EN JOSAS

Remerciements

En principe, des résultats suffisamment solides, publiables dans les meilleurs journaux possibles sont les attentes primordiales d'un thésard. Honnêtement, le grand résultat qui a marqué ma vie est ma présence au sein de l'équipe GME à la Minière...

Si je veux commencer à remercier chacun d'entre vous je pense que je ne terminerai jamais mais laissons un peu le cœur se lâcher ...

Christina, ton slogan "Live as if you were to die tomorrow. Learn as if you were to live forever" m'a suffi pour comprendre que chaque jour est une éternité, pour apprendre la bonté, la souplesse et l'optimisme et espérer qu'un jour je serai un chef comme toi!! Je te remercie énormément pour tout : ta confiance en moi, tes conseils, tes encouragements et ton esprit scientifique riche de cette capacité à transmettre des connaissances et à permettre des collaborations avec plusieurs équipes. "Tu resteras pour toujours mon Idole".

Chantal, "Chanchan" la mission de ta petite Elise est terminée. Néanmoins, elle partira avec un cœur gravé par de belles paroles, un hymne d'espoir, un chant de liberté, une source d'amour. Il m'a fallu trois ans et demi pour comprendre que le bonheur de la vie, c'est de vivre l'instant présent, et grâce à tes mots je peux dire tranquillement que ma vision de la vie a beaucoup changé. Mille mercis !!!

Diego, j'avoue être vraiment chanceuse d'avoir travaillé avec une personne comme toi. Je te remercie pour ta disponibilité illimitée, ton aide fructueuse, ton esprit critique et constructif ainsi que tes encouragements permanents. La solidarité est la première clé qui mène à la réussite. Félicitations !! Nous avons bien réussi notre histoire intitulée "IlsA".

Un grand merci du fond du cœur à Elisabeth et Agnès. Je n'oublierai jamais ni votre attention ni votre bonté impressionnantes. Je me rappellerai toujours des ateliers de cuisine chez toi Elisabeth, des déjeuners que nous avons partagés ensemble, de nos discussions intéressantes et sympas...

Agnès, ta petite « manucure » Libanaise a passé le flambeau à Christelle qui va maintenant prendre le relais. Cricri tu vas me manquer ☺.

Un merci pour Isabelle, ton sourire et tes conseils m'ont apporté un grand soulagement à chaque fois je me retrouvais fatiguée et dégoutée.

Je remercie Leyla et Emilie pour leurs discussions scientifiques enrichissantes, vous étiez toujours à l'écoute de mes problèmes de manips !

Je remercie infiniment Ludo, toujours prêt à résoudre mes problèmes informatiques.

Merci Christophe pour ta gentillesse sans mesure, je veux me souvenir que le caractère de ta fille ainée ressemble au mien. Sois alors rassuré!!

Merci Nath, Nalini, Eugénie, Vincent, Stéphane et Michel pour votre gentillesse et votre humour.

J'exprime ma sincère reconnaissance à Didier de m'avoir accordé sa confiance totale pour mener un projet de recherche au sein dans son laboratoire.

Vous êtes une équipe exceptionnelle ☺ je ne garde que de beaux souvenirs.

Je remercie infiniment Madame Mireille, qui a joué un grand rôle pour l'accomplissement de cette thèse. Je suis pour toujours reconnaissante pour tes encouragements réguliers, ton soutien positif, tes mots rassurants et tes conseils précieux.

Fadi, l'enseignement et l'encadrement des étudiants sont ta vocation. Ton dévouement pour la recherche est une voix qui t'appelle du fond de ton cœur. Je n'oublierai jamais mon séjour aux Etats Unis où j'ai appris la logique scientifique et l'esprit pédagogique de l'enseignante de demain, je ne peux que te dire "I am more than thankful" tu m'as comblée par ta générosité incomparable.

J'exprime ma profonde reconnaissance à Mme. Cécile Wandersman, M. Zouhair Attieh et M. Frédéric Barras d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Conseil de la recherche de l'université Saint Joseph et l'INRA-le département MICA pour les bourses de thèse qui m'ont accordées. Merci pour l'école doctorale ABIES pour la bourse de mobilité à l'étranger, qui m'a permis de réaliser un stage aux Etats Unis.

Un grand Merci pour le groupe GrabIron et ses réunions enrichissantes qui ont été le moteur dynamique derrière l'avancement des travaux expérimentaux.

Une thèse sans le soutien et les encouragements des vrais amis ne peut pas aboutir!!

Ma Chère Rita, Versailles était le point de notre rencontre et la Minière était un début d'histoire, une histoire "Amitié pour toujours". En effet, je pense que ni les mots ni les paroles ne peuvent exprimer ma gratitude. Je me contente de te dire que la même ambition nous a réunies mais au delà de la mission de la thèse, nous avons toutes les deux reçu des fruits ultimes cultivés dans le jardin de la sagesse et la vérité. Les moments que nous avons partagés ensemble resteront inoubliables. Ratrout je te souhaite tout le bonheur du monde.

Maya, tes conseils intelligents et ton humour m'ont beaucoup aidé à continuer sans avoir peur de l'inattendu, je ne garde que des beaux souvenirs de cette période qui nous a fait grandir et épanouir.

Mira, merci pour ta bonté, ta fidélité, ta présence.

Abbas, merci pour nos discussions et les moments sympas passés au labo.

Un grand merci pour Jack qui n'a pas arrêté de m'appeler du Liban pour avoir de mes nouvelles et qui m'a suivi du début jusqu'à la fin de ma thèse (Merci Brother)

Lalousati "Mon frère Elie", mon petit ange, ta présence juste avant la soumission de mon manuscrit était un grand réconfort pour moi. D'habitude la fin de la rédaction est la phase la plus stressante pour un thésard, mais grâce à toi j'ai agréablement passé cette période !!

A la personne qui m'avait accompagné pendant cette thèse je dis que "TU ES TRES FORT". Même en étant à longue distance t'as pu être l'oreille qui m'écoutait, la bouche qui me

rassurait, la voix qui me guidait, l'épaule sur laquelle je pouvais me reposer, la main qui essuyait mes larmes, le cœur qui m'attendait. Karim....

Enfin Merci à mon pilier : "Sans vous je ne serais pas allée en France, sans vous je n'aurais pas pu embarquer pour cette aventure" Un énorme merci à mes parents, pour leur patience, leurs soutiens et encouragements. Merci Mama, Baba, Teta, Jedo et mes frères.

Maman ton anniversaire est le 28 Avril; ma soutenance de thèse aura lieu le 26 Avril. Accepte mon manuscrit de thèse comme cadeau pour ton anniversaire. J'espère qu'il sera à la hauteur de tes attentes.

Voilà, un chapitre de ma vie vient de se terminer !!

PREAMBULE

Le travail de thèse présenté dans ce mémoire a été réalisé dans le contexte d'un projet de recherche "GrabIron" financé par ANR (Agence national de la recherche, programme MIE 2009-2013). Il a été effectué au sein de l'équipe Génétique Microbienne et Environnement, UMR1319 Micalis, à l'INRA La Minière-Guyancourt, France et au laboratoire de Biotechnologie, Faculté des Sciences, à l'université Saint Joseph de Beyrouth, Liban. Une partie des travaux, et en particulier ceux concernant les rôles des sidérophores : bacillibactine et pétrobactine dans l'acquisition du fer de la ferritine et dans la virulence chez *Galleria mellonella* ont été pris en charge par le Post doctorant Diego Segond.

Au cours de ma thèse, nous avons mis en place une collaboration avec Monsieur Fadi Bou Abdallah à State University of New York, Potsdam aux Etats Unis. J'ai été accueillie en Février 2012 dans son laboratoire afin de réaliser trois mois de stage. Sous son encadrement, les tests d'ITC, de Stopped-Flow et certains résultats de spectrophotométrie d'UV-Vis ont été conduits.

Des tentatives d'analyses structurales sur la protéine IIsA ont été réalisées dans le cadre du projet GrabIron en collaboration avec Gwenaëlle André-Leroux à l'Institut Pasteur, Paris. Des expériences de filtration sur gel ainsi que des essais de cristallographie ont été menées sous sa direction.

RESUME

Mécanismes d'acquisition du fer chez *Bacillus cereus* : rôles d'IlsA, du système Isd et des sidérophores dans l'assimilation du fer à partir de l'hème et de la ferritine

Au cours des interactions hôte-pathogène, la lutte pour le fer peut conditionner l'évolution de l'infection. Afin de s'adapter à la faible quantité de fer libre présente chez l'hôte, les bactéries ont développé diverses stratégies leur permettant d'acquérir cet élément vital. Chez *Bacillus cereus*, une bactérie pathogène opportuniste de l'homme, la protéine IlsA (Iron-regulated leucine rich surface protein), qui contient entre autres des domaines NEAT et LRR, a été identifiée. Il s'agit d'une protéine de surface impliquée dans l'acquisition du fer des hémoprotéines et de la ferritine. Dans un premier temps, nous avons caractérisé la fonction d'IlsA et de son domaine NEAT ainsi que leur implication dans la liaison à l'hème et l'hémoglobine. Nos résultats indiquent qu'IlsA capte l'hème via son domaine NEAT avec une stœchiométrie 1:1 et que ce domaine est capable d'extraire l'hème de l'hémoglobine. Par ailleurs, l'interaction entre IlsA et IsdC, une des protéines du système Isd (Iron surface determinant) décrit chez d'autres bactéries à Gram-positif, a été analysée. Suite à un contact direct entre ces deux protéines, nous avons démontré que l'hème était transféré d'holo-IlsA vers apo-IsdC. Dans un second temps, nous avons étudié les mécanismes permettant l'assimilation du fer à partir de la ferritine. Nous avons ainsi montré qu'IlsA pouvait interagir avec plusieurs types de ferritine avec une stœchiométrie de 24 molécules d'IlsA pour une ferritine. Ceci suggère qu'IlsA se lie à chaque sous-unité de la ferritine. De plus, en présence de sidérophores, cette interaction conduit à une augmentation de la libération du fer contenu dans la ferritine. Finalement, une souche de *B. cereus* qui ne produit plus de bacillibactine, un des deux sidérophores synthétisés par cette bactérie, n'est plus capable d'utiliser la ferritine comme source de fer pour sa croissance. De plus, sa virulence chez l'insecte est atténuée. Ces données indiquent qu'IlsA et la bacillibactine sont toutes les deux impliquées dans l'acquisition du fer de la ferritine. Ces travaux mettent donc en évidence l'interaction qui existe entre IlsA et les protéines de surface d'une part et les sidérophores d'autre part. Ils apportent également de nouveaux éléments permettant de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation mis en œuvre chez l'hôte par *B. cereus*.

Mots clés : Fer, *Bacillus cereus*, IlsA, NEAT, IsdC, hème, hémoglobine, ferritine, sidérophore.

ABSTRACT

Mechanisms of iron acquisition in *Bacillus cereus*: roles of IIsA, the Isd system and the siderophores in iron assimilation from heme and ferritin

In host-pathogen interactions, the struggle for iron may have major consequences on the outcome of the disease. To overcome the limited iron bioavailability in the host, bacteria have developed several strategies to acquire iron during infection. In the human opportunistic bacteria *Bacillus cereus*, a particular NEAT-LRR domain protein named IIsA (Iron-regulated leucine rich surface protein) was previously identified as a surface protein involved in iron acquisition from both hemoproteins and ferritin. In this study, we characterized the function of IIsA and the IIsA-NEAT domain and their involvement in heme and hemoglobin binding. Our results show that IIsA binds heme via the NEAT domain with a 1:1 stoichiometry and that this domain is able to extract heme from hemoglobin. Furthermore, the dynamic interplay between IIsA and the *B.cereus* Isd system (Iron surface determinant) involved in heme acquisition in other Gram-positive bacteria has been investigated. Following direct protein-protein interaction, we observe a heme transfer from holo-IIsA to apo-IsdC.

The molecular basis of iron assimilation from host-ferritin by pathogens remains largely unknown. Here, we show that IIsA interacts directly with several forms of ferritins, causing ferritin accumulation on the bacterial surface, leading to an increase in iron release from the ferritin nanocages in the presence of siderophores. In addition, the binding stoichiometry of 24 IIsA for 1 ferritin evidence an interaction between IIsA and each subunit of the ferritin shell. Finally, a *B. cereus* strain disrupted in bacillibactin production was markedly affected both in ferritin acquisition and in virulence in an insect model, suggesting a possible partnership between siderophores and IIsA in iron uptake from ferritin. Taken together, the results of this study highlight the interplay between surface proteins and siderophores and provide new insight into host adaptation of *B. cereus*.

Key words: Iron, *Bacillus cereus*, IIsA, NEAT, IsdC, heme, hemoglobin, ferritins, siderophore.

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

INTRODUCTION

- Figure 1 : Bacille et spore
- Figure 2 : Structure de l'hème et de l'hémoglobine humaine.
- Figure 3 : Structure globale de la ferritine humaine, chaîne H.
- Figure 4 : Schéma du centre ferroxidase de la chaîne H de la ferritine
- Figure 5 : Vue globale de la disposition du système d'acquisition du fer chez les bactéries Gram-négatifs (A) et Gram-positifs (B).
- Figure 6 : Schéma du système fhu (ferric hydroxamate uptake) Chez *E. coli*.
- Figure 7 : Schéma des transporteurs des sidérophores chez *S. aureus*.
- Figure 8 : Les siderophores de *S. aureus*.
- Figure 9 : Représentation schématique du locus *isd* chez *S. aureus*.
- Figure 10 : Schéma représentatif des protéines de surface Isd chez *S. aureus*.
- Figure 11 : Modèle du mécanisme de transport de l'hème du milieu extracellulaire jusqu'au cytosol par l'intermédiaire du système Isd chez *S. aureus*.
- Figure 12A : Modèle structural du domaine NEAT de IsdC chez *S. aureus* représentant la poche de liaison à l'hème.
- Figure 12B : Structure du complexe IsdH-N1: hémoglobine humaine (Hb ayant les deux chaînes α et β).
- Figure 13 : Structure chimique des deux sidérophores: la bacillibactine et la pétrobactine.
- Figure 14 : Représentation schématique du locus *isd* de *B. anthracis*.
- Figure 15 : Modèle du mécanisme de transport de l'hème chez *B. anthracis*.
- Figure 16 : Alignement de l'hélice 3_{10} et sa région adjacente entre les protéines à domaine NEAT chez *B. anthracis*.
- Figure 17A : Représentation schématique des ORF autour du transporteur ABC (htsABC) de *Streptococcus Pyogenes*.
- Figure 17B : Schéma représentatif de la structure de la protéine Shr de *Streptococcus Pyogenes*.
- Figure 18 : Modèle du mécanisme de transport de l'hème chez *Streptococcus pyogenes*.
- Figure 19 : Voie de biosynthèse de la bacillibactine décrite chez *B. anthracis*.
- Figure 20 : Voie de biosynthèse de la petrobactine chez *B. anthracis*.
- Figure 21 : Modèle représentant les différents domaines de la protéine IIsA de *B. cereus*.

- Tableau 1** : Diversité de fonctions au sein des domaines NEAT des protéines Isd de *S. aureus*.
- Tableau 2** : Constantes de vitesse du transfert de l'hème entre les différentes protéines Isd chez *S. aureus*.
- Tableau 3** : Différents gènes de *B. anthracis* impliqués dans l'acquisition du fer.
- Tableau 4** : Diversité de fonctions au sein des domaines NEAT de *B. anthracis*.

OBJECTIFS DU PROJET DE THESE

- Figure 22** : Représentation schématique du locus *isd* chez *B. cereus*.
- Figure 23** : Schéma du modèle de travail : transfert de l'hème et du fer de la ferritine via IIsA et des partenaires putatifs.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

- Figure 24** : Effet de la tétracycline sur la croissance du mutant *ilsA* en présence de l'hème comme source unique de fer.
- Figure 25** : Index de croissance du mutant *Bc4548* en milieu carencé en fer ou bien supplémenté soit par l'hème (16.5 µM) ou l'hémoglobine (2 µM).
- Figure 26** : Index de croissance de $\Delta Bc4547$ et du double mutant $\Delta\Delta Bc4547Bc4549$ en présence des sources uniques de fer: l'hème (16.5 µM) et l'hémoglobine (2 µM).
- Figure 27** : Mesures spectrophotométriques des protéines IIsA, IIsA^{NEAT} et IsdC purifiées dans la souche *E. coli* C600 $\Delta hema$.
- Figure 28** : (A) SDS/ PAGE de la protéine IIsA.
(B) Spectre après passage sur gel filtration
- Figure 29** : ITC entre la ferritine humaine homopolymère H et IIsA chargée par l'hème exogène.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BB	Bacillibactine
Bfd	Bacterioferredoxine
BsIK	<i>B. anthracis</i> S-layer protein K
cyt K	cytotoxine K
DFO	Désferrioxamine
DHB	Dihydroxybenzoate
Dip	Dipyridyl
DL ₅₀	Dose léthale 50
DPs	DNA-binding proteins from starved cells
DtxR	Diphtheria Toxin regulator
Ent	Entérobactine
Fhu	ferric hydroxamate uptake
FMN	Flavin Mononucleotide
Fur	Ferric uptake regulator
<i>G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i>
GAS	Group A streptococcus
GST	Glutathione S-Transferase
Hal	Heme-acquisition leucine-rich repeat protein
Hap	Haptoglobine
Hb	Hémoglobine
Hbl	Hémolysine B1
HlyII	Hémolysine II
HtsABC	Heme ABC type transporter
IlsA	Iron regulated leucine- rich surface protein
Inl	Internaline
IR	Interrepeat region
Isd	Iron surface determinant
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
IVET	<i>In Vivo</i> Expression Technology
K _d	Constante de dissociation
K _f	Constante d'affinité
kDa	kilodalton

LB	Luria-Bertani broth
LRR	Leucine Rich Repeat
MEK	Methyl Ethyl Ketone
NEAT	Near Iron Transporter
NHE	Entérotoxine non hémolytique
NIS	NRPS-independent synthase
NRPS	Nonribosomal peptide synthetases
NTD	N-terminal domain
ORF	Open reading frame
PB	Pétribactine
PCR	Polymerase Chain Reaction
SA	Staphyloferrine A
SB	Staphyloferrine B
SDS/PAGE	SDS/ Polyacrylamide gel electrophoresis
Shp	Streptoccal hemoprotein protein
Shr	Streptoccal hemoprotein receptor
SLH	S-layer homology
SrtB	Sortase B
SvpA	Surface virulence-associated protein
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
Tn-10	Tétracycline 10
UV-Vis	Ultraviolet-Visible

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
Chapitre I- <i>Bacillus cereus</i>, Généralités et Virulence.....	2
1. Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	2
2. <i>Bacillus cereus sensu stricto</i>	3
3. Les facteurs de virulence communs du groupe <i>B. cereus</i>	4
3.1. Les entérotoxines	4
3.2. Les phospholipases, les hémolysines et les protéases	5
4. Régulation de l'expression des toxines chez <i>B. cereus sensu lato</i>	5
Chapitre II- Sources de fer présentes chez l'hôte.....	7
1. Introduction	7
2. Sources de fer présentes chez l'hôte	8
2.1. L'hème	8
2.2. L'hémoglobine	8
2.3. La transferrine	9
3. La ferritine.....	9
3.1. Structure et caractéristiques des ferritines	9
3.2. Les ferritines bactériennes	10
3.3. Oxydation et minéralisation du Fer	11
3.4. Libération du fer de la ferritine	11
3.4.1. Déplacement des sous-unités	12
3.4.2. Diffusion des molécules via les canaux de type 3	12
3.4.3. Les pores.....	12
3.4.4. Le transfert des électrons à travers la coque de la protéine.....	13
3.4.5. La libération du fer de la ferritine par des processus non réducteurs	13
3.4.6. La libération du fer <i>in vivo</i>	13
Chapitre III- Systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries.....	15
1. Systèmes d'acquisition de fer chez les bactéries à Gram négatif	15
1.1. Systèmes d'acquisition indirecte	15
1.2. Systèmes d'acquisition directe	16
2. Systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram-positif	17

2.1. Principaux systèmes d'acquisition chez <i>S. aureus</i>	17
2.1.1. Les sidérophores de <i>S. aureus</i>	18
2.1.1.a. Le système Fhu	18
2.1.1.b. Les systèmes HtsABC et SirABC	18
2.1.2. Acquisition de l'hème : le système Isd	19
2.1.2.a. Description du système Isd	19
2.1.2.b. Mécanisme de transport de l'hème via le système Isd	20
2.1.2.c. Rôle du système Isd dans l'acquisition de l'hème et dans la virulence	21
2.1.3. Structure du domaine NEAT	22
2.1.4. Système FepABC	23
2.2. Principaux systèmes d'acquisition du fer chez <i>B. anthracis</i>	23
2.2.1. Les sidérophores de <i>B. anthracis</i>	24
2.2.1.a. Généralités sur la structure et l'affinité pour le fer des sidérophores de <i>B. anthracis</i>	24
2.2.1.b. Voie de synthèse et rôle des sidérophores de <i>B. anthracis</i>	25
2.2.2. Le système Isd : un réseau dynamique pour l'acquisition de l'hème	26
2.2.3. Autres portéines à domaine NEAT chez <i>B. anthracis</i> : BslK et Hal	27
2.2.4. Transfert de l'hème à travers la paroi et la membrane bactérienne	28
2.2.5. Rôle du système Isd dans la virulence de <i>B. anthracis</i>	28
2.2.6. IsdX1 : une protéine multifonctionnelle	29
2.3. Systèmes d'acquisition du fer chez <i>Listeria monocytogenes</i>	29
2.4. Système d'acquisition du fer chez <i>Streptococcus pyogenes</i>	30
2.5. Systèmes d'acquisition du fer chez <i>Bacillus cereus</i>	32
2.5.1. Sources de fer utilisées par <i>B. cereus</i>	32
2.5.2. Les sidérophores chez <i>B. cereus</i>	32
2.5.3. Autres systèmes impliqués dans l'acquisition du fer	33
2.5.4. IIsA : une nouvelle protéine impliquée dans l'acquisition du fer	33
3. Régulation de l'acquisition du fer chez les bactéries	34

OBJECTIFS DU PROJET DE LA THESE..... 36

1. Cadre du sujet de la thèse	37
1.1. Objectifs principaux de la thèse	37
1.2. Situation du sujet et objectifs détaillés	38
1.2.1. IIsA et ses partenaires dans le transport du fer	38
1.2.1a. IIsA et le transport de l'hème	38
1.2.1b. IIsA et la ferritine : interaction, libération et transport du fer	39

2. Approches et stratégies de travail	39
2.1. Phénotype des gènes <i>isd</i> , du locus entier et des sidérophores dans l'acquisition des hémoprotéines et la ferritine.....	39
2.2. Rôles du système Isd et des sidérophores dans la virulence.....	40
2.3. Transfert de l'hème de la protéine IIsA à IsdC.....	41
2.3.1. Principe du Stopped-Flow	41
2.3.2. Chromatographie d'affinité	42
2.4. ITC : principe et méthode	42
RÉSULTATS.....	44
Article 1: The heme interplay between IIsA and IsdC, two structurally different surface proteins of <i>Bacillus cereus</i>	46
Article 2: <i>Bacillus cereus</i> grabs iron from ferritin using IIsA as a ferritin receptor and bacillibactin as an iron carrier.....	47
RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....	48
1. Phénotype du mutant <i>ilsA</i> dans l'acquisition de l'hème et l'hémoglobine : effet de la cassette tétracycline Tn-10 et la tétracycline.....	49
2. Phénotypes des mutants des gènes <i>Bc4548</i> , <i>Bc4547</i> et le double mutant <i>Bc4549 Bc4547</i>	49
3. Approches différentes pour la purification des protéines IIsA et IsdC sous forme apo (sans hème)	50
4. Approches pour la cristallographie de la protéine IIsA	50
5. Les tests d'ITC avec la protéine holo-IIsA (chargée par l'hème exogène).....	51
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	52
1. IIsA et hémoprotéines.....	53
1.1. IIsA : Rôles du domaine NEAT dans la liaison à l'hème et à l'hémoglobine	53
1.2. Rôle de l'opéron <i>isd</i> dans l'acquisition de l'hème et de l'hémoglobine et dans la virulence chez l'insecte modèle <i>G. mellonella</i>	56
1.3. IIsA et IsdC : deux partenaires pour le transport de l'hème	58
2. IIsA et la ferritine.....	59
2.1. IIsA : Interaction avec les ferritines recombinantes et libération du fer de la ferritine	60
2.2. IIsA et ses partenaires dans l'acquisition du fer de la ferritine.....	61

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	62
ANNEXE.....	62
Annexe 1. Tableau des amorces utilisées dans la partie résultat complémentaire.....	84
Annexe 2 : Alignement du domaine NEAT d'Isa avec la plupart des domaines NEAT trouvés chez les bactéries à Gram-positif.....	84
Annexe 3.....	87
Annexe 4 : Alignement de la région Lip et son entourage entourage de IsdB-N2, IsdB-N1, IsdH-N1, IsdH-N2 et IsdH-N3 (Sa), Isa-N (Bc) et IsdX1-N(Ba).....	88
Annexe 5 : Modélisation du domaine NEAT d'Isa par homologie ave le domaine NEAT-5 d'IsdX2 de <i>Bacillus anthracis</i>	88

Introduction

Chapitre I- *Bacillus cereus*, Généralités et Virulence

1. Le groupe *Bacillus cereus*

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato*, est composé de sept espèces taxonomiquement très proches : *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoïdes*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus cytotoxicus* (83, 123, 163, 202, 277). Ce sont des bacilles à coloration de Gram– positive produisant des endospores (Figure 1), mobiles grâce à une ciliature péritriche ou immobiles. *Bacillus cereus sensu stricto* communément appelé *B. cereus*, est un agent pathogène opportuniste infectant les mammifères et les insectes, ubiquiste associé à plusieurs types d'infections et de maladies chez l'homme (cf. §2) (31, 83).

Dans les industries agroalimentaires, *B. cereus* et *B. weihenstephanensis* sont deux espèces principalement impliquées dans l'altération des aliments. Elles peuvent facilement contaminer les matières premières aussi bien que les équipements, y compris les matériaux utilisés dans les industries laitières et en papeterie (83, 87, 155, 193, 218, 261).

B. anthracis est l'agent responsable de la maladie du charbon (ou anthrax) chez les mammifères, notamment chez l'homme. Son pouvoir pathogène repose sur la présence de deux plasmides pXO1 et pXO2. pXO1 porte les gènes codant un complexe de trois protéines qui constituent les toxines secrétées par *B. anthracis* (26). Alors que pXO2 code des enzymes impliquées dans la synthèse des acides poly– D glutamiques de la capsule conférant à la bactérie la capacité de s'échapper des macrophages (42, 44, 199).

B. thuringiensis est un agent entomopathogène. Sa capacité à infecter les invertébrés est principalement liée à la production d'inclusions protéiques cristallines parasporales (Figure 1), formées de toxines appartenant à la famille des δ -endotoxines et appelées toxines Cry (10, 235). Il a été fréquemment admis que la présence des cristaux constitue la seule caractéristique phénotypique permettant de distinguer un *B. thuringiensis* d'un *B. cereus sensu stricto*. Les gènes codant les toxines Cry sont communément localisés sur des plasmides transférables (116). La souche *B. thuringiensis* ayant perdu le plasmide portant ces gènes sera alors considérée comme un *B. cereus* alors que dans le cas d'un transfert d'un tel plasmide d'une souche de *B.thuringiensis* vers une souche de *B. cereus sensu stricto*, cette dernière s'apparentera à un *B.thuringiensis*. Certaines souches de *B. thuringiensis* sont largement utilisées en agriculture

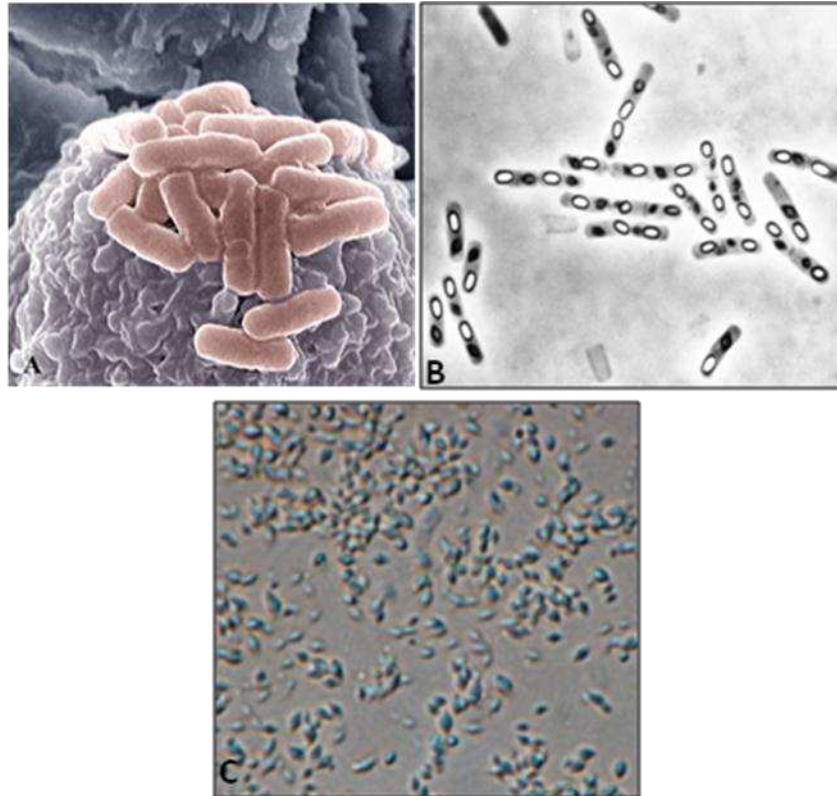


Figure 1 : Bacille et spore

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

B. Stade sporulé de *B. thuringiensis*. Spore (en blanc) et cristaux (en noir)

C. Cristaux isolés (en bleu)

comme agent de lutte biologique. Ainsi, 90 % des biopesticides employés dans le monde sont produits à partir de quelques souches de *B. thuringiensis* (160, 235). De plus, à l'instar de *B. cereus*, *B. thuringiensis* peut produire plusieurs facteurs de virulence tels que la phospholipase C, des hémolysines ou encore des entérotoxines. Certaines souches de *B. thuringiensis* sont donc potentiellement pathogènes et plusieurs cas d'infections sporadiques mais parfois sévères pour l'homme ont été rapportés (73, 110, 125, 141, 213, 244, 293).

B. mycoïdes et *B. pseudomycoïdes* sont deux espèces ubiquitaires trouvées dans le sol et l'eau. Au sein de chacune de ces deux espèces, des souches toxigènes, possédant un pouvoir pathogène ont été identifiées (21, 132, 137, 221, 299). Comme *B. thuringiensis*, *B. mycoïdes* peut produire un métabolite de faible poids moléculaire possédant des propriétés insecticides (131).

B. weihenstephanensis regroupe une grande partie des souches psychrotrophes, capables de se développer à des températures inférieures à 7°C et d'infecter les insectes à basse température (260).

2. *Bacillus cereus sensu stricto*

B. cereus est une bactérie fréquemment retrouvée comme contaminant alimentaire. Elle a été détectée dans plusieurs catégories de produits : céréales, épices, légumes, produits carnés et produits laitiers (46). *B. cereus* représente la quatrième cause de toxi-infections alimentaires (TIAC) en France, après *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, et *Clostridium perfringens*. En 2008, plus de 80 foyers de TIAC à *B. cereus* ont été recensés, un chiffre annuel en constante augmentation. *B. cereus* est notamment responsable de deux types d'intoxications alimentaires, une intoxication émétique et une intoxication diarrhéique.

- L'intoxication émétique survient rapidement, 1 à 5 h après l'ingestion des aliments contaminés, suggérant que la production de la toxine a lieu au sein de l'aliment. Un petit peptide cyclique, le céréulide, est la toxine responsable des symptômes émétiques. Il s'agit d'un dodécadepsipeptide fortement hydrophobe, extrêmement stable à haute température (121 °C) et pouvant persister après la disparition des bactéries (117). Le céréulide est synthétisé par un complexe enzymatique via des peptides synthétases non ribosomales (88). Les gènes responsables de sa synthèse sont localisés sur un méga-plasmide, pCER270 (270 Kb) (86).

- L'intoxication diarrhéique se déclenche 8 à 16 heures après la consommation d'un aliment contaminé (117). Elle est caractérisée par une diarrhée abondante accompagnée de

crampes intestinales. Les trois entérotoxines supposées être responsables de cette intoxication seront décrites ultérieurement (cf. §3.1). La longue durée d'apparition des symptômes indique que ces toxines sont produites lors de la croissance de *B. cereus* dans l'intestin grêle.

Par ailleurs, en plus des toxi-infections alimentaires, *B. cereus* peut être responsable d'infections sévères chez les patients immunodéprimés. Ces infections sont soit locales, soit systémiques. Les infections locales se manifestent souvent par des parodontites et des endophtalmies. Parmi les infections systémiques, *B. cereus* peut engendrer occasionnellement des septicémies, des pneumonies, des méningites et des endocardites, souvent après une intervention chirurgicale ou après l'apposition d'une valvule prothétique (31).

3. Les facteurs de virulence communs du groupe *B. cereus*

En plus des facteurs de virulence spécifiques à chacune des espèces *B. anthracis*, *B. thuringiensis* et *B. cereus*, des facteurs communs impliqués dans le pouvoir pathogène de ces bactéries ont été décrits. Il s'agit principalement d'entérotoxines et d'enzymes dégradatives.

3.1. Les entérotoxines

Trois entérotoxines sont généralement associées aux intoxications diarrhéiques : l'hémolysine BI (Hbl), l'entérotoxine non hémolytique (NHE) et la cytotoxine K (cyt K).

- L'hémolysine HBL est un complexe formé de trois composantes : une sous-unité B permettant à la toxine de se lier à la cellule cible et deux protéines lytiques L1 et L2 (22). En plus de son rôle entérotoxique, HBL possède des effets dermonécrotiques et une activité hémolytique (23, 24)
- L'entérotoxine non hémolytique NHE est, comme HBL, une entérotoxine tripartite (183). De même, elle présente des activités cytotoxiques mais non hémolytiques. Cependant, des similarités structurales remarquables entre les sous-unités de HBL et NHE ont été observées (184).
- Cyt K a été isolée à partir d'une souche clinique de *B. cereus* impliquée dans des empoisonnements alimentaires graves en France en 1998. Cette souche ne possède pas les autres gènes d'entérotoxines, et elle constitue à présent la nouvelle espèce *B. cytotoxicus* (123). Cette toxine est dermonécrotique et fortement hémolytique contre les érythrocytes du bœuf et du lapin (182).

3.2. Les phospholipases, les hémolysines et les protéases

B. cereus se caractérise par la production de trois phospholipases de spécificités différentes: la phospholipase C, la sphingomyélinase et la phosphatidylinositol phospholipase (158, 162). Alors que les hémolysines forment des pores conduisant à la lyse des cellules, les phospholipases déclenchent cette lyse grâce à leurs activités enzymatiques.

Les hémolysines les mieux caractérisées chez *B. cereus* sont :

- la céréolysine AB, formée par l'association de la phospholipase C et la sphingomyélinase. Ces deux phospholipases agissent de concert, induisant une activité hémolytique, notamment sur les érythrocytes humains (112).
- l'hémolysine II (HlyII) qui possède des propriétés lytiques sur différents types d'érythrocytes, appartenant à différentes espèces de mammifères (273).

En outre, de nombreuses protéases ont été identifiées chez *B. cereus*. On peut notamment citer les métalloprotéases à zinc InhA1, InhA2 et InhA3. InhA1 permet aux spores de *B. cereus* d'échapper à la phagocytose par les macrophages (222). Il a été démontré qu'InhA2 jouait un rôle important dans la virulence chez l'insecte modèle *Galleria mellonella* suite à une infection par voie orale et qu'InhA3 était particulièrement importante lors d'une infection intra-hémocoelique (94, 122). D'autres protéases telles que NprB et NprA ont également été détectées chez *B. cereus* (114, 115).

4. Régulation de l'expression des toxines chez *B. cereus sensu lato*

L'expression d'un grand nombre de facteurs de virulence sécrétés chez *B. cereus* est régulée par un système de quorum sensing impliquant le régulateur transcriptionnel pléiotrope PlcR. Ce dernier est exprimé en début de phase stationnaire (2, 168). PlcR est activé par PapR, un petit peptide sécrété, mûré dans le milieu extracellulaire, puis importé à l'intérieur de la bactérie où il interagit avec PlcR, permettant ainsi la fixation de ce dernier à un motif conservé (boîte PlcR) et l'activation du régulon PlcR (36, 254). Il a été démontré que PlcR jouait un rôle crucial dans la virulence de *B. cereus* et *B. thuringiensis*. En effet, la virulence d'un mutant $\Delta plcR$ est fortement réduite chez l'insecte modèle *G. mellonella*, la souris (228) et le lapin (41). Néanmoins, la délétion de *plcR* n'abolit pas complètement la virulence de *B. cereus* (228), ce qui suggère l'existence d'autres facteurs non régulés par PlcR et impliqués dans la pathogénicité de ces bactéries. Par exemple, on peut citer la toxine HlyII, les métalloprotéases InhA1 et InhA3

ainsi que les facteurs identifiés par l'utilisation d'un système IVET (*In Vivo* Expression Technology).

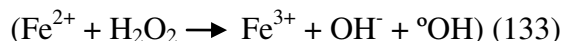
La méthode IVET permet d'identifier des promoteurs activés dans des conditions particulières. Ainsi, au cours d'un criblage chez l'insecte *Galleria mellonella*, plusieurs facteurs de la souche *B. cereus* ATCC14579 impliqués dans la virulence et l'adaptation chez l'hôte ont été identifiés (93). Parmi ces facteurs, une protéine de surface impliquée dans l'acquisition du fer chez l'hôte a été trouvée; cette protéine appelée "IlsA" constitue la base de ce projet de thèse.

La suite de l'introduction sera ainsi focalisée sur différents aspects en lien avec les sources de fer chez l'hôte (Chapitre II) et sur les mécanismes impliqués dans l'acquisition du fer chez les bactéries pathogènes (Chapitre III). Les systèmes propres à *B. cereus* seront abordés en fin de la partie introduction.

Chapitre II- Sources de fer présentes chez l'hôte

1. Introduction

Le fer est le quatrième élément le plus abondant de la croûte terrestre. Il est essentiel pour pratiquement tous les êtres vivants. Etant un cofacteur de nombreuses enzymes intervenant dans les transferts d'électrons, le fer est impliqué dans de multiples processus biologiques fondamentaux tels que la réplication de l'ADN, la synthèse d'acides aminés ou la respiration mitochondriale (8, 283). Le fer ferrique (Fe^{3+}) sous sa forme libre est peu soluble. Il précipite irréversiblement sous forme d'hydroxydes ferriques, ce qui le rend très peu disponible pour les êtres vivants (223). Sous sa forme réduite (Fe^{2+}), le fer ferreux participe via la réaction de Fenton :



à la formation de radicaux libres (124) extrêmement toxiques pour les cellules.

Le corps humain contient environ 4 g de fer, dont la majorité est complexée à des protéines de transport (263). Environ 75 % du fer intracellulaire est incorporé dans le noyau protoporphyrinique de l'hème, qui permet notamment le transport de l'oxygène en étant associé à l'hémoglobine (Hb). L'hème est également présent comme groupement prosthétique dans la myoglobine et certaines enzymes (263). Dans le milieu extracellulaire, le fer est lié à la transferrine et la lactoferrine, présentes respectivement dans le sérum sanguin et les sécrétions mucosales. L'hémopoxine et l'albumine sont deux protéines circulantes qui participent à la détoxification du sang en chélatant l'hème libre, généralement très toxique. De même, l'hémoglobine extracellulaire libre peut être nuisible, elle est alors prise en charge par l'haptoglobine. Finalement, les complexes hémopoxine-hème et hémoglobine-haptoglobine seront recyclés dans le foie (206). En cas d'excès, le fer sera stocké dans la ferritine, la protéine majeure de stockage du fer chez la plupart des organismes vivants.

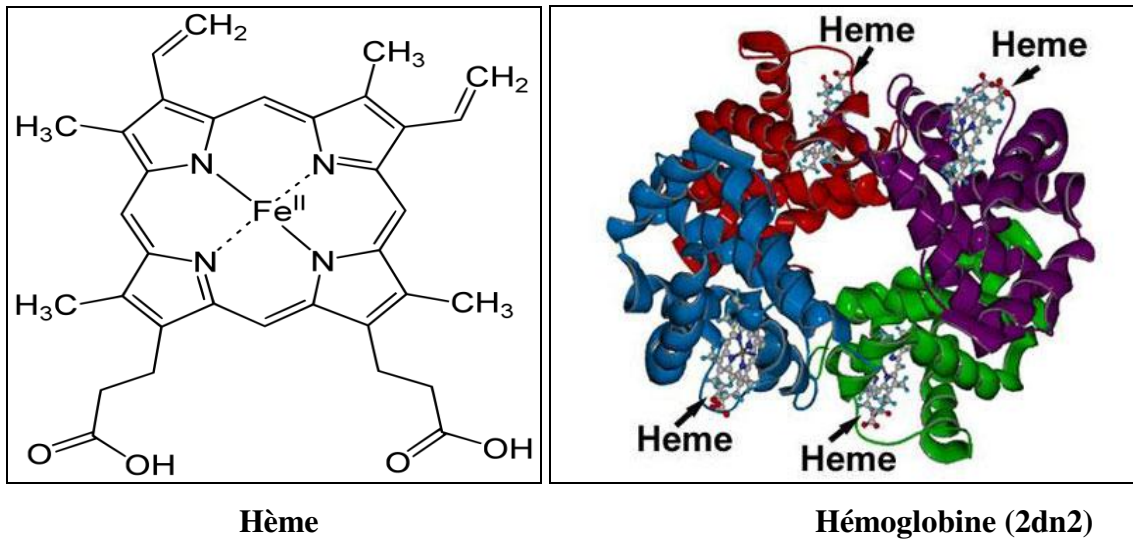


Figure 2 : Structure de l'hème et de l'hémoglobine humaine

L'hème est une association d'une protoporphyrine IX et d'un atome de fer.

L'hémoglobine est formée de deux chaînes α et de deux chaînes β de globines dont chacune est liée 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>), PDB : 2dn2

2. Sources de fer présentes chez l'hôte

2.1. L'hème

L'hème est composé d'un atome de fer ferreux (Fe^{2+}) lié au noyau tétrapyrrole de la protoporphyrine IX. La forme oxydée (Fe^{3+}) est connue sous le nom d'hémine. Toutefois, les deux formes sont communément appelées hème (Figure 2). En tant que groupement prosthétique de nombreuses protéines, l'hème joue des rôles primordiaux dans plusieurs processus biologiques vitaux. Il est impliqué dans le stockage et le transport de l'oxygène (via l'hémoglobine et la myoglobine) et dans la respiration et le transport d'électrons (cytochromes). Dans les catalases, il sert à transformer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène. Dans les peroxydases, il catalyse l'oxydation des substrats en présence du H_2O_2 . En plus de représenter une source de fer non négligeable, l'hème fournit également des noyaux protoporphyriniques aux bactéries qui ne peuvent pas synthétiser cette molécule.

L'hème est une molécule lipophile de faible poids moléculaire (616,48 Da) qui peut s'insérer dans les membranes menant à une destruction des bicouches lipidiques ainsi que des organites tels que les mitochondries et les noyaux (227). De plus, l'accumulation d'hème dans les cellules provoque des dommages au niveau cellulaire, un stress oxydatif et des lésions tissulaires (142, 279). Par conséquent, dès que les hémoprotéines présentes dans le milieu extracellulaire sont dégradées, l'hème libéré est tout de suite capté par l'hémopexine ($K_d = 10^{-12}$ M) (310) et l'albumine du sérum ($K_d \sim 10^{-8}$ M). Grâce à leur capacité à chélater l'hème, ces protéines permettent de maintenir une concentration en hème libre très faible (111).

2.2. L'hémoglobine

L'hémoglobine se trouve essentiellement à l'intérieur des globules rouges. Sa principale fonction est de transporter le dioxygène dans l'organisme. L'hémoglobine est un tétramère formé de quatre chaînes, identiques deux à deux : deux chaînes de globine α et deux chaînes de globine β . Chacun de ces monomères, de masse moléculaire de 16 kDa, est associé à une molécule d'hème et chaque hème renferme un atome de fer constituant le site actif de liaison à l'oxygène (Figure 2).

Suite à une hémolyse, l'hémoglobine contenue dans les érythrocytes est libérée dans le sérum, puis elle est rapidement complexée par l'haptoglobine, une glycoprotéine du plasma sanguin ayant une forte affinité pour l'hémoglobine.

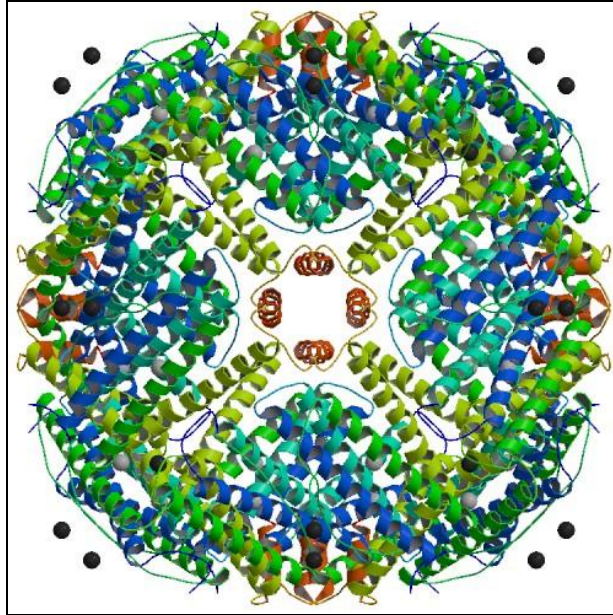


Figure 3 : Structure globale de la ferritine humaine, chaîne H.

La structure de la ferritine H humaine est trouvée dans les bases de données des protéines (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), PDB : 1FHA

2.3. La transferrine

La transferrine appartient à une famille de protéines qui joue un rôle critique dans l'homéostasie du fer. C'est une protéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique d'environ 680 acides aminés, avec une masse moléculaire de 80 kDa. Des études structurales ont montré que la transferrine est formée de deux lobes homologues appelés N et C (127). Chaque lobe renferme un site de liaison à un atome de fer.

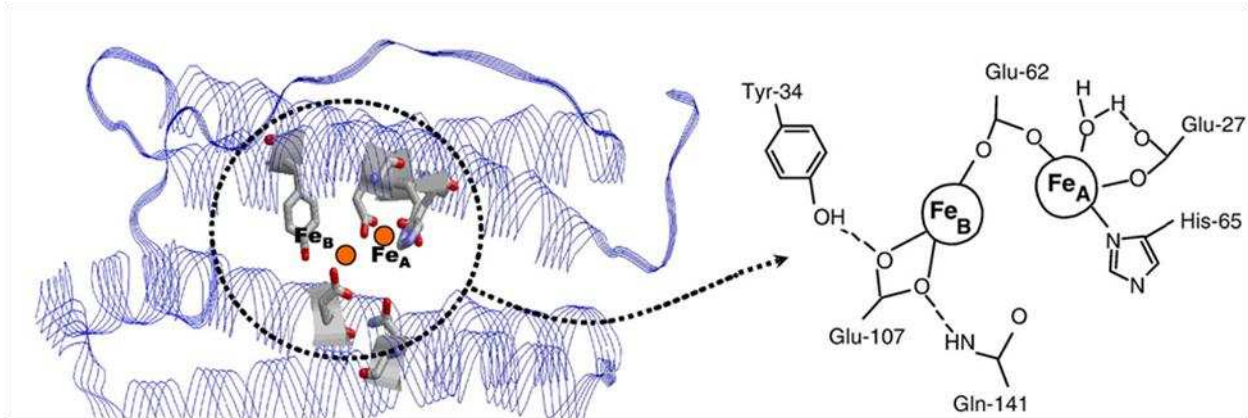
La transferrine est une protéine circulant dans le sérum sanguin qui permet le transport du fer vers les cellules et procure une certaine protection contre l'excès de fer libre en limitant sa concentration. Dans des conditions physiologiques normales, la transferrine n'est pas complètement saturée en fer. Ainsi, quand la concentration en fer augmente dans le sang ou dans les autres milieux extracellulaires, cette protéine peut lier le fer libre.

3. La ferritine

A cause de sa faible solubilité et de sa toxicité, le fer n'est que très rarement retrouvé sous sa forme libre au pH physiologique. Par conséquent, les organismes vivants ont développé divers mécanismes pour assurer l'acquisition et le stockage du fer. Afin de protéger les cellules des effets néfastes du fer libre, la ferritine joue un rôle important dans le stockage et la détoxification du fer. Les ferritines font partie d'une famille de supramolécules fortement conservées, capables de piéger des milliers d'atomes de fer qui seront mobilisables par la suite pour les besoins de la cellule.

3.1. Structure et caractéristiques des ferritines

Les structures de nombreuses ferritines isolées à partir de différents tissus biologiques et de ferritines recombinantes ont été largement étudiées et révèlent une architecture commune. Ainsi, les ferritines sont des molécules sphériques creuses d'environ 12 nm de diamètre formées par l'assemblage de 24 sous-unités (98). La coque protéique entoure une cavité d'un diamètre de 8 nm dans laquelle peuvent être stockés jusqu'à 4500 atomes de fer (Figure 3). Le fer va transiter par des canaux se trouvant à la surface de la ferritine pour entrer et sortir de la cavité (82, 266). Il existe ainsi des ferritines de la famille I composées de 8 canaux hydrophiles de type 3 et des ferritines de la famille II formées de 6 canaux hydrophobes de type 4 localisés respectivement à l'intersection de 3 et 4 sous-unités.



Le centre de la ferroxidase

Figure 4 : Schéma du centre ferroxidase de la chaîne H de la ferritine

A droite la structure du centre dinucléaire de la ferroxidase.

(Représentée dans Bou Abdallah, F., BBA, 2010.)

Chez les mammifères, deux types de sous-unités codées par différents gènes existent. Elles sont fonctionnellement différentes et sont appelées chaîne H (Heavy ou Heart ~ 21 kDa) et chaîne L (Light ou Liver ~ 19 kDa) (12). Ces deux types de sous-unités partagent 55 % d'identité au niveau protéique et elles sont structurellement très proches (37). En outre, le ratio chaîne H / chaîne L au sein d'une molécule de ferritine dépend de nombreux paramètres tels que l'organe à partir duquel la ferritine a été isolée (37). La ferritine isolée à partir du foie, un organe particulièrement riche en fer, est principalement composée de chaînes L alors que dans le cœur et le cerveau, la ferritine est majoritairement constituée de chaînes H (82, 266). La sous-unité L contribue à la nucléation et la minéralisation du fer (33, 51, 129, 269). La sous-unité H contient deux sites de fixation pour le Fe^{2+} (sites A et B) et possède un centre ferroxidase (Figure 4) où les ions Fe^{2+} sont oxydés en Fe^{3+} par l'oxygène ou le peroxyde d'hydrogène (35, 129, 238). La ferritine est une molécule remarquablement stable aux hautes températures et au changement de pH. En effet, elle supporte des températures supérieures à 70 °C et des pH extrêmes allant de 3 jusqu'à 10 (189). A un pH inférieur à 3, les 24 sous-unités se dissocient mais peuvent réversiblement se réassembler lorsque le pH augmente (189).

3.2. Les ferritines bactériennes

Chez les bactéries, il existe au moins trois types de protéines appartenant à la famille des ferritines et jouant un rôle dans le stockage du fer (8) :

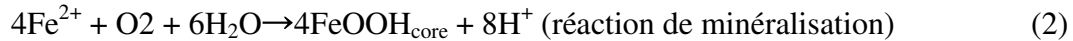
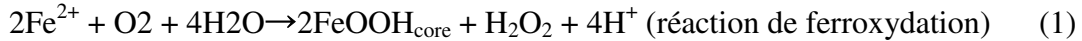
- les ferritines de type eucaryote qui sont des homopolymères constitués de 24 sous-unités de type H.
- les bactérioferritines formées de 24 sous-unités identiques de type H et d'environ 12 molécules d'hème ayant une fonction inconnue (300). Chez *E. coli*, ces dernières s'intercalent entre deux sous-unités et sont liées de façon covalente.
- les protéines Dps identifiées uniquement (8, 300) chez les procaryotes. Ces protéines sont plus petites (~ 250 kDa) que la ferritine (~ 500 kDa). Elles sont constituées de 12 chaînes similaires et peuvent stocker environ 500 atomes de fer (140).

Certaines bactéries sont capables de synthétiser ces trois types de ferritine. Les mécanismes de liaison et d'oxydation du fer sont spécifiques de chaque type de ferritine. Ainsi, dans le cas des ferritines et des bactérioferritines, la réaction de ferroxidation a lieu au niveau de résidus

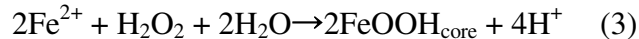
conservés localisés dans la chaîne H alors que pour les protéines Dps, l'oxydation du fer se fait à l'interface entre deux sous-unités (140).

3.3. Oxydation et minéralisation du Fer

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'oxydation et l'incorporation du fer au sein de la ferritine, de nombreuses études *in vitro* ont été effectuées (32, 34, 35, 200, 214, 274, 307). Les ions Fe^{2+} se fixent au niveau des sites catalytiques de la protéine où ils sont oxydés en Fe^{3+} avant d'être déplacés à l'intérieur de la cavité de la ferritine. Un noyau stable constitué d'un minéral cristallin (ferrihydrite) commence alors à se former. Ces réactions peuvent être représentées comme suit (52, 129, 174, 181) :



Récemment une troisième réaction a été identifiée (306). Le peroxyde d'hydrogène produit dans la réaction (1) est ainsi utilisé tel que :



3.4. Libération du fer de la ferritine

Certaines méthodes utilisées pour observer la libération du fer de la ferritine *in vitro* nécessitent la présence d'agents réducteurs et de molécules chélatrices. Le mécanisme de libération du fer constitue alors un processus qui a lieu en deux étapes : une réduction du fer suivie par une chélation des ions Fe^{2+} .



Néanmoins, d'autres mécanismes de mobilisation du fer sans réduction ont également été proposés (290).

Différents modèles de libération du fer ont été testés. Ainsi, ces différents travaux ont fourni un aperçu sur les mécanismes de libération du fer et sur les moyens par lesquels les ions seront transportés à travers de la coque de la ferritine. Par ailleurs, *in vivo*, chaque modèle fonctionne selon les conditions qui existent dans les cellules.

3.4.1. Déplacement des sous-unités

En 1993, Massover a mis en évidence la capacité de certains réactifs d'accéder à l'intérieur de la coque de la ferritine (138). Dans cette étude, l'analyse en microscopie électronique révèle que la structure de la ferritine est altérée, ce qui suggère des perturbations au niveau de ses sous-unités. Néanmoins, la forte stabilité de la ferritine vis-à-vis des températures élevées, des dénaturants et des pH extrêmes ne soutient pas cette hypothèse. En revanche, l'existence de l'hémosidérine, une molécule issue de la dégradation de la ferritine, constitue un argument en faveur de ce modèle. Certains signaux pourraient ainsi induire un déplacement des sous-unités conduisant à la formation de l'hémosidérine (9).

3.4.2. Diffusion des molécules via les canaux de type 3

Des études structurales ont mis en évidence le rôle que pourraient jouer les canaux de type 3 et de type 4 dans l'entrée des molécules à l'intérieur de la ferritine (98). Actuellement, il est admis que les canaux de type 3 sont les principales portes d'entrée et de sortie du fer dans la ferritine (286). Ainsi, il a été suggéré que les agents réducteurs et les molécules chélatrices peuvent diffuser à l'intérieur de la ferritine où ils agissent en réduisant et chélatant le fer via un contact direct. L'utilisation du réducteur FMN (flavine mononucléotide) seule ou complexée à un polymère a permis de distinguer deux phénomènes. Avec la FMN seule, le fer est rapidement libéré, probablement à cause de la diffusion de l'agent réducteur à l'intérieur de la ferritine. Par contre, la FMN liée au polymère était incapable de mobiliser le fer, ceci étant certainement dû à son incapacité à rentrer à l'intérieur de la molécule (145).

3.4.3. Les pores

En limitant l'accès au fer, la coque de la ferritine constitue une barrière protectrice et possède donc des fonctions similaires à celles des membranes cellulaires. Les canaux et les pores permettent aux ions de franchir les membranes. Des études récentes ont montré que des molécules de taille supérieure à 0.4 nm pouvaient traverser la coque de la ferritine (270). De plus, des mutations de certains résidus très conservés localisés à proximité des canaux de type 3 provoquent l'ouverture des pores de la ferritine et induisent une augmentation significative de la libération du fer (144). Par ailleurs, les canaux de type 3 peuvent s'ouvrir et se fermer sous l'effet d'agents chaotropiques (178) et de peptides synthétiques (179). Ces travaux soulignent

l'importance de la flexibilité des pores dans la sortie du fer vers l'extérieur de la cavité de la ferritine. Ainsi, il a été proposé que la liaison de certaines protéines permettrait de réguler l'ouverture et la fermeture des canaux de type 3 de la ferritine *in vivo* (178, 179, 270).

3.4.4. Le transfert des électrons à travers la coque de la protéine

L'hème présent au sein des ferritines bactériennes facilite le transfert direct des électrons à partir des agents réducteurs jusqu'au minéral (225, 292). En effet, les agents réducteurs ne peuvent diffuser directement dans la cavité. Pour l'instant, chez les eucaryotes, aucun mécanisme de transfert d'électrons n'a été mis en évidence dans des ferritines. Toutefois, certaines études ont montré que malgré l'incapacité des réducteurs ou des oxydants de grande taille à pénétrer à l'intérieur de la ferritine, les électrons peuvent être transportés à travers la coque de la protéine jusqu'au noyau minéral (288, 304).

3.4.5. La libération du fer de la ferritine par des processus non réducteurs

Plusieurs chélateurs induisant la mobilisation du fer de la ferritine ont été testés. Les acéto- et benzo-hydroxamates semblent pénétrer à l'intérieur de la ferritine via les canaux de type 3 pour interagir directement avec le noyau minéral, induisant une libération du fer de l'ordre de 30 à 60 % du fer stocké dans la ferritine (104). Par contre, la DFO (desferrioxamine), un sidérophore bactérien de *Streptomyces pilosus* ayant une $K_f > 10^{30}$ pour le fer (204), permet la libération du fer sans pénétrer à l'intérieur de la ferritine mais à un taux beaucoup plus faible (81). Une autre étude a montré que les catéchols peuvent directement chélater le fer de la ferritine par des mécanismes similaires à ceux des acéto et benzo-hydroxamates (229).

3.4.6. La libération du fer *in vivo*

Trois modèles différents de libération de fer *in vivo* ont été proposés :

- 1) Un équilibre entre le fer cytosolique et le fer stocké dans la ferritine. Dans ce modèle, le fer est libéré de la ferritine suite à la diminution de la concentration en fer dans le cytosol. Ce phénomène est accru dans un environnement réducteur (75).
- 2) La dégradation de la ferritine dans les lysosomes. Ce modèle suggère que le fer est irréversiblement stocké dans la ferritine et peut être libéré uniquement par une dégradation de la coque (275). Les lysosomes contiennent des agents réducteurs ainsi

qu'un pH relativement bas auquel le fer est soluble. Cependant, de part sa réactivité, le fer libre peut être dangereux pour les lysosomes et les cellules (159).

- 3) Des protéines chaperonnes qui se lient à la ferritine et induisent une réduction et une libération du fer. Plusieurs protéines de type ferredoxine chez *E. coli* (7) et *Pseudomonas aeruginosa* (285) ont été identifiées dans des régions d'ADN proches des gènes codant la ferritine. La fixation de ces protéines à la ferritine peut alors favoriser des réactions d'oxydo-réductions, conduisant à la libération du fer. Il a ainsi été suggéré que l'expression des bacterioferredoxines (Bfd) se faisait dans des conditions de carence en fer pour mobiliser le fer de la ferritine. D'autres protéines peuvent se lier à la ferritine, notamment certaines protéines du sérum tel que l' α -2-macroglobuline (230) et l'apolipoprotéine B (243). Jusqu'à présent aucun rôle précis de ces protéines dans la libération du fer de la ferritine n'a été établi. Cependant, en se basant sur les mécanismes de libération proposés ci-dessus, l'interaction de ces protéines avec la ferritine pourrait : (i) induire la dégradation de la ferritine et une libération du fer ; (ii) diriger la ferritine vers des récepteurs spécifiques et provoquer son endocytose ; (iii) réguler l'ouverture ou la fermeture des canaux type 3 afin de moduler le stockage et la libération du fer.

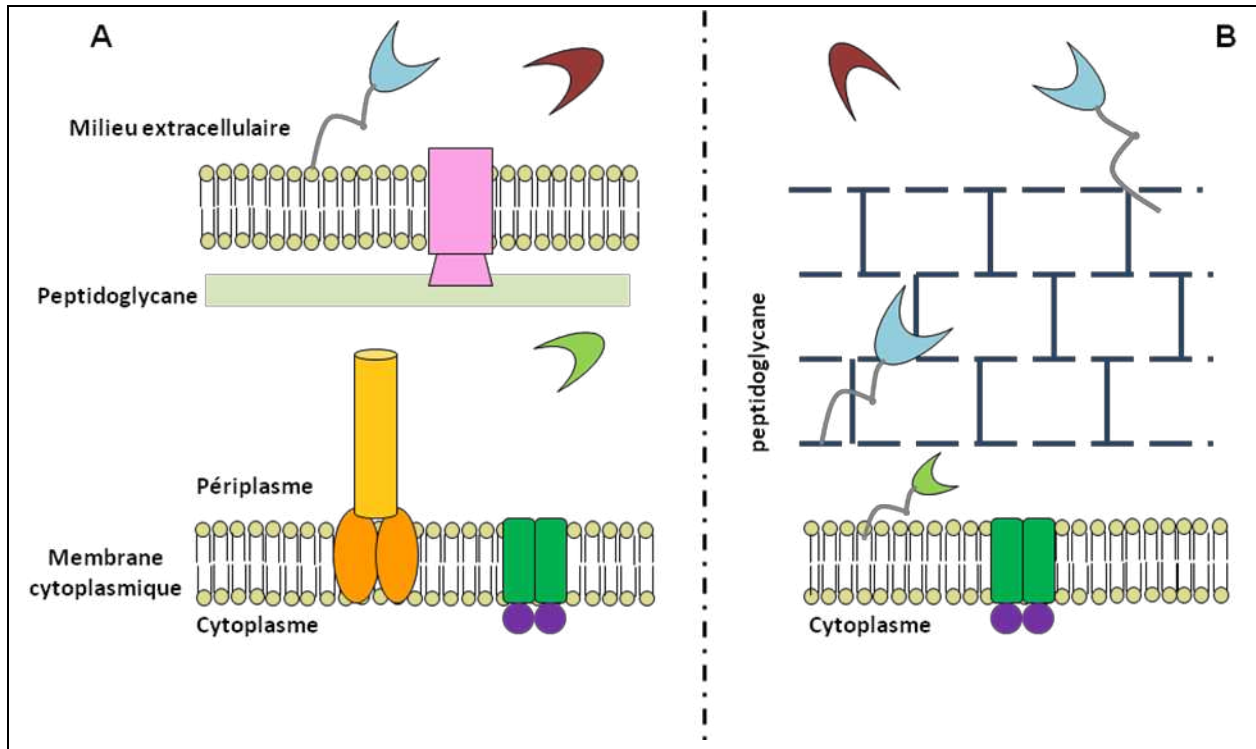


Figure 5 : Vue globale de la disposition du système d'acquisition du fer chez les bactéries Gram-négatifs (A) et Gram-positifs (B).

Les protéines ou bien les petites molécules qui assurent la même fonction chez les deux groupes sont présentées par la même couleur. Les chélateurs de fer sécrétés dans le milieu extracellulaire, soit les sidérophores ou bien les hémophores (rouge), sont des analogues dans les deux groupes de bactérie. Les bactéries à Gram- négatif reçoivent les complexes grâce à des récepteurs situés dans la membrane externe (rose) et utilisent l'énergie nécessaire assurée par le complexe TonB-ExbB-ExbD (jaune) pour l'import de la molécule. D'un autre côté, les bactéries à Gram-positif reçoivent les chélateurs-Fe à faible poids moléculaire (tel que les sidérophores-Fe(III)) directement à la membrane cytoplasmique. Au contraire des protéines portant les sources de fer, celles-ci rentrent en liaison avec des récepteurs ancrés au peptidoglycane.

Les deux groupes possèdent des protéines de liaison au substrat (vert clair), la seule différence c'est que cette classe de protéine est présente dans le périplasma chez les Gram-négatifs alors que chez les Gram-positifs elle se trouve ancrée à la membrane cytoplasmique. A partir du récepteur (vert clair), l'import du substrat se fait à travers la perméase (vert foncé) couplée à une source d'énergie qui est fournie par l'ATPase (mauve). Les protéines ayant des queues d'ancrage soit à la membrane externe ou bien au peptidoglycane (à couleurs bleues) sont variables d'un groupe à l'autre.

(Schéma inspiré de la thèse de Jason Christopher Grigg, 2010)

https://circle.ubc.ca/bitstream/handle/2429/29254/ubc_2010_fall_grigg_jason.pdf?sequence=1

Chapitre III- Systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries

Afin de s'adapter aux très faibles concentrations en fer rencontrées dans les tissus de l'hôte, les bactéries pathogènes ont développé de multiples systèmes pour accéder à cet élément vital. La spécificité de ces systèmes dépend à la fois de la forme sous laquelle le fer est présent (libre ou complexé), ainsi que de ses différents degrés d'oxydation. Chez les bactéries, on peut distinguer deux mécanismes principaux :

- 1) une acquisition indirecte du fer qui repose sur la synthèse et la sécrétion de molécules dans le milieu extracellulaire. On peut notamment citer les sidérophores qui sont des molécules de faible poids moléculaire ayant une très forte affinité pour le fer ferrique (Fe^{3+}) et les hémophores qui fonctionnellement sont proches des sidérophores mais qui reconnaissent spécifiquement l'hème à la place du fer (169).
- 2) une acquisition du fer basée sur un contact direct entre la bactérie et les sources du fer exogènes. Cette liaison se fait généralement par l'intermédiaire des protéines membranaires ou ancrées au peptidoglycane. Ces mécanismes d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif sont très différents de ceux existants chez les bactéries à Gram-positif.

1. Systèmes d'acquisition de fer chez les bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries à Gram-négatif, les sources de fer doivent traverser la membrane externe, le périplasme ainsi que la membrane interne (Figure 5). De plus, chaque type de source de fer nécessite un mécanisme d'acquisition spécifique.

1.1. Systèmes d'acquisition indirecte

Le fer ferreux peut diffuser à travers la membrane externe par l'intermédiaire de porines et accède ensuite aux transporteurs localisés au niveau de la membrane interne (262). Le transporteur de Fe^{2+} le mieux décrit est formé de deux composants : FeoA et FeoB couplées à une protéine G possédant une activité GTPasique qui fournit l'énergie nécessaire pour l'import du fer à partir du périplasme (128, 187).

En revanche, le transport des molécules de plus grande taille (ex : sidérophore-Fe(III), hémophores-hème) ne peut avoir lieu par diffusion passive via les porines.

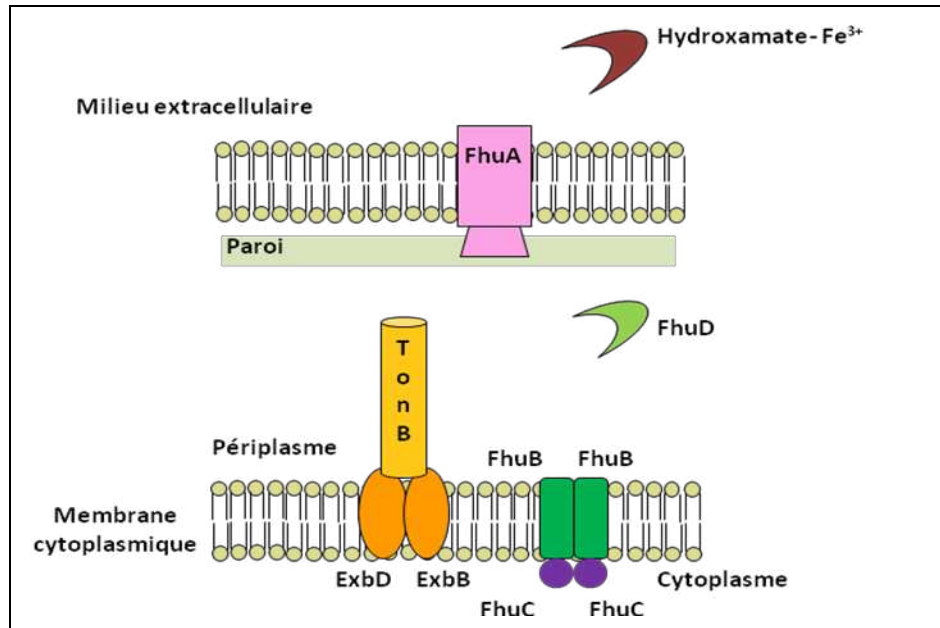


Figure 6 : Schéma du système fhu (ferric hydroxamate uptake) chez *E. coli*.

(Schéma inspiré de la thèse de Jason Christopher Grigg, 2010)

https://circle.ubc.ca/bitstream/handle/2429/29254/ubc_2010_fall_grigg_jason.pdf?sequence=1

Pour les sidérophores, on peut citer comme modèle le système fhu (ferric hydroxamate uptake) TonB-dépendant, largement étudié chez *E. coli* (Figure 6). Ce système permet de transporter des sidérophores exogènes de type hydroxamate, tels que le ferrichrome et la ferricrocine, synthétisés spécifiquement par les champignons (39).

- Tout d'abord, le ferri-sidérophore se lie au récepteur FhuA qui est localisé dans la membrane externe. Cette liaison induit des changements de conformation au niveau de FhuA (70, 96, 180)
- Puis TonB, qui est situé dans la membrane cytoplasmique au sein d'un complexe TonB-ExbB-ExbD, traverse le périplasma et rentre en contact avec FhuA, transmettant ainsi l'énergie indispensable à l'ouverture de cette protéine (212, 220).
- L'interaction entre TonB et FhuA conduit à la libération du ligand dans le périplasma (212).
- Une fois libéré, le ferri-sidérophore sera pris en charge par FhuD qui le transfère vers un transporteur de type ABC situé dans la membrane interne.

Concernant l'acquisition de l'hème, il peut se faire soit en contact direct avec des récepteurs membranaires soit indirectement par l'intermédiaire d'hémophores qui ont la capacité de chélater l'hème dans le milieu extracellulaire (284). HasA, le premier hémophore à avoir été caractérisé chez *Serratia marcescens* (HasA_{sm}), est un bon exemple de système d'acquisition indirect de l'hème à partir des hémoprotéines (169). Ce type de molécule est conservé chez plusieurs espèces à Gram-négatif (170, 226). HasA_{sm} peut non seulement capter l'hème présent dans les surnageants des cultures mais également l'hème lié à l'hémoglobine (169), l'hémopexine et la myoglobine (Wandersman C., résultats non publiés). L'hème est par la suite transféré à HasR, un récepteur TonB-dépendant associé à la membrane externe, qui le transporte à travers la membrane (111). Finalement, seul l'hème est internalisé alors que l'apo-hémophore reste à l'extérieur.

1.2. Systèmes d'acquisition directe

D'autres systèmes spécialisés TonB-dépendant impliqués dans l'acquisition directe des sources de fer chez l'hôte ont été identifiés. TbpB/TbpA décrit chez *Neisseria meningitidis*, est l'un des systèmes modèles pour l'acquisition du fer de la transferrine (63). La protéine TbpA, ancrée à la surface, peut capter le fer de la transferrine. Ce dernier est ensuite transporté dans la

cellule grâce à l'interaction avec la lipoprotéine TbpB (64, 65, 264). Les systèmes HupA/HupB et LbpA/LbpB sont d'autres exemples de récepteurs respectivement spécifiques des complexes hémoglobine-haptoglobine et de la lactoferrine chez *Neisseria meningitidis* (171, 236). On peut également citer HemR qui est un récepteur possédant une forte affinité pour l'hème chez *Yersinia enterocolitica* (38, 95).

2. Systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram-positif

Si les systèmes d'acquisition du fer chez les bactéries à Gram-négatif ont été particulièrement bien étudiés, ceux des bactéries à Gram-positif restent encore mal connus. Néanmoins, depuis maintenant une dizaine d'années, d'importantes avancées ont été effectuées.

Contrairement aux bactéries à Gram-négatif, les bactéries à Gram-positif ne possèdent ni membrane externe ni périplasme. Par contre, un peptidoglycane très épais est présent à la surface de ces bactéries et représente 90 % de la paroi bactérienne (Figure 5). Les systèmes d'acquisition du fer chez diverses espèces bactériennes à Gram-positif tels que *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* sont décrits ci-dessous.

2.1. Principaux systèmes d'acquisition chez *S. aureus*

S. aureus est responsable d'infections plus ou moins sévères chez l'homme, allant d'infections de la peau à d'autres infections plus graves telles que des endocardites (100) ou des septicémies (40). La capacité de *S. aureus* à acquérir le fer au cours de l'infection est très importante pour sa virulence (272). Il a été démontré que *S. aureus* est capable d'utiliser chacune des sources suivantes : l'hème, l'hémoglobine, le complexe hémoglobine-haptoglobine, la transferrine et le fer sous sa forme réduite ou oxydée (85, 191, 268). Les mécanismes d'acquisition du fer chez *S. aureus* sont parmi les mieux étudiés chez les bactéries à Gram-positif.

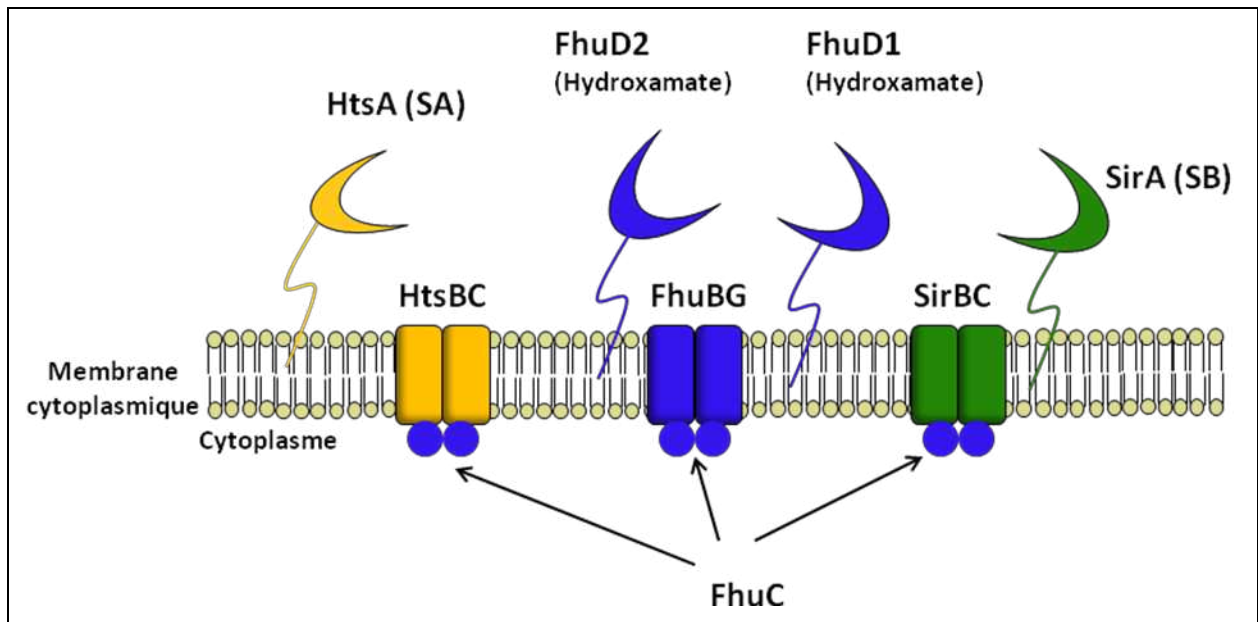


Figure 7 : Schéma des transporteurs des sidérophores chez *S. aureus*.

Les protéines réceptrices des substrats (HtsA, FhuD1, FhuD2 et SirA) sont représentées avec le motif lipidique par lequel elles sont associées à la membrane. Les perméases hétérodimériques (HtsBC, FhuBG et SirBC) sont intégrées dans la membrane cytoplasmique, chaque perméase est présentée avec la même couleur que le récepteur correspondant. FhuC est l'ATPase fonctionnelle des trois systèmes de transport (20, 72, 239, 240, 256).

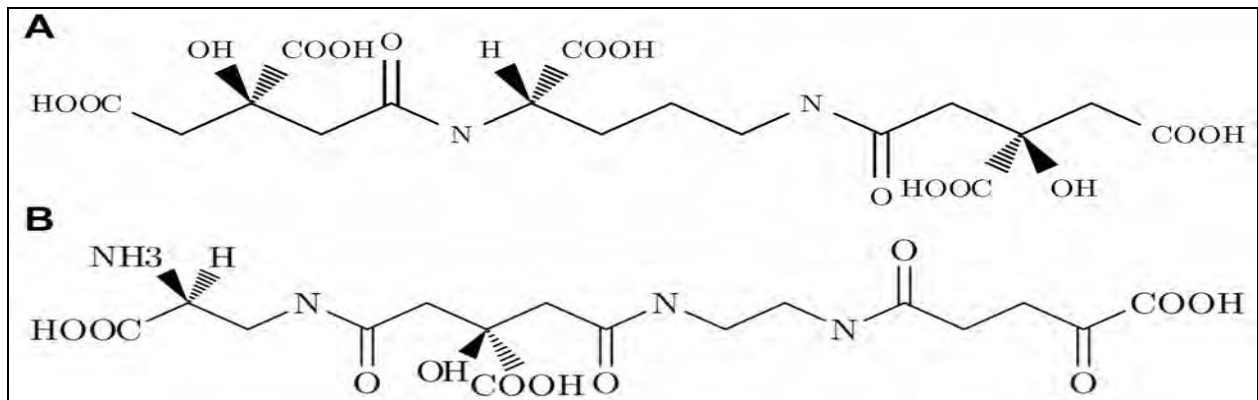


Figure 8 : Les sidérophores de *S. aureus*
 (A) Staphyloferrine A. (B) Staphyloferrine B.

2.1.1. Les sidérophores de *S. aureus*

2.1.1.a. Le système Fhu

S. aureus possède le système Fhu relativement similaire à celui d'*E. coli*. Ce système est constitué de deux lipoprotéines paralogues FhuD1 et FhuD2, une perméase homodimérique FhuBG et une ATPase FhuC (239, 240) (Figure 7). Bien que FhuD1 et FhuD2 possèdent une fonction équivalente à celle de FhuD chez *E. coli*, elles sont ancrées à la membrane cytoplasmique par un motif lipidique. FuhD2 est le récepteur le plus exposé à l'extérieur. De plus, il se lie au sidérophore avec une affinité nettement plus forte ($K_d \sim 20$ nM) que le récepteur FhuD d'*E. coli* ($K_d \sim 1$ μ M) (241, 242). Dans ce système, les sidérophores exogènes tels que le ferrichrome diffuse au travers du peptidoglycane pour atteindre les récepteurs membranaires. Le transport des ferri-sidérophores dans le cytoplasme se fait ensuite grâce à des transporteurs de type ABC (283).

2.1.1.b. Les systèmes HtsABC et SirABC

S. aureus a la faculté de synthétiser au moins deux sidérophores : la staphyloferrine A (SA) et la staphyloferrine B (SB) (Figure 8), appartenant à la famille des hydroxycarboxylates (126, 152, 194). Les loci impliqués dans leurs biosynthèses et dans leurs exports ont été récemment identifiés et leur voie de biosynthèse a été reconstituée *in vitro* (19, 20, 56, 66). La SA et la SB sont essentielles pour la croissance de *S. aureus* en milieu carencé en fer et pour sa virulence chez la souris.

La SA est synthétisée et exportée dans le milieu extracellulaire grâce à quatre protéines SfaABCD (20, 56, 66). Les systèmes d'import des SA et SB, sont respectivement codés par deux opérons HtsABC et SirABC. Les sidérophores SA et SB se lient respectivement aux récepteurs membranaires HtsA et SirA, les ferri-sidérophores passent ensuite par les perméases HtsBC et SirBC (19, 20, 56, 66, 72). Par ailleurs, ces deux systèmes ne possèdent pas leur propre ATPase. Cependant, il a été démontré que l'ATPase FhuC du système Fhu peut également être impliquée dans d'autres systèmes d'acquisition du fer, notamment dans les systèmes HtsABC et SirABC (256) (Figure 7).

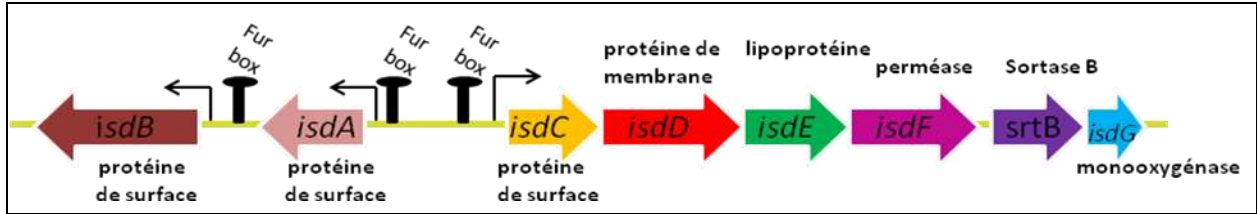


Figure 9 : Représentation schématique du locus *isd* chez *S. aureus* (191).

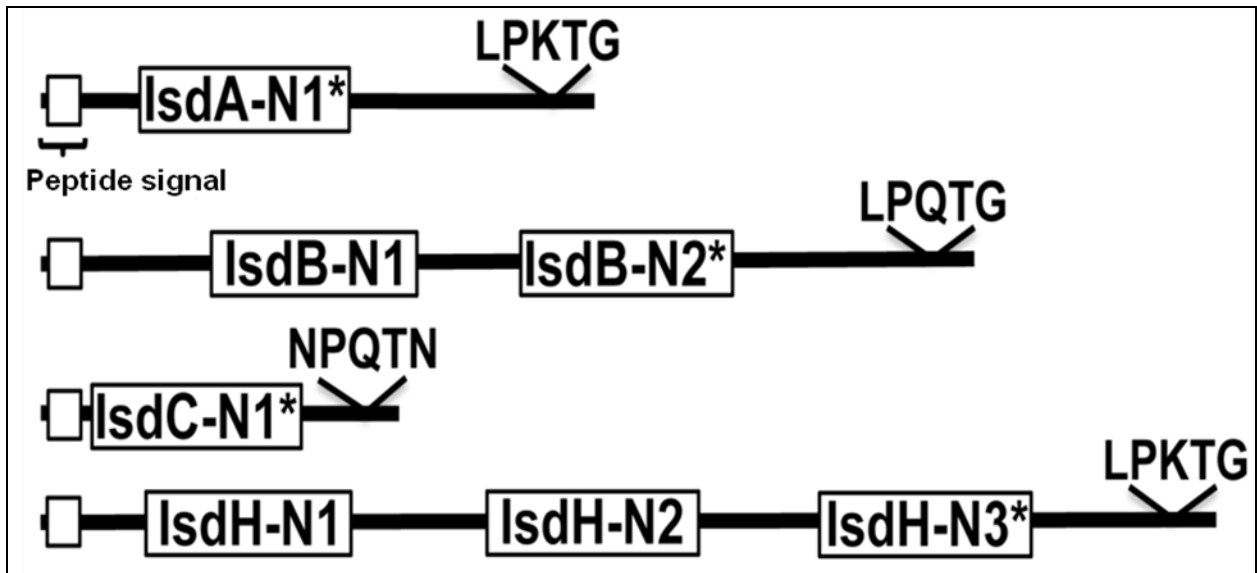


Figure 10 : Schéma représentatif des protéines de surface Isd chez *S. aureus*

Les petites boîtes blanches représentent les peptides signaux qui se trouvent du côté N-terminal. Chacune des protéines de surface est représentée avec son ou ses domaines NEAT et son motif d'ancrage au peptidoglycane, reconnu par la sortase.

* indiquent les domaines NEAT qui lient l'hème.

2.1.2. Acquisition de l'hème : le système Isd

Le système Isd (Iron surface determinant) est le premier système d'acquisition de l'hème découvert chez *S. aureus* (191, 192, 253). Depuis son identification en 2003, de nombreux travaux ont été entrepris afin de caractériser la structure et la fonction de chacun de ses composants.

2.1.2.a. Description du système Isd

L'opéron *isd* est constitué de dix gènes exprimés dans des conditions de carence en fer. Ces gènes codent pour neuf protéines directement impliquées dans l'acquisition de l'hème et pour une sortase B (SrtB) (Figure 9).

- IsdA, IsdB, IsdC et IsdH (aussi appelée HarA) sont quatre protéines de surface (62, 84, 191). Etant donné que les bactéries à Gram-positif ne possèdent pas de membrane externe, les protéines de surface sont souvent liées au peptidoglycane par des liaisons covalentes. L'ancrage se fait grâce à des enzymes appelées sortases qui jouent le rôle de transpeptidase. Leur mode d'action consiste à cliver la protéine au niveau de son motif d'ancrage (ex : LPXTG ou NPQTN) localisé du côté C-terminal par une réaction de transpeptidation et l'adresser au peptidoglycane en générant des ponts amides entre la protéine et les ponts pentaglycines (188, 203). Si IsdC est probablement une cible de la sortase B, IsdA et IsdB sont par contre ancrées par la sortase A (191).

- IsdE et IsdF sont respectivement une lipoprotéine de la membrane cytoplasmique qui lie l'hème et une perméase du transporteur de type ABC (191).

- IsdD est une protéine membranaire à fonction inconnue.

- IsdG et IsdI sont deux monooxygénases permettant la libération du fer à partir de l'hème (252, 296).

Le domaine NEAT

Les protéines IsdB, IsdC, IsdA et IsdH renferment une à trois copies du domaine conservé NEAT (Near Iron Transporter) (Figure 10). Ce domaine d'environ 120 résidus est retrouvé uniquement chez les bactéries à Gram-positif. La prédiction de sa structure secondaire a révélé une similarité avec des protéines se trouvant à proximité d'un transporteur putatif de ferri-sidérophore de certaines bactéries à Gram-positif (incluant des bactéries des genres *Streptococcus*, *Listeria*, *Bacillus* et *Clostridium*), d'où son nom "Near Iron transporter"(5). Les

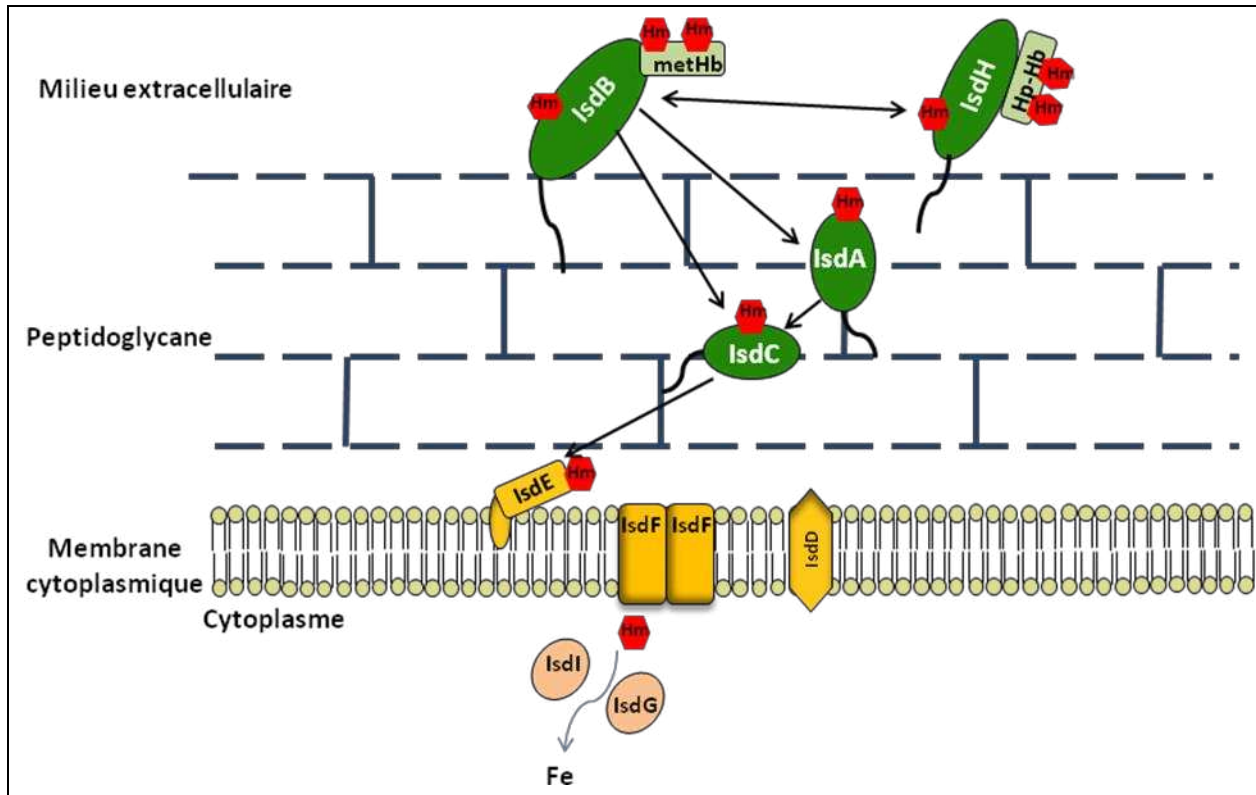


Figure 11 : Modèle du mécanisme de transport de l'hème du milieu extracellulaire jusqu'au cytosol par l'intermédiaire du système Isd chez *S. aureus*.

Le transport de l'hème et la libération du fer sont accomplis grâce à la coordination de neuf protéines. IsdA, IsdB, IsdC et IsdH sont ancrées d'une façon covalente au peptidoglycane. IsdE et IsdF sont respectivement la protéine de membrane et la perméase. IsdG et IsdI sont les enzymes cytosoliques qui dégradent l'hème. Le ligand spécifique de chaque membre de protéine est illustré comme suit: Hm (hème), metHb (méthémoglobine) et Hp-Hb (Haptoglobine-hémoglobine). Le transfert de l'hème dans le système Isd est représenté par des flèches. (177, 201, 251, 252, 309)

domaines NEAT jouent des rôles essentiels dans l'interaction avec les hémoprotéines et avec l'hème. Néanmoins, ils sont maintenant connus pour des fonctions très diversifiées. Certains lient spécifiquement l'hémoglobine ou les complexes hémoglobine-haptoglobine, alors que d'autres sont uniquement impliqués dans la liaison à l'hème. De plus, certains domaines NEAT sont spécialisés dans l'extraction de l'hème à partir de l'hémoglobine alors qu'une autre classe de domaines NEAT a été décrite comme étant impliquée dans le transfert de l'hème (84, 85, 92, 177, 185, 186, 191, 201, 216, 267, 272, 280).

2.1.2.b. Mécanisme de transport de l'hème via le système Isd

IsdB et IsdH sont complètement exposées à la surface, IsdA est partiellement exposée alors que IsdC est totalement intégrée dans la paroi (191). La localisation des protéines ainsi que les tests *in vitro* de transfert de l'hème entre les différentes protéines à domaine NEAT (protéines entières ou domaines NEAT seuls) ont permis d'élucider les mécanismes d'acquisition de l'hème et son transport dans le cytoplasme bactérien.

La protéine IsdH entière avec ces trois domaines NEAT (N1, N2 et N3) peut capter l'hème et les hémoprotéines (85). Plus spécifiquement, IsdH-N1 et IsdH-N2 lient l'hémoglobine ainsi que les complexes hémoglobine-haptoglobine avec les mêmes K_d (de l'ordre du nM), alors qu'IsdH-N3 peut lier seulement l'hème. Ce dernier est capable d'extraire l'hème de l'hémoglobine. Il a alors été proposé que les domaines N1 et N2 de IsdH jouent un rôle dans le transfert de l'hème contenu dans les hémoprotéines vers le domaine N3 (217). La protéine IsdB avec ces deux domaines (N1, N2) fonctionne comme un récepteur pour l'hème et la méthémoglobine (272). En revanche, IsdA et IsdC lient spécifiquement l'hème (120, 191). La séquence d'IsdB-N1 est proche de celle d'IsdH-N1 et IsdH-N2. Par contre, la séquence d'IsdB-N2 est assez similaire à celle d'IsdH-N3, avec des résidus conservés lui permettant sans doute de lier spécifiquement l'hème. Ces données suggèrent que la méthémoglobine se lie en premier à IsdB-N1, ce dernier induit la libération de l'hème qui sera ensuite capté par IsdB-N2 (217).

Le transfert de l'hème entre les protéines Isd est séquentiel et unidirectionnel (Figure 11) :

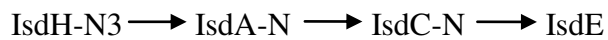
1. La méthémoglobine transfère directement son hème à apo-IsdB (309).
2. Holo-IsdB ainsi que IsdB-N2 seul transfèrent l'hème à apo-IsdA et apo-IsdC (201, 309).

Récemment il a été montré que la vitesse de transfert de l'hème d'holo-IsdB à apo-IsdA

est approximativement égale à celle de holoIsdB-N2 à apoIsdA-N ($\sim K_{\text{transfert}} = 87 \text{ s}^{-1}$) (109)

3. L'hème d'holo-IsdA est ensuite transféré à apo-IsdC qui joue un rôle central dans ce système (177). En principe, le transfert a lieu via la formation d'un complexe transitoire IsdA - hème- IsdC permettant le transfert de l'hème d'holo-IsdA à apo-IsdC (282).
4. Apo-IsdE reçoit l'hème lié à holo-IsdC (309).
5. Finalement, le fer est libéré dans le cytoplasme grâce à l'action des monooxygénases IsdG et IsdI (252, 296)

Alternativement, le schéma du transfert de l'hème à partir d'IsdH-N3 serait le suivant:



De plus, IsdH-N3 et IsdB-N2 pourraient s'échanger l'hème de manière bidirectionnelle (201). Les tableaux 1 et 2 résument respectivement la différence des fonctions au sein des domaines NEAT des protéines Isd chez *S. aureus* et les constantes de vitesse de transfert de l'hème entre les différentes protéines Isd.

2.1.2.c. Rôle du système Isd dans l'acquisition de l'hème et dans la virulence

L'opéron *isd* joue un rôle essentiel dans la croissance de *S. aureus* en présence d'hème ou d'hémoglobine comme unique source de fer, ainsi que dans la virulence dans plusieurs modèles d'infection. Des mutations dans chacun des gènes *isdA*, *isdG* et *isdI* induisent une diminution de la croissance des souches mutantes en présence d'hème (120, 224). De plus, la délétion du gène *isdB* conduit à une incapacité de la souche mutante de croître dans un milieu où l'hémoglobine est la seule source de fer présente, ce qui n'est pas le cas avec une délétion d'IsdH (272).

Dans un modèle murin, la croissance de chacune des souches mutantes suivantes $\Delta isdA$, $\Delta isdB$, $\Delta isdC$, $\Delta isdG$ et $\Delta isdI$ est nettement réduite dans différents organes (cœur, rate et reins) comparativement à la souche sauvage (55, 224, 272). Une forte expression d'*isdA* a été récemment détectée dans des souches isolées à partir de tissus cardiaques et hépatiques alors que l'expression d'*isdB* est uniquement induite dans le cœur (219).

Des études ont montré qu'IsdA interagit avec différentes molécules présentes chez l'hôte, autre que l'hème. Elle peut notamment se lier à de nombreuses protéines du sérum et de la matrice extracellulaire telles que la lactoferrine, le fibrinogène et la fibronectine. Elle favorise en particulier l'adhérence des bactéries aux cornéocytes et aux cellules épithéliales nasales (58-60),

Tableau 1 : Diversité de fonctions au sein des domaines NEAT des protéines Isd de *S. aureus*

Protéines	Hb	Hp ou Hp-Hb	l'hème	Extraction de l'hème de l'Hb	Références
IsdH entière (895 aa)	-	✓	-	-	(84)
IsdH-N1 (145 aa)	✓	✓	-	-	(85)
IsdH-N2 (145 aa)	✓ (Spéculation)	✓ (Spéculation)	-	-	
IsdH-N3 (124 aa)	Non	Non	✓	✓	(217)
IsdB entière (645 aa)	✓	Non	✓	✓	(85, 191, 272, 309)
IsdB-N1 (126 aa)	✓ (spéculation par comparaison avec IsdH-N1/N2)	-	-	-	(217)
IsdB-N2 (118 aa)	-	-	✓ (Spéculation par comparaison avec IsdH-N3)	-	(217)
IsdA (350 aa)	Non	-	✓	Non	(120, 191, 280, 309)
IsdC (227 aa)	Non	-	✓	?*	(191, 217, 309)

(?*) Deux résultats controversés existent : l'étude de Zhu et al. a montré que le transfert de l'hème de la méthémoglobine à apo-IsdC se fait indirectement et ceci est du probablement à la dissociation de l'hème dans la solution. Alors qu'une autre étude réalisée par Pilpa et al. a montré qu'apo-IsdC capture l'hème de la méthémoglobine

- (-) Données pas encore analysées
- ✓ Résultat positif
- (Non) Résultat négatif

Tableau 2 : Constantes de vitesse du transfert de l'hème entre les différentes protéines Isd chez *S. aureus*

	Apo-IsdA		Apo-IsdA-N*		Apo-IsdC		Apo-IsdC-N*	Apo-IsdE		Références
	✓	k_t (s ⁻¹)	✓	k_t (s ⁻¹)	✓	k_t (s ⁻¹)				
Holo-IsdB	✓	114	-		✓	15				(309)
Holo-IsdB_{E.coli}	✓	87	-		✓	-				(309)
Holo-IsdB-N2	✓	-	✓	82	✓	-				(109, 201)
Holo-IsdA					✓	53.5	✓			(177)
Holo-IsdC								✓	0.0062	(309)

N* : Signifie le domaine NEAT seul purifié à partir de la protéine

(-) Données pas encore analysées

✓ Résultat positif

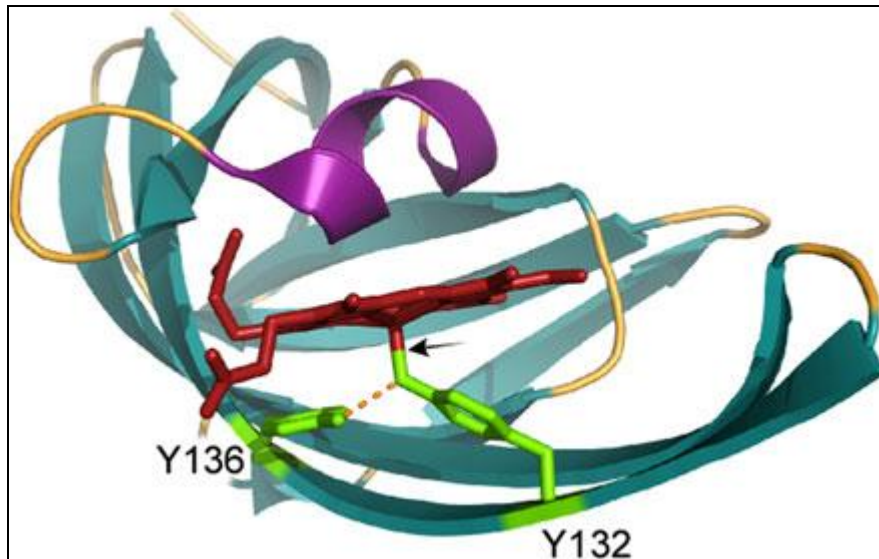


Figure 12A : Modèle structural du domaine NEAT de IsdC chez *S. aureus* représentant la poche de liaison à l'hème. La structure montre les deux tyrosines qui sont essentielles pour la coordination et la liaison de l'hème (en vert, Y¹³² et Y¹³⁶). Une seule molécule d'hème se trouve intégrée dans sa poche hydrophobe (rouge). Une région flexible appelée "Lip" (indiquée en mauve) est proposée d'être essentielle dans le transfert et l'acquisition de l'hème. La flèche noire indique la liaison qui se forme entre le groupe OH du phénol de Y¹³² et l'atome de fer situé dans la molécule de l'hème. Les pointillés orange montrent les liaisons hydrogènes qui s'établissent entre les deux tyrosines conservées. Cette structure a été construite avec Pymol ; pdb file 206P (246).

-(62, 268) De plus IsdA joue un rôle dans la résistance aux défenses innées chez l'homme et dans la survie sur la peau en modifiant l'hydrophobicité des cellules à la surface (61). IsdA est donc une protéine multifonctionnelle permettant à *S. aureus* de coloniser divers organes chez l'hôte.

Plusieurs vaccins constitués d'un mélange de protéines Isd ont déjà montré des résultats prometteurs (233). Par exemple, IsdA et IsdB ont été utilisées avec succès dans des tests de vaccination, prévenant ainsi l'infection dans un modèle murin (157, 265).

2.1.3. Structure du domaine NEAT

Les études cristallographiques menées dernièrement sur la plupart des protéines Isd à domaine NEAT de *S. aureus* ont permis de mieux comprendre le mécanisme d'interaction entre cette famille de protéines et les hémoprotéines. En effet, la structure de chacun des complexes suivants IsdC-hème (246), IsdA-hème (120) IsdHN3-hème (287), IsdBN2-hème (109) et IsdHN1-hémoglobine (156) a été résolue.

Ces études révèlent la présence de 8 feuillets β formant entre eux des repliements de type immunoglobuline bien que leurs séquences ne présentent pas d'homologie avec les protéines appartenant à la famille des immunoglobulines (120, 246). Les analyses structurales indiquent l'existence d'une poche hydrophobe indispensable pour la coordination de l'hème (281). Au sein de cette poche, l'hème n'est pas complètement incorporé et environ 35 % de la molécule reste exposée à l'extérieur (246, 287). Cette caractéristique peut être expliquée par le fait que le domaine NEAT peut avoir deux fonctions opposées : (i) la séquestration du ligand à partir des protéines de l'hôte et (ii) le transfert de l'hème à un autre domaine NEAT.

Deux tyrosines conservées, en plus de quatre autres résidus, sont nécessaires pour la coordination de l'hème (Figure 12A). La première tyrosine coordonne l'atome de fer présent dans l'hème via le groupement hydroxyle phénolique de cet acide aminé (246). La deuxième tyrosine forme des liaisons hydrogènes avec la première pour consolider la liaison avec l'hème (120) (Figure 12A). D'autres résidus spécifiques des domaines NEAT seraient également essentiels pour la liaison à l'hème et le transfert de l'hème entre deux domaines NEAT (109, 119). Une hélice 3_{10} (appelée aussi "région lip"), présente du côté distal de la poche de liaison à l'hème, semble être impliquée dans la séquestration de l'hème (246, 281) (Figure 12A). Les structures des formes apo et holo-NEAT suggèrent que le déplacement des acides aminés autour

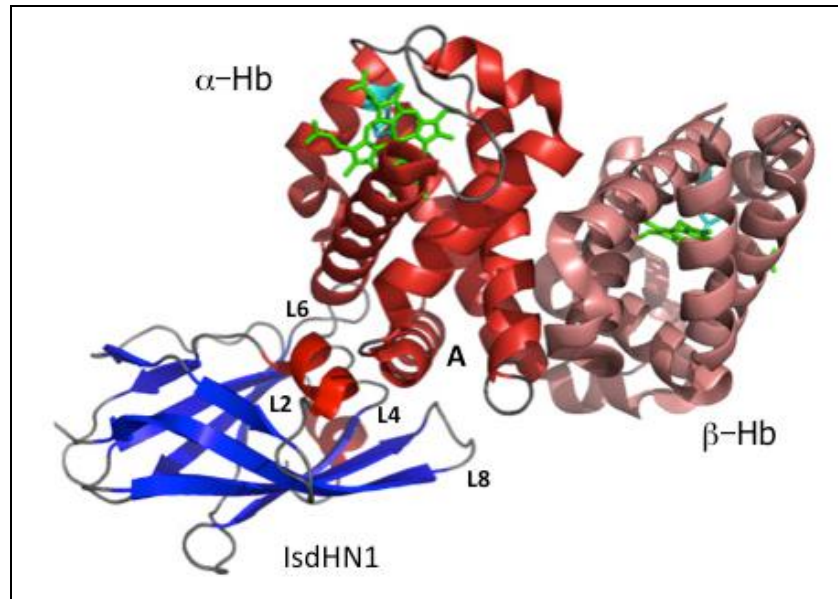


Figure 12B : Structure du complexe IsdH-N1: hémoglobine humaine (Hb ayant les deux chaînes α et β). IsdH-N1 interagit seulement avec la chaîne α de l'hémoglobine (en rouge) et non pas avec la chaîne β , cette interaction se fait via les boucles 2, 4, 6. L'hélice A de la chaîne α de l'hémoglobine constitue le déterminant majeur de la liaison (156).

PDB de l'Hb: 1IRD

PDB du domaine NEAT de IsdH-N1: 2H3K

de la poche conduit l'hélice à libérer l'hème (216, 281). Par conséquent, le changement de conformation dans la région de lip jouerait un rôle dans la fixation et le transfert de l'hème. Quand la région lip se referme sur le ligand, l'hème est alors séquestré, à contrario, quand elle s'ouvre, l'hème est libéré puis transféré vers un autre domaine NEAT.

IsdH et IsdB interagissent avec l'hémoglobine ce qui n'est pas le cas des autres protéines Isd chez *S. aureus*. L'analyse *in silico* des séquences protéiques des domaines NEAT IsdH-N1, IsdH-N2, IsdH-N3, IsdB-N1, IsdB-N2 et IsdA-N a révélé la présence d'un motif composé de résidus aromatiques uniquement dans IsdH-N1, IsdH-N2 et IsdB-N1 (QYYHFF pour IsdH-N1 et QFYHY pour chacun des IsdH-N2 et IsdB-N1) (85). Les résidus de ce motif jouent un rôle primordial dans l'interaction avec l'hémoglobine. De même, ils sont essentiels dans la reconnaissance de l'haptoglobine. Néanmoins, dans IsdH-N1, les résidus Y125, H127, F128 et F129 sont spécifiquement réservés pour l'interaction entre IsdH-N1 et l'haptoglobine alors que pour sa liaison avec l'hémoglobine, d'autres résidus localisés autour de la boucle sont impliqués (217). Enfin, la structure du complexe IsdH-N1- chaîne α de l'hémoglobine indique que les boucles 2, 4 et 6 constituent la poche de liaison à cette chaîne α (Figure 12B). Une liaison polaire s'établit entre un résidu unique (K¹¹) de la chaîne α et plusieurs résidus des boucles 2 et 4. Ainsi, l'hémoglobine se lie aux domaines NEAT de IsdH et IsdB principalement par l'intermédiaire de la chaîne α (156).

2.1.4. Système FepABC

Chez *S. aureus*, FepABC, un système orthologue de EfeUOB chez *E. coli*, a été récemment caractérisé (276). Le système EfeUOB peut reconnaître l'hème et permettre l'extraction du fer de l'hème par une réaction de déferrochélation (45, 121). La protéine FepB de *S. aureus* (orthologue de EfeB) peut capter l'hème ainsi que la protoporphyrine IX et les protéines FepA et FepB sont toutes les deux requises pour l'utilisation de l'hème. Ainsi, la fonction du système EfeUOB dans l'extraction du fer de l'hème est conservée dans le système FepABC de *S. aureus* (276).

2.2. Principaux systèmes d'acquisition du fer chez *B. anthracis*

Au cours de son cycle infectieux, *B. anthracis* exprime différents systèmes d'acquisition du fer afin de chélater le fer présent chez l'hôte. De part l'architecture particulière de sa paroi qui

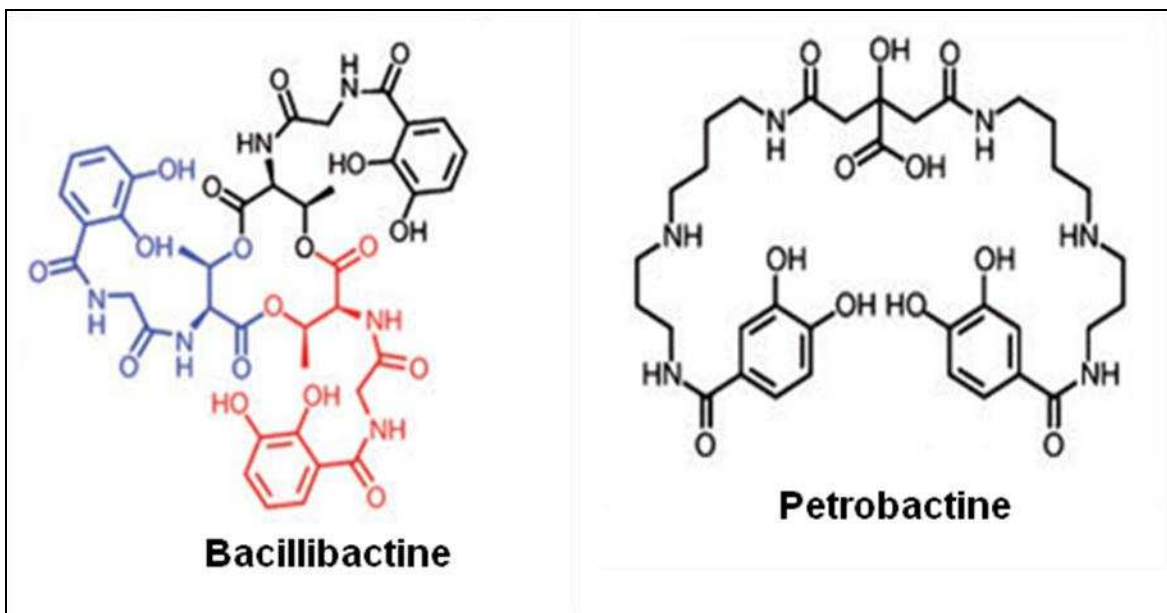


Figure 13 : Structure chimique des deux sidérophores: la bacillibactine et la pétrobactine (153).

comprend une couche S (43, 99, 197, 198), cette bactérie est considérée comme un modèle pour l'étude des mécanismes d'acquisition du fer chez les bactéries appartenant au groupe *B. cereus*.

Lors de sa réplication dans le milieu extracellulaire, *B. anthracis* sécrète l'anthrolysine O. Il s'agit d'une cytolysine cholestérol-dépendante qui induit la lyse des érythrocytes (149, 245). Suite à l'action hémolytique de l'anthrolysine O, l'hémoglobine est libérée dans le sang et permet à la bactérie de croître et de persister chez l'hôte. Le tableau 3 résume les différents gènes impliqués dans l'acquisition du fer chez *B. anthracis* ainsi que les fonctions des protéines correspondantes.

2.2.1. Les sidérophores de *B. anthracis*

2.2.1.a. Généralités sur la structure et l'affinité pour le fer des sidérophores de *B. anthracis*

Certaines souches du groupe *B. cereus sensu lato* produisent deux types de sidérophores, la bacillibactine (BB) et la pétrobactine (PB) appartenant à la famille des catécholates (153, 154, 295). Bien que ces deux molécules soient capables de chélater le fer, d'importantes différences au niveau de leur fonction biologique et de leur pouvoir pathogène ont été mises en évidence.

La bacillibactine a été identifiée dans des surnageants de culture de *Bacillus subtilis*. Sa structure consiste en un trimère cyclique formé d'une thréonine, une glycine et de la DHB (Dihydroxybenzoate) (Figure 13) (190). Il s'agit d'une 2,3-dihydroxybenzoyl-Gly-Thr trilactone possédant une homologie avec les entérobactines (Ent) produites par certaines bactéries à Gram négatif.

La pétrobactine, quand à elle a été décrite comme étant un sidérophore original, différant des autres catéchols par la présence d'une sous-unité 3,4-DHB au lieu de la 2,3-DHB (Figure 13). Initialement, la pétrobactine a été identifiée chez une bactérie marine qui dégrade le pétrole, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (16). La première preuve de la production des sidérophores de type 3,4-DHB a été rapportée chez *B. anthracis* en 2004 par Graner *et al.* (106, 153, 209, 210).

La bacillibactine possède une très forte affinité pour le fer ($K_f^{\text{bac}} = 10^{47,6}$) (77), qui est nettement plus élevée que celle de la transferrine et de la ferritine (79, 80, 223). De même, par rapport à la pétrobactine, l'affinité de la bacillibactine pour le fer est beaucoup plus forte ($K_f^{\text{bac}} = 10^{47,6}$ vs $K_f^{\text{pet}} = 10^{23}$) (134, 305).

Tableau 3 : Différents gènes de *B. anthracis* impliqués dans l'acquisition du fer

Gène (s)	Localisation de la protéine	Fonction (s)	Références
<i>-isdC</i>	Protéine ancrée à la paroi	Recevoir l'hème de IsdX1, IsdX2 Et BslK et le transférer à IsdE (?)	(92, 135, 185, 267)
<i>-isdX1</i>	Secrétée	Acquérir l'hème de l'Hb /transférer l'hème à IsdX2 et IsdC	(92, 186)
<i>-isdX2</i>	Secrétée/associée à la paroi	Acquérir l'hème de l'Hb/ accepter l'hème de IsdX1/transférer l'hème à IsdC	(92, 135, 186)
<i>-isdEFD</i>	Protéine de membrane	ABC transporteur putatif pour l'hème	(185)
<i>-isdG</i>	Cytosol	Monooxygénase (libération du fer de l'hème)	(251)
<i>-bas0520</i>	Protéine de paroi	Acquérir l'hème de l'Hb/liier l'hème	(15, 47)
<i>-bslK</i>	Protéine associée à la surface	Lier l'hème/transférer l'hème à IsdC	(267)
<i>-asbABSDEF</i>	Secrétée/cytosol	Synthèse de la petrobactine (sidérophore)	(153, 215)
<i>-bacACEBF</i>	Secrétée/cytosol	Synthèse de la bacillibactine (sidérophore)	(50, 294)
<i>-fpuA</i>	Protéine de membrane	Récepteur pour la petrobactine (proposée)	(47, 48, 301, 303)
<i>-fur</i>	Cytosol	Régulateur transcriptionnel qui réprime l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition de fer, dans un environnement riche en fer	(108, 185, 251)

? Pas encore connu

2.2.1.b. Voie de synthèse et rôle des sidérophores de *B. anthracis*

Les gènes impliqués dans la biosynthèse de la bacillibactine et de la pétrobactine sont localisés dans deux loci : *bacACEBF* pour la bacillibactine et *asbABCDEF* pour la pétrobactine (153, 165, 215). *bacACEBF* présente 79 % de similarité avec l'opéron *dhbACEBF* qui code pour la bacillibactine chez *B. subtilis*. Les deux gènes *asbA* et *asbB* partagent respectivement 45 % de similarité avec les gènes *iucA* et *iucB* impliqués dans la production de l'aérobactine chez *E. coli* (153). Ces gènes codent pour des machineries enzymatiques. Ainsi, dans le cas de la bacillibactine, sa biosynthèse repose sur un système de synthèse de peptides non ribosomale (NRPS) dont la voie métabolique a été bien caractérisée (190). Dans le cas de la pétrobactine, la synthèse de cette molécule linéaire est réalisée grâce à deux classes d'enzymes : les NRPS et les NIS (NRPS-independent synthase) qui agissent ensemble pour donner le produit final (209, 210).

La délétion des gènes *bacCEBF* et *asbA* conduit à une diminution de la synthèse des sidérophores dans un milieu carencé en fer (50). La pétrobactine est à la fois essentielle pour la croissance des bactéries dans les macrophages et pour la virulence dans un modèle murin. La diminution du pouvoir pathogène observée chez la souris est principalement due à l'incapacité de la souche $\Delta asbA$ à chélater le fer présent dans le cytosol des macrophages (50, 134). Contrairement à la souche $\Delta asbA$, suite à des mutations au niveau du locus *bacCEBF*, aucun phénotype particulier n'a été observé dans les conditions testées (50). Récemment, d'autres études suggèrent que la protéine FpuA, capable de se lier *in vitro* à la pétrobactine (302, 303) est un récepteur pour la ferri-PB. De plus, une forte diminution de la croissance de la souche $\Delta fpuA$ a été détectée chez la souris (48).

La découverte de la sidérocaldine (113), une lipocaline produite au cours de la réponse immunitaire innée chez les mammifères, permet d'expliquer le rôle prépondérant de la pétrobactine chez la souris. En effet, cette protéine peut séquestrer plusieurs sidérophores microbiens dont la bacillibactine et les rend ainsi inaccessibles aux bactéries pathogènes. Cependant, la pétrobactine n'est pas reconnue par la sidérocaldine (134, 295). Enfin, certaines analyses ont révélé que la synthèse de la pétrobactine débute environ 5h après la germination, ce qui correspond à peu près au temps nécessaire pour la production des sidérophores lors de la germination des spores de *B. anthracis* dans les phagocytes (294). En comparaison, la

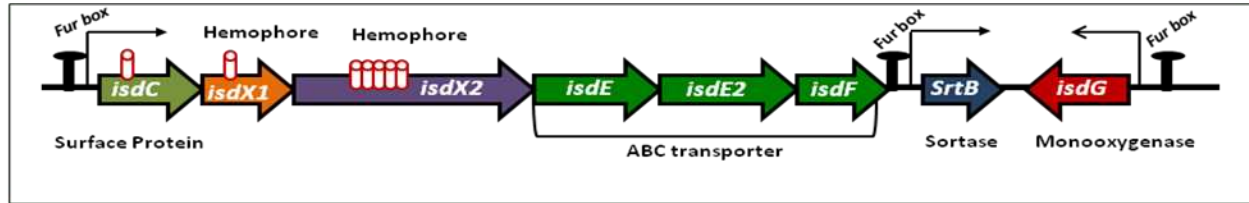


Figure 14 : Représentation schématique du locus *isd* de *B. anthracis*.

Les cylindres rouges indiquent le nombre des domaines NEAT de chacune des protéines IsdC, IsdX1 et IsdX2 (185, 186).

bacillibactine est produite beaucoup plus tardivement. Ces données soulignent le rôle primordial que joue la pétrobactine dans la virulence de *B. anthracis*.

2.2.2. Le système Isd : un réseau dynamique pour l'acquisition de l'hème

Bien que pendant la phase de croissance intracellulaire de *B. anthracis*, les sidérophores soient indispensables pour l'acquisition du fer, ils ne peuvent exploiter efficacement l'important pool de fer présent dans les hémoprotéines. La recherche des gènes potentiellement impliqués dans l'acquisition de l'hème a conduit à l'identification du locus *isd* qui code pour huit gènes présentant des homologies avec ceux du système Isd de *S. aureus* (185). Ce système est composé des gènes *isdC-X1-X2-EDF* qui sont exprimés en un seul transcrit alors que les gènes *srtB* et *isdG* peuvent être transcrits indépendamment (108, 185, 251) (Figure 14). L'expression de ces gènes est régulée par le répresseur Fur qui, dans un milieu riche en fer, vient se fixer sur la boîte Fur empêchant ainsi la transcription de ces gènes. Dans un milieu carencé en fer, Fur se détache de sa boîte, la transcription de ces gènes devient alors possible.

Les études menées sur le système Isd de *B. anthracis* ont permis de démontrer l'implication de ses différents composants dans l'acquisition de l'hème (185, 186, 251). En tant que substrat de la sortase B, IsdC (une protéine contenant un seul domaine NEAT) est ancrée à la paroi bactérienne grâce à son motif NPKTG. Par rapport à la souche sauvage, la croissance des deux souches $\Delta isdC$ et $\Delta srtB$ est affectée en présence d'hème comme unique source de fer. Ceci indique qu'IsdC joue un rôle dans l'acquisition de l'hème (185). Dans des conditions de carence en fer, les deux protéines IsdX1 et IsdX2, qui ne possèdent pas de motif d'ancrage à la paroi, ont été retrouvées dans le milieu extracellulaire; seulement 20 % d'IsdX2 restaient associés à la paroi. Ces protéines ont alors été classées comme étant des hémophores (186). Par ailleurs, une autre étude a défini la protéine IsdX2 (appelée alors IsdK) comme étant une protéine de surface (108). En effet, les analyses *in silico* ont révélé la présence d'un motif NSKTA reconnu par des sortases (108), qui n'a jamais été évoqué chez IsdX2.

IsdX1 (un seul domaine NEAT) et IsdX2 (cinq domaines NEAT) sont toutes les deux capables de capter l'hème. De plus, IsdX1 interagit directement avec l'hémoglobine, suite à cette liaison l'hème est extrait puis transféré aux autres protéines du système Isd (186). La sécrétion d'IsdX1 au cours de l'infection suggère que cette protéine permet de chélater l'hémoglobine libérée suite à la lyse des érythrocytes (186). De nouveaux travaux centrés sur chacun des domaines NEAT de IsdX2 ont montré que les cinq domaines peuvent s'associer à l'hémoglobine.

Mais seuls les domaines N1 et N5 ont la capacité d'extraire l'hème de l'hémoglobine. De plus, alors que les domaines N1, N3, N4 et N5 peuvent capter l'hème, le domaine N2 ne possède pas cette caractéristique (135). La délétion des gènes *isdX1* et *isdX2* a montré une diminution de la croissance des mutants cultivés dans des milieux carencés en fer, supplémentés uniquement avec de l'hémoglobine. Ainsi, lors d'une infection, ces deux protéines semblent être impliquées dans l'acquisition de l'hémoglobine présente dans le milieu extracellulaire (186).

2.2.3. Autres protéines à domaine NEAT chez *B. anthracis* : BslK et Hal

Bien que les études sur les mécanismes impliqués dans l'acquisition de l'hème se soient focalisées sur le système Isd ces dernières années, des travaux récents ont montré que d'autres protéines à domaine NEAT participaient à l'acquisition et au transport de l'hème. La protéine BslK (*B. anthracis* S-layer protein K) est constituée de trois domaines SLH (S-layer homology) et d'un seul domaine NEAT, qui lie l'hème *in vitro* (148, 267). BslK est localisée à la surface (267), elle y est probablement ancrée via ses domaines SLH qui forment des liaisons non covalentes avec le peptidoglycane (14, 25). Récemment, une nouvelle protéine dénommée Hal (Heme-acquisition leucine-rich repeat protein) a été caractérisée. Codée par le gène *bas0520* (souche *B. anthracis* Sterne), cette protéine renferme un seul domaine NEAT, plusieurs domaines LRR (Leucine Rich Repart) et un motif LGATG spécifiquement reconnu par les sortases (15, 107). Malgré l'absence des deux tyrosines conservées dans la majorité des domaines NEAT déjà décrits, le domaine NEAT de Hal a la capacité de se lier à l'hème. En outre, il peut aussi interagir avec l'hémoglobine en solution et extraire l'hème de cette molécule (15).

La délétion du gène *bas0520* conduit à une diminution importante de la croissance de la souche mutante dans des milieux de culture contenant soit de l'hème, soit de l'hémoglobine comme unique source de fer. Ce phénotype du mutant Δ *bas0520* est beaucoup plus marqué que celui observé avec le mutant de l'opéron *isd*. Ces données soulignent le rôle important de Hal dans l'acquisition du fer à partir des hémoprotéines. En revanche, aucun phénotype vis-à-vis de l'acquisition du fer à partir de ces sources de fer n'a été observé suite à la délétion du gène *bslK*. Curieusement, la souche Δ *bslK* pousse mieux que la souche sauvage dans un milieu carencé en fer supplémenté avec de l'hémoglobine (la même chose est observée avec l'hème mais plus tardivement au cours de la croissance) (15). De plus, il a également été démontré récemment que

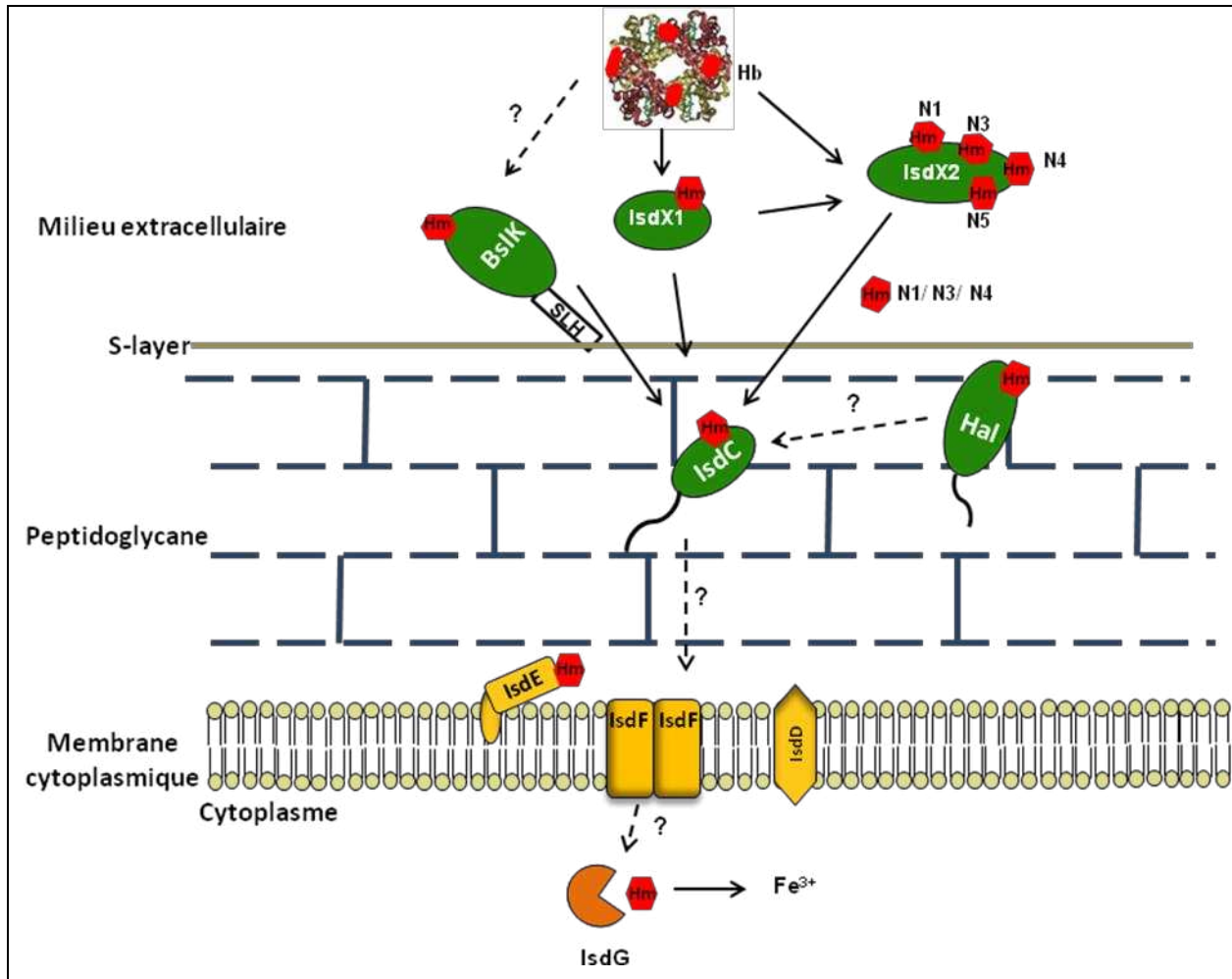


Figure 15 : Modèle du mécanisme de transport de l'hème chez *B. anthracis*.

IsdX1 et IsdX2 sont deux hémophores se trouvant dans le milieu extracellulaire, IsdC et Hal présentent un motif d'ancrage au peptidoglycane (cibles de la sortase). BslK s'associe à la paroi par le domaine SLH. Le transfert de l'hème dans ce modèle est représenté par des flèches noires, les flèches en pointillés indiquent que les études ne sont pas encore achevées.

Hm (hème), Hb (hémoglobine), N1, N3, N4 et N5 sont les domaines NEAT 1 jusqu'à 5 de la protéine IsdX2 sauf le domaine 2. Les domaines **N1, N3 et N4** sont seulement impliqués dans le transfert de l'hème (15, 92, 135, 267).

gbaa0552 (identifié dans la souche *B. anthracis* Ames), l'homologue de *bas0520*, est exprimé dans des conditions de carence en fer et que sa délétion résulte en une atténuation de la virulence chez la souris (47).

Le tableau 4 résume la diversité des fonctions des domaines NEAT de *B. anthracis*.

2.2.4. Transfert de l'hème à travers la paroi et la membrane bactérienne

Chez *B. anthracis*, les mécanismes du transfert de l'hème du milieu extracellulaire vers le cytosol ne sont pas encore complètement établis (Figure 15). Des études supplémentaires sont nécessaires afin de compléter ce modèle.

De part sa localisation dans le milieu extracellulaire, l'hémophore IsdX1 capte l'hème de l'hémoglobine puis le transfère à apo-IsdC et apo-IsdX2. Ces transferts s'effectuent via des interactions physiques entre les domaines NEAT (IsdX1)-NEAT (IsdC/X2) et les cinétiques de transfert sont nettement plus rapides qu'une simple dissociation spontanée de l'hème (92). La protéine BslK participe aussi au transfert de l'hème en coopérant avec les protéines Isd à domaine NEAT. En effet, il a été démontré dernièrement que BslK est capable de céder sa molécule d'hème à IsdC suite à une interaction directe entre holo-BslK et apo-IsdC (267). De plus, l'implication des domaines N1, N3 et N4 d'IsdX2 dans le transfert de l'hème à apo-IsdC a été récemment élucidé (135).

B. anthracis possède donc cinq protéines différentes (BslK, IsdC, IsdX1, IsdX2 et Hal) impliquées dans l'extraction de l'hème contenu dans l'hémoglobine et permettant le passage de cette molécule à travers l'épaisse paroi de la bactérie. Ces données soulignent ainsi la forte redondance de fonction qui existe chez *B. anthracis* pour l'acquisition de l'hème.

Le transfert de l'hème à IsdE, une des composantes du transporteur de type ABC IsdEFD, ainsi que le passage de l'hème dans le cytosol n'ont jusqu'à présent pas été caractérisés. Finalement, la monooxygénase IsdG est responsable de la libération du fer de l'hème dans le cytosol (251).

2.2.5. Rôle du système Isd dans la virulence de *B. anthracis*

Chez le cochon d'Inde, Gat *et al.* (2008) n'ont rapporté aucune différence significative entre la souche sauvage et le triple mutant $\Delta isdCXIX2$ concernant la virulence des bactéries (108). Par ailleurs, plusieurs études indiquent qu'IsdX1 et IsdX2 sont sécrétées au cours de

Tableau 4 : Diversité de fonctions au sein des domaines NEAT de *B. anthracis*

Protéines	Hb	Hème	Extraction de l'hème de l'Hb	Transfert de l'hème	Références
IsdC	-	✓	-	-	(185)
IsdX1	✓	✓	✓	✓	(92, 186)
IsdX2-N1	✓	✓	✓	✓	(135)
IsdX2-N2	✓	Non	Non	Non	(135)
IsdX2-N3	✓	✓	Non	✓	(135)
IsdX2-N4	✓	✓	Non	✓	(135)
IsdX2-N5	✓	✓	✓	Non	(135)
BslK	-	✓	-	✓	(267)
Hal	✓	✓	✓	-	(15)

(-) Données pas encore analysées

✓ Résultat positif

(Non) Résultat négatif

<i>Bacillus anthracis</i>			
		310	
BAS4443 (IsdX1)	48	DKDEESSRMNRY	58
BAS4444 (IsdC)	46	ENDSASMANDY	57
BAS0520 (Hal)	48	NSDEESYATVY	58
BAS1021 (BslK)	59	KTNDTSVASTY	69
BAS4442N1 (IsdX2)	47	TSDEESMMNQY	58
BAS4442N2 (IsdX2)	210	QTDEESKMNTY	221
BAS4442N3 (IsdX2)	370	QTDEISMMNTY	380
BAS4442N4 (IsdX2)	522	KTEEISMMNTY	533
BAS4442N5 (IsdX2)	694	KTEEISMMNQY	704

Figure 16 : Alignement de l'hélice 3₁₀ et sa région adjacente entre les protéines à domaine NEAT chez *B. anthracis*.

Le motif souligné correspond à l'hélice 3₁₀ (de l'Arg-54 jusqu'au Tyr-58) de IsdX1. En vert les résidus aromatiques de la lip (Arginine* 54 et Tyrosine 58). En rouge la sérine adjacente au premier résidu de la région lip et qui est conservée dans tous les domaines NEAT de *B. anthracis*

* Dans l'étude d'Ekworomadu *et al.* 2011, l'arginine a été considérée comme un acide aminé aromatique or ce n'est pas le cas (90).

l'infection chez le cochon d'Inde (57, 186). Dans le cas d'IsdX2, cette protéine a été détectée comme étant un puissant immunogène, ce qui pourrait suggérer un rôle du système Isd dans la pathogénicité de la bactérie (57), (186). Finalement, la délétion d'*isdG* n'a aucun effet sur la capacité des bactéries de se répliquer à l'intérieur des macrophages (251).

2.2.6. IsdX1 : une protéine multifonctionnelle

L'ensemble des études menées sur le système Isd chez *B. anthracis* ont permis de mettre en évidence les fonctions multiples de l'hémophore IsdX1. Son domaine NEAT possède la faculté de lier à la fois l'hème et l'hémoglobine et il possède la capacité d'extraire l'hème de l'hémoglobine (186). Seul le premier domaine NEAT d'IsdX2 est également capable de remplir l'ensemble de ces fonctions (Tableau 4).

Récemment, les structures d'apo et d'holo-IsdX1 ont été résolues (90). Comme les autres domaines NEAT, il comporte huit feuillets β de type immunoglobuline. La poche de fixation de l'hème renferme deux tyrosines conservées (Tyr-136, Tyr-140) et elle est entourée d'un côté par une hélice 3_{10} (résidus Arg-54 à Tyr-58) (Figure 16). Par rapport à l'étude de Pilpa *et al.* réalisée chez *S. aureus* (217), la région lip est en partie conservée avec la présence de plusieurs résidus aromatiques localisés en position 54 et 58 pour IsdX1. De plus, la sérine adjacente au premier résidu de l'hélice 3_{10} (Ser-53) est conservée dans la plupart des domaines NEAT, notamment dans tous les domaines NEAT identifiés chez *B. anthracis* (Figure 16). Des mutations ciblées des résidus situés dans ou à proximité de l'hélice ont conduit à l'identification des acides aminés impliqués dans la liaison à l'hème et l'hémoglobine. Plus spécifiquement, deux résidus de l'hélice, la Ser-53 et l'Arg-54, participent à l'interaction entre IsdX1 et l'hémoglobine. De même, il a été montré que ces deux acides aminés sont essentiels pour l'acquisition de l'hème dans des milieux carencés en fer (90).

2.3. Systèmes d'acquisition du fer chez *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est une bactérie à Gram-positif, impliquée dans des infections opportunistes sévères chez les êtres humains et les animaux. Elle est considérée comme un important contaminant alimentaire à cause de sa tolérance aux fortes concentrations en sel et aux faibles pH. De plus, contrairement à la plupart des bactéries pathogènes, elle peut se multiplier à

basse température (161). En tant qu'agent pathogène intracellulaire, cette bactérie a la capacité d'utiliser le fer présent dans les cellules hôtes.

Dans des conditions de carence en fer, *L. monocytogenes* exprime une protéine nommée SvpA (Surface virulence-associated protein) qui est majoritairement sécrétée. Néanmoins, SvpA se trouve en partie associée à la surface bactérienne par l'action de la sortase B qui reconnaît le motif NAKTN (28, 30). SvpA est impliquée dans la virulence de *L. monocytogenes* chez la souris en permettant aux bactéries de sortir des phagosomes (30). SvpA est l'un des produits de l'opéron *svpA-srtB* qui est l'équivalent de l'opéron *isd* de *S. aureus*. Elle partage 33 % d'homologie avec la protéine IsdC de *S. aureus* ainsi que la capacité de capter l'hème. Mais à l'inverse du système Isd de *S. aureus*, l'opéron *svpA-srtB* ne joue aucun rôle dans l'acquisition de l'hème et de l'hémoglobine (205).

Jusqu'à présent, deux transporteurs de type ABC ont été identifiés chez *L. monocytogenes*. Le premier, codé par l'opéron *fhuCDBG* dont l'expression est dépendante de la disponibilité du fer, permet le transport des hydroxamates ferriques. Le second, codé par l'opéron *hupDGC*, est utilisé pour le transport de l'hème et de l'hémoglobine (143). La délétion de chaque composant de l'opéron (la lipoprotéine HupD, la perméase HupG et l'ATPase HupC) conduit à une diminution de l'acquisition de l'hème et de l'hémoglobine. Cependant, la délétion de l'opéron entier *hupDGC* n'abolit pas complètement la capacité des bactéries de transporter l'hème marqué au ⁵⁹Fe, ce qui suggère l'existence d'un autre transporteur membranaire pour l'hème (143, 297). Finalement, dans un modèle murin, la souche mutante Δ *hupDGC* est moins virulente que la souche sauvage. Ce système joue donc un rôle non négligeable dans le pouvoir pathogène de la bactérie (297).

Curieusement, *L. monocytogenes* ne sécrète pas de sidérophores, elle utilise plutôt les sidérophores produits par d'autres bactéries tels que des hydroxamates (ferrichromes, ferrioxamine B), des catécholates (enterobactine, corynebactine) et d'autres composants riches en fer comme les catécholamines (67-69, 248) et le citrate (1).

2.4. Système d'acquisition du fer chez *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes est une bactérie à Gram-positif, appartenant au groupe A des streptocoques (GAS), qui provoque divers types d'infection chez l'être humain (71). Elle est capable d'utiliser l'hème des hémoprotéines comme source de fer (89, 101).

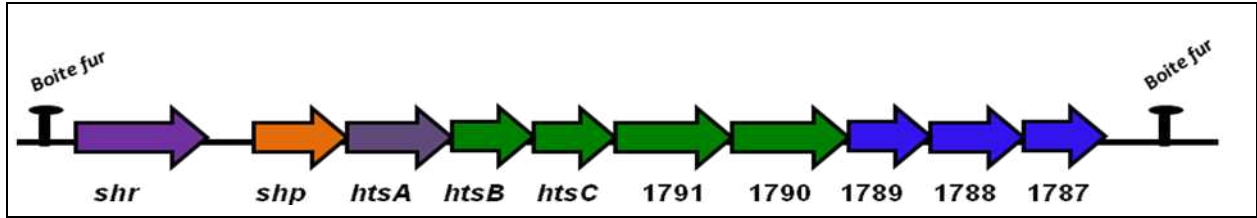


Figure 17A : Représentation schématique des ORF autour du transporteur ABC (*htsABC*) de *Streptococcus Pyogenes* (97, 166).



Figure 17B : Schéma représentatif de la structure de la protéine Shr de *Streptococcus Pyogenes* (208).

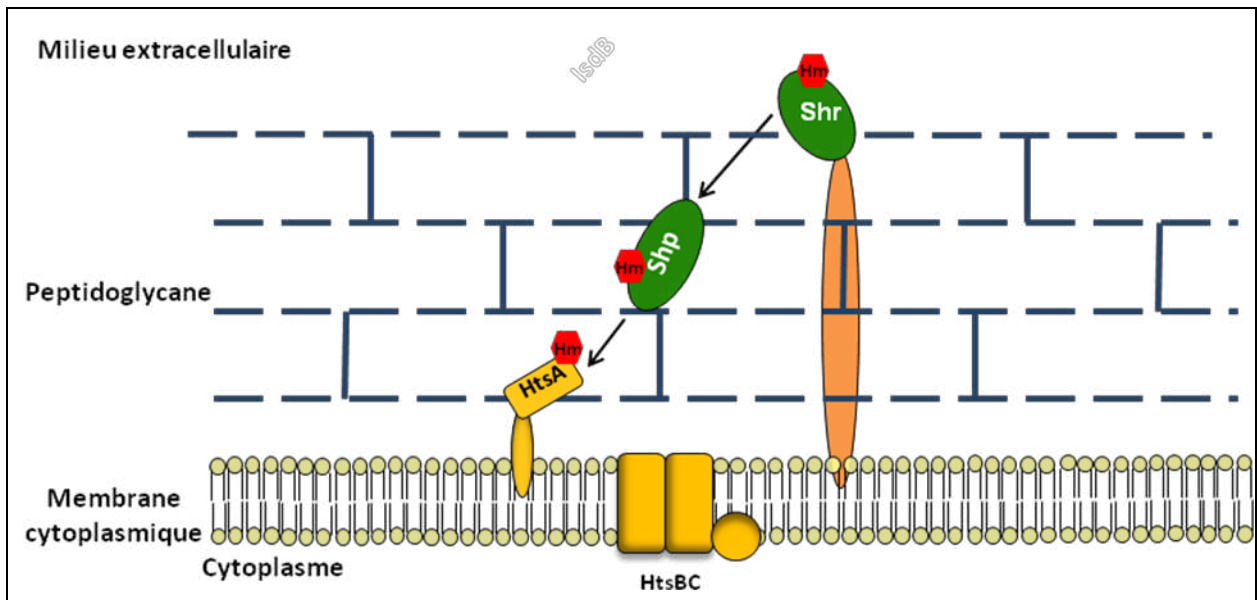


Figure 18 : Modèle du mécanisme de transport de l'hème chez *Streptococcus pyogenes*.

La protéine Shr est ancrée à la membrane cytoplasmique, elle se trouve exposée au milieu extracellulaire. L'hème est transféré d'une manière unidirectionnelle de Shr à Shp puis à HtsA. Hm (Hème) (176, 308).

S. pyogenes produit deux protéines HtsA (appelée SiA dans les travaux de Bates *et al.*) (17, 166) et Shp (167) qui sont notamment impliquées dans l'acquisition de l'hème. HtsA est la lipoprotéine d'un transporteur de type ABC, HtsABC, qui permet le transport de l'hème alors que Shp est une protéine de surface. Les gènes codant pour Shp et HtsA sont localisés au sein d'un même opéron constitué de dix gènes régulés par le répresseur *fur* (18, 167) (Figure 17A). La protéine membranaire Shr (Streptococcal hemoprotein receptor), codée par le premier gène de l'opéron, interagit avec plusieurs sources de fer telles que l'hémoglobine, la myoglobine, l'hème-albumine et les complexes hémoglobine-haptoglobine (17). En plus de son rôle dans la liaison aux hémoprotéines, Shr agit également comme une adhésine qui facilite l'attachement des GAS aux cellules épithéliales, contribuant ainsi au processus infectieux (97).

Par rapport aux protéines Isd, Shr possède une structure assez particulière. Elle renferme un domaine N-terminal (NTD), deux domaines NEAT (N1 et N2) séparés par un domaine LRR (Figure 17B). Les domaines LRR sont connus pour leur rôle dans les interactions protéines-protéines (150). De plus, du côté C-terminal, Shr présente un segment hydrophile avec une queue chargée positivement qui permet l'ancrage de la protéine à la membrane cytoplasmique. Shr traverse toute l'épaisseur de la paroi et est ainsi exposée au milieu extracellulaire (97). Etant donné que les mécanismes d'acquisition de l'hème via Shr diffèrent de ceux caractérisés pour les systèmes Isd, la protéine Shr serait un prototype d'une nouvelle classe de protéines à domaine NEAT. En effet, Shr se lie à l'hème ferrique puis provoque une réduction du fer de l'hème. Plus spécifiquement, les deux domaines N1 et N2 sont responsables de l'acquisition de l'hème, même si les deux tyrosines conservées dans la plupart des domaines NEAT n'y sont pas présentes. D'autres données ont mis en évidence le rôle de la région NTD dans l'interaction avec la méthémoglobine et il semble que les domaines NEAT ne contribuent pas significativement à cette liaison (208).

Chez *S. pyogenes*, un modèle pour le transport de l'hème a été proposé grâce aux études biochimiques réalisées *in vitro*. Ainsi, Shr chargée en hème a la capacité de transférer directement son contenu à apo-Shp mais pas à apo-HtsA (308). Par ailleurs, apo-Shp peut se lier à l'hème de l'hémoglobine. Ce dernier est transféré ensuite à apo-HtsA lors de l'interaction entre les deux protéines (176). Ce transfert direct très rapide se fait de façon unidirectionnelle suite à la formation d'un complexe holoShp-apoHtsA (207), 308) (Figure 18).

2.5. Systèmes d'acquisition du fer chez *Bacillus cereus*

Chez *B. cereus sensu stricto*, il existe très peu d'études sur l'acquisition du fer à partir des sources présentes chez l'hôte. La majorité des recherches ont été centrées sur l'identification des sources de fer qui peuvent être utilisées par *B. cereus*. Cependant, les bases moléculaires des mécanismes impliqués dans l'utilisation de ces sources sont encore mal connues.

2.5.1. Sources de fer utilisées par *B. cereus*

Des travaux réalisés par deux groupes de recherche différents portant sur la capacité de *B. cereus* d'acquérir le fer à partir de la transferrine via les sidérophores ont abouti à des résultats opposés. Sato *et al.* ont montré que *B. cereus* était incapable d'utiliser la transferrine et la lactoferrine pour sa croissance (231, 232). Au contraire, Park *et al.* ont établi que *B. cereus* était capable d'utiliser la transferrine comme source de fer grâce à des sidérophores de type catécholate (211). Ainsi, pour l'instant, l'utilisation de la transferrine par *B. cereus* reste ambiguë.

B. cereus peut utiliser l'hème, l'hémoglobine et les complexes hème-albumine et hémoglobine-haptoglobine. De plus, elle peut extraire l'hème des hémoprotéines. Une fois libéré, l'hème sera capté et assimilé par la bactérie (231, 232). Récemment, nous avons mis en évidence au laboratoire que la ferritine pouvait aussi servir à la croissance de *B. cereus*. En revanche, ni la transferrine, ni la lactoferrine ne pouvaient servir comme source de fer à la bactérie dans nos conditions de culture (74).

2.5.2. Les sidérophores chez *B. cereus*

Certaines souches de *B. cereus* produisent deux sidérophores de la famille des catécholates: la petrobactine (PB) et la bacillibactine (BB) (déjà décrits en détails précédemment chez *B. anthracis*). *B. thuringiensis* produit uniquement la bacillibactine. Cette dernière semble être produite chez toutes les espèces du groupe *B. cereus sensu lato*, alors que la pétrobactine est a priori une caractéristique des espèces pathogènes des vertébrés (295). Cependant, la pétrobactine a également été retrouvée chez d'autres espèces non pathogènes de vertébrés. Chez *B. cereus sensu stricto*, les loci impliqués dans la voie de biosynthèse de la bacillibactine et de la pétrobactine sont homologues à ceux décrits chez *B. anthracis*. Concernant la bacillibactine, les gènes *entA-dhbBCF* codent les enzymes impliquées dans l'assemblage de la bacillibactine.

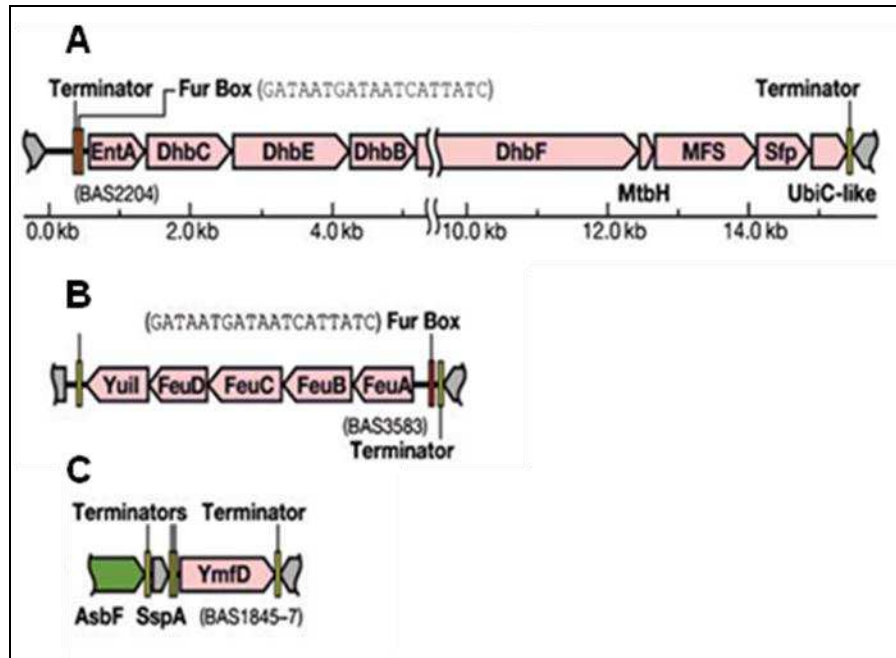


Figure 19 : Voie de biosynthèse de la bacillibactine décrite chez *B. anthracis* (136).

A. Les enzymes impliquées dans l'assemblage de la bacillibactine sont organisées en opéron composé des gènes *entA-dhbBCF*.

B. L'opéron *feuABCD/yuiI* est responsable de l'internalisation de la bacillibactine.

C. Le gène responsable de l'export du sidérophore.

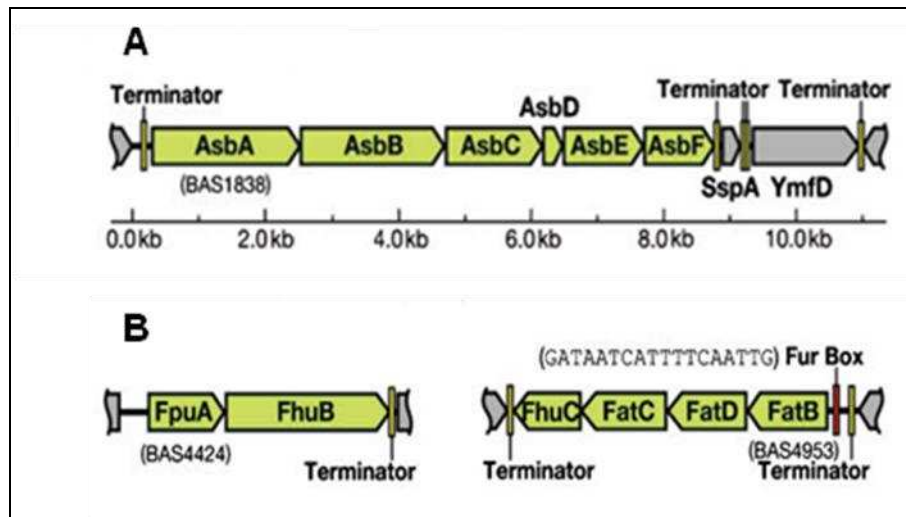


Figure 20 : Voie de biosynthèse de la petrobactine chez *B. anthracis* (136).

A. L'opéron *asbABCDEF*

B. Les opérons *fpuA/fhuB* et *fatBCD/fhuC* (Hotta)

L'internalisation de la bacillibactine est réalisée par des protéines codées par l'opéron *feuABCD/yuiI* et enfin l'export du sidérophore se fait par l'intermédiaire d'un transporteur de type MFS codé par le gène *ymfD* (136) (Figure 19). Pour la pétrobactine, les enzymes impliquées dans l'association des différents précurseurs du sidérophore sont codées par l'opéron *asbABCDEF* et les gènes jouant un rôle dans l'acquisition de la pétrobactine sont portés par les opérons respectifs *fpuA/fhuB* et *fatBCD/fhuC* (136) (Figure 20).

2.5.3. Autres systèmes impliqués dans l'acquisition du fer

Un système d'acquisition du citrate ferrique a été identifié dans le génome de *B. cereus*. Ce système repose sur un transporteur de type ABC, codé par l'opéron *FecABC* où *FecA* code pour la protéine de liaison au substrat, *FecB* code pour la perméase et *FecC* pour l'ATPase. Des infections de larves de lépidoptères (*Manduca sexta*) ont montré que cet opéron jouait un rôle dans la virulence de *B. cereus* (130).

Par ailleurs, *B. cereus* produit au moins quatre hémolysines parmi lesquelles l'hémolysine II (HlyII) qui est une protéine sécrétée responsable de l'hémolyse (249). Chez *B. cereus*, le rôle de HlyII dans la virulence chez la souris et chez les insectes a été démontré (273). La toxicité de la protéine est liée à sa capacité de former des pores dans les membranes cellulaires (6). L'expression d'HlyII est contrôlée par son propre régulateur HlyIIR mais aussi par le répresseur Fur (250). HlyII participe donc indirectement à l'acquisition du fer en lysant les érythrocytes, ce qui permet à *B. cereus* d'accéder à l'hémoglobine ainsi libérée.

2.5.4. IIsA : une nouvelle protéine impliquée dans l'acquisition du fer

Chez *B. cereus*, le développement d'un système IVET (*In Vivo Expression Technology*) a permis d'identifier de nouveaux gènes spécifiquement exprimés *in vivo* au cours de l'infection chez la larve du lépidoptère *Galleria mellonella*. Parmi ces gènes, le gène *ivi29* codant une protéine impliquée dans l'acquisition du fer dénommée IIsA (Iron regulated leucine- rich surface protein) a été caractérisé (93). L'analyse de la séquence protéique d'IIsA a montré la présence de quatre domaines conservés : un peptide signal en N-terminal de 28 acides aminés, un domaine NEAT suivi d'un domaine LRR et de trois domaines SLH (S-layer homology) du côté C-terminal (93) (Figure 21). Il a été démontré qu'IIsA était produite et localisée au niveau de la surface uniquement en condition de carence en fer, ce qui est en accord avec la présence d'une

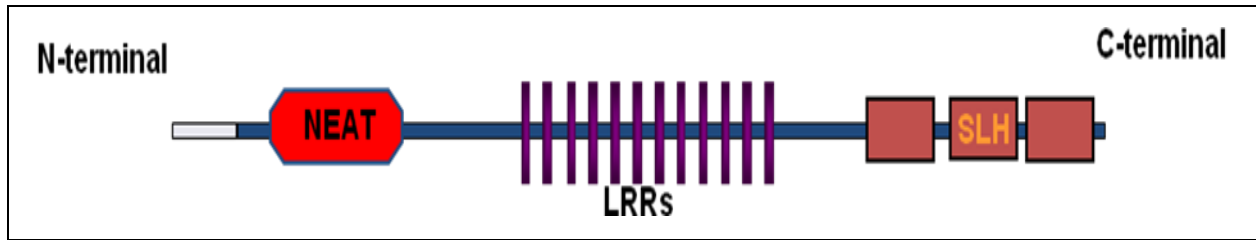


Figure 21 : Modèle représentant les différents domaines de la protéine IisA de *B. cereus* (74, 93).

boite *fur* dans sa région promotrice (74). Le fait qu'IlsA possède un peptide signal et des domaines SLH conforte la localisation de cette protéine à la surface et suggère qu'elle est liée de façon non-covalente au peptidoglycane via ses domaines SLH (196). IlsA peut capter l'hème ferrique et des tests d'affinité (ELISA et Biacore) indiquent qu'il existe une interaction entre IlsA et l'hémoglobine d'une part, et la ferritine d'autre part (74). Les caractéristiques de sa structure suggèrent que l'interaction avec les hémoprotéines se fait via le domaine NEAT.

Concernant les domaines LRR d'IlsA, ils présentent une certaine homologie avec ceux des internalines InIA et InIB, identifiées et caractérisées chez *L. monocytogenes* (103, 175). Chez l'être humain, InIA favorise l'adhésion et l'invasion bactérienne des cellules épithéliales intestinales via une interaction spécifique avec le récepteur E-cadherine de l'hôte (164, 195). InIB permet l'entrée des bactéries dans les cellules de mammifères en interagissant avec un récepteur de type tyrosine kinase (247). Ainsi, il est possible qu'IlsA ait un rôle dans l'adhésion aux cellules de l'hôte en plus de son rôle dans l'acquisition du fer (29, 105, 237).

IlsA est pour l'instant la seule protéine de surface capable d'interagir avec la ferritine à avoir été identifiée chez les procaryotes. En outre, IlsA est impliquée dans la virulence de *B.cereus* chez *G. mellonella* et le gène *ilsA* est exprimé spécifiquement dans l'hémocoèle (sang) chez l'insecte (74).

3. Régulation de l'acquisition du fer chez les bactéries

Chez les bactéries à Gram-négatif et à Gram-positif à faible pourcentage en GC, la régulation du métabolisme du fer se fait par l'intermédiaire du répresseur transcriptionnel Fur (Ferric uptake regulator). L'activité de ce régulateur est dépendante de la quantité de fer disponible dans le milieu. En présence de fer, l'ion ferreux se lie au niveau C-terminal de la protéine Fur qui forme alors des dimères et se fixe sur une séquence palindromique d'ADN (séquence consensus TTAGGTTAGCCTAACCTAA) : la boîte *fur*, empêchant ainsi la transcription des gènes du régulon Fur. Quand la concentration en fer devient trop faible, Fur se dissocie de l'ADN permettant à l'ARN polymérase d'accéder aux promoteurs et par conséquent d'initier la transcription des gènes impliqués dans l'acquisition du fer (49, 91). Généralement les souches mutantes Δfur expriment de manière constitutive les gènes régulés par Fur même en présence d'une forte concentration de fer (102). La boîte *fur* a été identifiée en amont de

nombreux systèmes d'acquisition de l'hème, y compris les systèmes Isd chez *S. aureus* (191) et *B. anthracis* (185).

Par ailleurs, Fur n'est pas le seul régulateur répondant à la disponibilité en fer. Un autre régulateur appelé DtxR (Diphtheria Toxin regulator) présent chez les bactéries à Gram-positif à fort pourcentage en GC comme les mycobactéries et les streptomycètes. DtxR régule un ensemble de gènes ayant des fonctions similaires à ceux régulés par Fur. Certains sont impliqués dans la biosynthèse des sidérophores, d'autres dans l'acquisition du fer ou dans la réponse au stress oxydatif. D'une façon similaire au répresseur Fur, en présence d'une forte concentration en fer, DtxR se dimérise puis se fixe à la boîte DtxR (TTAGGTTAGCCTAACCTAA) (3).

Enfin, d'autres régulateurs permettent de limiter la concentration de l'hème dans les cellules. En effet, en trop grandes quantités, l'hème peut devenir toxique. Dans le cas où l'équilibre entre l'acquisition de l'hème et l'activité monooxygénase est perturbé, les bactéries ont recours à d'autres moyens pour limiter l'accumulation de l'hème dans le cytosol. Il existe des pompes d'efflux de l'hème qui peuvent percevoir la présence d'hème libre dans le cytosol. Le premier système de détection de l'hème fut décrit chez *Corynebacterium diphtheriae*. Il s'agit d'un système à deux composantes comprenant une kinase ChrS et un régulateur ChrA (234). Il a été démontré que ChrS peut phosphoryler ChrA en présence d'hème, ce qui conduit à l'activation de la monooxygénase hmuO (27). Chez *S. aureus*, le système HssRS similaire à celui de *C. diphtheria* a été identifié. HssS est la kinase alors que HssR joue le rôle de régulateur spécifique de la monooxygénase (257-259, 271).

Chez certaines bactéries pathogènes à Gram-positif, le régulateur CodY contrôle l'expression de plusieurs gènes liés à la virulence (255, 278). Chez *B. anthracis*, CodY peut agir comme répresseur ou activateur de l'expression de nombreux gènes, y compris certains gènes impliqués dans l'homéostasie du fer (278). CodY est essentielle pour la régulation de l'acquisition de l'hème. Sa délétion peut mener à une diminution de croissance dans des conditions de carence en fer (53).

Objectifs du projet de la thèse

1. Cadre du sujet de la thèse

Rappels sur IIsA (Iron-regulated leucine rich surface protein)

Dans notre équipe, Génétique Microbienne et Environnement (GME), grâce à un système IVET (*In Vivo* Expression Technology), une nouvelle protéine IIsA impliquée dans l'acquisition du fer fut identifiée chez *B. cereus*. Les travaux menés par Sinda Fehdila (Postdoc en 2004) et Nadine Daou (étudiante en thèse 2005-2008) ont abouti à des résultats qui soulignent l'importance de cette protéine dans l'acquisition du fer au cours de l'infection (74,93). La particularité de cette protéine réside dans sa capacité à interagir avec deux "familles" de sources de fer différentes : les hémoprotéines (hème et hémoglobine) et la ferritine. Depuis environ dix ans, les systèmes d'acquisition du fer à partir des hémoprotéines chez les bactéries à Gram-positif ont connu un avancement considérable, notamment les systèmes Isd décrits dans l'introduction. En revanche, à part la protéine IIsA, l'implication des protéines bactériennes dans l'acquisition du fer de la ferritine exogène n'est que rarement évoquée dans la littérature. Toutefois, une protéine nommée Als3 chez la levure *Candida albicans* a été démontrée comme étant un récepteur pour la ferritine, permettant uniquement à la forme hyphale de se lier à cette source de fer (4). Par conséquent, les résultats obtenus par l'équipe GME où j'ai effectué la majorité de mes expériences, ont révélé l'existence d'un nouveau mécanisme d'acquisition du fer, adapté aux sources présentes chez les invertébrés (ex : la ferritine) et chez les vertébrés (ferritine et l'hémoglobine). Ces résultats ont apporté des nouveaux éléments sur l'écologie et l'adaptation des différentes espèces du groupe *B. cereus* à leurs hôtes : insectes et mammifères. Le projet de thèse vise à comprendre d'avantage le rôle de la protéine IIsA, de structure et de fonctions si particulières, dans l'acquisition du fer.

1.1. Objectifs principaux de la thèse

L'objectif principal de la thèse est d'approfondir nos connaissances sur le fonctionnement de la protéine IIsA et d'élucider le mécanisme de transport de l'hème et du fer de la ferritine via cette protéine. Ainsi, le projet de la thèse porte deux volets principaux :

1. Le premier volet s'articule sur l'identification des partenaires d'IIsA impliqués dans le transport de l'hème à travers la paroi de *B. cereus*. De même, nous nous sommes intéressés à déterminer le ou les domaines qui jouent un rôle direct dans la liaison avec l'hème.

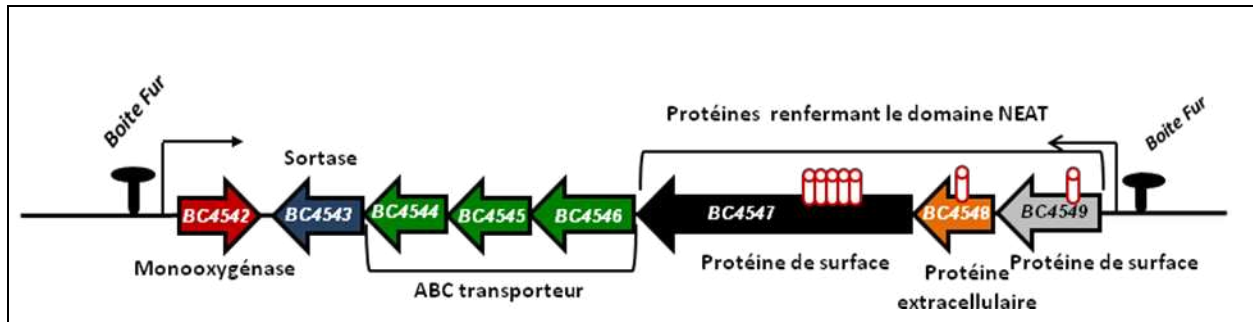


Figure 22 : Représentation schématique du locus *isd* chez *B. cereus*

Le locus *Isd* de *B. cereus* est composé de trois protéines à domaine NEAT: Bc4549, Bc4548 et Bc4547. Le nombre de domaines NEAT est symbolisé par les cylindres rouges. Les motifs NPKTG et NSKTA de Bc4549 et Bc4547 respectivement, sont les substrats de la sortase B putative (Bc4543). Le système ABC est formé de la protéine de liaison au ferrichrome (Bc4546), une perméase (Bc4545) et d'une ATPase (Bc4544). Le système renferme deux boîtes Fur, une en amont de la monoxygénase (Bc4542) et une deuxième en amont de la première protéine de surface (Bc4549).

2. Le deuxième volet est consacré à la caractérisation des facteurs qui interviennent dans la libération et le transfert du fer stocké dans la ferritine. De plus, nous avons voulu approfondir les études sur l'interaction entre IIsA et la ferritine et définir le (les) domaines d'IIsA qui en sont responsables.

1.2. Situation du sujet et objectifs détaillés

1.2.1. IIsA et ses partenaires dans le transport du fer

Lors des travaux de thèse de Nadine Daou, 2008 (138) plusieurs approches (expériences de pull down, immuno-précipitations, des analyses protéomiques ainsi que l'étude du rôle d'un transporteur de type ABC dans l'acquisition du fer) ont été tentées afin d'identifier les protéines avec lesquelles IIsA pourrait interagir pour transporter le fer. Ces expériences n'ont pas abouti à des résultats concluants et les molécules partenaires d'IIsA, participant au processus du transport du fer de l'hème ou bien de la ferritine sont restées non identifiées. Le premier objectif de ma thèse consistait alors en la recherche et l'identification des candidats qui agiraient en concert avec IIsA pour amener le fer au cytosol de *B. cereus*.

1.2.1a. IIsA et le transport de l'hème

Les études précédentes ont montré qu'en carence de fer, IIsA est localisée à la surface de *B. cereus* (74); il est alors probable qu'IIsA lie l'hémoglobine par l'intermédiaire de son domaine NEAT et ensuite transfère l'hème à une autre protéine de surface. Des analyses *in silico* ont révélé dans le génome de *B. cereus*, la présence d'un système Isd similaire à ceux décrits dans l'introduction et identifiés chez plusieurs bactéries à Gram-positif. L'hypothèse de notre travail s'est ainsi basée sur l'étude de l'interaction entre IIsA et les protéines de surface appartenant au locus *isd*. Ce locus renferme huit gènes codant trois protéines à domaines NEAT, dont deux (Bc4549 et Bc4547) ayant des motifs cibles pour une sortase B (Bc4543), et pouvant ainsi être des protéines de surface. Par ailleurs, Bc4548 exempté d'un motif d'ancrage au peptidoglycane semble être une protéine extracellulaire. Bc4546, Bc4545 et Bc4544 constituent le transporteur ABC du système (Figure 22). Une forte homologie s'est avérée entre le système Isd de *B. cereus* et celui de *B. anthracis*. Il existe respectivement 98 % d'identité entre IsdC, IsdX2 de *B. anthracis* et Bc4549, Bc4548 de *B. cereus*. En outre, Bc4547 partage 86 % d'identité en acides

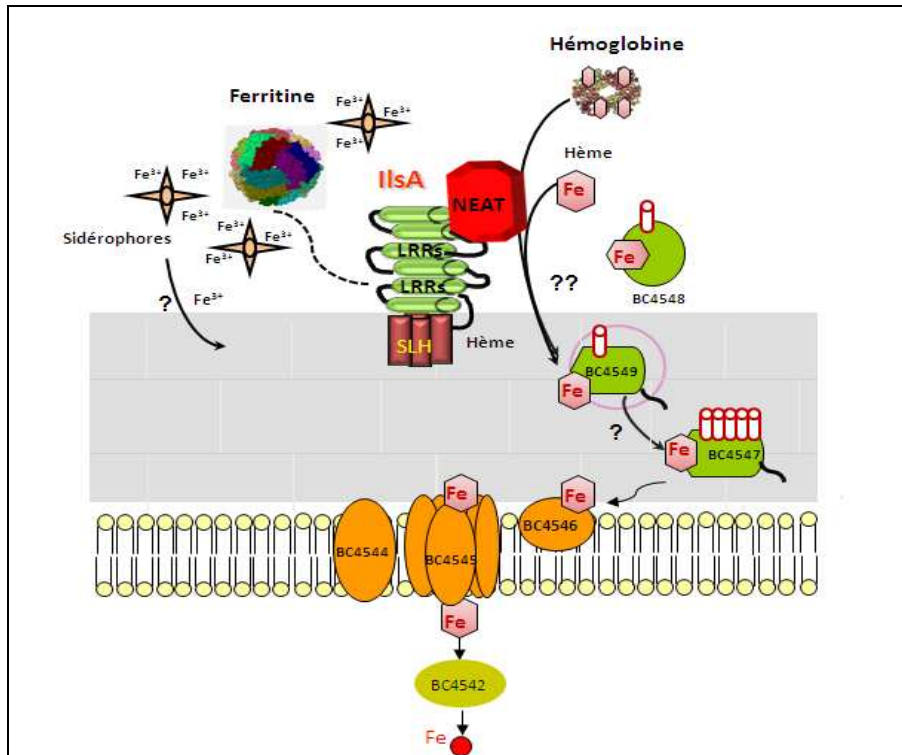


Figure 23 : Schéma du modèle de travail : transfert de l'hème et du fer de la ferritine via IIsA et des partenaires putatifs.

Les partenaires d'IIsA dans le transfert de l'hème à travers la paroi jusqu'au cytosol sont proposés d'être les composés du système Isd de *B. cereus*. IIsA pourra livrer son hème en premier, à la première protéine de paroi Bc4549 (nommée IsdC dans notre étude).

L'interaction d'IIsA avec la ferritine impliquerait l'intervention des sidérophores afin de chélater le Fe^{3+} , qui sera ensuite acheminer vers le cytoplasme.

LRR=Leucine rich repeat

NEAT= Near iron transporter

SLH= S-layer homology

Les cylindres rouges indiquent le nombre des domaines NEAT

Les losanges avec le fer représentent l'hème

Figure inspirée de la thèse de Daou, N. 2008 (138).

aminés avec la protéine IsdX2 (Ba). Deux boîtes *fur* ont été détectées au sein du système, ce qui indique l'expression de ces gènes dans des conditions de carence en fer.

Sur ces bases nous avons initié le projet de thèse par l'étude du rôle du locus *isd* entier dans l'acquisition de l'hème et l'hémoglobine. De même, nous avons travaillé séparément sur chacun des gènes (*Bc4549*, *Bc4548* et *Bc4547*). Plusieurs études génétiques, biochimiques et biophysiques ont été entreprises dans le but d'évaluer l'existence d'un lien entre IIsA et les protéines Isd. Nous avons en particulier travaillé sur la première protéine du système (*Bc4549*) dénommée IsdC. Les deux protéines IIsA et IsdC ont été purifiées et des études d'interactions et de transfert d'hème ont été conduites.

1.2.1b. IIsA et la ferritine : interaction, libération et transport du fer

L'implication d'IIsA dans l'acquisition du fer de la ferritine constitue une découverte innovante qui nous a incités à poser plusieurs questions : i) est-ce que l'interaction d'IIsA avec la ferritine pourra-t-elle induire un déplacement des sous-unités de la molécule afin de promouvoir la libération du fer? ii) Une fois le fer libéré, quels partenaires à IIsA seraient impliqués dans le transport du fer? L'objectif était donc d'élucider le (les) mécanismes de transport du fer à partir de la ferritine jusqu'au cytosol bactérien. Une des hypothèses la plus plausible serait que la liaison d'IIsA à la ferritine, provoquerait une libération du fer de la coque de la ferritine et que le fer libre serait ensuite pris en charge par des sidérophores produits par *B. cereus*. En effet, l'existence des machineries de production, d'export ainsi que d'internalisation de la bacillibactine et la petrobactine chez *B. cereus*, laisse penser que ces sidérophores seraient des partenaires éventuels d'IIsA dans le transport du fer à partir de la ferritine.

Ces hypothèses sont représentées sous forme d'un modèle de travail (Figure 23), qui illustre les partenaires putatifs de transport de l'hème et du fer de la ferritine via IIsA

2. Approches et stratégies de travail

2.1. Phénotype des gènes *isd*, du locus entier et des sidérophores dans l'acquisition des hémoprotéines et la ferritine

Afin d'étudier le rôle du locus *isd* dans l'acquisition du fer à partir de l'hème et l'hémoglobine nous avons réalisé en premier des mutations par double recombinaison homologue de chacun des gènes suivants : *Bc4549* (*isdC*), *Bc4548*, *Bc4547* puis un double

mutant *Bc4549Bc4547* et en dernier le locus *isd* entier. Pour évaluer l'implication de ces différents mutants dans l'acquisition des hémoprotéines nous avons commencé notre étude par des analyses *in vitro* qui consistent à suivre l'index de croissance (l'index est basé sur la croissance bactérienne mesurée dans les conditions de carence en fer supplémentées ou non par les sources de fer, par rapport à la croissance en milieu LB non carencé (index=1)) comme il a été décrit précédemment (74). Cette approche a été choisie pour être dans les conditions déjà adoptées avec le mutant *ilsA*. Toutefois, cette méthode n'était pas optimale pour les analyses des mutants *Isd*. De plus, nos travaux ont montré que le rôle essentiel d'*IlsA* dans l'acquisition du fer, publié auparavant était erroné (74). Les expériences de croissance du mutant *ilsA* avaient été réalisées en présence de tétracycline. Or, la présence de cet antibiotique dans le milieu de culture accentue la chélation d'ions de fer, induisant une forte perte dans la croissance observée au niveau du mutant $\Delta*ilsA*$ (cf. article 1 et résultats complémentaires).

Finalement, après plusieurs tentatives nous avons réussi à trouver une méthode optimale pour le suivi des phénotypes des mutants dans l'acquisition des sources de fer. Cette méthode semble être reproductible et moins sensible aux variations des conditions expérimentales. Il s'agit d'une étude de la cinétique de croissance bactérienne, effectuée dans des plaques à 96 puits en utilisant un lecteur de plaque (TECAN Infinite M200 Microplate Reader). La densité optique a été mesurée toutes les heures pendant 16 h. Cette méthode a été appliquée tardivement aux mutants suivants: *ilsA*, le locus *isd* entier, *isdC* et le double mutant *isdilsA*.

De plus, la même méthode a été utilisée pour évaluer les rôles des mutants sidérophores $\Delta*enta*$ (Bacillibactine) et $\Delta*asb*$ (Petrobactine) dans l'acquisition du fer de la ferritine.

2.2. Rôles du système *Isd* et des sidérophores dans la virulence

Nous avons choisi d'infecter la larve du lépidoptère *G. mellonella* par injection afin d'évaluer l'implication du locus *isd* et de chacun des mutants $\Delta*entA*$ et $\Delta*asb*$ dans la pathogénicité. C'est le dernier stade larvaire du papillon *G. mellonella* (la teigne des ruches d'abeilles) qui nous a servi comme modèle d'infection dans cette partie de l'étude. Chez *B. cereus*, ce modèle a permis d'évaluer le rôle de nombreux gènes dans la virulence après infection soit par voie orale ou bien par injection directe des bactéries dans l'hémocoèle. Le rôle d'*Isd* et des sidérophores dans la virulence a été évalué avec trois doses de bactéries en phase végétative. La mortalité a été relevée de 20 à 72 heures post infection.

2.3. Transfert de l'hème de la protéine IIsA à IsdC

L'étude du transfert de l'hème de la protéine IIsA à IsdC repose principalement sur des techniques de biochimie et de biophysique. Dans cette partie, nous avons adopté plusieurs stratégies afin de démontrer le transfert du groupement d'hème du donneur au récepteur. Nous avons utilisé les techniques suivantes : Stopped-Flow, chromatographie d'affinité et la micro-calorimétrie ITC (Isothermal Titration Calorimetry).

2.3.1. Principe du Stopped-Flow

Le Stopped-Flow est l'une des techniques qui est fréquemment utilisée pour l'étude des cinétiques rapides des réactions chimiques. En principe, deux réactifs (A et B) présents dans deux seringues séparées sont mélangés rapidement dans un mixer, le mélange (A+B) sera ensuite conduit vers une cellule d'observation. A un certain point, le débit s'arrête instantanément et la réaction pourra être suivie par des mesures spectrophotométriques (ex : l'absorbance détectée par l'UV/Vis), la fluorescence et par le dichroïsme circulaire. A l'issue d'une réaction, le changement dans le signal spectroscopique en fonction du temps sera enregistré. Cette technique permet la détermination des constantes de la vitesse de la réaction (k) qui quantifient la vitesse à laquelle une réaction a lieu. De plus, l'intérêt général du Stopped-Flow réside dans sa capacité à caractériser la complexité et les mécanismes d'une réaction. Il est en effet conçu pour réaliser des mélanges rapides de réactifs et donner accès à des mesures de l'ordre de la milliseconde. L'équipement Stopped-Flow (J&M Tidas diode array spectrophotometer) au laboratoire de M. Fadi Bou-Abdallah, à l'université de Potsdam aux Etats Unis, a été employé pour étudier les cinétiques de transfert de l'hème de holo-IIsA à apo-IsdC. Dans cette étude la protéine holo-IIsA est rapidement mélangée avec apo-IsdC et la réaction de transfert est suivie simultanément par la diminution de l'absorbance à ~ 405 nm correspondante à la perte de l'hème de holo-IIsA et l'augmentation de l'absorbance à ~ 426 nm représentant le transfert. Cette technique est largement utilisée dans plusieurs études conduites sur le transfert d'hème d'une protéine à une autre (92, 177, 267). De plus, le Stopped Flow nous a servi à déterminer les cinétiques d'association entre l'hème et IIsA entière et son domaine NEAT (IIsA^{NEAT}).

2.3.2. Chromatographie d'affinité

Cette technique est basée sur l'utilisation d'un gel de sépharose couplé à la glutathione qui permet de fixer des molécules portant un tag (étiquette) GST (glutathione transférase). Il s'agit de mettre deux protéines en contact : l'une chargée en hème et l'autre sous forme apo. Après un certain temps, la protéine fixée au gel de la colonne par l'intermédiaire du tag GST sera séparée de l'autre (par élution douce) qui se trouve libre dans l'éluat. Celui-ci, aussi bien que le sédiment (le gel), sont analysés par spectrophotométrie afin de mesurer la présence de l'hème sur chaque protéine et de déterminer ainsi le taux de transfert de l'hème de la protéine donatrice à la protéine réceptrice.

2.4. ITC : principe et méthode

La technique d'ITC permet de mesurer l'interaction entre deux molécules et de déterminer les paramètres thermodynamiques qui en découlent : l'enthalpie de la liaison (ΔH°), la constante d'association (K_a) la stœchiométrie de la réaction (n) ainsi que l'énergie de Gibbs (ΔG°) et l'entropie (ΔS°). Dans une expérience d'ITC, une macromolécule placée dans la cellule de mesure d'un calorimètre isotherme sera titrée par des injections constantes d'un ligand contenu dans une seringue pour progressivement atteindre la saturation. L'interaction entre deux molécules s'accompagne d'un échange de chaleur (soit une absorption ou bien une émission). Le suivi des interactions se fait alors indirectement par un suivi des échanges thermiques. En fonction de la quantité de complexe, des signaux thermiques proportionnels sont obtenus. Ces signaux sont enregistrés grâce au logiciel TA Instruments (Spectralys 2.0). En principe, la différence de chaleur est exprimée comme la puissance électrique requise pour maintenir une température constante entre la cellule contenant l'échantillon et la cellule de référence. Quand la macromolécule est saturée par le ligand, le signal de chaleur diminue et il ne reste plus que la chaleur de la dilution. Dans notre étude, les tests d'ITC ont été conduits avec un instrument "Nano ITC low volume" (180 μ l, TA Instrument) qui est conçu spécifiquement pour les échantillons à volume réduit. Ce système est alors économique en termes de concentration, permettant la consommation de beaucoup moins de protéines par rapport aux systèmes d'ITC classiques.

Les résultats obtenus par Nadine, Daou (74, 138) ont montré par les techniques d'ELISA et Biacore une interaction directe entre IlsA et respectivement la ferritine et l'hémoglobine.

Comment l'interaction entre une protéine bactérienne et une grande molécule comme la ferritine peut avoir lieu était une question à laquelle nous avons accordée un grand intérêt. Dans ce contexte, nous avons utilisé en plus de la ferritine commerciale (Horse spleen de chez Sigma), différents types de ferritines recombinantes humaines (homopolymères et hétéropolymères) pour évaluer leur interaction soit avec IIsA entière soit ses domaines séparés, par l'intermédiaire de l'ITC. Grâce à cette technique, des informations sur les paramètres thermodynamiques et la stœchiométrie qui résultent de l'interaction ont été obtenues. L'interaction entre holo-IIsA et apo-IsdC a aussi été réalisée par ITC.

Résultats

L'ensemble des travaux a, pour le moment, fait l'objet de deux manuscrits d'articles dont un, est soumis au journal "Metallomics" et le second est en préparation pour une soumission à Plos Pathogens.

Article 1: The heme interplay between IIsA and IsdC, two structurally different surface proteins of *Bacillus cereus*

Le premier article est focalisé sur la protéine IIsA et le transfert de l'hème à la protéine IsdC. Il rapporte de nouvelles informations sur le mécanisme de liaison d'IIsA avec l'hémoglobine et l'hème. Cet article se base principalement sur des études biochimiques et biophysiques qui évaluent l'association de l'hème aux différentes protéines : IIsA, le domaine NEAT d'IIsA seul et la protéine IsdC. De plus, il décrit le transfert de l'hème de holo-IIsA (chargée en hème) à apo-IsdC (sans hème), qui s'effectue notamment par l'association entre les deux protéines. Par ailleurs, le rôle du locus *isd* dans l'acquisition de l'hème et l'hémoglobine et dans la virulence chez le modèle d'infection *G. mellonella* a été analysé.

Heme interplay between IIsA and IsdC, two structurally different surface proteins from *Bacillus cereus*

Elise Abi Khalil^{1,2,3§}, *Diego Segond*^{1§}, *Tyson Terpstra*³, *Mireille Kallassy*², *Didier Lereclus*¹, *Fadi Bou-Abdallah*^{3*} and *Christina Nielsen Le Roux*^{1*}

¹INRA, UMR 1319 Micalis, La Minière, 78650 Guyancourt cedex, France

²Laboratory of Biotechnology, Saint-Joseph University, Beyrouth, Lebanon.

³Department of Chemistry, State University of New York at Potsdam, Potsdam, NY 13676, USA

Iron is an essential element for bacterial growth and virulence. Because of its limited bioavailability in the host, bacteria have adapted several strategies to acquire iron during infection. In the human opportunistic bacteria *Bacillus cereus* an **I**ron-regulated **L**eucine rich **S**urface protein type **A** (IIsA) is shown to be involved in iron acquisition from both ferritin and hemoproteins. IIsA has a particular structure consisting of a NEAT and several LRR domains with unknown roles in iron acquisition. Here, we characterize the function of full length IIsA, an IIsA^{NEAT} domain mutant and the individual NEAT and LRR domains and their involvement in heme binding. We then investigate a possible interplay between IIsA and the *B. cereus* Isd system (**I**ron **s**urface **d**eterminants) known to be involved in heme acquisition in other Gram-positive bacteria. We demonstrate that IIsA binds heme, via the NEAT domain with a 1:1 stoichiometry and that this domain is able to extract heme from hemoglobin in solution. The growth of the *isd* operon mutant in the presence of hemin and hemoglobin was affected and virulence toward insect larva was decreased. Biochemical and biophysical analysis of heme-containing IIsA (holo-IIsA) and heme-free IsdC (apo-IsdC) revealed a direct heme transfer from donor to acceptor. Our results show that the NEAT domain of IIsA is involved in heme acquisition from hemoglobin, that holo-IIsA delivers heme to IsdC and the LRR domain alone is not able to bind heme or hemoglobin. All together our results show for the first time that two different surface proteins present in *Bacillus cereus* can interact to ensure heme acquisition.

Introduction

Iron is an essential element for most living organisms and is normally found in complex with host proteins such as hemoglobin, ferritin and transferrin, among others (1). Pathogenic bacteria have developed a number of strategies involving various iron and heme acquisition and uptake systems including a network of surface and membrane proteins found in both Gram-positive and Gram-negative bacteria. While extracellular or surface hemophores interfere with receptors and membrane ABC transporters in Gram-negative bacteria, several Gram-positive pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus anthracis* use **I**ron **s**urface **d**eterminants (Isd) and their associated

Near Iron Transporter domains (NEAT) to acquire iron from heme (2). In the human opportunistic pathogen *Bacillus cereus* (*B. cereus*), which is closely related to *B. anthracis* (3-5), an iron regulated leucine rich repeat surface protein “IlsA” has been identified and shown to bind directly heme, hemoglobin and ferritin (6, 7). IlsA has a unique structure with three different domains : NEAT, LRR (Leucine Rich Repeat) and SLH (S-Layer homology). Under iron limiting conditions, it is produced and anchored to the peptidoglycan making possible a direct interaction with these molecules (7). Although NEAT domains are known for their heme binding affinity, they have a certain level of specificity. Some NEAT-proteins act as hemoglobin receptors while others strictly bind heme but almost all take part in the network of NEAT domains mediating heme transfer from the bacterial surface to the bacterial membrane (8, 9). As to the LRR domains, they are composed of consecutive structural units that provide a large interaction surfaces. This characteristic makes LRR an ideal motif for protein-protein interaction (10, 11). To date, the role of LRR in heme or ferritin binding has not been described keeping the question largely opened for its role in iron source binding.

Here, using several *in vitro* and *in vivo* approaches, we investigate the heme binding capacity of full-length IlsA, a NEAT domain mutated IlsA, and the NEAT and LRR domains. Our results indicate that IlsA binds heme via the NEAT domain and is able to extract heme from hemoglobin while the LRR domain alone is not involved in heme binding. An earlier study from our laboratory indicated an important role of IlsA in *B. cereus* growth with hemin and hemoglobin as sole iron sources (7). The observed growth defect of the *ilsA* mutated strain (containing a tetracycline resistance cassette) was mainly due to the presence of tetracycline in the hemin containing growth medium. This observation has led us to suspect the involvement of other proteins in heme uptake and transport and the possible implication of the *B. cereus* Isd system. Using, various approaches, we demonstrate a role of Isd in bacterial growth, heme uptake and insect virulence. All together, our findings provide new insights into the interplay between an Isd NEAT surface protein and a NEAT-LRR protein involved in heme-iron acquisition in *B. cereus* and presumably between similar surface proteins in *B. anthracis* as well.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial strains and growth conditions, construction of the *B. cereus* *isd* locus and *isdC* mutants, insect virulence assays, site-directed mutagenesis, the expression and purification of all proteins and mutants employed in this study are provided in the supplementary material.

Reconstitution of holo-proteins. The concentration of the proteins purified from *E. coli* M15 was determined by the Bio-Rad protein assay or spectrophotometrically at 280 nm using molar extinction coefficients (ϵ) of 60740 M⁻¹cm⁻¹ for apo-IlsA, 12090 M⁻¹cm⁻¹ for apo-IsdC, 10500 M⁻¹cm⁻¹ for apo-IlsA^{NEAT}, 57760 M⁻¹cm⁻¹ for IlsA_{Y147AY151A}, 103600 M⁻¹cm⁻¹ for GST- apo-IlsA and 50120 M⁻¹cm⁻¹ for

GST-apo-IIsA^{NEAT}. To reconstitute the holo proteins, hemin was prepared as described elsewhere (12) and added to the apo-proteins until saturation. The apo-protein purified in *E. coli* C600 Δ *hemA* was 80-90% saturated by exogenous hemin.

Hemin binding. Hemin binding to apo-IIsA, apo-IsdC, apo-IIsA^{NEAT} and IIsA_{Y147AY151A} was followed spectrophotometrically at 405 nm using a Varian Cary 50 Bio UV-vis spectrophotometer and aliquots of a hemin solution. The kinetics of hemin binding to the apo-proteins were measured using a pneumatic drive Hi-Tech SFA-20M stopped-flow apparatus interfaced to a J&M Tidas diode array spectrometer with data acquisition every 2.5 ms in the wavelength range of 190-1024 nm. Equal 140 μ L volumes of hemin (15 or 20 μ M) and apo-IIsA (30 μ M), apo-IIsA^{NEAT} (30 μ M) or apo-IsdC (20 μ M) buffered solutions (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=7.4) were rapidly mixed into the quartz stopped-flow cuvette having a 1 cm path length and a cell volume of 80 μ L. All concentrations given in the figure captions are final concentrations following mixing of the reagents.

Heme extraction from hemoglobin by IIsA and IIsA^{NEAT} and hemin transfer from holo-IIsA to apo-IsdC. GST-apo-IIsA, GST-apo-IIsA^{NEAT}, GST-IIsA^{LRR} or PBS (control) were mixed with glutathione-sepharose followed by centrifugation and three washes with PBS. Human hemoglobin was then incubated with the different glutathione-sepharose bound GST-proteins for 30 min at 25 °C and the mixtures centrifuged. The supernatant containing hemoglobin was separated from the gel while the glutathione-sepharose was washed three times with PBS then eluted with reduced glutathione to recover the GST-IIsA, GST-IIsA^{NEAT} and GST-IIsA^{LRR}. The sediment (different proteins) and the supernatant (hemoglobin) were analyzed for heme binding at 405 nm. For hemin transfer, an apo-IsdC solution was incubated with GST-holo-IIsA and the mixture centrifuged. The sediment was washed and then eluted with reduced glutathione and the different fractions analyzed by SDS-PAGE gel to ensure separation of IIsA and IsdC. Hemin content was quantified spectrophotometrically at 404 nm. The kinetics of hemin transfer from holo-IIsA and holo-IIsA^{NEAT} (loaded with endogenous or exogenous hemin) to apo-IsdC were followed by stopped-flow rapid kinetics between 250–800 nm in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.4.

Isothermal titration calorimetry (ITC) of holo-IIsA binding to apo-IsdC. The binding interaction between holo-IIsA saturated with bovine hemin and apo-IsdC was followed at 25.00 °C and pH 7.0 on a low volume NanoITC from TA Instruments. An automated sequence of 16 injections of 3 μ L each of apo-IsdC (109 μ M) into the sample cell containing holo-IIsA (15 μ M) spaced at 5 min intervals to allow complete equilibration was performed. The data was collected automatically and analyzed using NanoAnalyze fitting program (TA Instruments). The standard enthalpy change (ΔH°), the binding constant (K), and the stoichiometry of binding (n) were determined by a single ITC experiment and the

standard Gibbs free energy change (ΔG°) and standard entropy change (ΔS°) were calculated using the following equations : $\Delta G^\circ = -RT \ln K$ and $T\Delta S^\circ = \Delta H^\circ - \Delta G^\circ$.

Results and discussion

Role of IIsA NEAT domain residues Tyr¹⁴⁷ and Tyr¹⁵¹ in endogenous heme binding.

NEAT domains from various Isd proteins have been implicated in heme binding. Crystallographic studies on IsdA of *Staphylococcus aureus* showed that heme binding and coordination is due to a conserved tyrosine Tyr¹⁶⁶ that is hydrogen-bonded to Tyr¹⁷⁰ (13). Multiple sequence alignments of NEAT domains of IIsA and Isd proteins from *S. aureus* revealed two highly conserved tyrosine residues (Y¹⁴⁷ and Y¹⁵¹) (7). Spectroscopic studies of native IIsA purified directly from *E. coli* strain M15 reveal a strong absorbance at 407 nm ($A_{407} = 0.16$) typical of heme-binding proteins. Mutation of the conserved heme-iron coordinating residues, Tyr¹⁴⁷ and Tyr¹⁵¹ to alanine (variant IIsA_{Y147AY151A}) resulted in a drastic decrease in the absorbance at 407 nm ($A_{407} = 0.03$) (Fig.1A) suggesting an important role of these residues in heme binding and the inability of variant IIsA_{Y147AY151A} to efficiently bind intracellular heme in *E. coli*. Figure 1A shows that the amount of heme bound to IIsA-YY is about 5-fold lower in comparison to the full-length IIsA. Structural analysis of several Isd proteins (IsdA-Sa, IsdC-Sa, IsdB-N2-Sa, and IsdX1-Ba) showed that one of two tyrosines provides the fifth axial ligand for the iron-heme coordination while the other tyrosine forms a hydrogen bond that strengthens heme coordination (12-15). It is possible that the heme-binding region in variant IIsA_{Y147AY151A} is intrinsically disordered and other residues (besides Y¹⁴⁷ and Y¹⁵¹) might be involved in heme binding. In *S. aureus*, the heme pocket residues Y⁴⁴⁰, M³⁶², S³⁶¹ and indirectly Y⁴⁴⁴ of the IsdB NEAT domain are involved in heme binding (14) and mutations of any of these residues alter the heme binding pocket environment and disrupt heme binding. Alternatively, it is possible that the *in vivo* covalent attachment of heme to IIsA occurs through a complex machinery and is weakened in IIsA_{Y147AY151A} leading to almost a complete loss of endogenously bound heme upon protein purification.

Hemin association with recombinant IIsA, IIsA^{NEAT}, IIsA^{LRR} and IIsA_{Y147AY151A}.

IIsA has two main domains (NEAT and LRR) that probably confer the protein the ability to bind different iron sources (i.e. hemoglobin, heme and ferritin). Since a role for LRR in heme binding has not been demonstrated or proposed, we presumed it might be involved in protein binding. To examine the ability of different forms of IIsA to bind heme, several apo-protein (without heme) samples (i.e. IIsA, IIsA^{NEAT}, IIsA^{LRR} and IIsA_{Y147AY151A}) were prepared. The addition of heme to a full-length apo-IIsA protein sample showed an increase in the Soret band at 407 nm characteristic of a protein-heme complex

(Fig. 1B). A plot of the maximum absorbance at 407 nm as a function of hemin concentration revealed a binding stoichiometry of one hemin per protein (Fig. 1B). Similarly, titration of a 2.5 μM apo-IlsA^{NEAT} domain alone, purified in *E. coli* C600 ΔhemA , with an increased amount of hemin showed saturation at \sim 2.6 μM of hemin (Fig. 1B) indicating a binding stoichiometry of one hemin per one IlsA^{NEAT}. However, apo-IlsA^{LRR} domain alone, purified in the *E. coli* M15 strain did not exhibit a peak in the \sim 400 nm region following excess addition of hemin (data not shown). These results suggest that hemin binding to IlsA is mediated by the NEAT domain and that the LRR domain is not involved in hemin binding. Since variant IlsA_{Y147AY151A} was unable to bind endogenous hemin during production in *E. coli* (M15) (Fig. 1A), we sought to determine whether it is able to bind exogenous hemin. Figure 1B shows that IlsA_{Y147AY151A} can indeed bind hemin with a 1:1 stoichiometry. However, the UV-vis spectrum of the IlsA_{Y147AY151A}-hemin complex shows a shoulder at around 370 nm indicative of a perturbation in the hemin binding environment (Fig. 1A). It was shown that a single mutation of the distal loop residues was insufficient to perturb the IsdA-heme complex in *S. aureus* and that mutation of the heme-iron ligand Y¹⁶⁶ was compensated for by His⁸³ (16). Interestingly, in *B. cereus* IlsA^{NEAT} His⁸³ is substituted by Met⁶² and the x-ray crystal structure of the *S. aureus* IsdB-N2-heme showed the involvement of Met³⁶³ in iron-heme coordination (14). Our results show that both the full-length native IlsA and variant IlsA_{Y147AY151A} bind exogenous hemin. However, while variant IlsA_{Y147AY151A} almost completely lost its affinity to endogenous hemin following protein purification, it maintained a weak affinity (i.e. non-covalent association) to exogenous hemin perhaps through Met⁶² located near the hydrophobic heme pocket.

Kinetics of hemin association to IlsA and IlsA^{NEAT}.

Figure 2 illustrates the absorbance-time curves at 410 nm and the family of UV-vis spectra (insets) for hemin association to IlsA and IlsA^{NEAT}. The time course at $A_{410\text{ nm}}$ for both proteins could be described by two exponential equations resulting in two rate constants, k_1 (fast) and k_2 (slow) (49.4 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and 2.94 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and 52.7 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and 2.23 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ for full length IlsA and IlsA^{NEAT}, respectively) with the two kinetic steps contributing equally to the total spectral change (Table 2C). A recent investigation (17) of an aqueous ferriprotoporphyrin IX reported the presence of monomeric and dimeric hemin species in solution and that hemin dimers involved non-covalent interaction between two monomer subunits. The fast rapid phase observed in our kinetics data can be attributed to the reaction of monomeric hemin with apo-IlsA whereas the slower kinetic phase corresponds to the dissociation of dimeric hemin followed by the rapid association of the resulting monomeric hemin with the protein. Similar hemin association kinetics have been previously described with *S. aureus* apo-IsdA (18).

Role of IIsA NEAT domain in heme extraction from hemoglobin.

A direct interaction between IIsA and human hemoglobin (Hb) has already been reported (7). To further investigate the ability of IIsA to extract heme from Hb, glutathione-sepharose loaded with either GST-apo-IIsA or GST- apo-IIsA^{NEAT} was incubated in the presence or absence of Hb and the different protein fractions were analyzed by UV-vis spectroscopy. Following incubation with Hb, both GST-IIsA and GST-IIsA^{NEAT} displayed a spectrum at 404 nm characteristic of hemin-binding proteins (Fig. 3A) whereas the characteristic metal-to-ligand charge transfer absorption bands decreased after incubation with apo-IIsA suggesting that IIsA had removed heme from Hb (Fig. 3B). The apo-IIsA^{NEAT} was also shown to extract heme from Hb albeit less efficiently compared to the whole protein (Fig. 3B). To examine whether the isolated LRR domain alone plays any role in heme binding and/or removal from Hb, the experiment was repeated with GST-IIsA^{LRR} as a possible heme extractor. The GST-IIsA^{LRR} incubated with Hb did not show the characteristic soret peak at 404 nm and the absorbance spectrum of Hb remained essentially unchanged after incubation with LRR (Fig. 3C). Altogether, these results indicate that the LRR domain of IIsA alone is unable to extract heme from Hb and that the IIsA^{NEAT} domain is involved in both heme binding and heme acquisition from Hb. Ekworomadu et al. (12) attributed the direct association of Hb with *B. anthracis* IsdX1 to Ser-53 since mutation of this latter led to a loss of Hb binding. This observation was supported by an earlier x-ray structure of *S. aureus* IsdH in complex with the alpha-chain of Hb showing a hydrogen bond between Ser-130 on IsdH NEAT and Lys-11 on Hb (19). Since no structural data is available for IIsA, it is tempting to speculate that IIsA association with Hb is due to Ser-61 which is the equivalent of Ser-53 in IsdX1.

Roles of *B. cereus* *isd* locus and *isdC* mutants in iron acquisition from hemin and hemoglobin.

B. cereus isd (iron surface determinant) locus is composed of eight open reading frames (Fig. 4A) encoding for three NEAT proteins (Bc4549, Bc4548 and Bc4547), a possible iron permease system (Bc4546, Bc4545, Bc4544), a putative sortase (Bc4543) and a putative mono-oxygenase (Bc4542) that degrades heme to liberate iron into the cytosol. Bc4549 and Bc4547 are believed to be two surface proteins because of their sortase motifs: NPKTG and NSKTA, respectively. In contrast, Bc4548 lacks a clear anchoring motif and might act as a secreted hemophore. *In silico* analysis showed a high similarity between the *isd* operons of *B. anthracis* and *B. cereus*. IsdC and IsdX1 from *B. anthracis* have 98% sequence identity with Bc4549 and Bc4548 respectively, while IsdX2 and Bc4547 share 86% amino acid identity (20, 21). Because IIsA is unlikely to be solely involved in heme binding, transport and release, we sought to investigate the role of the *isd* locus, not yet explored in *B. cereus* in heme uptake and transport and to examine the interaction of holo-IIsA with the first protein Bc4549 (here referred to as IsdC). The growth rates of the wild type (Bc ATCC14579), Δ *ilsA*, Δ *isd* and Δ *ilsA* Δ *isd* strains were compared under

different experimental conditions of LB iron-depleted medium with or without hemoglobin or hemin as sole iron sources. The *isd* locus mutant has a remarkable growth defect when cultivated in the presence of hemin and hemoglobin as sole iron sources (Fig. 4C and 4D). However, no difference in growth between the *isd* locus mutant and the double mutant Δ *ilsA* Δ *isd* was detected in an LB medium (Fig.4B) suggesting that components of the *isd* locus have a significant role in iron scavenging from hemoproteins. To examine the possible cooperation between IIsA and the first protein of the *isd* operon (presumably a peptidoglycan located) in heme transport and iron acquisition, a Δ *isdC* mutant was used. Compared to the wild type, the growth of the *isdC* mutant was not affected in an iron-depleted medium enriched by hemin or hemoglobin (data not shown). In fact, under *in vitro* conditions the deletion of *ilsA* or *isdC* alone did not present a strong phenotype in contrast to the whole locus mutant. This data suggest functional redundancy among the Isd components. By comparison to *B. anthracis*, a defect in growth was displayed for Δ *isdC* when the mutant is grown in an iron-free medium supplemented with hemin (20). Furthermore, the newly identified *B. anthracis* Hal protein (a protein similar to IIsA with a NEAT domain and several leucin-rich repeats) had a stronger role than *isd* compounds in growth with hemin and hemoglobin as sole iron sources (22). Thus, despite relative homology in the iron acquisition systems between *B. cereus* and *B. anthracis*, significant differences are noted. Earlier data from our laboratory (7) showed that Δ *ilsA* mutant displayed a strong reduction in growth, likely due to the presence of tetracycline which can act as an iron chelator (23). It is also possible that the tetracycline resistant protein acts as divalent cations efflux pump (24). Therefore, it appears that IIsA plays a less important role in heme and hemoglobin uptake and that other heme-iron acquisition systems (i.e. Isd) might be involved in bacterial heme-iron uptake with or without the assistance of IIsA as suggested by our current data.

Role of *isd* in virulence.

The role of *B. anthracis* and *S. aureus* Isd components in virulence have been previously investigated in pig and mice models with contradictory outcomes (25-29). To investigate the role for *B. cereus isd* mutants in bacterial virulence *in vivo*, three doses of mid-log phase bacteria (1×10^3 , 3×10^3 and 10^4 bacteria/larva) were directly injected into the hemocoel of *Galleria melonella* larva and mortality was recorded 24 hours post infection. The results revealed that the *isd* locus, the double *isd ilsA* and the *ilsA* mutants strains were less virulent than the wild type. The 50% lethal doses (LD50s) (Table 4E) indicate a small but significant decrease in virulence (2.5 to 3 fold) which is consistent with an earlier report (7) for the *ilsA* mutant. In addition, the fact that all mutants show a similar phenotype, may suggest a certain level of interplay between Isd and IIsA during *in vivo* infection. This difference between the *in vivo* and *in vitro* results might be due to variations in the composition and concentrations of iron sources in the two experimental set-ups. Indeed, hemoglobin is not found in *G. mellonella* but other heme-containing

molecules such as catalase or cytochrome (30) in addition to ferritin are present in insects and the latter was shown to interact with IIsA (7). However, no interactions have been proposed or reported between ferritin and Isd proteins yet.

Hemin association with IsdC - binding stoichiometry and rate of reaction.

Having established a possible role for *B. cereus* Isd system in heme iron uptake, we sought to compare the heme binding characteristics of IsdC with those of IIsA. Our results show that *E. coli* M15 recombinant IsdC possesses the characteristics of a heme-binding protein with a solet peak at 410 nm in addition to a series of Q bands in the visible region at 511, 549, 570 and 624 nm (Fig. S2). Multiple sub-stoichiometric additions of hemin to apo-IsdC (purified in *E. coli* C600 Δ hemA) reveal a binding stoichiometry of 1 apo-Isd protein per 1 hemin molecule (Fig. 5A). Stopped-flow spectrophotometry of hemin association with apo-IsdC reveals a maximal change in the absorbance at ~ 408 nm and a double exponential fit to the data yielded two rate constants $k_1 = 63.3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ and $k_2 = 2.60 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Fig. 5B), similarly to those found with IIsA and IIsA^{NEAT}.

Affinity chromatography of hemin transfer from Holo-IIsA to apo-IsdC.

Because heme transport across the surface of *B. cereus* has not yet been investigated, we followed hemin transfer from holo-IIsA to apo-IsdC using affinity chromatography. Following incubation of apo-IsdC with GST-holo-IIsA, the supernatant showed a clear increase at 404 nm (Fig. 6A) while the sediment exhibited a concurrent decrease in the absorbance of holo-IIsA at the same wavelength (Fig. 6B). Analysis of GST-IIsA hemin content (calculated via $A_{404 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ ratio) revealed that nearly 60% of hemin-loaded IIsA was transferred to apo-IsdC (Fig. 6C). Interestingly, when the experiment was repeated with apo-GST-IsdC, only about 20 % of hemin was transferred from holo-IsdC to apo-IIsA (Fig. S3). These results suggest that hemin transfer is essentially unidirectional and that holo-IIsA is able to transfer more efficiently its hemin to apo-IsdC and that these two heme-binding proteins interact to ensure heme transfer at the bacterial surface

Kinetics of hemin transfer from holo-IIsA and holo-IIsA^{NEAT} to apo-IsdC.

The kinetics of hemin transfer from holo-IIsA M15, holo-IIsA C600 and holo-IIsA^{NEAT} to apo-IsdC were followed by stopped-flow spectrophotometry at pH 7.4 and 25.0°C (Fig. 7). The spectral changes at 405 nm, 407 nm and 390 nm are associated with hemin loss from holo-IIsA M15, holo-IIsA C600 and holo-IIsA^{NEAT} while those at 426 nm, 435 nm and 424 nm are attributed to hemin transfer to apo-IsdC, respectively. The hemin dissociation and association rate constants were obtained from fits to the data using single exponential equations and are reported in Table 7D. The data indicate that, in the presence of

apo-IsdC, the rate of heme dissociation from holo-IlsA^{NEAT} (9.8 s⁻¹) is about 2 and 3-fold faster than that from holo-IlsA C600 (4.7 s⁻¹) and holo-IlsA M15 (3.4 s⁻¹), respectively (Table 7D). In contrast, the pseudo first-order rate constant for heme association with apo-IsdC is independent of the nature of heme donor and is similar (6 s⁻¹ to 8 s⁻¹) amongst all three holo-IlsA samples tested. These results suggest that the NEAT domain alone transfers heme more efficiently than the full-length IlsA proteins. The absorbance value of the IsdC-heme complex formed from IlsA^{NEAT} as heme donor is on average about four times higher than the IsdC-heme complex formed from full-length IlsA. The rapid kinetics of heme transfer from holo-IlsA to IsdC suggests that this process may be mediated by protein-protein interaction (31) as the ITC binding data below suggest.

Thermodynamics of holo-IlsA interaction with apo-IsdC.

Figure 8 shows the injection heats for apo-IsdC binding to holo-IlsA at pH 7.0 and 25.00 °C and the integrated heats (μJ) for each injection vs the molar ratio of apo-IsdC to holo-IlsA after subtraction of the control heats. The positive upward peaks in Fig. 8A correspond to an exothermic reaction with a binding stoichiometry of ~ 1 apo-IsdC protein per holo-IlsA and a dissociation constant of ~ 315 nM. All the experimental thermodynamic parameters obtained from curve fitting the integrated heats to a model of one set of independent binding sites are compiled in Table 8C. The ITC data revealed a direct interaction between holo-IlsA and apo-IsdC and is in agreement with the heme transfer from holo-IlsA to apo-IsdC occurring through direct protein-protein contact.

In conclusion, a potential role of IlsA and IsdC in heme and hemoglobin uptake and a dynamic interplay between these two *B. cereus* NEAT surface proteins have been demonstrated. NEAT domains have been shown to have a wide range of functions including hemoglobin binding or heme extraction through direct transfer from hemoglobin to the protein (21, 27, 32-35). In recent years, the mechanism of heme transfer in Gram-positive bacteria has gained considerable attention (18, 36-41) in an effort to develop drugs or vaccines for therapeutic targets. In an earlier study, Tarlovsky et al. (31) demonstrated an efficient heme transfer from the BslK protein, that is harboring a NEAT domain, to IsdC (*B. anthracis*). However, the deletion of *bslK* does not render *B. anthracis* unable to grow on heme or hemoglobin as sole iron sources (22). In the case of IlsA, our results suggest a direct and rapid heme transfer between two structurally distinct surface proteins IlsA, a NEAT-LRR protein and a NEAT-protein belonging to the Isd system. The IlsA^{NEAT} domain alone is shown to transfer its heme to IsdC more efficiently than the full length protein suggesting a more direct contact between the two proteins. Altogether, our results have provided new information into the interplay between two different bacterial molecules involved in iron acquisition from hemoglobin, the major heme containing host protein in

vertebrates. Further studies are needed to elucidate whether other heme-rich molecules can interfere with IIsA. Likewise, studies comparing IIsA and the recently described *B. anthracis* Hal protein (22) might give important insight into a possible ecological host adaptation for both heme and ferritin iron sources during host infections.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from ANR (Agence Nationale de la Recherche MIE 2009-2012) to the GrabIron project (DS), from INRA (Institut National de la recherche agronomique), Mica Department-France (CNL, EAK), Conseil de la recherche, Saint Joseph University- Beirut, Lebanon (FS32)(EAK, MK) and Cottrell College Science Award (ID # 7892) from Research Corporation and the National Science Foundation (NSF MRI Award # 0921364) (FBA).

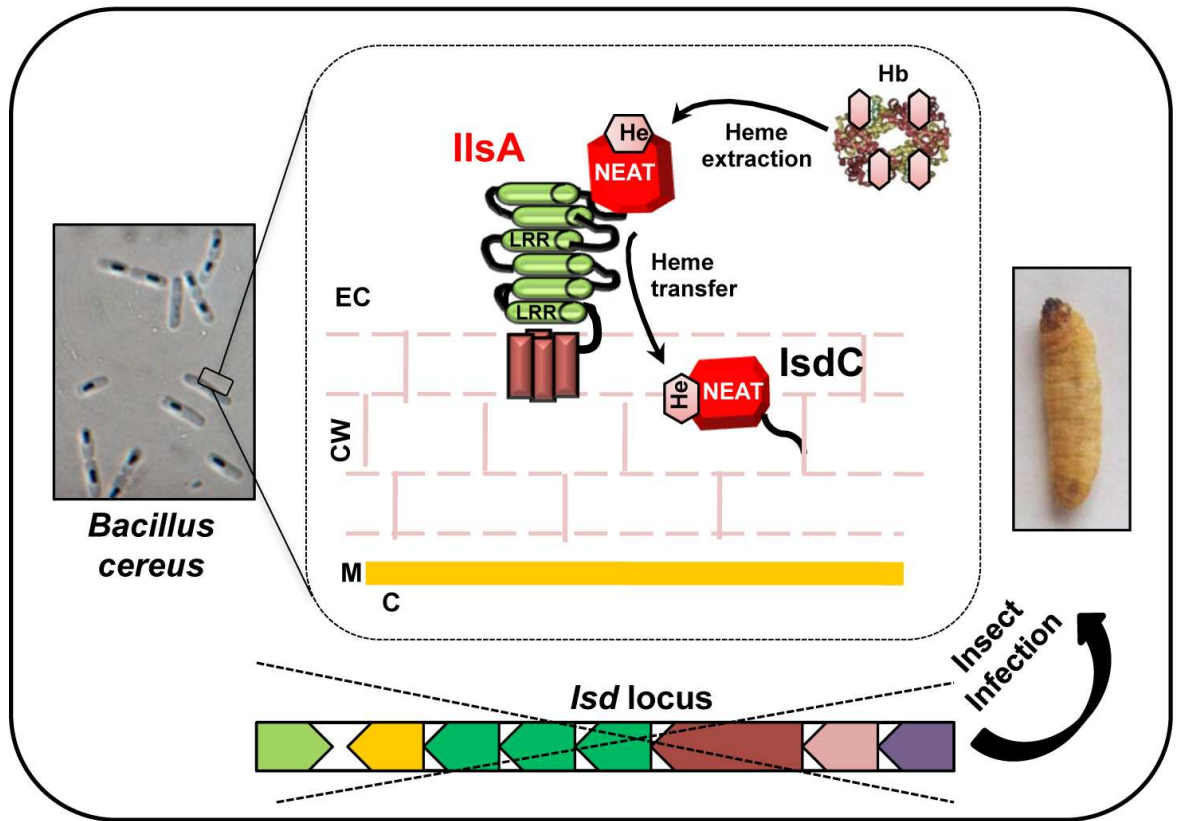
REFERENCES

1. Andrews, S. C., Robinson, A. K., and Rodriguez-Quinones, F. (2003) Bacterial iron homeostasis, *FEMS Microbiol.Rev.* 27, 215-237.
2. Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2012) Haemophore functions revisited, *Molecular microbiology* 85, 618-631.
3. Kolsto, A. B., Lereclus, D., and Mock, M. (2002) Genome structure and evolution of the *Bacillus cereus* group, *Current topics in microbiology and immunology* 264, 95-108.
4. Kolsto, A. B., Tourasse, N. J., and Okstad, O. A. (2009) What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species?, *Annual review of microbiology* 63, 451-476.
5. Vilas-Boas, G. T., Peruca, A. P., and Arantes, O. M. (2007) Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*, *Can.J.Microbiol.* 53, 673-687.
6. Fedhila, S., Daou, N., Lereclus, D., and 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.
7. Daou, N., Buisson, C., Gohar, M., Vidic, J., Bierne, H., Kallassy, M., Lereclus, D., and Nielsen-LeRoux, C. (2009) IIsA, a unique surface protein of *Bacillus cereus* required for iron acquisition from heme, hemoglobin and ferritin, *PLoS.Pathog.* 5, e1000675.
8. Honsa, E. S., and Maresso, A. W. (2011) Mechanisms of iron import in anthrax, *Biometals* 24, 533-545.
9. Nobles, C. L., and Maresso, A. W. (2011) The theft of host heme by Gram-positive pathogenic bacteria, *Metallomics.* 3, 788-796.
10. Kobe, B., and Deisenhofer, J. (1994) The leucine-rich repeat: a versatile binding motif, *Trends Biochem.Sci.* 19, 415-421.
11. Kobe, B., and Kajava, A. V. (2000) When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein structures, *Trends Biochem.Sci.* 25, 509-515.
12. Ekworomadu, M. T., Poor, C. B., Owens, C. P., Balderas, M. A., Fabian, M., Olson, J. S., Murphy, F., Balkabasi, E., Honsa, E. S., He, C., Goulding, C. W., and Maresso, A. W. (2012) Differential function of lip residues in the mechanism and biology of an anthrax hemophore, *PLoS.Pathog.* 8, e1002559.
13. Grigg, J. C., Vermeiren, C. L., Heinrichs, D. E., and Murphy, M. E. (2007) Haem recognition by a *Staphylococcus aureus* NEAT domain, *Mol.Microbiol.* 63, 139-149.

14. Gaudin, C. F., Grigg, J. C., Arrieta, A. L., and Murphy, M. E. (2011) Unique heme-iron coordination by the hemoglobin receptor IsdB of *Staphylococcus aureus*, *Biochemistry* 50, 5443-5452.
15. Sharp, K. H., Schneider, S., Cockayne, A., and Paoli, M. (2007) Crystal structure of the heme-IsdC complex, the central conduit of the Isd iron/heme uptake system in *Staphylococcus aureus*, *J.Biol.Chem.* 282, 10625-10631.
16. Grigg, J. C., Mao, C. X., and Murphy, M. E. (2011) Iron-coordinating tyrosine is a key determinant of NEAT domain heme transfer, *J.Mol.Biol.* 413, 684-698.
17. de Villiers, K. A., Kaschula, C. H., Egan, T. J., and Marques, H. M. (2007) Speciation and structure of ferriprotoporphyrin IX in aqueous solution: spectroscopic and diffusion measurements demonstrate dimerization, but not mu-oxo dimer formation, *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* 12, 101-117.
18. Liu, M., Tanaka, W. N., Zhu, H., Xie, G., Dooley, D. M., and Lei, B. (2008) Direct hemin transfer from IsdA to IsdC in the iron-regulated surface determinant (Isd) heme acquisition system of *Staphylococcus aureus*, *J.Biol.Chem.* 283, 6668-6676.
19. Krishna, K. K., Jacques, D. A., Pishchany, G., Caradoc-Davies, T., Spirig, T., Malmirchegini, G. R., Langley, D. B., Dickson, C. F., Mackay, J. P., Clubb, R. T., Skaar, E. P., Guss, J. M., and Gell, D. A. (2011) Structural basis for hemoglobin capture by *Staphylococcus aureus* cell-surface protein, IsdH, *J.Biol.Chem.* 286, 38439-38447.
20. Maresso, A. W., Chapa, T. J., and Schneewind, O. (2006) Surface protein IsdC and Sortase B are required for heme-iron scavenging of *Bacillus anthracis*, *J.Bacteriol.* 188, 8145-8152.
21. Maresso, A. W., Garufi, G., and Schneewind, O. (2008) *Bacillus anthracis* secretes proteins that mediate heme acquisition from hemoglobin, *PLoS.Pathog.* 4, e1000132.
22. Balderas, M. A., Nobles, C. L., Honsa, E. S., Alicki, E. R., and Maresso, A. W. (2012) Hal Is a *Bacillus anthracis* Heme Acquisition Protein, *J.Bacteriol.* 194, 5513-5521.
23. Grenier, D., Huot, M. P., and Mayrand, D. (2000) Iron-chelating activity of tetracyclines and its impact on the susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to these antibiotics, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44, 763-766.
24. Yamaguchi, A., Udagawa, T., and Sawai, T. (1990) Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein, *The Journal of biological chemistry* 265, 4809-4813.
25. Gat, O., Zaide, G., Inbar, I., Grosfeld, H., Chitlaru, T., Levy, H., and Shafferman, A. (2008) Characterization of *Bacillus anthracis* iron-regulated surface determinant (Isd) proteins containing NEAT domains, *Mol.Microbiol.* 70, 983-999.
26. Chitlaru, T., Gat, O., Grosfeld, H., Inbar, I., Gozlan, Y., and Shafferman, A. (2007) Identification of in vivo-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome, *Infection and immunity* 75, 2841-2852.
27. Torres, V. J., Pishchany, G., Humayun, M., Schneewind, O., and Skaar, E. P. (2006) *Staphylococcus aureus* IsdB is a hemoglobin receptor required for heme iron utilization, *J.Bacteriol.* 188, 8421-8429.
28. Cheng, A. G., Kim, H. K., Burts, M. L., Krausz, T., Schneewind, O., and Missiakas, D. M. (2009) Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23, 3393-3404.
29. Hurd, A. F., Garcia-Lara, J., Rauter, Y., Cartron, M., Mohamed, R., and Foster, S. J. (2012) The iron-regulated surface proteins IsdA, IsdB, and IsdH are not required for heme iron utilization in *Staphylococcus aureus*, *FEMS microbiology letters* 329, 93-100.
30. Kavanagh, K., and Reeves, E. P. (2004) Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens, *FEMS microbiology reviews* 28, 101-112.

31. Tarlovsky, Y., Fabian, M., Solomaha, E., Honsa, E., Olson, J. S., and Maresso, A. W. (2010) A Bacillus anthracis S-layer homology protein that binds heme and mediates heme delivery to IsdC, *J.Bacteriol.* 192, 3503-3511.
32. Mazmanian, S. K., Skaar, E. P., Gaspar, A. H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D. M., and Schneewind, O. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of Staphylococcus aureus, *Science* 299, 906-909.
33. Pilpa, R. M., Fadeev, E. A., Villareal, V. A., Wong, M. L., Phillips, M., and 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.
34. Dryla, A., Gelbmann, D., von Gabain, A., and Nagy, E. (2003) Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity, *Molecular microbiology* 49, 37-53.
35. Dryla, A., Hoffmann, B., Gelbmann, D., Giefing, C., Hanner, M., Meinke, A., Anderson, A. S., Koppensteiner, W., Konrat, R., von, G. A., and 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, 254-264.
36. Fabian, M., Solomaha, E., Olson, J. S., and Maresso, A. W. (2009) Heme transfer to the bacterial cell envelope occurs via a secreted hemophore in the Gram-positive pathogen Bacillus anthracis, *J.Biol.Chem.* 284, 32138-32146.
37. Honsa, E. S., Fabian, M., Cardenas, A. M., Olson, J. S., and Maresso, A. W. (2011) The five near-iron transporter (NEAT) domain anthrax hemophore, IsdX2, scavenges heme from hemoglobin and transfers heme to the surface protein IsdC, *J.Biol.Chem.* 286, 33652-33660.
38. Zhu, H., Xie, G., Liu, M., Olson, J. S., Fabian, M., Dooley, D. M., and Lei, B. (2008) Pathway for heme uptake from human methemoglobin by the iron-regulated surface determinants system of Staphylococcus aureus, *J.Biol.Chem.* 283, 18450-18460.
39. Muryoi, N., Tiedemann, M. T., Pluym, M., Cheung, J., Heinrichs, D. E., and Stillman, M. J. (2008) Demonstration of the iron-regulated surface determinant (Isd) heme transfer pathway in Staphylococcus aureus, *J.Biol.Chem.* 283, 28125-28136.
40. Liu, M., and Lei, B. (2005) Heme transfer from streptococcal cell surface protein Shp to HtsA of transporter HtsABC, *Infect.Immun.* 73, 5086-5092.
41. Zhu, H., Liu, M., and Lei, B. (2008) The surface protein Shr of Streptococcus pyogenes binds heme and transfers it to the streptococcal heme-binding protein Shp, *BMC.Microbiol.* 8, 15.

Figures



Cover Figure

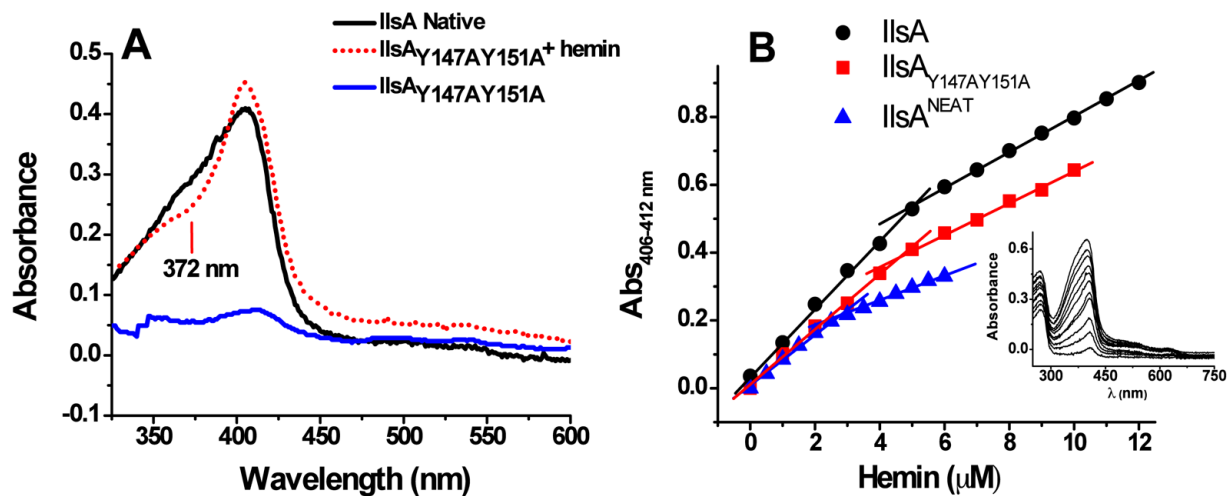
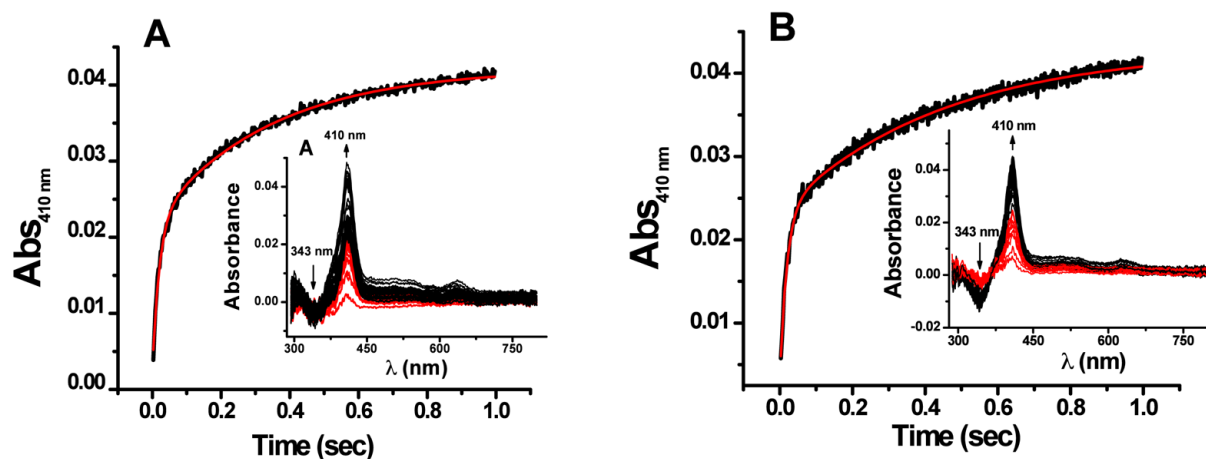


Figure 1. Electronic absorbance spectra of *E. coli* M15 IIsA and IIsA_{Y147AY151A} and spectrophotometric titrations of apo-IIsA, apo-IIsA^{NEAT}, IIsA_{Y147AY151A} with exogenous hemin.

(A) 5 μM native IIsA (black), alanine-substitution mutant IIsA (IIsA_{Y147AY151A}) (blue) and IIsA_{Y147AY151A} (dotted red) in the presence of 5 μM hemin. (B) 4.3 μM apo-IIsA (circles), 5 μM IIsA_{Y147AY151A} (squares) were titrated with 1 μM hemin per injection and 2.5 μM apo-IIsA^{NEAT} (triangles) was titrated with 0.5 μM hemin per injection; All protein solutions were prepared in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.4 and 25 °C. The inset of panel B shows an example titration curve.



C

Apo-proteins + Hemin	A ₁	k ₁ (M ⁻¹ s ⁻¹)	A ₂	k ₂ (M ⁻¹ s ⁻¹)
Apo-IIsA C600	0.0196	49.4	0.0203	2.94
Apo-IIsA-NEAT	0.0204	52.7	0.0195	2.23

Figure 2. Absorbance time curves at 410 nm for hemin association with apo-IIsA and apo-IIsA^{NEAT}. (A) 15 μM apo-IIsA or (B) apo-IIsA^{NEAT} and 10 μM hemin; 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=7.4 and 25 °C. The red curves are the best fit to the experimental data in black using two exponential equations. The insets are the family of stopped-flow UV-vis spectra gathered every 2.5 ms for the first 40 ms (red) of the reaction and every 50 ms (black) thereafter. (C) Table showing the second order rate constants (k₁ and k₂) and the corresponding absorbance values (A₁ and A₂).

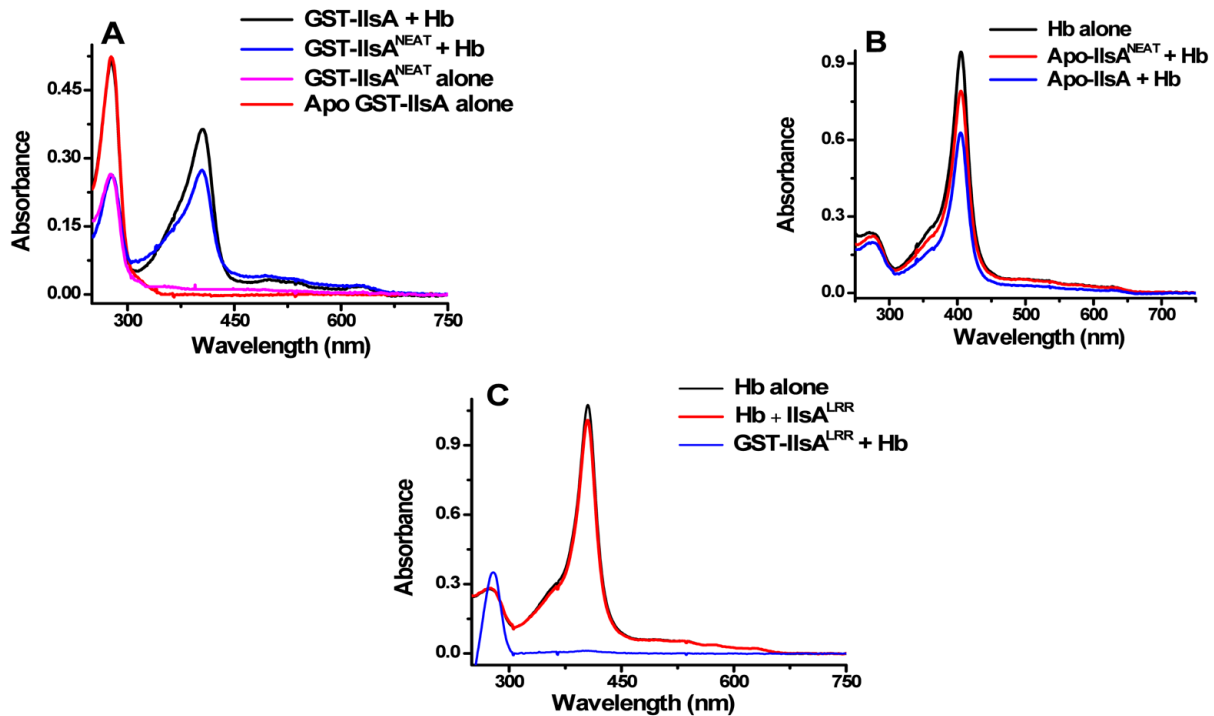


Figure 3. Absorbance spectra of IIsA-heme and IIsA^{NEAT}-heme complexes.

GST-apo-IIsA (20 μ M), GST-apo-IIsA^{NEAT} (20 μ M) or LRR (10 μ M) were anchored to Glutathione-sepharose and then incubated with 5 μ M hemoglobin (Hb) for 30 min at 25 $^{\circ}$ C.

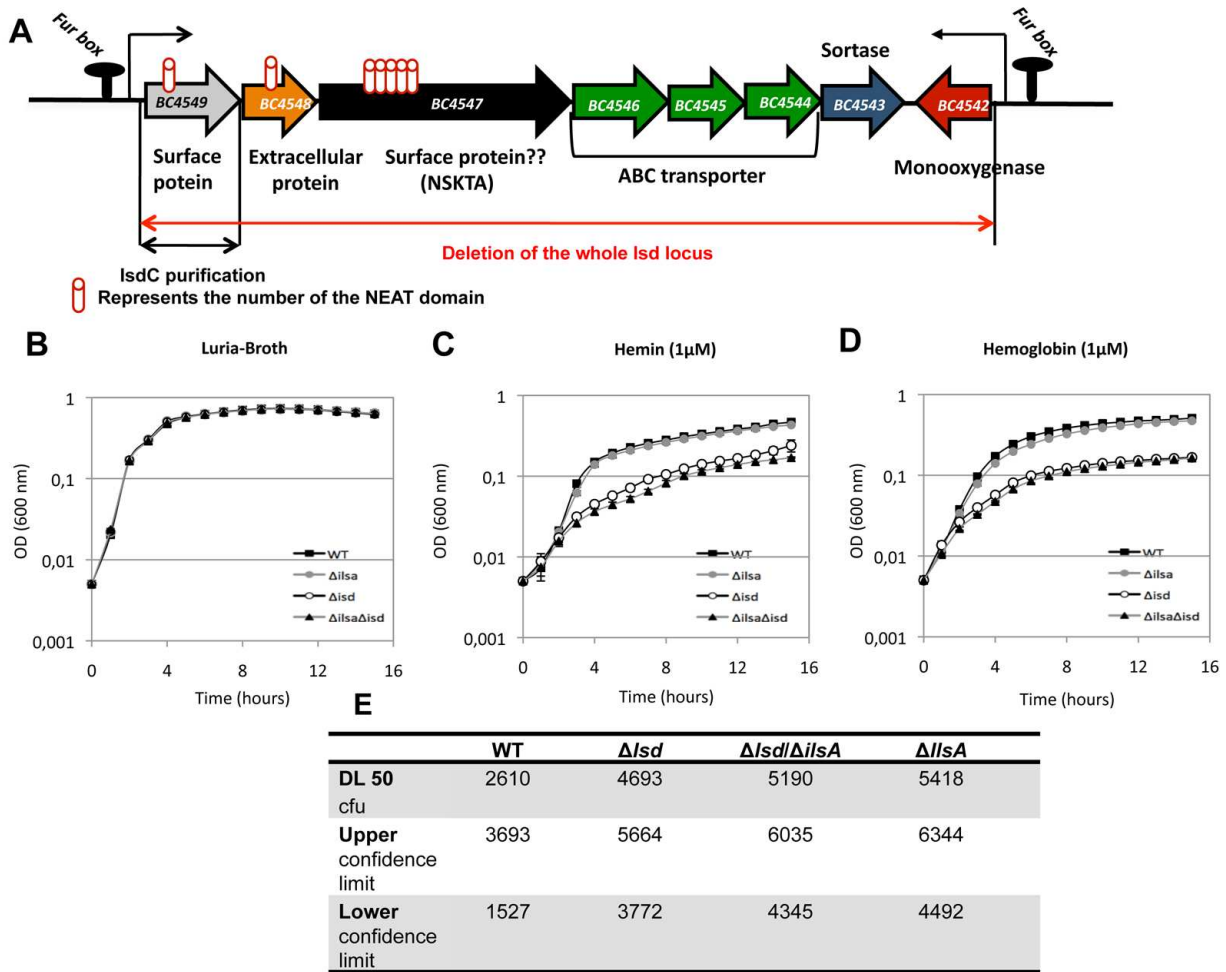


Figure 4. Iron acquisition by *B. cereus isd* and virulence assays in *Galleria mellonella*. (A) The *B. cereus isd* locus showing 8 open reading frames, three NEAT domain proteins: Bc4549, Bc4548, Bc4547, an ABC membrane transporter, Bc4546, Bc4545 and Bc4544, a sortase: Bc4543 and a monooxygenase: Bc4542. Growth kinetics of *B. cereus* wild-type (black square), Δisd (white circle), $\Delta ilsA$ (grey circle), $\Delta ilsA\Delta isd$ (black triangle). The strains were grown at 37°C in (B) LB medium and in (C) iron chelated LB supplemented with 1μM hemin or (D) 1μM hemoglobin. Bacterial growth was monitored at 600 nm for 15 hours. Curves are averages of three independent experiments (error bars are SEM from mean values). (E) Effect of *isd* and *ilsA* mutation on the virulence after intra-hemocoelic injection in *Galleria mellonella*. Last-instar larvae were injected with various doses (10^3 to 10^4) of mid-log phase bacteria. Mortality was evaluated after 24 h post injection and results are presented as LD₅₀ (cfu= number of bacteria resulting in 50% mortality of exposed larvae) values with upper and lower limits confidence intervals obtained by Probit Analysis using Stat Plus software.

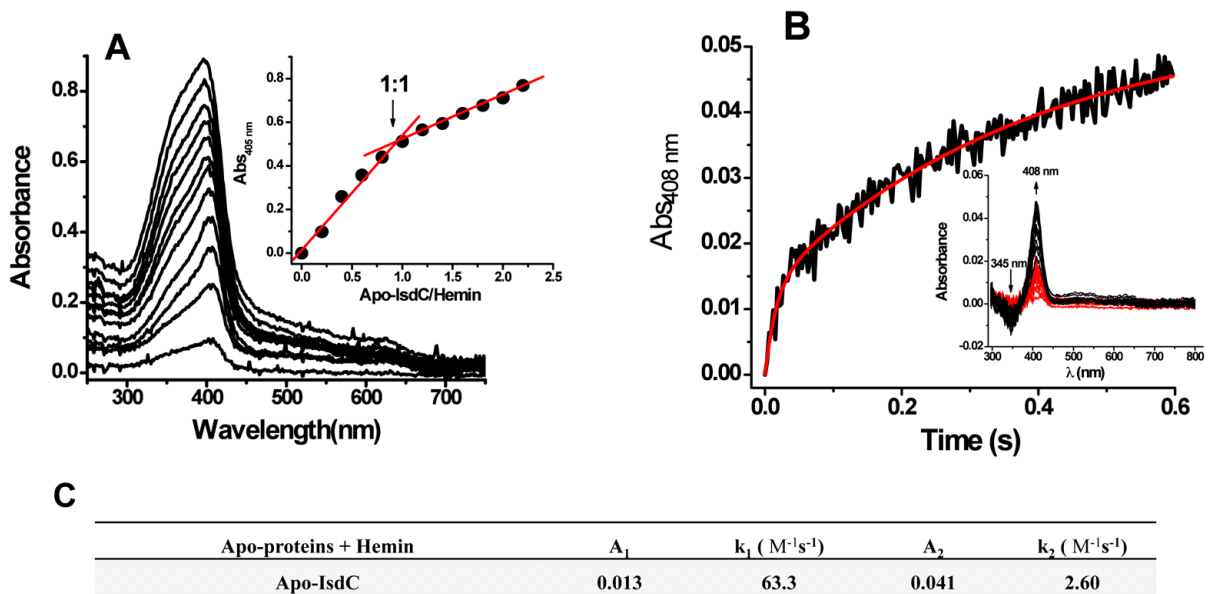


Figure 5. Exogenous hemin binding to apo-IsdC.

(A) spectrophotometric titrations of 5 μ M apo-IsdC with 1 μ M hemin per injection. The inset shows the titration curve. (B) Kinetic trace for hemin (7.5 μ M) association with apo-IsdC (10 μ M) measured with the stopped-flow technique. The red curve is the best fit to the experimental data in black using two exponential equations. The inset of panel B represents the family of spectra gathered every 2.5 ms for the first 50 ms (red) of the reaction and every 20 ms (black) thereafter. (C) Table showing the second order rate constants (k_1 and k_2) and the corresponding absorbance values (A_1 and A_2). All solutions were in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH7.4 and 25 $^{\circ}$ C.

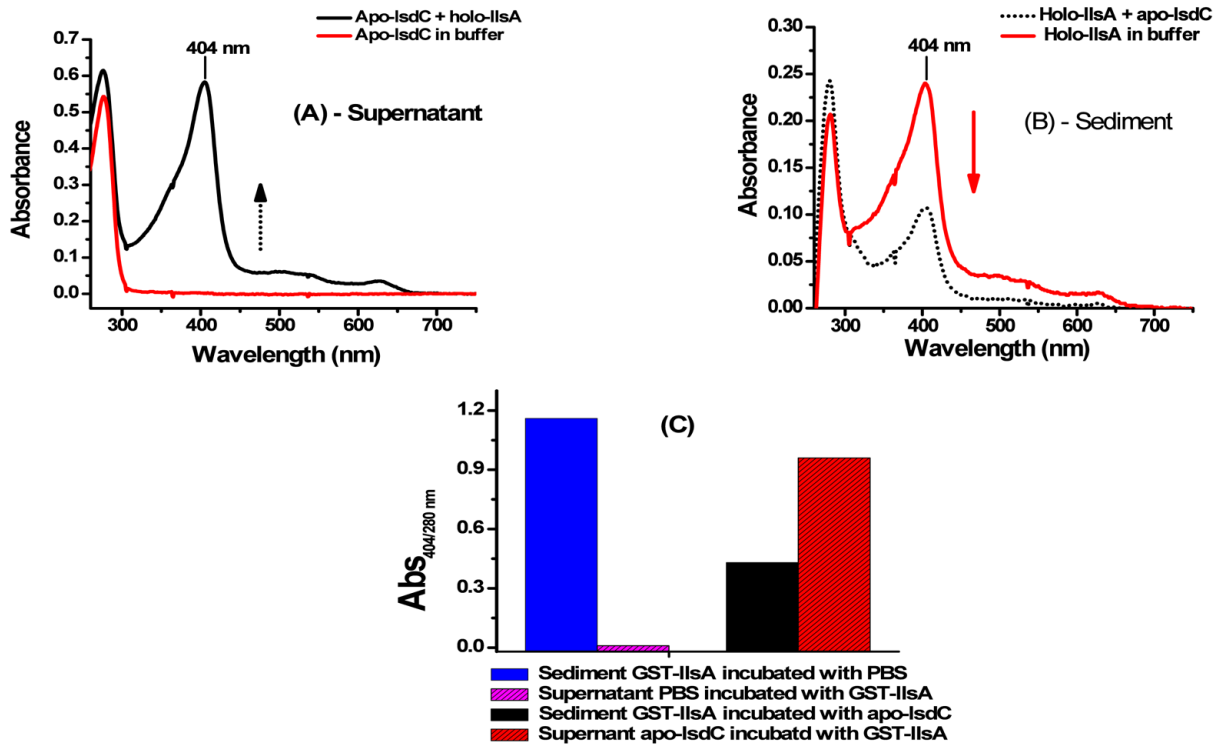
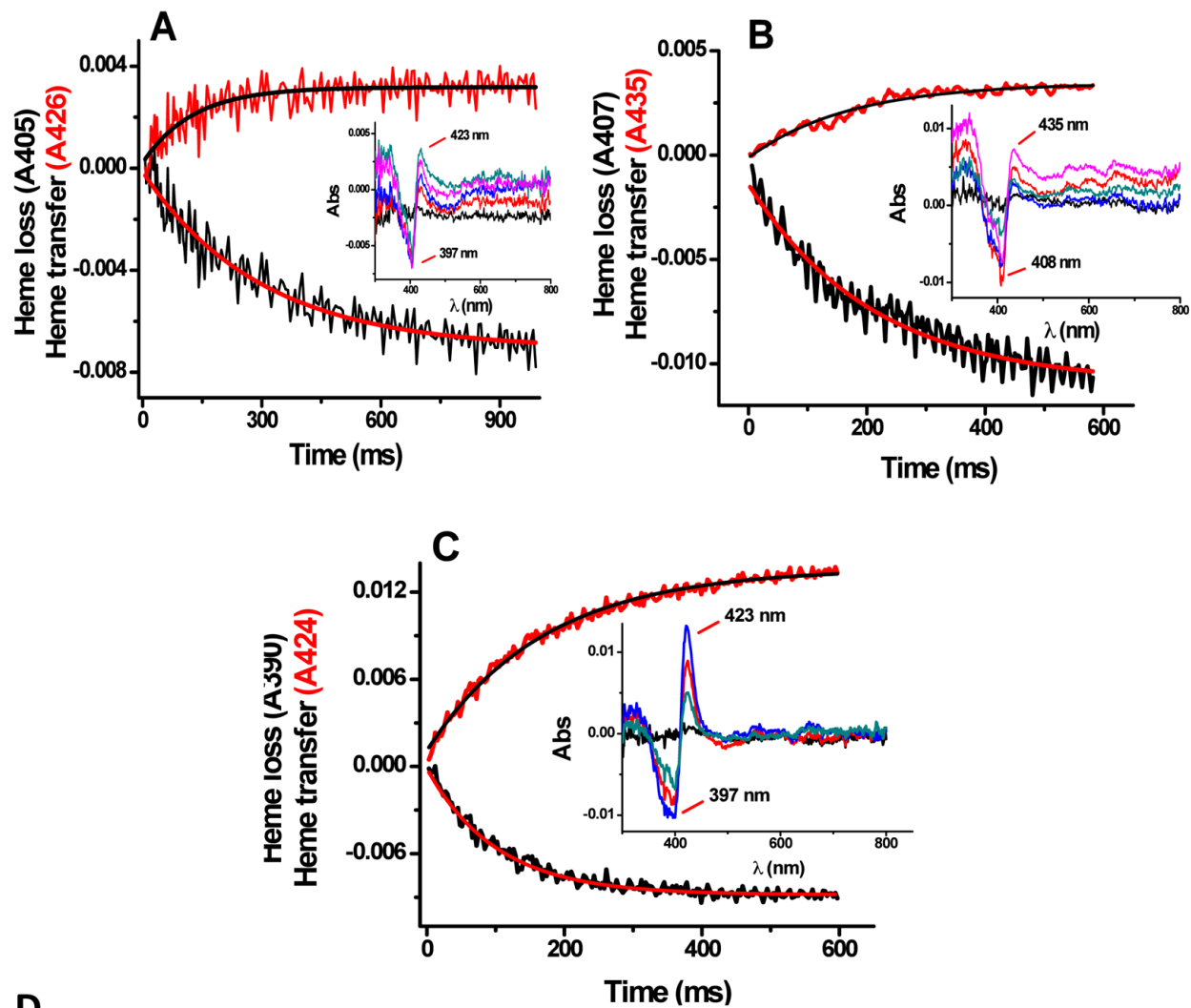


Figure 6. Hemin transfer from holo-IIsA to apo-IsdC.

10 μ M GST-apo-IIsA was loaded onto a glutathione-Sepharose charged by hemin and then incubated with 50 μ M of apo-IsdC for 30 min at 25°C. Both (A) supernatant and (B) sediment were separated by centrifugation and GST-IIsA was collected by elution with reduced Glutathione. The different fractions were analyzed by UV-vis and (C) the hemin content was quantified using the 404/280 ratio.



D

	A_1	k_1 (s^{-1})	A_2	k_1 (s^{-1})
Holo-proteins + apo-IsdC		1 st order rate cte of hemin dissociation from holo-IIsA		pseudo 1 st order rate cte of hemin uptake by apo-Isd
Holo-IIsA M15	0.0071	3.4	0.0029	7.9
Holo-IIsA-C600	0.0096	4.7	0.0036	5.8
Holo-IIsA-NEAT	0.0089	9.8	0.0125	5.9

Figure 7. Kinetics of hemin transfer from holo-IIsA to apo-IsdC.

(A) 50 μ M apo-IsdC were rapidly mixed in a stopped-flow apparatus with 10 μ M holo-IIsA (purified from *E. coli* strain M15), (B) 10 μ M holo-IIsA (purified from strain C600 Δ hemA) and (C) 10 μ M holo-

IIsA^{NEAT}. The insets represent the family of spectra of heme loss from holo-IIsA(M15), holo-IIsA(C600) and holo-IIsA^{NEAT} at various times. All protein solutions were in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH=7.4. (D) Table showing the first order rate constants (k1) and the corresponding absorbance values (A1 and A2) for hemin transfer from holo-IIsA to apo-IsdC.

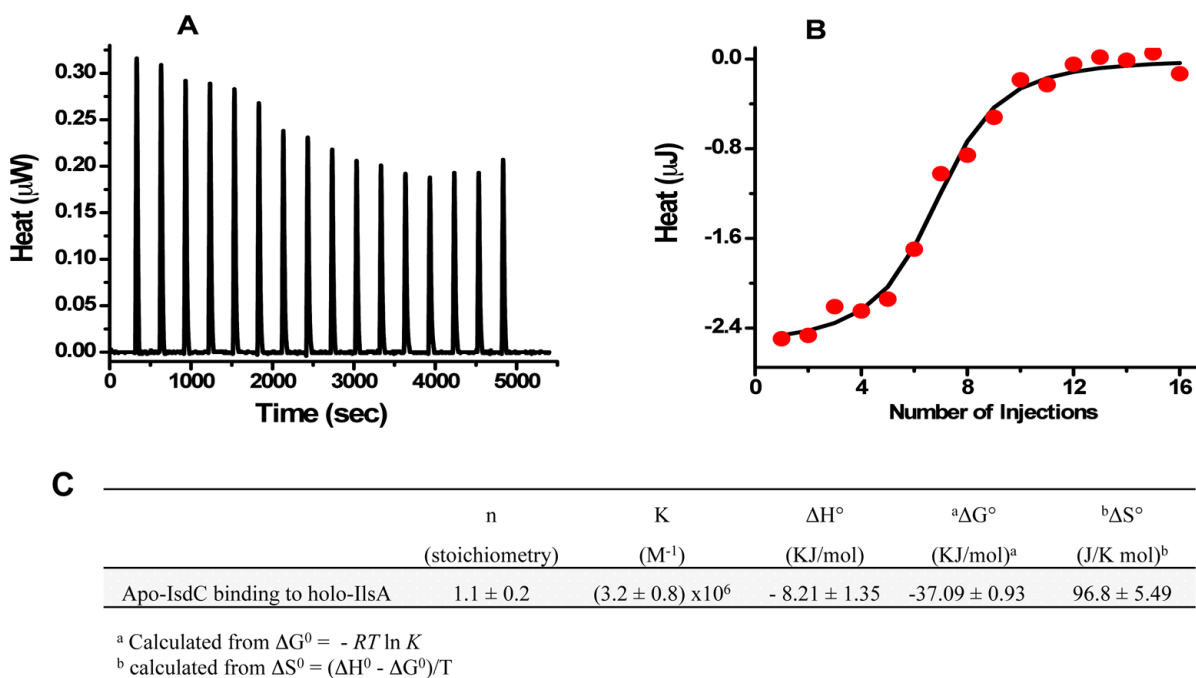


Figure 8. Isothermal titration calorimetry of apo-IsdC binding to holo-IIsA.

15 μM holo-IIsA are titrated with 3 μl injections of 109 μM apo-IsdC in 50 mM Tris/HCl buffer, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1 mM DTT, pH = 7.0 and 25°C. (A) ITC raw data, (B) Plot of the integrated heat versus the number of injections of apo-IsdC. (C) Best fit ITC thermodynamic parameters of apo-IsdC binding to holo-IIsA. At least three independent determinations were made.

Supplementary data

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial strains and growth conditions

Bacillus cereus strain ATCC 14579 (laboratory stock) was used throughout this study. *E. coli* K12 strain TG1 was used as a host for cloning experiments. *E. coli* strain ET 12567 (laboratory stock) was used to generate non-methylated DNA for electro-transformation in *B. cereus* as previously described (1, 2). *E. coli* M15 (pREP 4, Km 25 resistant) strain was used for expression and purification of the Glutathione S-transferase (GST) fusion protein (GST-IlsA, GST-IsdC with endogenous heme, IlsA_{Y147AY151A} and LRR domain). The *E. coli* C600 Δ hemA :: Km (3) was used to produce the apo-IlsA, apo-IlsA^{NEAT} and apo-IsdC. *E. coli* and *B. cereus* were cultured in LB (Luria-Bertani) broth, with vigorous shaking (175 rpm) at 37 °C. For electro-transformation, *B. cereus* was grown in BHI (Brain Heart Infusion, Difco) broth. *E. coli* C600 Δ hemA was cultured in BHI without shaking. Antibiotics for bacterial selection were used at the following concentrations: ampicillin 100 µg/mL (for *E. coli* TG1 and ET), ampicillin 100 µg/mL+ kanamycin 25 µg/mL (for *E. coli* M15), ampicillin 100 µg/mL+ kanamycin 20 µg/mL (for *E. coli* C600 Δ hemA), and erythromycin 10 µg/mL (for *B. cereus*). The iron chelator 2,2'-dipyridyl and the iron sources, human hemoglobin (Sigma, H7379) and bovine hemin (Sigma, H9039) were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin, Fallavier Cedex-France).

Construction of the *B. cereus* *isd* locus and *isdC* mutants

B. cereus Δ isd was constructed as follows. A 1032 bp EcoRI/ PstI DNA fragment and a 1024 bp PstI/ BamHI DNA fragment corresponding to the chromosomal regions located upstream and downstream the *isd* operon respectively, were amplified by PCR using *B. cereus* strain ATCC 14579 chromosomal DNA as a template and primers pairs F-Aoperon/R-Aoperon and F-Boperon /R-Boperon respectively (Table S1). The *isdC* mutant was generated by allelic exchange using deletion replacement. An 870 bp and a 913 bp DNA regions upstream and downstream the gene were respectively amplified by PCR using chromosomal DNA of *B. cereus* strain as template and FAisd4549/RAisd4549, FBisd4549/RBisd4549 as primers (Table S1). The resulting DNA fragments were fused by overlapping PCR with the FAisd4549 and RBisd4549 primers. The amplified DNA was digested with the appropriate enzymes and cloned between EcoRI and BamHI sites of the thermosensitive plasmid pMAD, conferring resistance to erythromycin and carrying a thermostable β -galactosidase gene (4). The resultant plasmids were

introduced into the wild type *B. cereus* strain and double-cross-over events resulted, in the deletion of the whole *isd* locus and *isd4549* coding sequences, respectively.

The two deletions were performed without insertion of antibiotic resistance cassettes. Therefore, chromosomal allele exchange and gene deletion were checked by PCR using appropriate oligonucleotide primers.

Growth assay of wild type and mutant strains

B. cereus strains were grown overnight under low iron conditions by inoculating strains in LB medium supplemented with 200 μ M 2,2'-dipyridyl. Overnight cultures were inoculated into a new LB medium+ 200 μ M 2,2'-dipyridyl at a final OD of 0,01. Bacteria from mid exponential phase culture were washed twice in LB medium containing 600 μ M 2,2'-dipyridyl, then inoculated to a final optical density (OD) of about 0.005 into 100 μ l of LB medium, LB medium containing 2,2'-dipyridyl (600 μ M) only or added separately by hemoglobin (1 μ M) or hemin (1 μ M). Stock solutions of both iron sources were pre-chelated in 1 mM 2,2'-dipyridyl for three hours in order to eliminate the free iron that might contaminate the sources. *B. cereus* cells were grown at 37°C in 96-wells microtiter plate under continuous shaking. The OD was measured at 600 nm every hour over 15 hours using a TECAN Infinite M200 Microplate Reader (TECAN Group, Mannedorf, Switzerland). The assays were repeated three times.

Insect virulence assays

B. cereus wild type and the mutant strains: Δisd and $\Delta isd\Delta ilsA$ were grown in LB medium and bacterial concentrations were monitored by optical density and by dilutions onto LB agar plates. 10 μ l of mid-log phase bacteria suspended in physiological water were injected separately into the hemocoel of the larvae *Galleria mellonella* using the micro-injector (Buckard Scientific) as previously described (5). Three different doses of bacteria (1×10^3 , 3×10^3 and 10^4 bacteria/larvae) were used, and each experiment was repeated on 20 larvae at least three times. A control group of larvae was injected with physiological water only and no mortality was observed. Infected larvae were kept at 37°C and mortality was recorded after 24 hours. For statistical analysis, P-values were determined using Student's T-test. Based on the data obtained, LD₅₀ were estimated by Probit analysis with StatPlus[®] software (AnalystSoft).

Production of full-length IIsA, NEAT domain (IIsA^{NEAT}), the LRR domain (IIsA^{LRR}) and IsdC

The *ilsA*, *ilsA^{NEAT}*, *ilsA^{LRR}* and *isdC* coding sequences were amplified by PCR using genomic DNA from *B. cereus* as template and the following primers F-IIsA prot/R-IIsA prot, F-NEAT IIsA/ R-NEAT IIsA, F-LRR/ R-LRR and F-IsdC/R-IsdC respectively (Table S1). The *ilsA*, *ilsA^{NEAT}*, *ilsA^{LRR}* and *isdC* DNA sequences were digested with EcoRI and XhoI and cloned into the plasmid pGEX-6p-1 holding the

tag encoding Glutathione-S Transferase (GST). Analysis of the full-length IIsA protein sequence with the SIGNALP 3.0 program identified a signal peptide cleavage site between amino acid residues 1 and 28 (6). The DNA sequence corresponding to the signal peptide of IIsA was omitted for the production of the recombinant IIsA (amino acids Ala 29 to Lys 760). Therefore, the soluble protein was produced into the cytosol which facilitated its purification. DNA encoding the NEAT domain (Thr 24 to Gly 163) and the LRR domain (Lys 208 to Asn 493) of IIsA were respectively fused to the DNA encoding GST in pGEX-6p-1 to create pGST-IIsA^{NEAT} and pGST-IIsA^{LRR}. Purified IsdC was lacking both the N-terminal signal peptide (amino acid 1-31) and the C-terminus charged tail (amino acids 212-237). All clones were verified by sequencing (Beckman Coulter Genomics, Essex, UK) to rule out spurious mutations. The accession numbers of IIsA and IsdC proteins from *B. cereus* are respectively NP_831113 and NP_834256.

Site-directed mutagenesis of IIsA^{NEAT} domain

Site-directed mutagenesis of two conserved tyrosine residues (Tyr 147 and Tyr 151) in IIsA by alanine was performed using the Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England, BioLabs), pGST-IIsA as template and F-Y147AY151A, R-Y147AY151A as primers (Table S1). The PCR products were treated with DpnI (Biolabs) for 1 hour at 37 °C to degrade template DNA and transformed into *E. coli* TG1. The resulting gene was designated *ilsA_{Y147AY151A}*. Mutations were confirmed by sequencing (Beckman Coulter Genomics, Essex, UK).

Purification of IIsA, IIsA_{Y147AY151A}, IIsA^{LRR} and IsdC in *E. coli* strain M15

Genes encoding IIsA, IIsA_{Y147AY151A}, IIsA^{LRR} and IsdC were overexpressed in *E. coli* M15. 5 L of LB medium were inoculated with 50 ml of overnight cultures supplemented with 100 µg/ mL ampicillin and 25 µg/ mL kanamycin. The cultures were grown under agitation at 37°C to an OD₆₀₀ of 0.8 - 0.9. The expression of the different protein fusions GST-IIsA, GST-IIsA_{Y147AY151A}, GST-IIsA^{LRR} or GST-IsdC was induced by adding 1 mM IPTG (isopropyl β-d-thiogalactopyranoside), and the cultures were first incubated for 3 h at 30 °C and then overnight (16 hours) at 15 °C. As the proteins were expressed in the cytosol of M15 (except the GST-IIsA^{LRR}), the cultures were centrifuged at 8000 rpm, 4 °C for 15 min and the cell pellets resuspended in 60 mL PBS (Phosphate Buffered Salin) and 3.5 mL of 20 % Triton X-100. 1.5 mL of lysozyme (50 mg/mL) was added and the bacterial cells were incubated for 15 min at room temperature followed by a DNase I treatment by adding 200 µl (5 mg/mL) of DNase I at 4 °C for 45 min. The bacteria were lysed on ice by sonication using a Branson sonicator 250 (10 sec of sonication for 10 times with an interval of 10 sec). Bacterial lysate was centrifuged at 15000 rpm, for 15 min at 4 °C; soluble proteins from the supernatants were filtrated through 0.22 µm pore size filter (Millipore). Since

the GST-IlsA^{LRR} fusion protein was localized in the pellet, solubilization was achieved by overnight incubation at 4°C in 80 mL 50 mM Tris (pH 8.0) containing 8 M urea at 4°C. The insoluble pellet was removed by centrifugation at 8000 rpm for 45 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 approximately 5 hours with stirring at 4°C and then against the same buffer without urea for nearly 48 hours with stirring at 4°C to remove the residual detergent. The filtrate containing the tagged GST-proteins and the solubilized GST-IlsA^{LRR} were incubated overnight at 4 °C with agitation in the presence of 3.3 mL of glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare).

The affinity gel holding the target protein was loaded on to a column and washed with 75 ml PBS (1X) and then 50 mL of the PreScission protease buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT). The GST was cleaved by PreScission protease, for 16 h at 4 °C. For some set of experiments we kept the GST tag by eluting the gel with the L-Glutathione reduced (Sigma-Aldrich, G4251). The purification of IlsA, IlsA_{Y147AY151A}, IlsA^{LRR} and IsdC was monitored by 10% SDS PAGE electrophoresis. IlsA and IsdC proteins were purified with the endogenous hemin from *E. coli* strain M15, whereas the IlsA NEAT domain mutant and the IlsA^{LRR} did not contain hemin. Average yield of purified proteins varied from 5 mg to 10 mg per Liter growth medium.

Purification of IlsA, IlsA^{NEAT} and IsdC in apo-form

We produced the IlsA, IlsA^{NEAT} and IsdC proteins in the apo-form by using *E. coli* C600 $\Delta hemA: Km$, a strain knocked out for heme synthesis (3). The recombinant proteins apo-IlsA, apo-IlsA^{NEAT} and apo-IsdC were expressed in 10 L of BHI (Brain Heart Infusion, Difco) supplemented with 100 µg/mL ampicillin and 20 µg/mL kanamycin. Cultures were grown in bottles without shaking at 37 °C to an OD₆₀₀ of 0.8-0.9. The expression, production and the purification of proteins were performed as described above in *E. coli* M15.

REFERENCES

1. 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.
2. Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J., and Lecadet, M. (1989) Transformation and expression of a cloned delta-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiol.Lett.* 51, 211-217.
3. Ghigo, J. M., Letoffe, S., and Wandersman, C. (1997) A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*, *Journal of bacteriology* 179, 3572-3579.
4. Arnaud, M., Chastanet, A., and Debarbouille, M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria, *Appl.Environ.Microbiol.* 70, 6887-6891.

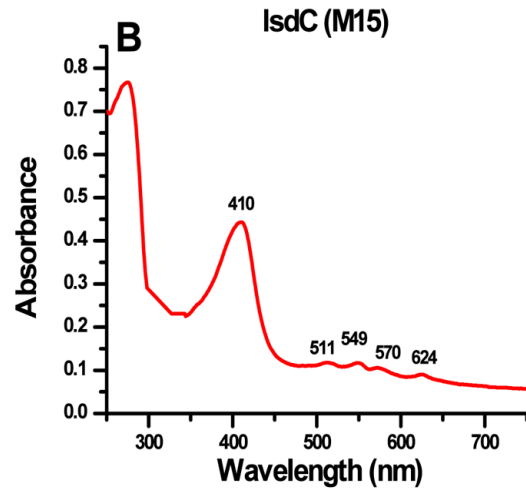
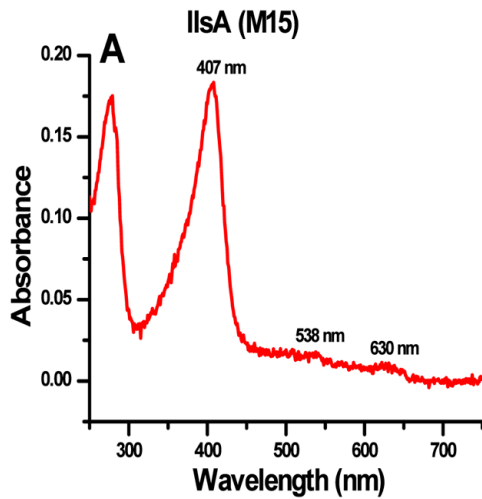
5. Bouillaut, L., Ramarao, N., Buisson, C., Gilois, N., Gohar, M., Lereclus, D., and Nielsen-Leroux, C. (2005) FlhA influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene transcription, protein production, and virulence, *Applied and environmental microbiology* 71, 8903-8910.
6. Fedhila, S., Daou, N., Lereclus, D., and 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.

Tables and figures

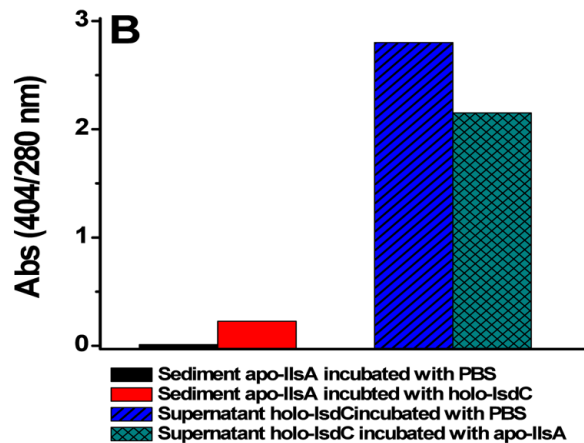
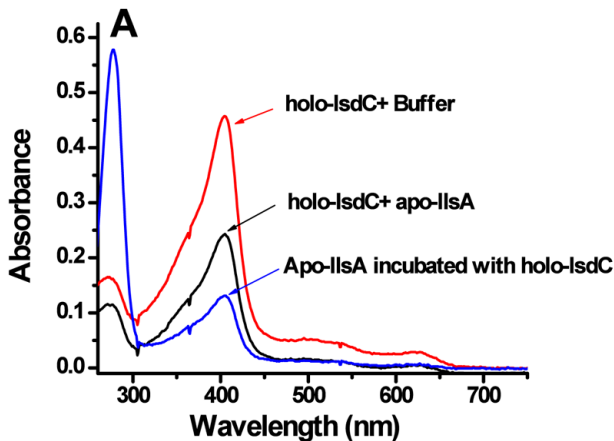
Table S1: Primers sequences used in this study

Name	Nucleotide sequence ^a	Restriction site
F-A operon	5'-CCGGAATTCACGATTTGCAAGGTCAACAC-3'	EcoRI
R-A operon	5'-AAA <u>ACTGCAGT</u> TCAAGAACTCATATACATCAA-3'	PstI
F-B operon	5'-AAA <u>ACTGCAGT</u> CCCTCCTTGGTTATCTTTCA-3'	PstI
R-B operon	5'-CGCGGATCCCGCAAACGGAGGAATTATTT-3'	BamHI
F- Aisd4549	5'-CGGAATTCGCAACTAGCTTACCTGCTTT-3'	EcoRI
R-A isd4549	5'-ATGCCATACGGGAATGC <u>GTATTGGATTGTTTGCAG</u> -3'	
F-B isd4549	5'-CTGCAAACAATCCAATAC <u>GCATTCCCGTATGGCAT</u> -3'	
R-B isd4549	5'-CGCGGATCCGGTAGCAAACCTTGGGTAA-3'	BamHI
F-IIsA prot	5'-CGGAATTCGCATTTAAAAGTTGAAGCAAATC-3'	EcoRI
R-IIsA prot	5'-CCCTCGAGTTATTTCTTTATTGCATTATAC-3'	XhoI
F- NEAT IIsA	5'-CCGGAATTCACTCCAGCATTAGCGGCA-3'	EcoRI
R-NEAT IIsA	5'-CCCTCGAGACCTACAGTTGGATCTTTAAT-3'	XhoI
F-LRR	5'-CCGGAATTCAAAGATTTAAATACACC-3'	EcoRI
R-LRR	5'-CCCTCGAGTCAATTTTGGACATTAATATAA-3'	XhoI
FY147AY151A	5'-TTGGAgcTGATCACAAAgcTCAAGTTCAATTTGAAATTAA-3'	
RY147AY151A	5'-ACTTGAgcTTTGTGATCAgcTCCAATAGCTGGAATAAGTA-3'	
F-IsdC	5'-CCGGAATTCCTAGCTGATGGTACTTACGAT-3'	EcoRI
R-IsdC	5'-CCCTCGAGATCGCCTGTTTTTGGGTATC-3'	XhoI

^aRestrictions sites are underlined.



S2. Purified IIsA and IsdC expressed in *E.coli* M15 , the GST is cleaved by the preScission protease. 3 μ M of IIsA M15 (A), 50 μ M of IsdC M15 (B) were scanned in 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT using a conventional spectrophotometer. Absorption spectrum from samples of purified IIsA and IsdC in *E.coli* M15 from 250 to 750 nm show that IIsA and IsdC have the characteristics of a heme-binding protein. These include a Soret band at 407 nm along with additional Q-band peaks at 538 and 630 nm for IIsA and a 410 nm Soret peak and the 511, 549, 570 and 624 nm Q bands for IsdC



S3. Heme transfer from Holo-IsdC to apo-IsdC. (A) 30 μ M of apo GST-IIsA was loaded on to a Glutathione-sepharose and incubated with 10 μ M of holo-IsdC for 30 min at 25 $^{\circ}$ C. UV-Vis spectrum of the supernatant containing IsdC and the sediment which has been eluted to recover GST-IIsA .

(B). Heme content after the separation of holo-IsdC from the apo-IIsA

Article 2: *Bacillus cereus* grabs iron from ferritin using IIsA as a ferritin receptor and bacillibactin as an iron carrier

Le deuxième article est centré sur IIsA et la ferritine, il met en évidence le rôle d'IIsA dans la déstabilisation de la ferritine conduisant à la libération du fer de sa coque. De plus, il décrit les paramètres thermodynamiques de l'interaction entre IIsA et différents types de ferritine recombinantes. De plus, les rôles des sidérophores, bacillibactine et petrobactine dans l'utilisation du fer de la ferritine et leur implication dans la virulence *in vivo* ont été étudiés.

TITLE

Bacillus cereus Grabs Iron from Ferritin Using IIsA as a Ferritin Receptor and Bacillibactin as an Iron Carrier

Running Title: Ferritin utilization in *Bacillus cereus*

Authors:

Diego Segond^{1§}, Elise Abi Khalil^{1,2,3§}, Christophe Buisson¹, Nadine Daou^{1,4}, Mireille Kallassy², Didier Lereclus¹, Paolo Arosio⁵, Fadi Bou-Abdallah³ and Christina Nielsen Le Roux^{1*}

¹INRA, UMR 1319 Micalis, La Minière, 78280 Guyancourt , France

¹bis AgroParisTech, UMR Micalis, 78352 Jouy en Josas cedex, France

²Laboratory of Biotechnology, Saint-Joseph University, Beyrouth, Lebanon.

³Department of Chemistry, State University of New York at Potsdam, Potsdam, NY 13676, USA

⁴Department of Medicine, Section of Infectious Diseases, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118, USA

⁵ Department of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, 25123 Brescia, Italy

§Co-authorship: D.S. did the immunofluorescence and the siderophore mutant studies; E.A.K. performed the ITC experiments and the iron release assays. Both authors collaborated on the writing of the manuscript equally.

*Corresponding author: C. Nielsen Le Roux; E-mail: christina.nielsen@jouy.inra.fr

Abstract

In host-pathogen interactions, the struggle for iron may have major consequences on the outcome of the disease. To overcome the low solubility and bio-availability of iron, bacteria have evolved multiple systems to grab iron from various sources as heme, hemoglobin and ferritin. The molecular basis of iron acquisition from heme and hemoglobin have been extensively studied; however, those used to get iron from host ferritin, a 24-mer nanocage protein able to store thousands of iron atoms within its cavity, remain largely unknown. In the human opportunistic pathogen *Bacillus cereus*, a surface protein named IIsA (Iron-regulated leucine rich surface protein type A) binds heme, hemoglobin and ferritin *in vitro* and is involved in virulence. Here, we demonstrate that IIsA acts as a ferritin receptor causing ferritin aggregation on the bacterial surface. Isothermal titration calorimetry data indicate that IIsA binds several types of ferritins through direct interaction with the shell subunits. UV-vis kinetic data show a significant enhancement of iron release from ferritin in the presence of IIsA indicating for the first time that a bacterial protein might alter the stability of the ferritin iron core. Disruption of the siderophore bacillibactin production, but not petrobactin, drastically reduces the ability of *B. cereus* to utilize ferritin for growth and results in attenuated bacterial virulence in insects. We propose a new model of iron acquisition in *B. cereus* that involves the binding of IIsA to host ferritin followed by siderophore-mediated iron release. Our results highlight a crucial interplay between a surface protein and a siderophore and provide new insights into host adaptation of *B. cereus* and general bacterial pathogenesis.

Introduction

Iron is an essential nutrient for most forms of life. Owing to the high variability of the $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ redox potential, this transition metal fulfills a large number of biological processes including respiration and DNA synthesis. However, because of its low solubility and propensity to generate highly reactive hydroxyl radicals, iron is a double-edged element and its homeostasis must be finely tuned [1]. Given that most microorganisms require micromolar iron concentrations for growth and multiplication [2], the ability to obtain iron is thus an important adaptation factor. Upon infection, the host sets up a form of nutritional immunity aimed at depriving the invader of nutritional iron through iron redistribution in the organism and scavenging of microbial iron acquisition systems [3,4]. The importance of this strategy is evidenced by the effects of iron homeostasis disorders on both innate and acquired immune responses [2,5]. In this battle for iron, and to circumvent host-iron withholding, pathogens have evolved several high-affinity iron uptake systems. Pathogenic bacteria are able to acquire iron via siderophore-based systems or by surface and membrane anchored proteins which interfere with host iron-containing proteins such as transferrins, hemoproteins or ferritins [6]. Most of these iron acquisition systems are under the control of the global regulator Fur (Ferric uptake regulator) which also regulates the expression of multiple virulence factors [7]. Over the past 10 years, our understanding of iron import into bacteria has been greatly improved [8,9]. The most impressive advances concerned heme acquisition in Gram-positive bacteria. One major discovery has been made with the characterization of the Isd (Iron-regulated surface determinant) system in *Staphylococcus aureus* [10]. Heme or hemoglobin uptake by this system relies on cell wall-anchored proteins that act as hemoprotein receptors by means of their NEAT (NEAr iron Transporter) domains. Since then, a growing number of studies have emphasized the role of NEAT domains in heme binding in several Gram-positive bacteria including *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus anthracis* (for review, see [11]) or *Bacillus cereus* (Abi Khalil *et al.*, unpublished data). Although most iron is bound to hemoglobin in vertebrates, ferritin can represent another important source of iron for microbes [12,13,14,15,16,17,18].

Ferritin is a well-studied ubiquitous protein found in both prokaryotes and eukaryotes. In animals, it is composed of 24 subunits that self-assemble through non-covalent interactions into a hollow spherical shell. Due to the presence of two types of subunits, H (heavy) and L (light), multiple ferritin isoforms exist whereby up to 4500 iron atoms can be mineralized inside the nanocage [19]. Whereas the main role of ferritin is to store iron under a safe and bioavailable form, other biological functions have been proposed [20]. This extremely stable protein represents a concentrated source of iron and thus could be a perfect target for microbes. However, the molecular basis of ferritin utilization by pathogens remains poorly

documented. Recent studies have shown that the intracellular bacterium *Neisseria meningitidis* can indirectly utilize ferritin by inducing an iron starvation state within epithelial cells leading to ferritin degradation and release of free iron [16]. Other *in vitro* studies showed that ferritin utilization relies on proteolytic degradation in the cystic fibrosis-associated pathogen *Burkholderia cenocepacia* [18] and on a reductase activity in *Listeria monocytogenes* [21]. To our knowledge, only two molecular determinants directly involved in iron acquisition from ferritin have been identified: (i) Als3, a *Candida albicans* invasin-like protein [12] and (ii) IIsA, a *Bacillus cereus* surface protein [13]. It has been suggested that both proteins are ferritin receptors but direct *in vitro* binding to ferritin has only been reported in *B. cereus* [13].

B. cereus is a Gram-positive, spore-forming bacterium. This opportunistic human pathogen is frequently associated with food-borne infections due to the production of diarrheal and emetic toxins. Rare non-gastrointestinal infections such as meningitis, pneumonia, endophthalmitis or gas gangrene-like cutaneous infections have also been observed [22]. As a member of the *B. cereus sensu lato* group, *B. cereus* is closely related to other species of this group such as *B. anthracis*, the etiological agent of anthrax in mammals and the entomopathogen, *Bacillus thuringiensis* [23]. The ability of *B. cereus* and *B. thuringiensis* to colonize the host (mammal or insect) is linked to the presence of multiple adaptation and virulence factors, one of which is the capacity to acquire iron [24]. Several host iron sources can be used by *B. cereus*, including hemoproteins and ferritin [13,25,26,27,28,29,30]. In the past few years, various systems involved in iron acquisition have been discovered and some of them are required for full virulence in animal models (Table S1). The adaptation of *B. cereus* to iron paucity in host tissues is also illustrated by the Fur-regulation of the cytotoxin HlyII [31]. Among the iron uptake systems characterized in *B. cereus*, an original surface protein, IIsA, is involved in both ferritin and heme/hemoglobin acquisition [13,32]. This protein is composed of a unique combination of three conserved domains: an N-Terminal NEAT domain followed by 13 LRRs (Leucine Rich Repeat) and three C-Terminal SLH (S-Layer Homology) domains and has been shown to interact with heme and hemoglobin via the NEAT domain [13] (Abi Khalil *et al.*, unpublished data). Affinity tests revealed that IIsA binds to ferritin although the details of this interaction have not been described [13]. As a Fur-regulated gene, *ilsA* is specifically expressed in the insect hemocoel and under iron-depleted conditions [13,32]. Moreover, the virulence and the survival of the Δ *ilsA* mutant are affected in the lepidopteran insect model *Galleria mellonella* suggesting IIsA involvement in optimal colonization of a susceptible host [13].

These results prompted us to investigate the interaction between IIsA and ferritin and examine the possible involvement of two siderophores produced by *B. cereus*, bacillibactin and petrobactin, as partners of IIsA in ferritin utilization. Here, we demonstrate that IIsA acts

as ferritin receptor on the surface of *B. cereus*. Isothermal titration calorimetry data indicate a binding stoichiometry of 24 IIsA per ferritin molecule (i.e. one IIsA per ferritin subunit). Iron release kinetic measurements exhibit significant increase of iron mobilization from ferritin in the presence of IIsA. In addition, our results show that bacillibactin is essential for iron acquisition from ferritin and for full virulence of *B. cereus* in an insect model, suggesting that IIsA and bacillibactin work synergistically to effectively mobilize iron from host ferritin.

Results

IIsA is required for ferritin binding *in vivo*

Earlier studies showed that under iron-restricted conditions IIsA was located on the surface of *B. cereus*, and ELISA assays and Surface Plasmon Resonance measurements indicated a possible interaction between IIsA and ferritin *in vitro* [13]. To demonstrate the involvement of IIsA in the binding of ferritin to bacterial cells *in vivo*, ferritin localization was followed by immunofluorescence using the polyclonal antibody anti-HoSF (Horse Spleen Ferritin) (Figure 1). When the wild-type strain was grown in ferritin-enriched LB medium, condition in which *ilsA* is not expressed [13,32], ferritin was not immuno-detected on the bacterial cell surface. In sharp contrast, in iron-depleted medium supplemented with HoSF, ferritin aggregation was observed on the surface along the chains of bacterial cells. Moreover, ferritin recruitment was abolished in the Δ *ilsA* mutant whereas complementation of this mutation with a wild-type copy of *ilsA* restored ferritin aggregation on the bacterial surface (Figure 1). Because *B. cereus* has its own bacterial ferritins, the antibodies were tested against the bacteria and no staining was observed in living cells; fluorescence was only detected in dead cells (data not shown). Collectively, our data are in agreement with the expression profile and the localization of IIsA during iron starvation [13,32] and suggest that IIsA acts as a ferritin receptor *in vivo*.

IIsA interacts with each ferritin subunit

To further investigate the interaction of IIsA with the ferritin shell, the binding between the two proteins was followed by isothermal titration calorimetry (ITC). This highly sensitive thermodynamic technique measures heat variations during molecular interactions. In a single experiment, a complete thermodynamic profile of the interaction is obtained with the concomitant determination of the binding constant (K), the binding stoichiometry (n), the enthalpy (ΔH°), the entropy (ΔS°) and the free energy (ΔG°) changes of binding. The ITC technique has been proven very successful in obtaining accurate thermodynamic data for a number of molecular interactions involving ferritin [33,34] or IIsA (Abi Khalil *et al.*, unpublished data).

Figure 2 shows the injection heats for IIsA binding to recombinant human H-chain ferritin (HuHF) at pH 7.0 and 25°C (A) and the integrated heats (μJ) for each injection against the molar ratio of IIsA to HuHF after subtraction of the control heats (B). The other ferritins tested (recombinant human homopolymer L-chain, recombinant human heteropolymer ferritin composed of $\sim 20\text{H}$ -chains and 4L -chains, recombinant mouse homopolymer H-chain and Sigma horse spleen ferritin) gave similar ITC isotherms (data not shown). All of the experimental thermodynamic parameters obtained from curve fittings of the integrated heats to a model of one set of independent binding sites are compiled in Table 1. As the concentration of IIsA increases following successive injections into the ITC reaction cell containing ferritin, saturation is reached and subsequently less heat is absorbed on further addition of IIsA. The positive upward peaks seen in Figure 2A correspond to an exothermic reaction with a binding stoichiometry of ~ 24 IIsA per ferritin shell and an apparent dissociation constant (K_d) of ~ 540 nM. The binding of one IIsA molecule to one ferritin subunit did not alter binding of additional IIsA to the remaining subunits suggesting similar affinities and direct interactions between IIsA molecules and the 24-mer protein. The negative enthalpy change (~ -4 to -10 kJ/mol) and the large and positive entropy of binding (~ 85 to 110 J/mol.K) observed with all IIsA-ferritin interactions indicate that the interaction is both enthalpically and entropically driven. The most likely contributions to the large positive ΔS^0 values are probably due to changes in the hydration of the two proteins upon binding leading to an overall increase of the disorder of the system. To determine whether IIsA NEAT or LRR domains are involved in ferritin binding, dot blot experiments were performed separately on either domain following their individual expression and purification. No significant binding was found between HoSF and the NEAT domain and HoSF bound weakly to the LRR domains while a strong binding appeared with full-length IIsA (Figure S1). These results suggest that the presence of both the NEAT and LRR domains may be crucial for optimal binding of ferritin to IIsA.

IIsA enhances iron release from ferritin

To examine whether IIsA plays any role in iron mobilization from ferritin, spectrophotometric kinetic experiments using HuHF in the presence of IIsA were performed under aerobic non-reducing conditions. Figure 3 shows that the bacterial siderophore DFO (Deferoxamine B) was able to release only a small amount of iron from HuHF loaded with ~ 500 Fe/protein at a very slow rate (less than 5% after 90 minutes), a result in accord with earlier data obtained with other ferritins [35,36,37]. However, in the presence of IIsA and the Fe(III)-chelator DFO, a faster rate and a significant amount of iron was released from the protein ($\sim 25\%$ of total iron present within the protein) during the same amount of time (Figure 3) suggesting a role of IIsA in iron mobilization from ferritin. It is conceivable that IIsA

might alter the ferritin structural integrity rendering the iron core more accessible to iron chelators such as microbial siderophores.

Production of siderophores in *B. cereus*

In iron-depleted medium, *B. cereus* and *B. anthracis* synthesize two catechol-based siderophores, bacillibactin and petrobactin [38,39]. The organization of the biosynthetic gene clusters for both siderophores is highly conserved in the two species. Petrobactin and bacillibactin productions rely on the *asbABCDEF* and *entA-dhbBCF* clusters, respectively. To evaluate the relative contribution of the two siderophores in catechol production, the total siderophore production in wild-type and isogenic mutant strains Δasb and $\Delta entA$ and double mutant $\Delta entA\Delta asb$ were compared using the Arnow assay [40] (Figure 5). The mutant strains were obtained from deletions of the *asbABCDEF* cluster and *entA* gene in the wild-type strain (Figure 4). The expression of the *asbA* and *entA* genes was activated in the wild type strain grown under iron-depleted conditions (data not shown) and catechol production was detected in the wild type. The production of catechols was almost four times lower in the bacillibactin $\Delta entA$ mutant and the wild-type production was restored following complementation of $\Delta entA$ mutant with *entA* gene. In contrast, catechol production was not impaired in Δasb strain, suggesting a possible overproduction of bacillibactin to compensate for the absence of petrobactin. The strongest reduction in catechol production was observed in the $\Delta entA\Delta asb$ double mutant (Figure 5). These data indicate that bacillibactin represents the primary siderophore produced by *B. cereus* in low iron environment.

Bacillibactin is essential for iron acquisition from ferritin

The ability of siderophores to remove iron from ferritin *in vitro* has been documented [41]. To investigate the ability of *B. cereus* siderophores to extract iron from ferritin *in vivo*, the growth of the wild type and mutant strains in different media was followed. No difference in growth was noticed in LB (Figure 6A). In iron-depleted medium, bacterial growth was strongly reduced for any strain (OD max after 16h ~ 0.1), the $\Delta entA$ and $\Delta entA\Delta asb$ mutants being the most affected strains (Figure 6B). Supplementation with ferritin as sole iron source restored the growth of the wild type and the Δasb strains whereas the mutants disrupted in bacillibactin production were still unable to grow under these conditions (Figure 6C). The importance of *entA* (and therefore of bacillibactin) in iron acquisition from ferritin was further confirmed with the $\Delta entA\Omega entA$ complemented strain since its ability to grow with ferritin was fully rescued (Figure 6C). Zawadzka *et al.* showed that the *B. cereus* FeuA transporter could bind both bacillibactin and the exogenous *E. coli* siderophore enterobactin [42]. Our data showed that the growth defect with ferritin due to the *entA* mutation was recovered when *E.*

coli enterobactin was added to the culture medium (Figure 6D) suggesting that the FeuA transporter is involved in this process. The results of our study emphasize an important role of bacillibactin in iron acquisition from ferritin in *B. cereus* in contrast to previous work with *B. anthracis* pointing out a major role of the siderophore petrobactin in bacterial growth under iron starvation [43,44,45,46].

Bacillibactin is important for bacterial virulence in an insect model

In addition to iron storage, ferritin serves as iron transporter in insects. High amounts of ferritin are found in the insect hemocoel (mg/L quantity) compared to the low level of vertebrate plasma ferritin ($\mu\text{g/L}$ quantity) [3,47]. Thus, insect ferritins represent an easily accessible iron-concentrated source for extracellular pathogens such as *B. cereus* and have been purified from the tissues and the hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella* [48,49], a very useful model to study bacterial pathogenesis [50]. While earlier studies have reported on the importance of IIsA in growth and survival of *B. cereus* in *G. mellonella* [13,32], our current data suggest that bacillibactin acts in unison with IIsA in ferritin utilization. To investigate whether *B. cereus* siderophores are also involved in bacterial pathogenicity, virulence of the siderophore mutants was assayed in *G. mellonella* by direct injection into the hemocoel of various doses of mid-log phase bacteria (1×10^3 to 3×10^4). The number of living larvae was recorded for three days (Figure 7) and the 50% lethal doses (LD_{50}) 24 hours after infection were evaluated by Probit analysis (Table 2). ΔentA and $\Delta\text{entA}\Delta\text{asb}$ mutants were significantly less virulent than the wild-type strain with a 5.6-fold and 6.7-fold decrease, respectively. At the highest dose, only the double mutant was affected. The virulence of the ΔentA strain complemented with wild-type *entA* ($\Delta\text{entA}\Omega\text{entA}$) was partially restored and no difference was observed between the Δasb mutant and the wild-type strain. While most of the larvae died 24 hours after the injection of the wild type or the Δasb mutant, survival with the ΔentA mutant continued to decrease after the first 24 hours (Figure 7). Since petrobactin is the first siderophore produced upon bacterial outgrowth from spores in *B. anthracis* [46], the role of petrobactin in *B. cereus* virulence following inoculation with spores was then investigated. The infection tests with wild type and mutant spores yielded the same conclusions as the previous assays with vegetative cells (data not shown). These results confirm that bacillibactin plays a more important role than petrobactin in *B. cereus* virulence. Our data indicate that the strains impaired in bacillibactin production are still able to kill their host but slower than the wild type suggesting that bacillibactin is an important adaptation factor that allows *B. cereus* to disseminate into the low iron environment encountered in the insect hemocoel.

Discussion

For pathogens, the ability to cope with the low iron environment encountered in the host is essential for tissue colonization. Thus, the production of efficient iron acquisition systems represents key factors. Because ferritin is the major iron storage protein found in living organisms, pathogens have developed efficient mechanisms to use this iron source and gain rapid access to important quantities of iron. However, studies of the microbial determinants involved in host ferritin iron theft remain scarce. The present study showed that the bacterial surface protein IIsA interacts directly with the ferritin shell and alters its structural integrity leading to an amplification of the siderophores-mediated iron release from the nanocage.

In an earlier work [13], an *in vitro* interaction between recombinant IIsA and horse spleen ferritin was reported. Here, a more detailed *in vivo* characterization of this interaction demonstrates that IIsA is required for ferritin recognition and recruitment at the bacterial surface. The observed binding stoichiometry argues in favor of a direct binding of IIsA on the surface of each ferritin subunit, irrespective of the ferritin source or type (Table 1) suggesting a role for IIsA as ferritin receptor. This novel finding advances our understanding of iron acquisition by pathogens since to our knowledge no host-ferritin receptor has been identified thus far in microorganisms. The only existing clue was described in the pathogenic fungus *C. albicans*, where Als3, which has no structural homology with IIsA, was required for ferritin binding to hypha. However, the authors did not show any direct interaction between Als3 and ferritin [12]. To further understand how IIsA interacts with ferritin and which domain(s) is involved in the binding, we searched for ferritin-binding receptors that share some degree of homology with IIsA. In mammals, several receptors associated with serum ferritin internalization have been described. Tim-2, a T cell immunoglobulin-domain and a mucin-domain protein expressed in various mouse tissues and TfR-1, the human transferrin receptor-1 are both able to recognize H-chain ferritin [51,52] whereas Scara5, a class A scavenger receptor binds L-chain ferritin and is used to deliver iron to mouse kidney cells [53]. However, no homology or conserved domains exist or is evident between IIsA and these ferritin receptors.

IIsA has an original structure consisting of LRR and NEAT domains. LRR motifs are found in a broad range of proteins and are frequently involved in protein-protein interactions [54]. The NEAT domains are known to interact with heme and hemoproteins. However, the NEAT protein IIsA from *S. aureus* was shown to bind several non-heme host proteins [55]. A recent investigation from our laboratory showed that *B. cereus* IIsA NEAT domain alone exhibited affinity for heme binding (Abi Khalil *et al.*, unpublished data). Here, we tested separately the LRR and NEAT domains of *B. cereus* IIsA for their ability to bind ferritin. Although a weak interaction was observed with the LRR domains alone but not with the NEAT domain, only

the IIsA protein bound ferritin efficiently. However, we cannot exclude structural modifications in the LRR domains during purification, which would explain the weak binding affinity observed with these domains. Therefore, further in-depth structural and mutagenesis studies are needed to pinpoint the exact location of the binding site between IIsA and ferritin.

Among the NEAT proteins, a few carry also LRR domains. They are found only in the Firmicutes phylum. Besides IIsA, two other members of this composite NEAT protein family have been described in *S. pyogenes* (Shr) and in *B. anthracis* (Hal). Similarly to IIsA, both NEAT proteins are involved in heme acquisition and bacterial virulence but no role in ferritin acquisition has been reported yet [56,57,58,59]. Interestingly, *B. anthracis* possesses an ORF encoding a protein termed BslL (*Ba1346*) [60] that is nearly identical to the last three fourths of IIsA with LRR domains followed by three SLH domains. *bslL* is preceded by another gene encoding a protein that contains a NEAT domain. Except for an in frame mutation, *Ba1345-1346* is nearly identical to *ilsA*. BslK (*Ba1093*), another *B. anthracis* protein, shares some similarities with both IIsA NEAT and SLH domains [60]. BslK binds and directionally transfers heme to the Ild system [61]. However, the involvement of these proteins in ferritin acquisition has not been studied. Further experiments are needed to determine whether the ability of IIsA to bind ferritin is a conserved feature of the composite NEAT-LRR proteins found in other pathogenic bacteria.

IIsA-ferritin interaction is also shown to enhance the rate of iron release from ferritin. This result constitutes a major finding since no direct effect of a microbial protein on iron mobilization from host ferritin has ever been reported. As the supramolecular structure of the ferritin shell is extremely robust, it is possible that IIsA induces small conformational modifications upon binding leading to local destabilization of the ferritin subunits. This observation is supported by the large positive ΔS^0 values obtained by ITC reflecting an increase in the system's disorder.

Several models for iron mobilization from the protein nanocage have been proposed but the exact *in vivo* mechanism of iron release remains poorly understood [62]. It has been suggested that iron ions exit through the eight gated-pores located at the 3-fold symmetry axis of ferritin [63]. Mutations of specific residues near the ferritin pore provoke an increase in iron release and are associated with localized unfolding without changes in the overall protein assembly [64]. Moreover, the 3-fold channels can be opened and closed by chaotropic agents [65] and specific ferritin binding peptides [66]. By interfering with the protein intramolecular forces, these small molecules can significantly alter the rate of iron mobilization from ferritin, underlying the importance of pore flexibility in the transfer of iron in or out of the nanocage cavity. In addition to the several ferritin receptors described above, a number of studies have reported the existence of other proteins that bind ferritin (for review,

see [20]). In the absence of a clear mechanism of iron release from ferritin, it has been suggested that ferritin-binding proteins may cause opening or closing of the 3-fold channels and regulate iron storage or release. Hence, it is tempting to speculate that IIsA might act as a chaperone protein that dock around the 3-fold channels causing pore opening and rapid iron mobilization from ferritin. In contrast, the slow iron release rate by DFO alone (less than 5% of the total iron present in ferritin) is probably a consequence of the chelator size, which is too large to pass through the narrow ferritin pores. Direct chelation at the surface of the iron core has been reported with small bidentate Fe(III)-chelator [67,68] and is unlikely to be relevant in our case. However, our proposed model of iron release involving IIsA contrasts with previous models for microbial iron acquisition from host ferritin. For instance, *B. cenocepacia* and *N. meningitidis* adopt direct or indirect proteolytic degradation strategy, respectively [16,18]. Preliminary tests using protease inhibitors suggest that ferritin utilization in *B. cereus* does not rely on proteolysis *in vivo* (data not shown). This is further supported by the *in vitro* assays performed in this study showing that the interplay between IIsA and *B. cereus* bacillibactin siderophore is sufficient to enhance iron mobilization. Another strategy used by microbes is based on a reductase activity as proposed for *L. monocytogenes* and *C. albicans* [12,21]. However, DFO can remove iron from ferritin in a non-reductive process [37] and our *in vitro* experiments were carried out under non-reducing conditions. Thus, it is likely that the reductive pathway is not relevant in *B. cereus* although enhancement of iron mobilization through redox processes is not excluded by the present study.

The effect of microbial siderophores on iron mobilization from ferritin has been emphasized thirty years ago [41]. Although two *B. cereus* siderophores are produced in iron-depleted media, our data show that only bacillibactin enables iron transfer from ferritin. Compared to earlier studies with the Δ *ilsA* mutant [13], the Δ *entA* strain deficient in bacillibactin production displayed a more pronounced growth defect on ferritin. This indicates that bacillibactin is essential for iron uptake from ferritin and that IIsA synergizes this process. Furthermore, as the ferric iron core of ferritin is highly insoluble in aerobic conditions and neutral pH ($K_{sp}(\text{Fe}(\text{OH})_3)=10^{-39}$) [62], the major influence of bacillibactin could be ascribed to its stronger affinity for ferric ions ($K_f=10^{47.6}$) [69] compared to petrobactin ($K_f=10^{23}$) [70]. Bacillibactin is not only important for growth with ferritin but also for bacterial virulence in an insect model. These results contrast with the major role played by petrobactin in *B. anthracis*. In this closely related species, petrobactin is the primary siderophore synthesized under conditions of iron starvation [44] and is important for virulence in mice and macrophages [43]. Petrobactin, but not bacillibactin, possesses a unique ability to evade the mammalian siderophore scavenger protein named siderocalin [71]. It has been proposed that petrobactin is probably a trait required for pathogenesis in mammals [38]. Considering that no siderocalin

homolog has been described in insects to date and that ferritin is more abundant in the insect hemocoel than in the vertebrate blood, the relevance of bacillibactin in *G. mellonella* is meaningful. However, depending on the host infected, the type of tissues and the available iron source, variation in the relative importance of the *B. cereus* siderophores might be expected. Further studies in mammal models are needed to elucidate this possibility.

In conclusion, a new model of iron mobilization from host ferritin in bacteria is proposed (Figure 8). This model is based on ferritin-subunit destabilization by IIsA and iron core removal and transport by bacillibactin. The results of our current study and additional work from our laboratory [13] (Abi Khalil *et al.*, unpublished data) provide new insights into iron uptake by pathogens and ascribe a multifaceted role for IIsA in iron acquisition from structurally different host iron sources. Chelation therapies used to manage hematological disorders are often limited by the slow rates of iron-DFO formation and require long-term subcutaneous infusion. Our observation of enhanced iron mobilization from ferritin by IIsA in the presence of DFO might offer exciting alternatives for the treatment of iron-overload diseases.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

Bacillus cereus strain ATCC14579 (laboratory stock) was used throughout this study. The mutant *B. cereus* ATCC14579 Δ *iIsA* was previously constructed by homologous recombination [32] and complemented with the pHT304*Ω**iIsA* plasmid [13]. *E. coli* K12 strain TG1 was used as a host for cloning experiments. $\text{Dam}^-/\text{Dcm}^-$ *E. coli* strain ET12567 (laboratory stock) was used to generate unmethylated DNA for electro-transformation in *B. cereus*. *E. coli* strains M15 (laboratory stock) and C600 Δ *hemA* [72] were used for protein overproduction. All the strains used in this study are listed in Table 3. *E. coli* and *B. cereus* were cultured in LB (Luria-Bertani) broth, with vigorous shaking (175 rpm) at 37°C and *E. coli* C600 Δ *hemA* was cultured in BHI (Brain Heart Infusion, Difco) broth, without shaking. For electro-transformation, *B. cereus* was grown in BHI. *E. coli* and *B. cereus* strains were transformed by electroporation as previously described [73,74]. The following concentrations of antibiotic were used for bacterial selection: ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and kanamycin 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *E. coli*; kanamycin 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, tetracycline 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and erythromycin 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *B. cereus*. The iron chelator, 2,2'-dipyridyl and the horse spleen ferritin (HoSF) were purchased from Sigma-Aldrich. 2,2'-dipyridyl was used at final concentrations of 200, 450 and 600 μM and ferritin at 300 nM.

Immunofluorescence analysis

B. cereus wild type, Δ ilsA and Δ ilsA Ω ilsA strains were grown overnight in LB medium supplemented with 200 μ M 2,2'-dipyridyl. These cultures were used to inoculate several media (LB / LB + 0.3 μ M HoSF/ LB + 450 μ M 2,2'-dipyridyl / LB + 450 μ M 2,2'-dipyridyl + 0.3 μ M HoSF) at 37°C and a final OD of 0.1. Mid-log phase bacteria were collected, washed twice in PBS buffer and used immediately. Bacterial cells ($\sim 10^8$) were fixed with 4% formaldehyde dissolved in PBS on poly-L-Lysine slides (Labomoderne). After 20 min, bacteria were washed with PBS, blocked with 1% BSA and incubated for one hour at room temperature with an anti-HoSF polyclonal antibody (Sigma-Aldrich) Alexa Fluor[®] 594-conjugated (Invitrogen) at a dilution of 1:60 in 1% BSA. Then, bacteria were washed with PBS, fixed a second time with 4% formaldehyde and bacterial DNA was counterstained with DAPI diluted at 1:300 in 1% BSA. Finally, slides were rinsed with water, cover-slips were stuck with the antifading Polyvinyl alcohol mounting medium with DABCO[®] (Fluka) and dried at 37°C for 30 min. At least two experiments in duplicates were examined by phase contrast and epifluorescence microscopy using a Zeiss Observer Z1 microscope and the Axiovision imaging software (Carl Zeiss). A representative picture of each strain was selected.

Overproduction and purification of IIsA and its NEAT and LRR domains

GST-IIsA, GST-NEAT^{IIsA} and GST-LRR^{IIsA} were purified as recombinant proteins from *E. coli* using the expression plasmids pGEX6P1-*ilsA*, pGEX6P1-NEAT^{IIsA} and pGEX6P1-LRR^{IIsA}. In order to purify recombinant IIsA protein and its NEAT and LRR domains, sequences corresponding to Ala29-Lys760, Thr24-Gly163 and Lys208-Asn492 respectively were amplified from *B. cereus* strain ATCC14579 with paired primers FIIsA/RIIsA, FNEAT/RNEAT and FLRR/RLRR respectively (Table 4) and cloned into the plasmid pGEX6P1 holding the tag GST (GE Healthcare) after digestion of the PCR products with EcoRI/XhoI. Recombinant LRR^{IIsA} were overexpressed in *E. coli* M15 as previously described in [13], except that the bacterial culture was incubated for 3 h at 30 °C and overnight at 15 °C. IIsA and NEAT^{IIsA} were produced in apo-form ((without heme bound to the NEAT domain) by using *E. coli* strain C600 Δ hemA impaired in heme biosynthesis [72]. The recombinant apo-proteins were expressed in BHI (Brain Heart Infusion, Difco) supplemented with appropriate antibiotics and the cultures were grown into bottles, in static phase, at 37 °C to an OD₆₀₀=0.8-0.9. The same protocol used for LRR^{IIsA} purification is then followed. The Bulk GST Purification Module (GE Healthcare) was used as recommended by the manufacturer. GST tag was removed by eluting the proteins with the PreScission Protease (GE Healthcare). The purified proteins were concentrated by ultrafiltration and stored at -20°C.

For apo-IIsA and apo-NEAT^{IIsA}, in order to reconstitute holo-proteins, hemin (Sigma-Aldrich) was added to protein preparations until saturation of 80%.

Microcalorimetry

Isothermal titration calorimetry (ITC) experiments were performed at 25°C on a low volume (185 µl) NanoITC (TA Instruments). Titrant and sample solutions were made from the same stock buffer solution (50 mM Tris- HCl pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1 mM DTT). IIsA and its purified domains were obtained as described hereabove. Concerning the ferritin samples, recombinant mouse H-chain (MoHF), human H-chain (HuHF), human L-chain (HuLF) and human heteropolymer H/L (HuH/LF) were purified as previously described [75,76]. To test for the interaction between IIsA (or its NEAT and LRR domains) and ferritins, an automated sequence of 16 injections, each of 3 µl titrant (229 µM holo-IIsA) into the sample cell containing 1 µM ferritin, was performed at intervals of 5 min to allow complete equilibration, with the equivalence point coming at the area midpoint of the titration. The protein solution was stirred at 250 rpm to ensure rapid mixing of the titrant upon injection. The area under the resulting peak following each injection is proportional to the heat of interaction, which is normalized by the concentration of the added titrant and corrected for the dilution heat using the buffer solution alone to give the molar binding enthalpy ΔH° . The data were collected automatically and analyzed using NanoAnalyze fitting program (TA Instruments). The standard enthalpy change (ΔH°), the binding constant (K), and the stoichiometry of binding (n) are determined by a single ITC experiment. From these values, the standard Gibbs free energy change (ΔG°), and standard entropy change (ΔS°) are calculated using the following equations: $\Delta G^\circ = - RT \ln K$ and $T \Delta S^\circ = \Delta H^\circ - \Delta G^\circ$ where R is the universal gas constant (1.9872 cal mol⁻¹ K⁻¹) and T is the temperature in Kelvin degrees. The dissociation constant is expressed as $K_d = 1/K$ (in mol l⁻¹). All experiments were repeated two to four times and control experiments (IIsA or ferritin alone in the buffer) did not show any significant heat changes.

Iron release assays

Apo-ferritin (HuHF) was loaded aerobically with 500 Fe atoms/nanocage. Typically, the FeSO₄ solution was prepared in pH 2 DI water and loaded into ferritin via ten additions of 50 Fe(II) per shell. The iron release experiments were conducted in 50 mM Tris-HCl pH 7 and 150 mM NaCl in presence of 1 µM ferritin, 1 mM deferoxamine B (DFO – Sigma-Aldrich) chelator and with or without purified IIsA at 5 µM. The kinetics of iron release were performed in aerobiosis at 25°C and monitored by the increase in the characteristic MLCT absorption band of the Fe(III)-DFO complex (425 nm). The percent of iron release from ferritin was

calculated using experimentally determined UV-Vis molar absorptivity coefficient of this complex at 425 nm ($3500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Experiments were repeated three times with different protein preparations.

DNA manipulations and plasmid constructions

Chromosomal DNA was extracted from *B. cereus* cells with the Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN). Plasmid DNA was extracted from *E. coli* and *B. cereus* using QIAprep spin columns (QIAGEN). For *B. cereus*, 5 mg ml^{-1} of lysozyme was added and cells were incubated at 37°C for 1 h. Restriction enzymes and T4 DNA ligase were used according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). Oligonucleotide primers (Table 4) were synthesized by Sigma-Proligo. PCRs were performed in an Applied Biosystem 2720 Thermak cycler (Applied Biosystem) with Phusion® High-Fidelity or Taq DNA Polymerase (New England Biolabs). Amplified fragments were purified using the QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN). Digested DNA fragments were separated by electrophoresis on 0,8% agarose gels and extracted from gels using the QIAquick gel extraction Kit (QIAGEN). Nucleotide sequences were determined by Beckman Coulter Genomics.

The thermosensitive plasmids pMAD [77] and pRN5101 [78] were used for homologous recombination. The low-copy-number plasmid pHT304 [79] was used for complementation experiments with wild-type *entA* gene under its own promoter. The vector pGEX6P1 (GE Healthcare) was used to overproduce Glutathione S-transferase (GST)-tagged protein under the control of a *tac* promoter. All the plasmids used in this study are reported in Table 3.

Construction of the *B. cereus* mutant strains

B. cereus Δasb and $\Delta entA$ were constructed as follows. For *asbABCDEF* (*bc1978-1983*) deletion, a 956 bp EcoRI/BamHI DNA fragment and a 985 bp PstI/SalI DNA fragment, corresponding to the chromosomal regions located immediately upstream and downstream from the *asb* locus, were generated by PCR, using *B. cereus* strain ATCC14579 chromosomal DNA as a template and oligonucleotide pairs FpetU–RpetU and FpetD–RpetD respectively (Table 4). A Tet^R cassette, conferring resistance to tetracycline, was purified from pHTS1 [80] as a 1.6 kb PstI/BamHI fragment carrying the *tet* gene from *B. cereus*. The amplified DNA fragments and the Tet^R cassette were digested with the appropriate enzymes and inserted between the EcoRI and SalI sites of the thermosensitive plasmid pMAD [77] by ligation using the T4 DNA ligase.

For *entA* (*bc2302*) deletion, a 996 bp HindIII/XbaI and a 957 bp XhoI/BamHI DNA regions upstream and downstream the *entA* gene, were respectively amplified by PCR, using chromosomal DNA of the ATCC14579 strain of *B. cereus* as template and FbacU/RbacU, FbacD/RbacD as primers (Table 4). In addition, a 359 bp PstI/XhoI DNA fragment

corresponding to the putative regulatory region of *entA-dhbBCF* was amplified using the same template and the primer pair FbacP/RbacP (Table 4). A Kan^R cassette containing *aphA3* gene, conferring resistance to kanamycin, was purified from pDG783 [81] as a 1.5 kb PstI/XbaI. The amplified DNA fragments and the Kan^R cassette were digested with the appropriate enzymes and inserted between the HindIII and BamHI sites of the thermosensitive plasmid pRN5101 [82] as illustrated in Figure 4B.

The resulting plasmids pMAD Ω *asb::tet* and pRN5101 Ω *entA::kan* were produced in *E. coli*, and then used to transform *B. cereus* wild type strain by electroporation. Integrants resistant to tetracycline (for Δ *asb*) or kanamycin (for Δ *entA*) and sensitive to erythromycin arose through a double cross-over event, in which the chromosomal wild-type copies of *asbABCEDF* and *entA* coding sequences were deleted and replaced by the Tet^R and Kan^R cassette respectively. The chromosomal allelic exchanges were checked by PCR, using appropriate primers and by sequencing the insertion sites.

The genetic complementation of the Δ *entA* mutant was carried out as follows. A 1142 bp DNA fragment corresponding to the *entA* gene and its putative promoter was amplified by PCR using the *B. cereus* ATCC14579 genomic DNA as a template and FbacComp/RbacComp as primers (Table 4). The PCR product was digested with PstI and XbaI restriction enzymes and inserted into the plasmid pHT304 [79]. The resulting plasmid (pHT304 Ω *entA*) was amplified in *E. coli* and then introduced into the Δ *entA* mutant strain of *B. cereus* by electroporation.

Measurement of catechol production

Extracellular levels of catechols were measured using the Arnow assay [40]. Bacteria were grown overnight (20 h) at 37°C in LB medium + 200 μ M 2,2'-dipyridyl. Then, samples of cultures were collected, centrifuged and filtered to remove bacteria. Samples were mixed sequentially with equal volumes of 0.5 N HCl, nitrite-molybdate reagent (10% sodium nitrite and 10% sodium molybdate), and 1 N NaOH. Positive reactions produce a red colour and absorbance was determined at 510 nm. Data were normalized to OD₆₀₀ of the original culture and percentages of wild-type catechol level in culture supernatants are presented. Three independent replicates were statistically analyzed using the Student's T-test.

Growth assays

B. cereus strains were grown overnight at 37°C under low iron conditions by inoculating strains in LB medium supplemented with 200 μ M 2,2'-dipyridyl. Overnight cultures were inoculated into a new LB medium + 200 μ M 2,2'-dipyridyl at a final OD of 0.01. Bacteria from mid-log phase culture were washed twice in LB medium containing 600 μ M 2,2'-dipyridyl, then inoculated to a final optical density (OD) of about 0.005 into LB medium or LB + 600 μ M

2,2'-dipyridyl + 0.3 μ M HoSF supplemented or not with 5 μ M Enterobactin (Sigma-Aldrich). Stock solution of ferritin was prechelated in 2 mM 2,2'-dipyridyl for two hours in order to eliminate the free iron. *B. cereus* cells were grown at 37°C in 96-wells microtiter plate under continuous shaking. The OD was measured at 600 nm every hour over 16 hours using a TECAN Infinite M200 Microplate Reader (TECAN Group). The assays were repeated at least three times.

Virulence assays

Bacterial strains were grown in LB medium and bacterial concentrations were monitored by optical density measurements and plating dilutions onto LB agar plates. *B. cereus* wild-type and mutant strains were injected separately into the hemocoel of *G. mellonella*. Insect eggs were incubated at 25°C and the larvae reared on beeswax and pollen (Naturalim). Last-instar larvae weighing about 200 mg were injected with 10 μ l of mid-log phase bacteria (or spores) suspended in PBS, using the microinjector (Buckard Scientific) as previously described [83]. Various doses of bacteria (1×10^3 to 3×10^4 bacteria/larva) were used, and each experiment was repeated at least three times with 20 larvae. A control group of larvae was injected with PBS only and no effect was observed. The survival rate (% of alive/total number of infected larvae) was recorded during 72 hours after infection. Based on the data obtained, LD₅₀ were estimated by Probit analysis with StatPlus® software (AnalystSoft).

Acknowledgments

We thank the members of the GrabIron project for helpful discussions and particularly Gwenaëlle André Leroux for the protein purifications. We are also grateful to Tyson Terpstra for his valuable help for ITC studies.

References

1. Pierre JL, Fontecave M (1999) Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry. *Biometals* 12: 195-199.
2. Schaible UE, Kaufmann SH (2004) Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* 2: 946-953.
3. Ong ST, Ho JZ, Ho B, Ding JL (2006) Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology* 211: 295-314.
4. Skaar EP (2010) The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog* 6: e1000949.
5. Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PB, Ward CG (2005) Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43: 325-330.
6. Ratledge C, Dover LG (2000) Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* 54: 881-941.
7. Litwin CM, Calderwood SB (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 6: 137-149.
8. Chu BC, Garcia-Herrero A, Johanson TH, Krewulak KD, Lau CK, et al. (2010) Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* 23: 601-611.
9. Wandersman C, Delepelaire P (2012) Haemophore functions revisited. *Mol Microbiol* 85: 618-631.
10. Mazmanian SK, Skaar EP, Gaspar AH, Humayun M, Gornicki P, et al. (2003) Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299: 906-909.
11. Nobles CL, Maresso AW (2011) The theft of host heme by Gram-positive pathogenic bacteria. *Metallomics* 3: 788-796.
12. Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, Thewes S, Laue M, et al. (2008) The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog* 4: e1000217.
13. Daou N, Buisson C, Gohar M, Vidic J, Bierne H, et al. (2009) IIsA, a unique surface protein of *Bacillus cereus* required for iron acquisition from heme, hemoglobin and ferritin. *PLoS Pathog* 5: e1000675.
14. Gobin J, Horwitz MA (1996) Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in the *M. tuberculosis* cell wall. *J Exp Med* 183: 1527-1532.
15. Jin B, Newton SM, Shao Y, Jiang X, Charbit A, et al. (2006) Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 59: 1185-1198.
16. Larson JA, Howie HL, So M (2004) *Neisseria meningitidis* accelerates ferritin degradation in host epithelial cells to yield an essential iron source. *Mol Microbiol* 53: 807-820.
17. Sikkema DJ, Brubaker RR (1989) Outer membrane peptides of *Yersinia pestis* mediating siderophore-independent assimilation of iron. *Biol Met* 2: 174-184.
18. Whitby PW, Vanwagoner TM, Springer JM, Morton DJ, Seale TW, et al. (2006) *Burkholderia cenocepacia* utilizes ferritin as an iron source. *J Med Microbiol* 55: 661-668.
19. Bou-Abdallah F (2010) The iron redox and hydrolysis chemistry of the ferritins. *Biochim Biophys Acta* 1800: 719-731.
20. Watt RK (2011) The many faces of the octahedral ferritin protein. *Biometals* 24: 489-500.
21. Deneer HG, 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.
22. Bottone EJ (2010) *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 23: 382-398.
23. Vilas-Boas GT, Peruca AP, Arantes OM (2007) Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Can J Microbiol* 53: 673-687.
24. Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N (2010) *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol* 18: 189-194.
25. Fukushima T, Sia AK, Allred BE, Nichiporuk R, Zhou Z, et al. (2012) *Bacillus cereus* iron uptake protein fishes out an unstable ferric citrate trimer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16829-16834.
26. Harvie DR, Ellar DJ (2005) A ferric dicitrate uptake system is required for the full virulence of *Bacillus cereus*. *Curr Microbiol* 50: 246-250.
27. Park RY, Choi MH, Sun HY, Shin SH (2005) Production of catechol-siderophore and utilization of transferrin-bound iron in *Bacillus cereus*. *Biol Pharm Bull* 28: 1132-1135.
28. Sato N, Ikeda S, Mikami T, Matsumoto T (1999) *Bacillus cereus* dissociates hemoglobin and uses released heme as an iron source. *Biol Pharm Bull* 22: 1118-1121.
29. Sato N, Kurotaki H, Ikeda S, Daio R, Nishinome N, et al. (1999) Lactoferrin inhibits *Bacillus cereus* growth and heme analogs recover its growth. *Biol Pharm Bull* 22: 197-199.
30. 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.

31. Sineva E, Shadrin A, Rodikova EA, Andreeva-Kovalevskaya ZI, Protsenko AS, et al. (2012) Iron regulates expression of *Bacillus cereus* hemolysin II via global regulator Fur. *J Bacteriol* 194: 3327-3335.
32. 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.
33. Bou-Abdallah F, Arosio P, Levi S, Janus-Chandler C, Chasteen ND (2003) Defining metal ion inhibitor interactions with recombinant human H- and L-chain ferritins and site-directed variants: an isothermal titration calorimetry study. *J Biol Inorg Chem* 8: 489-497.
34. Bou-Abdallah F, Arosio P, Santambrogio P, Yang X, Janus-Chandler C, et al. (2002) Ferrous ion binding to recombinant human H-chain ferritin. An isothermal titration calorimetry study. *Biochemistry* 41: 11184-11191.
35. Bou-Abdallah F, McNally J, Liu XX, Melman A (2011) Oxygen catalyzed mobilization of iron from ferritin by iron(III) chelate ligands. *Chem Commun (Camb)* 47: 731-733.
36. Crichton RR, Roman F, Roland F (1980) Iron mobilization from ferritin by chelating agents. *J Inorg Biochem* 13: 305-316.
37. Johnson J, Kenealey J, Hilton RJ, Brosnahan D, Watt RK, et al. (2011) Non-reductive iron release from horse spleen ferritin using desferoxamine chelation. *J Inorg Biochem* 105: 202-207.
38. Koppisch AT, Dhungana S, Hill KK, Boukhalfa H, Heine HS, et al. (2008) Petrobactin is produced by both pathogenic and non-pathogenic isolates of the *Bacillus cereus* group of bacteria. *Biometals* 21: 581-589.
39. Wilson MK, Abergel RJ, Raymond KN, Arceneaux JE, Byers BR (2006) Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 348: 320-325.
40. Arnow LE (1937) Proposed Chemical Mechanisms for the Production of Skin Erythema and Pigmentation by Radiant Energy. *Science* 86: 176.
41. Tidmarsh GF, Klebba PE, Rosenberg LT (1983) Rapid release of iron from ferritin by siderophores. *J Inorg Biochem* 18: 161-168.
42. Zawadzka AM, Abergel RJ, Nichiporuk R, Andersen UN, Raymond KN (2009) Siderophore-mediated iron acquisition systems in *Bacillus cereus*: Identification of receptors for anthrax virulence-associated petrobactin. *Biochemistry* 48: 3645-3657.
43. Cendrowski S, MacArthur W, Hanna P (2004) *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol Microbiol* 51: 407-417.
44. Koppisch AT, Browder CC, Moe AL, Shelley JT, Kinkel BA, et al. (2005) Petrobactin is the primary siderophore synthesized by *Bacillus anthracis* str. Sterne under conditions of iron starvation. *Biometals* 18: 577-585.
45. Lee JY, Passalacqua KD, Hanna PC, Sherman DH (2011) Regulation of petrobactin and bacillibactin biosynthesis in *Bacillus anthracis* under iron and oxygen variation. *PLoS One* 6: e20777.
46. Wilson MK, Abergel RJ, Arceneaux JE, Raymond KN, Byers BR (2010) Temporal production of the two *Bacillus anthracis* siderophores, petrobactin and bacillibactin. *Biometals* 23: 129-134.
47. Pham DQ, Winzerling JJ (2010) Insect ferritins: Typical or atypical? *Biochim Biophys Acta* 1800: 824-833.
48. Kim BS, Lee CS, Yun CY, Yeo SM, Park WM, et al. (2001) Characterization and immunological analysis of ferritin from the hemolymph of *Galleria mellonella*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 129: 501-509.
49. Yuk Ji-Eun D-HS, Chi-Won CHOI, Jikhyon HAN, Hye-Kyoung CHOI, Jong-Bae PARK, Seock-Yeon HWANG2, Sang Kyun KOH and Chi-Young YUN (2005) Characterization of Tissue-Ferritin Purified from Wax Moth, *Galleria mellonella*. *ENTOMOLOGICAL RESEARCH* 35: 227-234.
50. Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D (2012) The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. *J Vis Exp*.
51. Chen TT, Li L, Chung DH, Allen CD, Torti SV, et al. (2005) TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *J Exp Med* 202: 955-965.
52. Li L, Fang CJ, Ryan JC, Niemi EC, Lebron JA, et al. (2010) Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 3505-3510.
53. Li JY, Paragas N, Ned RM, Qiu A, Viltard M, et al. (2009) Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Dev Cell* 16: 35-46.
54. Kobe B, Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11: 725-732.
55. Taylor JM, Heinrichs DE (2002) Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol Microbiol* 43: 1603-1614.
56. Balderas MA, Nobles CL, Honsa ES, Alicki ER, Maresso AW (2012) Hal Is a *Bacillus anthracis* heme acquisition protein. *J Bacteriol* 194: 5513-5521.
57. Carlson PE, Jr., Carr KA, Janes BK, Anderson EC, Hanna PC (2009) Transcriptional profiling of *Bacillus anthracis* Sterne (34F2) during iron starvation. *PLoS One* 4: e6988.

58. Fisher M, Huang YS, Li X, McIver KS, Toukoki C, et al. (2008) Shr is a broad-spectrum surface receptor that contributes to adherence and virulence in group A streptococcus. *Infect Immun* 76: 5006-5015.
59. Ouattara M, Cunha EB, Li X, Huang YS, Dixon D, et al. (2010) Shr of group A streptococcus is a new type of composite NEAT protein involved in sequestering haem from methaemoglobin. *Mol Microbiol* 78: 739-756.
60. Kern JW, Schneewind O (2008) BslA, a pXO1-encoded adhesin of *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* 68: 504-515.
61. Tarlovsky Y, Fabian M, Solomaha E, Honsa E, Olson JS, et al. (2010) A *Bacillus anthracis* S-layer homology protein that binds heme and mediates heme delivery to IsdC. *J Bacteriol* 192: 3503-3511.
62. Watt RK, Hilton RJ, Graff DM (2010) Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochim Biophys Acta* 1800: 745-759.
63. Theil EC, Liu XS, Toshi T (2008) Gated Pores in the Ferritin Protein Nanocage. *Inorganica Chim Acta* 361: 868-874.
64. Jin W, Takagi H, Pancorbo B, Theil EC (2001) "Opening" the ferritin pore for iron release by mutation of conserved amino acids at interhelix and loop sites. *Biochemistry* 40: 7525-7532.
65. Liu X, Jin W, Theil EC (2003) Opening protein pores with chaotropes enhances Fe reduction and chelation of Fe from the ferritin biomineral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3653-3658.
66. Liu XS, Patterson LD, Miller MJ, Theil EC (2007) Peptides selected for the protein nanocage pores change the rate of iron recovery from the ferritin mineral. *J Biol Chem* 282: 31821-31825.
67. Galvez N, Ruiz B, Cuesta R, Colacio E, Dominguez-Vera JM (2005) Release of iron from ferritin by aceto- and benzohydroxamic acids. *Inorg Chem* 44: 2706-2709.
68. Sanchez P, Galvez N, Colacio E, Minones E, Dominguez-Vera JM (2005) Catechol releases iron(III) from ferritin by direct chelation without iron(II) production. *Dalton Trans*: 811-813.
69. Dertz EA, Xu J, Stintzi A, Raymond KN (2006) Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. *J Am Chem Soc* 128: 22-23.
70. Abergel RJ, Zawadzka AM, Raymond KN (2008) Petrobactin-mediated iron transport in pathogenic bacteria: coordination chemistry of an unusual 3,4-catecholate/citrate siderophore. *J Am Chem Soc* 130: 2124-2125.
71. Abergel RJ, Wilson MK, Arceneaux JE, Hoette TM, Strong RK, et al. (2006) Anthrax pathogen evades the mammalian immune system through stealth siderophore production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18499-18503.
72. Ghigo JM, Letoffe S, Wandersman C (1997) A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 3572-3579.
73. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-6145.
74. 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.
75. Levi S, Luzzago A, Cesareni G, Cozzi A, Franceschinelli F, et al. (1988) Mechanism of ferritin iron uptake: activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *J Biol Chem* 263: 18086-18092.
76. Levi S, Salfeld J, Franceschinelli F, Cozzi A, Dorner MH, et al. (1989) Expression and structural and functional properties of human ferritin L-chain from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 28: 5179-5184.
77. 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.
78. Lereclus D, Vallade M, Chaufaux J, Arantes O, Rambaud S (1992) Expansion of insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by in vivo genetic recombination. *Biotechnology (N Y)* 10: 418-421.
79. Arantes O, Lereclus D (1991) Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* 108: 115-119.
80. Sanchis V, Agaisse H, Chaufaux J, 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.
81. Guerout-Fleury AM, Shazand K, Frandsen N, Stragier P (1995) Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* 167: 335-336.
82. Villafane R, Bechhofer DH, Narayanan CS, Dubnau D (1987) Replication control genes of plasmid pE194. *J Bacteriol* 169: 4822-4829.
83. Bouillaut L, Ramarao N, Buisson C, Gilois N, Gohar M, et al. (2005) FlhA influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-regulated gene transcription, protein production, and virulence. *Appl Environ Microbiol* 71: 8903-8910.
84. Harvie DR, Vilchez S, Steggles JR, Ellar DJ (2005) *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology* 151: 569-577.

85. Tran SL, Guillemet E, Ngo-Camus M, Clybourn C, Puhar A, et al. (2011) Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cell Microbiol* 13: 92-108.

Figures

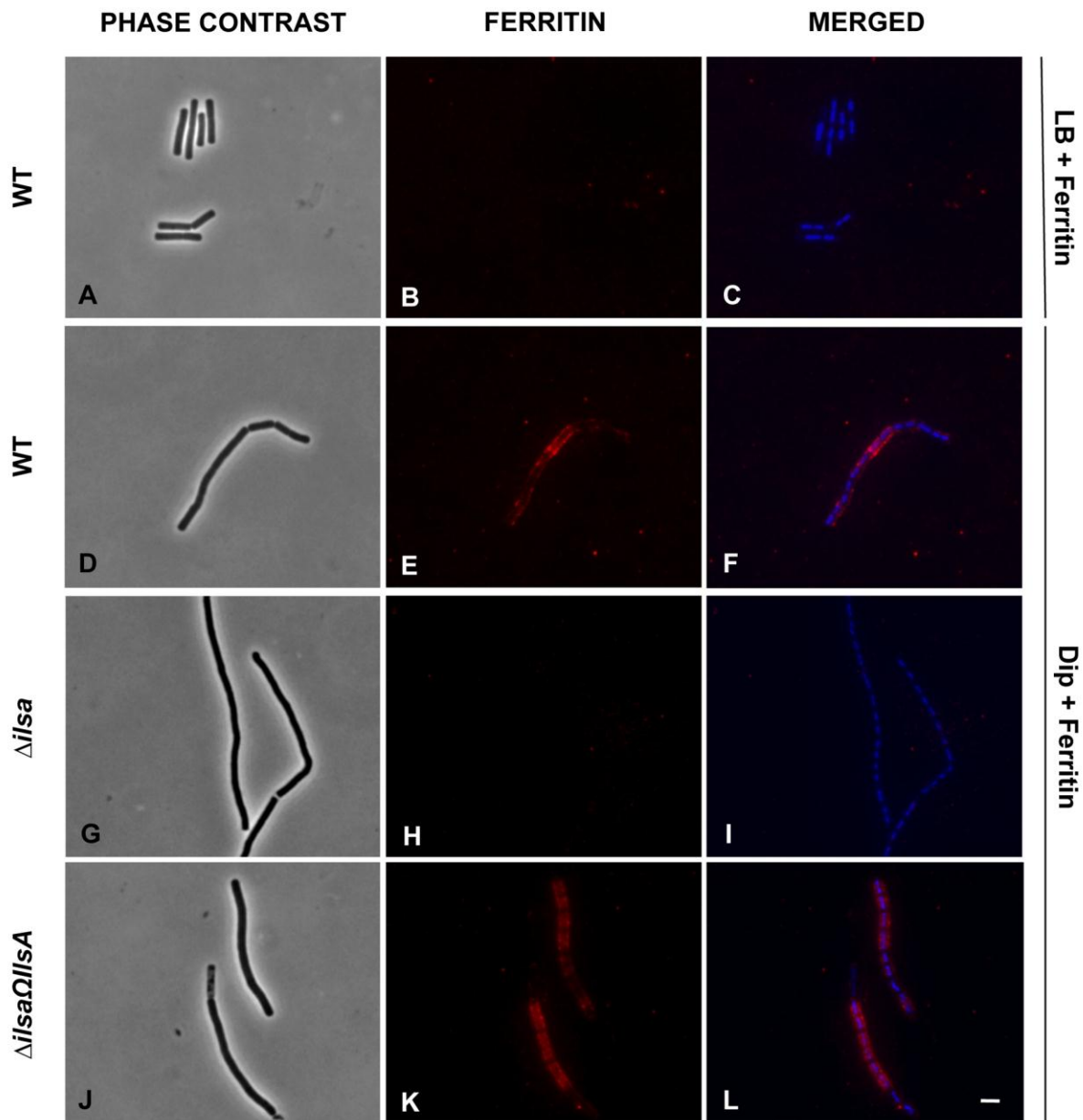


Figure 1. IIsA is essential for ferritin binding on *B. cereus* cell surface

B. cereus wild type (WT; A-F), $\Delta ilsA$ mutant (G-I) and the complemented $\Delta ilsA \Omega ilsA$ (J-L) strains were grown in LB + 0,3 μ M HoSF medium (only the wild type; A-C) and in iron-depleted LB (Dip) + 0,3 μ M HoSF medium (D-L). Bacterial cells were washed before fluorescence microscopy analysis using HoSF Alexa Fluor[®] 594 labelled polyclonal antibody (B,E,H,K) or DAPI to stain DNA. The merged images (C,F,I,L) show DAPI in blue and ferritin in red. Experiments were performed three times. In iron rich LB medium, IIsA is not produced [13] and no ferritin is detected on the bacterial surface in these conditions (A-C) Ferritin aggregates only on the surface only in iron-depleted medium supplemented with ferritin (D-

F). Absence of IIsA in the $\Delta iIsA$ mutant compromises ferritin binding on the bacterial surface (G-I) whereas *iIsA* complementation restores ferritin aggregation (J-L).

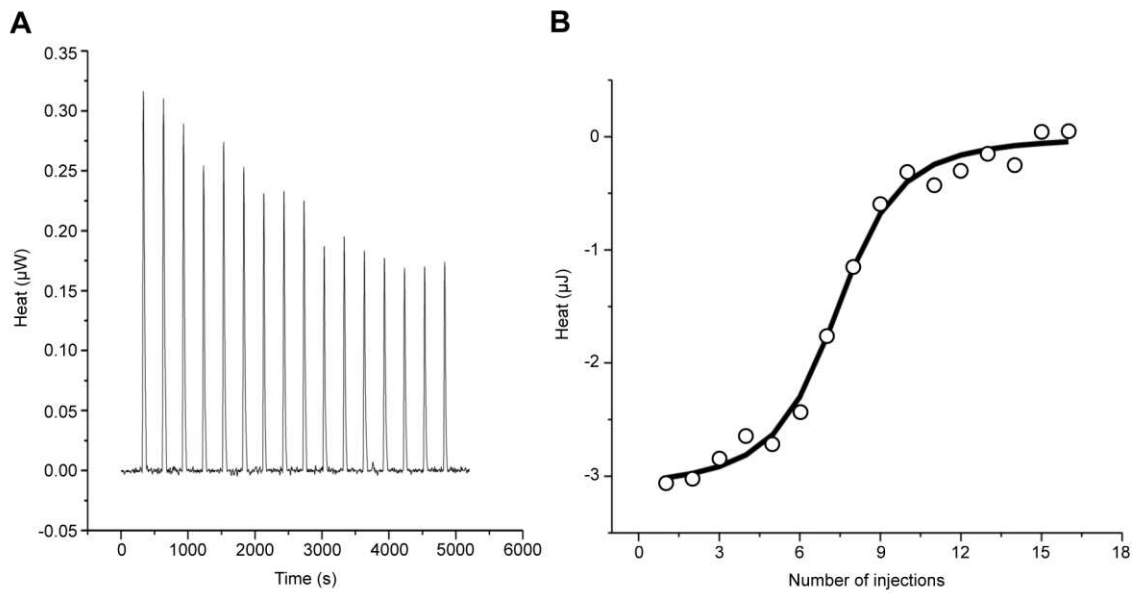


Figure 2. Calorimetric titration of recombinant human H-chain ferritin with IIsA

(A): ITC raw data. (B): Plot of the integrated heat versus the number of injections of IIsA. Conditions: 1 μM H/L ferritin titrated with 3 μl injections of 229 μM IIsA solution in 50 mM Tris/HCl buffer, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1 mM DTT, pH = 7.0 and 25°C. ITC binding experiments were repeated at least two times with similar results and thermodynamic data are listed in Table 1.

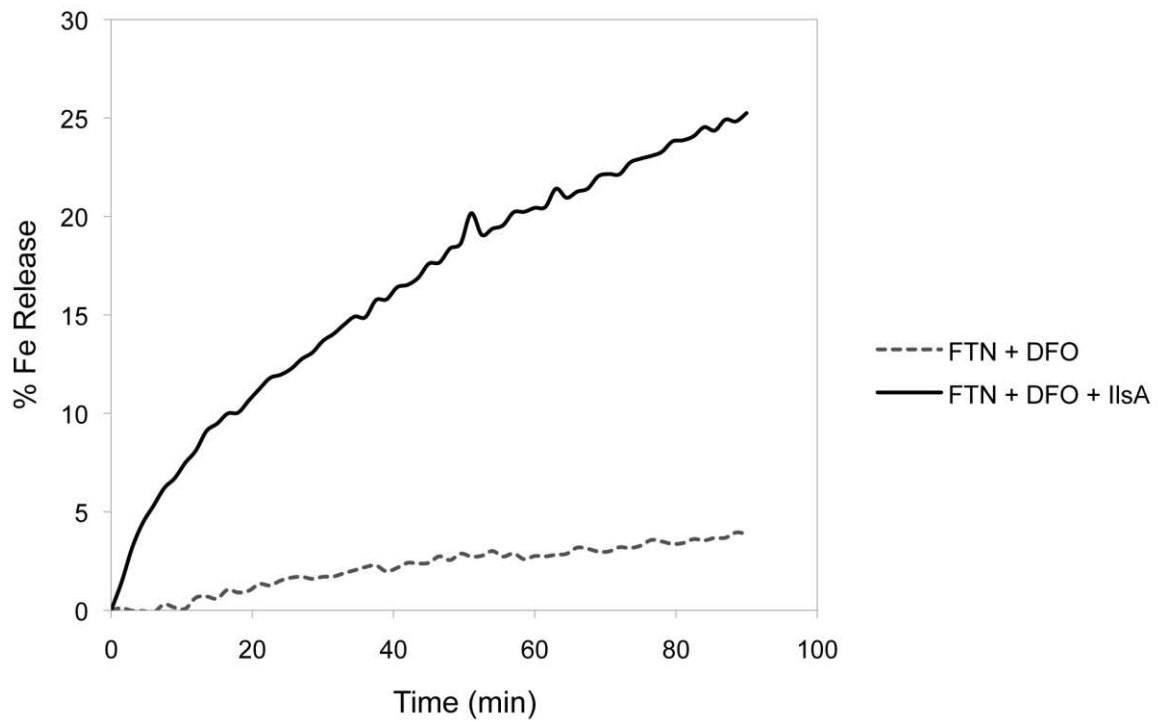


Figure 3. Role of IIsA in iron mobilization from ferritin

Demineralization of recombinant holoHuHF (1 μM) containing 500 Fe/shell was followed by the absorption of the Fe(III)-DFO complexes at 425 nm in the presence (black line) or absence (dotted line) of IIsA (5 μM). The experiment was repeated in triplicate using different protein preparations. The curve shown here is from one of the three runs.

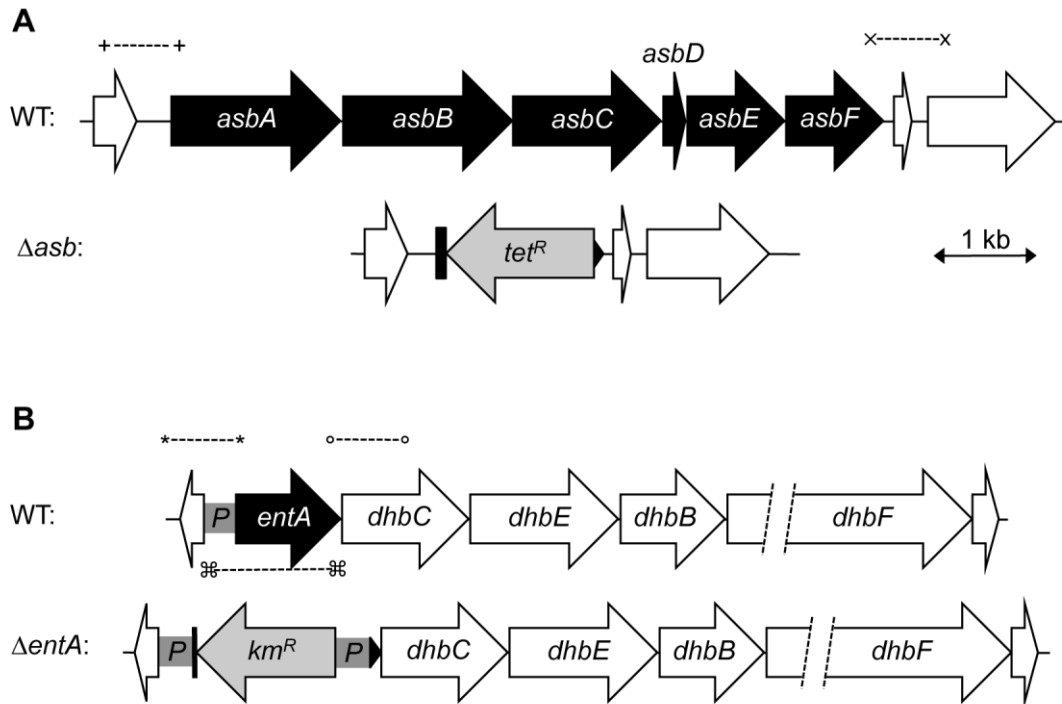


Figure 4. Construction of *B. cereus* siderophore mutants

Genetic organization of petrobactin (**A**) and bacillibactin (**B**) biosynthetic gene clusters in *B. cereus* strain ATCC 14579 is represented. The deleted genes (in black) and the orientation of the antibiotic cassettes (tetracycline, *tet^R* and kanamycin, *km^R*) are depicted. Deletions were created by integrative recombination in the loci using upstream and downstream region (~ 1 kb each) amplified with primer pairs (+) and (x) for the *asb* locus or (*) and (°) for *entA* gene. In addition, the promoter region (359 bp) of *entA* was cloned between the *km^R* cassette and *dhbC* (*P* in gray box) to ensure transcription of downstream genes. For $\Delta entA$ complementation, (⌘) represent the primers used to amplify the fragment cloned in pHT304 plasmid.

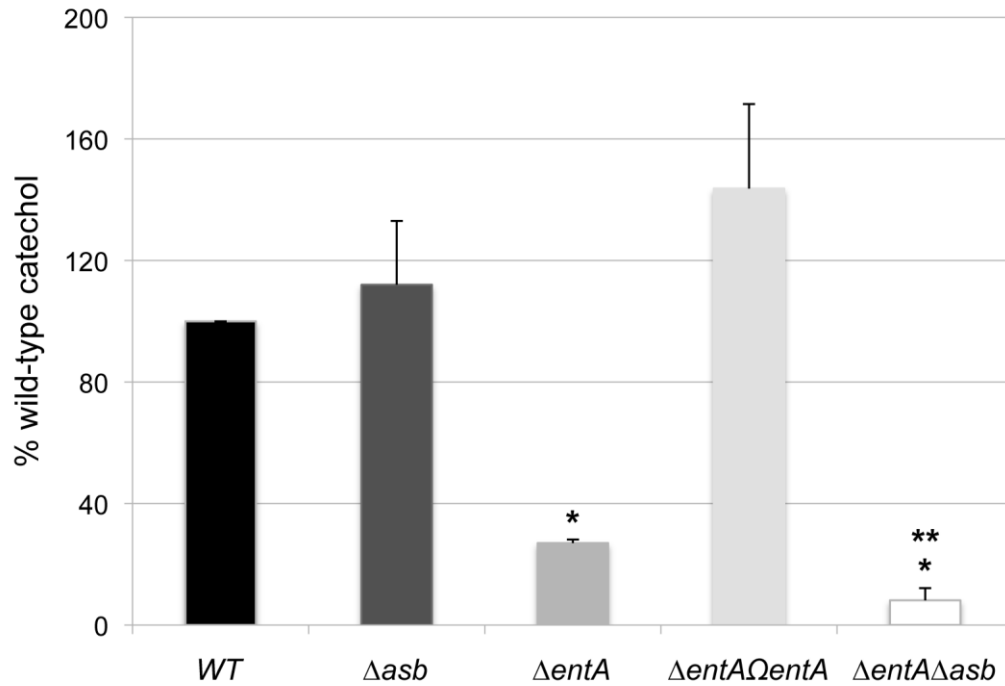


Figure 5. Production of catechol siderophores in Δasb and $\Delta entA$ mutants

Culture supernatants were collected for each strain from overnight (20 h) cultures in low iron conditions. Measurement of catechol productions was achieved using the Arnow assay. Data were normalized to the OD_{600} of cultures and percentages of wild-type (WT) catechol level are shown. Error bars represent SEM from mean values of three independent experiments. * Significant difference compared to wild type ($P < 0.001$). ** Significant difference compared to $\Delta entA$ strain ($P < 0.05$).

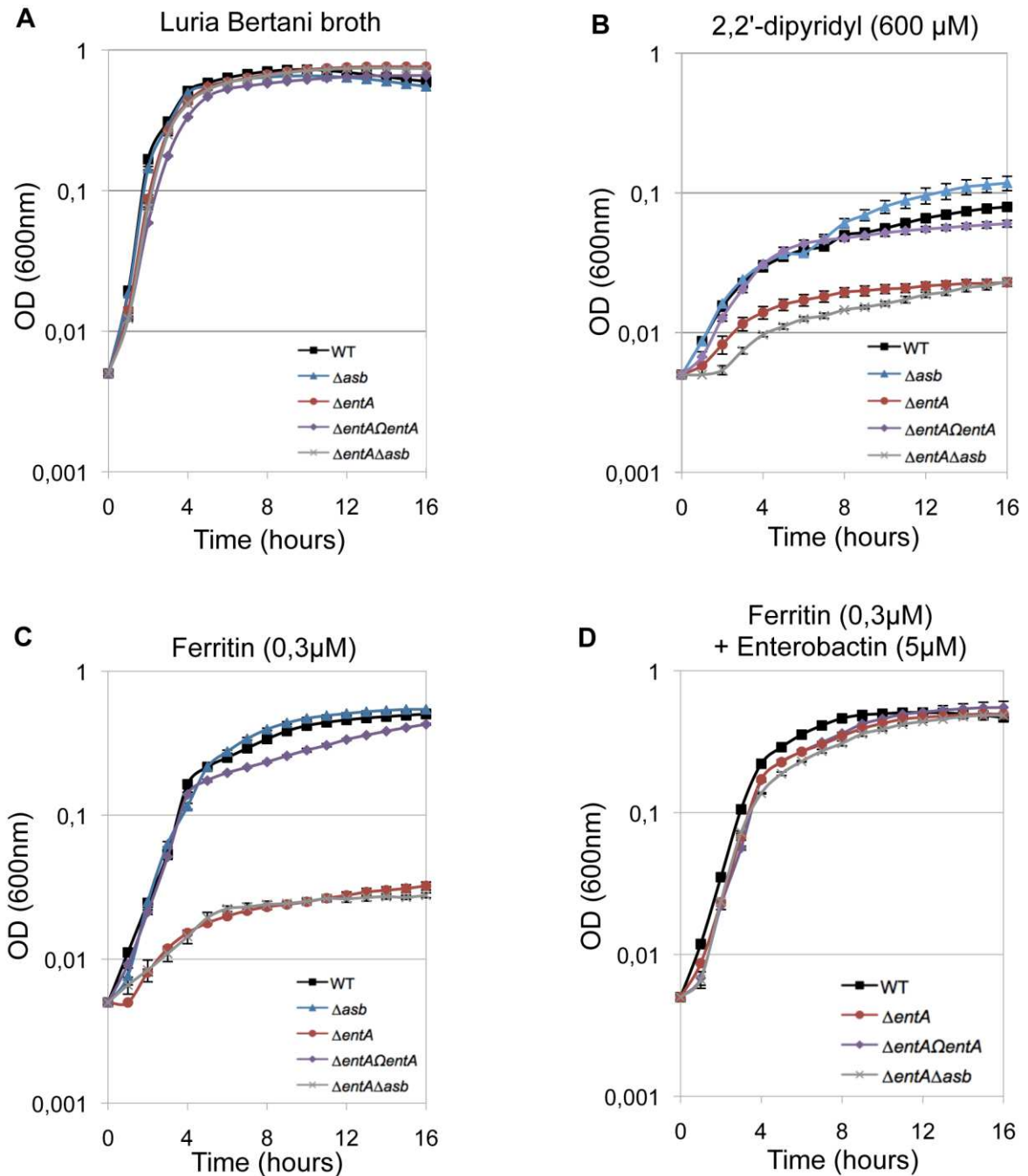


Figure 6. Iron acquisition from ferritin relies on bacillibactin production

Growth kinetics of *B. cereus* wild type (WT; black square), Δasb petrobactin mutant (blue triangle), $\Delta entA$ bacillibactin mutant (red circle), complemented $\Delta entA\Delta entA$ strains (purple diamond) and double $\Delta entA\Delta asb$ mutant (grey cross). The strains were grown at 37°C in LB medium (**A**) and in LB medium treated with 2,2'-dipyridyl without addition of iron sources (**B**) or supplemented with 0,3 μ M ferritin only (**C**) or with 0,3 μ M ferritin and 5 μ M enterobactin (**D**). Bacterial growth was monitored during 16 hours by measuring the optical density (OD) at 600 nm every hour. Curves are averages of three independent experiments and error bars are SEM from mean values.

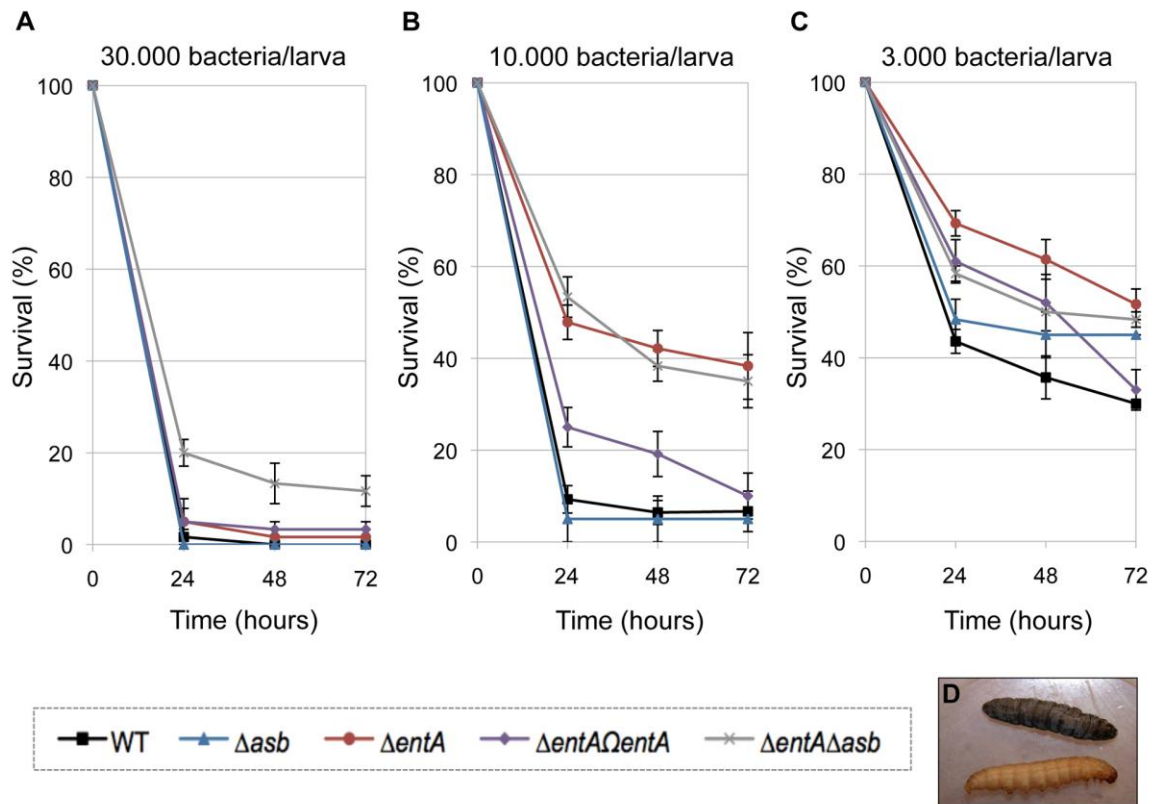


Figure 7. Effects of siderophore deficiency on *B. cereus* virulence in *G. mellonella* are dose- and time-dependent

Wild type and mutant strains were injected separately into the hemocoel. For each strain, twenty last-instar larvae were infected with 3×10^4 (A), 1×10^4 (B) or 3×10^3 (C) of mid-log phase bacteria. The survival rate (% of alive/total number of infected larvae) was monitored for 72 hours after infection with the wild type (black square), Δasb (blue triangle), $\Delta entA$ (red circle), $\Delta entA\Omega entA$ (purple diamond) or $\Delta entA\Delta asb$ (grey cross) strains. Results are mean values of three to seven independent experiments and error bars indicate SEM from mean values. Based on these data, LD_{50} were estimated and are reported in Table 2. (D) illustrates alive and black dead larvae.

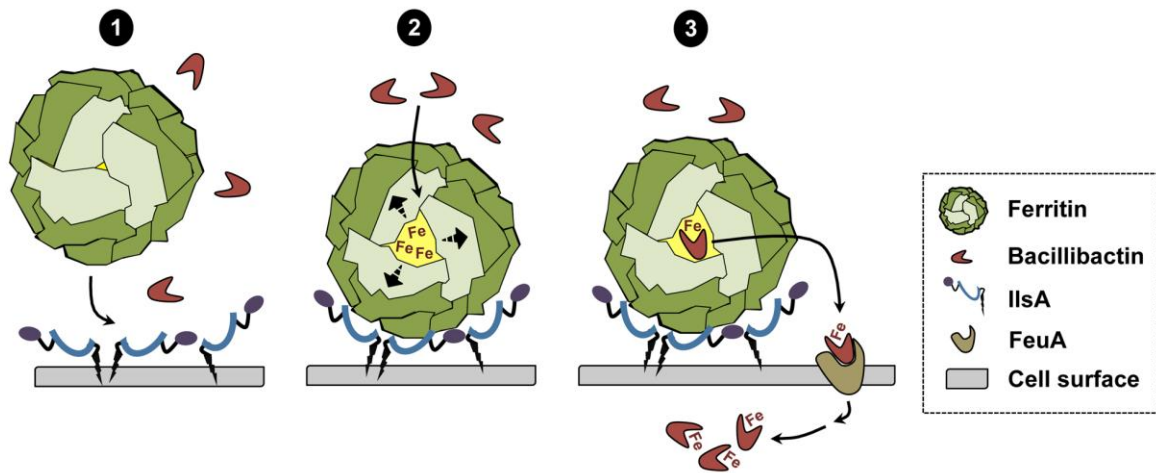


Figure 8. Schematic representation of iron uptake from ferritin in *B. cereus*.

(1) In low iron environments, IIsA is produced and anchored to the peptidoglycane. IIsA binds to each ferritin subunit, resulting in ferritin recognition and recruitment on the bacterial cell surface. (2) Following interaction, IIsA is proposed to alter ferritin pores openings or subunit-subunit interactions leading to destabilization or an increased accessibility to the ferritin iron core. (3) The final stage involves iron mobilization from ferritin by bacillibactin whereby the iron-siderophore complex is transported into the cell probably via the FeuA transporter leading to iron release into the cytosol.

Tables

Table 1: Best fit parameters for ITC measurements of IIsA binding to ferritins^a

Protein 1	Protein 2	<i>n</i>	<i>K</i> (M ⁻¹)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔG^0 (kJ/mol) ^b	ΔS^0 (J/(mol.K)) ^c
Holo-IIsA	HuHF	25.21 ± 2.62	(1.86 ± 0.99) × 10 ⁶	- 4.11 ± 0.11	-35.78 ± 1.32	106.24 ± 4.44
Holo-IIsA	HuLF	23.88 ± 0.1	(8.36 ± 0.24) × 10 ⁵	- 8.71 ± 3.15	-33.80 ± 0.07	84.16 ± 10.56
Holo-IIsA	HuH/LF	23.79 ± 0.89	(1.08 ± 0.21) × 10 ⁶	- 8.72 ± 2.47	-34.44 ± 0.48	86.26 ± 8.44
Holo-IIsA	MoHF	24.94 ± 1.73	(2.07 ± 0.66) × 10 ⁶	- 3.35 ± 0.32	-36.05 ± 0.79	109.68 ± 2.85

^aThe reported thermodynamic quantities are apparent values and include the contributions to the overall equilibrium from ferritin and buffer species in different states of protonation. Standard errors from replicate determinations are indicated. ^bCalculated from $\Delta G^0 = -RT \ln K$. ^cCalculated from $\Delta S^0 = (\Delta H^0 - \Delta G^0)/T$. HuHF, recombinant human H-chain ferritin; HuLF, recombinant human L-chain ferritin; HuH/LF, recombinant heteropolymer ferritin of 21H-chains and 4L-chains; MoHF, recombinant mouse H-chain ferritin. All experiments were repeated two to four times.

Table 2: Virulence of siderophore mutants in *G. mellonella*

Strain	LD ₅₀ ^a	Confidence Limits
Wild type	1.8x10 ³	3.1x10 ² – 3.3x10 ³
Δasb	3,4x10 ³	1.2x10 ³ – 5.6x10 ³
$\Delta entA$	1.0x10 ⁴	8.8x10 ³ – 1.2x10 ⁴
$\Delta entA\Omega entA$	6.4x10 ³	4.7x10 ³ – 8.2x10 ³
$\Delta entA\Delta asb$	1.2x10 ⁴	8.5x10 ³ – 1.6x10 ⁴

^aThe 50% lethal doses, in number of colony forming units (cfu), were evaluated by Probit analysis ($P < 0,05$).

Table 3: Strains and plasmids used in this work.

Strain or plasmid	Characteristics	Reference
Strain		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	Wild type	Laboratory stock
<i>Bc</i> Δ <i>ilsA</i>	ATCC14579 mutant; Δ <i>bc1331</i> ; Tet ^R	[32]
<i>Bc</i> Δ <i>ilsA</i> Δ <i>ilsA</i>	Δ <i>ilsA</i> strain carrying pHT304 Ω <i>ilsA</i> plasmid; Tet ^R , Erm ^R	[13]
<i>Bc</i> Δ <i>asb</i>	ATCC14579 mutant; Δ <i>bc1978-1983</i> ; Tet ^R	This study
<i>Bc</i> Δ <i>entA</i>	ATCC14579 mutant; Δ <i>bc2302</i> ; Kan ^R	This study
<i>Bc</i> Δ <i>entA</i> Δ <i>entA</i>	Δ <i>entA</i> strain carrying pHT304 Ω <i>entA</i> plasmid; Kan ^R , Erm ^R	This study
<i>Bc</i> Δ <i>entA</i> Δ <i>asb</i>	Δ <i>asb</i> mutation into Δ <i>entA</i> strain; Kan ^R , Tet ^R	This study
<i>Escherichia coli</i> K12 strain TG1	Strain used as host for cloning experiments	Laboratory stock
<i>Ec</i> ET12567	Strain used for generation of unmethylated DNA	Laboratory stock
<i>Ec</i> C600 Δ <i>hemA</i>	Heme-deficient mutant used for protein overproduction; Kan ^R	[72]
<i>Ec</i> C600 Δ <i>hemA</i> GST- <i>ilsA</i>	Strain C600 Δ <i>hemA</i> carrying pGEX6P1- <i>ilsA</i> ; Kan ^R , Amp ^R	This study
<i>Ec</i> C600 Δ <i>hemA</i> GST-NEAT ^{<i>ilsA</i>}	Strain C600 Δ <i>hemA</i> carrying pGEX6P1-NEAT ^{<i>ilsA</i>} ; Kan ^R , Amp ^R	This study
<i>Ec</i> M15	Strain carrying pREP4, used for protein overproduction; Km ^R	Laboratory stock
<i>Ec</i> M15 GST-LRR ^{<i>ilsA</i>}	Strain M15 carrying pREP4 and pGEX6P1-LRR ^{<i>ilsA</i>} ; Kan ^R , Amp ^R	This study
Plasmid		
pHT304	Shuttle vector used for complementation; Amp ^R , Erm ^R	[79]
pMAD	Shuttle vector, thermosensitive origin of replication; Amp ^R , Erm ^R	[77]
pRN5101	Shuttle vector, thermosensitive origin of replication; Amp ^R , Erm ^R	[82]
pHTS1	Vector carrying the tetracycline resistance cassette (<i>tet</i>)	[80]
pDG783	Vector carrying the kanamycin resistance cassette (<i>aphA3</i>)	[81]
pGEX6P1	Vector for inducible GST-tagged protein overproduction; Amp ^R	GE Healthcare
pMAD Ω <i>asb</i> :: <i>tet</i>	pMAD with <i>bc1978-1983</i> deletion fragment	This study
pRN5101 Ω <i>entA</i> :: <i>kan</i>	pRN5101 with <i>bc2302</i> deletion fragment	This study
pHT304 Ω <i>entA</i>	pHT304 with wild-type <i>entA</i> fragment	This study
pGEX6P1- <i>ilsA</i>	pGEX6P1 with the whole <i>ilsA</i> sequence (without signal peptide)	This study
pGEX6P1-NEAT ^{<i>ilsA</i>}	pGEX6P1 with NEAT domain sequence of <i>ilsA</i>	This study
pGEX6P1-LRR ^{<i>ilsA</i>}	pGEX6P1 with LRR domains sequence of <i>ilsA</i>	This study

Bc, *B. cereus*; *Ec*, *E. coli*; Tet, tetracycline; Erm, erythromycin; Kan, kanamycin; Amp, ampicillin

Table 4: Primers used in this work.

Name	Sequence 5'-3'	Restriction site (underlined)
F <i>ilsA</i>	CGGAATTCGCATTA ^{CG} AAAAGTTGAAGCAAATC	EcoRI
R <i>ilsA</i>	CCCTCGAGTTATTTCTTTATTGCATTATAC	XhoI
FNEAT <i>ilsA</i>	CCGGAATTC ^{CG} ACTCCAGCTTAGCGGCA	EcoRI
RNEAT <i>ilsA</i>	CCCTCGAGACCTACAGTTGGATCTTTAAT	XhoI
FLRR	CCGGAATTC ^{CG} AAAGATTTAAATACACC	EcoRI
RLRR	CCCTCGAGTCAATTTTGGACATTAATATAA	XhoI
FpetU	GGAATTCGATAGTTGGAAGCAACG	EcoRI
RpetU	CGGGATCCATACAAAGTAACGTTCTG	BamHI
FpetD	AACTGCAGAATGGTTTGGACATAATTC	PstI
RpetD	GCGTCGACCTTGAATCGCTCTACCG	Sall
FbacU	CCAAGCTTGGTATTTACTTCGTATGTGTAG	HindIII
RbacU	GCTCTAGAGCCTATGCCTTGTGCTGCA	XbaI
FbacD	CCCTCGAGGCACAACCTTCAGAAGTTGC	XhoI
RbacD	CGGGATCCCGCTTCACTATGAATAACTGAT	BamHI
FbacP	AACTGCAGAAGCATTGTAATGAACGTATC	PstI
RbacP	CCCTCGAGGGTTTCTCTATCCTTTACATA	XhoI
FbacComp	AACTGCAGCATTGTAATGAACGTATC	PstI
RbacComp	GCTCTAGATTA ^{CG} AACTCCTAACGTAGC	XbaI

Supporting Information

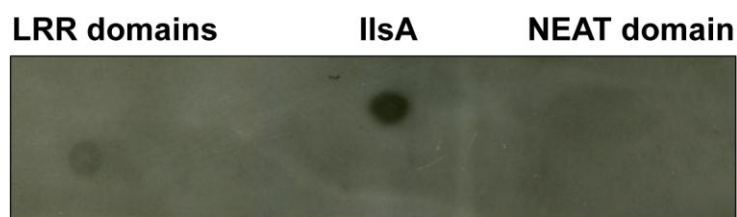


Figure S1. Relative role of the IIsA NEAT and LRR domains in ferritin binding.

Dot blot experiments were carried as follows: 12 pmol of IIsA and the NEAT and LRR domains of IIsA purified separately were spotted on PVDF membranes and then incubated for 1 hour with HoSF at 1 µg/ml. The signals were obtained with the HRP system using an anti-HoSF polyclonal antibody at a dilution of 1:1000 in TBS pH 7.4 buffer with 1% fat free milkpowder.

Table S1: Iron-related genes characterized so far in *B. cereus*

Gene name	Strain	Description	Role in virulence (Model)	Reference
<i>entA</i>	<i>Bc</i> ATCC14579	BB biosynthesis	Yes (<i>Gm</i>)	This study
<i>feuA</i>	<i>Bc</i> ATCC14579	BB and Ent transporter	nt	[42]
<i>asbABCDEF</i>	<i>Bc</i> ATCC14579	PB biosynthesis	No (<i>Gm</i>)	This study
<i>fatB</i>	<i>Bc</i> ATCC14579	PB and 3,4-DHB transporter	nt	[42]
<i>fpuA</i>	<i>Bc</i> ATCC14579	PB and 3,4-DHB transporter	nt	[42]
<i>yfiY</i>	<i>Bc</i> ATCC14579	Schizokinen transporter	nt	[42]
<i>yxkB</i>	<i>Bc</i> ATCC14579	DFO and Ferrichrome transporter	nt	[42]
<i>ilsA</i>	<i>Bc</i> ATCC14579	Heme and ferritin receptor	Yes (<i>Gm</i>)	[13,32]; (Abi Khalil <i>et al.</i> , unpublished data); this study
<i>isd</i> locus	<i>Bc</i> ATCC14579	Heme uptake system	No (<i>Gm</i>)	(Abi Khalil <i>et al.</i> , unpublished data)
<i>fctC</i>	<i>Bc</i> ATCC14579	Ferric citrate complexes transporter	nt	[25]
<i>fecABC</i>	<i>Bc</i> 569	Ferric dicitrate uptake system	Yes (<i>Ms</i>)	[26]
<i>Fur</i>	<i>Bc</i> 569	Regulator	Yes (<i>Ms</i>)	[84]
<i>HlyII</i>	<i>Bt</i> 407 Cry	Pore-forming cytotoxin	Yes (<i>Mm</i> & <i>Bm</i>)	[31,85]

Bc, *Bacillus cereus*. *Bt*, *Bacillus thuringiensis*. *Gm*, *Galleria mellonella*. *Ms*, *Manduca sexta*. *Mm*, *Mus musculus*. *Bm*, *Bombyx mori*. nt, non tested.

Résultats complémentaires

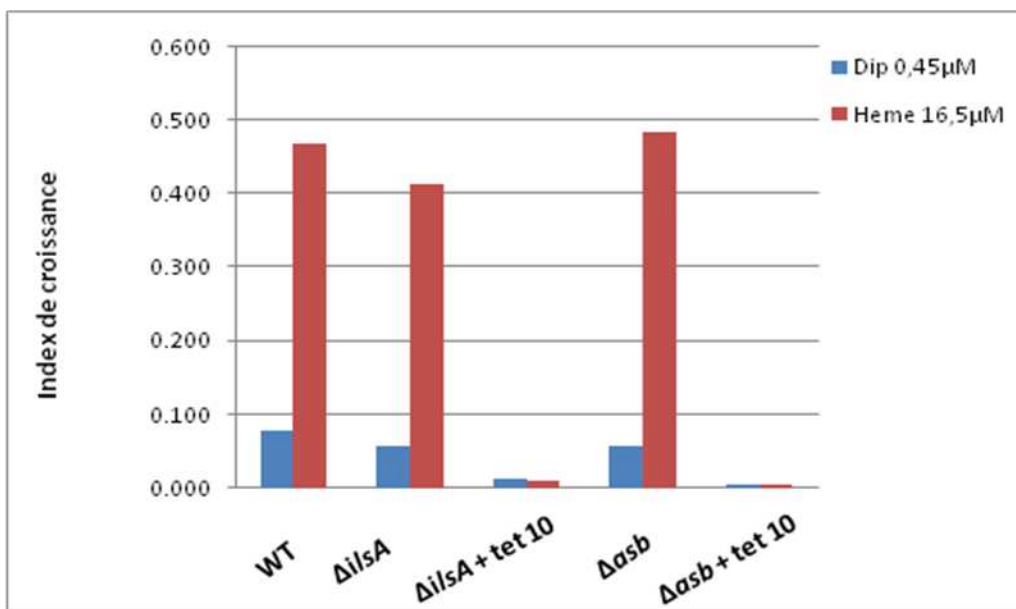


Figure 24: Effet de la tétracycline sur la croissance du mutant *ilsA* en présence de l'hème comme source unique de fer

Le mutant *asb* portant aussi une cassette de résistance à la tétracycline a été utilisé comme témoin. Il montre tout comme $\Delta ilsA$ une diminution drastique dans la croissance en milieu carencé en fer et supplémenté par les sources de fer.

1. Phénotype du mutant *ilsA* dans l'acquisition de l'hème et l'hémoglobine : effet de la cassette tétracycline Tn-10 et la tétracycline

Au cours de nos expériences, il s'est avéré que le rôle d'*IlsA* dans l'acquisition du fer à partir de l'hème et l'hémoglobine n'était pas essentiel comme il avait été démontré dans les travaux de thèse de N. Daou publiés dans *Plos Pathogens* (74). En effet, nous avons constaté que le défaut de croissance du mutant *ilsA* en présence d'hème et d'hémoglobine était uniquement lié à la présence de tétracycline dans le milieu de culture. En absence de l'antibiotique, le mutant *ilsA* n'était plus affecté au niveau de sa croissance avec ces sources de fer (Figure 24). Certaines molécules de la famille des tétracyclines ont été décrites dans la littérature comme des chélateurs de fer, générant ainsi un effet bactériostatique (118). Dans une autre étude, la protéine codée par la cassette de résistance à la tétracycline *Tn-10* est décrite comme une pompe d'efflux, permettant d'exporter les complexes tétracycline-cation divalent à l'extérieur des cellules (298). La remise en question de l'effet essentiel d'*IlsA* dans l'acquisition du fer de l'hème nous a incité à étudier le rôle du système *Isd*, ainsi que l'existence d'une redondance fonctionnelle entre *IlsA* et les protéines de surface de ce système dans l'acquisition du fer de l'hème.

2. Phénotypes des mutants des gènes *Bc4548*, *Bc4547* et le double mutant *Bc4549 Bc4547*

Afin de démontrer si les protéines de surface du système *Isd* chez *B. cereus* sont impliquées dans l'acquisition du fer à partir de l'hémoglobine et de l'hème, des mutations des trois premiers gènes de l'opéron *isd* (*Bc4549*, *Bc4548* et *Bc4547*) ainsi que le double mutant $\Delta\Delta Bc4549Bc4547$ ont été réalisées par double recombinaison homologue en utilisant le plasmide pMAD (11) (la mutation ainsi que le phénotype du mutant du gène *Bc4549* (*isdC*) sont décrits dans l'article 1 ; données supplémentaires). Des régions d'environ 1000 bp localisées en amont et en aval de l'ORF du gène en question sont amplifiées respectivement à partir du génome de la souche sauvage (*Bc ATCC14579*) avec les amorces représentées dans l'annexe (Annexe 1). Les fragments d'ADN résultants sont ensuite fusionnés par "overlapp PCR" avec les amorces ayant les sites de restrictions des enzymes de clonage, puis insérés dans le vecteur pMAD. Le phénotype de ces mutants (sans cassette de résistance) a été étudié *in vitro* en suivant la croissance bactérienne en milieu riche (LB) ou en milieu carencé en fer (LB + dipyridyl) supplémenté ou non par les sources de fer suivantes: hème et hémoglobine. Enfin, l'index de croissance a été calculé et les courbes de croissance ont été réalisées.

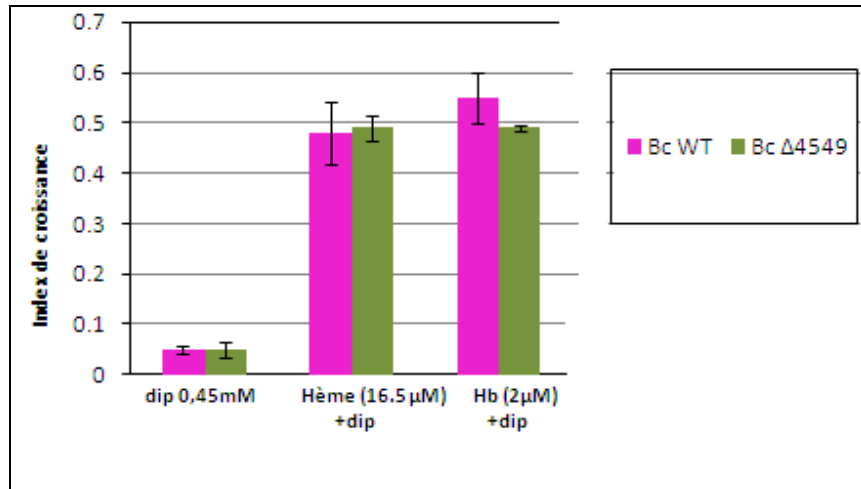


Figure 25: Index de croissance du mutant *Bc4548* en milieu carencé en fer ou bien supplémenté soit par l'hème (16.5 μM) ou l'hémoglobine (2 μM)

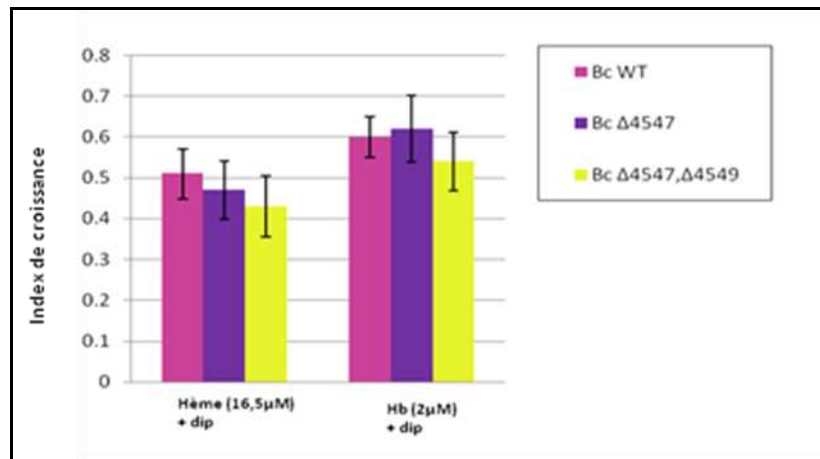


Figure 26: Index de croissance de $\Delta Bc4547$ et du double mutant $\Delta\Delta Bc4547Bc4549$ en présence des sources uniques de fer: l'hème (16.5 μM) et l'hémoglobine (2 μM)

Ces méthodes utilisées pour évaluer l'implication de ces gènes dans l'acquisition du fer à partir des hémoprotéines, n'ont pas montré de phénotypes significatifs pour les différents mutants testés (Figures 25, 26). Ceci suggère l'existence d'une redondance fonctionnelle entre les différents gènes du locus *isd* chez *B. cereus*. Ainsi, seule la souche dans laquelle tout le locus *isd* avait été délété a présenté une diminution de croissance en présence d'hème (cf. article 1, Figure 4).

3. Approches différentes pour la purification des protéines IIsA et IsdC sous forme apo (sans hème)

Les protéines IIsA, IIsA^{NEAT} et IsdC produites dans *E. coli* (la souche M15) ont été purifiées avec l'hème endogène de la bactérie. A l'issue de cette purification, les protéines étaient un mélange des formes d'apo (sans hème) et de holo (avec hème), ce qui était un obstacle pour l'avancement du travail. Pour palier à ce problème, nous avons tenté dans un premier temps d'extraire l'hème endogène par l'utilisation du solvant Methyl Ethyl Ketone (MEK) à des pH très acides (13), ceci n'a pas donné de résultats convaincants, probablement à cause de la dénaturation des protéines. Nous avons également essayé de séparer les deux formes apo et holo par chromatographie échangeuse d'ions (S-sépharose et Q-sépharose). Cependant, ces méthodes ne nous ont pas permis d'obtenir des préparations suffisamment pures.

Nous avons donc mis en place, une nouvelle approche afin d'obtenir les protéines sous forme apo en produisant les protéines dans une souche *E. coli* C600 Δ *hema*, délétée dans le gène de synthèse de l'hème (111). Les mesures spectrophotométriques des protéines purifiées dans cette souche ne montrent pas le pic spécifique du noyau protoporphyrinique de l'hème à ~ 400 nm (Figure 27). Par conséquent, le système utilisé peut servir comme un nouvel outil permettant l'expression des protéines homogènes sans hème.

4. Approches pour la cristallographie de la protéine IIsA

Dans le but de définir le rôle de chacun des domaines NEAT et LRR, dans l'acquisition de l'hème, l'hémoglobine et la ferritine nous avons envisagé une approche d'analyse structurale par diffraction des cristaux en rayon-X. Cette technique a été envisagée grâce à une collaboration avec Gwenaëlle André-Leroux (Institut Pasteur, Paris). Des tentatives de production de cristaux ont été effectuées en premier avec la protéine IIsA purifiée (construction sans le peptide signal) à

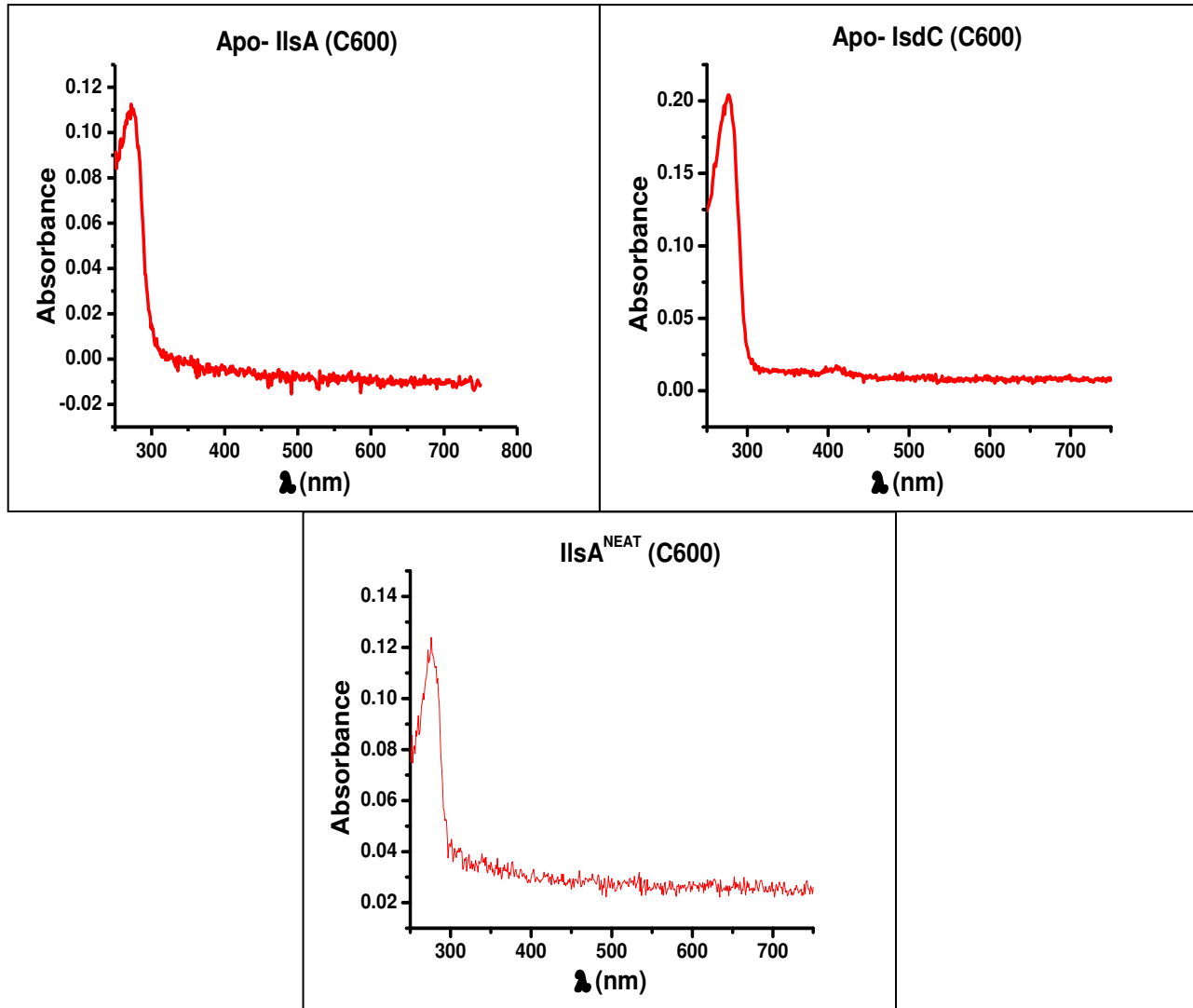


Figure 27: Mesures spectrophotométriques des protéines IlsA, IlsA^{NEAT} et IsdC purifiées dans la souche *E. coli* C600 Δ hemA

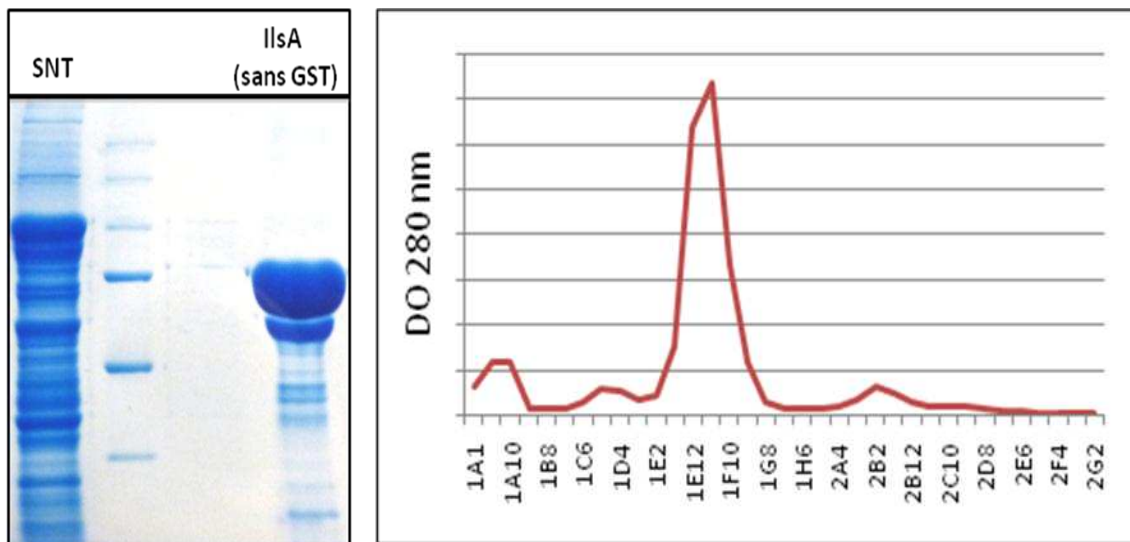
Les spectres représentent 2 μ M d'IlsA, 17 μ M d'IsdC et 10 μ M of IlsA^{NEAT} exprimées respectivement dans la souche *E.coli* C600 Δ hemA : Km 20. Les différentes protéines sont purifiées sous forme apo-hème.

partir de la souche M15 d'*E. coli*. Pour effectuer des analyses cristallographiques, la pureté des protéines est un facteur essentiel. Or dans notre cas, les analyses protéiques par SDS /PAGE révèlent la présence d'une bande principale correspondante à la taille théorique de la protéine IIsA et d'autres bandes de tailles inférieures dues soit à une dégradation, soit à des contaminants (Figure 28). Pour augmenter la chance d'obtenir des cristaux, la protéine a été passée sur une colonne d'exclusion afin de séparer les différentes bandes selon leur taille. Les différentes fractions correspondantes au pic principal ont été collectées puis déposées dans des plaques de 96 puits contenant des tampons et sels différents favorisant la formation des cristaux. Les différentes tentatives n'ont pas abouti à la formation de cristaux. Puisque la production d'IIsA dans la souche M15 conduit à un mélange d'apo et d'holo-protéine, nous avons décidé de poursuivre l'analyse structurale avec une préparation de la forme apo produite dans la souche C600 $\Delta hemA$ pour augmenter la chance d'avoir des cristaux. Dans ce cas, des cristaux se sont formés mais les analyses de diffraction n'ont été concluantes et jusqu'à présent la structure d'IIsA reste non résolue.

5. Les tests d'ITC avec la protéine holo-IIsA (chargée par l'hème exogène)

Les résultats d'ITC détaillés dans le deuxième article représentent principalement l'interaction entre IIsA (produite dans la souche M15) et différents types de ferritines recombinantes. Les résultats ont montré une interaction entre IIsA et toutes les différentes ferritines avec une stœchiométrie de ~ 24 molécules IIsA pour une molécule de ferritine, ce qui suggère qu'une molécule d'IIsA interagit avec chaque sous-unité de la ferritine.

D'autres tests d'ITC ont été effectués pour analyser les interactions entre IIsA sans hème et des ferritines d'origines variées. Les données d'ITC entre apo-IIsA et la ferritine recombinante (homopolymère chaîne H) révèlent la même stœchiométrie qu'avec IIsA purifiée d'*E. coli* M15 (~ 24 IIsA : 1 ferritine). En revanche, la stœchiométrie d'interaction entre holo-IIsA (apo-IIsA chargée avec l'hémine) et la ferritine humaine à chaîne H est passée de 24 à ~ 10-14 molécules (Figure 29). Ce résultat pourrait indiquer que l'hème apporté de façon exogène a aussi un site de fixation sur la ferritine. En effet, dans la littérature, une interaction entre la ferritine et l'hème a été rapportée, avec une stœchiométrie qui varie entre 14 et 16 molécules d'hème pour une ferritine (146). La stœchiométrie observée dans notre étude suggère qu'une molécule d'hème s'intercalerait entre deux sous-unités de la ferritine. Cependant, ces résultats sont à confirmer pour tirer des conclusions solides.



**Figure 28: (A) Gel SDS/ PAGE de la protéine IIsA.
(B) Spectre après passage sur gel filtration**

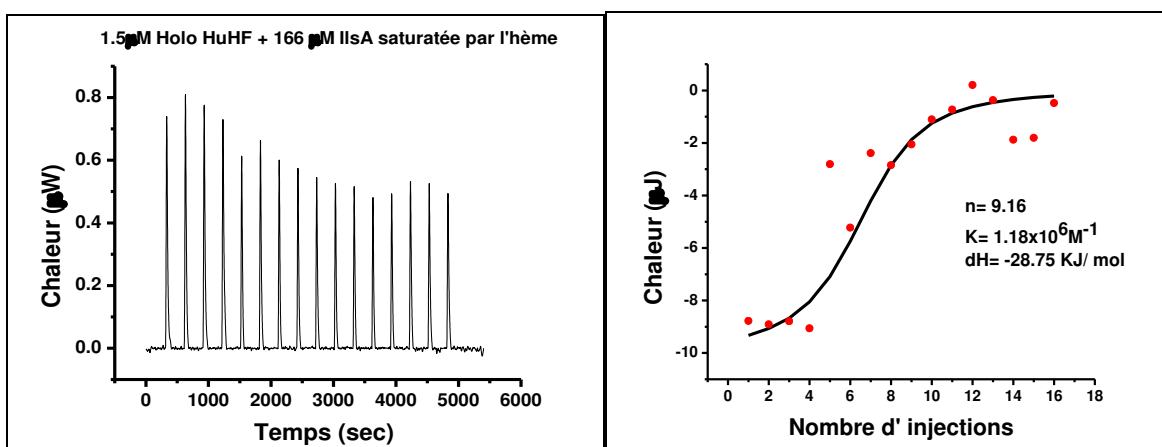


Figure 29: ITC entre la ferritine humaine homopolymère H et IIsA chargée par l'hème exogène
La stœchiométrie d'interaction est de 10 IIsA: Ferritine (pour d'autres tests $n = 14$)

Discussion et perspectives

1. IIsA et hémoprotéines

Le fer est un élément vital pour tous les êtres vivants, y compris les bactéries. Afin de satisfaire leurs besoins en fer, les bactéries pathogènes ont développé des stratégies très élaborées par lesquelles elles peuvent acquérir le fer présent dans les sources de fer de l'hôte. Jusqu'à présent, les mécanismes d'acquisition et les machineries du transport de l'hème chez *B. cereus* n'étaient que peu étudiés. Les travaux antérieurs sont pratiquement limités à la caractérisation de la protéine de surface IIsA, qui a l'habileté d'interagir avec des sources de fer structurellement différentes, les hémoprotéines (hémoglobine et hème) et la ferritine. Cependant, la manière par laquelle IIsA lie l'hème et le mécanisme par lequel ce dernier est transporté dans le cytosol bactérien étaient jusqu'alors inconnus. Dans ce projet de thèse plusieurs approches ont été utilisées dans le but d'élargir nos connaissances sur les processus de séquestration et du transport de l'hème impliquant IIsA.

1.1. IIsA : Rôles du domaine NEAT dans la liaison à l'hème et à l'hémoglobine

IIsA possède une structure originale, formée de plusieurs domaines LRR et d'un seul domaine NEAT. Ce dernier, est connu pour sa capacité à lier les hémoprotéines alors qu'en ce qui concerne les domaines LRR, ils sont présents dans certaines protéines fréquemment impliquées dans les interactions protéine-protéine (151). Dans la première partie de notre étude, le rôle d'IIsA dans l'interaction avec l'hème et avec l'hémoglobine a été largement étudié.

Des mesures spectrophotométriques effectuées soit sur la protéine IIsA entière, soit sur les domaines NEAT et LRR seuls, ont montré que l'hème se lie à IIsA entière de la même manière qu'au domaine NEAT seul. En effet, une stœchiométrie de 1 IIsA ou 1 NEAT pour 1 hème a été déterminée. Par contre, le domaine LRR seul ne présente pas d'affinité pour l'hème. Ces résultats suggèrent l'absence ou une faible implication du domaine LRR dans la liaison à l'hème, du fait que le domaine NEAT seul et IIsA entière ont les mêmes paramètres d'interaction (stoechiométrie et vitesse de réaction). Cependant, ceci n'exclut pas un rôle des LRR dans l'interaction avec l'hémoglobine. Des expériences par ITC avaient été entreprises afin de mesurer cette interaction, mais des problèmes techniques nous ont empêché de conclure pour l'instant. Par conséquent, des nouvelles expériences seront nécessaires pour compléter l'étude.

L'alignement multiple du domaine NEAT d'IIsA avec ceux de différentes protéines chez les bactéries à Gram-positif a révélé la présence dans le domaine NEAT d'IIsA de deux tyrosines

(Y¹⁴⁷ et Y¹⁵¹) fortement conservées dans la plupart des domaines NEAT trouvés dans les bases de données (Annexe 2). Les analyses structurales (3D par diffraction au Rayon-X) de plusieurs protéines Isd (IsdA-Sa, IsdC-Sa, IsdB-N2-Sa et IsdX1-Ba) ont démontré que la première tyrosine assure la coordination de l'atome de fer présent dans l'hème. Alors que, la deuxième tyrosine forme des liaisons hydrogènes avec la première afin de consolider la liaison avec l'hème (90, 109, 120, 246). De plus, chez *S. aureus* les tyrosines conservées Y¹⁶⁶ et Y¹⁷⁰ de IsdA sont décrites comme étant deux résidus essentiels pour la liaison à l'hème (120). La protéine IIsA_{Y147AY151A}, obtenue par mutagenèse dirigée (substitution des deux Y¹⁴⁷ et Y¹⁵¹ par deux Alanines), ne montre pas d'affinité pour l'hème endogène d'*E. coli* contrairement à la protéine native. Ceci suggère, un rôle essentiel de ces deux résidus dans la liaison à l'hème endogène. Suite à la mutation des deux tyrosines conservées, la poche de liaison à l'hème est possiblement désordonnée, ce qui rend IIsA_{Y147AY151A} incapable de lier efficacement l'hème endogène d'*E. coli*. Toutefois, malgré l'incapacité d'IIsA_{Y147AY151A} à acquérir l'hème endogène d'*E. coli*, sa liaison à l'hème exogène n'a pas été complètement altérée. La titration d'apo-IIsA_{Y147AY151A} avec une solution d'hème suivie par des mesures spectrophotométriques (UV-Vis) a révélé une stœchiométrie d'une IIsA_{Y147AY151A} pour une molécule d'hème. Ceci, suggère l'implication des résidus autres que Y¹⁴⁷ et Y¹⁵¹, dans la liaison à l'hème exogène. Ainsi, l'absence de la Y¹⁶⁶ chez IsdA est compensée par un autre acide aminé (His⁸³), localisé dans la boucle distale. En outre, une seule mutation au niveau des résidus de la loupe est insuffisante pour perturber le complexe établi entre IsdA et l'hème (119). Dans IIsA^{NEAT}, l'His⁸³ d'IsdA est remplacée par une Méthionine, ce qui est aussi le cas pour le domaine NEAT d'IsdB-N2 (Annexe 3). La structure du complexe IsdB-N2+hème résolue par cristallographie a mis en évidence le rôle de la Met³⁶³ dans la coordination de l'atome du fer de l'hème (109). Par ailleurs, la liaison d'IIsA_{Y147AY151A} à l'hème est certainement compensée par d'autres résidus situés dans la poche hydrophobe. Les données structurales d'IsdA et d'IsdB-N2, suggèrent que la Met⁶² d'IIsA^{NEAT} serait impliquée dans la coordination de l'hème. Il est donc important d'évaluer le rôle de ce résidu dans la formation du complexe IIsA-hème, soit par mutagenèse dirigée de la Met⁶² seule soit en combinaison avec les deux tyrosines. L'ensemble de ces données indique que la liaison de l'hème à IIsA se fait par l'intermédiaire du domaine NEAT. Cependant, afin de mieux caractériser les acides aminés directement associés à l'hème, des expériences de co-cristallisation entre le domaine NEAT et l'hème pourraient être envisagées.

Les domaines NEAT sont impliqués dans plusieurs fonctions : certains sont consacrés à l'interaction avec l'hémoglobine tandis que d'autres sont strictement conservés à la liaison à l'hème (84, 85, 186, 191, 216, 272). De plus, une certaine classe de NEAT est décrite pour sa capacité d'extraire l'hème de l'hémoglobine et de le transférer directement à un autre domaine NEAT (92, 186, 309). Dans cette étude, nous avons identifié deux nouvelles caractéristiques d'IlsA dans l'acquisition de l'hème. Tout d'abord, la protéine entière aussi bien que le domaine NEAT lie l'hème exogène avec une stœchiométrie 1 : 1. En outre, les cinétiques d'association de l'hème à IlsA entière et IlsA^{NEAT} sont décrites par deux équations exponentielles dont chacune est définie par une constante de vitesse k . L'association s'effectue ainsi en deux étapes, donnant lieu à deux constantes de vitesse k_1 et k_2 (avec $k_1 \gg k_2$) (les constantes de vitesse sont les mêmes pour les deux protéines). Il a été rapporté qu'une solution aqueuse d'hème peut être constituée de deux formes : une forme monomérique et une autre dimérique (76). La phase rapide de la cinétique peut donc être attribuée à la réaction entre apo-IlsA/NEAT et l'hème qui se trouve sous sa forme monomérique alors que la réaction la plus lente correspondrait à l'association avec l'hème monomérique issu de la dissociation de l'hème dimérique. Des résultats similaires montrant des réactions en deux phases sont d'ailleurs décrits pour l'association d'IsdA-Sa à l'hème (177).

La liaison directe entre IlsA et l'hémoglobine avait été démontrée par les tests d'ELISA et Biacore (74). Toutefois, aucune donnée précise sur les domaines impliqués et le fonctionnement d'IlsA en relation avec l'acquisition de l'hémoglobine était disponible. Dans notre travail, nous avons mis en évidence le rôle d'IlsA dans l'extraction de l'hème de l'hémoglobine. En effet, les tests *in vitro* ont montré qu'en présence de l'hémoglobine, apo-IlsA passe à une forme holo chargée en hème, ceci est accompagné par la perte des molécules d'hème de l'hémoglobine. Cette fonction est à priori attribuée au domaine NEAT et, aucun effet avec les domaines LRR seuls n'a été observé. Par ailleurs, L'alignement entre les séquences du domaine NEAT d'IlsA et les domaines NEAT des protéines Isd de *S. aureus*, définies comme récepteurs de l'hémoglobine (IsdH-N1, IsdH-N2 et IsdB-N1) indique que le motif aromatique nécessaire pour la liaison à l'hémoglobine est absent (216, 217). A sa place, IlsA possède les résidus de la région lip identifiés dans la protéine IsdX1 de *B. anthracis* (Annexe 4). L'association directe d'IsdX1 à l'hémoglobine a été attribuée à la Ser⁵³, puisque la mutation de ce résidu conduit à la perte de cette liaison (90). La structure du complexe IsdH(N1)-chaîne alpha de l'hémoglobine indique la

présence d'une liaison hydrogène entre la Ser¹³⁰ de IsdH-N1 et la Lys¹¹ de l'hémoglobine (156). Bien que nous ne disposions pas de données structurales pour IIsA, il est tentant de penser que la liaison entre IIsA et l'hémoglobine s'effectue par l'intermédiaire de la Ser⁶¹ qui est l'équivalent de la Ser⁵³ (la sérine adjacente au premier résidu de l'hélice 3₁₀ d'IsdX1). Cependant, un rôle des domaines LRR dans l'interaction avec l'hémoglobine n'est pas à exclure. Pour évaluer ceci, nous avons initié des tests d'interaction par ITC entre les domaines LRR d'IIsA et l'hémoglobine. Cette étude n'a pas été totalement achevée d'où la nécessité de poursuivre des expériences pour en tirer des conclusions définitives. De plus, il serait intéressant d'évaluer l'interaction entre l'hémoglobine et une protéine IIsA mutée au niveau de son résidu Ser⁶¹.

En conclusion, cette étude nous a permis de mieux caractériser les interactions entre IIsA et l'hème ou l'hémoglobine et de souligner l'importance du domaine NEAT dans ces interactions.

1.2. Rôle de l'opéron *isd* dans l'acquisition de l'hème et de l'hémoglobine et dans la virulence chez l'insecte modèle *G. mellonella*

Les résultats obtenus avant mes travaux de thèse avaient montré un rôle essentiel d'IIsA dans l'acquisition de l'hème car le mutant $\Delta iIsA$ était fortement affecté dans sa croissance en présence d'hème ou d'hémoglobine comme uniques sources de fer dans le milieu de culture (74). Au cours de nos expériences, nous avons constaté que le phénotype obtenu avec le mutant $\Delta iIsA$ était dû à la présence de tétracycline, ajoutée dans le milieu de culture pour maintenir une pression de sélection. Dans la littérature, la tétracycline a été décrite comme un chélateur du fer, ayant des effets bactériostatiques (118). De plus, le gène de résistance à la tétracycline introduit chez le mutant $\Delta iIsA$ code pour une protéine qui agirait comme une pompe d'efflux pour les complexes tétracycline-cations divalents (298). IIsA joue donc un rôle moins important, probablement à cause d'une forte redondance des systèmes d'acquisition des hémoprotéines. Le rôle du système Isd présent dans le génome de *B. cereus* n'a jamais été étudié auparavant. Nous avons donc effectué une étude approfondie de son implication dans l'acquisition du fer des hémoprotéines et dans la virulence chez l'insecte. L'interaction de ce système avec IIsA a également été étudiée.

Dans des milieux contenant de l'hème et de l'hémoglobine comme uniques sources de fer, une diminution significative de la croissance du mutant du locus *isd* par rapport à la souche sauvage a été observée. Ceci suggère que ces composants sont importants pour l'acquisition du

fer à partir de ces sources de fer. En revanche, dans les mêmes conditions de culture, aucune différence n'a été notée pour le mutant $\Delta isdC$ et le double mutant $\Delta isd\Delta ilsA$ se comportait comme le simple mutant Δisd . Ces données confirment l'existence d'une redondance des systèmes impliqués dans l'acquisition du fer des hémoprotéines chez *B. cereus*. Cependant, en ce qui concerne les composants de l'opéron *isd*, nous ne pouvons pas tirer des conclusions puisque les analyses sur chacun des mutants *Bc4548*, *Bc4547* et le double mutant *IsdCBc4547* ont été effectuées par une méthode différente de celle utilisée avec les mutants Δisd et $\Delta isdC$. Chez *B. anthracis*, le mutant $\Delta isdC$ présente une légère diminution de croissance dans des milieux carencés en fer, supplémentés avec de l'hème (185). De plus, le mutant Δhal (la protéine Hal possède des domaines NEAT et LRR et partage 43 % d'identité avec IlsA) présente une réduction de croissance dans l'acquisition de l'hème et l'hémoglobine nettement plus forte que le mutant Δisd (15). Par conséquent, malgré l'homologie existante entre les différents systèmes d'acquisition du fer chez *B. cereus* et *B. anthracis*, leur rôle et leur importance divergent d'une espèce à l'autre.

Récemment, une nouvelle étude menée par Hurd *et al.* a montré que le triple mutant $\Delta isdA\Delta isdB\Delta isdH$ chez *S. aureus* n'a pas de défaut de croissance en présence de l'hémoglobine, de l'hème et de la lactoferrine comme uniques sources de fer (139). Ces observations contredisent des résultats antérieurs qui indiquaient une implication d'IsdA dans l'acquisition de l'hème (120) et le rôle essentiel d'IsdB dans l'acquisition de l'hémoglobine (272). Ces données contradictoires pourraient s'expliquer par des variations des conditions expérimentales. Le suivi du phénotype des mutants des gènes impliqués dans l'acquisition du fer en condition *in vitro* est souvent associé à des biais résultants de plusieurs facteurs : contamination des verreries, du matériel ou bien des sources de fer par du fer libre, composition du milieu qui peut différer d'une étude à l'autre, etc.

Le rôle du locus *isd* dans la virulence chez l'insecte étudié par injection dans l'hémocoèle de larves de *G. mellonella* avec différentes doses bactériennes a été évalué. La DL_{50} a indiqué que les mutants Δisd et $\Delta isd\Delta ilsA$ sont moins virulents que la souche sauvage, ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec le mutant $\Delta ilsA$ (74). Par ailleurs, chez *G. mellonella* ni l'hémoglobine, ni l'hème ne sont présents dans l'hémocoèle de l'insecte. Cependant, des molécules contenant de l'hème tels que les catalases et les cytochromes sont retrouvées dans l'hémocoèle (147). De plus, chez l'insecte la source de fer la plus abondante est la ferritine or,

aucune interaction entre cette dernière et les protéines Isd n'a été montrée. Le rôle du locus *isd* dans la pathogénicité peut alors être expliquée par l'affinité de ses composants aux molécules renfermant l'hème alors que pour IIsA il a été déjà suggéré que son rôle dans la virulence est principalement liée à son interaction avec la ferritine (74).

Des résultats contradictoires sur le rôle des gènes *isd* dans la virulence chez *B. anthracis* et *S. aureus* ont été obtenus chez le cochon d'Inde (pour *B. anthracis*) et la souris (pour *S. aureus*) (55, 57, 108, 139, 272). Chez *B. cereus*, un modèle d'infection chez la souris par instillation nasale est déjà établi pour la détection des gènes impliqués dans la virulence (273). Il serait intéressant d'effectuer des tests d'infection dans un modèle murin afin de tester chacun des mutants Δ *ilsA* et Δ *isd* et le double mutant. Des tests préliminaires ont été entrepris pour le mutant Δ *ilsA*, mais aucune conclusion n'a pu être tirée. Par ailleurs, des expériences décrites dans les travaux de thèse de Nadine Daou ont montré que la croissance du mutant Δ *ilsA* dans le sang et dans le sérum du porc était affectée (138).

1.3. IIsA et IsdC : deux partenaires pour le transport de l'hème

Le transport de l'hème déjà bien détaillé chez plusieurs bactéries à Gram-positif, n'avait jusqu'à présent pas été étudié chez *B. cereus*. La découverte d'IIsA a permis d'initier les travaux sur le transport de l'hème chez cette bactérie. Nous avons focalisé notre attention sur le transfert de l'hème de la protéine IIsA à la première protéine du locus *isd*, IsdC. Les deux protéines purifiées à partir d'*E. coli* renferment de l'hème endogène de la souche M15. Une nouvelle méthode d'expression en utilisant une souche d'*E. coli* (C600 Δ *hemA*) déficiente dans la synthèse de l'hème nous a permis de produire les protéines sous leur forme apo-hème. Un transfert direct entre ces deux protéines de surface structurellement différentes : IIsA (NEAT + LRR) et IsdC (NEAT seulement) a été démontré. Tout d'abord, les études spectrophotométriques ont montré que le mélange holo-IIsA/ apo-IsdC donne lieu après la séparation des protéines à une protéine holo-IsdC et une protéine IIsA moins chargée en hème, ce qui indique que l'hème perdu par holo-IIsA a été capté par apo-IsdC. Par ailleurs, les cinétiques de transfert de l'hème déterminées par stopped-flow (nous avons testé le transfert de holo-IIsA (M15), holo-IIsA (C600) ou holo-IIsA^{NEAT} vers apo-IsdC) ont révélé un transfert qui se fait d'une façon rapide et directe de holo-IIsA à apo-IsdC. Il est à signaler que le domaine NEAT tout seul est plus efficace au niveau du transfert que la protéine entière, ce qui est peut être dû à un contact plus facile entre

IlsA^{NEAT} et IsdC. Finalement, les données d'ITC ont montré une interaction entre holo-IlsA et apo-IsdC avec une stœchiométrie de 1:1. Ce résultat indique la formation d'un complexe entre holo-IlsA et apo-IsdC, favorisant le mécanisme du transfert qui s'effectue potentiellement via le domaine NEAT. En plus des propriétés d'IlsA dans l'acquisition de l'hème, l'hémoglobine et l'extraction de l'hème de l'hémoglobine, une quatrième propriété concernant sa potentielle participation à la machinerie du transport/transfert de l'hème a été démontrée. Par comparaison aux protéines Isd décrites dans la littérature, IlsA possède les mêmes fonctions qu'IsdX1 (92, 186) et IsdX2-N1 (135, 186) (tableau 4). IlsA et IsdX1 sont deux protéines à un seul domaine NEAT exerçant plusieurs activités. Suite à notre étude, une première partie du modèle de transport de l'hème chez *B. cereus* peut être proposée, il s'agit du transport de l'hème de holo-IlsA à apo-IsdC. Cependant, l'implication des autres protéines Isd dans le processus du transport de l'hème reste pour l'instant inconnue. Est-ce que Bc4548, comme IsdX1, permet le transfert de l'hème à IsdC? Est-ce qu'une interaction existe entre Bc4548 et IlsA? Quel est le rôle de la protéine à cinq domaines NEAT "Bc4547" dans l'acquisition et le transport de l'hème?

Pour compléter le schéma (Figure 23) du passage de l'hème jusqu'au cytosol, il faudra purifier les différentes protéines Isd (Bc4548, Bc4547 et chacun des domaines NEAT de Bc4547) et réaliser des analyses d'interactions et de transfert d'hème. Par ailleurs, des expériences de co-immunolocalisation de ces protéines pourraient aussi être envisagées afin de préciser leurs rôles *in vivo*. Enfin dans nos études, nous avons uniquement travaillé avec deux sources d'hème différentes. Il serait alors intéressant d'analyser l'affinité d'IlsA avec d'autres molécules riches en hème.

2. IlsA et la ferritine

L'interaction entre une protéine bactérienne et les ferritines de l'hôte n'a que très peu été évoquée dans la littérature. IlsA fut la première à être décrite comme une protéine de surface présentant une affinité pour cette source de fer. Les études précédentes ont montré une interaction directe dans les conditions *in vitro* entre la ferritine commerciale (Horse spleen ferritin, Sigma) et IlsA. Dans ce travail, plusieurs approches ont été utilisées afin d'approfondir nos connaissances sur le mécanisme par lequel IlsA interagit avec ce grand réservoir de fer et d'éclaircir les mécanismes permettant d'acquérir le fer contenu dans la ferritine suite à la liaison avec IlsA.

2.1. IIsA : Interaction avec les ferritines recombinantes et libération du fer de la ferritine

Dans cette étude, l'interaction entre IIsA et la ferritine a été caractérisée en détail, démontrant qu'IIsA est nécessaire pour l'agrégation de la ferritine à la surface bactérienne. En outre, les études d'interaction avec différents types de ferritines recombinantes révèlent une stœchiométrie de ~ 24 IIsA pour une molécule de ferritine indiquant une liaison directe entre IIsA et chacune des sous-unités de la ferritine. Ces données montrent qu'IIsA est un récepteur de la ferritine. Seule, la protéine Als3 a été décrite comme étant essentielle pour l'acquisition de la ferritine chez *Candida albicans*. Néanmoins, aucune interaction directe entre Als3 et la ferritine n'a été démontrée (4). Pour mieux comprendre comment IIsA interagit avec la ferritine et par quel(s) domaine(s) cette interaction peut avoir lieu, nous avons analysé les séquences des protéines qui présentent une affinité pour la ferritine. Chez les mammifères, plusieurs récepteurs associés à l'internalisation de la ferritine ont été caractérisés. Tim-2 (T cell immunoglobulin - domain), exprimé dans plusieurs tissus chez la souris et le TfR (récepteur de la transferrine humaine) peuvent tous les deux se lier à la chaîne H de la ferritine (54, 173) alors que Scaras5 appartient à une classe de récepteurs qui lie la chaîne L de la ferritine permettant de fournir le fer aux cellules rénales (172). Cependant, aucune homologie entre IIsA et ces récepteurs de la ferritine n'a été détectée.

Les tests d'interaction entre chacun des domaines NEAT et LRR séparément et la ferritine humaine recombinante n'ont pas montré des résultats significatifs, ceci suggère que seule la protéine entière peut interagir avec les sous-unités de la ferritine. Par conséquent, des analyses structurales approfondies et des études de mutagenèse dirigée sont indispensables pour déterminer le site de liaison de la ferritine à IIsA. Chez *B. anthracis*, deux protéines homologues à IIsA ont été identifiées : BslL (LRR+SLH) et BslK (NEAT+SLH) (148). Des études préliminaires sur $\Delta bslL$ et $\Delta bslK$ n'ont pas montré un rôle essentiel de ces mutants dans l'acquisition de la ferritine (A. Fouet, communication personnelle). Ce résultat renforce les données des interactions obtenues avec les domaines purifiés d'IIsA et la ferritine.

Dans notre étude, nous avons démontré que la liaison d'IIsA à la ferritine induit une plus forte libération du fer. Etant donné que la structure de la ferritine est extrêmement stable, il se peut qu'IIsA induise des changements conformationnels de la coque protéique. Dans la bibliographie, il existe plusieurs modèles qui illustrent la libération du fer de la ferritine, par

exemple : les canaux de type 3 de la ferritine pourraient s'ouvrir et se fermer suite à la liaison de certains peptides (179). Ces petites molécules altèreraient la mobilisation du fer en augmentant la flexibilité des pores par lesquels le fer s'échappe. Ces données suggèrent qu'*in vivo*, il pourrait exister des protéines qui se fixent à la ferritine autour des pores, participant ainsi à la régulation du stockage et de la libération du fer (289). Etant donné l'implication d'IlsA dans la mobilisation du fer lors de sa liaison avec la ferritine recombinante humaine, il est tentant de penser qu'IlsA se fixe au niveau des canaux de type 3, induisant l'ouverture des pores et la libération du fer. Des expériences de mutagenèse dirigée de certains résidus présents autour des pores de la ferritine pourraient permettre de confirmer cette hypothèse.

2.2. IlsA et ses partenaires dans l'acquisition du fer de la ferritine

Dans nos conditions *in vitro*, la DFO (désferrioxamine) qui est un agent chélateur du fer a été utilisée comme un indicateur pour la libération du fer de la coque de la ferritine. Nos résultats ont montré qu'en présence d'IlsA et de DFO, le taux du fer libéré est significativement augmenté. Ceci suggère que chez *B. cereus*, une synergie entre IlsA et les sidérophores pourrait exister dans le but de transférer le fer jusqu'au cytosol bactérien.

Le rôle des sidérophores bactériens dans la mobilisation du fer de la ferritine a déjà été décrit. Dans notre étude, le rôle de la bacillibactine et de la pétrobactine dans l'acquisition du fer de la ferritine a été évalué. Seule la souche mutante $\Delta entA$ incapable de produire la bacillibactine a présenté un phénotype vis-à-vis de l'acquisition de la ferritine. Ceci souligne l'intervention de la bacillibactine dans le mécanisme du transport du fer dont la libération de la ferritine est facilitée par IlsA. Le fer ferrique du noyau de la ferritine est extrêmement insoluble dans les conditions aérobiques et à pH neutre (291); le rôle essentiel de la bacillibactine dans l'acquisition du fer de la ferritine pourrait ainsi être attribué à sa très forte affinité pour le fer ferrique ($K_f = 10^{47.6}$) (78) beaucoup plus élevée que celle la pétrobactine ($K_f = 10^{23}$) (295).

En plus de son rôle essentiel dans l'acquisition du fer de la ferritine, la bacillibactine est aussi impliquée dans la virulence chez l'insecte *G. mellonella*. Ces résultats contrastent avec le rôle majeur de la pétrobactine dans la virulence de *B. anthracis* chez la souris (50). Contrairement à la bacillibactine, la pétrobactine n'est pas reconnue par la sidérocaldine produite chez les mammifères, elle est ainsi un facteur essentiel pour la virulence de *B. anthracis* chez ces hôtes (295). L'absence de la sidérocaldine chez les insectes et l'abondance de la ferritine dans

l'hémocoèle sont des éléments qui nous permettent d'expliquer l'implication de la bacillibactine dans la virulence de *B. cereus* chez l'insecte. Il reste à déterminer si la pétrobactine de *B. cereus* a un rôle plus important dans la virulence chez la souris.

En conclusion, dans cette partie du travail nous avons montré qu'IlsA interagit avec plusieurs types de ferritine avec une stoechiométrie de 24 : 1. Cette interaction est accompagnée par la libération du fer détectée en présence de DFO. Ces résultats suggèrent que suite au contact avec la ferritine, IlsA déstabilise l'assemblage de ses sous-unités. En parallèle, un rôle essentiel de la bacillibactine de *B. cereus* dans l'acquisition de la ferritine et dans la virulence chez l'insecte *G. mellonella* a été mis en évidence. Ensemble, ces données suggèrent qu'IlsA et la bacillibactine agissent de concert afin de transporter le fer stocké dans la ferritine jusqu'au cytosol bactérien.

Nos travaux montrent pour la première fois le rôle d'une protéine bactérienne dans la libération du fer de la coque de la ferritine. Cependant, le processus par lequel IlsA mobilise le fer n'est pas complètement élucidé. Des études supplémentaires des cinétiques de la libération du fer de la ferritine seront indispensables pour mieux comprendre ce mécanisme. Nous pouvons par exemple substituer la DFO par la bacillibactine d'*E. coli* ou bien pour imiter les conditions *in vivo*, une purification de la bacillibactine de *B. cereus* pourra être envisageable. De plus, le rôle de certaines protéines qui renferment des domaines LRR (Shr de *S. pyogenes*, InlA de *L.monocytogenes*) dans l'adhésion aux cellules hôtes a été décrit (97, 195), ce qui suggère qu'IlsA pourrait également avoir un rôle dans l'adhésion aux cellules.

Références bibliographiques

1. **Adams, T. J., S. Vartivarian, and R. E. Cowart.** 1990. Iron acquisition systems of *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity* **58**:2715-2718.
2. **Agaisse, H., M. Gominet, O. A. Okstad, A. B. Kolsto, and D. Lereclus.** 1999. PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular microbiology* **32**:1043-1053.
3. **Allen, C. E., and M. P. Schmitt.** 2009. HtaA is an iron-regulated hemin binding protein involved in the utilization of heme iron in *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of bacteriology* **191**:2638-2648.
4. **Almeida, R. S., S. Brunke, A. Albrecht, S. Thewes, M. Laue, J. E. Edwards, S. G. Filler, and B. Hube.** 2008. The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS pathogens* **4**:e1000217.
5. **Andrade, M. A., F. D. Ciccarelli, C. Perez-Iratxeta, and P. Bork.** 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.
6. **Andreeva, Z. I., V. F. Nesterenko, M. G. Fomkina, V. I. Ternovsky, N. E. Suzina, A. Y. Bakulina, A. S. Solonin, and E. V. Sineva.** 2007. The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions. *Biochimica et biophysica acta* **1768**:253-263.
7. **Andrews, S. C., P. M. Harrison, and J. R. Guest.** 1989. Cloning, sequencing, and mapping of the bacterioferritin gene (*bfr*) of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **171**:3940-3947.
8. **Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol.Rev.* **27**:215-237.
9. **Andrews, S. C., A. Treffry, and P. M. Harrison.** 1987. Siderosomal ferritin. The missing link between ferritin and haemosiderin? *The Biochemical journal* **245**:439-446.
10. **Angus, T. A.** 1954. A bacterial toxin paralyzing silkworm larvae. *Nature* **173**:545-546.
11. **Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille.** 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**:6887-6891.
12. **Arosio, P., T. G. Adelman, and J. W. Drysdale.** 1978. On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers. *The Journal of biological chemistry* **253**:4451-4458.
13. **Ascoli, F., M. R. Fanelli, and E. Antonini.** 1981. Preparation and properties of apohemoglobin and reconstituted hemoglobins. *Methods Enzymol.* **76**:72-87.
14. **Bahl, H., H. Scholz, N. Bayan, M. Chami, G. Leblon, T. Gulik-Krzywicki, E. Shechter, A. Fouet, S. Mesnage, E. Tosi-Couture, P. Gounon, M. Mock, E. Conway de Macario, A. J. Macario, L. A. Fernandez-Herrero, G. Olabarria, J. Berenguer, M. J. Blaser, B. Kuen, W. Lubitz, M. Sara, P. H. Pouwels, C. P. Kolen, H. J. Boot, and S. Resch.** 1997. Molecular biology of S-layers. *FEMS microbiology reviews* **20**:47-98.
15. **Balderas, M. A., C. L. Nobles, E. S. Honsa, E. R. Alicki, and A. W. Maresso.** 2012. Hal is a *Bacillus anthracis* Heme Acquisition Protein. *J.Bacteriol.* **194**:5513-5521.
16. **Barbeau, K., G. Zhang, D. H. Live, and A. Butler.** 2002. Petrobactin, a photoreactive siderophore produced by the oil-degrading marine bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *Journal of the American Chemical Society* **124**:378-379.
17. **Bates, C. S., G. E. Montanez, C. R. Woods, R. M. Vincent, and Z. Eichenbaum.** 2003. Identification and characterization of a *Streptococcus pyogenes* operon involved in binding of hemoproteins and acquisition of iron. *Infect.Immun.* **71**:1042-1055.
18. **Bates, C. S., G. E. Montanez, C. R. Woods, R. M. Vincent, and Z. Eichenbaum.** 2003. Identification and characterization of a *Streptococcus pyogenes* operon involved in binding of hemoproteins and acquisition of iron. *Infection and immunity* **71**:1042-1055.

19. **Beasley, F. C., and D. E. Heinrichs.** 2010. Siderophore-mediated iron acquisition in the staphylococci. *Journal of inorganic biochemistry* **104**:282-288.
20. **Beasley, F. C., E. D. Vines, J. C. Grigg, Q. Zheng, S. Liu, G. A. Lajoie, M. E. Murphy, and D. E. Heinrichs.** 2009. Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* **72**:947-963.
21. **Beattie, S. H., and A. G. Williams.** 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Letters in applied microbiology* **28**:221-225.
22. **Beecher, D. J., and J. D. Macmillan.** 1991. Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and immunity* **59**:1778-1784.
23. **Beecher, D. J., J. L. Schoeni, and A. C. Wong.** 1995. Enterotoxigenic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and immunity* **63**:4423-4428.
24. **Beecher, D. J., and A. C. Wong.** 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.
25. **Beveridge, T. J., P. H. Pouwels, M. Sara, A. Kotiranta, K. Lounatmaa, K. Kari, E. Kerosuo, M. Haapasalo, E. M. Egelseer, I. Schocher, U. B. Sleytr, L. Morelli, M. L. Callegari, J. F. Nomellini, W. H. Bingle, J. Smit, E. Leibovitz, M. Lemaire, I. Miras, S. Salamiou, P. Beguin, H. Ohayon, P. Gounon, M. Matuschek, and S. F. Koval.** 1997. Functions of S-layers. *FEMS microbiology reviews* **20**:99-149.
26. **Bhatnagar, R., and S. Batra.** 2001. Anthrax toxin. *Critical reviews in microbiology* **27**:167-200.
27. **Bibb, L. A., C. A. Kunkle, and M. P. Schmitt.** 2007. The ChrA-ChrS and HrrA-HrrS signal transduction systems are required for activation of the hmuO promoter and repression of the hemA promoter in *Corynebacterium diphtheriae*. *Infection and immunity* **75**:2421-2431.
28. **Bierne, H., C. Garandeau, M. G. Pucciarelli, C. Sabet, S. Newton, F. Garcia-del Portillo, P. Cossart, and A. Charbit.** 2004. Sortase B, a new class of sortase in *Listeria monocytogenes*. *Journal of bacteriology* **186**:1972-1982.
29. **Bierne, H., S. K. Mazmanian, M. Trost, M. G. Pucciarelli, G. Liu, P. Dehoux, L. Jansch, F. Garcia-del Portillo, O. Schneewind, and P. Cossart.** 2002. Inactivation of the srtA gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Molecular microbiology* **43**:869-881.
30. **Borezee, E., E. Pellegrini, J. L. Beretti, and P. Berche.** 2001. SvpA, a novel surface virulence-associated protein required for intracellular survival of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **147**:2913-2923.
31. **Bottone, E. J.** 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clinical microbiology reviews* **23**:382-398.
32. **Bou-Abdallah, F., P. Arosio, P. Santambrogio, X. Yang, C. Janus-Chandler, and N. D. Chasteen.** 2002. Ferrous ion binding to recombinant human H-chain ferritin. An isothermal titration calorimetry study. *Biochemistry* **41**:11184-11191.
33. **Bou-Abdallah, F., G. Biasiotto, P. Arosio, and N. D. Chasteen.** 2004. The putative "nucleation site" in human H-chain ferritin is not required for mineralization of the iron core. *Biochemistry* **43**:4332-4337.
34. **Bou-Abdallah, F., G. C. Papaefthymiou, D. M. Scheswohl, S. D. Stanga, P. Arosio, and N. D. Chasteen.** 2002. μ -1,2-Peroxo-bridged di-iron(III) dimer formation in human H-chain ferritin. *The Biochemical journal* **364**:57-63.
35. **Bou-Abdallah, F., P. Santambrogio, S. Levi, P. Arosio, and N. D. Chasteen.** 2005. Unique iron binding and oxidation properties of human mitochondrial ferritin: a comparative analysis with Human H-chain ferritin. *Journal of molecular biology* **347**:543-554.

36. **Bouillaut, L., S. Perchat, S. Arold, S. Zorrilla, L. Slamti, C. Henry, M. Gohar, N. Declerck, and D. Lereclus.** 2008. Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic acids research* **36**:3791-3801.
37. **Boyd, D., C. Vecoli, D. M. Belcher, S. K. Jain, and J. W. Drysdale.** 1985. Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. *The Journal of biological chemistry* **260**:11755-11761.
38. **Bracken, C. S., M. T. Baer, A. Abdur-Rashid, W. Helms, and I. Stojiljkovic.** 1999. Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *Journal of bacteriology* **181**:6063-6072.
39. **Braun, V.** 2009. FhuA (TonA), the career of a protein. *Journal of bacteriology* **191**:3431-3436.
40. **Brook, I.** 2002. Secondary bacterial infections complicating skin lesions. *Journal of medical microbiology* **51**:808-812.
41. **Callegan, M. C., S. T. Kane, D. C. Cochran, M. S. Gilmore, M. Gominet, and D. Lereclus.** 2003. Relationship of plcR-regulated factors to *Bacillus endophthalmitis* virulence. *Infection and immunity* **71**:3116-3124.
42. **Candela, T., and A. Fouet.** 2005. *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. *Molecular microbiology* **57**:717-726.
43. **Candela, T., T. Mignot, X. Hagnerelle, M. Haustant, and A. Fouet.** 2005. Genetic analysis of *Bacillus anthracis* Sap S-layer protein crystallization domain. *Microbiology* **151**:1485-1490.
44. **Candela, T., M. Mock, and A. Fouet.** 2005. CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. *Journal of bacteriology* **187**:7765-7772.
45. **Cao, J., M. R. Woodhall, J. Alvarez, M. L. Cartron, and S. C. Andrews.** 2007. EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe²⁺ transporter that is cryptic in *Escherichia coli* K-12 but functional in *E. coli* O157:H7. *Molecular microbiology* **65**:857-875.
46. **Carlin F., and N.-t. C.** 1998. *Bacillus cereus*. In "Manuel de Bactériologie Alimentaire" (Sutra L., Federighi M., Jouve J. L.). Polytechnica, Paris:163-183.
47. **Carlson, P. E., Jr., K. A. Carr, B. K. Janes, E. C. Anderson, and P. C. Hanna.** 2009. Transcriptional profiling of *Bacillus anthracis* Sterne (34F2) during iron starvation. *PLoS.One.* **4**:e6988.
48. **Carlson, P. E., Jr., S. D. Dixon, B. K. Janes, K. A. Carr, T. D. Nusca, E. C. Anderson, S. E. Keene, D. H. Sherman, and P. C. Hanna.** 2010. Genetic analysis of petrobactin transport in *Bacillus anthracis*. *Molecular microbiology* **75**:900-909.
49. **Carpenter, B. M., J. M. Whitmire, and D. S. Merrell.** 2009. This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis. *Infection and immunity* **77**:2590-2601.
50. **Cendrowski, S., W. MacArthur, and P. Hanna.** 2004. *Bacillus anthracis* requires siderophore biosynthesis for growth in macrophages and mouse virulence. *Mol.Microbiol.* **51**:407-417.
51. **Chasteen, N. D.** 1998. Ferritin. Uptake, storage, and release of iron. *Metal ions in biological systems* **35**:479-514.
52. **Chasteen, N. D., and P. M. Harrison.** 1999. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *Journal of structural biology* **126**:182-194.
53. **Chateau, A., W. van Schaik, A. Six, W. Aucher, and A. Fouet.** 2011. CodY regulation is required for full virulence and heme iron acquisition in *Bacillus anthracis*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**:4445-4456.
54. **Chen, T. T., L. Li, D. H. Chung, C. D. Allen, S. V. Torti, F. M. Torti, J. G. Cyster, C. Y. Chen, F. M. Brodsky, E. C. Niemi, M. C. Nakamura, W. E. Seaman, and M. R. Daws.** 2005. TIM-2 is expressed on B cells and in liver and kidney and is a receptor for H-ferritin endocytosis. *The Journal of experimental medicine* **202**:955-965.

55. **Cheng, A. G., H. K. Kim, M. L. Burts, T. Krausz, O. Schneewind, and D. M. Missiakas.** 2009. Genetic requirements for *Staphylococcus aureus* abscess formation and persistence in host tissues. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**:3393-3404.
56. **Cheung, J., F. C. Beasley, S. Liu, G. A. Lajoie, and D. E. Heinrichs.** 2009. Molecular characterization of staphyloferrin B biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* **74**:594-608.
57. **Chitlaru, T., O. Gat, H. Grosfeld, I. Inbar, Y. Gozlan, and A. Shafferman.** 2007. Identification of in vivo-expressed immunogenic proteins by serological proteome analysis of the *Bacillus anthracis* secretome. *Infection and immunity* **75**:2841-2852.
58. **Clarke, S. R., G. Andre, E. J. Walsh, Y. F. Dufrene, T. J. Foster, and S. J. Foster.** 2009. Iron-regulated surface determinant protein A mediates adhesion of *Staphylococcus aureus* to human corneocyte envelope proteins. *Infection and immunity* **77**:2408-2416.
59. **Clarke, S. R., K. J. Brummell, M. J. Horsburgh, P. W. McDowell, S. A. Mohamad, M. R. Stapleton, J. Acevedo, R. C. Read, N. P. Day, S. J. Peacock, J. J. Mond, J. F. Kokai-Kun, and S. J. Foster.** 2006. Identification of in vivo-expressed antigens of *Staphylococcus aureus* and their use in vaccinations for protection against nasal carriage. *The Journal of infectious diseases* **193**:1098-1108.
60. **Clarke, S. R., and S. J. Foster.** 2008. IsdA protects *Staphylococcus aureus* against the bactericidal protease activity of apolactoferrin. *Infection and immunity* **76**:1518-1526.
61. **Clarke, S. R., R. Mohamed, L. Bian, A. F. Routh, J. F. Kokai-Kun, J. J. Mond, A. Tarkowski, and S. J. Foster.** 2007. The *Staphylococcus aureus* surface protein IsdA mediates resistance to innate defenses of human skin. *Cell host & microbe* **1**:199-212.
62. **Clarke, S. R., M. D. Wiltshire, and S. J. Foster.** 2004. IsdA of *Staphylococcus aureus* is a broad spectrum, iron-regulated adhesin. *Molecular microbiology* **51**:1509-1519.
63. **Cornelissen, C. N., G. D. Biswas, J. Tsai, D. K. Paruchuri, S. A. Thompson, and P. F. Sparling.** 1992. Gonococcal transferrin-binding protein 1 is required for transferrin utilization and is homologous to TonB-dependent outer membrane receptors. *Journal of bacteriology* **174**:5788-5797.
64. **Cornelissen, C. N., and P. F. Sparling.** 1996. Binding and surface exposure characteristics of the gonococcal transferrin receptor are dependent on both transferrin-binding proteins. *Journal of bacteriology* **178**:1437-1444.
65. **Cornelissen, C. N., and P. F. Sparling.** 1994. Identification of receptor-mediated transferrin-iron uptake mechanism in *Neisseria gonorrhoeae*. *Methods in enzymology* **235**:356-363.
66. **Cotton, J. L., J. Tao, and C. J. Balibar.** 2009. Identification and characterization of the *Staphylococcus aureus* gene cluster coding for staphyloferrin A. *Biochemistry* **48**:1025-1035.
67. **Coulanges, V., P. Andre, and D. J. Vidon.** 1998. Effect of siderophores, catecholamines, and catechol compounds on *Listeria* spp. Growth in iron-complexed medium. *Biochemical and biophysical research communications* **249**:526-530.
68. **Coulanges, V., P. Andre, and D. J. Vidon.** 1996. Esculetin antagonizes iron-chelating agents and increases the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Research in microbiology* **147**:677-685.
69. **Coulanges, V., P. Andre, O. Ziegler, L. Buchheit, and D. J. Vidon.** 1997. Utilization of iron-catecholamine complexes involving ferric reductase activity in *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity* **65**:2778-2785.
70. **Coulton, J. W., P. Mason, D. R. Cameron, G. Carmel, R. Jean, and H. N. Rode.** 1986. Protein fusions of beta-galactosidase to the ferrichrome-iron receptor of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **165**:181-192.

71. **Cunningham, M. W.** 2000. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clinical microbiology reviews* **13**:470-511.
72. **Dale, S. E., M. T. Sebulsky, and D. E. Heinrichs.** 2004. Involvement of SirABC in iron-siderophore import in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* **186**:8356-8362.
73. **Damgaard, P. H., P. E. Granum, J. Bresciani, M. V. Torregrossa, J. Eilenberg, and L. Valentino.** 1997. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from infections in burn wounds. *FEMS immunology and medical microbiology* **18**:47-53.
74. **Daou, N., C. Buisson, M. Gohar, J. Vidic, H. Bierne, M. Kallassy, D. Lereclus, and C. Nielsen-LeRoux.** 2009. IIsA, a unique surface protein of *Bacillus cereus* required for iron acquisition from heme, hemoglobin and ferritin. *PLoS.Pathog.* **5**:e1000675.
75. **De Domenico, I., M. B. Vaughn, L. Li, D. Bagley, G. Musci, D. M. Ward, and J. Kaplan.** 2006. Ferroportin-mediated mobilization of ferritin iron precedes ferritin degradation by the proteasome. *The EMBO journal* **25**:5396-5404.
76. **de Villiers, K. A., C. H. Kaschula, T. J. Egan, and H. M. Marques.** 2007. Speciation and structure of ferriprotoporphyrin IX in aqueous solution: spectroscopic and diffusion measurements demonstrate dimerization, but not mu-oxo dimer formation. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry* **12**:101-117.
77. **Dertz, E. A., A. Stintzi, and K. N. Raymond.** 2006. Siderophore-mediated iron transport in *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *J.Biol.Inorg.Chem.* **11**:1087-1097.
78. **Dertz, E. A., J. Xu, A. Stintzi, and K. N. Raymond.** 2006. Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*. *Journal of the American Chemical Society* **128**:22-23.
79. **Dhungana, S., D. S. Anderson, T. A. Mietzner, and A. L. Crumbliss.** 2005. Kinetics of iron release from ferric binding protein (FbpA): mechanistic implications in bacterial periplasm-to-cytosol Fe³⁺ transport. *Biochemistry* **44**:9606-9618.
80. **Dhungana, S., C. H. Taboy, O. Zak, M. Larvie, A. L. Crumbliss, and P. Aisen.** 2004. Redox properties of human transferrin bound to its receptor. *Biochemistry* **43**:205-209.
81. **Dominguez-Vera, J. M.** 2004. Iron(III) complexation of Desferrioxamine B encapsulated in apoferritin. *Journal of inorganic biochemistry* **98**:469-472.
82. **Douglas, T., and D. R. Ripoll.** 1998. Calculated electrostatic gradients in recombinant human H-chain ferritin. *Protein science : a publication of the Protein Society* **7**:1083-1091.
83. **Drobniowski, F. A.** 1993. *Bacillus cereus* and related species. *Clinical microbiology reviews* **6**:324-338.
84. **Dryla, A., D. Gelbmann, A. von Gabain, and E. Nagy.** 2003. Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Molecular microbiology* **49**:37-53.
85. **Dryla, A., B. Hoffmann, D. Gelbmann, C. Giefing, M. Hanner, A. Meinke, A. S. Anderson, W. Koppensteiner, R. Konrat, G. A. von, and E. Nagy.** 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**:254-264.
86. **Ehling-Schulz, M., M. Fricker, H. Grallert, P. Rieck, M. Wagner, and S. Scherer.** 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 microbiology* **6**:20.
87. **Ehling-Schulz, M., M. Fricker, and S. Scherer.** 2004. *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular nutrition & food research* **48**:479-487.
88. **Ehling-Schulz, M., N. Vukov, A. Schulz, R. Shaheen, M. Andersson, E. Martlbauer, and S. Scherer.** 2005. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology* **71**:105-113.

89. **Eichenbaum, Z., E. Muller, S. A. Morse, and J. R. Scott.** 1996. Acquisition of iron from host proteins by the group A streptococcus. *Infection and immunity* **64**:5428-5429.
90. **Ekworomadu, M. T., C. B. Poor, C. P. Owens, M. A. Balderas, M. Fabian, J. S. Olson, F. Murphy, E. Balkabasi, E. S. Honsa, C. He, C. W. Goulding, and A. W. Maresso.** 2012. Differential function of lip residues in the mechanism and biology of an anthrax hemophore. *PLoS.Pathog.* **8**:e1002559.
91. **Escolar, L., J. Perez-Martin, and V. de Lorenzo.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of bacteriology* **181**:6223-6229.
92. **Fabian, M., E. Solomaha, J. S. Olson, and A. W. Maresso.** 2009. Heme transfer to the bacterial cell envelope occurs via a secreted hemophore in the Gram-positive pathogen *Bacillus anthracis*. *J.Biol.Chem.* **284**:32138-32146.
93. **Fedhila, S., N. Daou, D. Lereclus, and C. Nielsen-LeRoux.** 2006. Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. *Mol.Microbiol.* **62**:339-355.
94. **Fedhila, S., P. Nel, and D. Lereclus.** 2002. The InhA2 metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* strain 407 is required for pathogenicity in insects infected via the oral route. *Journal of bacteriology* **184**:3296-3304.
95. **Ferguson, A. D., and J. Deisenhofer.** 2002. TonB-dependent receptors-structural perspectives. *Biochimica et biophysica acta* **1565**:318-332.
96. **Ferguson, A. D., E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs, and W. Welte.** 1998. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**:2215-2220.
97. **Fisher, M., Y. S. Huang, X. Li, K. S. Mclver, C. Toukoki, and Z. Eichenbaum.** 2008. Shr is a broad-spectrum surface receptor that contributes to adherence and virulence in group A streptococcus. *Infection and immunity* **76**:5006-5015.
98. **Ford, G. C., P. M. Harrison, D. W. Rice, J. M. Smith, A. Treffry, J. L. White, and J. Yariv.** 1984. Ferritin: design and formation of an iron-storage molecule. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **304**:551-565.
99. **Fouet, A., S. Mesnage, E. Tosi-Couture, P. Gounon, and M. Mock.** 1999. *Bacillus anthracis* surface: capsule and S-layer. *Journal of applied microbiology* **87**:251-255.
100. **Fowler, V. G., Jr., J. M. Miro, B. Hoen, C. H. Cabell, E. Abrutyn, E. Rubinstein, G. R. Corey, D. Spelman, S. F. Bradley, B. Barsic, P. A. Pappas, K. J. Anstrom, D. Wray, C. Q. Fortes, I. Anguera, E. Athan, P. Jones, J. T. van der Meer, T. S. Elliott, D. P. Levine, and A. S. Bayer.** 2005. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **293**:3012-3021.
101. **Francis, R. T., Jr., J. W. Booth, and R. R. Becker.** 1985. Uptake of iron from hemoglobin and the haptoglobin-hemoglobin complex by hemolytic bacteria. *The International journal of biochemistry* **17**:767-773.
102. **Friedman, D. B., D. L. Stauff, G. Pishchany, C. W. Whitwell, V. J. Torres, and E. P. Skaar.** 2006. *Staphylococcus aureus* redirects central metabolism to increase iron availability. *PLoS.Pathog.* **2**:e87.
103. **Gaillard, J. L., P. Berche, C. Frehel, E. Guin, and P. Cossart.** 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.
104. **Galvez, N., B. Ruiz, R. Cuesta, E. Colacio, and J. M. Dominguez-Vera.** 2005. Release of iron from ferritin by aceto- and benzohydroxamic acids. *Inorganic chemistry* **44**:2706-2709.

105. **Garandeau, C., H. Reglier-Poupet, I. Dubail, J. L. Beretti, P. Berche, and A. Charbit.** 2002. The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is involved in processing of internalin and in virulence. *Infection and immunity* **70**:1382-1390.
106. **Garner, B. L., J. E. Arceneaux, and B. R. Byers.** 2004. Temperature control of a 3,4-dihydroxybenzoate (protocatechuate)-based siderophore in *Bacillus anthracis*. *Current microbiology* **49**:89-94.
107. **Gaspar, A. H., L. A. Marraffini, E. M. Glass, K. L. Debord, H. Ton-That, and O. Schneewind.** 2005. *Bacillus anthracis* sortase A (SrtA) anchors LPXTG motif-containing surface proteins to the cell wall envelope. *J.Bacteriol.* **187**:4646-4655.
108. **Gat, O., G. Zaide, I. Inbar, H. Grosfeld, T. Chitlaru, H. Levy, and A. Shafferman.** 2008. Characterization of *Bacillus anthracis* iron-regulated surface determinant (Isd) proteins containing NEAT domains. *Mol.Microbiol.* **70**:983-999.
109. **Gaudin, C. F., J. C. Grigg, A. L. Arrieta, and M. E. Murphy.** 2011. Unique heme-iron coordination by the hemoglobin receptor IsdB of *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* **50**:5443-5452.
110. **Gaviria, R. A., P. Granum, and F. Priest.** 2000. Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS microbiology letters* **190**:151-155.
111. **Ghigo, J. M., S. Letoffe, and C. Wandersman.** 1997. A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **179**:3572-3579.
112. **Gilmore, M. S., A. L. Cruz-Rodz, M. Leimeister-Wachter, J. Kreft, and W. Goebel.** 1989. A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. *Journal of bacteriology* **171**:744-753.
113. **Goetz, D. H., M. A. Holmes, N. Borregaard, M. E. Bluhm, K. N. Raymond, and R. K. Strong.** 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular cell* **10**:1033-1043.
114. **Gohar, M., N. Gilois, R. Graveline, C. Garreau, V. Sanchis, and D. Lereclus.** 2005. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics* **5**:3696-3711.
115. **Gohar, M., O. A. Okstad, N. Gilois, V. Sanchis, A. B. Kolsto, and D. Lereclus.** 2002. Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* **2**:784-791.
116. **Gonzalez, J. M., Jr., B. J. Brown, and B. C. Carlton.** 1982. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**:6951-6955.
117. **Granum, P. E.** 1997. *Bacillus cereus*. In "Food microbiology. Fundamentals and frontiers", ASM Press, Washington DC.:327-336.
118. **Grenier, D., M. P. Huot, and D. Mayrand.** 2000. Iron-chelating activity of tetracyclines and its impact on the susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to these antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **44**:763-766.
119. **Grigg, J. C., C. X. Mao, and M. E. Murphy.** 2011. Iron-coordinating tyrosine is a key determinant of NEAT domain heme transfer. *J.Mol.Biol.* **413**:684-698.
120. **Grigg, J. C., C. L. Vermeiren, D. E. Heinrichs, and M. E. Murphy.** 2007. Haem recognition by a *Staphylococcus aureus* NEAT domain. *Mol.Microbiol.* **63**:139-149.
121. **Grosse, C., J. Scherer, D. Koch, M. Otto, N. Taudte, and G. Grass.** 2006. A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **62**:120-131.

122. **Guillemet, E., C. Cadot, S. L. Tran, M. H. Guinebretiere, D. Lereclus, and N. Ramarao.** 2010. The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *Journal of bacteriology* **192**:286-294.
123. **Guinebretiere, M. H., S. Auger, N. Galleron, M. Contzen, B. De Sarrau, M. L. De Buyser, G. Lamberet, A. Fagerlund, P. E. Granum, D. Lereclus, P. De Vos, C. Nguyen-The, and A. Sorokin.** 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **63**:31-40.
124. **Gutteridge, J. M., R. Richmond, and B. Halliwell.** 1979. Inhibition of the iron-catalysed formation of hydroxyl radicals from superoxide and of lipid peroxidation by desferrioxamine. *The Biochemical journal* **184**:469-472.
125. **Guttmann, D. M., and D. J. Ellar.** 2000. Phenotypic and genotypic comparisons of 23 strains from the *Bacillus cereus* complex for a selection of known and putative *B. thuringiensis* virulence factors. *FEMS microbiology letters* **188**:7-13.
126. **Haag, H., H. P. Fiedler, J. Meiwes, H. Drechsel, G. Jung, and H. Zahner.** 1994. Isolation and biological characterization of staphyloferrin B, a compound with siderophore activity from staphylococci. *FEMS microbiology letters* **115**:125-130.
127. **Hall, D. R., J. M. Hadden, G. A. Leonard, S. Bailey, M. Neu, M. Winn, and P. F. Lindley.** 2002. The crystal and molecular structures of diferric porcine and rabbit serum transferrins at resolutions of 2.15 and 2.60 Å, respectively. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **58**:70-80.
128. **Hantke, K.** 2003. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends in microbiology* **11**:192-195.
129. **Harrison, P. M., and P. Arosio.** 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et biophysica acta* **1275**:161-203.
130. **Harvie, D. R., and D. J. Ellar.** 2005. A ferric dicitrate uptake system is required for the full virulence of *Bacillus cereus*. *Current microbiology* **50**:246-250.
131. **Heins, S. D., D. S. Manker, D. R. Jimenez, and P. G. Marrone.** 1999. *Bacillus mycoides* strain for controlling corn rootworms. US Patent 5,906,818
132. **Hendriksen, N. B., B. M. Hansen, and J. E. Johansen.** 2006. Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. *Antonie van Leeuwenhoek* **89**:239-249.
133. **Henle, E. S., and S. Linn.** 1997. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry* **272**:19095-19098.
134. **Hoette, T. M., R. J. Abergel, J. Xu, R. K. Strong, and K. N. Raymond.** 2008. The role of electrostatics in siderophore recognition by the immunoprotein Siderocalin. *Journal of the American Chemical Society* **130**:17584-17592.
135. **Honsa, E. S., M. Fabian, A. M. Cardenas, J. S. Olson, and A. W. Maresso.** 2011. The five near-iron transporter (NEAT) domain anthrax hemophore, IsdX2, scavenges heme from hemoglobin and transfers heme to the surface protein IsdC. *J.Biol.Chem.* **286**:33652-33660.
136. **Hotta, K., C. Y. Kim, D. T. Fox, and A. T. Koppisch.** 2010. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains. *Microbiology* **156**:1918-1925.
137. **Hsieh, Y. M., S. J. Sheu, Y. L. Chen, and H. Y. Tsen.** 1999. Enterotoxigenic profiles and polymerase chain reaction detection of *Bacillus cereus* group cells and *B. cereus* strains from foods and food-borne outbreaks. *Journal of applied microbiology* **87**:481-490.
138. http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/50/11/29/PDF/These_DAOU.pdf.

139. **Hurd, A. F., J. Garcia-Lara, Y. Rauter, M. Cartron, R. Mohamed, and S. J. Foster.** 2012. The iron-regulated surface proteins IsdA, IsdB, and IsdH are not required for heme iron utilization in *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters* **329**:93-100.
140. **Ilari, A., S. Stefanini, E. Chiancone, and D. Tsernoglou.** 2000. The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site. *Nature structural biology* **7**:38-43.
141. **Jackson, S. G., R. B. Goodbrand, R. Ahmed, and S. Kasatiya.** 1995. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in applied microbiology* **21**:103-105.
142. **Jeney, V., J. Balla, A. Yachie, Z. Varga, G. M. Vercellotti, J. W. Eaton, and G. Balla.** 2002. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* **100**:879-887.
143. **Jin, B., S. M. Newton, Y. Shao, X. Jiang, A. Charbit, and P. E. Klebba.** 2006. Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **59**:1185-1198.
144. **Jin, W., H. Takagi, B. Pancorbo, and E. C. Theil.** 2001. "Opening" the ferritin pore for iron release by mutation of conserved amino acids at interhelix and loop sites. *Biochemistry* **40**:7525-7532.
145. **Jones, T., R. Spencer, and C. Walsh.** 1978. Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavins and dihydroflavin analogues. *Biochemistry* **17**:4011-4017.
146. **Kadir, F. H., F. K. al-Massad, and G. R. Moore.** 1992. Haem binding to horse spleen ferritin and its effect on the rate of iron release. *The Biochemical journal* **282 (Pt 3)**:867-870.
147. **Kavanagh, K., and E. P. Reeves.** 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS microbiology reviews* **28**:101-112.
148. **Kern, J. W., and O. Schneewind.** 2008. BslA, a pXO1-encoded adhesin of *Bacillus anthracis*. *Mol. Microbiol.* **68**:504-515.
149. **Klichko, V. I., J. Miller, A. Wu, S. G. Popov, and K. Alibek.** 2003. Anaerobic induction of *Bacillus anthracis* hemolytic activity. *Biochemical and biophysical research communications* **303**:855-862.
150. **Kobe, B., and J. Deisenhofer.** 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem.Sci.* **19**:415-421.
151. **Kobe, B., and A. V. Kajava.** 2001. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Current opinion in structural biology* **11**:725-732.
152. **Konetschny-Rapp, S., G. Jung, J. Meiwes, and H. Zahner.** 1990. Staphyloferrin A: a structurally new siderophore from staphylococci. *European journal of biochemistry / FEBS* **191**:65-74.
153. **Koppisch, A. T., C. C. Browder, A. L. Moe, J. T. Shelley, B. A. Kinkel, L. E. Hersman, S. Iyer, and C. E. Ruggiero.** 2005. Petrobactin is the primary siderophore synthesized by *Bacillus anthracis* str. Sterne under conditions of iron starvation. *Biomaterials* **18**:577-585.
154. **Koppisch, A. T., S. Dhungana, K. K. Hill, H. Boukhalfa, H. S. Heine, L. A. Colip, R. B. Romero, Y. Shou, L. O. Ticknor, B. L. Marrone, L. E. Hersman, S. Iyer, and C. E. Ruggiero.** 2008. Petrobactin is produced by both pathogenic and non-pathogenic isolates of the *Bacillus cereus* group of bacteria. *Biomaterials* **21**:581-589.
155. **Kotiranta, A., K. Lounatmaa, and M. Haapasalo.** 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **2**:189-198.
156. **Krishna, K. K., D. A. Jacques, G. Pishchany, T. Caradoc-Davies, T. Spirig, G. R. Malmirchegini, D. B. Langley, C. F. Dickson, J. P. Mackay, R. T. Clubb, E. P. Skaar, J. M. Guss, and D. A. Gell.** 2011. Structural basis for hemoglobin capture by *Staphylococcus aureus* cell-surface protein, IsdH. *J. Biol. Chem.* **286**:38439-38447.

157. **Kuklin, N. A., D. J. Clark, S. Secore, J. Cook, L. D. Cope, T. McNeely, L. Noble, M. J. Brown, J. K. Zorman, X. M. Wang, G. Pancari, H. Fan, K. Isett, B. Burgess, J. Bryan, M. Brownlow, H. George, M. Meinz, M. E. Liddell, R. Kelly, L. Schultz, D. Montgomery, J. Onishi, M. Losada, M. Martin, T. Ebert, C. Y. Tan, T. L. Schofield, E. Nagy, A. Meineke, J. G. Joyce, M. B. Kurtz, M. J. Caulfield, K. U. Jansen, W. McClements, and A. S. Anderson.** 2006. A novel *Staphylococcus aureus* vaccine: iron surface determinant B induces rapid antibody responses in rhesus macaques and specific increased survival in a murine *S. aureus* sepsis model. *Infection and immunity* **74**:2215-2223.
158. **Kupke, T., M. Lechner, G. Kaim, and F. Gotz.** 1989. Improved purification and biochemical properties of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus thuringiensis*. *European journal of biochemistry / FEBS* **185**:151-155.
159. **Kurz, T.** 2008. Can lipofuscin accumulation be prevented? *Rejuvenation research* **11**:441-443.
160. **Lambert, B., H. Hofte, K. Annys, S. Jansens, P. Soetaert, and M. Peferoen.** 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Applied and environmental microbiology* **58**:2536-2542.
161. **Lammerding, A. M., and M. P. Doyle.** 1989. Evaluation of enrichment procedures for recovering *Listeria monocytogenes* from dairy products. *International journal of food microbiology* **9**:249-268.
162. **Lechner, M., T. Kupke, S. Stefanovic, and F. Gotz.** 1989. Molecular characterization and sequence of phosphatidylinositol-specific phospholipase C of *Bacillus thuringiensis*. *Molecular microbiology* **3**:621-626.
163. **Lechner, S., R. Mayr, K. P. Francis, B. M. Pruss, T. Kaplan, E. Wiessner-Gunkel, G. S. Stewart, and S. Scherer.** 1998. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International journal of systematic bacteriology* **48 Pt 4**:1373-1382.
164. **Lecuit, M., H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infection and immunity* **65**:5309-5319.
165. **Lee, J. Y., B. K. Janes, K. D. Passalacqua, B. F. Pflieger, N. H. Bergman, H. Liu, K. Hakansson, R. V. Somu, C. C. Aldrich, S. Cendrowski, P. C. Hanna, and D. H. Sherman.** 2007. Biosynthetic analysis of the petrobactin siderophore pathway from *Bacillus anthracis*. *Journal of bacteriology* **189**:1698-1710.
166. **Lei, B., M. Liu, J. M. Voyich, C. I. Prater, S. V. Kala, F. R. DeLeo, and J. M. Musser.** 2003. Identification and characterization of HtsA, a second heme-binding protein made by *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **71**:5962-5969.
167. **Lei, B., L. M. Smoot, H. M. Menning, J. M. Voyich, S. V. Kala, F. R. DeLeo, S. D. Reid, and J. M. Musser.** 2002. Identification and characterization of a novel heme-associated cell surface protein made by *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity* **70**:4494-4500.
168. **Lereclus, D., H. Agaisse, M. Gominet, S. Salamitou, and V. Sanchis.** 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. *Journal of bacteriology* **178**:2749-2756.
169. **Letoffe, S., J. M. Ghigo, and C. Wandersman.** 1994. Iron acquisition from heme and hemoglobin by a *Serratia marcescens* extracellular protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:9876-9880.
170. **Letoffe, S., V. Redeker, and C. Wandersman.** 1998. Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Molecular microbiology* **28**:1223-1234.

171. **Lewis, L. A., E. Gray, Y. P. Wang, B. A. Roe, and D. W. Dyer.** 1997. Molecular characterization of hpuAB, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. *Molecular microbiology* **23**:737-749.
172. **Li, J. Y., N. Paragas, R. M. Ned, A. Qiu, M. Viltard, T. Leete, I. R. Drexler, X. Chen, S. Sanna-Cherchi, F. Mohammed, D. Williams, C. S. Lin, K. M. Schmidt-Ott, N. C. Andrews, and J. Barasch.** 2009. Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Developmental cell* **16**:35-46.
173. **Li, L., C. J. Fang, J. C. Ryan, E. C. Niemi, J. A. Lebron, P. J. Bjorkman, H. Arase, F. M. Torti, S. V. Torti, M. C. Nakamura, and W. E. Seaman.** 2010. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**:3505-3510.
174. **Lindsay, S., D. Brosnahan, T. J. Lowery, Jr., K. Crawford, and G. D. Watt.** 2003. Kinetic studies of iron deposition in horse spleen ferritin using O₂ as oxidant. *Biochimica et biophysica acta* **1621**:57-66.
175. **Lingnau, A., E. Domann, M. Hudel, M. Bock, T. Nichterlein, J. Wehland, and T. Chakraborty.** 1995. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infection and immunity* **63**:3896-3903.
176. **Liu, M., and B. Lei.** 2005. Heme transfer from streptococcal cell surface protein Shp to HtsA of transporter HtsABC. *Infect.Immun.* **73**:5086-5092.
177. **Liu, M., W. N. Tanaka, H. Zhu, G. Xie, D. M. Dooley, and B. Lei.** 2008. Direct heme transfer from IsdA to IsdC in the iron-regulated surface determinant (Isd) heme acquisition system of *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **283**:6668-6676.
178. **Liu, X., W. Jin, and E. C. Theil.** 2003. Opening protein pores with chaotropes enhances Fe reduction and chelation of Fe from the ferritin biomineral. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:3653-3658.
179. **Liu, X. S., L. D. Patterson, M. J. Miller, and E. C. Theil.** 2007. Peptides selected for the protein nanocage pores change the rate of iron recovery from the ferritin mineral. *The Journal of biological chemistry* **282**:31821-31825.
180. **Locher, K. P., B. Rees, R. Koebnik, A. Mitschler, L. Moulinier, J. P. Rosenbusch, and D. Moras.** 1998. Transmembrane signaling across the ligand-gated FhuA receptor: crystal structures of free and ferrichrome-bound states reveal allosteric changes. *Cell* **95**:771-778.
181. **Lowery, T. J., Jr., J. Bunker, B. Zhang, R. Costen, and G. D. Watt.** 2004. Kinetic studies of iron deposition in horse spleen ferritin using H₂O₂ and O₂ as oxidants. *Biophysical chemistry* **111**:173-181.
182. **Lund, T., M. L. De Buyser, and P. E. Granum.** 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular microbiology* **38**:254-261.
183. **Lund, T., and P. E. Granum.** 1996. Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS microbiology letters* **141**:151-156.
184. **Lund, T., and P. E. Granum.** 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.
185. **Maresso, A. W., T. J. Chapa, and O. Schneewind.** 2006. Surface protein IsdC and Sortase B are required for heme-iron scavenging of *Bacillus anthracis*. *J.Bacteriol.* **188**:8145-8152.
186. **Maresso, A. W., G. Garufi, and O. Schneewind.** 2008. *Bacillus anthracis* secretes proteins that mediate heme acquisition from hemoglobin. *PLoS.Pathog.* **4**:e1000132.

187. **Marlovits, T. C., W. Haase, C. Herrmann, S. G. Aller, and V. M. Unger.** 2002. The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:16243-16248.
188. **Marraffini, L. A., A. C. Dedent, and O. Schneewind.** 2006. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **70**:192-221.
189. **Martsev, S. P., A. P. Vlasov, and P. Arosio.** 1998. Distinct stability of recombinant L and H subunits of human ferritin: calorimetric and ANS binding studies. *Protein Eng* **11**:377-381.
190. **May, J. J., T. M. Wendrich, and M. A. Marahiel.** 2001. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *The Journal of biological chemistry* **276**:7209-7217.
191. **Mazmanian, S. K., E. P. Skaar, A. H. Gaspar, M. Humayun, P. Gornicki, J. Jelenska, A. Joachmiak, D. M. Missiakas, and O. Schneewind.** 2003. Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* **299**:906-909.
192. **Mazmanian, S. K., H. Ton-That, K. Su, and O. Schneewind.** 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.
193. **McKillip, J. L.** 2000. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**:393-399.
194. **Meiwes, J., H. P. Fiedler, H. Haag, H. Zahner, S. Konetschny-Rapp, and G. Jung.** 1990. Isolation and characterization of staphyloferrin A, a compound with siderophore activity from *Staphylococcus hyicus* DSM 20459. *FEMS microbiology letters* **55**:201-205.
195. **Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R. M. Mege, and P. Cossart.** 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**:923-932.
196. **Mesnage, S., T. Fontaine, T. Mignot, M. Delepierre, M. Mock, and A. Fouet.** 2000. Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *The EMBO journal* **19**:4473-4484.
197. **Mesnage, S., E. Tosi-Couture, and A. Fouet.** 1999. Production and cell surface anchoring of functional fusions between the SLH motifs of the *Bacillus anthracis* S-layer proteins and the *Bacillus subtilis* levansucrase. *Molecular microbiology* **31**:927-936.
198. **Mesnage, S., E. Tosi-Couture, M. Mock, and A. Fouet.** 1999. The S-layer homology domain as a means for anchoring heterologous proteins on the cell surface of *Bacillus anthracis*. *Journal of applied microbiology* **87**:256-260.
199. **Mock, M., and A. Fouet.** 2001. Anthrax. *Annual review of microbiology* **55**:647-671.
200. **Moenne-Loccoz, P., C. Krebs, K. Herlihy, D. E. Edmondson, E. C. Theil, B. H. Huynh, and T. M. Loehr.** 1999. The ferroxidase reaction of ferritin reveals a diferric μ -1,2 bridging peroxide intermediate in common with other O₂-activating non-heme diiron proteins. *Biochemistry* **38**:5290-5295.
201. **Muryoi, N., M. T. Tiedemann, M. Pluym, J. Cheung, D. E. Heinrichs, and M. J. Stillman.** 2008. Demonstration of the iron-regulated surface determinant (Isd) heme transfer pathway in *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **283**:28125-28136.
202. **Nakamura, L. K.** 1998. *Bacillus pseudomycoloides* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* **48 Pt 3**:1031-1035.
203. **Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Molecular microbiology* **14**:115-121.
204. **Neilands, J. B.** 1981. Microbial iron compounds. *Annual review of biochemistry* **50**:715-731.

205. **Newton, S. M., P. E. Klebba, C. Raynaud, Y. Shao, X. Jiang, I. Dubail, C. Archer, C. Frehel, and A. Charbit.** 2005. The *svpA-srtB* locus of *Listeria monocytogenes*: fur-mediated iron regulation and effect on virulence. *Mol.Microbiol.* **55**:927-940.
206. **Nielsen, M. J., H. J. Moller, and S. K. Moestrup.** 2010. Hemoglobin and heme scavenger receptors. *Antioxidants & redox signaling* **12**:261-273.
207. **Nygaard, T. K., G. C. Blouin, M. Liu, M. Fukumura, J. S. Olson, M. Fabian, D. M. Dooley, and B. Lei.** 2006. The mechanism of direct heme transfer from the streptococcal cell surface protein Shp to HtsA of the HtsABC transporter. *J.Biol.Chem.* **281**:20761-20771.
208. **Ouattara, M., E. B. Cunha, X. Li, Y. S. Huang, D. Dixon, and Z. Eichenbaum.** 2010. Shr of group A streptococcus is a new type of composite NEAT protein involved in sequestering haem from methaemoglobin. *Molecular microbiology* **78**:739-756.
209. **Oves-Costales, D., N. Kadi, M. J. Fogg, L. Song, K. S. Wilson, and G. L. Challis.** 2007. Enzymatic logic of anthrax stealth siderophore biosynthesis: AsbA catalyzes ATP-dependent condensation of citric acid and spermidine. *Journal of the American Chemical Society* **129**:8416-8417.
210. **Oves-Costales, D., N. Kadi, M. J. Fogg, L. Song, K. S. Wilson, and G. L. Challis.** 2008. Petrobactin biosynthesis: AsbB catalyzes condensation of spermidine with N8-citryl-spermidine and its N1-(3,4-dihydroxybenzoyl) derivative. *Chem Commun (Camb)*:4034-4036.
211. **Park, R. Y., M. H. Choi, H. Y. Sun, and S. H. Shin.** 2005. Production of catechol-siderophore and utilization of transferrin-bound iron in *Bacillus cereus*. *Biological & pharmaceutical bulletin* **28**:1132-1135.
212. **Pawelek, P. D., N. Croteau, C. Ng-Thow-Hing, C. M. Khursigara, N. Moiseeva, M. Allaire, and J. W. Coulton.** 2006. Structure of TonB in complex with FhuA, *E. coli* outer membrane receptor. *Science* **312**:1399-1402.
213. **Perani, M., A. H. Bishop, and A. Vaid.** 1998. Prevalence of beta-exotoxin, diarrhoeal toxin and specific delta-endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS microbiology letters* **160**:55-60.
214. **Pereira, A. S., W. Small, C. Krebs, P. Tavares, D. E. Edmondson, E. C. Theil, and B. H. Huynh.** 1998. Direct spectroscopic and kinetic evidence for the involvement of a peroxodiferric intermediate during the ferroxidase reaction in fast ferritin mineralization. *Biochemistry* **37**:9871-9876.
215. **Pfleger, B. F., Y. Kim, T. D. Nusca, N. Maltseva, J. Y. Lee, C. M. Rath, J. B. Scaglione, B. K. Janes, E. C. Anderson, N. H. Bergman, P. C. Hanna, A. Joachimiak, and D. H. Sherman.** 2008. Structural and functional analysis of AsbF: origin of the stealth 3,4-dihydroxybenzoic acid subunit for petrobactin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**:17133-17138.
216. **Pilpa, R. M., E. A. Fadeev, V. A. Villareal, M. L. Wong, M. Phillips, and R. T. Clubb.** 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.
217. **Pilpa, R. M., S. A. Robson, V. A. Villareal, M. L. Wong, M. Phillips, and R. T. Clubb.** 2009. Functionally distinct NEAT (NEAr Transporter) domains within the *Staphylococcus aureus* IsdH/HarA protein extract heme from methemoglobin. *J.Biol.Chem.* **284**:1166-1176.
218. **Pirttijarvi, T. S., M. A. Andersson, A. C. Scoging, and M. S. Salkinoja-Salonen.** 1999. Evaluation of methods for recognising strains of the *Bacillus cereus* group with food poisoning potential among industrial and environmental contaminants. *Systematic and applied microbiology* **22**:133-144.
219. **Pishchany, G., S. E. Dickey, and E. P. Skaar.** 2009. Subcellular localization of the *Staphylococcus aureus* heme iron transport components IsdA and IsdB. *Infect.Immun.* **77**:2624-2634.

220. **Postle, K.** 2007. TonB system, in vivo assays and characterization. *Methods in enzymology* **422**:245-269.
221. **Pruss, B. M., R. Dietrich, B. Nibler, E. Martlbauer, and S. Scherer.** 1999. The hemolytic enterotoxin HBL is broadly distributed among species of the *Bacillus cereus* group. *Applied and environmental microbiology* **65**:5436-5442.
222. **Ramarao, N., and D. Lereclus.** 2005. The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cellular microbiology* **7**:1357-1364.
223. **Ratledge, C., and L. G. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual review of microbiology* **54**:881-941.
224. **Reniere, M. L., and E. P. Skaar.** 2008. *Staphylococcus aureus* haem oxygenases are differentially regulated by iron and haem. *Molecular microbiology* **69**:1304-1315.
225. **Richards, T. D., K. R. Pitts, and G. D. Watt.** 1996. A kinetic study of iron release from *Azotobacter vinelandii* bacterial ferritin. *Journal of inorganic biochemistry* **61**:1-13.
226. **Rossi, M. S., J. D. Fetherston, S. Letoffe, E. Carniel, R. D. Perry, and J. M. Ghigo.** 2001. Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*. *Infection and immunity* **69**:6707-6717.
227. **Ryter, S. W., and R. M. Tyrrell.** 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free radical biology & medicine* **28**:289-309.
228. **Salamitou, S., F. Ramisse, M. Brehelin, D. Bourguet, N. Gilois, M. Gominet, E. Hernandez, and D. Lereclus.** 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.
229. **Sanchez, P., N. Galvez, E. Colacio, E. Minones, and J. M. Dominguez-Vera.** 2005. Catechol releases iron(III) from ferritin by direct chelation without iron(II) production. *Dalton Trans*:811-813.
230. **Santambrogio, P., and W. H. Massover.** 1989. Rabbit serum alpha-2-macroglobulin binds to liver ferritin: association causes a heterogeneity of ferritin molecules. *British journal of haematology* **71**:281-290.
231. **Sato, N., S. Ikeda, T. Mikami, and T. Matsumoto.** 1999. *Bacillus cereus* dissociates hemoglobin and uses released heme as an iron source. *Biological & pharmaceutical bulletin* **22**:1118-1121.
232. **Sato, N., H. Kurotaki, S. Ikeda, R. Daio, N. Nishinome, T. Mikami, and T. Matsumoto.** 1999. Lactoferrin inhibits *Bacillus cereus* growth and heme analogs recover its growth. *Biological & pharmaceutical bulletin* **22**:197-199.
233. **Schaffer, A. C., and J. C. Lee.** 2009. Staphylococcal vaccines and immunotherapies. *Infectious disease clinics of North America* **23**:153-171.
234. **Schmitt, M. P.** 1999. Identification of a two-component signal transduction system from *Corynebacterium diphtheriae* that activates gene expression in response to the presence of heme and hemoglobin. *Journal of bacteriology* **181**:5330-5340.
235. **Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler, and D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR **62**:775-806.
236. **Schryvers, A. B., R. Bonnah, R. H. Yu, H. Wong, and M. Retzer.** 1998. Bacterial lactoferrin receptors. *Advances in experimental medicine and biology* **443**:123-133.
237. **Schubert, W. D., C. Urbanke, T. Ziehm, V. Beier, M. P. Machner, E. Domann, J. Wehland, T. Chakraborty, and D. W. Heinz.** 2002. Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell* **111**:825-836.
238. **Scudiero, R., F. Trinchella, and E. Parisi.** 2008. Iron metabolism genes in Antarctic notothenioids: A review. *Marine genomics* **1**:79-85.

239. **Sebulsky, M. T., and D. E. Heinrichs.** 2001. Identification and characterization of fhuD1 and fhuD2, two genes involved in iron-hydroxamate uptake in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* **183**:4994-5000.
240. **Sebulsky, M. T., D. Hohnstein, M. D. Hunter, and D. E. Heinrichs.** 2000. Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology* **182**:4394-4400.
241. **Sebulsky, M. T., B. H. Shilton, C. D. Speziali, and D. E. Heinrichs.** 2003. The role of FhuD2 in iron(III)-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. Demonstration that FhuD2 binds iron(III)-hydroxamates but with minimal conformational change and implication of mutations on transport. *The Journal of biological chemistry* **278**:49890-49900.
242. **Sebulsky, M. T., C. D. Speziali, B. H. Shilton, D. R. Edgell, and D. E. Heinrichs.** 2004. FhuD1, a ferric hydroxamate-binding lipoprotein in *Staphylococcus aureus*: a case of gene duplication and lateral transfer. *The Journal of biological chemistry* **279**:53152-53159.
243. **Seki, T., T. Kunichika, K. Watanabe, and K. Orino.** 2008. Apolipoprotein B binds ferritin by hemin-mediated binding: evidence of direct binding of apolipoprotein B and ferritin to hemin. *Biometals* **21**:61-69.
244. **Sergeev, N., M. Distler, M. Vargas, V. Chizhikov, K. E. Herold, and A. Rasooly.** 2006. Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. *Journal of microbiological methods* **65**:488-502.
245. **Shannon, J. G., C. L. Ross, T. M. Koehler, and R. F. Rest.** 2003. Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infection and immunity* **71**:3183-3189.
246. **Sharp, K. H., S. Schneider, A. Cockayne, and M. Paoli.** 2007. Crystal structure of the heme-IsdC complex, the central conduit of the Isd iron/heme uptake system in *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **282**:10625-10631.
247. **Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton.** 2000. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**:501-510.
248. **Simon, N., V. Coulanges, P. Andre, and D. J. Vidon.** 1995. Utilization of exogenous siderophores and natural catechols by *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology* **61**:1643-1645.
249. **Sinev, M. A., I. Budarina Zh, I. V. Gavrilenko, A. Tomashevskii, and N. P. Kuz'min.** 1993. [Evidence of the existence of hemolysin II from *Bacillus cereus*: cloning the genetic determinant of hemolysin II]. *Molekuliarnaia biologii* **27**:1218-1229.
250. **Sineva, E., A. Shadrin, E. A. Rodikova, Z. I. Andreeva-Kovalevskaya, A. S. Protsenko, S. G. Mayorov, D. Y. Galaktionova, E. Magelky, and A. S. Solonin.** 2012. Iron regulates expression of *Bacillus cereus* hemolysin II via global regulator Fur. *Journal of bacteriology* **194**:3327-3335.
251. **Skaar, E. P., A. H. Gaspar, and O. Schneewind.** 2006. *Bacillus anthracis* IsdG, a heme-degrading monooxygenase. *J.Bacteriol.* **188**:1071-1080.
252. **Skaar, E. P., A. H. Gaspar, and O. Schneewind.** 2004. IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **279**:436-443.
253. **Skaar, E. P., M. Humayun, T. Bae, K. L. Debord, and O. Schneewind.** 2004. Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* **305**:1626-1628.
254. **Slamti, L., and D. Lereclus.** 2002. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *The EMBO journal* **21**:4550-4559.
255. **Sonenshein, A. L.** 2005. CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Current opinion in microbiology* **8**:203-207.
256. **Speziali, C. D., S. E. Dale, J. A. Henderson, E. D. Vines, and D. E. Heinrichs.** 2006. Requirement of *Staphylococcus aureus* ATP-binding cassette-ATPase FhuC for iron-restricted growth and

- evidence that it functions with more than one iron transporter. *Journal of bacteriology* **188**:2048-2055.
257. **Stauff, D. L., D. Bagaley, V. J. Torres, R. Joyce, K. L. Anderson, L. Kuechenmeister, P. M. Dunman, and E. P. Skaar.** 2008. Staphylococcus aureus HrtA is an ATPase required for protection against heme toxicity and prevention of a transcriptional heme stress response. *Journal of bacteriology* **190**:3588-3596.
 258. **Stauff, D. L., and E. P. Skaar.** 2009. The heme sensor system of Staphylococcus aureus. *Contributions to microbiology* **16**:120-135.
 259. **Stauff, D. L., V. J. Torres, and E. P. Skaar.** 2007. Signaling and DNA-binding activities of the Staphylococcus aureus HssR-HssS two-component system required for heme sensing. *The Journal of biological chemistry* **282**:26111-26121.
 260. **Stenfors Arnesen, L., P. E. Granum, C. Buisson, J. Bohlin, and C. Nielsen-LeRoux.** 2011. Using an insect model to assess correlation between temperature and virulence in *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters* **317**:196-202.
 261. **Stenfors, L. P., R. Mayr, S. Scherer, and P. E. Granum.** 2002. Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains. *FEMS microbiology letters* **215**:47-51.
 262. **Stojiljkovic, I., M. Cobeljic, and K. Hantke.** 1993. *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS microbiology letters* **108**:111-115.
 263. **Stojiljkovic, I., and D. Perkins-Balding.** 2002. Processing of heme and heme-containing proteins by bacteria. *DNA and cell biology* **21**:281-295.
 264. **Stokes, R. H., J. S. Oakhill, C. L. Joannou, A. R. Gorringer, and R. W. Evans.** 2005. Meningococcal transferrin-binding proteins A and B show cooperation in their binding kinetics for human transferrin. *Infection and immunity* **73**:944-952.
 265. **Stranger-Jones, Y. K., T. Bae, and O. Schneewind.** 2006. Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:16942-16947.
 266. **Takahashi, T., and S. Kuyucak.** 2003. Functional properties of threefold and fourfold channels in ferritin deduced from electrostatic calculations. *Biophysical journal* **84**:2256-2263.
 267. **Tarlovsky, Y., M. Fabian, E. Solomaha, E. Honsa, J. S. Olson, and A. W. Maresso.** 2010. A *Bacillus anthracis* S-layer homology protein that binds heme and mediates heme delivery to IsdC. *J.Bacteriol.* **192**:3503-3511.
 268. **Taylor, J. M., and D. E. Heinrichs.** 2002. Transferrin binding in *Staphylococcus aureus*: involvement of a cell wall-anchored protein. *Mol.Microbiol.* **43**:1603-1614.
 269. **Theil, E. C.** 1990. The ferritin family of iron storage proteins. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **63**:421-449.
 270. **Theil, E. C., X. S. Liu, and T. Tosha.** 2008. Gated Pores in the Ferritin Protein Nanocage. *Inorganica chimica acta* **361**:868-874.
 271. **Thomsen, L. E., C. T. Gottlieb, S. Gottschalk, T. T. Wodskou, H. H. Kristensen, L. Gram, and H. Ingmer.** 2010. The heme sensing response regulator HssR in *Staphylococcus aureus* but not the homologous RR23 in *Listeria monocytogenes* modulates susceptibility to the antimicrobial peptide plectasin. *BMC microbiology* **10**:307.
 272. **Torres, V. J., G. Pishchany, M. Humayun, O. Schneewind, and E. P. Skaar.** 2006. *Staphylococcus aureus* IsdB is a hemoglobin receptor required for heme iron utilization. *J.Bacteriol.* **188**:8421-8429.
 273. **Tran, S. L., E. Guillemet, M. Ngo-Camus, C. Clybouw, A. Puhar, A. Moris, M. Gohar, D. Lereclus, and N. Ramarao.** 2011. Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cellular microbiology* **13**:92-108.

274. **Treffry, A., Z. Zhao, M. A. Quail, J. R. Guest, and P. M. Harrison.** 1997. Dinuclear center of ferritin: studies of iron binding and oxidation show differences in the two iron sites. *Biochemistry* **36**:432-441.
275. **Truty, J., R. Malpe, and M. C. Linder.** 2001. Iron prevents ferritin turnover in hepatic cells. *The Journal of biological chemistry* **276**:48775-48780.
276. **Turlin, E., M. Debarbouille, K. Augustyniak, A. M. Gilles, and C. Wandersman.** 2013. Staphylococcus aureus FepA and FepB Proteins Drive Heme Iron Utilization in Escherichia coli. *PLoS one* **8**:e56529.
277. **Turnbull, P. C.** 1999. Definitive identification of Bacillus anthracis--a review. *Journal of applied microbiology* **87**:237-240.
278. **van Schaik, W., A. Chateau, M. A. Dillies, J. Y. Coppee, A. L. Sonenshein, and A. Fouet.** 2009. The global regulator CodY regulates toxin gene expression in Bacillus anthracis and is required for full virulence. *Infection and immunity* **77**:4437-4445.
279. **Vercellotti, G. M., G. Balla, J. Balla, K. Nath, J. W. Eaton, and H. S. Jacob.** 1994. Heme and the vasculature: an oxidative hazard that induces antioxidant defenses in the endothelium. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology* **22**:207-213.
280. **Vermeiren, C. L., M. Pluym, J. Mack, D. E. Heinrichs, and M. J. Stillman.** 2006. Characterization of the heme binding properties of Staphylococcus aureus IsdA. *Biochemistry* **45**:12867-12875.
281. **Villareal, V. A., R. M. Pilpa, S. A. Robson, E. A. Fadeev, and R. T. Clubb.** 2008. The IsdC protein from Staphylococcus aureus uses a flexible binding pocket to capture heme. *J.Biol.Chem.* **283**:31591-31600.
282. **Villareal, V. A., T. Spirig, S. A. Robson, M. Liu, B. Lei, and R. T. Clubb.** 2011. Transient weak protein-protein complexes transfer heme across the cell wall of Staphylococcus aureus. *J.Am.Chem.Soc.* **133**:14176-14179.
283. **Wandersman, C., and P. Delepelaire.** 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu.Rev.Microbiol.* **58**:611-647.
284. **Wandersman, C., and I. Stojiljkovic.** 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Current opinion in microbiology* **3**:215-220.
285. **Wang, A., Y. Zeng, H. Han, S. Weeratunga, B. N. Morgan, P. Moenne-Loccoz, E. Schonbrunn, and M. Rivera.** 2007. Biochemical and structural characterization of Pseudomonas aeruginosa Bfd and FPR: ferredoxin NADP+ reductase and not ferredoxin is the redox partner of heme oxygenase under iron-starvation conditions. *Biochemistry* **46**:12198-12211.
286. **Wardeska, J. G., B. Viglione, and N. D. Chasteen.** 1986. Metal ion complexes of apoferritin. Evidence for initial binding in the hydrophilic channels. *The Journal of biological chemistry* **261**:6677-6683.
287. **Watanabe, M., Y. Tanaka, A. Suenaga, M. Kuroda, M. Yao, N. Watanabe, F. Arisaka, T. Ohta, I. Tanaka, and K. Tsumoto.** 2008. Structural basis for multimeric heme complexation through a specific protein-heme interaction: the case of the third neat domain of IsdH from Staphylococcus aureus. *J.Biol.Chem.* **283**:28649-28659.
288. **Watt, G. D., D. Jacobs, and R. B. Frankel.** 1988. Redox reactivity of bacterial and mammalian ferritin: is reductant entry into the ferritin interior a necessary step for iron release? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**:7457-7461.
289. **Watt, R. K.** 2011. The many faces of the octahedral ferritin protein. *Biometals* **24**:489-500.
290. **Watt, R. K., R. J. Hilton, and D. M. Graff.** 2010. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochim.Biophys.Acta* **1800**:745-759.
291. **Watt, R. K., R. J. Hilton, and D. M. Graff.** 2010. Oxido-reduction is not the only mechanism allowing ions to traverse the ferritin protein shell. *Biochimica et biophysica acta* **1800**:745-759.

292. **Weeratunga, S. K., C. E. Gee, S. Lovell, Y. Zeng, C. L. Woodin, and M. Rivera.** 2009. Binding of *Pseudomonas aeruginosa* apobacterioferritin-associated ferredoxin to bacterioferritin B promotes heme mediated electron delivery and mobilization of core mineral iron. *Biochemistry* **48**:7420-7431.
293. **Whalon, M. E., and B. A. Wingerd.** 2003. Bt: mode of action and use. *Archives of insect biochemistry and physiology* **54**:200-211.
294. **Wilson, M. K., R. J. Abergel, J. E. Arceneaux, K. N. Raymond, and B. R. Byers.** 2010. Temporal production of the two *Bacillus anthracis* siderophores, petrobactin and bacillibactin. *Biometals* **23**:129-134.
295. **Wilson, M. K., R. J. Abergel, K. N. Raymond, J. E. Arceneaux, and B. R. Byers.** 2006. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical and biophysical research communications* **348**:320-325.
296. **Wu, R., E. P. Skaar, R. Zhang, G. Joachimiak, P. Gornicki, O. Schneewind, and A. Joachimiak.** 2005. *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes with structural similarity to monooxygenases. *The Journal of biological chemistry* **280**:2840-2846.
297. **Xiao, Q., X. Jiang, K. J. Moore, Y. Shao, H. Pi, I. Dubail, A. Charbit, S. M. Newton, and P. E. Klebba.** 2011. Sortase independent and dependent systems for acquisition of haem and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology* **80**:1581-1597.
298. **Yamaguchi, A., T. Udagawa, and T. Sawai.** 1990. Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. *The Journal of biological chemistry* **265**:4809-4813.
299. **Yang, I. C., D. Y. Shih, T. P. Huang, Y. P. Huang, J. Y. Wang, and T. M. Pan.** 2005. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *Journal of food protection* **68**:2123-2130.
300. **Yang, X., N. E. Le Brun, A. J. Thomson, G. R. Moore, and N. D. Chasteen.** 2000. The iron oxidation and hydrolysis chemistry of *Escherichia coli* bacterioferritin. *Biochemistry* **39**:4915-4923.
301. **Zawadzka, A. M., R. J. Abergel, R. Nichiporuk, U. N. Andersen, and K. N. Raymond.** 2009. Siderophore-mediated iron acquisition systems in *Bacillus cereus*: Identification of receptors for anthrax virulence-associated petrobactin. *Biochemistry* **48**:3645-3657.
302. **Zawadzka, A. M., R. J. Abergel, R. Nichiporuk, U. N. Andersen, and K. N. Raymond.** 2009. Siderophore-mediated iron acquisition systems in *Bacillus cereus*: Identification of receptors for anthrax virulence-associated petrobactin. *Biochemistry* **48**:3645-3657.
303. **Zawadzka, A. M., Y. Kim, N. Maltseva, R. Nichiporuk, Y. Fan, A. Joachimiak, and K. N. Raymond.** 2009. Characterization of a *Bacillus subtilis* transporter for petrobactin, an anthrax stealth siderophore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:21854-21859.
304. **Zhang, B., and G. D. Watt.** 2007. Anaerobic iron deposition into horse spleen, recombinant human heavy and light and bacteria ferritins by large oxidants. *Journal of inorganic biochemistry* **101**:1676-1685.
305. **Zhang, G., S. A. Amin, F. C. Kupper, P. D. Holt, C. J. Carrano, and A. Butler.** 2009. Ferric stability constants of representative marine siderophores: marinobactins, aquachelins, and petrobactin. *Inorganic chemistry* **48**:11466-11473.
306. **Zhao, G., F. Bou-Abdallah, P. Arosio, S. Levi, C. Janus-Chandler, and N. D. Chasteen.** 2003. Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide. *Biochemistry* **42**:3142-3150.
307. **Zhao, G., M. Su, and N. D. Chasteen.** 2005. μ -1,2-peroxo diferric complex formation in horse spleen ferritin. A mixed H/L-subunit heteropolymer. *Journal of molecular biology* **352**:467-477.

308. **Zhu, H., M. Liu, and B. Lei.** 2008. The surface protein Shr of *Streptococcus pyogenes* binds heme and transfers it to the streptococcal heme-binding protein Shp. *BMC.Microbiol.* **8**:15.
309. **Zhu, H., G. Xie, M. Liu, J. S. Olson, M. Fabian, D. M. Dooley, and B. Lei.** 2008. Pathway for heme uptake from human methemoglobin by the iron-regulated surface determinants system of *Staphylococcus aureus*. *J.Biol.Chem.* **283**:18450-18460.
310. **Zunszain, P. A., J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsuchida, and S. Curry.** 2003. Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with heme and fatty acid. *BMC structural biology* **3**:6.

Annexe

Annexe1 : Tableau des amorces utilisées dans la partie résultat complémentaire

Nom	Séquences ^a des nucleotides (3'-5')	Site de restriction
F- Aisd4548	<u>CGGAATTCTTCCGGTTTTTCTACTTCTG</u>	EcoRI
R-Aisd4548	CGTAAAGTGAAATTGAGTAAAGTCGTTCCATTGAACAGG	
F-Bisd4548	CCTGTTCAATGGAACGACTTACTCAATTTCACTTTACG	
R-Bisd4548	<u>CGCGGATCCGGGAAGAGGTGAAAGAAGAG</u>	BamHI
F- Aisd4547	<u>CGGAATTCTACAACCTCATCAGGCATACC</u>	EcoRI
R-A isd4547	ATCAACATTACAACCACGATACAGCACAACTTGG	
F-B isd4547	CCAAGTTGTGCTGTATCGTGGTTGTAATGTTGAT	
R-B isd4547	<u>CGCGGATCCGATAATGGCGTAGCTGCTAC</u>	BamHI

a : les sites de restrictions sont soulignés

Annexe 2 : Alignement du domaine NEAT d'IlsA avec la plupart des domaines NEAT trouvés chez les bactéries à Gram-positif

```

IlsA-NEAT_Bc_      TPALAALKVEANQSVAAASDRTYDTEIKIYKDQKDEPSMVSQYIKDP-
KVTIAAG--KKI
HaL-NEAT_Ba_      -----AVQSPKKHVFDAAVIKAYKDNSDEESYATVYIKDP-
KLTIEENG--KRI
BC4549-NEAT_Bc_   -----
LADGTYDINYVIQKAENDSASMANDYFEKPAKLIVKNG--EMR
IsdC-NEAT_Ba_     -----
LADGTYDINYVIQKAENDSASMANDYFEKPAKLIVKNG--EMR
BC4548-NEAT_Bc_   -----
LADGKYNIAFTVWKGDKDESSRMNSYFESPATLTVKNG--KQY
IsdX1-NEAT_Ba_    -----
LADGKYNIAFTVWKGDKDESSRMNRYFESPATLTVKNG--KQY
BC4547-N1_Bc_     -----
LADGEYSIGFKVLKDTSD EESMMNQYSVSPGTLKVKDG--KKK
IsdX2-N1_Ba_      -----
LADGEYSIGFKVLKDTSD EESMMNQYSVSPGTLKVKDG--KKK
BC4547-N3_Bc_     -----
IKDGEYSINFALKDQTD EISMNTYTKSPGVLKVKDG--KKY
IsdX2-N3_Ba_      -----
IKDGEYSINFALKDQTD EISMNTYTKSPGLLKVKDG--KKY
BC4547-N4_Bc_     -----
LKDGEYRIGFKVLKQTD EISMNTYTKSPGVLKVKDG--KKY
IsdX2-N4_Ba_      -----
DNKTIDPNALKDGEYSIGFKVLKDKTEEISMNTYTKNPGVLKVKDG--KKY
BC4547-N5_Bc_     -----
LVDGQYDITFKVLKDKTDEISKMNDYVVNPAKLIVKDG--KKY
IsdX2-N5_Ba_      -----
LKDGEYDIAFKVLKDKTEEISMNQYVVSPARLTVKDG--KKY

```


BC4547-N2_Bc_ -----
 ITDGAYSIPFKVLKQDTDEESKMNSYMVNPGVLKVENG--KKK
 IsdX2-N2_Ba_ -----
 IKDGEYSIPFKVLKNQDTDEESKMNTYMVNPGVLKIENG--KKK
 IsdB-N2Sa -----
 KMTDLQDTKYVVYESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNG--KKY
 IsdH-N3Sa -----
 QLTDLQEAHFVVFESEENSESVMDGFVEHPFYTATLNG--QKY
 IsdB-N1Sa -----
 SAPNSRPIDFEMKKENGEQQFYHYASSVKPARVIFTDS--KPE
 IsdH-N2Sa -----
 TADNWRPIDFQMKNDKGERQFYHYASTVEPATVIFTKT--GPV
 IsdH-N1Sa -----
 DIGPREQVNFQLLDKNNETQYYHFFSIKDPADVYYTKK--KAE
 IsdC-NSa -----
 NAADSGTLNVEVYKYNTNDTSIANDYFNKPAKYIKKNG--KLY
 IsdA-NSa -----
 SQATSQPINFQVQKDGSSSEKSHMDDYMQHPGKVIKQNN--KYY
 Spy49-1405cN1 -----
 LTEGTYTLNFKANKENSEESSMLQGAFDKRAKLVVKADGTMEI
 SpyN2 -----
 LRDGIIYLNASMLKTDLASESMSNKAINHRVTLVVKKGVSYLE

IIsA-NEAT_Bc_ -----
 VVTVMQDSDYFQYLRIEDKNQPGVFHDVKVLSSEDKRKNGTQVQFEIGEFKKNH-----
 HaL-NEAT_Ba_ -----
 ITATLKDSDFFDYLVKVEDSKEPGVFHDVKVLSSEDKRKHGTKVIQFEVGEKGRYN-----
 BC4549-NEAT_Bc_ VQVPMNHSAWITFKAPEN---GNFVDAKVVNKDESAD-
 KRTVEFKVDDLSKPAA-----
 IsdC-NEAT_Ba_ VQVPMNHSAWITFKAPEN---GNFVDAKVVSKDESAD-
 KRTVEFKVDDLSKPAA-----
 BC4548-NEAT_Bc_ VSFVKKDSASIKSFQVEKD---GQFVETTVLSENKKDN-
 TRVVEFEVADLSKKNL-----
 IsdX1-NEAT_Ba_ VSFVKKDSTSISKFQVEKD---GQFVETTVLSENKKDN-
 TRVVEFEVADLSKKNL-----
 BC4547-N1_Bc_ VSFTLTNSSWITKFETEK---GKLVATNVI SEDKEK-
 TRVVEFDVEDVEKVLN-----
 IsdX2-N1_Ba_ VSFTLTNSSWITKFETEK---GKLVATNVI SEDKEK-
 TRVVEFDVEDVEKVLN-----
 BC4547-N3_Bc_ VSFTLTNSSWITKFEFK---GSFVDAHVI SEDKAD-
 TRVVEVEVSDLSKKNL-----
 IsdX2-N3_Ba_ VSFTLTNSSWITKFEFK---GSFVDANVI SEDKAD-
 TRVVEVAVDLSKKNL-----
 BC4547-N4_Bc_ VSFTLTNSTWITKFEFK---GSFVNAKVLSENKEQN-
 TRVVEVEVNDLSKKNL-----
 IsdX2-N4_Ba_ VSFTLTNSSWITKFEFK---GAFVDAKVLGTNKEQD-
 TRVVEVEVADLSKKNL-----
 BC4547-N5_Bc_ IEMTLKNSAWITKFQTE---ELFADAKVVSEDKNVN-
 TRVVQFEVEDLFKKNL-----
 IsdX2-N5_Ba_ IAMTLKNSAWITKFQTE---GGFADAKVVSEDKAAN-
 TRVVEFEANDLFAKKNL-----
 BC4547-N2_Bc_ AIVTLKSSSLIKNFQTEKD---GAFVDAKVVSEDKEK-
 TRVVEFEVNDLSKKNL-----
 IsdX2-N2_Ba_ AIVTLKSSSLIKNFQTEKD---GAFVDAKVVSENKEK-
 TRVVEFEVADLSKKNL-----

```

IsdB-N2Sa          MVMETTNDDYWKDFMVEGQ-----RVRTISKDAKNN-
TRTIIFPYVEGKTLYD-----
IsdH-N3Sa          VVMKTKDSDSYWKDLIVEGK-----RVTTVSKDPKNN-
SRTLIFPYIPDKAVYN-----
IsdB-N1Sa          IELGLQSGQFWRKFEVYEG---DKKLPIKLVSYDTV-
KDYAYIRFSVSNGTKAVK-----
IsdH-N2Sa          IELGLKTASTWKKFEVYEG---DKKLPVELVSYDSD-
KDYAYIRFPVSNNGTRDVK-----
IsdH-N1Sa          VELDINTASTWKKFEVYEN---
NQLKPVRLVSYSPVPEDHAYIRFPVSDGTQELK-----
IsdC-NSa           VQITVNHSHWITGMSIEGH-----KENIISKNTAKD-
ERTSEFEVSKLNGKIDGKI--
IsdA-NSa           FQTVLNNASFWKEYKFYNAN--NQELATTVVNDNKKAD-
TRTINVAVEPGYKSLT-----
Spy49-1405cN1
SMLNTALGQFLIDFSIESKGTYPAAVRKQVGQKDINGSYIRSEFTMPIDDLDKLHKG---
SpyN2
VEFRGIKVGKMLGYLGELSYFVDGYQRDLGKPVGRTKKAENVSYFTDVTGLPLADRYGK

```

```

IlsA-NEAT_Bc_      ----MQMHILIPAIGYDHKYQVQFEIKDPTVG-----
HaL-NEAT_Ba_       ----MQMHILIPTLGDKFEFKIQFEVNMRT-----
BC4549-NEAT_Bc_    ----VKIHVVVPSANVDHHTYIRFAFDANVKAVG-----
IsdC-NEAT_Ba_      ----VKIHVVVPSANVDHHTYIRFAFDANVKAVGGDNGV-----
BC4548-NEAT_Bc_    ----GKVKINIPIINYNASDIRFVFDGNSIK-----
IsdX1-NEAT_Ba_     ----GKVKINIPIINYNASDIRFVFDGNSIK-----
BC4547-N1_Bc_      ----AKVKVDIDFLNYHHEVDVRIAFDQNSI-----
IsdX2-N1_Ba_       ----AKVKVDIDFLNYHHEVDVRIAFDQNSITPI-----
BC4547-N3_Bc_      ----AKVKVIDIDSMNYHHFYDIQFAFDKGSIKPL-----
IsdX2-N3_Ba_       ----AKVKVIDIDSMNYHHFYDIQFAFDKGSIKPL-----
BC4547-N4_Bc_      ----AKVKVIDIDSMNYHHFYDVQFVFDQDSIKAL-----
IsdX2-N4_Ba_       ----AKVKVIDIDSMNYHHFYDIQFAFDKGSIKSL-----
BC4547-N5_Bc_      ----AKVKVIDIDEMNYHHFYDVQIQFDTNNIGAL-----
IsdX2-N5_Ba_       ----AKVKVIDIDSMNYHHFYDVQIQFDPTKIGAV-----
BC4547-N2_Bc_      ----TKVFIEMASRNYQMHDVQLLFEQDKLEQI-----
IsdX2-N2_Ba_       ----TKVFIEMASRNYQTHDVQLLFEQDKLEQI-----
IsdB-N2Sa          --AIVKVHVKTIDYDGGYHVRIVDKEAFTKAN-----
IsdH-N3Sa          --AIVKVVANIGYEGQYHVRINQDINTKDD-----
IsdB-N1Sa          --IVSSTHFNN-KEEKYDYTLMEFAQPIYNSADKFKT-----
IsdH-N2Sa          --NVSSIEYGENIHEDYDYTLMVFAQPITNNPDDYVD-----
IsdH-N1Sa          --IVSSTQIDDGEETNYDYTKLVFAKPIYNDPSLVKS-----
IsdC-NSa           DVYIDEKVNPKPKYDHHYINITYKFNPTDVAG-----
IsdA-NSa           --TKVHIVVPQINYNHRYTTHLEFEKAIPTLA-----
Spy49-1405cN1     -AVLVSAMGGQESDLNHYDKYTKLDMTFSKTVTK-----
SpyN2              NYPKVLRMKLI EQAKKDGVLPLQVFPIMDAISKSGSLQTVFMRLDWSLTT

```

En rouge : les deux tyrosines conservées, présentes dans la plupart des domaines NEAT

Annexe 2' : tableau représentant le pourcentage d'identité entre le domaine NEAT d'IlsA et ceux des protéines Isd et Shr (*S. Pyogenes*)

	IlsA-N (%)
IsdX1-NEAT (Ba)	25
IsdC-NEAT (Ba)	19.685
IsdX2-N1 (Ba)	23.7705

IsdX2-N2 (Ba)	25.4098
IsdX2-N3 (Ba)	26.2295
IsdX2-N4 (Ba)	23.6641
IsdX2-N5 (Ba)	27.8689
HaL-NEAT (Ba)	58.4
BC4549-NEAT (Bc)	20.4918
BC4548-NEAT (Bc)	25
BC4547-N1 (Bc)	24.3697
BC4547-N2 (Bc)	26.2295
BC4547-N3 (Bc)	27.8689
BC4547-N4 (Bc)	28.6885
BC4547-N5 (Bc)	27.8689
Spy49-1405c-N1 (<i>S.pyogenes</i>)	12.0301
Spy49-1405c-N2 (<i>S.pyogenes</i>)	13.5714
IsdA-N (Sa)	17.8862
IsdC-N (Sa)	13.7097
IsdB-N1 (Sa)	11.9048
IsdB-N2 (Sa)	16.9492
IsdH-N1 (Sa)	10.9375
IsdH-N2 (Sa)	12.5984
IsdH-N3 (Sa)	16.9492

Annexe 3

```

IlsA-NEAT_Bc          41          ASDRTYDTEIKIYKDQKDEPSMVSQYIKDP-
KVTIAAG--KKI
IsdB-N2_Sa           341 -----
KMTDLQDTKYVVYVESVENNESMMDTFVKHPIKTGMLNG--KKY
IsdA-N_Sa            62 -----
SQATSQPINFQVQKDGSSSEKSMDDYMQHPGKVIKQNN--KYY

```

```

IlsA-NEAT_Bc
VTVTMQDSDYFQYLRIEDKNQPGVFHDVKVLSSEDKRKNGTKVQVFEIGFEKKN-----
IsdB-N2_Sa          MVMETTNDYWKDFMVEGQ-----RVRTISKDAKNN-
TRTIIFFPYVEGKTLTD-----
IsdA-N_Sa           FQTVLNNASFWKEYKFYNAN--NQELATTVVNDNKKAD-
TRTINVAVEPGYKSLT-----

```

```

IlsA-NEAT_Bc_      -----MQMHILIPAIGYDHKYQVQFEIKDPTVG-----
IsdB-N2_Sa         -AIVKVHVKTIDYDGQYHVRIVDKEAFTKAN-----
IsdA-N_Sa          -TKVHIVVPQINYNHRYTTHLEFEKAIPTLA-----

```

En vert sont respectivement les M⁶³, M³⁶³ et L'H⁸³ d'IlsA, IsdB-N2 et IsdA
En rouge : les deux tyrosines conservées

Annexe 4 : Alignement de la région Lip et son entourage de IsdB-N2, IsdB-N1, IsdH-N1, IsdH-N2 and IsdH-N3 (Sa), IIsA-N (Bc) et IsdX1-N(Ba)

```

IsdB-N2Sa      -----
KMTDLQDTKYVVYESVENNE SMMDTFVKHPIKGTGMLNGKKYMV
IsdH-N3Sa      -----
QLTDLQEAHFVVFESEENSE SVMDGFVEHPFYTATLNGQKYVV
IsdB-N1Sa      -----
SAPNSRPIDFEMKKENGEQQ FYHYASSVKPARVIFTDSKPEIE
IsdH-N2Sa      -----
TADNWRPIDFQMKNDKGERQ FYHYASTVEPATVIFTKTGPVIE
IsdH-N1Sa      -----
DIGPREQVNFQLLDKNNETQ YYHFFSIKDPADVYYTKKKA EVE Sérine 131
IsdX1-N Ba     -----
LADGKYNI AFTVWVGDKDES SRMNRYFESPATLTVKNGKQYVS Sérine53
IIsA-N Bc      TPALAALKVEANQSVAAASDRTYDTEIKIYKDQKDEPSMVSCYIKDPK-
VTIAAGKKIVT Sérine61
: . : *
:

```

En rouge : le motif aromatique trouvé dans le domaine NEAT des protéines IsdH-N1, IsdH-N2 et IsdB-N1 de *S. aureus* qui sont des récepteurs de l'hémoglobine. La S¹³⁰ soulignée est la sérine d'IsdH-N1 qui est en liaison avec la Lys¹¹ de la chaîne alpha de l'hémoglobine.

En jaune : Ce sont les résidus de la lip d'IsdX1 (*B. anthracis*) avec la Sérine S⁵³ adjacente soulignée

En vert : C'est la région Lip(?) chez IIsA, avec la Sérine 61 conservée chez IsdX1, IsdB-N2 et IsdH-N3 (en mauve)

Annexe 5 : Homology modeling of IIsA and Heme Docking in IIsA

The fasta sequence of *Bacillus cereus* IIsA (IIsA_Bc) was retrieved from the UniProtKB server at (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) with the entry code Q81G77_BACCR. Using ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) and (<http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa>), the fasta sequence of IIsA_Bc was 2D aligned with IsdA_Sa, IsdB-N2_Sa, and IsdX2_Ba, the homologous Isd proteins in *Staphylococcus aureus* (Sa) and *Bacillus anthracis* (Ba), respectively, whose fasta sequences were retrieved from their solved structures at (<http://www.rcsb.org/pdb>). These sequences were then 3D aligned using the advanced method in Esript (<http://esript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>) to include the secondary features of IsdA_Sa, IsdB-N2_Sa and IsdX2_Ba from their pdb codes: 2ITF, 3RTL and 4H8P, respectively. Hundreds of structures of IIsA_Bc were homology modeled with the three solved X-ray structures cited

above as 3D templates and using the model-building software Modeller (mod9v10) to satisfy the spatial restraints issued from the alignment with the target proteins. The model with the lowest score function value and best stereochemistry was selected and superimposed to the three templates that harbored the heme molecule in the binding pocket. The structures, templates, and homology model were then subjected to further refinement by energy minimization using CHARMM implemented in Discovery Studio 2.5 ©, 5000 iterations using Smart algorithm, constraints on the protein backbone and 0.01 RMS gradient as stop criterion. After optimization, the binding energy between the protein and the heme was calculated using the Calculate Energy Interaction module, implemented in Discovery Studio 2.5 ©.

Results

Structural analysis of Isd proteins of *S. aureus* (Sa) and *B. anthracis* (Ba), namely IsdA-Sa, IsdC-Sa, IsdB-N2-Sa and IsdX2-N5-Ba, clearly suggest that the YxxxY motif is involved in heme binding, with one of the tyrosine providing the fifth axial ligand for the iron-heme coordination and the other forming a hydrogen bond that strengthens heme coordination. Additionally, the structures showed that other conserved residues that belong to the 3_{10} -helix and face the critical tyrosines directly interact with the heme. To examine whether Tyr-147 and Tyr-151 (which align with Tyr-166 and Tyr-170 in IsdA-Sa, Tyr-440 and Tyr-444 in IsdB-N2-Sa and Tyr-108 and Tyr-112 in IsdX2-Ba, Fig. 1A) are also part of the heme binding pocket, a homology model for the wild-type NEAT domain of IIsA-Bc is computed (Fig. 1B) and superimposed with IsdX2-N5-Ba used here as a template. Interestingly, the binding pocket of IIsA-Bc is located at the interface between strand β_{10} and 3_{10} -helix with Tyr-147 and Tyr-151 of strand β_{10} and Met-62, Gln-65 and Tyr-66 of 3_{10} -helix strictly aligning with Tyr-108 and Tyr-112 and Met-26, Gln-29 and Tyr-30 of IsdX2-Ba, respectively. Our docking experiments confirm heme coordination to those five residues with binding energy similar to the crystallized complexes (Fig. 1C). In accordance with our experimental data showing almost a complete loss of endogenously bound heme in IIsA_{Y147AY151A}, *in silico* results suggest that mutation of tyrosine residues Tyr-147 and Tyr-151 into alanine significantly weakens heme binding but does not totally abolish it, presumably because residues Met-62, Gln-65 and Tyr-66 also participate in heme binding.

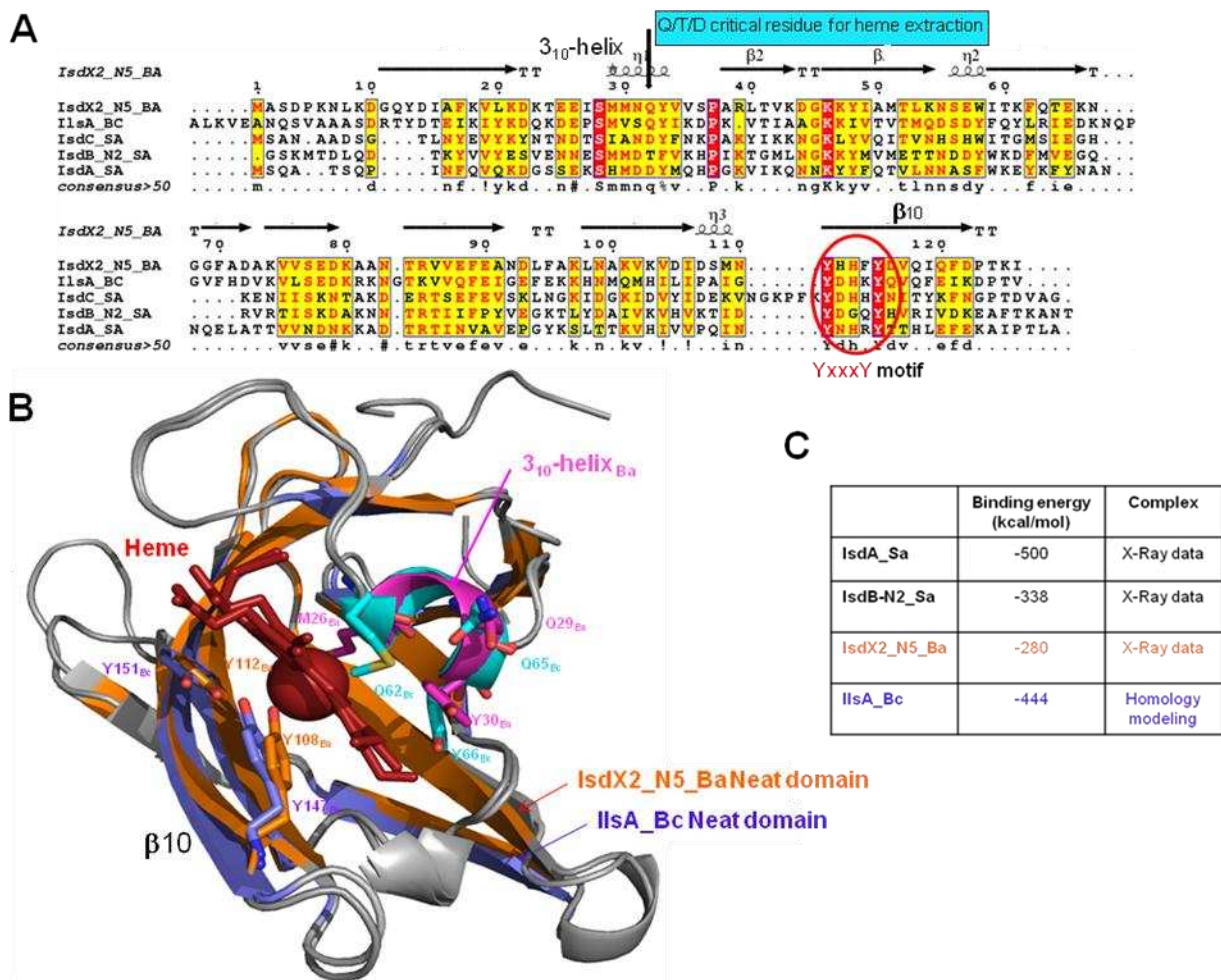


Figure 1. Structural comparison of NEAT domains

(A) Two-dimensional alignment of IIsA NEAT domain from *B. cereus* (Bc) with the Neat 5 domain of IsdX2 from *B. anthracis* (reference 4HP8 fasta and pdb) and the neat domains from IsdC, IsdB_N2 and IsdA from *S. aureus* (the numbering arbitrarily starts at Met1 for IsdX2_N5_Ba) (B) Structural overlay of the homology model of NEAT domain of IIsA-Bc (with the β -sheets colored in purple and the 3_{10} helix in cyan) onto the domain Neat 5 of IsdX2 solved for *B. anthracis* (with the β -sheets colored in orange and the 3_{10} helix in pink). The docking of the heme (sticked in red) is highlighted with the residues involved in the binding shown as sticks. The residue numbering using Ba and Bc as indices refer to *B. anthracis* and *B. cereus*, respectively. The structural picture was generated using PyMol (www.pymol.org). (C) Table

with binding energy computed for holostructures of Neat domains available in the pdb and for
IlsA-Bc NEAT in complex with heme as defined by homology modeling.