



HAL
open science

La protéine Fnr et le système à deux composants ResDE, des régulateurs majeurs de la synthèse des entérotoxines de *Bacillus cereus*

Julia Esbelin

► **To cite this version:**

Julia Esbelin. La protéine Fnr et le système à deux composants ResDE, des régulateurs majeurs de la synthèse des entérotoxines de *Bacillus cereus*. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2009. Français. NNT : 2009AVIG0620 . tel-00410526v2

HAL Id: tel-00410526

<https://theses.hal.science/tel-00410526v2>

Submitted on 5 Feb 2010

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.

Ecole doctorale

"Sciences des procédés-Sciences des aliments"

Université Montpellier II

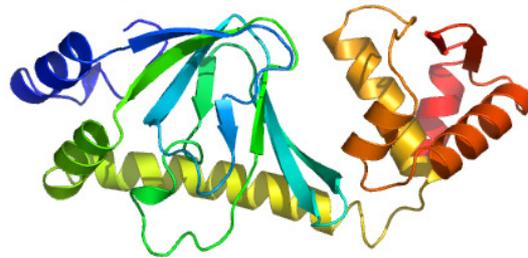
Thèse

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

Discipline : **Biotechnologie, Microbiologie**

Julia ESBELIN



La protéine Fnr et le système à deux composants ResDE,
des régulateurs majeurs de la synthèse des
entérotoxines de *Bacillus cereus*

Soutenue publiquement le 2 juillet 2009 devant le jury composé de :

Président	Mr. Philippe Schmitt - Professeur Université Avignon
Rapporteurs	Mr. Didier Lereclus - Directeur de Recherches INRA Mme Marie-Agnès Sari – Professeur Université Paris Descartes
Examineurs	Mr. Yves Jouanneau - Directeur de Recherches CNRS Mr. Jean Armengaud - Chercheur-Ingénieur-HDR CEA
Directrice de thèse	Mme Catherine Duport - Maître de conférence-HDR Avignon

Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR A408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Avignon

Remerciements

A tous ceux qui ont influencé ma vie, de près ou de loin, et qui font ou ont fait ce que je suis aujourd'hui, MERCI.

En commençant par mes parents. Merci de m'avoir encouragé dans mes études, de m'avoir toujours soutenue et de vous être intéressés à mes travaux.

Merci à mes grands-parents pour leur amour et leur soutien et un merci plus particulier à ma petite mamie qui a lu et relu chacune des lignes de ce mémoire afin d'en extraire les fautes d'orthographe.

Je remercie ma petite sœur (ma popote). Je suis sûre que tu es aussi fière de moi que moi de toi. Ça était si dur d'être loin de toi tout ce temps, j'espère être à nouveau vite près de toi.

À vous tous, merci, JVAPQTAM !!!

Doudou, je te remercie pour ton soutien moral dans les mauvais comme dans les bons moments. Merci pour ta patience, ton écoute et ton amour. Merci d'être aussi fort et de savoir si bien gérer mes angoisses. Ce n'était pas toujours facile, mais merci d'avoir été là et d'avoir franchi cette étape avec moi. Le meilleur reste à venir!

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail de thèse.

Je remercie Monsieur Christophe Nguyen-The pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci à Catherine Duport, ma directrice de recherche, pour m'avoir permis de faire une thèse sur un sujet aussi enrichissant. Merci de m'avoir donné l'encadrement nécessaire à ma réussite. Merci aussi de m'avoir transmis ces nombreux outils scientifiques et merci pour les collaborations que vous avez mis en place et qui ont été si profitables.

Merci à TOUTE l'équipe de l'UMR A408 ...

Merci à Caro, j'aurais aimé t'avoir au labo jusqu'à la fin ...

Merci à Véro et Julien pour leurs conseils et gentillesse.

Merci à Mr Yves Jouanneau pour son accueil au CEA, pour son implication dans mon travail et son aide précieuse pour la purification de cette protéine !

Merci à Mr Jean Armengaud pour son aide et les manip réalisées au CEA de Marcoule.

Merci à l'équipe de l'IUT pour leur accueil. Michel, merci pour tes encouragements et ton écoute. Tu m'as initié à l'enseignement et je crois qu'aujourd'hui je suis bien mordue !

Merci à tous les étudiants qui ont été et qui sont de passage, comme moi, dans le laboratoire. Vous avez tous contribué à un climat de travail amical et agréable. Un merci particulier à Assia, les 2 Nico, Ouassila, Cam-Cam, béné, Céline, Charlotte, Stella, Caro et Franck. Plus que des collègues de boulot, certains sont devenus de véritables amis... À tous, je vous souhaite un futur à la hauteur de vos attentes.

Merci à ma Carinette (pouet pouet) et Pierrot. Vous m'avez bien pris pour une folle (et non je ne travaille pas vraiment sur la C....E !), vous étiez là au tout début (pour m'héberger !) ... maintenant nous y sommes, c'est fini! Merci d'avoir été là, tout simplement.

Un merci un peu étrange à ma crapette (Aquarel, Crapsou, mon mouchard) dont je ne comprends toujours pas le langage mais qui par sa présence a apaisé bien de mes angoisses.

Merci aux habitants du fond du chemin de Castellás ! Merci Jenny pour m'avoir gardé jusqu'à la fin dans ce petit coin de paradis. Merci à toi Arielle pour ta gentillesse, tu as été une super voisine et une super nounou pour chat !

Sans oublier,

Lionel. On s'énerve souvent mais finalement je sais que l'on s'aime bien!

Ma Nini, sans toi Vendos ne serait pas si agréable, merci pour ta douceur et pour tout ce que tu fais pour nous.

À tous ceux que j'ai oubliés ou que je n'ai pu nommer, MERCI!

Table des matières

Table des illustrations

Liste des abréviations

Liste des abréviations	1
Avant-propos	1
Etude bibliographique	3
Chapitre 1 : <i>Bacillus cereus</i>	3
1. <i>Bacillus</i> et genres apparentés	3
2. Le groupe <i>B. cereus</i>	4
3. Cycle de vie de <i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> et <i>B. thurengiensis</i>	6
4. Le génome de <i>Bacillus cereus</i>	8
4.1 Caractères généraux du génome	8
4.2 Génomique des plasmides du groupe <i>cereus</i>	8
5 Pathologies	9
5.1 Atteintes non gastro-intestinales	10
5.2 Atteintes gastro-intestinales	10
5.2.1 Définition d'une toxi infection alimentaire	10
5.2.2 Toxi infections alimentaires à <i>B. cereus</i>	11
5.2.2.1 Caractéristiques	11
5.2.2.2 Adaptation de <i>Bacillus cereus</i> au tractus digestif	13
5.2.2.2.1 pH et pression en oxygène	13
5.2.2.2.2 Potentiel d'oxydoréduction	14
5.2.3 Stress oxydant et régulation des gènes	15
6 Pouvoir pathogène de <i>B. cereus</i>	17
6.1 La toxine émétique	17
6.2 Les entérotoxines	18
6.2.1 L'hémolysine BL	18
6.2.2 L'enterotoxine non-hémolytique	19
6.2.3 La cytotoxine K	20
6.2.4 L'enterotoxine T et l'enterotoxine FM	20
6.3 Autres facteurs de virulence	21
Chapitre 2 : Régulation du pouvoir pathogène de <i>Bacillus cereus</i>	21
1. Le regulon PlcR	21
1.1. PlcR : un activateur transcriptionnel pléiotrope	21
1.2 Mécanisme d'action de PlcR	22

1.3.	Bases moléculaires du système PlcR-PapR _____	24
1.4.	Importance et rôles du régulon PlcR au sein du groupe <i>B. cereus</i> _____	25
1.5.	Les facteurs de virulence échappant au contrôle de PlcR _____	27
2.	Le système à deux composants ResDE _____	27
2.1	Les systèmes de régulation à deux composants: généralités _____	28
2.1.1	Mécanisme général d'un système à deux composants _____	28
2.1.2	Transduction du signal _____	29
2.1.3	Description de deux systèmes à deux composants modèles _____	30
2.1.3.1	Le système à deux composants EnvZ/OmpR _____	30
2.1.3.1.1	Les histidine-kinases : structure et fonction _____	31
2.1.3.1.2	Les régulateurs de réponse: structure et fonction _____	33
2.1.3.2	Le système à deux composants ArcAB _____	34
2.1.4	Les systèmes à deux composants et la virulence _____	35
2.1.5	Le système à deux composants ResDE _____	36
2.1.5.1	Le système à deux composants ResDE de <i>B. subtilis</i> _____	36
2.1.5.2	Les systèmes à deux composants chez <i>B. cereus sensu lato</i> _____	39
2.1.5.3	Le système à deux composants ResDE de <i>B. cereus</i> _____	40
3.	La protéine à centre Fer-Soufre, Fnr _____	41
3.1	Les protéines de la famille CRP/Fnr : Généralités _____	41
3.2	La protéine réceptrice de l'AMP cyclique d' <i>E. Coli</i> : CRP _____	42
3.3	Interaction de la protéine CRP avec l'AMPc _____	43
3.4	Les protéines à centre Fer-Soufre _____	44
3.4.1	Les centres [Fe-S] _____	44
3.4.2	Rôles des centres Fer-Soufre dans la régulation génique _____	46
3.4.3	Mécanismes moléculaires d'assemblage des centres Fer-Soufre _____	48
3.4.3.1	Introduction _____	48
3.4.3.2	Les différentes machineries chez les procaryotes _____	48
3.4.3.3	Les donneurs de soufre : cystéines desulfurases _____	51
3.4.3.4	Les protéines d'assemblage _____	52
3.4.3.5	Les autres protéines _____	52
3.4.3.6	Le donneur de fer _____	52
3.4.4	Distribution des systèmes de maturation des protéines [Fe-S] chez les organismes procaryotes _____	53
3.5	La protéine Fnr des organismes modèles _____	54
3.5.1	La protéine Fnr d' <i>E. coli</i> _____	54
3.5.1.1	Structure et fonction _____	54
3.5.1.2	Biogenèse du centre Fer-Soufre de la protéine Fnr d' <i>E.coli</i> _____	57
3.5.2	La protéine Fnr de <i>B. subtilis</i> _____	58
3.6	La protéine Fnr de <i>B. cereus</i> _____	60
	Objectifs du travail de thèse _____	62

Matériel et méthodes	63
1 Souches et plasmides	63
1.1 Souches bactériennes	63
1.1.1 Souche de <i>Bacillus cereus</i>	63
1.1.2 Souches d' <i>Escherichia coli</i>	63
1.2 Les souches de <i>S. cerevisiae</i>	64
1.3 Les vecteurs plasmidiques utilisés	64
1.3.1 Le vecteur de clonage pCR-4-TOPO	64
1.3.2 Les vecteurs d'expression pET100/101 et pET 52b (+)	65
1.3.3 Les vecteurs "double hybride"	67
2 Milieux de culture	68
3 Techniques de biologie moléculaire	69
3.1 Techniques générales	69
3.1.1 Extraction d'ADN génomique	69
3.1.2 Extraction des plasmides bactériens	70
3.1.3 Extraction des plasmides de levure	70
3.1.4 Amplification des acides nucléiques	70
3.1.5 Electrophorèse d'ADN	72
3.1.6 La technique de RACE PCR	73
3.1.7 Ligation	73
3.1.7.1 Dans le vecteur pCR-4-TOPO	73
3.1.7.2 Dans le vecteur pET100/101	73
3.1.7.3 Dans le vecteur pET52b (+)	73
3.1.8 Transformation chimique des cellules d' <i>E. coli</i> compétentes	73
3.1.9 Transformation dans la levure	74
3.1.9.1 Préparation des cellules compétentes	74
3.1.9.2 Transformation	74
3.2 Technique de retard sur gel (EMSA)	74
3.2.1 Principe	74
3.2.2 Marquage radioactif des régions promotrices	75
3.2.2.1 Marquage des oligonucléotides	75
3.2.2.2 Marquage des fragments d'ADN	75
3.2.3 Interaction ADN/protéines	75
3.2.4 Migration des complexes ADN-Protéines	76
3.3 Le système du double-hybride chez la levure	76
3.3.1 Principe	76
3.3.2 Construction des vecteurs d'expression appât et proie	78
4 Techniques de biochimie	79
4.1 Techniques générales	79
4.1.1 Dosage des protéines	79
4.1.1.1 Dosage des protéines selon la méthode de Biuret (insensible aux thiols)	79
4.1.1.2 Dosage selon la méthode du BCA	79

4.1.2	Production des anticorps polyclonaux _____	80
4.1.3	Purification par épuisement des anticorps _____	80
4.1.3.1	Préparation du lysat bactérien _____	80
4.1.3.2	Saturation de la membrane _____	80
4.1.3.3	Epuisement des anticorps non spécifiques _____	81
4.1.4	Extraction des protéines intracellulaires de <i>B. cereus</i> _____	81
4.1.5	Electrophorèse de protéines _____	81
4.1.6	Détection des protéines par immunomarquage _____	82
4.1.7	Oxydation par le diamide _____	83
4.1.8	Phosphorylation d'un régulateur de réponse (RR) _____	83
4.1.8.1	Trans-phosphorylation par une histidine kinase (HK) _____	83
4.1.8.2	Phosphorylation par l'acétyl phosphate _____	84
4.1.9	Détection de la phosphorylation à l'aide du kit Pro Q Diamond _____	84
4.1.10	Dosage de l'activité β -gal en milieu liquide chez la levure _____	84
4.2	Purification des protéines recombinantes _____	85
4.2.1	Contrôle de l'expression des protéines recombinantes _____	85
4.2.2	Préparation des culots bactériens _____	85
4.2.3	Purification des protéines étiquetées en polyhistidine par chromatographie d'affinité _____	86
4.2.4	Purification de la protéine Fnr étiquetées en Streptavidine et native _____	87
4.2.4.1	Lyse non dénaturante des cellules _____	88
4.2.4.2	Chromatographie échangeuse d'ions DEAE _____	88
4.2.4.3	Chromatographie sur hydroxylapatite HA ultrogel _____	89
4.2.4.4	Chromatographie de gel filtration sur Superdex SD200 _____	90
4.3	Analyse biochimique des centres [Fe-S] _____	90
4.3.1	Reconstitution biologique de Fnr en présence de CsdA _____	90
4.3.2	Reduction de la protéine Fnr _____	91
4.4	Mise en évidence d'interactions protéiques _____	92
4.4.1	Pontage covalent ou cross-linking _____	92
4.4.1.1	Principe _____	92
4.4.1.2	La réaction de pontage _____	93
4.4.2	Far Western Blot _____	93
4.4.2.1	Marquage des protéines à la biotine _____	93
4.4.2.2	Dot Far Western Blot _____	93
	Résultats _____	95
	Chapitre 1 : Implication du régulateur Fnr dans la toxinogénèse _____	95
1	Introduction à l'étude _____	95
2	Stratégie envisagée _____	96
2.1	Surexpression de la protéine Fnr _____	96
2.2	Purification de la protéine Fnr _____	96
2.3	Caractérisation biochimique et fonctionnelle _____	97

3	Résultats et discussion	98
3.1	Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des protéines recombinantes Fnr _{His} et Fnr _{Strep} : Article 1	98
3.2	Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la protéine Fnr native	111
3.2.1	Surexpression de la protéine Fnr	111
3.2.2	Purification de la protéine Fnr en anaérobiose	112
3.2.3	Reconstitution du centre fer-soufre de la protéine Fnr	115
3.2.4	Réduction de la protéine Fnr	117
Chapitre 2 : Implication du système à deux composants ResDE dans la toxino-génèse		119
1.	Introduction à l'étude	119
2	Stratégie envisagée	120
2.1	Surexpression des protéines ResD et ResE	120
2.2	Purification des protéines ResD et ResE	120
2.3	Caractérisation biochimique et fonctionnelle du système ResDE	121
3	Résultats et discussion	122
3.1	Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du système à deux composants ResDE : Article 2	122
3.2	Expériences complémentaires	137
3.2.1	Mise en évidence de l'état de phosphorylation de ResD <i>in vitro</i>	137
3.2.2	Effet de l'ADN sur l'état d'oligomérisation de ResD	138
Chapitre 3 : Interaction entre les régulateurs ResD, Fnr et PlcR		139
1	Introduction à l'étude	139
2.	Stratégie envisagée	141
2.1	Surexpression et purification du régulateur pléiotrope PlcR	141
2.2	Etude des interactions protéique	141
2.2.1	Double hybride dans la levure	141
2.2.2	Pontage covalent	143
3	Résultats et discussion	143
3.1	Obtention de la protéine PlcR	143
3.1	Interactions entre les régulateurs : test de l'activité α -Gal	146
3.2	Interactions entre les régulateurs : dosage de l'activité β -Gal	147
3.3	Réaction de pontage covalent entre les régulateurs	149
Conclusion générale et perspectives		152
Références bibliographiques		158
Valorisation du travail de thèse		172

Table des illustrations

Figures

Figure 1 : Cellules de <i>B. cereus</i> en cours de sporulation (microscopie optique).	3
Figure 2 : Colonie formée par une souche de <i>B. mycoides</i> sur gélose à 1.5% d'agar	5
Figure 3 : Spore de <i>B. thuringiensis</i> et son cristal parasporal (colorisation).....	5
Figure 4 : Représentation des deux cycles de vie présumés des bactéries du groupe <i>B. cereus</i> 7	
Figure 5 : Populations microbiennes du tractus intestinal d'un arthropode terrestre.....	7
Figure 6 : Représentation schématique des infections à <i>B. cereus</i>	10
Figure 7 : Représentation schématique des deux formes de TIA liées à <i>B. cereus</i>	12
Figure 8 : Schématisation de la formation d'un pont disulfure.	17
Figure 9 : Organisation génétique de l'opéron <i>hbl</i> et schématisation du devenir post-traductionnel des différents composants de la toxine Hbl.	19
Figure 10 : Organisation génétique de l'opéron <i>nhe</i> et schématisation du devenir post-traductionnel des différents composants de la toxine Nhe.	20
Figure 11 : Région promotrice de gènes dont la transcription est sous le contrôle de PlcR ..	22
Figure 12 : Mécanisme d'action du régulateur PlcR et modèle pour la régulation de l'expression du régulon PlcR.....	23
Figure 13 : Effet de la fixation de PapR sur PlcR.....	24
Figure 14 : Organisation du régulon PlcR.....	26
Figure 15 : Schéma général d'un système à deux composants.....	29
Figure 16: Représentation du mécanisme de phospho-relais du système typique à deux composants <i>EnvZ/OmpR</i> d' <i>E. coli</i>	31
Figure 17: Schéma illustrant l'organisation des domaines des histidine-kinases et des régulateurs de réponse typiques des systèmes à deux composants.....	32
Figure 18: Schéma illustrant l'organisation des domaines de l'histidine kinase <i>EnvZ</i>	32
Figure 19: Alignement des séquences des régulateurs de réponse <i>OmpR</i> , <i>PhoB</i> et <i>ArcA</i> d' <i>E.coli</i>	34
Figure 20 : Représentation du mécanisme de phospho-relais du système à deux composants <i>ArcB/ArcA</i> d' <i>E. coli</i>	34
Figure 21: Voies de régulation de la respiration nitrite et nitrate chez <i>B. subtilis</i>	37
Figure 22: Organisation structurale des domaines constitutifs de la protéine <i>ResE</i>	38

Figure 23 : (A) Organisation génétique de la région chromosomique de <i>B. cereus</i> contenant <i>resDE</i> . (B) Prédiction de la topologie membranaire du senseur <i>ResE</i>	41
Figure 24 : La protéine CRP. A: Structure tertiaire de la protéine CRP. B : Dimère lié à l'ADN.	43
Figure 25 : Interaction entre la protéine CRP et l'ADN	44
Figure 26: Schéma illustrant les trois types majeurs de centres Fer-soufre.	45
Figure 27 : Eléments nécessaires à la reconstitution chimique, <i>in vitro</i> , d'un centre [Fe-S].	48
Figure 28. Organisation des gènes du locus <i>nif</i> impliqués dans la synthèse des centres [Fe-S] chez <i>Azotobacter.vinelandii</i>	49
Figure 29. Opéron <i>isc</i> responsable de biosynthèse des centres [Fe-S] chez <i>E. coli</i>	50
Figure 30. Opéron <i>suf</i> responsable de biosynthèse des centres [Fe-S] chez <i>E. coli</i>	51
Figure 31 : Schéma général de la biosynthèse des centres [Fe-S]	53
Figure 32 : Représentation de la machinerie de biogenèse des centres [Fe-S] retrouvée chez <i>B. cereus</i> ATCC 14579.	54
Figure 34 : Structure prédictive d'un monomère de la protéine <i>Fnr</i> d' <i>E. coli</i>	55
Figure 35 : Schéma illustrant le passage de <i>Fnr</i> d'un état monomérique inactif à un état dimérique actif en fonction de la présence ou non d'oxygène	56
Figure 36 : Schéma illustrant le mécanisme proposé pour la conversion du centre [4Fe-4S] de la protéine <i>Fnr</i> d' <i>E. coli</i>	56
Figure 34 : Modèle de biogenèse du cluster [Fe-S] de la protéine <i>Fnr</i> d' <i>E.coli</i>	58
Figure 35 : Mécanisme d'action des protéines <i>Fnr</i> d' <i>E.coli</i> et de <i>B. subtilis</i>	59
Figure 36 : Modèle de régulation impliquant <i>Fnr</i> lors du passage à des conditions de croissance anaérobie.....	60
Figure 37 : Organisation génétique de la région chromosomique de <i>B. cereus</i> contenant <i>fnr</i>	60
Figure 38 : Alignement des deux séquences protéiques de <i>Fnr</i> de <i>B. subtilis</i> et <i>B. cereus</i>	61
Figure 39 : Organisation structurale de la protéine <i>Fnr</i> de <i>B. cereus</i>	62
Figure 40 : Le vecteur pCR-4-TOPO (Invitrogen).	64
Figure 41 : Mécanisme d'action de la topoisomérase I au cours d'un clonage dans un système pET directionnel.....	65
Figure 42 : Les vecteurs pET/100/101-TOPO (Invitrogen, kit Champion).	66
Figure 43 : Le vecteur d'expression pET52b (+).	67
Figure 44: Carte des vecteurs pGBKT7 et pGADT7	68
Figure 45 : Schéma représentatif du principe de la technique de retard sur gel.	75
Figure 46: Principe de l'activation des gènes rapporteurs chez la levure AH109.....	77

<i>Figure 47: Gènes rapporteurs dans la levure AH109.</i>	78
<i>Figure 48 : Le système Matchmaker.</i>	78
<i>Figure 49 : Formule chimique du diamide.</i>	83
<i>Figure 50 : Principe de l'IMAC</i>	86
<i>Figure 51: Principe de la chromatographie échangeuse d'ions DEAE</i>	88
<i>Figure 52 : Principe de la chromatographie sur hydroxyapatite</i>	89
<i>Figure 53 : Réduction de la protéine Fnr par la 5-déazariboflavine.</i>	91
<i>Figure 54 : Principe de la réaction de pontage chimique de deux protéines par l'EDC et le NHS.</i>	92
<i>Figure 55 : Principe du marquage d'une protéine à la biotine.</i>	93
<i>Figure 56 : Schéma représentatif de la reconnaissance biotine-streptavidine.</i>	94
<i>Figure 57 : Analyse de l'expression de Fnr.</i>	112
<i>Figure 58: Analyse par gel SDS-PAGE de la purification de Fnr native. Des échantillons de protéine ont été récupérés lors des principales étapes de la purification</i>	113
<i>Figure 59: Diagramme d'éluion de la fraction issue de la colonne d'hydroxyapatite sur colonne Superdex SD200 en gradient de tampon phosphate</i>	114
<i>Figure 60 : Spectre d'absorption UV-Visible de Fnr native.</i>	115
<i>Figure 61: Spectre d'absorption UV-Visible de la protéine Fnr native, suivi de la reconstitution.</i>	116
<i>Figure 62: Spectre d'absorption UV-Visible de la protéine Fnr reconstituée.</i>	117
<i>Figure 63: Spectre UV-Visible de la protéine Fnr native après réduction par la 5-déazariboflavine</i>	118
<i>Figure 65 : Réaction de pontage covalent de ResD en présence d'ADN.</i>	138
<i>Figure 66 : Localisation des boîtes potentielles de fixation des protéines ResD, Fnr et de la boîte connue pour le régulateur PlcR</i>	140
<i>Figure 67: Séquence en acides aminés de la protéine PlcR surexprimée chez E. coli</i>	144
<i>Figure 68 : Analyse de l'expression de PlcR par immunodétection</i>	145
<i>Figure 69: Analyse par gel SDS-PAGE 12% de la purification de PlcR</i>	145
<i>Figure 70 : Clones obtenus par le système double hybride chez la levure</i>	146
<i>Figure 71 : Dosage de l'activité β-galactosidase des clones obtenus par le système du double hybride chez la levure</i>	148
<i>Figure 72 : Analyse SDS-PAGE couplée à une révélation anti-His des produits de pontage entre Fnr, ResD et PlcR.</i>	150
<i>Figure 73 : Schéma hypothétique de la régulation de l'activité de l'apoFnr.</i>	153

Figure 74 : Schéma hypothétique de la co-régulation de l'activité des entérotoxines par les régulateurs Fnr et ResD..... 155

Tableaux

Tableau 1: Caractéristiques principales du génome de quelques espèces du groupe cereus..... 8

Tableau 2: Panorama de certains plasmides du groupe cereus 9

Tableau 3 : Caractéristiques des deux types de TIA liées à B. cereus 13

Tableau 4 : Agents oxydants (A) et réducteurs (B) les plus connus. 17

Tableau 5 : Systèmes à deux composants impliqués dans la virulence..... 35

Tableau 6: Systèmes de régulation putatifs chez différents Bacilli 40

Tableau 7: Fonctions de quelques centres [Fe-S]..... 46

Tableau 8 : Souches d'E. coli utilisées..... 63

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées dans les réactions PCR..... 72

Tableau 10 : Synthèse des interactions obtenues en double hybride. 148

Liste des abréviations

AD	Domaine d'activation
ADE	Adénine
ADN	Acide Désoxyribonucléique
Amp	Ampicilline
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine 5'-Triphosphate
BCA	Acide bicinchonique
BD	Domaine de fixation
BET	Bromure d'éthidium
BSA	Sérum Albumine bovine
cpm	coups par minute
CytK	Cytotoxine K
D.O	Densité optique
Da	Dalton (unité de masse - un dalton représente le douzième de la masse d'un atome de carbon 12, soit $1,66 \cdot 10^{-24}$ g)
DEAE	Diethylaminoethyl
DTT	Dithiothréitol
EDC	1-éthyl-3(3-diméthyl-aminopropylcarbodiimide)
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
[Fe-S]	Centre Fer Soufre
Fnr	Fumarate nitrate reductase
GSH	Glutathion réduit
HBL	Hemolysine BL
HCl	Acide chlorhydrique
HTH	Helix-Turn-Helix
GSSG	Glutathion oxydé
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Berthani
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
Nhe	Entérotoxine non-hémolytique
ONPG	Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne
PEG	Polyéthylèneglycol
PlcR	Phospholipase C Regulator
PM	Poids moléculaire
POR	Potentiel d'oxydo-réduction
ppm	partie par million
RPE	Résonance paramagnétique électronique
RR	Régulateur de réponse
SDC	Système à deux composants

SDS	Dodécylsulfate de sodium
SOB	Super optimal broth
SOC	Super optimal broth with Catabolite repression
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TBE	Tris Borate EDTA
TIA	Toxi-infections alimentaires
TIAC	Toxi-infections alimentaires communes
TPR	TetratricoPeptide Repeat
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
URA	Uracile
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indol-(β ou α)-D-galactoside
YPDA	Extrait de levure, peptone, dextrose et adénine

Avant-propos

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* comprend plusieurs espèces de bactéries très répandues dans l'environnement. Bien que ces espèces soient très proches d'un point de vue phylogénétique, elles ont adopté des modes de vie qui divergent considérablement. Certaines vivent et se développent librement dans l'environnement, tandis que d'autres sont capables de coloniser différents tissus ou organes animaux et provoquer des maladies. C'est le cas de l'espèce *B. cereus*, qui depuis une dizaine d'années, a radicalement changé de statut et a détrôné *B. anthracis* en devenant le chef de file du groupe *B. cereus*. C'est un contaminant fréquent des plats cuisinés pasteurisés et représente un problème récurrent dans les équipements utilisés en industrie alimentaire. Sa survie le long de la ligne de fabrication s'explique par son aptitude à produire des spores, résistantes aux températures élevées, mais aussi par sa capacité à adhérer aux matériaux utilisés. La régularité de sa participation à des toxi-infections alimentaires (TIA) le place au quatrième ou cinquième rang des agents responsables de maladies alimentaires, en France et dans de nombreux autres pays. *B. cereus* est aussi devenu un véritable "danger bactériologique" au sens de l' HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), à prendre en compte dans différentes filières alimentaires.

Les TIA dont *B. cereus* est responsable, se décline sous deux formes: **une forme émétique** (vomissements) due à l'ingestion d'une toxine (cereulide) préformée dans les aliments et **une forme diarrhéique** due à l'ingestion de cellules ou de spores bactériennes produisant des entérotoxines dans l'intestin grêle. Ce dernier est caractérisé par un environnement anaérobie et fortement réducteur auquel la cellule bactérienne doit s'adapter. La capacité de *B. cereus* à se développer et à produire des entérotoxines dans l'intestin pourrait être sous le contrôle du système à deux composants **ResDE** et du régulateur **Fnr** (Fumarate Nitrate Reductase), tous deux étant des régulateurs du métabolisme anaérobie de *B. cereus*. Des études récentes ont montré que ces deux systèmes de régulation des entérotoxines agissaient, en partie, indépendamment du régulateur pléiotrope connu, PlcR (Phospholipase C Regulator).

La virulence bactérienne est un phénomène multifactoriel et de nombreux facteurs, dits de virulence, sont nécessaires à son expression. L'étude moléculaire de la relation structure-fonction des facteurs de virulence, de leur biogenèse et surtout de leur régulation

génétiq ue est une étape primordiale pour une meilleure compréhension des pathogènes. Les propriétés d'un organisme ne sont pas la simple somme des informations codées par ses gènes mais elles résultent des interactions régulatrices compliquées et non-linéaires entre ses composants. Ces interactions régulatrices sont exercées à tous les niveaux de l'expression génique, de la transcription des gènes jusqu'au contrôle de la dégradation des protéines. Les techniques génomiques permettent aujourd'hui d'identifier les gènes et protéines impliqués dans un processus donné, mais il manque encore des méthodes pour prédire leur comportement collectif.

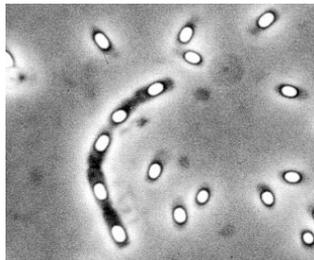
Etude bibliographique

Chapitre 1 : *Bacillus cereus*

1. *Bacillus* et genres apparentés

Les *Bacillus* forment un genre de bactéries à Gram positif, appartenant à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*), l'ordre des bacillales (*Bacillales*), la classe des bacilles (*Bacilli*), le phylum des firmicutes (*Firmicutes*).

De forme bacilles, elles sont anaérobies facultatives, et tirent leur énergie par respiration ou fermentation. Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables.



INRA

Figure 1 : Cellules de *B. cereus* en cours de sporulation (microscopie optique) (spore = corps réfringent).

Le genre *Bacillus* est particulièrement hétérogène et ceci est reflété par la grande variété de niches écologiques que les nombreuses espèces occupent et par l'extrême diversité de leur statut taxonomique. Les *Bacillus* sont hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires. Ils sont fréquemment retrouvés dans le sol où certaines espèces ont un rôle dans le cycle du carbone et de l'azote.

Il en existe un grand nombre d'espèces avec des propriétés physiologiques et des habitats très variés (terre, poussière, etc...). Certaines espèces sont trouvées dans l'eau douce, d'autres dans l'eau de mer. Il existe des espèces thermophiles, acidophiles, psychrophiles, alcalinophiles. Les espèces saprophytes sont responsables de multiples dégradations de produits alimentaires (sûrissement et caillage du lait, etc...). Certaines d'entre elles ont des rôles utiles comme la production d'antibiotiques (tyrothricine, polymyxines, bacitracine...). Les plus connus sont : *Bacillus anthracis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus*.

Le genre *Bacillus* a été créé en 1872 par Ferdinand Cohn qui décrit *B. subtilis* comme espèce type. Quinze années plus tard (1887), Frankland et Frankland isolent une nouvelle espèce, *B. cereus* à partir de l'air d'une étable au Royaume-Uni (Frankland & Frankland, 1887). La bactérie isolée est la souche type de *B. cereus* : ATCC 14579. En 1955, Steinar Hauge est le premier à prouver l'implication de *B. cereus* dans des toxi-infections alimentaires (Hauge, 1955). C'est en 1975 que la souche diarrhéique F4430/73 de *B. cereus* a été isolée à partir d'une soupe de pois (Spira & Goepfert, 1975).

2. Le groupe *B. cereus*

Le groupe *B. cereus sensu lato*, inclut les espèces, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycooides*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanensis* et *B. cereus sensu stricto*. Les trois espèces *B. anthracis*, *B. thuringiensis* et *B. cereus* sont si proches du point de vue génétique qu'elles peuvent être considérées comme des variants d'une seule espèce. L'analyse des séquences génomiques révèle une homologie de 94% entre *B. anthracis* Ames et *B. cereus* ATCC 10987 et une homologie de 91% est retrouvée entre les deux souches *B. cereus* ATCC 10987 et *B. cereus* ATCC 14579 (Schoeni & Wong, 2005).

Toutes ces espèces ont pour habitat principal le milieu extérieur et ont une grande importance sur un plan hygiénique et écologique :

- *B. anthracis* est l'agent du charbon bactérien (ou en anglais, anthrax), maladie potentiellement mortelle chez l'homme et l'animal (Mock & Fouet, 2001).

Les souches de *B. anthracis* synthétisent habituellement des exotoxines codées par des gènes présents sur le plasmide pXO1 et une capsule codée par des gènes présents sur le plasmide pXO2.

Le charbon reste, indépendamment du danger potentiel qu'il représente dans le cadre du bioterrorisme et malgré des mesures de prophylaxie sanitaire mises en oeuvre depuis une centaine d'années dans notre pays, une maladie d'actualité. Ces mesures, qui ont permis jusqu'à maintenant de reléguer dans le passé les phénomènes épidémiques majeurs, n'empêchent pas la survenue régulière de quelques foyers animaux chaque année. Les derniers cas de charbon humain signalés en France remontent à 1997 (3 cas signalés dans les Pyrénées-Atlantiques, lors d'un épisode de fièvre charbonneuse bovine).

- Des souches de *B. mycooides* sont associées aux racines des conifères et elles stimuleraient la croissance de ces plantes. L'aspect rhizoïde des colonies différencie *B. cereus* et *B. mycooides*.

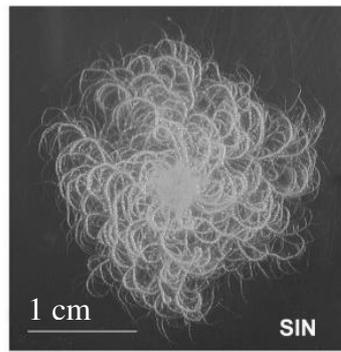
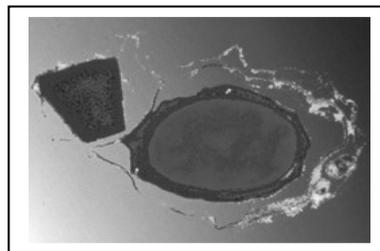


Figure 2 : Colonie formée par une souche de *B. mycooides* sur gélose à 1.5% d'agar (Di Franco *et al.*, 2002).

- *B. thuringiensis* élabore un cristal parasporal contenant des toxines pathogènes pour les insectes (delta-endotoxines). La synthèse du cristal parasporal est gouvernée par les gènes *cry* portés par un plasmide. *B. thuringiensis* a une importance économique considérable car certaines souches de cette espèce sont utilisées dans la lutte biologique contre les insectes (Whalon & Wingerd, 2003). On l'appelle un biopesticide et elle représente à ce titre 90 % du marché mondial des biopesticides. A la fin de la phase de croissance, la bactérie éclate et libère la spore et le cristal. Lorsque l'insecte ingère le cristal, celui-ci est dissous par ses sucs digestifs et devient toxique.



Institut Pasteur

Figure 3 : Spore de *B. thuringiensis* et son cristal parasporal (colorisation).

- *B. weihenstephanensis* est constitué de souches psychrotolérantes autrefois considérées comme des souches de *B. cereus*. Même si aucune infection ou toxi-infection n'a été formellement attribuée à *B. weihenstephanensis*, il est probable que le pouvoir pathogène de cette espèce soit comparable à celui de *B. cereus*.

- *B. cereus sensu lato* est responsable d'infections et surtout de toxi-infections alimentaires décrites chez l'homme et les animaux.

Il existe donc des caractères phénotypiques permettant de distinguer ces espèces. Mais les gènes responsables de ces caractères majeurs sont portés par des plasmides qui sont échangeables au sein du groupe (Van der Auwera *et al.*, 2007).

La perte des plasmides pXO1 et pXO2 ou la perte du plasmide portant les gènes *cry* donne naissance à une souche de *B. anthracis* ou à une souche de *B. thuringiensis* qu'il est très difficile de distinguer d'une souche de *B. cereus*. Inversement, l'acquisition par conjugaison des gènes *cry* par une souche de *B. cereus* transforme cette dernière en une souche impossible à différencier de *B. thuringiensis*. Ceci explique l'implication de *B. thuringiensis* dans des gastro-enterites typiquement causées par *B. cereus* (Jackson *et al.*, 1995) ou encore la capacité d'une souche de *B. cereus* à provoquer des symptômes très proches de ceux de l'anthrax (Hoffmaster *et al.*, 2004).

3. Cycle de vie de *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis*

Il existe pour les bactéries du groupe *B. cereus sensu lato*, une circulation entre les trois réservoirs : réservoir animal, humain et hydrotellurique. Le réservoir hydrotellurique est le plus important et servirait de source aux deux autres. En 2003, Jensen *et al* soulignent le manque de données concernant l'écologie des membres de groupe *B. cereus* au sein de leur environnement. Les auteurs proposent un modèle dans lequel les membres du groupe *B. cereus* ont deux cycles de vie : un cycle où les bactéries vivent en relation symbiotique avec leurs hôtes invertébrés, et un autre, peu fréquent, dans lequel les bactéries peuvent se multiplier rapidement chez un autre insecte, hôte infecté, ou un mammifère.

En effet les spores de *B. anthracis* peuvent être transportées dans le tractus digestif d'insectes se nourrissant de charognes contaminées et disséminées via les fèces. De plus, une transmission de la maladie du charbon à des animaux sains par piqûres de moustiques ou de mouches nourries de sang d'animaux contaminés a aussi été observée (Turell & Knudson, 1987).

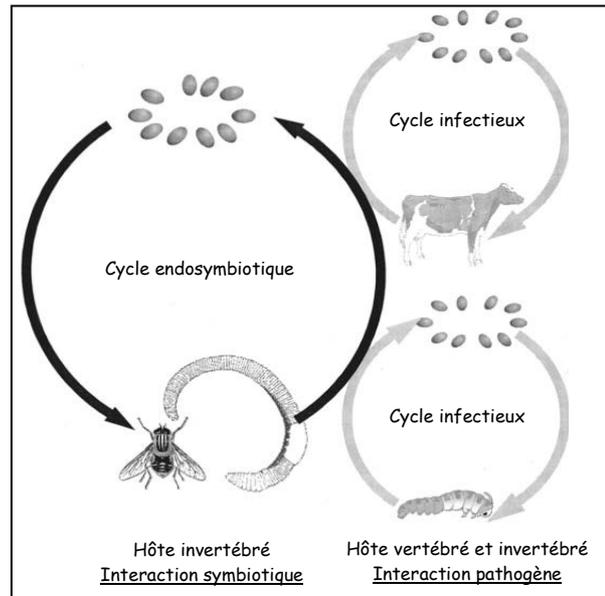


Figure 4 : Représentation des deux cycles de vie présumés des bactéries du groupe *B. cereus*, d'après (Jensen *et al.*, 2003).

Chez *B. cereus*, il n'existe pas de cycle pathogénique spécifique. Il a été retrouvé dans le tube digestif d'insectes, sous une forme symbiotique et filamenteuse appelée "*arthromitus*". Pour Margulis *et al* (1998), il s'agirait d'un état particulier de *B. cereus*. *Arthromitus* correspondrait à une des "phases" du cycle de *B. cereus* dans l'environnement, chez l'homme et chez l'animal. Avec cette phase intestinale, on peut concevoir que *B. cereus* pourrait être tour à tour pathogène pour l'homme (et parfois pour l'animal), saprophyte dans le milieu extérieur, et symbiotique chez l'animal. Il mériterait donc bien la qualification d'ubiquiste.

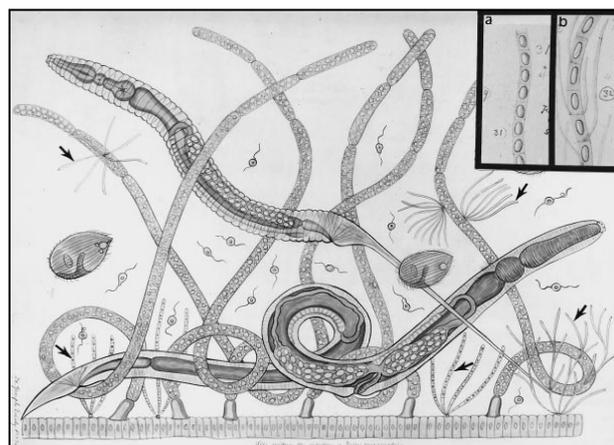


Figure 5 : Populations microbiennes du tractus intestinal d'un arthropode terrestre (*Julus marginatus*). *Arthromitus* (forme filamenteuse de *B. cereus*) est attaché à l'intestin et aux hyphes des trichomycètes (flèches noires). D'après une planche de Joseph Leidy's (Margulis *et al.*, 1998).

4. Le génome de *Bacillus cereus*

4.1 Caractères généraux du génome

Les membres du groupe *B. cereus*, et particulièrement *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis*, ont un fort intérêt économique et médical. Pour ces raisons, ce groupe contient le plus grand nombre de génomes d'espèces apparentées séquencés. A ce jour 25 génomes du groupe *B. cereus* sont séquencés et disponibles. On en retrouve 12 pour *B. cereus sensu stricto*, 10 pour *B. anthracis*, 2 pour *B. thuringiensis* et 1 pour *B. weihenstephanensis*. Cela offre une opportunité unique pour les comparaisons et analyses de séquences. Les cartes génomiques montrent que la taille du génome des souches de *B. cereus* varie entre 2.4 et 5.5 Mb.

Organisme	Taille en paires de base	Pourcentage de séquences codantes	G + C %	Nombre d'ORF
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	5 427 083	81.60 %	35.29 %	5 255
<i>B. anthracis</i> A2012	5 370 060	80.23 %	35.10 %	5 662
<i>B. thuringiensis israelensis</i> ATCC-35646	5 880 839	79.06 %	35.04 %	6 451
<i>B. cereus</i> NVH 391-98	4 087 024	79%	35%	4165

Tableau 1: Caractéristiques principales du génome de quelques espèces du groupe *cereus* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.2 Génomique des plasmides du groupe *cereus*

Les bactéries du groupe *B. cereus sensu lato* auraient émergé d'un ancêtre commun, à la suite d'une série de réarrangements génétiques effectués entre autres par des éléments mobiles d'ADN, tels que des transposons, des séquences d'insertion et des bactériophages. Ces réarrangements se seraient additionnés de divers mécanismes de transfert horizontaux de gènes, tels que la conjugaison, la transduction ou la transformation. Ces mécanismes auraient conduit à l'acquisition des gènes de virulence.

Ainsi, chez *B. cereus*, *B. anthracis* et *B. thuringiensis*, tous les gènes responsables de la virulence et de la spécificité de l'hôte, sont présents sur des éléments extrachromosomiques.

B. anthracis doit ses propriétés pathogènes à deux très grands plasmides, pX01 de 182 kbs, codant les toxines de l'anthrax, et pX02 de 96 kbs, codant la capsule (Van der Auwera *et al.*, 2007).

De même, les gènes *cry* du cristal toxique de *B. thuringiensis* sont situés sur de grands plasmides (plus de 50 kbs) actifs contre différentes espèces d'insectes (Aronson, 2002).

Quant à *B. cereus sensu stricto*, sa pathogénicité est due à la production de facteurs chromosomiques de virulence, tels que des phospholipases et des entérotoxines. Cependant, les gènes responsables de la production du céréulide (ou toxine émétique) sont codés par un grand plasmide de virulence, appelé pCERE01, de 200 kbs (Hoton *et al.*, 2005).

Un certain nombre de plasmides de *B. cereus* et de bactéries apparentées sont présentés dans le tableau 2.

Nom du plasmide	Micro-organisme	Taille en paire de bases	G + C %
pBc10987	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC10987)	208 369	33
pBclin15	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC14579)	15 100	38
pBCX01	<i>Bacillus cereus</i> (G9241)	191 110	33
pBC218	<i>Bacillus cereus</i>	218 094	32
pZK5 (zebra killer)	<i>Bacillus cereus</i>	5108	31
pZK8 (zebra killer)	<i>Bacillus cereus</i>	8191	32
pZK9 (zebra killer)	<i>Bacillus cereus</i>	9150	31
pZK54 (zebra killer)	<i>Bacillus cereus</i>	53 501	32
pZK467 (zebra killer)	<i>Bacillus cereus</i>	466 370	33
pX01	<i>Bacillus anthracis</i>	181 677	33
pX02	<i>Bacillus anthracis</i>	94 830	33
pBT9727	<i>Bacillus thuringiensis</i>	77 122	33

Tableau 2: Panorama de certains plasmides du groupe *cereus* (Rasko *et al.*, 2005).

5 Pathologies

Très largement répandu dans la nature, *B. cereus* se comporte comme un pathogène opportuniste responsable d'infections systémiques et locales et cette espèce est également responsable de toxi-infections alimentaires. Le schéma suivant illustre les différents types d'infections dans lesquelles *B. cereus* peut-être impliqué.

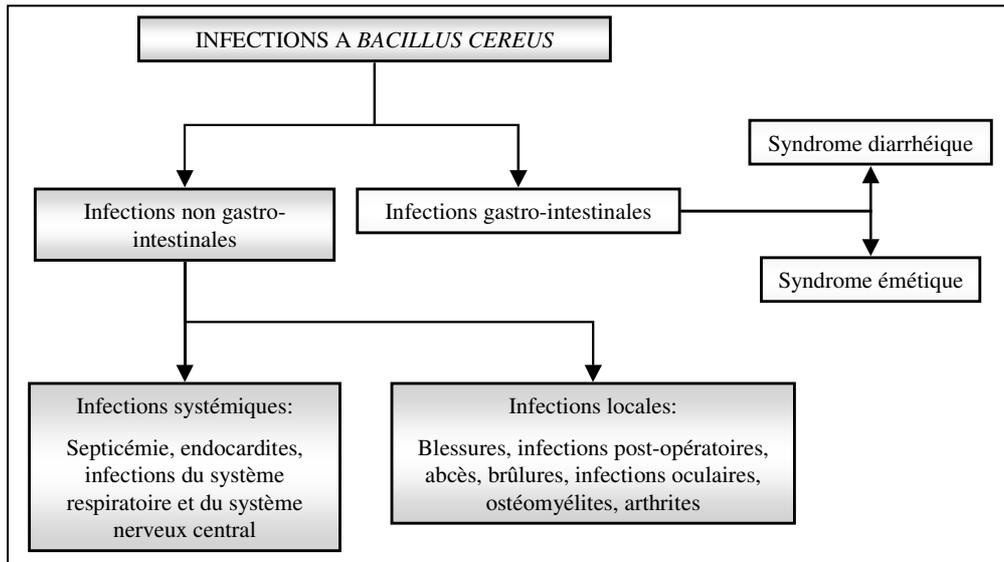


Figure 6 : Représentation schématique des infections à *B. cereus*, d'après (Drobniewski, 1993).

5.1 Atteintes non gastro-intestinales

Des infections non gastro-intestinales causées par *B. cereus* ont été rapportées avec une fréquence en augmentation, peut-être en raison d'une conscience croissante du potentiel pathogène de ce micro-organisme. *B. cereus* a été identifié comme agent de cas graves de septicémies, d'endocardites, de pneumonies, d'infections cutanées, d'infections orthopédiques, de méningites et d'infections de blessures traumatiques, en majorité chez des individus immunodéprimés.

5.2 Atteintes gastro-intestinales

5.2.1 Définition d'une toxi infection alimentaire

Individuelles ou collectives, les toxi-infections alimentaires (TIA) résultent de la transmission d'infections à l'homme par les aliments. L'attaque microbienne peut être liée aux propriétés invasives du micro-organisme et/ou aux produits toxiques qu'il est capable d'élaborer au cours de sa croissance. Un foyer de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est défini par l'apparition d'au moins 2 cas d'une symptomatologie, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. Les TIAC sont fréquentes, leur incidence est en augmentation dans les pays industrialisés, malgré un approvisionnement en eau saine, de bonnes règles d'hygiène et l'application de technologies comme la pasteurisation. En France la déclaration des TIAC à l'autorité sanitaire (DDASS) est obligatoire. Les principaux agents pathogènes responsables des TIA-TIAC sont d'origine

bactérienne (*Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, certaines souches *d'Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *B. cereus*), virale (rotavirus), autre (cyclospora, dinoflagellés, phytoplancton, parasitaire).

5.2.2 Toxi infections alimentaires à *B. cereus*

5.2.2.1 Caractéristiques

Les toxi-infections alimentaires collectives à *B. cereus* sont plus fréquemment rapportées qu'il y a 20 ans en France. Elles représentent 5847 cas et 290 foyers confirmés ou suspectés (soit 7% des cas et 5% des foyers déclarés) de 1996 à 2005 (Buyser.M.L, 2008). Deux TIAC à *B. cereus* survenues en France ont fait l'objet d'une description détaillée. L'une d'entre elles est responsable de trois décès en 1998 (Lund *et al.*, 2000).

La présence de spores de *B. cereus* pose de sérieux problèmes dans les industries agro-alimentaires (notamment les industries laitières) car non seulement, elles sont résistantes à la chaleur mais elles ont la capacité d'adhérer fortement à de nombreuses surfaces y compris l'acier inoxydable. Cette adhésion est liée à l'hydrophobicité de la surface des spores et à la présence de filaments (Tauveron *et al.*, 2006). De ce fait, les spores sont très difficiles à éliminer des tuyaux, des canalisations, des réservoirs (Andersson *et al.*, 1995). De plus les cellules végétatives peuvent former des biofilms difficiles à détacher et pouvant constituer une niche pour la formation de spores qui se libèrent dans la chaîne de transformation des aliments (Wijman *et al.*, 2007). La résistance conférée par la spore permet donc à *B. cereus* de survivre dans l'aliment malgré les traitements thermiques appliqués et de traverser le tractus gastro-intestinal (Drobniewski, 1993; Granum & Lund, 1997; McKillip, 2000).

B. cereus est responsable de toxi infections alimentaires se présentant sous deux formes : une forme émétique, déterminant de fortes nausées et des vomissements, et une forme diarrhéique, provoquant des crampes abdominales et une diarrhée profuse.

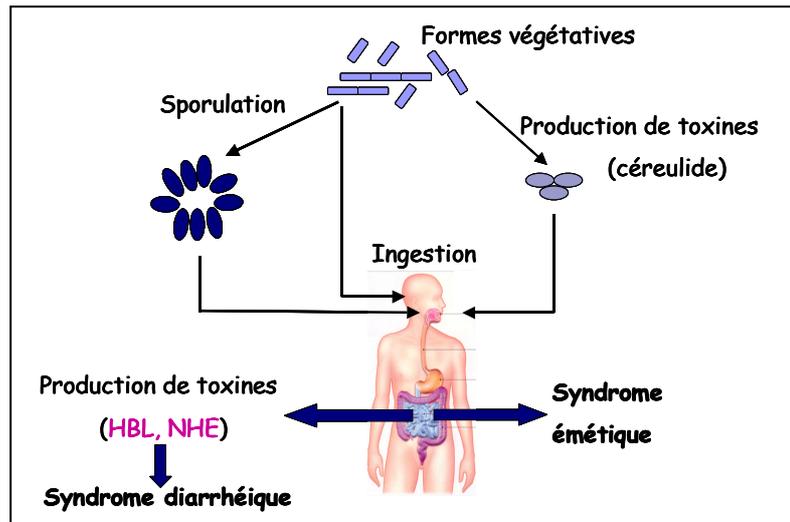


Figure 7 : Représentation schématique des deux formes de TIA liées à *B. cereus*.

Dans les deux cas, il s'agit d'une infection opportuniste bénigne à résolution spontanée, le plus souvent dans les 24 heures. Cependant, si l'intoxication survient chez un sujet immunodéprimé, il peut y avoir dissémination bactérienne (Granum, 1994).

Dans la **forme émétique**, la pathogénie fait intervenir l'ingestion d'une toxine préformée dans les aliments. Il s'agit d'un petit peptide cyclique appelé le céréulide. Celui-ci est thermostable (il résiste plus de 30 minutes à 121 °C), résistant à la protéolyse (insensibilité à la trypsine et à la pepsine) et stable à des pH compris entre 2 et 11. Compte tenu de sa résistance, la toxine émétique n'est détruite ni par la cuisson ni par les enzymes digestives.

La **forme diarrhéique** ou gastro-entéritique est la plus fréquente en Europe et en Amérique du Nord. Elle ne semble pas résulter de l'ingestion de toxines préformées car les toxines en cause (notamment les toxines Hbl, Nhe et CytK) sont fragiles et sensibles aux protéases du tube digestif. Les toxines responsables des formes gastro-entéritiques sont donc produites dans le tube digestif par les cellules végétatives après ingestion de cellules viables ou de spores (Clavel *et al.*, 2004). Les souches diarrhéiques de *B. cereus* agissent donc par un mécanisme de véritable "toxi-infection" ou plus exactement, de "processus infectieux et toxique". La toxi-infection intestinale due à *B. cereus* suit un processus classiquement observé chez d'autres bactéries entériques avec plusieurs phases successives :

- Une mobilité flagellaire, orientée par le chimiotactisme, et qui permet à la bactérie de se rapprocher des cellules intestinales.
- Une adhésion aux cellules intestinales
- La production de toxines.

Le transit des cellules végétatives dans l'estomac dure au minimum 4h à 6h dans l'intestin grêle (Granum *et al.*, 1995).

Le tableau suivant reprend les principales caractéristiques des deux formes de toxi-infections alimentaires collectives liées à *B. cereus*.

Caractéristiques	Syndrome diarrhéique	Syndrome émétique
Toxines produites	Entérotoxines Hbl, Nhe et CytK	Cérealide (peptide cyclique)
Lieu de production	Intestin grêle de l'hôte	Préformées dans l'aliment
Dose infectieuse	10^5 - 10^8 cfu (totale)	10^5 - 10^8 cellules/g cerealide : 8-10 μ g/kg (modèle animal)
Temps d'incubation	8-16h	0.5-6h
Durée de l'infection	12-24h	6-24h
Symptômes	Crampes abdominales, diarrhées profuses	Nausées, vomissements et malaises
Aliments impliqués	Produits carnés, soupes, légumes, sauces, lait et produits laitiers	Riz cuisiné ou frit, pâtes et nouilles.

Tableau 3 : Caractéristiques des deux types de TIA liées à *B. cereus* (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

5.2.2.2 Adaptation de *Bacillus cereus* au tractus digestif

5.2.2.2.1 pH et pression en oxygène

Un des premiers facteurs de destruction dans l'estomac est l'acidité. Le pH gastrique dépend de variables physiologiques incluant l'ingestion de nourriture. Dans des conditions de jeûne, le pH moyen dans l'estomac est autour de 2 et s'étend de 1.5 à 5.5. L'ingestion d'un repas caractéristique occidental produit une élévation immédiate du pH jusqu'à environ 6 (Waterman & Small, 1998). L'adaptation de *B. cereus* à l'acidité gastrique a été bien caractérisée et elle dépend de la forme cellulaire de *B. cereus* lorsqu'il est ingéré (cellules végétatives ou spores), de l'aliment et du niveau d'acidité de l'estomac (Clavel *et al.*, 2004). Dans cette étude, la survie des cellules de *B. cereus* était plus élevée dans un milieu stomacal contenant du lait, présumant ainsi un effet protecteur des lipides, des protéines ou des particules de l'aliment sur l'inactivation par des pH faibles. Les cellules végétatives étaient,

bien entendu, moins résistantes que les spores au contact du milieu gastrique. La dose infectieuse serait donc plus faible pour des spores que pour des cellules végétatives. Toutefois on peut penser que les spores, une fois arrivées dans l'intestin grêle, devront entamer un cycle de germination et de multiplication, ce qui représente un retard par rapport à l'action des cellules végétatives. Une étude complémentaire a montré que les bactéries développaient une réponse de tolérance à l'acidité afin de s'adapter au stress acide (Jobin *et al.*, 2002).

Un autre facteur définissant l'environnement intestinal est la pression en oxygène. Dans l'intestin grêle, les microorganismes sont exposés à un environnement anaérobie (la pO₂ est de 5-40 mmHg (Guyton, 1977)). Plusieurs études ont montré que les pathogènes entériques pouvaient s'adapter à une faible concentration en oxygène et exprimer leurs facteurs de virulence dans ces conditions. C'est le cas pour *Salmonella typhi* (Leclerc *et al.*, 1998), *Staphylococcus aureus* (Yarwood *et al.*, 2001), *Escherichia coli* (Landini & Zehnder, 2002) et *Vibrio cholerae* (Krishnan *et al.*, 2004). Chez *B. anthracis*, l'anaérobiose induit l'expression de facteurs hémolytiques (Klichko *et al.*, 2003). Une étude réalisée chez *B. cereus* F4430/73 a montré que l'anaérobiose conduisait à l'augmentation de la production de l'entérotoxine HBL (Duport *et al.*, 2004).

5.2.2.2 Potentiel d'oxydoréduction

Un troisième facteur s'ajoutant à l'anaérobiose est le potentiel d'oxydoréduction (POR). C'est un paramètre intrinsèque à tout milieu biologique. Il peut intervenir à différents niveaux sur la cellule microbienne et principalement sur l'expression des gènes, modifiant ainsi potentiellement son aptitude à la croissance et à la production de molécules. La flore intestinale est en partie responsable de la variation du potentiel d'oxydoréduction. En effet, elle constitue un écosystème complexe d'environ 10¹⁴ bactéries, composée d'espèces aéro-anaérobies facultatives et anaérobies strictes (Magalhaes *et al.*, 2007). Elle est constituée essentiellement des phylums suivants : *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteriodes*, *Verrucomicrobacteria*, *Clostridum* et *Fusobacteria* (Eckburg *et al.*, 2005). La diversité de la distribution de ces bactéries le long du tube digestif est sous le contrôle de plusieurs paramètres, tel que l'acidité gastrique, le transit intestinal, les facteurs biotiques ou la prise d'antibiotiques. Ainsi, en fonction de la composition de la flore intestinale, la valeur du POR est variable. Dans l'intestin grêle, la flore intestinale est constituée essentiellement des genres *Lactobacillus*, *Streptococcus* et *Enterococcus*, la valeur du POR= -150 mV (Moriarty-Craige & Jones, 2004). Des travaux menés au laboratoire sur la réponse de *B.*

cereus au bas POR ont montré que celle-ci s'accompagnait de réajustements du catabolisme du glucose et d'une activation de la synthèse des entérotoxines Hbl et Nhe (Zigha *et al.*, 2006a).

La croissance et la production d'entérotoxines dans l'intestin grêle de l'homme pourraient refléter la capacité adaptative de *B. cereus* à un environnement anaérobie et réducteur.

5.2.3 Stress oxydant et régulation des gènes

Lorsqu'une molécule comporte un atome pouvant s'entourer d'un nombre variable d'électrons (par exemple C, S, P et les métaux Fe, Zn...), elle est dite sous forme oxydée ou réduite si ce nombre est respectivement bas ou élevé. Ainsi, une molécule est dite "oxydante" si elle a le pouvoir de gagner un électron. Les deux états (réduit et oxydé) d'une même molécule forment un "couple rédox" dont le "potentiel rédox" (noté E°) augmente avec le pouvoir oxydant de l'espèce oxydée du couple. Un oxydant ne peut oxyder que des molécules réduites qui ont un E° inférieur au sien. En pratique, les conditions rédox régnant dans la cellule sont évaluées par le rapport des concentrations des formes oxydée et réduite d'un couple rédox prépondérant comme celui du glutathion. Le couple glutathion réduit/glutathion oxydé (noté GSH/GSSG) agit comme un tampon rédox. Ainsi, ce que l'on nommera par la suite le "potentiel rédox" régnant dans la cellule va déterminer les proportions relatives des espèces oxydée ou réduite de chaque couple rédox, celles-ci dépendant du E° de ces derniers. Par exemple, selon le potentiel rédox intracellulaire, certains facteurs de transcription seront sous forme oxydée ou réduite.

De par sa configuration électronique, l'oxygène est avide d'électron (il revêt un caractère oxydant). La réduction incomplète de l'oxygène conduit à des espèces qui ont encore un caractère oxydant et qui sont de surcroît très réactives : H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène), OH^\bullet (radical hydroxyle) et, dans une moindre mesure, $O_2^{\bullet-}$ (radical anion superoxyde). Ces espèces, appelées "dérivés réactifs de l'oxygène" (DRO), pourront oxyder des macromolécules (ADN, lipides et protéines) (Vaughan., 1997). Le métabolisme normal de la cellule produit sans cesse des dérivés réactifs de l'oxygène.

On parle de "stress oxydant" lorsque l'homéostasie rédox est perturbée, soit par une surproduction de DRO, soit par une défaillance des systèmes antioxydants.

On sait qu'une protéine peut être sensible à l'oxydation au niveau de certains résidus, en particulier les résidus soufrés et principalement les cystéines. Des travaux ont montré que le potentiel rédox intracellulaire pouvait moduler l'activité *in vivo* de certains facteurs de transcription. Chez *E. coli*, la régulation en réponse à un stress oxydant de la transcription est maintenant bien comprise. Elle passe par deux facteurs de transcription, - SoxR (particulièrement sensible à $O_2^{\bullet-}$), et OxyR (particulièrement sensible à H_2O_2) qui ne sont opérationnels que sous leur forme oxydée (Farr & Kogoma, 1991).

La plupart des facteurs de transcription comporte dans leur séquence protéique des cystéines (sensibles aux variations rédox par leur groupe thiol) fonctionnellement très importantes. En effet, elles peuvent se situer dans le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription et assurer la reconnaissance d'un site donné par des interactions électrostatiques avec les bases de l'ADN. Elles peuvent aussi donner naissance à des ponts disulfures inter ou intramoléculaires essentiels pour la conformation tridimensionnelle de la protéine. Enfin, des cystéines participent à la coordination de cations métalliques (principalement Zn^{2+}). C'est le cas des protéines dites "à doigt de zinc" dont la conformation assurée par la coordination du cation peut permettre une interaction avec le grand sillon de l'ADN.

L'oxydation d'une cystéine peut donc modifier le comportement d'un facteur de transcription. La formation anormale d'un pont disulfure va perturber la fonction de la protéine en conduisant à une mauvaise conformation (éventuellement en empêchant une dimérisation passant par un pont disulfure). Elle peut aussi empêcher ou se substituer à la formation normale d'un autre pont à partir de la même cystéine, ce qui peut aussi perturber la conformation globale. Ainsi, la dimérisation d'un facteur de transcription (phénomène très fréquent) ou sa faculté de lier l'ADN peuvent être modifiées. La figure 8 schématise la formation d'un pont disulfure par oxydation des fonctions thiol de deux cystéines dans une séquence peptidique. La formation d'un pont disulfure à partir de deux cystéines s'accomplit spontanément en condition oxydante, en particulier en présence de dioxygène. La réduction d'un pont disulfure est aussi facile à faire avec des réducteurs "doux", tel que le 2-mercaptoéthanol ou le dithiothreitol (DTT).

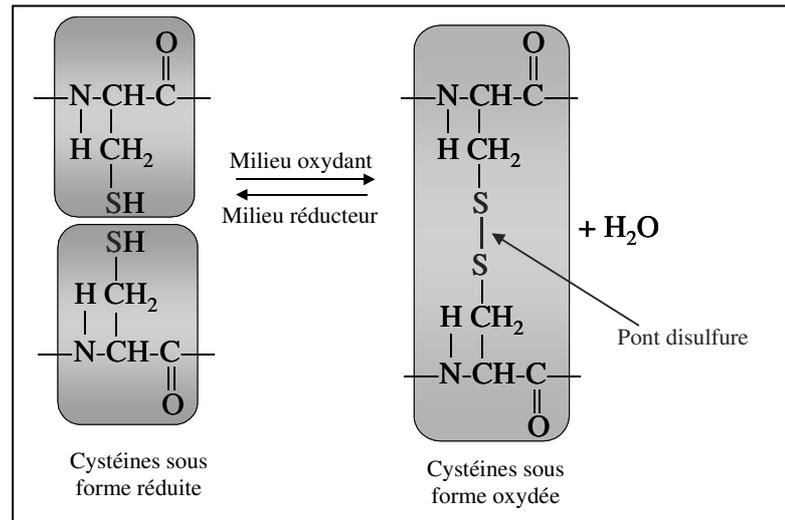


Figure 8 : Schématisation de la formation d'un pont disulfure.

Ainsi, un stress oxydant peut influencer le comportement de protéines possédant des cystéines critiques et ainsi affecter la signalisation cellulaire et la régulation des gènes.

Dans le tableau 4, sont répertoriés quelques agents oxydants et réducteurs utilisés en biologie dont ceux utilisés dans cette étude (en gras).

Composés	Potentiel standard	Composés	Potentiel standard
Oxygène	+820 mV	Hydrogène	-420 mV
Diamide	?	β-mercaptoéthanol	?
Peroxyde d'hydrogène	+1800 mV	Dithiothréitol	-330 mV
Radical hydroxyl	+2800 mV	Chlohydrate de cystéine	-270 mV
		5-déazaflavine	- 650 mV

Tableau 4 : Agents oxydants (A) et réducteurs (B) les plus connus.

6 Pouvoir pathogène de *B. cereus*

6.1 La toxine émétique

La toxine responsable du syndrome émétique ou céréulide est un dodécadepsipeptide (polypeptide qui renferme des liaisons esters et peptidiques) cyclique [(D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃] (Agata *et al.*, 1994). Il est très difficile de purifier cette toxine et pour cette raison encore, peu de choses sont connues à son sujet. Elle présente un faible caractère antigénique (Kramer, 1989) et est très résistante à la chaleur (120°C pendant 90 min), au pH

(2-11) ainsi qu'à des traitements à la trypsine ou à la pepsine. Le céréulide est produit dans l'aliment et il s'agit d'une véritable intoxication. Sa synthèse ne résulte pas de l'expression d'un gène mais de l'assemblage enzymatique de sous-unités par une peptide synthétase codée par les gènes *ces* portés par un plasmide (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). De structure semblable à la valinomycine produite par *Streptomyces griseus*, le céréulide agit en provoquant la formation d'un canal ionophore au travers de la membrane des mitochondries, ce qui bloque la phosphorylation oxydative (Mikkola *et al.*, 1999). Le céréulide stimule le nerf vague ou pneumogastrique, il provoque des lésions réversibles du foie et il est toxique pour les cellules NK (Natural Killer, cellules tueuses naturelles) (Shinagawa *et al.*, 1996).

6.2 Les entérotoxines

6.2.1 L'hémolysine BL

L'entérotoxine la mieux caractérisée est l'hémolysine BL (Hbl: H pour hémolysine, B pour binding component et L pour lytic component). Cette entérotoxine est constituée d'une partie responsable de l'attachement (B, d'un poids moléculaire 38 kDa) et de deux composés lytiques, L1 (poids moléculaire 38.5 kDa) et L2 (43.2 kDa) (Beecher & Macmillan, 1991). La synthèse de Hbl est sous la dépendance d'un opéron composé de quatre gènes : *hblC* (codant le composant L2), *hblD* (codant le composant L1), *hblA* (codant pour B) et *hblB* dont la fonction est inconnue. Cette toxine est hémolytique, dermonécrotique, elle augmente la perméabilité des capillaires et elle provoque une accumulation de liquide lorsqu'elle est administrée dans une anse intestinale ligaturée de lapin (Beecher *et al.*, 1995). La stœchiométrie des trois composants de l'entérotoxine Hbl n'a pas encore été déterminée mais il semblerait que l'activité hémolytique maximale soit obtenue quand les concentrations molaires des composants L1 et L2 sont inférieures à celle du composant B (Beecher & Wong, 1994). La figure ci-dessous illustre l'organisation génétique de l'opéron *hbl* ainsi que le devenir post-traductionnel des composants codés par cet opéron.

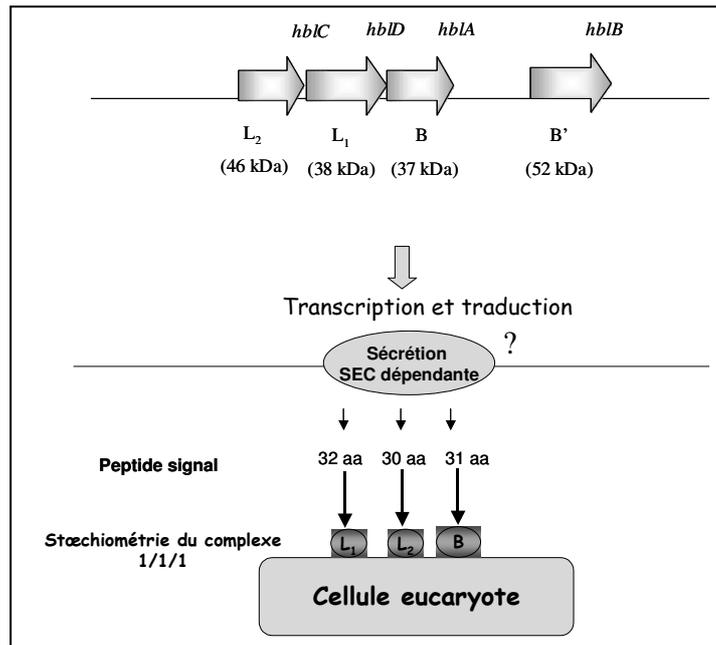


Figure 9 : Organisation génétique de l'opéron *hbl* et schématisation du devenir post-traductionnel des différents composants de la toxine Hbl.

6.2.2 L'enterotoxine non-hémolytique

La toxine Nhe (Non-Haemolytic Enterotoxin) est elle aussi tripartite. Elle est constituée d'un composant NheA (codé par *nheA*) similaire au composant L2 de la toxine Hbl et d'un composant NheB (codé par *nheB*) similaire au composant L1. L'opéron *nhe* porte également le gène *nheC* qui pourrait coder pour une protéine similaire au composant B de la toxine Hbl (Granum *et al.*, 1999; Moravek *et al.*, 2004). La toxine Nhe est aussi cytotoxique que la toxine Hbl, mais elle est non hémolytique. L'activité cytotoxique maximale est observée sur des cellules Vero lorsque le ratio molaire entre NheA, NheB et NheC est de 10 :10 :1 (Lindback *et al.*, 2004).

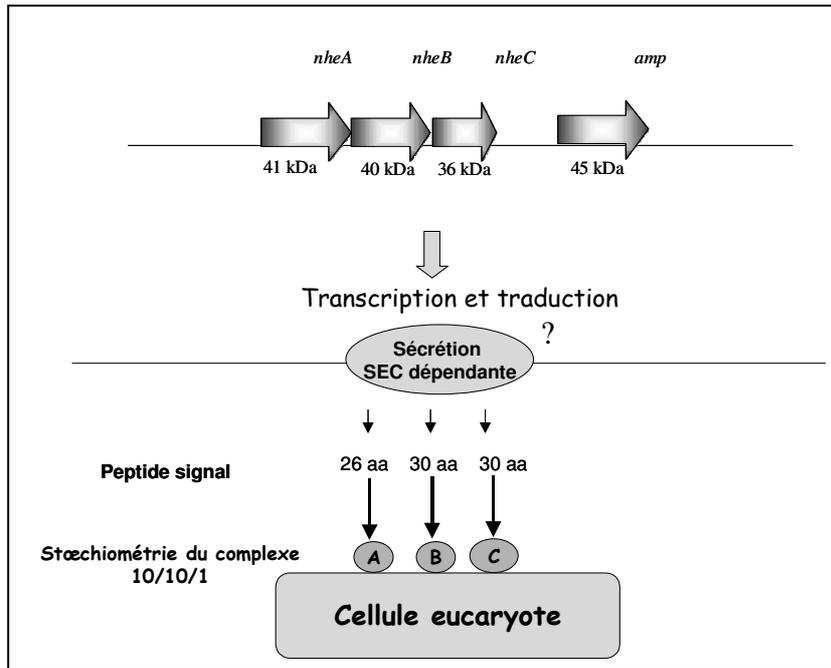


Figure 10 : Organisation génétique de l'opéron *nhe* et schématisation du devenir post-traductionnel des différents composants de la toxine Nhe.

6.2.3 La cytotoxine K

La cytotoxine K, codée par le gène *cytK*, a été isolée en 1998 d'une souche de *B. cereus* ayant provoqué une toxi-infection alimentaire (3 décès) dans une maison de retraite française (Lund *et al.*, 2000). Cette toxine de 34 kDa appartient à la famille des "bêta-barrel pore-forming toxins". Elle est dermonécrotique et fortement hémolytique vis-à-vis des hématies de bovins et de lapins. Elle est également toxique pour les cellules de l'épithélium intestinal et pour les cellules Vero.

6.2.4 L'enterotoxine T et l'enterotoxine FM

La toxine BceT, codée par le gène *bceT*, a un poids moléculaire de 41 kDa (Agata *et al.*, 1995). Elle est cytotoxique pour les cellules Vero, augmente la perméabilité capillaire, provoque une accumulation de liquide lorsqu'elle est administrée dans une anse intestinale ligaturée de souris, mais n'est pas hémolytique. Cette toxine est dépourvue de séquence signal et elle n'est libérée qu'après une lyse des cellules bactériennes.

La toxine FM caractérisée par Shinagawa *et al* est une toxine constituée d'une seule sous-unité d'un poids moléculaire de 45 kDa. Cette toxine semble identique à la toxine EntFM

décrite par Asano *et al* chez la souche FM1. Elle est inactivée par la trypsine, la pepsine, les pH acides et elle est thermolabile. Son pouvoir entérotoxique n'a cependant pas été démontré.

6.3 Autres facteurs de virulence

B. cereus peut produire une variété d'autres facteurs de virulence regroupant des phospholipases spécifiques aux phosphatidylcholine et phosphatidylinositol, des sphingomyelinases, des collagénases, des protéines hémolytiques (céréolysine O, hémolysine II...) ou encore des protéases comme la métalloprotéase InhA1 qui confère à la bactéries la capacité d'échapper aux macrophages (Beecher *et al.*, 2000; Gohar *et al.*, 2002; Pomerantsev *et al.*, 2003; Ramarao & Lereclus, 2005).

Chapitre 2 : Régulation du pouvoir pathogène de *Bacillus cereus*

1. Le regulon PlcR

1.1. PlcR : un activateur transcriptionnel pléiotrope

PlcR (Phospholipase c Regulator) est le régulateur majeur de la virulence chez *B. cereus* (Lereclus *et al.*, 1996). Il intègre un système de quorum sensing permettant à *B. cereus* de réguler l'expression des gènes de virulence en fonction de la densité de la population bactérienne. PlcR permet l'activation de l'expression d'un regulon comprenant plusieurs facteurs de virulence et incluant Hbl, Nhe, CytK, des phospholipases et protéases (Agaisse *et al.*, 1999; Gohar *et al.*, 2002; Gohar *et al.*, 2008; Lereclus *et al.*, 1996). L'analyse de la séquence du génome de *B. cereus* et du protéome extracellulaire indiquent que plus de 50 gènes sont potentiellement régulés par PlcR. Chaque région promotrice des gènes régulés par le regulon PlcR possède une courte séquence fortement conservée, appelée boîte PlcR, qui constitue la cible reconnue par la protéine PlcR. Il s'agit d'un motif palindromique (TATGnAnnnnTnCATATA) situé en amont des gènes cibles (Agaisse *et al.*, 1999; Gohar *et al.*, 2008; Slamti & Lereclus, 2002). L'analyse du génome de *B. cereus* ATCC 14579 a montré que la boîte PlcR est située en amont de 26 gènes et de 24 opérons putatifs. La fonction assignée à ces gènes a été déterminée expérimentalement ou par prédiction de séquence.

Les séquences présentées dans la figure 11, sont les régions promotrices de gènes régulés par PlcR. On retrouve pour exemple, les gènes codant pour les entérotoxines Hbl et Nhe. Sur ces séquences, la boîte PlcR est particulièrement mise en évidence.

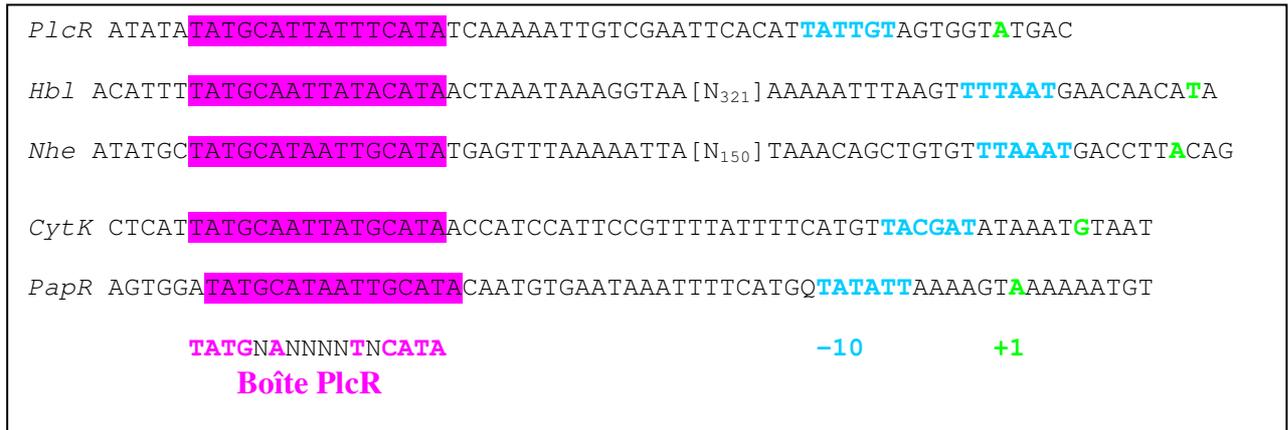


Figure 11 : Région promotrice de gènes dont la transcription est sous le contrôle de PlcR. Les nucléotides conservés de la boîte PlcR sont en rose. La séquence cible de fixation du facteur de transcription sigmaA (-10) est en bleu et le site d'initiation de la transcription est en vert (+1).

En 2003, Ivanova *et al* ont dressé une liste exhaustive des membres potentiels du régulon PlcR. Ceux-ci se répartissent en 10 classes de protéines de fonction connue et une classe de protéine de fonction inconnue. Il est intéressant de noter qu'en plus des familles de protéines comme les toxines, les phospholipases, les protéases et les protéines de chimiotactisme, le régulon PlcR est potentiellement composé de transporteurs, de protéines impliquées dans le métabolisme et de régulateurs liés à la sporulation (Ivanova *et al.*, 2003).

1.2 Mécanisme d'action de PlcR

L'activation du gène *plcR* est sous la dépendance d'un peptide appelé PapR (Peptide activating PlcR). Le peptide PapR est codé par le gène *papR*, lui même régulé par PlcR, sous la forme d'un précurseur de 48 acides aminés possédant la séquence signal caractéristique des peptides excrétés. Dans le milieu extracellulaire, PapR se présente sous la forme d'un peptide de 24 acides aminés qui subit des phénomènes de maturation pour donner naissance à des hexapeptides. Ces pentapeptides s'assemblent sous la forme de pentamères et sont réimportés dans la cellule grâce à un système de perméation d'oligopeptides (Opp). Dans la cellule, le peptide s'unit à la protéine PlcR et permet à cette dernière de se fixer sur la boîte PlcR située en amont du gène *plcR*. Cette fixation active la transcription de *plcR* et conduit à la synthèse de la protéine PlcR qui, à son tour, va permettre l'expression d'autres gènes. Il existe une spécificité d'interaction PlcR-PapR. En effet, quatre types d'hexapeptides (ADLPFEF,

réimportés dans les cellules, ce qui va déclencher l'expression du régulon PlcR et l'activation des gènes qu'il contrôle.

1.3. Bases moléculaires du système PlcR-PapR

PlcR est composé d'un domaine N-terminal de liaison à l'ADN (domaine HTH) et d'un domaine C-terminal de régulation. Ce dernier est lui-même composé de cinq motifs TPR (Tetratricopeptide Repeat) (Bouillaut *et al.*, 2008; Declerck *et al.*, 2007). Les motifs TPR correspondent à des structures conservées impliquées dans les interactions protéine-protéine ou protéine-peptide.

Une récente analyse cristallographique a permis de déterminer les bases moléculaires du système PlcR-PapR (figure 13 A). Leur étude structurale par rayons X montre comment le peptide-signal extracellulaire PapR se fixe sur le régulateur de transcription PlcR, et suggère comment cette interaction engendre la transcription de gènes de virulence. La liaison du peptide PapR avec PlcR entraîne un rapprochement et donc une fermeture des domaines TPR. L'ouverture et la fermeture de ces domaines TPR conférerait un mouvement de levier aux domaines HTH via leur linker. En l'absence de PapR, les domaines TRP sont donc dits "ouverts" et les domaines N-terminaux des linkers sont joints. Cette configuration rapproche les domaines HTH et les stabilise dans une position inactive. PlcR ne peut pas lier l'ADN. En présence de PapR le levier est inversé et PlcR est capable de lier l'ADN (figure 13 B).

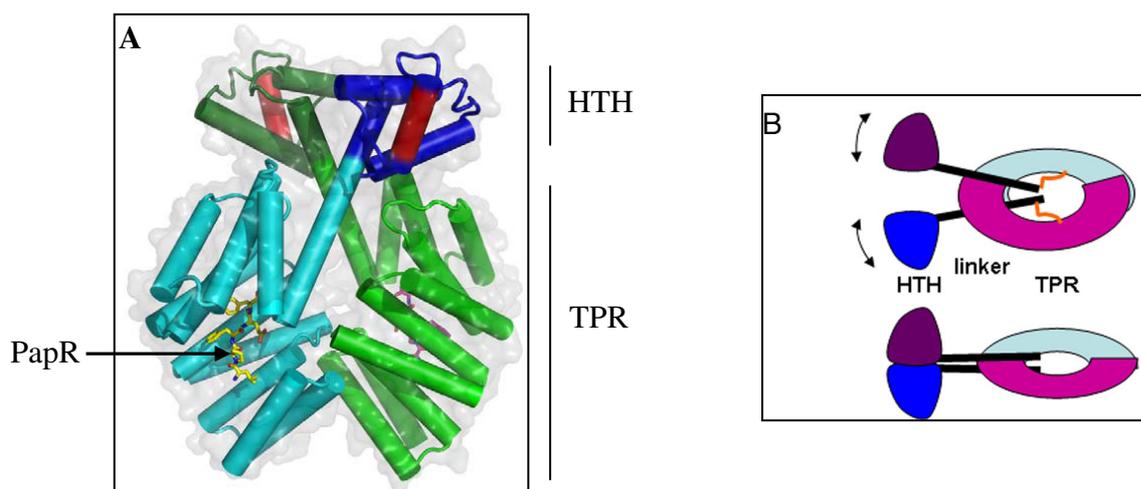


Figure 13 : Effet de la fixation de PapR sur PlcR. A : Structure cristallographique du dimère de PlcR, ayant lié le peptide PapR (jaune et violet). Les domaines TPR sont colorés en bleu et vert clair, et les domaines HTH en bleu et vert foncé. L'hélice qui contribue majoritairement à la fixation de l'ADN est colorée en rouge (d'après S.T. Arold). B : Schéma illustrant comment la fixation de PapR ré-arrange la disposition des domaines HTH.

1.4. Importance et rôles du régulon PlcR au sein du groupe *B. cereus*

Le système PlcR-PapR est un système de "quorum sensing" qui contrôle la virulence des bactéries du groupe *B. cereus*. Les bactéries ayant développé ces systèmes de régulation génétiques, peuvent ainsi communiquer entre elles et voire, la population bactérienne adopter un comportement d'organisme multicellulaire. Ces systèmes de communication sont utilisés pour coordonner, au sein d'une population bactérienne, des fonctions essentielles pour l'adaptation aux conditions environnementales, comme la virulence, le transfert de gènes, la production d'antibiotiques ou la sporulation. Les bactéries peuvent, par exemple, se multiplier docilement dans l'intestin humain jusqu'à ce que leurs systèmes de communication leur indiquent qu'elles sont suffisamment nombreuses pour faire face au système immunitaire humain et c'est à ce moment que chaque individu de toute la communauté bactérienne commence à produire un ensemble de facteurs de virulence (toxines, hémolysines...).

Le gène *plcR* a été trouvé chez les différentes espèces bactériennes appartenant au groupe *B. cereus*. Chez *B. anthracis*, le gène *plcR* est tronqué et son produit n'est pas fonctionnel. Une étude du régulon PlcR révèle que les gènes régulés par PlcR sont présents chez *B. anthracis* et peuvent être réactivés par l'introduction du gène *plcR* de *B. thuringiensis* (Mignot *et al.*, 2001). La délétion du gène *plcR* chez ces bactéries conduit à une diminution du pouvoir pathogène chez l'insecte et la souris, mais aussi dans certains cas, des endophtalmites (Callegan *et al.*, 2003).

Comme l'écrivent Slamti *et al.*, "D'un point de vue finaliste, la sélection d'un tel système de régulation permettrait donc aux bactéries du groupe *B. cereus* de s'engager dans un processus infectieux, si les conditions environnementales sont favorables et seulement si le nombre de bactéries présentes est "jugé" suffisant pour que l'action engagée ait une chance de succès" (Slamti *et al.*, 2003). En d'autres termes, *B. cereus* se comporte comme certaines espèces animales qui chassent en meute et n'attaquent que lorsque le gibier n'a aucune chance de résister compte tenu du nombre des agresseurs.

La majorité des gènes régulés par PlcR, code pour des protéines sécrétées ou localisées dans la membrane cellulaire, c'est à dire à l'interface entre la bactérie et son environnement incluant les hôtes eucaryotiques. Les protéases, les phospholipases, les enterotoxines et les hémolysines sont retrouvées à cette interface. Ces enzymes sont impliquées dans la dégradation des tissus de l'hôte. Les phospholipases et les sphingomyelinases induisent l'hémolyse et la métalloprotéase InhA2 est impliquée dans la protection de la cellule bactérienne contre les défenses immunitaires de l'hôte. Les protéines impliquées dans la synthèse du peptidoglycane sont aussi impliquées dans la protection de la cellule. De plus,

trois peptides antibactériens et quatre transporteurs de drogues s'avèrent être contrôlés par PlcR et protègent ainsi la cellule de la compétition avec d'autres bactéries.

Ces fonctions fonctionnent en synergie de manière à apporter nutriments et protection à la bactérie dans un environnement hostile (Gohar *et al.*, 2008). Ces différentes fonctions attribuées à l'organisation du régulon PlcR sont répertoriées figure 14.

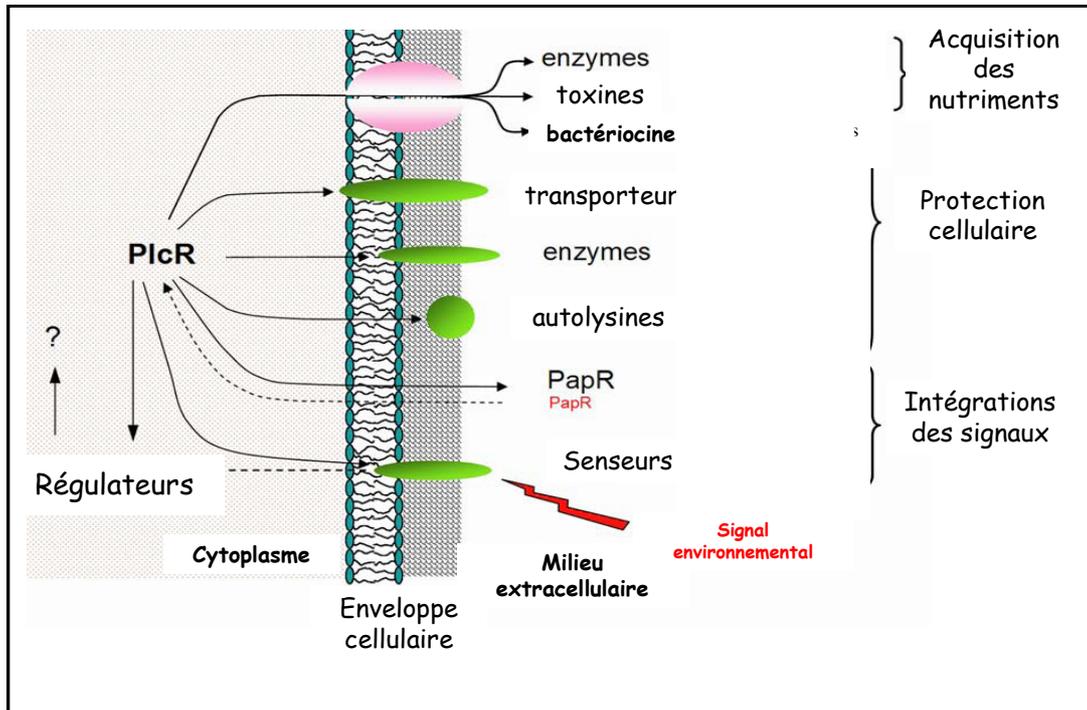


Figure 14 : Organisation du régulon PlcR. D'après (Gohar *et al.*, 2008).

En plus de ces fonctions de protection, Gohar *et al* ont montré en 2008 que quatre senseurs appartenaient au régulon PlcR. Un d'entre eux (YufL) appartient à un système à deux composants et les autres sont des protéines possédant une activité chimiotactique (McpA et TlpA) et un régulateur produisant un messager secondaire.

Ainsi le système de quorum sensing PlcR/PapR permet l'intégration de nombreux signaux et l'adaptation continue de la cellule à son environnement

1.5. Les facteurs de virulence échappant au contrôle de PlcR

Si PlcR régule la transcription de nombreux gènes codant pour des facteurs de virulence chez *B. cereus* et *B. thuringiensis*, certains se voient régulés via d'autres systèmes. C'est le cas du céréulide, la toxine émétique et de la métalloprotéase InhA1, un facteur de virulence impliqué dans le contournement du système immunitaire de l'hôte (Ramarao & Lereclus, 2005).

Une étude menée en 2009 a permis de mettre en évidence le rôle des facteurs de transcription PlcR, Spo0A et AbrB sur la production du céréulide et la transcription du gène *ces* codant pour la peptide synthétase responsable de son assemblage. Les résultats ont montré que le céréulide n'est pas sous le contrôle du régulateur PlcR mais appartient au régulon Spo0A-AbrB (lacking). Dans ce système de régulation, Spo0A est un répresseur du facteur AbrB qui est lui-même capable d'agir directement et négativement sur la transcription du gène *ces* via sa fixation sur sa région promotrice. En affectant négativement la transcription de *ces*, AbrB agit comme un répresseur de la production du céréulide.

L'autre facteur de virulence dont la régulation est indépendante de PlcR est InhA1. Il a été montré que chez *B. thuringiensis*, son expression est indirectement régulée par AbrB qui régule *SinR* capable à son tour de réguler l'expression de *InhA1* (Grandvalet *et al.*, 2001).

2. Le système à deux composants ResDE

Il a été montré que le pouvoir pathogène de *B. cereus* était dépendant des facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la concentration en glucose ou la tension en oxygène. Des travaux récents ont montré que la production des toxines Hbl et Nhe était dépendante du métabolisme et que leur production était plus importante lorsque *B. cereus* était cultivé en anaérobiose (Duport *et al.*, 2004). Cette augmentation de la production des entérotoxines est d'autant plus marquée que le potentiel d'oxydoréduction est faible (Zigha *et al.*, 2006a). Ces données sont en accord avec les conditions rencontrées dans le milieu intestin, caractérisé par un environnement anaérobie et fortement réducteur (-150 mV). Il semblerait que ce soit dans ce milieu que *B. cereus* produise les toxines responsables du syndrome diarrhéique. Des régulateurs intervenant dans la réponse à ces deux facteurs (anaérobiose et POR) ont été identifiés. Il s'agit du système à deux composants ResDE et de la protéine Fnr (Fumarate Nitrate Reductase) (Duport *et al.*, 2006; Zigha *et al.*, 2007).

2.1 Les systèmes de régulation à deux composants: généralités

2.1.1 Mécanisme général d'un système à deux composants

L'adaptation à l'environnement est essentielle pour la survie de tout organisme. Pour s'adapter rapidement aux milieux extrêmement variés et aux fluctuations environnementales, les procaryotes ont adopté des systèmes élaborés, capables de détecter et de réagir aux molécules vitales ou toxiques à leur développement. Outre les facteurs de stress tels que la température, le pH, la concentration de nutriments, la cellule doit s'adapter aux variations de gaz diatomiques. Très souvent, différents facteurs de stress agissent sur une bactérie simultanément et affectent des processus cellulaires, nécessitant l'interaction de systèmes variés de réponse et de régulation. Ces composants de régulation incluent souvent des systèmes de régulation à deux composants (two-component regulatory systems ou TCS), responsables de la régulation de l'expression de nombreux gènes.

Historiquement, le terme "système à deux composants" a été utilisé la première fois pour décrire une nouvelle classe de systèmes régulateurs chez les procaryotes (Nixon *et al.*, 1986; Parkinson & Kofoed, 1992; Stock *et al.*, 1989). A ce jour, plusieurs centaines de systèmes à deux composants ont été décrits chez la plupart des organismes vivants. Chez les Archaea et les eubactéries (Alex & Simon, 1994; Bourret *et al.*, 1989; Loomis *et al.*, 1997) chez des organismes eucaryotes où ils constituent 1% des protéines codées (West & Stock, 2001), comme dans la plante *Arabidopsis thaliana* où ils jouent un rôle dans la régulation de l'utilisation de l'éthylène (Chang & Shockey, 1999) et la levure *Saccharomyces cerevisiae* où ils interviennent dans l'osmorégulation (Ota & Varshavsky, 1993). Ces exemples donnent à penser qu'un mode de transmission de certains signaux similaires à celui des bactéries pourrait être aussi présent chez certains organismes eucaryotes. Les systèmes à deux composants représentent la forme majoritaire des voies de signalisation cellulaire chez les bactéries et plus de 60 de ces systèmes ont été répertoriés uniquement chez *Escherichia coli* (Mizuno & Tanaka, 1997; West & Stock, 2001). Ils sont présents chez des bactéries Gram-négatives et Gram-positives dans des fonctions aussi différentes que le chimiotactisme (Bischoff & Ordal, 1991), la compétence (Weinrauch *et al.*, 1990), l'osmorégulation (EnvZ/OmpR) (Parkinson & Kofoed, 1992; Stock *et al.*, 1989) et la sporulation (Burbulys *et al.*, 1991), et contrôlent en plus la régulation de l'expression de toxines et de protéines impliquées dans la pathogénicité (virulence, résistance aux antibiotiques).

2.1.2 Transduction du signal

Un système de transduction du signal fonctionne comme une voie d'information intracellulaire qui relie un stimulus extérieur à une réponse adaptative. En dépit de la grande diversité du nombre de stimuli et de réponses, un petit nombre de stratégies moléculaires est mis en oeuvre pour la signalisation. La phosphorylation transitoire est une des stratégies fondamentales. Beaucoup de processus de transduction de signal procaryotes impliquent des protéines kinases qui s'autophosphorylent et phosphorylent des résidus spécifiques d'autres protéines : sérine, thréonine, tyrosine, et de ce fait régulent leur activité.

Les TCS sont structurés autour de deux protéines conservées: une histidine kinase (HK) et un régulateur de réponse (RR). Les stimuli de l'environnement sont détectés par le domaine senseur de l'HK et provoquent l'autophosphorylation ATP-dépendante d'un résidu histidine (H) dans l'histidine kinase. Le régulateur de réponse permet ensuite le transfert d'un groupe phosphate à partir de l'histidine phosphorylée vers son propre résidu aspartate. La phosphorylation du domaine de RR active alors un domaine effecteur qui induit une réponse spécifique.

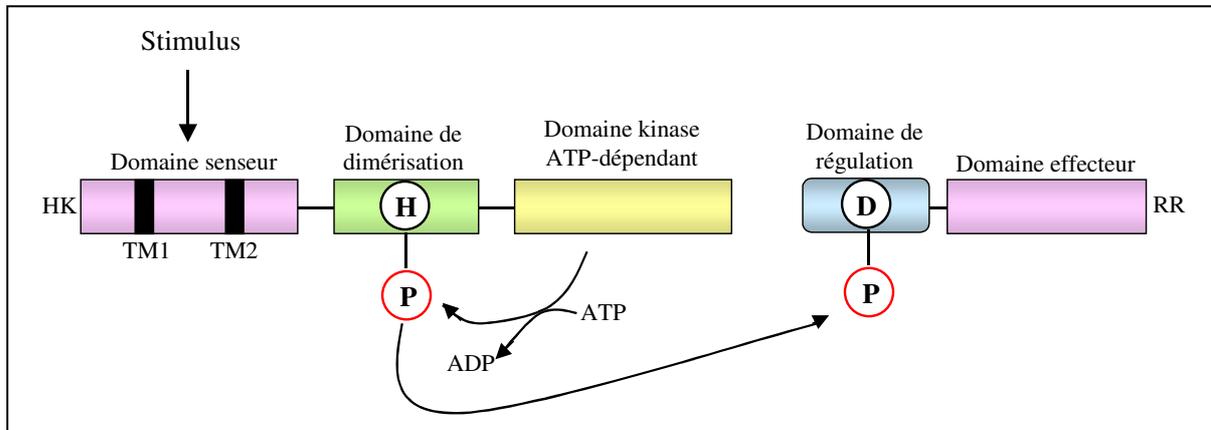


Figure 15 : Schéma général d'un système à deux composants. La perception du signal induit l'autophosphorylation de l'histidine kinase (HK) sur un résidu histidine (H). Le groupement phosphate est ensuite transféré vers un résidu aspartate (D) du régulateur de réponse (RR) et modifie ses propriétés de liaison à l'ADN. La transcription d'un ensemble de gènes cibles sera alors modifiée en réponse au stimulus perçu par le système à deux composants. D'après (Hoch & Varughese, 2001).

Comme la plupart des protéines de transduction du signal, les systèmes à deux composants sont modulables au niveau de leur architecture. Des arrangements différentiels de domaines conservés au sein d'une protéine ou l'intégration différente de protéines dans une

voie de signalisation, permettent une adaptabilité du schéma basique des systèmes. Dans la majorité des cas, l'histidine kinase est dite bifonctionnelle et peut, en plus de la phosphorylation, catalyser la déphosphorylation du régulateur de réponse. Ainsi, pour ce type d'histidine kinase, le stimulus peut réguler l'activité kinase et phosphatase. Cette double activité est connue sous le nom de "phospho-relais".

Il existe une variante plus complexe que le système décrit ci-dessus. Dans quelques cas, il a été montré que le système de phosphorylation était à composants multiples et commençait souvent avec une histidine-kinase hybride comprenant un domaine RR additionnel en C-terminal. Il y a dans ce cas un transfert de phosphate supplémentaire et le schéma implique la présence d'une protéine Hpt (histidine phosphotransférase) intermédiaire (Laub & Goulian, 2007). Afin d'illustrer le mécanisme de phospho-relais de ces deux types de systèmes à deux composants bactériens, j'ai choisi de présenter deux systèmes représentatifs et bien décrits : le système EnvZ/OmpR et le système ArcAB d'*E. coli*.

2.1.3 Description de deux systèmes à deux composants modèles

2.1.3.1 Le système à deux composants EnvZ/OmpR

Le système à deux composants EnvZ/OmpR d'*E. coli*, impliqué dans la réponse à l'osmolarité, est représentatif du schéma basique retrouvé dans la plupart des systèmes à deux composants et notamment dans le système ResDE sur lequel porte une partie de ce travail de thèse. OmpR est un des membres d'une large famille de régulateurs de réponse portant le même nom. Chez *E. coli*, il existe au moins 15 protéines pour lesquelles la séquence en acides aminés montre de fortes similarités avec la séquence de OmpR. Parmi ces protéines on trouve, PhoB, PhoP, KdpE, ArcA et CreB. De plus, des membres de cette famille ont été retrouvés dans d'autres espèces bactériennes ainsi que chez quelques eucaryotes. Ceci suggère que les membres de la famille de régulateurs de réponse OmpR, sont parmi les régulateurs de transcription les plus répandus.

La partie C-terminale de l'HK EnvZ comporte deux domaines (figure 16). Le premier contient le résidu histidine, site de l'autophosphorylation. Le deuxième domaine renferme une région conservée N G1 F G2 formant une poche capable de capturer une molécule d'ATP qui est utilisée pour la phosphorylation du résidu histidine. Le groupement phosphate est ensuite transféré sur un résidu aspartate conservé du domaine régulateur (région N-terminale) de la protéine régulatrice de réponse OmpR. La région C-terminale de OmpR (domaine effecteur) est un domaine de liaison à l'ADN et permet à la protéine de modifier l'expression de gènes cibles (ex : porines). En réponse au stimulus, EnvZ transmet le signal à son partenaire OmpR

en le phosphorylant. Cette phosphorylation augmente la constante d'affinité de OmpR à l'ADN. OmpR phosphorylé (OmpR-P) va ainsi pouvoir moduler l'expression de gènes cibles.

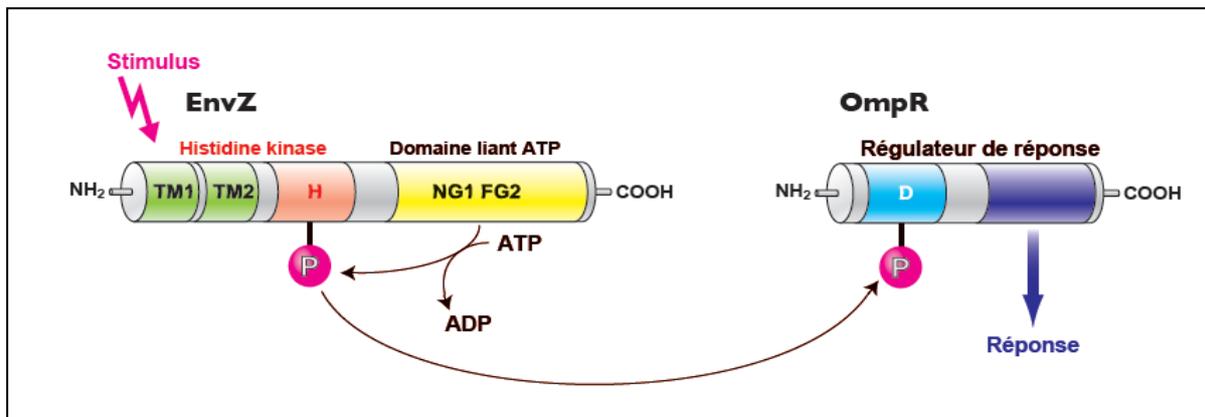


Figure 16: Représentation du mécanisme de phospho-relais du système typique à deux composants EnvZ/OmpR d'*E. coli*, consistant en un senseur à histidine kinase transmembranaire dimérique (HK) et un régulateur de réponse cytoplasmique (RR). Le monomère représentatif de HK est désigné par des segments transmembranaires TM1 et TM2. Une séquence conservée N, G1, F, G2 est localisée dans le domaine liant l'ATP. HK catalyse l'autophosphorylation ATP-dépendante d'un résidu spécifique histidine (H). Le groupe phosphate (P) est alors transféré vers un résidu spécifique aspartate (D), localisé dans le domaine régulateur conservé du RR, d'après (West & Stock, 2001).

2.1.3.1.1 Les histidine-kinases : structure et fonction

Une récente étude génomique a permis d'identifier environ 350 membres de la famille des histidine-kinases. La plupart représente des protéines membranaires et homodimériques. Elles contiennent un domaine senseur N-terminal périplasmique couplé à un domaine kinase C-terminal cytoplasmique. Les domaines senseurs ont des séquences variables reflétant bien la diversité des signaux environnementaux qu'ils doivent percevoir. A l'inverse, le domaine kinase est plus conservé et peut être caractérisé par un ensemble de motifs très conservés au niveau de la séquence primaire. Il s'agit des motifs H, N, G1, F et G2 (Figure 17).

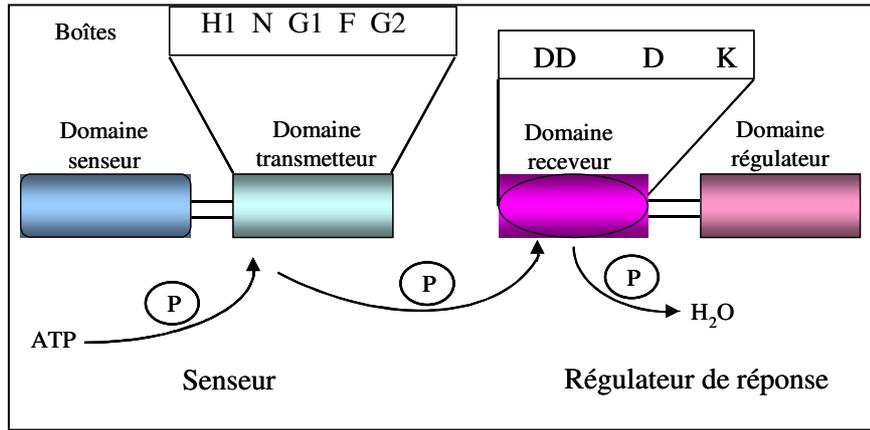


Figure 17: Schéma illustrant l'organisation des domaines des histidine-kinases et des régulateurs de réponse typiques des systèmes à deux composants (West & Stock, 2001).

Toutes les histidine-kinases présentent cette signature. Sur la base de l'organisation de leur domaine, ces HK ont été groupées en deux classes majeures. EnvZ appartient à la classe I. Dans celle-ci, la région contenant le motif H (résidu histidine, site de l'autophosphorylation) est directement liée à la région contenant les 4 autres motifs. Cette dernière région est aussi appelée domaine CA pour "Catalytic and ATP-binding". Dans la classe II représentée par CheA, la région contenant le motif H est plus distante du domaine CA (Dutta *et al.*, 1999). Chez EnvZ, la région contenant l'histidine kinase (H), consiste en deux domaines fonctionnels complémentaires : un domaine de 67 résidus que l'on appelle aussi le domaine DHp pour "Dimerization and Histidine phosphotransfert" et un domaine de 161 résidus qui correspond au domaine CA (figure 18). Le domaine DHp est donc le site de dimérisation de EnvZ ainsi que le site où a lieu la réaction de *trans* phosphorylation dépendante de l'ATP.

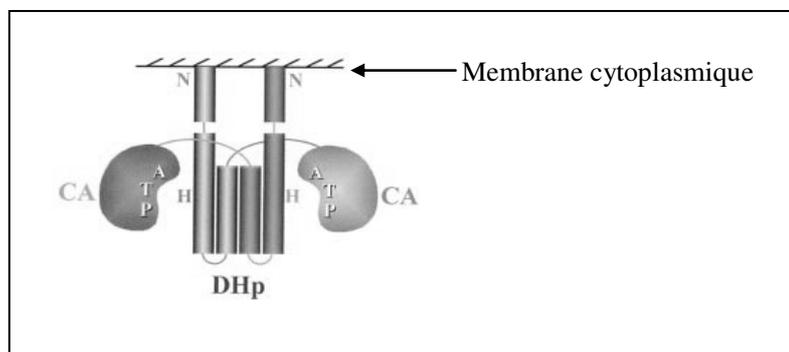


Figure 18: Schéma illustrant l'organisation des domaines de l'histidine kinase EnvZ. Seule la région cytoplasmique est représentée. Les deux monomères présentent deux couleurs différentes (Dutta *et al.*, 1999).

2.1.3.1.2 Les régulateurs de réponse: structure et fonction

Plus de 400 RRs différents ont été identifiés jusqu'à présent. Les RRs sont en général situés à la fin des chaînes de phosphotransfert. Ces protéines possèdent en général deux domaines dont un domaine receveur N-terminal conservé d'environ 125 acides aminés et un domaine effecteur C-terminal variable en raison de la variabilité des promoteurs régulés.

Le domaine linker du régulateur OmpR est sensible à la protéolyse et ceci est altéré par la phosphorylation et la liaison à l'ADN. Ce linker semble avoir un rôle important dans la communication entre les deux domaines du régulateur. Chez OmpR il présente une longueur de 15 acides aminés et est plus long que celui de PhoB qui présente une longueur de 9 acides aminés seulement (Kenney, 2002).

La structure du domaine C-terminal du régulateur OmpR est à présent bien connue. Comme le montre la figure 19, le motif de liaison à l'ADN, appelé wHTH (winged Helix Turn Helix), est formé de plusieurs feuilletts β anti-parallèles et de trois hélices α . Le domaine N-terminal est composé de cinq brins β parallèles entourés de cinq hélices α et comporte le site de phosphorylation de la protéine (aspartate 55 pour OmpR). Grâce au domaine HTH, OmpR possède la capacité de se fixer de manière spécifique à l'ADN. OmpR initie la transcription en établissant un contact direct avec la sous-unité α de l'ARN polymérase. Des expériences de mutations ont permis de montrer que la boucle qui relie les hélices 2 et 3 du domaine C-terminal de OmpR assurait l'interaction avec la sous-unité α de l'ARN polymérase (Pratt & Silhavy, 1995).

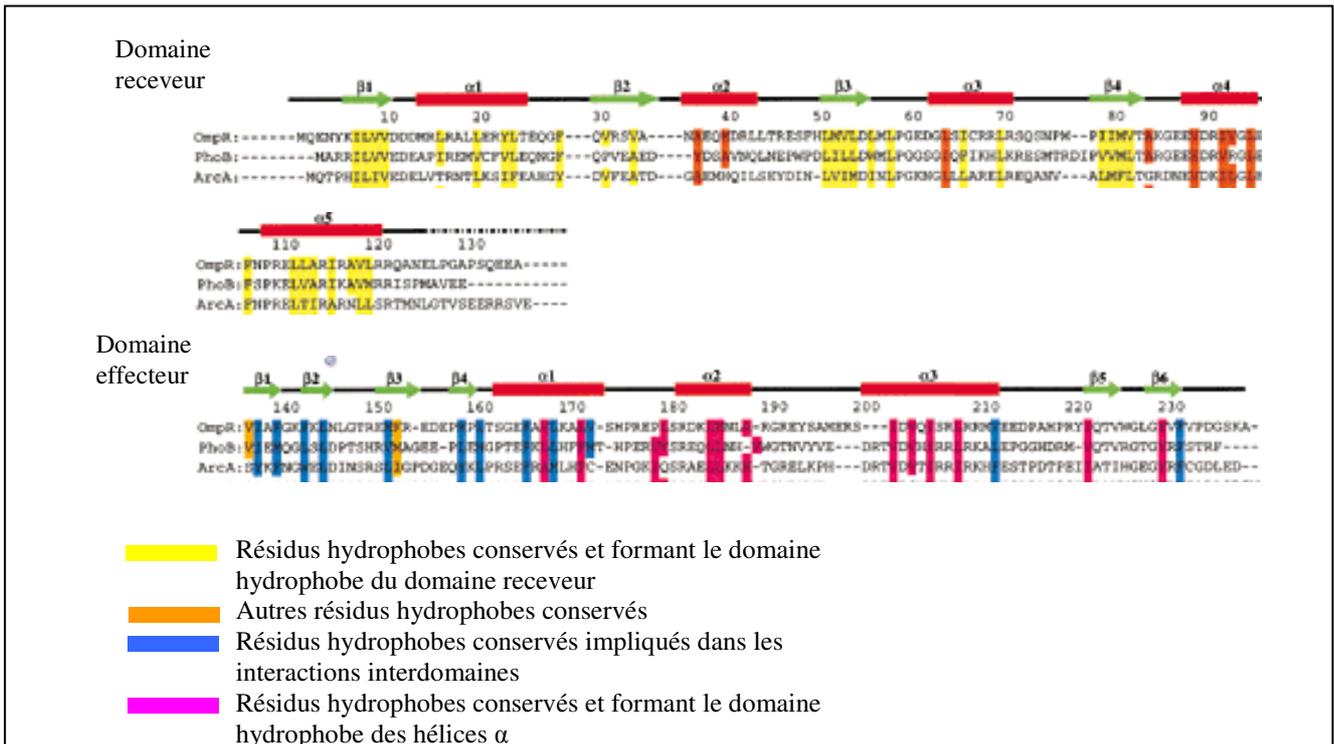


Figure 19: Alignement des séquences des régulateurs de réponse OmpR, PhoB et ArcA d'*E. coli* d'après (Itou & Tanaka, 2001).

2.1.3.2 Le système à deux composants ArcAB

Le système à deux composants ArcAB d'*E. coli* est un exemple plus complexe de ce type de signalisation. Il assure une réponse aux variations de la teneur en oxygène. Avant d'être transféré sur le résidu aspartate du RR ArcA, le groupement phosphate subit un transfert en cascade au sein de la protéine HK ArcB entre un premier résidu histidine, site de l'autophosphorylation, un résidu aspartate, et un deuxième résidu situé dans un domaine appelé HPT pour "Histidine-containing Phosphotransferase".

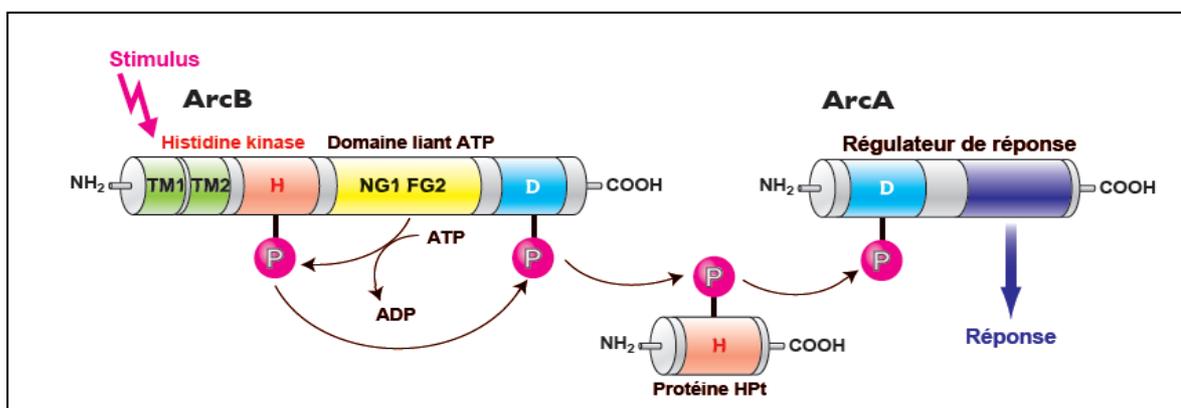


Figure 20 : Représentation du mécanisme de phospho-relais du système à deux composants ArcB/ArcA d'*E. coli*, qui commence souvent avec une HK hybride, un domaine

RR additionnel en C-terminal. Il y a dans ce cas plus d'une réaction de transfert de phosphate histidine vers l'aspartate et le schéma implique une protéine HPt (histidine phosphotransférase) intermédiaire (Perraud *et al.*, 1999).

2.1.4 Les systèmes à deux composants et la virulence

Les systèmes à deux composants représentent les seuls éléments communs impliqués dans la régulation d'un large spectre de systèmes de virulence. Ceci implique la possibilité qu'un inhibiteur commun à ces systèmes puisse être utilisé pour atténuer voire éliminer la virulence chez une grande variété de pathogènes. Les systèmes à deux composants sont ubiquitaires chez les bactéries. Les protéines les constituant présentent des séquences communes particulièrement les acides aminés localisés au niveau du site actif. Le tableau suivant énumère la majorité des systèmes à deux composants impliqués dans la régulation de la virulence.

microorganisme	SDC senseur/régulateur	Régulation
<i>Staphylococcus aureus</i>	srrA/srrB	régulateur global de la virulence
	saeS/saeR	exoprotéines
	arlS/arlR	exoprotéines
	agrA/agrC	exoprotéines
<i>Salmonella sp</i>	phoQ/phoR	virulence
	pmrB/pmrA	virulence
	envZ/ompR	virulence
<i>Listeria monocytogenes</i>	resD/resE	virulence
	virS/virR	atténuation de la virulence
	lisK/lisR	atténuation de la virulence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	prpA/prpB	virulence, mobilité cellulaire et quorum sensing
	algR/agrD	capsule
	pilS/pilR	Formation des pili et fimbriae
<i>Clostridium perfringens</i>	VirS/VirR	toxines
<i>Escherichia coli</i>	envZ/ompR	virulence
	cpxR/cpxA	capsule
	rscB/rscC	capsule
<i>Vibrio cholerae</i>	arcA/arcB	virulence
	toxS/toxR	toxines, pili, hémolysines
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ntrA/ntrC	uréase
<i>Helicobacter pylori</i>	flgS/flgR	flagelles
	arsS/arsR	uréase et autres gènes de résistance à l'acidité
<i>Enterococcus faecalis</i>	vanR/vanS	résistance à la vancomycine
<i>Bacillus anthracis</i>	brrA/brrB (ou ResDE)	virulence

Tableau 5 : Systèmes à deux composants impliqués dans la virulence, d'après (Barrett & Hoch, 1998).

Des homologues du système ResDE, impliqués dans la régulation de gènes de virulence, ont été identifiés chez des pathogènes tels que *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*.

Dans le système SrrAB de *S. aureus*, SrrA est le régulateur de réponse et présente 81% d'homologie avec ResD et SrrB est le senseur membranaire et présente 60% d'homologie avec ResE de *B. subtilis*. Le système SrrAB régule le métabolisme respiratoire et la production de facteurs de virulence en absence d'oxygène (Yarwood *et al.*, 2001).

Le régulateur ResD de *L.* est nécessaire pour la répression de l'expression des gènes de virulence en présence d'une source de carbone facilement fermentée (Larsen *et al.*, 2006). Des analyses de séquences ont permis d'identifier un système homologue de ResDE chez *B. anthracis*. Il s'agit du système BrrAB (Vetter & Schlievert, 2007) encore appelé ResDE (Wilson *et al.*, 2008) dont le rôle dans la régulation de la virulence reste encore incertain. En effet dans une étude menée en 2007, Vetter et Schlievert montraient que le système BrrAB de *B. anthracis* faisait le lien entre le métabolisme et la virulence chez ce pathogène. Chez le mutant $\Delta brrA$, les gènes codant pour les trois toxines *lef*, *pag* et *cya* étaient largement sous exprimés et la souche ne pouvait ni sporuler ni croître en anaérobiose. Lors d'une étude publiée en 2008, Wilson *et al* montraient, cette fois, que la délétion des gènes *ResD* et *ResE* n'affectait pas l'expression du gène *pagA* (Anthrax Protective Antigen) codant pour un antigène de la toxine de l'anthrax ni celle du gène codant pour le régulateur de virulence *atxA*. Les auteurs suggèrent que la mutation du système ResDE s'accompagne d'un phénotype complexe résultant de la dé-régulation du métabolisme respiratoire. C'est cette perturbation qui affecterait indirectement la virulence de *B. anthracis*.

2.1.5 Le système à deux composants ResDE

2.1.5.1 Le système à deux composants ResDE de *B. subtilis*

B. subtilis a longtemps été considéré comme une bactérie aérobie stricte. Cette bactérie est en fait capable de croître en l'absence d'oxygène en utilisant le nitrate et le pyruvate comme accepteur alternatif d'électrons. La nitrate réductase dissimilatrice (NarGHI) constitue l'étape terminale de la chaîne respiratoire anaérobie. Elle associe la réduction du nitrate à la génération d'une force proton-motrice nécessaire aux activités vitales de la bactérie en conditions d'anaérobiose. Le nitrite issu de la respiration nitrate est excrété grâce à la protéine NarK.

L'expression des gènes impliqués dans la respiration aérobie et anaérobie est sous le contrôle du système ResDE. L'étude initiale de ce système montrait qu'il régulait la transcription de l'opéron *resABCDE* auquel il appartient et codant aussi pour des protéines similaires à celles impliquées dans la biogenèse du cytochrome c (ResABC) (Sun *et al.*, 1996). C'est aussi le cas du gène *ctaA* responsable de la conversion de l'hème O en hème A, du gène *ctaB* responsable de la conversion de l'hème B en hème A et de l'opéron *petCBD* (cytochrome *bf*). Mais ResDE contrôle aussi les gènes impliqués dans la respiration nitrate, tel :

- Le locus *nar* de *B. subtilis* contenant les gènes *narK-fnr* (extrusion du nitrite, régulateur Fnr), *nirC* (protéine de transport du nitrite) et *narGHJI* (nitrate reductase).
- Le locus *nas* contenant *nasBC* et *nas DEF* (nitrite reductase).
- Le gène *hmp* codant pour une flavohémoglobine (Nakano & Zuber, 1998).

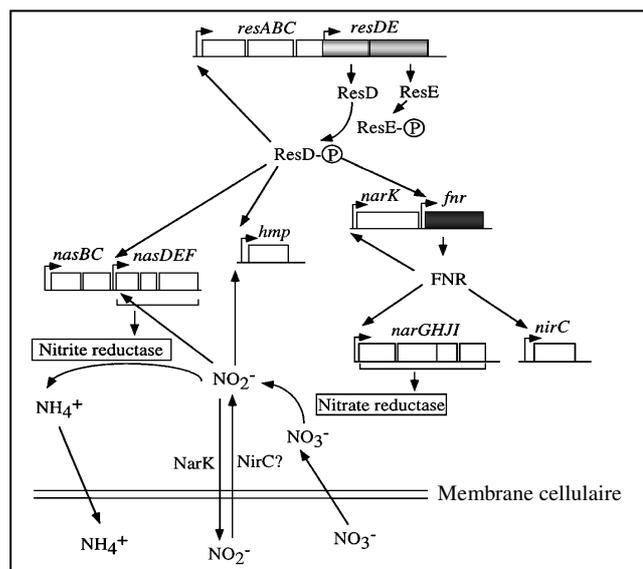


Figure 21: Voies de régulation de la respiration nitrite et nitrate chez *B. subtilis* (Nakano & Zuber, 1998).

Le senseur ResE possède deux domaines transmembranaires ainsi qu'un domaine extracytoplasmique relativement large. Entre le second domaine transmembranaire et le domaine kinase, on trouve un domaine "linker" HAMP (Histidine kinase, Adenyl cyclase, Methyl-accepting chemotaxis protein, Phosphatase) et un domaine PAS.

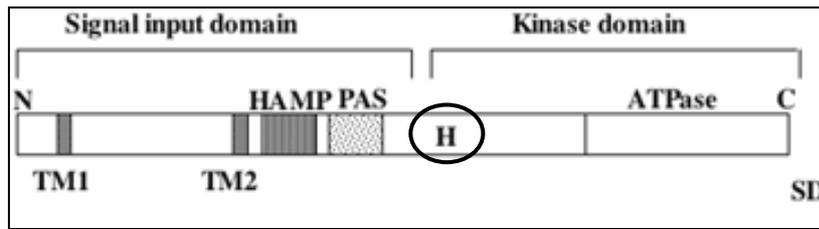


Figure 22: Organisation structurale des domaines constitutifs de la protéine ResE, d'après (Baruah *et al.*, 2004). H : résidu Histidine.

L'acronyme PAS (Nambu *et al.*, 1991) a été utilisé à l'origine pour décrire un domaine de 270 acides aminés entourant deux régions répétées (PAS A et PAS B) de 50 résidus chacune, identifiée dans trois protéines différentes : La protéine PER "Period circadian protein" chez la drosophile (Crews *et al.*, 1988), ARNT "Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein" chez les vertébrés (Hoffman *et al.*, 1991) et la protéine SIM "Single minded protein" chez la drosophile. Ces trois protéines sont impliquées respectivement dans la régulation du rythme circadien, l'activation de la réponse xénobiotique et la détermination du devenir des cellules.

Pour un grand nombre d'histidine kinases, les domaines extracytoplasmiques et PAS sont impliqués dans la perception du signal tandis que le domaine HAMP est impliqué dans la transmission de ce signal entre les deux domaines qu'il sépare. Dans cette configuration, le signal peut être perçu aussi bien depuis l'extérieur de la cellule que depuis le cytoplasme. L'étude des domaines extracytoplasmiques de quelques histidines kinases a permis de révéler une grande variété de stimuli perçus. Parmi eux on trouve une phéromone extracellulaire (*B. subtilis* : ComP), l'ion métallique Mg^{2+} (*E. coli* et *S. enterica* : PhoQ) ou encore le citrate (*K. pneumoniae* : CitA). Le domaine PAS, très important aussi dans le processus d'acquisition du signal, est connu pour percevoir divers stimuli comme la lumière, l'oxygène ou encore l'état redox intracellulaire. Les ligands interagissant avec ce domaine sont tout aussi divers et incluent la flavine adenine dinucléotide (FAD), l'hème, les clusters [2Fe-2S] et le 4-hydroxycinnamoyl.

Le domaine PAS est requis pour l'activité de ResE et est probablement impliqué dans la perception du signal associé à une limitation en oxygène (Baruah *et al.*, 2004). Le signal perçu par ResE reste inconnu. De nombreux paramètres métaboliques comme le ratio $NADH/NAD^+$ ont été testés mais ces travaux n'ont pas apporté de réponse claire.

Le régulateur de réponse ResD est cytoplasmique et est actif lorsqu'il est phosphorylé. Cependant, des travaux ont montré que la protéine ResD, mutée au niveau de son site de phosphorylation, pouvait tout de même activer la transcription (Geng *et al.*, 2004). Des travaux ont montré que la fixation de ResD sur la région promotrice du gène *cydA* dont il régule l'expression, n'était pas dépendante de la phosphorylation. Ainsi, au niveau d'une région promotrice contenant plusieurs sites de fixation pour ResD, la phosphorylation pourra être nécessaire ou non à l'interaction protéine/ADN. De plus, il est envisagé que ResD puisse être phosphorylé par une histidine kinase autre que ResE (Puri-Taneja *et al.*, 2007). Le rôle de la phosphorylation de ResD reste à ce jour très controversé. Des études ont montré que ResD était un monomère quelque soit son état de phosphorylation et qu'il pouvait se fixer à certains promoteurs sous sa dépendance sous cette forme monomérique (Geng *et al.*, 2007).

2.1.5.2 Les systèmes à deux composants chez *B. cereus sensu lato*

La présence d'un certain nombre de systèmes régulateurs à deux composants (en moyenne 40) suggère qu'ils forment une famille importante de régulateurs chez *B. cereus*. Un ensemble complet d'histidine kinase (HK) et de régulateurs de réponse (RR) a pu être récupéré de huit génomes de bactéries du groupe *B. cereus sensu lato* : *B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis* et *B. thuringiensis*. Environ 40 paires de gènes *HK-RR* ont été détectées chez chaque membre du groupe. En outre, chaque membre contient beaucoup de gènes de HK et de RR non codés par des "paires" et donc "orphelins". Des fonctions biologiques putatives, y compris la participation dans des interactions de virulence et les relations hôte-microbe, ont été proposées pour le groupe *B. cereus* en comparant les HK et les RR à ceux de *B. subtilis* et d'autres micro-organismes (de Been *et al.*, 2006).

B. anthracis semble être dépourvu de HK et de RR spécifiques et s'avère contenir beaucoup de gènes tronqués et donc potentiellement non fonctionnels. La spécialisation de *B. anthracis* comme pathogène pourrait avoir réduit la gamme de stimuli environnementaux auxquels il est exposé. Ceci a pu avoir eu pour résultat la suppression de quelques gènes de HK et de RR et vice-versa.

B. cereus ATCC14579 possède de nombreux systèmes de régulation putatifs: 55 HK, 48 RR, 39 systèmes HK-RR, des systèmes orphelins (14 HK et 7 RR) et 2 systèmes hybrides (HK-RR). *B. cereus* possède en moyenne 10 systèmes HK-RR de plus que *B. subtilis* (tableau 6). L'importance quantitative de ces systèmes de régulation pourrait expliquer, en partie, l'extrême adaptabilité de *B. cereus* à différents milieux et laisserait présager sa grande capacité d'adaptation aux changements environnementaux.

espèce	HK	RR	Paires HK-RR	fusions HK-RR	'Orphelins'	
					HK	RR
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	55	48	39	2	14	7
<i>B. cereus</i> ATCC10987	54	49	40	2	12	7
<i>B. cereus</i> ZK	57	52	43	2	12	7
<i>B. thuringiensis</i> konkukian	58	52	44	1	13	7
<i>B. anthracis</i> Ames (0581), Sterne	52	51	41	1	10	9
<i>B. anthracis</i> A2012	50	50	38	1	11	11
<i>B. subtilis</i> 168	35	35	29	0	6	6

Tableau 6: Systèmes de régulation putatifs chez différents *Bacilli* (de Been *et al.*, 2006).

2.1.5.3 Le système à deux composants ResDE de *B. cereus*

Le système à deux composants ResDE de *B. cereus* est homologue à celui de *B. subtilis*. Une analyse du génome de *B. cereus* ATCC 14579, a montré que, comme chez *B. subtilis*, les gènes *resDE* de *B. cereus*, composaient une unité transcriptionnelle incluse dans un opéron plus large (figure 22).

- Les trois gènes en amont, *resA*, *resB* et *resC* codent pour des protéines homologues aux protéines de biogenèse du cytochrome c.

- *resE* code pour une protéine de 591 acides aminés avec une masse molaire théorique de 66.4 kDa et partage 79% d'identité avec la kinase ResE de *B. subtilis*. Comme ses homologues, la protéine ResE de *B. cereus* présente toutes les caractéristiques de la famille des protéine kinases.

- *resD* code pour une protéine de 238 acides aminés et présente une masse théorique de 27.4 kDa. Cette protéine partage 55% d'identité avec le régulateur de réponse ResD de *B. subtilis*. La protéine ResD de *B. cereus* appartient, au même titre que celle de *B. subtilis*, à la sous famille de régulateurs de réponse OmpR/PhoB (Kenney, 2002).

Le système ResDE est très largement conservé dans le groupe *B. cereus*, ce qui révèle son importance physiologique. L'implication du système ResDE dans l'adaptation métabolique à bas POR et dans la toxinogénèse a été mise en évidence chez la souche diarrhéique *B. cereus* F4430/73 (Duport *et al.*, 2006).

Les figures 23, A et B représentent respectivement, l'organisation génétique de *resDE* et l'organisation structurale des protéines ResD et ResE.

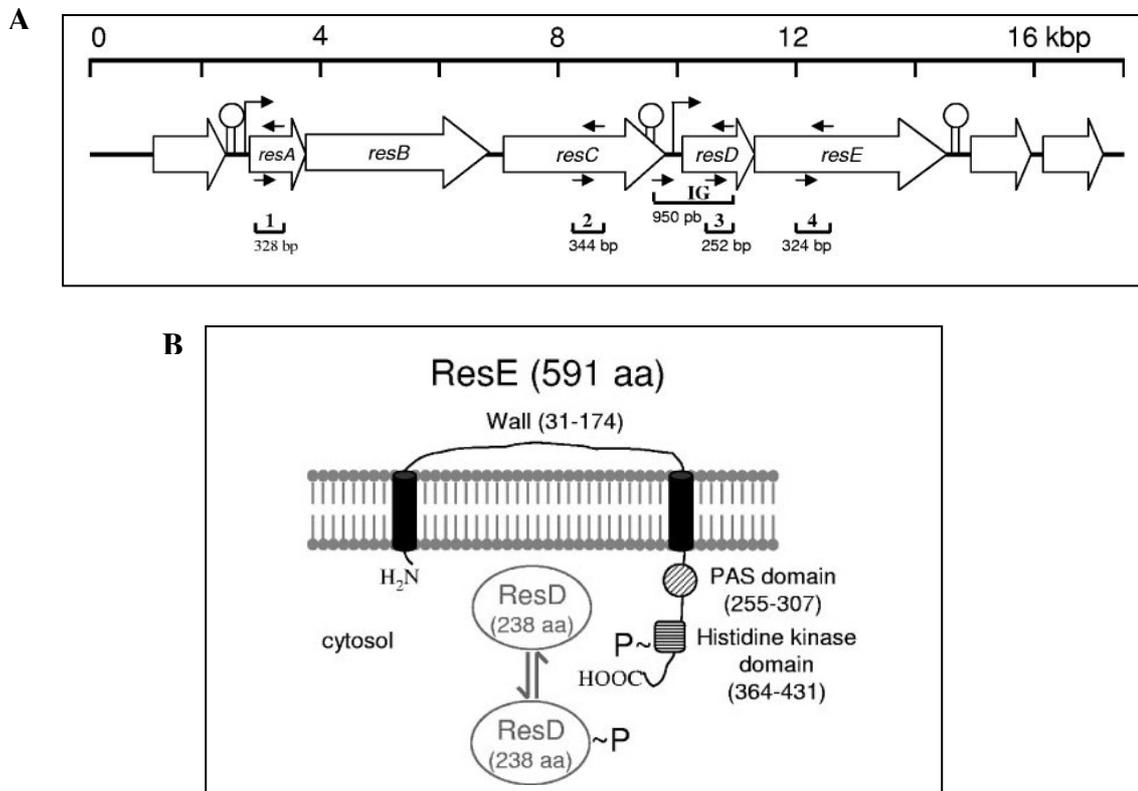


Figure 23 : (A) Organisation génétique de la région chromosomique de *B. cereus* contenant *resDE*. (B) Prédiction de la topologie membranaire du senseur ResE (Duport *et al.*, 2006).

3. La protéine à centre Fer-Soufre, Fnr

3.1 Les protéines de la famille CRP/Fnr : Généralités

Plus de 250 facteurs de transcription contrôlent l'expression des gènes de l'organisme modèle *E. coli*. Certains sont opérons spécifiques alors que d'autres sont connus pour être des régulateurs globaux contrôlant l'expression d'un grand nombre de promoteurs en réponse à des signaux environnementaux spécifiques (Browning *et al.*, 2004).

E. coli, bactérie anaérobie facultative, dispose de nombreuses stratégies pour s'adapter aux variations des concentrations en glucose et en oxygène de son environnement.

Les protéines CRP (cAMP Receptor Protein) et Fnr (Fumarate Nitrate Reductase) d'*E. coli*, sont toutes deux des activateurs transcriptionnels globaux. Ils régulent un grand nombre de promoteurs en réponse à l'absence de glucose pour CRP et d'oxygène pour Fnr. Les séquences primaires des deux protéines sont proches et les homologues de structure suggèrent

une évolution des deux protéines depuis une origine commune (Kolb *et al.*, 1993; Spiro & Guest, 1990).

Les deux facteurs, CRP et Fnr, activent la transcription en établissant un contact direct avec l'ARN polymérase au niveau de régions cibles des promoteurs dont l'expression est régulée. Ils agissent sous forme dimérique au niveau d'un site spécifique de 22 pb dont la position peut varier d'un promoteur à un autre et définir ainsi ses caractéristiques (Spiro *et al.*, 1990; Wing *et al.*, 1995). Leur découverte successive, la caractérisation et la mise en évidence de similarités structurales des deux régulateurs ont donné naissance à la grande famille des régulateurs CRP/Fnr (Shaw *et al.*, 1983).

3.2 La protéine réceptrice de l'AMP cyclique d'*E. Coli* : CRP

La protéine CRP encore appelée CAP (Catabolite activator protein) active la transcription de plus d'une centaine de promoteurs. Lorsque la concentration en glucose diminue dans le milieu, un signal de carence alimentaire est déclenché sous la forme d'une augmentation du taux d'AMPc. L'AMPc forme un complexe avec CRP et se lie à l'ADN en amont du site de fixation de l'ARN polymérase. Le complexe CRP-AMPc agit comme un inducteur en augmentant l'affinité de l'ARN polymérase pour le promoteur de l'opéron. Cette régulation positive peut permettre d'augmenter d'un facteur 50 la transcription de l'opéron lactose. On comprend alors qu'en présence de glucose, il n'y a pas de complexe CRP-AMPc disponible : le niveau de transcription de l'opéron lactose est donc très faible. En présence d'AMP cyclique, la protéine CRP se fixe sur des sites spécifiques de promoteurs cibles permettant ainsi la fixation de l'ARN polymérase (ARNP) et l'initiation de la transcription (Busby & Ebright, 1999). La protéine CRP est le premier régulateur de la transcription dont la structure tridimensionnelle a été déterminée. Il a été le sujet de nombreuses études et est devenu, pour ces raisons, un système modèle pour l'étude structurale et fonctionnelle des facteurs de transcription.

Par opposition à d'autres facteurs de transcription, le fonctionnement de la protéine CRP est relativement simple. Elle ne nécessite la présence que de trois macromolécules : CRP, l'ARN polymérase et la séquence d'ADN cible.

3.3 Interaction de la protéine CRP avec l'AMPc

CRP est un facteur dimérique de 45 kDa constitué de deux sous-unités identiques de 209 acides aminés (Cossart & Gicquel-Sanze, 1982). Le domaine N-terminal (résidus 1 à 139) est impliqué dans la dimérisation de CRP ainsi que dans son interaction avec l'AMPc. Le domaine C-terminal (résidus 140 à 209) est responsable de l'interaction avec l'ADN via un motif hélice tour hélice (Brennan & Matthews, 1989). (Figure 24, A).

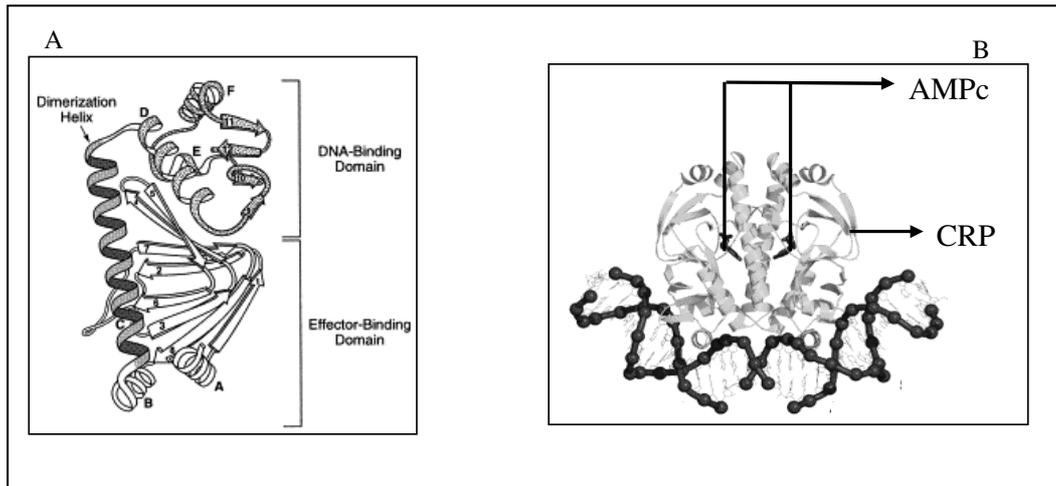


Figure 24 : La protéine CRP. A : Structure tertiaire de la protéine CRP. B : Dimère lié à l'ADN.

Chaque monomère peut lier une molécule d'AMPc entraînant un changement de conformation d'une apo-forme inactive vers un complexe CRP/AMPc actif (Figure 24, B). Une étude a montré l'existence de trois conformations de CRP différentes. Selon la concentration en AMPc : la forme apo-CRP, le complexe CRP/(AMPc)₁ ou encore le complexe CRP/(AMPc)₂. L'apo-forme de CRP se fixe à l'ADN avec une faible affinité et sans spécificité de séquence. La forme CRP/(AMPc)₁ présente une forte affinité pour l'ADN et est très spécifique tandis que le complexe CRP/(AMPc)₂ semble moins actif (Harman., 2001). CRP interagit avec une séquence symétrique de 22 pb dont le motif consensus est : 5'-AAATGTGAN₆TCACATTT-3' (Ebright *et al.*, 1989).

En examinant un monomère et son demi-site de fixation à l'ADN, plusieurs points de contact entre la protéine et l'ADN peuvent être identifiés. En effet, il se crée des liaisons hydrogène entre les résidus Arg¹⁸⁰, Glu¹⁸¹, et Arg¹⁸⁵ et l'ADN (motif RER sur la figure 25).

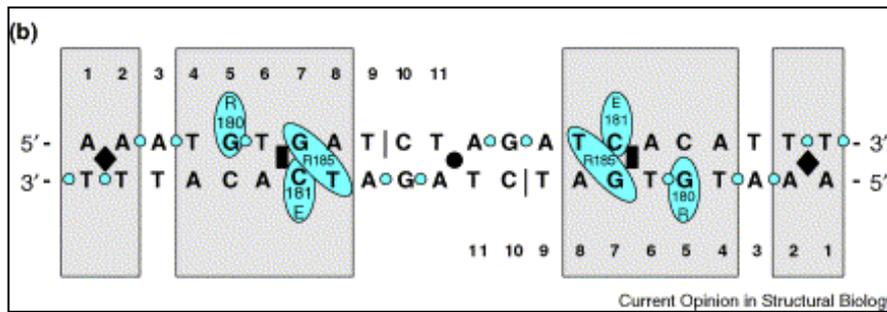


Figure 25 : Interaction entre la protéine CRP et l'ADN. Les cases grisées entourent les bases appartenant au motif consensus et les cercles ovales indiquent les acides aminés entrant en contact avec l'ADN (motif RER).

Les promoteurs dont l'expression est dépendante du facteur CRP, peuvent être désignés selon trois classes (Busby & Ebright, 1999).

La régulation des promoteurs CRP-dépendants de classe I, nécessite une seule molécule CRP et présente un site unique de fixation pour CRP localisé en amont du site de fixation de l'ARN polymérase. Le site CRP peut être situé à différentes distances du point d'initiation de la transcription, en position -92.5, -82.5, -71.5 ou -61.5. L'activation de la transcription implique une interaction protéine-protéine entre CRP et le domaine C-terminal de la sous-unité α de l'ARN polymérase. Le promoteur *lac* est le promoteur de classe I le mieux caractérisé.

La régulation des promoteurs CRP-dépendants de classe II, nécessite aussi une seule molécule CRP pour leur activation et ont un site de fixation unique localisé en position -41.5 et chevauchant le site de reconnaissance de l'ARN polymérase. L'activation de la transcription implique cette fois deux types d'interactions protéine-protéine : une interaction entre CRP et le domaine C-terminal de la sous-unité α de l'ARN polymérase et une interaction entre CRP et le domaine N-terminal de la sous-unité α de l'ARN polymérase. Le promoteur *galP1* est le promoteur de classe II le plus connu.

La régulation des promoteurs CRP-dépendants de classe III est plus complexe et nécessite deux ou plusieurs molécules CRP ou encore d'autres molécules activatrices spécifiques. Le promoteur *araBAD* est le plus connu.

3.4 Les protéines à centre Fer-Soufre

3.4.1 Les centres [Fe-S]

Les centres [Fe-S] sont constitués d'atomes de fer et de soufre liés entre eux par des liaisons covalentes. Dans les métalloprotéines, ils sont la plupart du temps associés à la chaîne

polypeptidique par des liaisons entre les atomes de fer et les groupements thiols de résidus cystéine de la protéine.

Il en existe trois types majeurs, les centres [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S] (Figure 26).

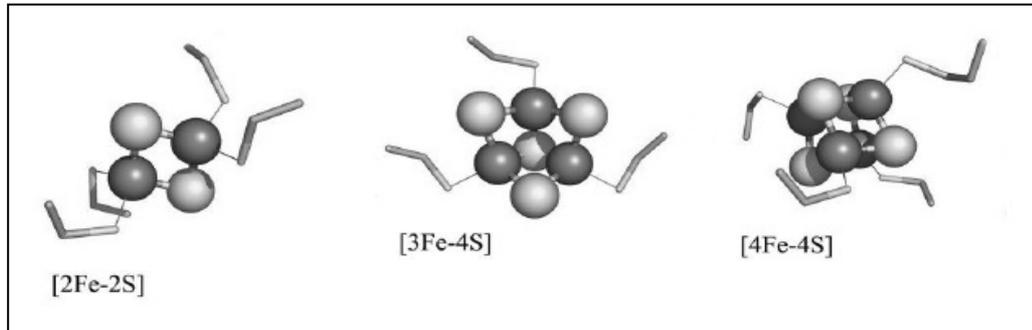


Figure 26: Schéma illustrant les trois types majeurs de centres Fer-soufre.

- **Les centres [2Fe-2S]** sont composés le plus souvent de deux atomes de fer reliés à deux atomes de soufre inorganique et à deux atomes de soufre de résidus cystéines de la métalloprotéine selon une géométrie tétraédrique. Dans de rares cas, tels les centres [2Fe-2S] de type Rieske retrouvés dans les dioxygénases microbiennes, ils peuvent être liés à la chaîne polypeptidique par l'intermédiaire de 2 résidus cystéine et de 2 résidus histidine. La séquence consensus retrouvée dans les métalloprotéines liant les centres [2Fe-2S], est de type (CX₄CX₂CX_nC) chez les plantes et (CX₅CX₂CX_nC) chez les vertébrés. On retrouve ce type de "clusters" dans de nombreuses déshydratases, ainsi que dans le régulateur SoxR (Kiley & Beinert, 2003).

- **Les centres [4Fe-4S]** sont les plus représentés dans les métalloprotéines. Ils se présentent dans une structure cubique, dans laquelle, quatre atomes de soufre et quatre atomes de fer sont liés à quatre cystéines. Néanmoins, il est possible de retrouver d'autres ligands que le soufre de la cystéine, c'est notamment le cas pour l'aconitase des organismes eucaryotes, pour laquelle, la coordination s'effectue via un atome d'oxygène (Emptage *et al.*, 1983). Cette variabilité de ligands tend à expliquer pourquoi aucune séquence consensus n'a été décrite pour les ligands de ces centres.

- **Les centres [3Fe-4S]** possèdent une structure semblable à celle des [4Fe-4S], mais l'absence d'un atome de fer, ne permet une coordination qu'avec trois cystéines de la protéine. Généralement, ce type de centre est transitoire et résulte d'une attaque oxydative d'un centre [4Fe-4S] conduisant le plus souvent à l'inactivation de la protéine, c'est

notamment le cas de la dihydroxy-acide deshydratase (DHAD) (Gardner & Fridovich, 1991) et de la protéine Fnr d'*E. coli*. Dans d'autres cas toutefois, tel la nitrate réductase d'*E. coli*, les centres [3Fe-4S] possèdent une réelle fonctionnalité (Johnson *et al.*, 1985).

3.4.2 Rôles des centres Fer-Soufre dans la régulation génique

Dans un premier temps, les centres [Fe-S] ont été caractérisés dans les protéines de type "ferrédoxine" (Mortenson *et al.*, 1962) comme ayant un rôle dans le transfert d'électrons lors des mécanismes d'oxydoréduction. Il faudra attendre la découverte de l'aconitase (Ruzicka & Beinert, 1978), protéine sans fonction redox mais possédant un centre [Fe-S], pour mettre en lumière les fonctions diverses associées à la présence de ces centres métalliques. La diversité chimique de ces groupements reflète, en fait, très bien la variabilité des fonctions associées aux protéines [Fe-S]. Dans le tableau ci-dessous sont répertoriés les principaux rôles attribués aux centres Fe-S ainsi que leur nature et les protéines qui les contiennent.

Fonction	Exemples	Nature du centre
Transfert d'électrons	Ferredoxines; enzymes redox	[2Fe-2S]; [3Fe-4S]; [4Fe-4S]
Transfert couplé electron/proton	Nitrogenase	[8Fe-7S]
Ligation d'un cofacteur/activation	(de)Hydratases	[4Fe-4S]
	Radical SAM enzymes	[4Fe-4S]
	Acetyl-CoA synthase	Ni-Ni-[4Fe-4S], [Ni-4Fe-5S]
	Sulfite reductase	[4Fe-4S]-siroheme
Stockage du fer	Ferredoxines	[4Fe-4S]
Structure	Endonuclease III	[4Fe-4S]
Régulation de l'expression de gènes	SoxR	[2Fe-2S]
	Fnr	[4Fe-4S]/[3Fe-4S]/[2Fe-2S]
	IRP	[4Fe-4S]
	IscR	[2Fe-2S]
Régulation de l'activité enzymatique	Glutamine PRPP amidotransferase	[4Fe-4S]
	Ferrochelatase	[2Fe-2S]
Réduction ponts disulfures	Ferredoxin:thioredoxin reductase	[4Fe-4S]
	Hétérodisulfide reductase	[4Fe-4S]
Donneur de soufre	Biotin synthase	[2Fe-2S]

Tableau 7: Fonctions de quelques centres [Fe-S], d'après (Johnson *et al.*, 2005).

En fonction de l'état d'oxydation des atomes de fer qui les composent : réduit, (ferreux, Fe^{2+}) ou oxydé (ferrique, Fe^{3+}), des résidus qui les lient à la protéine, de leur accessibilité aux solvants, on trouvera des potentiels redox et des processus réactionnels différents pour des centres de même type. Ainsi, grâce aux fonctions de transfert d'électrons, les centres [Fe-S] sont des constituants essentiels de protéines des chaînes respiratoires ou photosynthétiques. Ils sont des composants à part entière de sites actifs de protéines, à fonction redox ou non redox. Enfin, en contribuant à la structure des protéines, ils peuvent être la cible de régulation vis-à-vis de stimuli divers, conduisant ainsi à contrôler des activités enzymatiques ou à moduler l'expression de certains gènes. Les centres [Fe-S] sont des éléments clés dans les fonctions de régulation des trois facteurs de transcription : IscR, SoxR et Fnr. Une notion émergente est que ces centres pourraient déclencher une réponse cellulaire spécifique en réponse à un oxydant tel que l'oxygène (O_2), des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou encore le monoxyde d'azote (NO). Si le NO est avant tout un polluant, c'est aussi le premier gaz connu qui agit comme messenger biologique. Sa petite taille va lui permettre d'entrer dans la cellule et d'en sortir aisément. A la périphérie de la molécule de NO, gravite un électron qui n'est pas apparié et qui fait de cette molécule un radical libre susceptible de pouvoir interagir avec d'autres molécules.

- Le facteur de transcription SoxR joue un rôle de senseur dans le cadre du stress oxydant (stress superoxyde) et nitrosant (stress NO). Son centre [2Fe-2S] passe de l'état d'oxydation +1 à +2 (dans le cas du stress superoxyde), ou bien se retrouve nitrosylé (dans le cas du stress NO) (Kiley & Beinert, 2003). Dans ces conditions, la protéine est capable de stimuler (par 100) l'expression du facteur de transcription SoxS qui peut alors activer l'expression de plusieurs enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant (telles que la SuperOxyde Dismutase).

- IscR est le répresseur de l'opéron *isc* impliqué dans la biosynthèse des centres [Fe-S] (Kiley and Beinert, 2003). Il est sensible à l'état des clusters [Fe-S] dans la cellule. En effet, lorsque le pool de centres [Fe-S] dans la cellule est suffisant et que toutes les protéines [Fe-S] sont actives, IscR est sous forme holo, contenant un centre [2Fe-2S]. Sous cette forme, IscR se lie à l'ADN et bloque sa propre transcription ainsi que celle de l'opéron *isc*. Dans le cas inverse (conditions de carence en centres [Fe-S]), IscR est sous forme apo et dérègle sa transcription et celle de l'opéron *isc*.

- Fnr est un des régulateurs pléiotropes de l'anaérobiose.

3.4.3 Mécanismes moléculaires d'assemblage des centres Fer-Soufre

3.4.3.1 Introduction

Il est admis que les centres [Fe-S] peuvent être assemblés de manière efficace *in vitro* dans de nombreuses apo-protéines par reconstitution chimique, à partir de Fe^{2+} et d'ions sulfures S_2^- , dans des conditions anaérobies (figure 27).

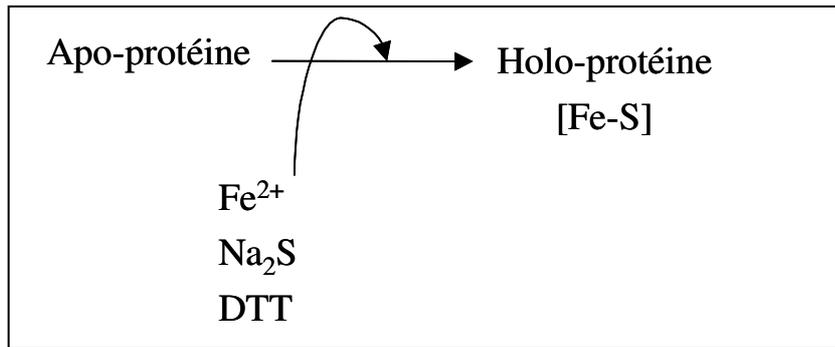


Figure 27 : Eléments nécessaires à la reconstitution chimique, *in vitro*, d'un centre [Fe-S].

Compte tenu de la toxicité des ions Fe^{2+} et S_2^- , la synthèse des centres [Fe-S], *in vivo*, ne se produit pas spontanément et requiert des transporteurs et des protéines spécialisées dans l'assemblage et le transfert du centre dans la chaîne polypeptidique des apo-protéines. *In vivo*, la biosynthèse des centres [Fe-S] fait appel à une machinerie complexe. C'est lors de l'étude de la Nitrogenase de la bactérie fixatrice d'azote *Azotobacter vinelandii*, que les protéines impliquées dans la biosynthèse des centres [Fe-S] ont été mises en évidence pour la première fois (Jacobson *et al.*, 1989).

La cellule contient en fait un nombre très limité de "machineries" de biosynthèse pour l'ensemble des différents centres [Fe-S]. On en trouve essentiellement quatre chez les bactéries. Il s'agit des machineries **NIF**, **ISC**, **SUF** et **CSD**.

3.4.3.2 Les différentes machineries chez les procaryotes

La machinerie NIF

Elle est constituée de plusieurs protéines dont les gènes sont organisés en opéron (opéron *nif* pour Nitrogen Fixation) (Figure 28), et codant pour des protéines requises spécifiquement pour l'assemblage du centre [Fe-S] de la nitrogénase d'*Azotobacter vinelandii* (Jacobson *et al.*, 1989; Zheng *et al.*, 1993). Au sein de ce système, on retrouve quatre

protéines NifS, NifU, CysE1 et IscA^{Nif}. L'analyse biochimique de la protéine NifS a montré que celle-ci peut former un homodimère et qu'elle possède une activité cystéine désulfurase. NifU est également une protéine homodimérique capable de former un complexe tétramérique transitoire avec NifS (Yuvaniyama, 2000). Un modèle a donc été proposé dans lequel NifS fournirait le soufre à NifU, qui lui-même servirait pour l'acquisition du fer et/ou pour l'assemblage conduisant à un centre [Fe-S]. Ce rôle de construction du centre métallique sur NifU lui a donné le nom de protéine d'échafaudage ou "scaffold". Comme l'inactivation de NifS et NifU n'entraînent qu'une diminution de l'activité de la nitrogenase, l'existence d'autres protéines aux rôles similaires a été envisagée.

Deux autres gènes du locus *nif* pourraient être impliqués dans l'assemblage des centres [Fe-S], *cysE1* et *iscA^{Nif}*. CysE1 est une protéine qui intervient dans la synthèse de la cystéine, le substrat de NifS (Jacobson *et al.*, 1989). IscA^{Nif} est capable d'assembler *in vitro* des centres [Fe-S] et jouerait un rôle voisin de celui de NifU (Krebs *et al.*, 2001).

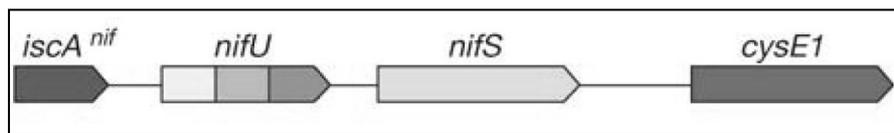


Figure 28. Organisation des gènes du locus *nif* impliqués dans la synthèse des centres [Fe-S] chez *Azotobacter. vinelandii* (Johnson *et al.*, 2005).

La machinerie ISC

L'opéron *isc* (pour Iron Sulfur Cluster) est constitué de 8 gènes *iscRSUA-hscBA-fdx-yfhJ* (figure 29). La suppression totale du système ISC (et en particulier la suppression de *iscS*) chez *E. coli* conduit à un ralentissement de la croissance des cellules en milieu riche mais aussi une forte diminution de l'activité des enzymes [Fe-S] (Schwartz *et al.*, 2000; Takahashi & Tokumoto, 2002; Tokumoto & Takahashi, 2001). Cette observation a mis en évidence le rôle prédominant du système ISC pour la maturation des protéines [Fe-S] chez *E. coli*, qui ne contient pas le système NIF. Cependant, l'existence d'une activité résiduelle laissait supposer qu'un système alternatif puisse intervenir dans la biosynthèse des centres [Fe-S] et ainsi prendre le relais du système ISC. Le système SUF a ainsi été mis en évidence (Takahashi & Tokumoto, 2002).

IscS est une cystéine désulfurase très proche de NifS au plan structural et fonctionnel. Le soufre qu'elle génère à partir de la cystéine est transféré à la protéine IscU qui sert de matrice

à l'assemblage des centres [Fe-S]. La protéine IscU est un homodimère qui s'associe à IscS pour former un hétérotetramère. Le rôle de la protéine IscA reste encore mal connu. Les protéines codées par les gènes *hscB* et *hscA* sont des chaperons moléculaires, capables de s'associer au complexe apoIscU/apoIscA afin de stabiliser une conformation favorisant l'assemblage des centres Fe-S. Une ferredoxine à centre [2Fe-2S] codée par le gène *fdx*, pourrait fournir les équivalents réduits nécessaires aux différents stades de la biosynthèse des centres [Fe-S]. La protéine Orf3 contenant un grand nombre d'acides aspartiques et glutamiques fournirait le fer nécessaire à la formation des centres [Fe-S] (Takahashi & Nakamura, 1999). La protéine IscR, contient un centre [2Fe-2S], et a pour fonction la régulation de l'expression des gènes *iscSUA*.

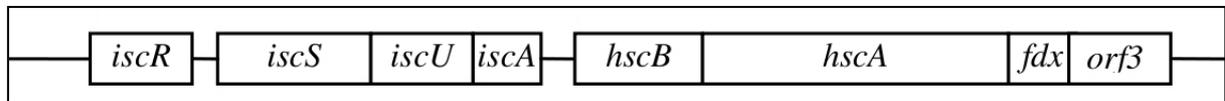


Figure 29. Opéron *isc* responsable de biosynthèse des centres [Fe-S] chez *E. coli* (Takahashi & Nakamura, 1999).

La machinerie SUF

L'opéron *suf* (pour SulFUr) est constitué de 6 gènes (*sufABCDSE*) (Figure 30). Il a d'abord été identifié chez *E. coli*. Les premières expériences semblaient montrer que la contribution des protéines codées par l'opéron *suf* dans la biosynthèse des centres [Fe-S] était mineure puisque leur absence avait peu d'effet sur l'activité des enzymes [Fe-S] dans des conditions de croissance en laboratoire. En fait, le rôle du système SUF prend de l'importance dans des conditions de stress oxydant et de carence en fer (Nachin *et al.*, 2003; Outten *et al.*, 2004).

Le gène *sufS* code une cystéine désulfurase. La protéine SufE est un homodimère qui ressemble à NifS mais qui n'a pas d'activité désulfurase (Loiseau *et al.*, 2003). Cependant, il a été montré que SufE peut s'associer à SufS pour former un complexe actif dans lequel le soufre est transféré du site actif de la protéine SufS à celui de SufE. Aucune fonction n'est connue pour les gènes *sufBD*. La protéine SufC quant à elle, appartient à la classe des transporteurs ABC et permettrait d'importer et/ou d'exporter des substrats. SufB, SufC et SufD forment un complexe qui améliore l'activité désulfurase du complexe SufS/SufE (Outten *et al.*, 2003). SufA, tout comme IscA avec laquelle elle partage 40 % d'identité de séquence, permettrait la formation transitoire d'un centre Fe-S et son transfert vers l'apoprotéine cible.

Ainsi, ISC est "LA" machinerie générale d'assemblage des centres [Fe-S] et fonctionne dans des conditions normales de croissance. La machinerie SUF remplit un rôle similaire à celui du système ISC, mais intervient dans des conditions particulières (de stress oxydant et de carence en fer).

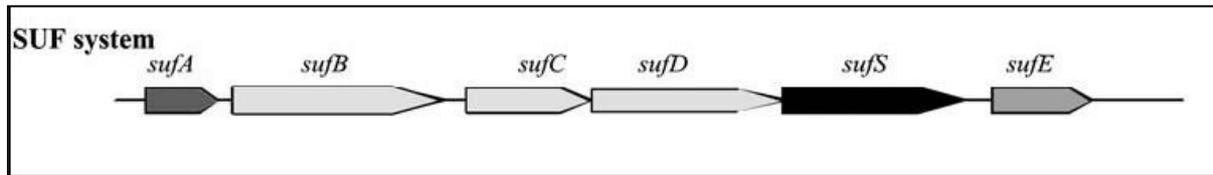


Figure 30. Opéron *suf* responsable de biosynthèse des centres [Fe-S] chez *E. coli* (Fontecave *et al.*, 2005).

La machinerie CSD

Très récemment, un autre système, nommé CSD (pour Cystéine Sulfinate Desulfinate), a été découvert chez *E. coli* (Loiseau *et al.*, 2005). Ce système est extrêmement simple comparé aux systèmes ISC et SUF puisqu'il ne se compose que de deux protéines, CsdA et CsdE. Il est possible qu'il fonctionne grâce à la contribution d'autres protéines appartenant aux systèmes ISC et/ou SUF ou de nature encore inconnue. Il a été mis en évidence comme donneur de soufre spécifique dans la maturation du centre [4Fe-4S] de la quinolinate synthase (nommée NadA), une enzyme impliquée dans la biosynthèse du NAD (Ollagnier-de Choudens *et al.*, 2005).

3.4.3.3 Les donneurs de soufre : cystéines desulfurases

Chaque système possède des protéines responsables de la mobilisation du soufre. La première à avoir été identifiée est la protéine NifS. Cette enzyme est capable de convertir la L-cystéine en L-alanine et soufre (libéré sous forme de sulfure en présence de DTT) (Zheng *et al.*, 1994). Le soufre est stocké sous la forme d'un persulfure au niveau d'une cystéine conservée ayant un caractère nucléophile fort et qui est essentielle à l'activité. NifS appartient à une classe de protéines définies comme ayant une activité cystéine désulfurase, dont font partie également IscS, SufS et CsdA. Les protéines SufE et CsdE forment un complexe avec les protéines SufS et CsdA respectivement, et permettent d'augmenter l'activité cystéine désulfurase de ces dernières d'un facteur 50 et 2 respectivement (Loiseau *et al.*, 2003; Loiseau *et al.*, 2005).

3.4.3.4 Les protéines d'assemblage

Les machineries NIF, ISC et SUF possèdent toutes trois des protéines d'assemblage dites protéines "scaffold". Il s'agit de NifU, IscU, IscA et SufA, capables d'assembler transitoirement des centres [Fe-S] avant de les transférer à des protéines cibles.

3.4.3.5 Les autres protéines

En plus des cystéines désulfurases et des protéines "scaffold", d'autres composés sont requis pour la formation des centres [Fe-S]. Parmi eux on retrouve :

- les protéines HscA, HscB, présentes dans le système ISC sont des chaperons moléculaires.

- La ferrédoxine, codée par le gène *fdx* de l'opéron *isc*, possède un centre [2Fe-2S] stable, du même type que celui coordonné par le domaine central de NifU et pourrait jouer un rôle rédox dans la biosynthèse des centres [Fe-S].

- le gène *yfhJ* code pour une petite protéine de 66 acides aminés dont la fonction n'a pas encore été clairement démontrée. Des études récentes ont révélé que la protéine YfhJ est capable de lier du fer (Pastore *et al.*, 2006).

- Les protéines SufB, SufC et SufD présentes dans le système SUF, forment un complexe ayant une activité ATPase portée par SufC (Nachin *et al.*, 2003). Son rôle dans le processus de biosynthèse des centres [Fe-S] reste inconnu.

3.4.3.6 Le donneur de fer

Chez *E. coli*, il a été montré clairement que la protéine CyaY pouvait jouer le rôle de donneur de fer (Layer *et al.*, 2006) mais il existe probablement d'autres protéines ayant la même fonction physiologique et qui pourraient prendre le relais de CyaY.

La figure ci-dessous résume l'ensemble des connaissances acquises pour les différents systèmes bactériens. Elle schématise le fonctionnement général du processus de maturation des protéines à centre [Fe-S].

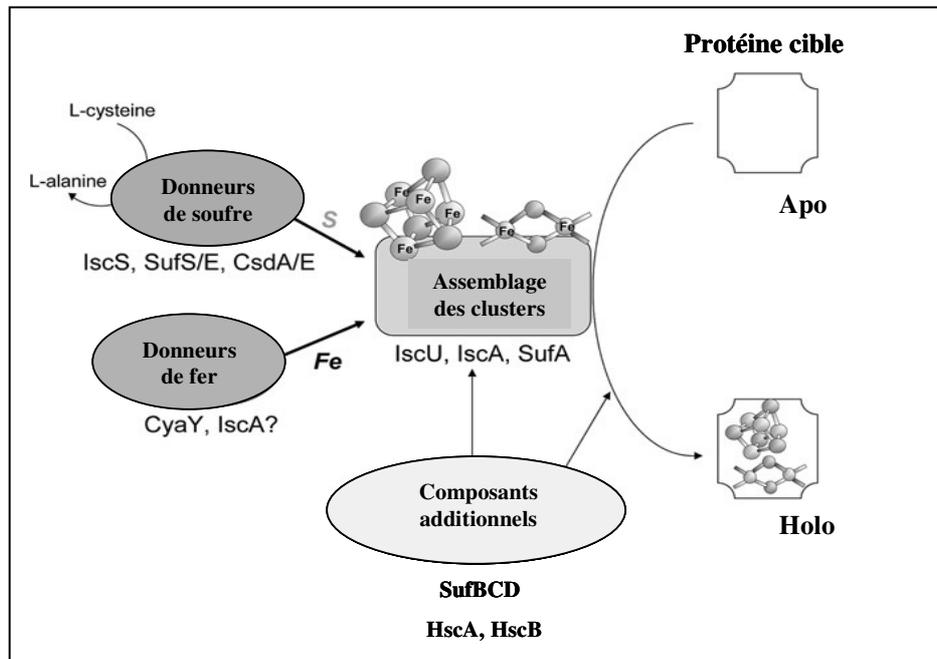


Figure 31 : Schéma général de la biosynthèse des centres [Fe-S] d'après (Fontecave & Ollagnier-de-Choudens, 2008).

3.4.4 Distribution des systèmes de maturation des protéines [Fe-S] chez les organismes procaryotes

Chez les bactéries, il existe comme décrit précédemment, plusieurs systèmes de maturation des protéines [Fe-S] capables de jouer des fonctions similaires. Chez certaines espèces, plusieurs systèmes coexistent. Ainsi, les cellules d'*E. coli* disposent des deux machineries principales ISC et SUF. Certaines espèces bactériennes ne possèdent qu'une seule machinerie sur les deux. Ceci peut être expliqué par une activité redondante des deux systèmes ISC et SUF qui opèrent séparément au sein de voies parallèles. Il est aussi à noter que *iscU* n'est pas retrouvé uniquement au niveau de l'opéron *isc* mais aussi au niveau de l'opéron *suf*. Ainsi chez *B. subtilis*, on retrouve le gène *iscU* et le système SUF avec les gènes *sufCBDSU* (Takahashi & Tokumoto, 2002). Chez *B. cereus*, il semble que l'on retrouve la même chose avec la présence de *iscU* et du système SUF et en particulier les gènes *sufCDSB*. L'organisation en opéron est bien conservée au sein du groupe *ceruus* et on la retrouve aussi chez d'autres organismes à Gram positif tel que *L. monocytogenes*.

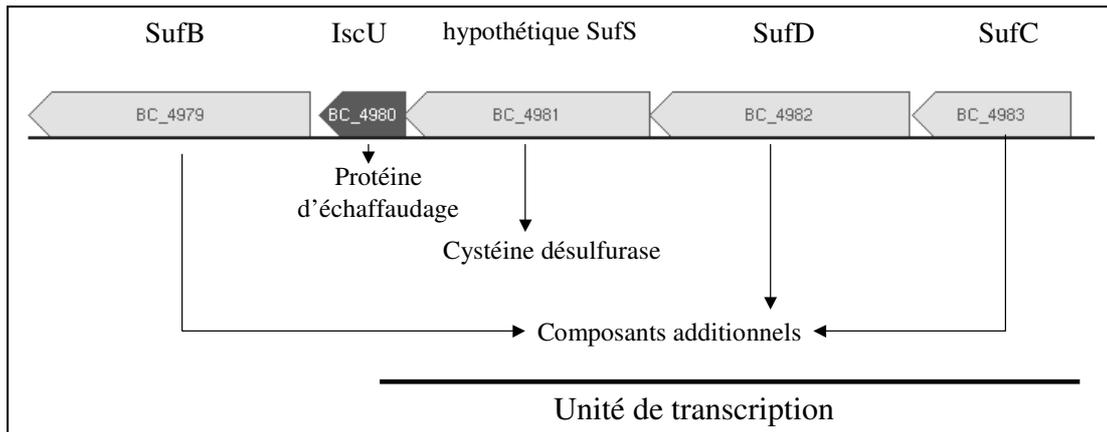


Figure 32 : Représentation de la machinerie de biogenèse des centres [Fe-S] retrouvée chez *B. cereus* ATCC 14579.

3.5 La protéine Fnr des organismes modèles

3.5.1 La protéine Fnr d'*E. coli*

3.5.1.1 Structure et fonction

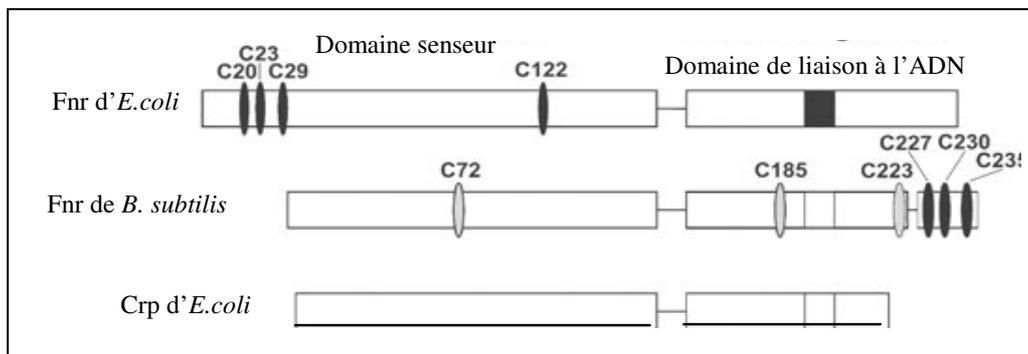


Figure 33 : Organisation structurale de la protéine Fnr d'*E. coli* en comparaison avec la protéine Fnr de *B. subtilis* et de la protéine Crp. Les 4 cystéines impliquées dans la formation du centre [Fe-S] de la protéine Fnr d'*E. coli* sont notées C20, C23, C29 et C122. La position des cystéines de la protéine Fnr de *B. subtilis* est aussi spécifiée et en noir figurent plus particulièrement les cystéines impliquées dans la formation du centre Fe-S, d'après (Reents *et al.*, 2006a).

Fnr d'*E. coli* est une protéine composée de 250 acides aminés (30 kDa). Le gène codant pour Fnr (*fnr*) a été initialement découvert par John Guest en 1970 lors d'un travail portant sur la caractérisation d'un mutant déficient pour la réduction du nitrate et du fumarate. Comme CRP, le régulateur Fnr (Fumarate and Nitrate Reductase) est composé de deux domaines, l'un impliqué dans la fixation à l'ADN et l'autre dans des fonctions senseurs. Le

domaine C-terminal de liaison à l'ADN (motif hélice-tour-hélice) reconnaît des séquences spécifiques au niveau des promoteurs contrôlés par Fnr. La séquence consensus de fixation de Fnr sur l'ADN est un palindrome symétrique (TTGAT X₄ ATCAA) similaire à celui retrouvé pour la protéine CRP (Green *et al.*, 1996a). Le domaine senseur N-terminal est composé de 5 résidus cystéine dont 4 (Cys²⁰, Cys²³, Cys²⁹ et Cys¹²²) sont essentiels à la constitution du centre fer-soufre (Kiley & Beinert, 1998).

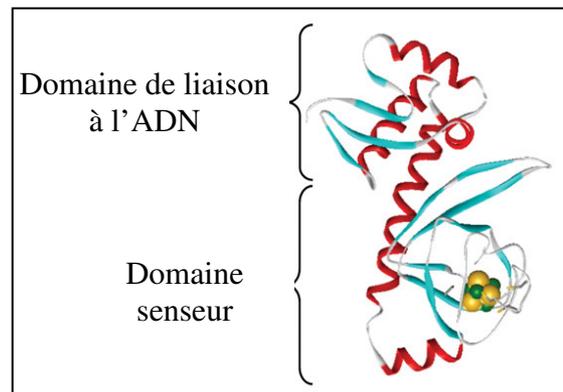


Figure 34 : Structure prédictive d'un monomère de la protéine Fnr d'*E. coli* (Crack *et al.*, 2008).

Fnr est l'un des principaux régulateurs des nombreux gènes impliqués dans l'expression des systèmes respiratoires aérobies et anaérobies d'*E. coli* (Sawers & Bock, 1988; Spiro & Guest, 1990). Ainsi, Fnr active l'expression de gènes codant pour les systèmes respiratoires DMSO réductase, fumarate réductase, nitrate réductase et nitrite réductase. Il régule également positivement l'expression de déshydrogénases spécifiques en anaérobiose, telles que la glycérol-3-phosphate déshydrogénase ou la formiate déshydrogénase. Fnr est par ailleurs un répresseur de l'expression des gènes codant pour les systèmes impliqués dans la respiration aérobique comme les cytochromes oxydases *bo* et *bd* ou encore la NADH déshydrogénase (Bauer *et al.*, 1999).

Le mécanisme d'action du régulateur Fnr est original car il entraîne la réorganisation du centre fer-soufre [4Fe-4S] fixé à la protéine lorsqu'elle détecte l'oxygène. En effet, en anaérobiose, c'est-à-dire lorsque le régulateur Fnr est actif, ce dernier présente un centre [4Fe-4S]²⁺ et forme des homodimères capables de se fixer à l'ADN et d'interagir avec l'ARN polymérase (Lamberg & Kiley, 2000; Lazazzera *et al.*, 1993; Moore & Kiley, 2001). Au cours de la transition entre l'anaérobiose et l'aérobiose, le centre [4Fe-4S] est déstabilisé et converti en un centre intermédiaire [3Fe-4S] puis en un centre [2Fe-2S]. L'homodimère est

alors dissocié et perd son affinité pour l'ADN (Crack *et al.*, 2004). Ce mécanisme s'inverse lorsque la bactérie repasse en condition anaérobie.

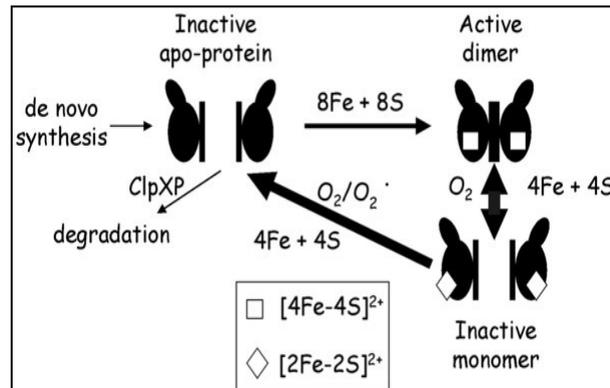


Figure 35 : Schéma illustrant le passage de Fnr d'un état monomérique inactif à un état dimérique actif en fonction de la présence ou non d'oxygène. D'après (Dibden & Green, 2005).

Crack *et al* ont élucidé le mécanisme d'oxydation du centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ de la protéine Fnr (Crack *et al.*, 2004). Leur travail montre que la conversion du cluster est un processus se décomposant en deux étapes. Dans une première étape, le centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]^{2+}$ est rapidement oxydé en un centre $[3\text{Fe}-4\text{S}]^+$ instable avec émission d'un ion ferreux. Dans une seconde étape, le centre intermédiaire $[3\text{Fe}-4\text{S}]^+$ est converti plus lentement en un centre $[2\text{Fe}-2\text{S}]^{2+}$ avec émission d'un ion ferrique et deux ions sulfure. L'oxygène ayant oxydé Fnr est réduit produisant ainsi du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène.

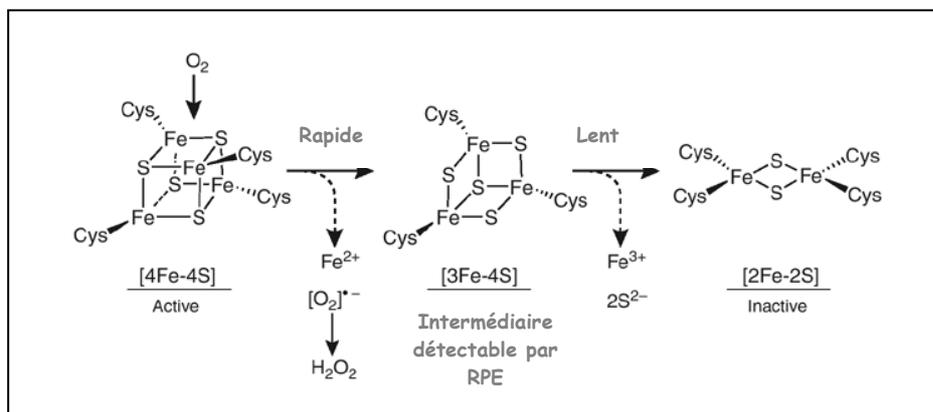


Figure 36 : Schéma illustrant le mécanisme proposé pour la conversion du centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ de la protéine Fnr d'*E. coli* (Outten, 2007).

Des études récentes ont montré que la protéine Fnr pourrait réguler plus d'une centaine d'opérons, probablement environ 115, parmi lesquels la grande majorité serait

activée (les 2/3) dans des conditions anaérobies, les autres étant réprimés. Il est à noter également que parmi ces nombreux gènes régulés par Fnr un certain nombre l'est également par les systèmes à deux composants NarX/NarL et/ou NarQ/NarP donc par la présence de nitrate ou de nitrite dans le milieu (Constantinidou *et al.*, 2006; Overton *et al.*, 2006). Bien que ce soit très faiblement, la protéine Fnr active également la transcription de la protéine ArcA, le régulateur du système à deux composants ArcB/ArcA (Compan & Touati, 1994). Cette activation de la transcription de ArcA par Fnr pourrait jouer un rôle important dans la coordination de l'expression des gènes associée aux métabolismes aérobie ou anaérobie lors des changements environnementaux.

Chez *E. coli*, Fnr est synthétisée de manière constitutive. En anaérobiose, la transcription du gène *fnr* est sous l'autocontrôle négatif de son produit qui se fixe au niveau de deux sites centrés à -103.5 pb et -0.5 bp (Green *et al.*, 1996b). En anaérobiose, le niveau de protéine Fnr est le même qu'en condition anaérobie. Cependant le contrôle de la quantité de protéine Fnr est très importante dans la mesure où sa surexpression conduirait dans des cellules aérobies à l'expression inappropriée de gènes activés par Fnr. Une étude a montré que cette régulation était réalisée par voie de protéolyse et que la protéine Fnr monomérique (dépourvue du centre Fe-S) était la cible de la protéase CplXP. Lorsque Fnr n'est pas active en tant que facteur de transcription, elle est donc reconnue par CplXP grâce à un motif puis dégradée. Cette étude a aussi montré que de l'apoFnr initialement présente dans la cellule, pouvait être convertie en holoprotéine (Fnr-[4Fe-4S]) en anaérobiose (Mettert & Kiley, 2005).

3.5.1.2 Biogenèse du centre Fer-Soufre de la protéine Fnr d'*E.coli*

Dans le chapitre 3, sont décrites les différentes machineries de biogenèse des centres [Fe-S]. Comme toute protéine possédant ce type de centre, la protéine Fnr mobilise elle aussi des systèmes de ce genre. Dans une étude récente, (Mettert *et al.*, 2008) ont étudié l'implication des deux systèmes principaux d'assemblage du centre [Fe-S] (Isc et Suf) de la protéine Fnr d'*E. coli*.

Pour cela, l'expression de promoteurs dépendants de Fnr dans des souches délétées des systèmes Isc ou Suf a été mesurée. Les résultats montrent qu'en anaérobiose l'activité de la protéine Fnr est réduite de 60% en absence du système Isc. Inversement, en absence du système Suf, la protéine Fnr conserve une activité normale et la surexpression du système Suf restaure complètement l'activité de Fnr chez les souches dépourvues du système Isc. Des expériences de "pulse chase" utilisant de la méthionine marquée radioactivement, ont montré

que le système Isc était le système majeur requis pour la conversion de l'apoFnr inactive vers la protéine Fnr active ([4Fe-4S]-Fnr).

Ces résultats ont mené à un modèle de biogenèse du cluster [Fe-S] de la protéine Fnr d'*E.coli* en présence et en absence d'oxygène (figure 34). Quelque soit la condition, l'apo-Fnr monomérique, acquière son cluster dans un premier temps via le système Isc. En anaérobiose, le système Suf permet l'assemblage d'environ 40% du cluster sur la protéine Fnr lorsque le système Isc est manquant. Bien que l'expression des deux systèmes soit augmentée en aérobiose, le système Suf ne semble pas permettre la biogenèse des clusters sur Fnr lorsque le système Isc est absent. De plus, le besoin d'assemblage via Isc est plus important en condition aérobiose. Ceci peut-être dû au fait que le turnover des centres [Fe-S] est plus important en aérobiose et que le niveau de substrats d'apoprotéine est bien plus élevé.

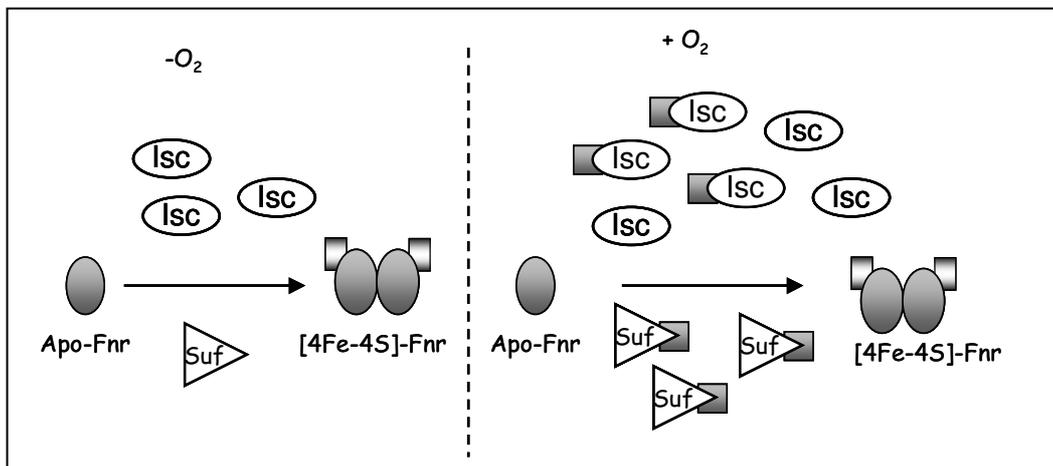


Figure 34 : Modèle de biogenèse du cluster [Fe-S] de la protéine Fnr d'*E.coli* d'après (Mettert *et al.*, 2008).

3.5.2 La protéine Fnr de *B. subtilis*

Chez *B. subtilis*, *fnr* est le second gène de l'opéron *narK-fnr*. Le produit du gène *fnr* est une protéine composée de 238 acides aminés (27.2 kDa) présentant 19.6% d'homologie avec la Fnr d'*E. coli* et 23% avec la protéine Crp. La protéine Fnr de *B. subtilis*, bien que proche de celle d'*E. coli*, présente plusieurs différences aussi bien en terme de structure que d'activité.

Comme présenté sur la figure 35, l'organisation structurale est un peu différente. Le domaine senseur de Fnr de *B. subtilis* est situé en C-terminal et est constitué de 4 cystéines. Il a été montré récemment que trois cystéines de l'extrémité C-terminal (C227, C230 et C235) étaient indispensables à la formation du centre [4Fe-4S]²⁺ (Reents *et al.*, 2006a).

D'un point de vue fonctionnel, contrairement à la protéine Fnr d'*E. coli*, elle est capable de former des dimères stables en aérobie et en anaérobie indépendamment de l'état du centre [Fe-S]. En revanche, la présence du centre [Fe-S] reste indispensable à la fixation sur l'ADN.

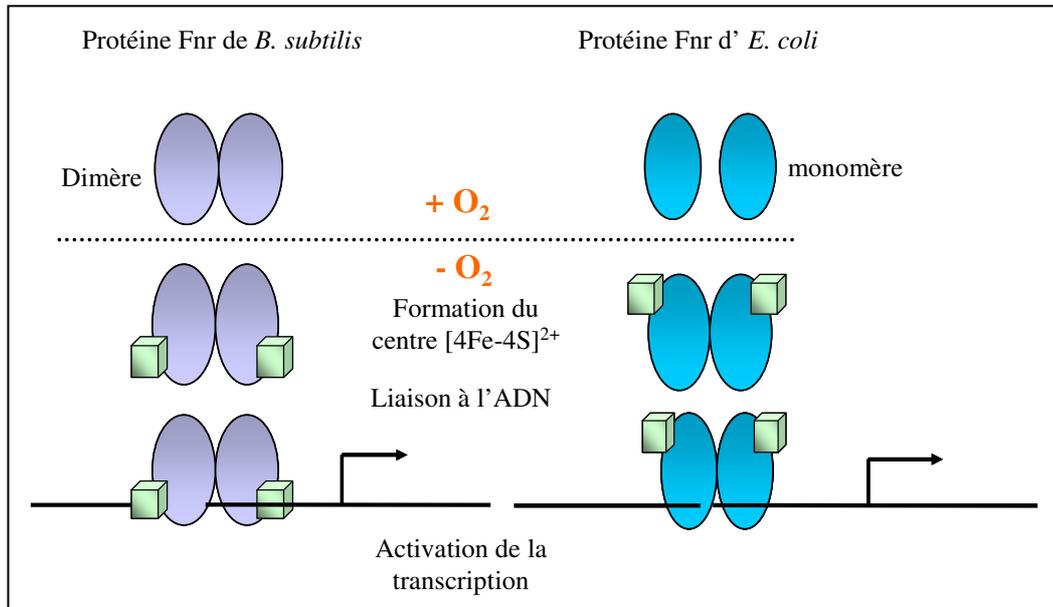


Figure 35 : Mécanisme d'action des protéines Fnr d'*E. coli* et de *B. subtilis*, d'après (Reents *et al.*, 2006a; Reents *et al.*, 2006b).

Les différences de localisation du centre [4Fe-4S]²⁺ et l'organisation oligomérique de la protéine indiquent des différences dans le mode d'action de chacune des protéines.

Fnr est un régulateur transcriptionnel des gènes d'anaérobiose qui reconnaît une séquence consensus TGTGA X₆ TCACA centrée en position -41,5. A la différence du gène *fnr* d'*E. coli*, *fnr* de *B. subtilis* est fortement induit en anaérobiose. L'induction spécifique de *fnr* requière la présence du système ResDE. Un palindrome de 18 pb situé en amont du gène *fnr* est nécessaire à son induction et pourrait être le site de fixation d'un activateur.

Quatre groupes distincts de gènes régulés par Fnr ont été caractérisés (figure 36). Le groupe de gènes 1 (*narKfnr*, *narGHJI* et *arfM*) est généralement induit en anaérobiose par Fnr. Les séquences promotrices de ces gènes contiennent des boîtes spécifiques de fixation de Fnr, localisé à - 41,5/- 40,5 en amont du site d'initiation de la transcription, qui suggèrent que l'induction se fait par interaction directe avec la protéine Fnr. Le groupe de gènes 2 (*alsSD*, *ldh* *lctP*, *ywcJ* et *cydABCD*) est réprimé par Fnr en présence de nitrate dans le milieu et impliquerait probablement le régulateur redox YdiH. Le groupe de gènes 3 (*yKuNOP*,

dhbABCEF, *ydbN*, *hmp*, *nasDE*) est induit par Fnr en présence de nitrate. Ces gènes ne possèdent pas de sites de fixation potentiels de Fnr et leur induction nécessite la présence de nitrate et nitrite produits *via* la nitrate réductase. Le groupe 4 est constitué de l'opéron *acoABCL* qui ne possède pas de boîte de fixation de Fnr et dont l'induction requiert la nitrate réductase.

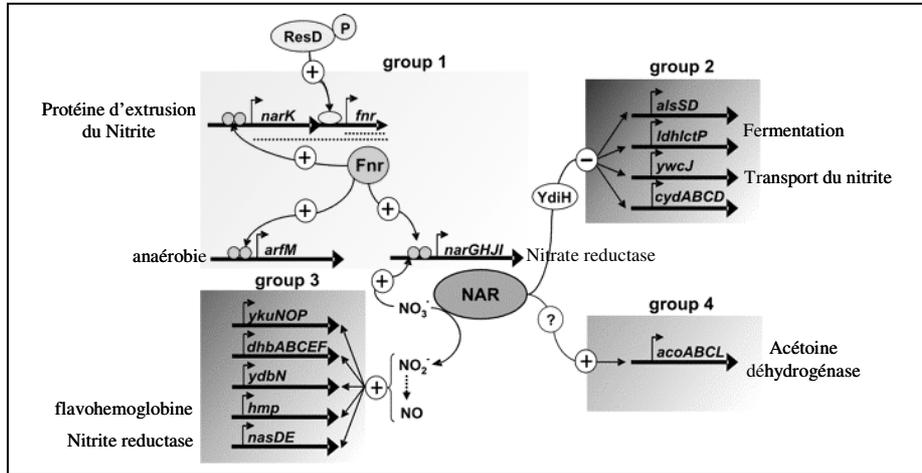


Figure 36 : Modèle de régulation impliquant Fnr lors du passage à des conditions de croissance anaérobie (Reents *et al.*, 2006b).

3.6 La protéine Fnr de *B. cereus*

Le gène *fnr* de *B. cereus* présente une organisation génétique différente de celle de son homologue *B. subtilis*. Il est en aval et en orientation inverse par rapport à l'opéron *narGHJI* codant pour les sous-unités de la nitrate réductase (Figure 37). Il est transcrit sous forme monocistronique et code pour une protéine de 230 acides aminés (28 kDa) ayant 80% d'homologie avec Fnr de *B. subtilis* (Figure 38).

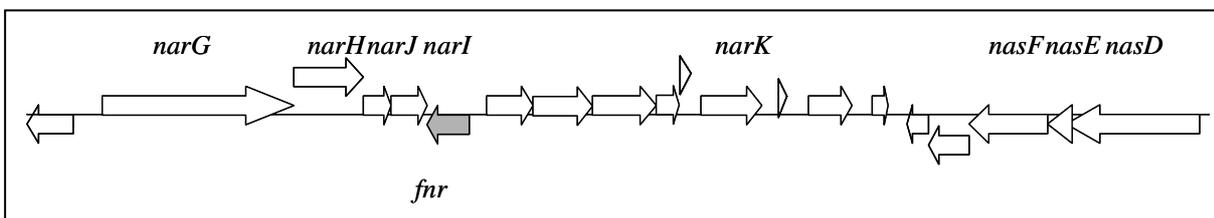


Figure 37 : Organisation génétique de la région chromosomique de *B. cereus* contenant *fnr* (Zigha *et al.*, 2007).

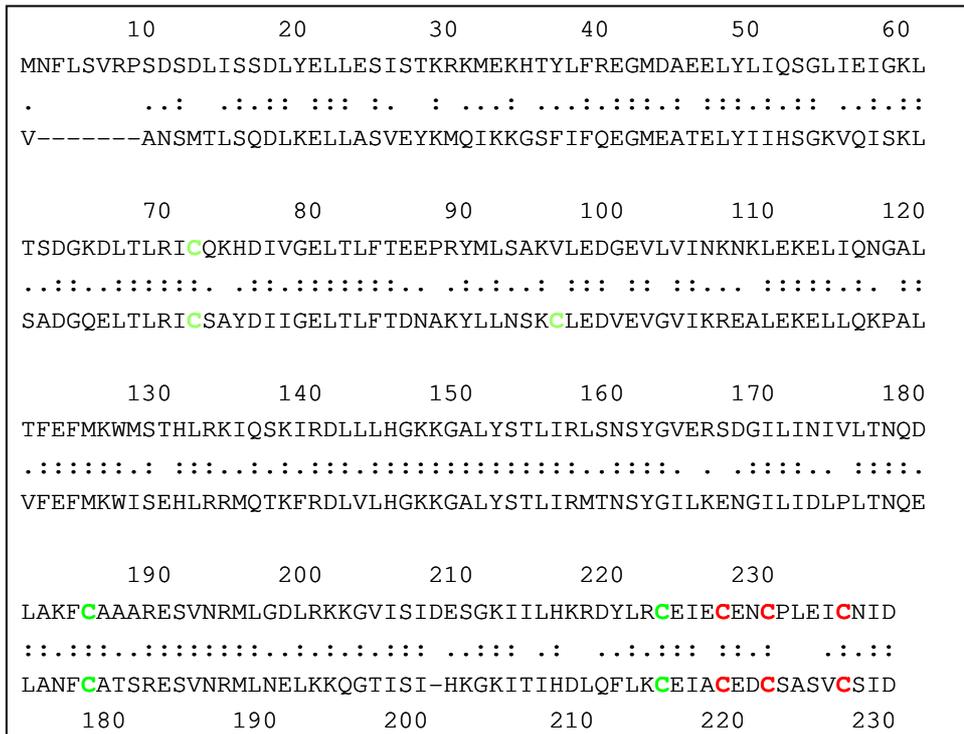


Figure 38 : Alignement des deux séquences protéiques de Fnr de *B. subtilis* et *B. cereus*. En rouge sont représentées les cystéines impliquées dans la formation du centre Fe-S (d'après ce qui est connu chez *B. subtilis*) et en vert les autres cystéines présentes dans la séquence.

Comme tous les membres de la famille Crp/Fnr, la protéine Fnr de *B. cereus* contient une région N-terminale constituée d'un domaine Crp capable de lier un nucléotide et une région C-terminale constituée d'un motif hélice tour hélice (HTH). Les deux protéines présentent une conservation des domaines C-terminaux de liaison à l'ADN et du domaine riche en cystéines (Cys-X₃-Cys-X₂-Cys-X₄-Cys).

Tout comme Fnr de *B. subtilis*, l'expression de Fnr de *B. cereus* est induite en anaérobiose et est d'autant plus importante que le potentiel d'oxydo-réduction est bas (Zigha *et al.*, 2007). La caractérisation du rôle de ce régulateur chez la souche diarrhéique *B. cereus* F4430/73 a montré qu'il avait un rôle clé dans le métabolisme fermentaire et dans la régulation de la toxigenèse.

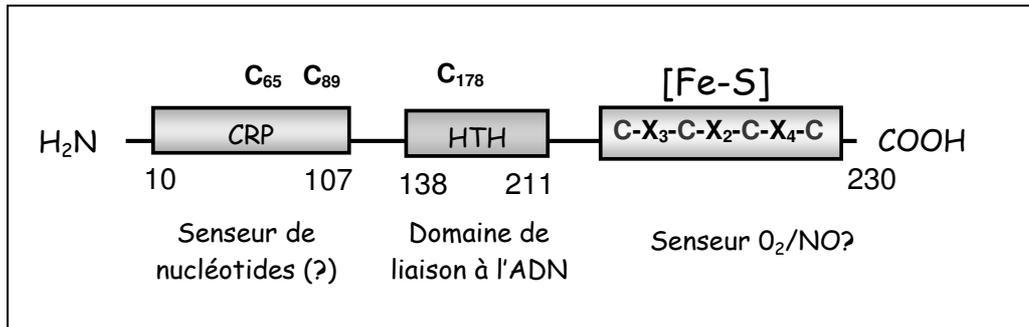


Figure 39 : Organisation structurale de la protéine Fnr de *B. cereus*. Schéma réalisé par comparaison avec la structure de la protéine Fnr de *B. subtilis* (Reents *et al.*, 2006a) et le logiciel procite (www.expasy.org/prosite).

Objectifs du travail de thèse

Les systèmes à deux composants de type ResDE et la protéine Fnr sont connus pour être des senseurs redox impliqués dans la régulation du métabolisme carboné chez *B. subtilis* (Cruz Ramos *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996) et dans la régulation de la virulence de pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* (Yarwood *et al.*, 2001) et *Listeria monocytogenes* (Lampidis *et al.*, 1994).

Les données apportées par la bibliographie et la caractérisation au laboratoire de mutants pour ces deux systèmes, nous ont amené à considérer les régulateurs Fnr et ResDE comme des éléments majeurs dans la régulation du pouvoir pathogène de *B. cereus* (Duport *et al.*, 2006; Zigha *et al.*, 2007).

Les deux premiers objectifs de cette thèse étaient de caractériser les mécanismes d'action des deux régulateurs Fnr et ResDE (action directe et/ou indirecte ?). Après une étude individuelle des régulateurs, le troisième objectif était de mettre en évidence leur interaction deux à deux ainsi qu'avec le régulateur pléiotrope PlcR connu pour sa contribution globale dans la virulence (Gohar *et al.*, 2008).

En s'intéressant aux deux régulateurs Fnr et ResDE du pathogène *B. cereus*, cette étude permet de mieux comprendre un mécanisme qui s'inscrit dans un réseau de régulation très complexe.

Matériel et méthodes

1 Souches et plasmides

1.1 Souches bactériennes

1.1.1 Souche de *Bacillus cereus*

La souche de *Bacillus cereus* utilisée dans cette étude est la souche F4430/73. Elle a été isolée d'une soupe de pois (Spira et Goepfert, 1975) et a été à l'origine de TIA. Elle appartient au même groupe génétique que la souche type de *B. cereus* ATCC14579 (Hill *et al.*, 2004). Les mutants $\Delta resE$ (ResD⁺, ResE⁻), $\Delta resD$ (ResD⁻, ResE⁻) et Δfnr (Fnr⁻) ont été obtenus au laboratoire par inactivation insertionnelle (Duport *et al.*, 2006; Zigha *et al.*, 2007).

1.1.2 Souches d'*Escherichia coli*

Les souches d'*E. coli* utilisées dans cette étude pour les expériences de clonage et d'expression sont répertoriées dans le tableau ci-dessous.

Souche	Collection	Utilisation	Génotype
TOP 10	Invitrogen	clonage	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80 lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74 deoR recA1 araD139 \Delta(ara-leu) 7697 galIU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$
BL21 CodonPlus(DE3)- RIL	stratagene	expression	[F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal l</i> (DE3) <i>endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>

Tableau 8 : Souches d'*E. coli* utilisées.

La souche BL21CodonPlus (DE3)-RIL est utilisée comme souche d'expression. La délétion de *endA* qui code pour une endonucléase, évite la dégradation de l'ADN plasmidique par cette dernière. Dans ces cellules, la présence d'un plasmide codant pour des ARNs de transfert capables de traduire les codons rares chez *E. coli* (AUA, AGG, AGA, CUA), codent pour les acides aminés isoleucine (AUA), arginine (AGG et AGA) et leucine (CUA).

1.2 Les souches de *S. cerevisiae*

- La souche AH109 (*MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 : GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 : : MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ*) est celle utilisée pour la technique de double hybride.

- La souche W303 1-b (*MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3*) a permis de réaliser les clonages par recombinaison homologue.

1.3 Les vecteurs plasmidiques utilisés

1.3.1 Le vecteur de clonage pCR-4-TOPO

Les séquences sont amplifiées avec une Taq polymérase catalysant l'addition d'une adénine sur l'extrémité 3'-OH de l'ADN. L'ajout d'un A en 3' permet par la suite l'insertion de la séquence d'ADN linéaire directement dans un plasmide avec un T en 3' (TA cloning).

Le vecteur pCR[®]-4-TOPO[®] (Invitrogen) possède à ses extrémités des topoisomérases permettant une ligature d'un insert en 5 min à température ambiante. En outre, il possède une résistance à l'ampicilline et à la kanamycine et le gène létal *ccdB* (control of cell death) qui est exprimé lorsque le plasmide n'a pas incorporé d'insert.

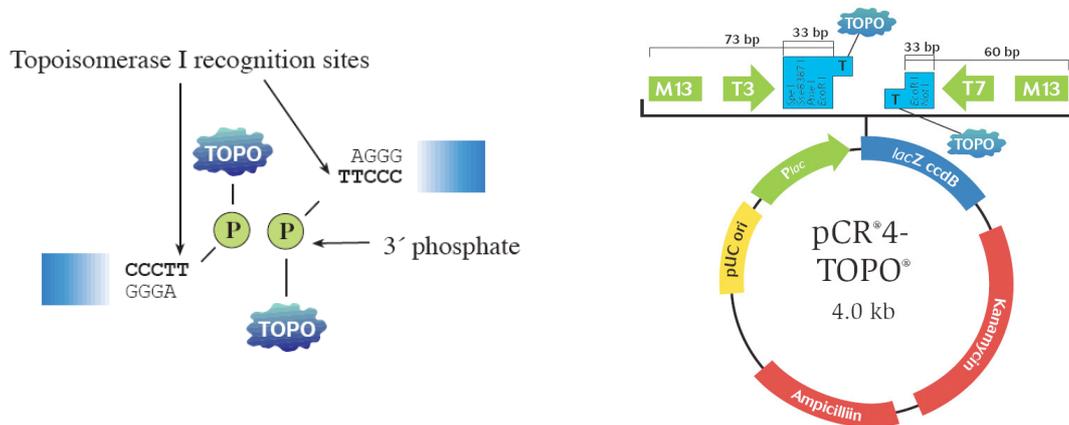


Figure 40 : Le vecteur pCR-4-TOPO (Invitrogen).

1.3.2 Les vecteurs d'expression pET100/101 et pET 52b (+)

Les vecteurs pET100/101 (Invitrogen) et pET 52b (+) (Stratagene) utilisés pour la purification des protéines étudiées appartiennent à la famille des vecteurs d'expression pET. L'avantage du système pET est que l'expression de la protéine est induite et contrôlée par l'ajout d'isopropyl- β -thiogalactopyranoside (IPTG) à la culture bactérienne. En effet, les gènes sous le contrôle du promoteur T7lac sont exprimés suite à la transcription de la T7 polymérase bactérienne par l'induction à l'IPTG. Lors de l'utilisation de ce système, il est important d'effectuer le clonage dans une souche exempte de T7 polymérase. La protéine ne sera donc pas exprimée de façon basale, ce qui limitera l'instabilité du plasmide d'expression et la toxicité (s'il y a lieu) pouvant être engendrée par l'expression protéique.

Dans ce système, les produits PCR à bouts cohésifs obtenus par ajout de quatre bases CACC à l'amorce sens, sont clonés d'une façon directionnelle dans le vecteur possédant un bout surplombant GTGG. Le clonage est médié par l'ADN Topoisomérase 1 dont le rôle est de couper et religuer l'ADN. Les vecteurs utilisés sont linéarisés et liés de manière covalente à la topoisomérase. L'enzyme reconnaît un site spécifique de 5 nucléotides (5'-CCCTT) auquel elle se lie de façon covalente puis qu'elle clive. Cette enzyme est utilisée *in vitro* pour jouer successivement les rôles des enzymes de restriction et de la ligase (Figure 41).

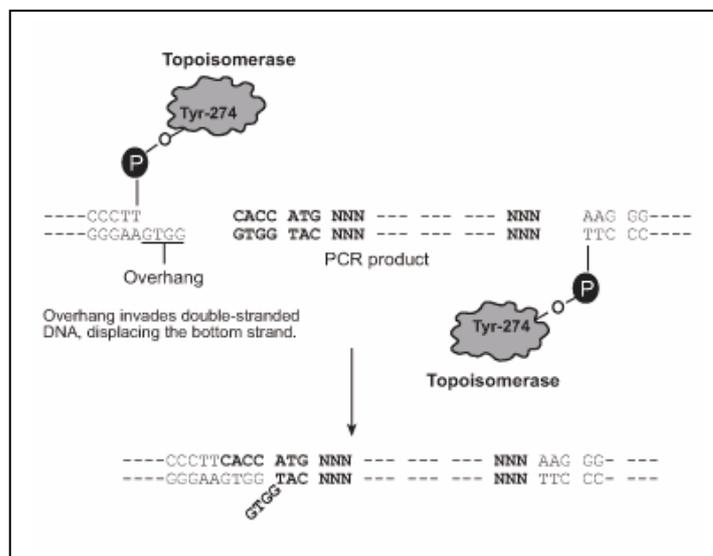


Figure 41 : Mécanisme d'action de la topoisomérase I au cours d'un clonage dans un système pET directionnel.

Selon le choix des couples d'amorces et le choix du plasmide (pET100 ou pET101), les amplicons générés par PCR grâce au système "High template" (Roche), correspondent à

l'expression d'une protéine native ou portant une étiquette polyhistidine pouvant être ajoutée en N-terminal ou en C-terminal. Après traduction, cette étiquette peut être détectée en Western-Blot grâce à un anticorps spécifique (Anti-His-Peroxydase, Roche) ou bien être utilisée pour la purification de la protéine sur colonne d'affinité pour les ions cobalt (TALON™ Metal Affinity Resin, Clontech). La figure 42 présente le système d'expression pET100/101 utilisé.

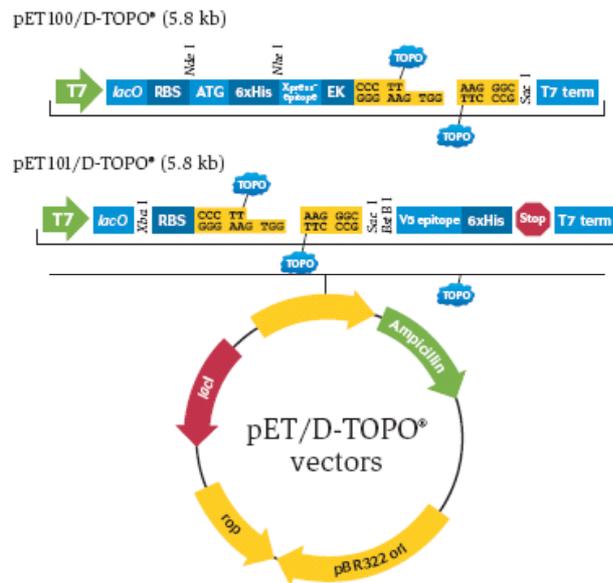


Figure 42 : Les vecteurs pET/100/101-TOPO (Invitrogen, kit Champion).

La figure 43 présente le vecteur d'expression pET52b (+) utilisé. Dans ce vecteur, les gènes étudiés sont clonés par restriction enzymatique selon les enzymes présentes dans le site de clonage. Avec ce système, plusieurs protéines recombinantes peuvent être obtenues :

- Obtention d'une protéine Strep taguée en N-terminal (**WSHPQFEK**) avec possibilité d'éliminer le tag via la protéase HRV 3C. Après traduction, cette étiquette peut être détectée en Western-Blot grâce à un anticorps spécifique (Anti-Streptavidin, Novagen) ou bien être utilisée pour la purification de la protéine sur colonne d'affinité pour la streptavidine (Gravity flow *Strep*-Tactin Superflow column (5 ml), IBA).

- Obtention d'une protéine His taguée en C-terminal (**10 His**) avec possibilité d'éliminer le tag via la thrombine. Après traduction, cette étiquette sera détectée grâce aux anticorps Anti-His-Peroxydase (Roche) et pourra être utilisée pour la purification de la protéine.

- Obtention d'une protéine Strep taguée en N-terminal (**WSHPQFEK**) et His taguée en C-terminal (**10 His**).

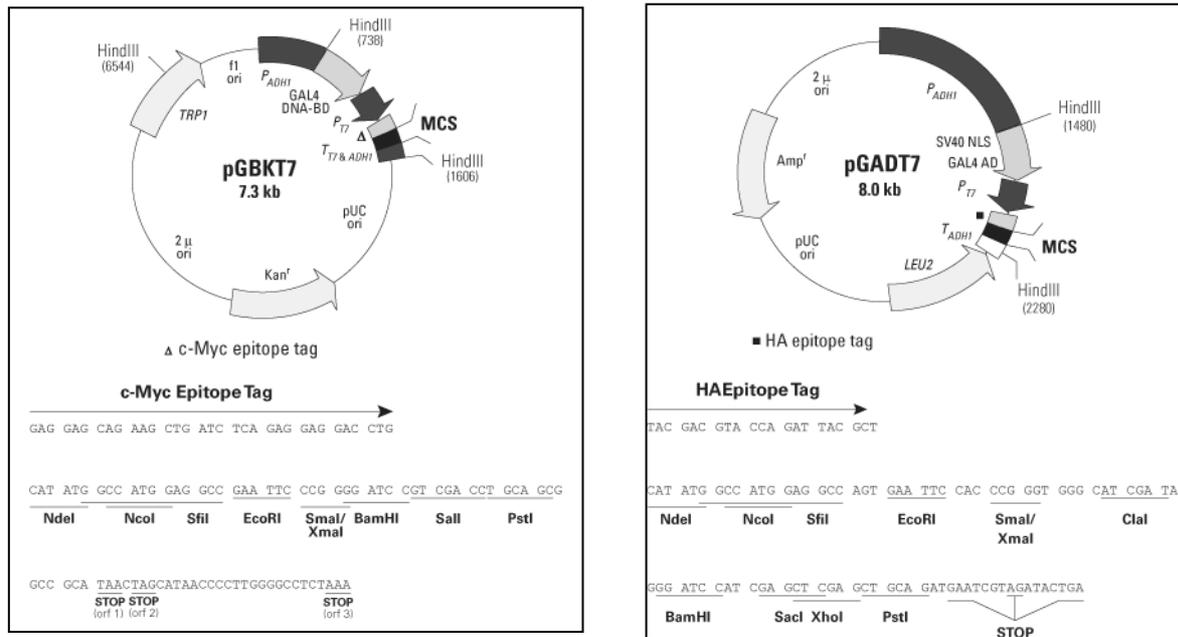


Figure 43 : Le vecteur d'expression pET52b (+).

1.3.3 Les vecteurs "double hybride"

Les vecteurs utilisés en double hybride, pGADT7 et pGBKT7 sont des plasmides "navettes" c'est-à-dire capables de se répliquer aussi bien chez *E. coli* que chez *S. cerevisiae* et portent les marqueurs de sélection Trp et Leu respectivement (Clontech).

Les vecteurs pGBKT7 et pGADT7 (figure 44) permettent un fort niveau d'expression des protéines et facilitent l'identification des interactions protéiques. Les appâts sont exprimés en protéines fusionnées au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et les proies sont exprimées en protéines fusionnées au domaine d'activation de la transcription de GAL4. Ces vecteurs contiennent aussi des marqueurs de sélection (Ampicilline et Kanamycine) permettant la sélection dans les bactéries transformées.



Les vecteurs témoins

Les vecteurs pGBKT7-53 et pGADT7-T codent pour des protéines fusion DLA /murine p53 et DA/antigène T du SV40. La protéines p53 et l'antigène T du SV40 sont connus pour interagir dans la levure lors d'essais de double hybride (Li & Fields, 1993). Une levure co-transformée avec ces plasmides constitue un témoin d'interaction positive. Le vecteur pGBKT7-Lam code pour une protéine fusion DLA /lamine C et constitue un bon contrôle négatif dans la mesure ou la lamine C ne forme jamais de complexe protéique.

2 Milieux de culture

Les souches de *B. cereus* et *E. coli* sont cultivées dans le milieu de Luria-Bertani ou LB (10 g.l⁻¹ tryptone, 5 g.l⁻¹ extrait de levure, 5 g.l⁻¹ NaCl, pH 7,0) en liquide ou en solide (ajout de 15g d'agar dans le milieu). Afin de sélectionner les bactéries transformées par un plasmide, le ou les antibiotiques appropriés sont utilisés. De l'ampicilline (100 µg/ml) ou de la kanamycine (50 µg/ml) ont été rajoutés quand cela était nécessaire.

Les levures ont été cultivées soit en milieu riche YPDA, soit en milieu minimum SD. Le milieu YPDA contient : 20 g/L de pastone (AES, Bruz, France), 10 g/L d'extrait de levure (AES, Bruz, Franc), 20 g/L de glucose (PROLABO) et 2 g/L d'Adénine (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH™, Steinheim, Allemagne).

Le milieu minimum SD contient 6,7 g/L de "Yeast Nitrogen Base without AA" (SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH™, Steinheim, Allemagne), 20 g/L de glucose. Selon les besoins, il est supplémenté soit avec 0,64g/L de "DO supplement –Leu –Trp" (Clontech Laboratories Inc, Terra Bella Ave, USA) soit 0,6 g/L de "DO supplement –Leu –His –Ade –Trp" (Clontech Laboratories Inc, Terra Bella Ave, USA), soit en ajoutant 0,1 g/L de leucine ou 0,02 g/l de tryptophane et 40 mg/L de X-gal.

L' α -galactosidase est une enzyme naturellement exportée de la cellule de levure. Elle est codée par le gène rapporteur *mel1* présent chez la souche de levure AH109. Dans le système de double hybride, lorsqu'il y a interaction entre deux protéines, la réponse Gal-4 est induite. Cette réponse amène la transcription du gène rapporteur *mel1*. L'activation de *mel1* peut être vérifiée par l'addition d'un substrat chromogène, le α -X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl α -D-galactopyranoside) dans le milieu. L'hydrolyse de ce substrat par l' α -galactosidase se traduit par une coloration bleue. Les cellules de levure AH109 co-transformées sont repiquées sur milieu minimum contenant α -X-Gal (40 mg/L).

Tous les milieux peuvent être obtenus sous forme solide en ajoutant 15 g/L d'agar (AES, Bruz, France).

3 Techniques de biologie moléculaire

3.1 Techniques générales

3.1.1 Extraction d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique de *B. cereus* est réalisée suivant la méthode de Guinebretière et Nguyen-The (2003) (Guinebretière and Nguyen-The, 2003). 10 ml d'une culture jeune (16 heures) de *B. cereus* sont centrifugés (9500 g, 5 min) et les culots bactériens sont repris dans 500 μ l de tampon TES (0,2 M NaCl, 0,2 M Tris pH 8,8, 0,02 M EDTA) et 50 μ l de SDS à 20% et incubé 60 min à 55°C. Après ajout de la RNase (10 mg/ml) et incubation de la réaction 30 min à 65°C, l'ADN est purifié par extraction phénol/ chloroforme et précipité avec de l'alcool absolu (2 volumes) et de l'acétate de sodium 3M pH 4,8 (0,1 volume) à -20°C, pendant 1 heure. Les culots sont repris dans 50 μ l d'eau ultra pure. L'ADN est dosé par spectrophotométrie à 260 nm et stocké à -20°C.

3.1.2 Extraction des plasmides bactériens

L'extraction de plasmides s'effectue avec le kit "Wizard R *Plus* SV Minipreps DNA Purification System" (Promega). Il permet l'extraction de plasmides utilisés pour les réactions de séquençage d'ADN ou de clonage.

3.1.3 Extraction des plasmides de levure

Les cellules sont récoltées par centrifugation (10 min à 5000 tour/min) après 48 h de culture à 30°C. Le culot cellulaire est repris dans 1 ml d'un tampon de "cassage" (Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM) auxquels sont ajoutés 200µl de phénol-chloroforme (v/v) et l'équivalent de 200 µl de billes de Zirconium. Les cellules sont lysées par broyage mécanique à l'aide du broyeur Fastprep (MP Biomedicals) (puissance 6,5 pendant 45 secondes). Le broyat est ensuite centrifugé et l'ADN contenu dans la phase supérieure est précipité avec 2,5 volume d'éthanol et 1/10 volume d'acétate 3M pH 4,8. Après 20 min d'incubation à -20°C, l'ADN précipité est récupéré par centrifugation (15-20 min à 4°C à 10000 t/min) et est ensuite solubilisé avec 50 µl d'eau. La quantification de l'ADN est réalisée via la mesure de son absorption à 260 nm.

3.1.4 Amplification des acides nucléiques

Les réactions de PCR ont été effectuées à l'aide de la polymérase "Expand™ High Fidelity PCR System (Roche)". L'amplification avec cette enzyme nécessite 20 ng d'ADN génomique, 10 µM des amorces sens et anti-sens, 50 µM de chaque dNTP et 3.5 U/ µl d'enzyme. Le tampon utilisé est celui fourni par le fabricant.

Les séquences des amorces utilisées dans cette étude sont présentées dans le tableau 9.

Amorces	Séquence de l'amorce	Gène amplifié
FnrpET101F	CACCGTGGCAAACAGTATGACATTATCT	<i>fnr::his</i>
FnrpET101R	ATCAATGCTACAAACAGAAGC	
FnrpET52F	CCCGGGATGACATTATCTCAAGATTTAAAAGAA	<i>strep::fnr</i>
FnrpET52R	GAGCTCCTAATCAATGCTACAAACAGAAGCA	
ResDpET101F	CACCATGGAAAATGAATCAAGAATTTTAATTGTAG	<i>resD::his</i>
ResDpET101R	GTCGTTCCACAACCTCAAATTTGTAACCTAC	
ResEpET100F	CACCATGACAGCACCGCTTCGTAAAATGCGTGAG	<i>his::resE</i>
ResEpET100R	CTAAATTATACGATTCGGTAAATATACAG	
Fnr2pET101F	CACCATGACATTATCTCAAG	<i>fnr</i>
Fnr2pET101R	CTAATCAATGCTACAAACAGAAGC	
PlcRpET101F	CCCGGGATGCACGCAGAAAAATTAGGA	<i>Strep::plcR::his</i>
PlcRpET101R	GAGCTCTCTGCTGATCTTATTTACGAGCG	
FpGBKT7/Fnr	GGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATATG GCCATGGAGGCC GCG GTGGCAAACAGTATGACATTATC	<i>fnr</i>
RpGBKT7/Fnr	CAAGGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGTC GACGGATCCCCGG G CTAATCAATGCTACAAACAG	
FpGADT7/Fnr	GTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCC ATGGAGGCCAGT GCG GTGGCAAACAGTATGACATTATC	
RpGADT7/Fnr	CATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCGTATCGATG CCCACCCGGGTGGCTAATCAATGCTACAAACAG	
FpGBKT7/ResD	GGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATAT GGCCATGGAGGCC GCG ATGGAAAATGAATCAAGAAT	<i>resD</i>
RpGBKT7/ResD	CAAGGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGT CGACGGATCCCCGG G TCAGTCGTTACAACCTCAA	
FpGADT7/ResD	GTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCC ATGGAGGCCAGT GCG ATGGAAAATGAATCAAGAAT	
RpGADT7/ResD	CATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCGTATCGAT GCCACCCGGGTGGT G CAGTCGTTACAACCTCAA	
FpGBKT7/ResE	GGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATA TGCCATGGAGGCC GCG ATTACAGCACCGCTTCG	<i>resE</i>
RpGBKT7/ResE	CAAGGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGG TCGACGGATCCCCGG G CTAAATTATACGATTCGG	
FpGADT7/ResE	GTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGC CATGGAGGCCAGT GCG ATTACAGCACCGCTTCG	
RpGADT7/ResE	CATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCGTATC GATGCCACCCGGGTGGCTAAATTATACGATTCGG	
FpGBKT7/PlcR	GGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGCATAT GGCCATGGAGGCC GCG ATGCACGCAGAAAAATTAG	<i>plcR</i>
RpGBKT7/PlcR	CAAGGGTTATGCTAGTTATGCGGCCGCTGCAGGT CGACGGATCCCCGGT T ACTGATTTTATTAC	
FpGADT7/PlcR	GTACCCATACGACGTACCAGATTACGCTCATATGGCC ATGGAGGCCAGT GCG ATGCACGCAGAAAAATTAG	
RpGADT7/PlcR	CATCTGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCCGTATCGATG CCCACCCGGGTGGTTATCTACTGATTTTATTAC	

Fhbl1	GGTAAGCAAGTGGGTGAAGC	<i>hbl1</i>
Rhbl1	AATCGCAAATGCAGAGCACAA	
Fhbl2	TTACTTAATTCATATAACTT	<i>hbl2</i>
Rhbl2	TACGCATTAATAAATTTAAT	
Fnhe	TGTTATTACGACAGTTCCAT	<i>nhe</i>
Rnhe	CTGTAACCAATAACCCTGTG	
Ffnr	CGAACACTTCAGCAGGCATA	<i>fnr</i>
Rfnr	AATGTCATACTGTTTGCCAC	
FresDE	TGGGATCCCAAAGAGGTTTG	<i>resDE</i>
RresDE	CGATCCTCATCATCTACAAT	
FplcR	TATGTTTGTGCAAGGCGAAC	<i>plcR</i>
RplcR	CCTAATTTTTCTGCGTGCAT	

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées dans les réactions PCR.

Le programme utilisé est le suivant:

- Dénaturation initiale (94°C, 1 min)
- 35 cycles: Dénaturation (94°C, 1 min)
 - Hybridation (température adaptée aux amorces, 1 min)
 - Élongation (68°C, 1 min pour 1000 pb)
- Elongation finale (68°C, 7 min)

Les produits de la réaction PCR sont vérifiés sur un gel d'agarose 1% et purifiés à l'aide du Kit de purification "High Pure PCR Product" (Roche).

3.1.5 Electrophorèse d'ADN

Les fragments d'acides nucléiques sont séparés par électrophorèse horizontale en gel d'agarose dans un tampon TAE (Tris 40 mM, acide acétique 0,1%, EDTA 2 mM, pH 8,5). La concentration d'agarose est dépendante de la taille des fragments à séparer, elle peut varier de 1 à 2 %. Dans la majorité des cas, nous utilisons des gels d'agarose à 1 % en tampon TAE, avec 1 µg/ml de bromure d'éthidium (BET). Les échantillons d'ADN sont, au préalable, additionnés de 1/5 (v/v) d'une solution de charge (bleu de bromophénol 0,25 %, xylène cyanol 0,25 %, glycérol 30 %) afin de visualiser la migration et d'augmenter la densité des échantillons. Après une migration entre 50 et 100 V, selon la taille des échantillons, l'ADN est visualisé par fluorescence au BET sous ultraviolets.

3.1.6 La technique de RACE PCR

Il s'agit d'un procédé permettant l'amplification d'une séquence d'acide nucléique à partir d'un ARN messager (ARNm). Elle permet de déterminer le site +1 de transcription d'un gène. Cette analyse a été réalisée à l'aide du kit 3'/5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) (Roche Molecular Biochemicals). Les réactions sont réalisées selon les recommandations du fournisseur à l'aide d'amorces spécifiques.

3.1.7 Ligation

3.1.7.1 Dans le vecteur pCR-4-TOPO

Le produit PCR purifié (4 µl) est ajouté à 1 µl de plasmide et 1 µl de solution de sels. Le mélange réactionnel est incubé 5 min à température ambiante puis placé dans la glace avant transformation dans les cellules d'*E. coli* compétentes. La transformation s'effectue dans des bactéries compétentes d'*E. coli* souche TOPO10 (Invitrogen).

3.1.7.2 Dans le vecteur pET100/101

La réaction est réalisée dans un volume total de 5 µl contenant : 5 ng de produit PCR purifié, 1 µl de vecteur pET100 ou 101 et 1 µl d'une solution de sels. Le mélange réactionnel est incubé 10 min à température ambiante et la transformation bactérienne est réalisée immédiatement.

3.1.7.3 Dans le vecteur pET52b (+)

D'un point de vue pratique, la réaction de clonage est réalisée dans un volume réactionnel contenant : 5 µl de vecteur pET52b (+) double digéré, le produit PCR purifié dans un rapport insert/vecteur de 5, 1 µl de T4 DNA ligase et 1 µl de tampon de ligase. Le mélange réactionnel est incubé 5 heures à température ambiante et la transformation bactérienne est réalisée immédiatement.

3.1.8 Transformation chimique des cellules d'*E. coli* compétentes

Les bactéries compétentes (100 µl) sont incubées dans la glace avec 3 µl du produit de ligation pendant 30 min. Les bactéries sont transformées grâce à une incubation de 30 sec à 42°C puis refroidies immédiatement dans la glace pendant 2 min. Les cellules sont ensuite incubées 1h30 à 37°C sous agitation (200 t/min) dans 250 µl de milieu SOC (1,5 ml de SOB

(Super Optimal Broth), 15 μ l Mg^{2+} 2M, 15 μ l glucose 2 M). Les bactéries sont ensuite étalées sur du milieu LB contenant l'antibiotique adapté et incubées pendant 16 h à 37°C.

3.1.9 Transformation dans la levure

3.1.9.1 Préparation des cellules compétentes

Pour la transformation, 2 ou 3 jeunes colonies de levure (AH109 ou W303), conservées à 30°C, sont prélevées et mises en culture dans 30 ml de YPDA. Après une nuit d'incubation à 30°C et sous agitation (200 t/min), la totalité de la préculture est utilisée afin d'inoculer 200 ml de milieu YPDA. La croissance est suivie pendant 3h à 30°C sous une agitation de 200 t/min. Les cellules sont ensuite centrifugées 3 min à 5000 t/min et le culot est repris dans 2 ml d'eau stérile. Après deux lavages avec 2 ml d'eau stérile, les cellules sont lavées avec 2 ml de tampon lithium (100 mM acétate de lithium, 10 mM Tris-HCl pH 7,5 et 1 mM EDTA) puis reprises dans 150 μ l de ce même tampon.

3.1.9.2 Transformation

Une fois les cellules rendues compétentes, 50 μ l de ces cellules sont mélangés avec 1 à 2 μ g d'ADN transformant purifié et 50 μ g d'ADN de sperme de saumon soniqué et dénaturé. On ajoute 350 μ l de tampon PEG (40% de PEG 4000, 100 mM d'acétate de lithium, 10 mM Tris-Hcl pH 7,5 et 1 mM EDTA). Les cellules sont incubées 30 min à 30°C puis placées à 42°C pendant 20 min (choc thermique). Un lavage avec 2ml de NaCl 0,4% est effectué avant d'étaler 100 μ l de la transformation sur le milieu sélectif approprié que l'on incube à 30°C pendant 48 à 72h. Les cellules transformées sont ensuite mises en culture dans 30 ml de milieu sélectif (SD-Leu/SD-Trp) sous agitation pendant 48h à 30°C.

3.2 **Technique de retard sur gel (EMSA)**

3.2.1 Principe

La technique du gel retard est basée sur le retard de migration dans un gel natif de polyacrylamide de duplex d'oligonucléotides en présence de protéines (ou de complexes protéiques) ayant la propriété de reconnaître spécifiquement la séquence d'intérêt. La variation de migration des duplex (ou sondes) complexés aux protéines par rapport aux duplex libres est suivie grâce au marquage radioactif au ^{32}P des sondes nucléotidiques (Figure 45). La spécificité de reconnaissance des sondes marquées peut être testée par l'ajout en excès du même duplex non radioactif qui entrent en compétition avec la forme radioactive.

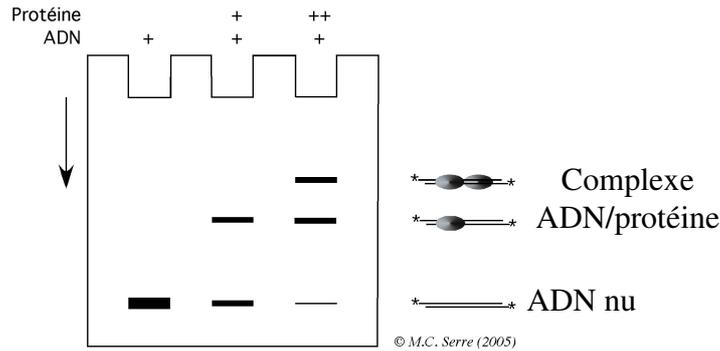


Figure 45 : Schéma représentatif du principe de la technique de retard sur gel.

3.2.2 Marquage radioactif des régions promotrices

3.2.2.1 Marquage des oligonucléotides

Les oligonucléotides sens sont marqués radioactivement à l'aide de ^{32}P -[ATP]. La phosphorylation en 5' est réalisée à l'aide de la T4-polynucléotide kinase (Promega). La réaction se fait dans un volume total de 10 μl en présence de 10 pmol d'oligonucléotides (0.5 μl), de tampon 10X de la T4 kinase (1 μl), de 10 pmol de ^{32}P -[ATP] (activité spécifique 5000 Ci/mmol) (Amersham Biosciences) et 4 unités de T4 polynucléotide kinase (1 μl). La réaction est incubée à 37°C pendant 30 min, puis chauffée à 65°C afin d'inactiver l'enzyme.

3.2.2.2 Marquage des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN marqués sont produits par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en utilisant une des deux amorces marquée au ^{32}P . Le mélange réactionnel est composé de l'ADN matrice (20 ng), de l'oligonucléotide sens radioactif, de l'oligonucléotide non-sens froid, de désoxyribonucléotides (0,2 mM de chaque dNTP), du tampon de la polymérase et de la polymérase (High Template, Roche) (1 μl). Les fragments PCR sont purifiés par le kit "High Pure PCR Product Purification Kit, Roche". Le dosage de la radioactivité se fait par le compteur à scintillation (Tri-Carb, Packard).

2.2.3 Interaction ADN/protéines

La réaction de complexation ADN/protéine se fait dans un volume final de 10 μl dans du tampon binding (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, Glycérol 10%, DTT 4 mM et MgCl_2 4 mM) en présence de la protéine d'intérêt à la concentration désirée, et de poly dIdC (1 μg). La sonde testée (1 000 cpm de fragment d'ADN marqué) est ajoutée et la

réaction est incubée à 37°C. Après 30 min d'incubation, la réaction est arrêtée par ajout de solution stop (glycérol 20%, tampon binding 1X, 0,25% de bleu de bromophénol et 0,25% de xylène cyanol). Cette dernière permet de faciliter le dépôt des échantillons et de suivre la vitesse de migration en visualisant la progression des deux marqueurs colorés (Sambrook & Gething, 1989).

3.2.4 Migration des complexes ADN-Protéines

Nous avons utilisé des gels de polyacrylamide de 18 cm x 2 cm x 0,8 mm à 4 ou 6% d'acrylamide suivant la taille du fragment considéré (acrylamide/ bisacrylamide, 29:1, sous forme liquide, Biorad). Le tampon d'électrophorèse est du TBE 0,5X à pH 8. Avant dépôt des échantillons, nous réalisons un pré-run du gel à 140 V pendant une heure. Pour éviter une dénaturation des protéines durant la migration, nous avons eu recours à un système de doubles cuves d'électrophorèse à réfrigération centrale par un cryostat réglé à 4°C. Dans ces conditions, la migration a lieu à voltage constant (150 V). Après migration, les gels sont séchés sur papier Wathman et exposés en cassette de phosphoImager. Les cassettes sont numérisées à l'aide d'un scanner (Storm, Molecular dynamics) et le traitement des images est réalisé à l'aide du programme "phospho Imager".

3.3 Le système du double-hybride chez la levure

3.3.1 Principe

Le système du double-hybride chez la levure *S. cerevisiae* permet d'identifier une interaction protéine-protéine (X-Y) *in vivo* par reconstitution d'un activateur chimérique de la transcription. La protéine GAL4 n'est fonctionnelle que dans la mesure où son domaine de liaison à l'ADN (DLA) et son domaine d'activation (DA) sont associés (Chien *et al.*, 1991; Fields & Song, 1989). Le système utilisé dans cette étude est le Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 commercialisé par Clontech. Ce kit propose une souche de levure optimisée afin de réduire les faux positifs ainsi que les deux vecteurs permettant le clonage des gènes appâts et des gènes proies.

Dans la levure AH109 (Clontech), conçue spécialement pour être utilisée dans le système de double hybride, la reconstitution fonctionnelle du facteur de transcription GAL4 mène à la transactivation de gènes rapporteurs placés en aval du promoteur (Figure 46).

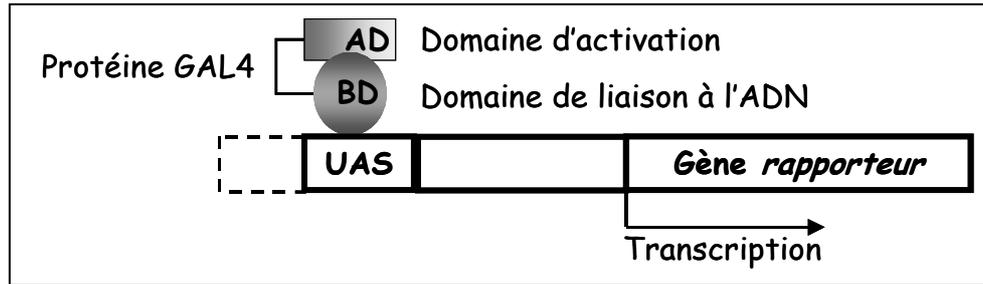


Figure 46: Principe de l'activation des gènes rapporteurs chez la levure AH109.

Expérimentalement, les levures AH109 sont transformées simultanément par deux plasmides : l'un code pour la protéine recombinante X fusionnée au DLA de GAL4 (DLA-X) et portant le gène de sélection *trp1* (tryptophane), tandis que l'autre code pour la protéine Y fusionnée au DA (DA-Y) et portant le gène de sélection *leu2* (leucine). Les protéines de fusion exprimées possèdent un signal de localisation nucléaire permettant leur translocation au noyau, où se trouvent les gènes rapporteurs. La première étape consiste à sélectionner les levures transformées par les deux plasmides en les étalant sur un milieu minimum sélectif. La deuxième étape consiste à déceler une éventuelle interaction entre les deux protéines d'intérêt. L'interaction des protéines X et Y permettra la reconstitution du transactivateur GAL4 et la transcription des gènes rapporteurs *ade2*, *his3* et *lacZ/mel1*, permettant respectivement la synthèse d'adénine, d'histidine et de la β ou α -galactosidase. L'importance de l'interaction entre les deux protéines peut être estimée par la croissance des colonies sur des milieux déficients en adénine ou en histidine, ou par l'intensité de la coloration bleue sur les milieux contenant le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-Gal).

La transcription de ces gènes rapporteurs permet la sélection des levures lorsque nous utilisons un milieu sélectif. Le gène rapporteur *ade2* permet d'appliquer une forte sélection nutritionnelle en éliminant l'adénine du milieu. L'utilisation optionnelle d'une sélection via le gène rapporteur *his3* réduit l'incidence de faux positifs et permet de contrôler la stringence du milieu sélectif. En plus de ces systèmes, il est possible d'exploiter les gènes rapporteurs *mel1* ou *lacZ* codant respectivement pour l' α -galactosidase et la β -galactosidase. Comme l' α -galactosidase est une enzyme sécrétée, des tests sur milieu solide X- α -Gal peuvent être réalisés directement pour un screening bleu/blanc.

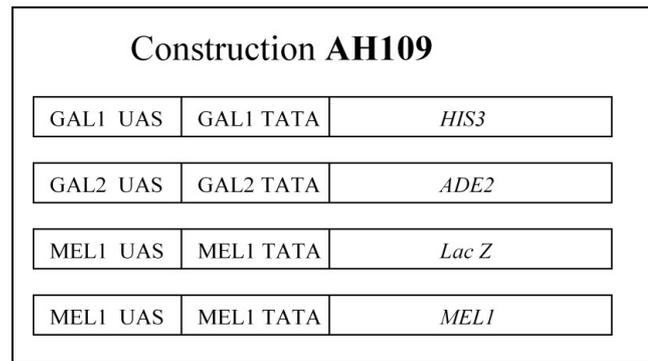


Figure 47: Gènes rapporteurs dans la levure AH109.

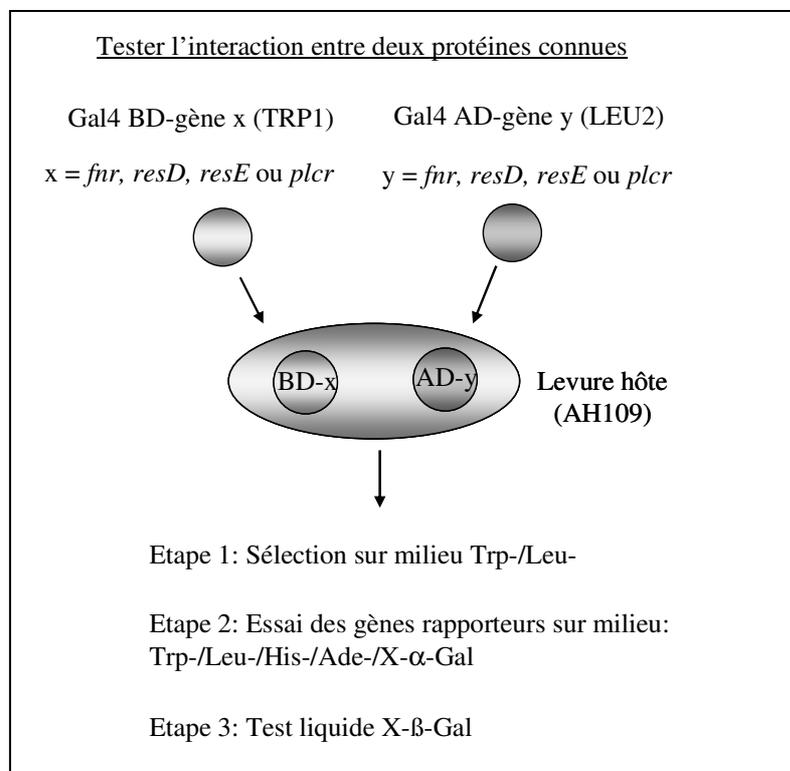


Figure 48 : Le système Matchmaker.

3.3.2 Construction des vecteurs d'expression appât et proie

Chez la levure, il est possible d'utiliser la recombinaison homologe pour cloner *in vivo* un insert dans un vecteur linéarisé à condition que les extrémités de l'insert portent une séquence identique à une séquence d'au moins 40 nucléotides du vecteur. Cette méthode, appelée la méthode du "gap repair" a été largement utilisée pour cloner pratiquement tous les ORFs de *Saccharomyces cerevisiae*.

Dans cette technique de clonage, le vecteur de double hybride pGBKT7 a été linéarisé par l'enzyme de restriction *EcoR1* et les inserts ont été amplifiés à l'aide d'amorces portant 50 nucléotides du vecteur. Les extrémités des inserts se trouvent ainsi allongées d'une séquence homologue au vecteur de manière à permettre la recombinaison dans la levure.

4 Techniques de biochimie

4.1 Techniques générales

4.1.1 Dosage des protéines

4.1.1.1 Dosage des protéines selon la méthode de Biuret (insensible aux thiols)

Cette méthode a été développée par Gornall *et al* en 1949 (Gornall *et al.*, 1949) et repose sur la formation d'un complexe pourpre entre le biuret ($\text{NH}_2\text{-CO-NH-CO-NH}_2$) et deux liens peptidiques consécutifs en présence de cuivre en milieu alcalin. Le complexe de coordination résultant absorbe fortement dans le bleu.

Dans cette méthode, le réactif 1 (1,8g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ + 3,35 g $\text{Na}_2 \text{EDTA}$, H_2O qsp 350 ml) est mélangé au réactif 2 (NaOH 20%) dans la proportion 7:2. A 700 μl de ce mélange réactionnel sont ajoutés 70 μl de sept concentrations de Sérum Albumine Bovine (BSA) ainsi que l'échantillon protéique dont la concentration est à déterminer. Les réactions sont incubées 5 mn à 65°C et la $\text{DO}_{545\text{nm}}$ est mesurée après 30 min à l'aide d'un spectrophotomètre.

4.1.1.2 Dosage selon la méthode du BCA

L'acide bicinchonique (BCA) réagit avec les complexes de Cu^{2+} et de protéines de façon très similaire à la réaction du biuret. Les protéines réduisent le cuivre II en cuivre I proportionnellement à leurs concentrations. Le BCA forme un complexe de couleur pourpre avec les ions Cu (I) dont le maximum d'absorbance se situe à une longueur d'onde de 562 nm. C'est une méthode sensible et rapide qui résiste aux détergents comme le Triton ou le SDS.

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode fournie avec le kit "MicroBC Assay Protein quantification" (Interchim). En premier lieu, 150 μl du mélange réactionnel (solution A + solution B + solution C (25/25/1)) a été ajouté à 150 μl de onze concentrations de BSA ainsi qu'à 1 à 10 μl d'échantillon protéique (selon la concentration estimée). Ces mélanges ont été réalisés en micro-plaque puis incubés à 37°C pendant 60 minutes. La DO à 562 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre. La concentration moyenne de chaque échantillon a été déterminée à partir de la courbe standard de BSA.

4.1.2 Production des anticorps polyclonaux

Les anticorps dirigés contre les protéines Fnr et ResD ont été produits à l'animalerie du CEA/Valrhô de Marcoule (Bagnols-sur-Cèze) sous la direction de Mme Valérie Tanchou. Brièvement, les anticorps ont été obtenus après 4 injections en sous cutané de 500 µl de protéines (1 mg/ml) émulsionnées avec de l'adjuvant. Des prélèvements intermédiaires de sérum ont été réalisés afin de suivre la spécificité des anticorps au cours de l'immunisation. Le cinquième mois la saignée finale des lapins est réalisée et la totalité du sérum est récupérée (environ 30 ml par animal) afin d'être aliquotée et conservée à -80°C.

4.1.3 Purification par épuisement des anticorps

Les préparations d'anticorps polyclonaux contiennent souvent des anticorps qui peuvent être réactifs de façon non spécifique avec les protéines de l'organisme étudié. Ces anticorps contaminants augmentent le bruit de fond des analyses par Western Blot affectant leur sensibilité. Pour éliminer ce problème, il est possible d'adsorber les anticorps avec un lysat d'*E. coli*. Dans ce protocole, le lysat bactérien est dans un premier temps lié à une membrane de nitrocellulose. La solution d'anticorps polyclonaux est alors incubée avec cette membrane afin d'adsorber les anticorps contaminants.

4.1.3.1 Préparation du lysat bactérien

Une colonie de la souche BL21 CodonPlus (DE3)-RIL est inoculée dans 10 ml de milieu LB et incubée durant une nuit sous une agitation de 200 t/min à 37°C. Le lendemain 90 ml de milieu LB sont inoculés avec les 10 ml de pré-culture et incubés sous une agitation 200 t/min 3 h à 37°C. Les cellules sont centrifugées à 3000 g pendant 15 min à 4°C et remises en suspension dans 10 ml de tampon de lyse (50 mM sodium phosphate, 300 mM NaCl, pH7). Du lysozyme est ajouté à une concentration finale de 0.75 mg/ml et la préparation est incubée 30 min à température ambiante avant d'être refroidie dans la glace. La lyse est réalisée par sonication (6 cycles de 10 secondes) en gardant les cellules dans la glace. Le lysat cellulaire est obtenu par centrifugation à 12000 g, 20 min à 4°C.

4.1.3.2 Saturation de la membrane

Une membrane de nitrocellulose est incubée 30 min sous agitation avec le lysat bactérien d'*E. coli* dilué au 1/5^{ème} dans du PBS 1X. Après être séchée sur du papier Wathman celle-ci est lavée 3 fois par incubation de 5 min dans du PBS 1X. La membrane est ensuite

incubée dans une solution de saturation (Régilait 5%) pendant 1h sous agitation à température ambiante.

4.1.3.3 Epuisement des anticorps non spécifiques

La membrane est lavée 3 fois avec du tampon PBS 1X. La solution d'anticorps polyclonaux (sérum brut) est diluée 200 fois dans du tampon PBS 1X et la membrane y est immergée sous agitation pendant une nuit à 4°C. La solution d'anticorps est ensuite stockée à -20°C et sera utilisée par la suite au 1/2000^{ème}.

4.1.4 Extraction des protéines intracellulaires de *B. cereus*

L'extraction est réalisée sur 50 ml de culture que l'on veut étudier. Les cellules sont décongelées et centrifugées à 6000 t/min pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire est repris dans 5 ml d'eau MilliQ puis centrifugé à nouveau à 6000 t/min pendant 10 min à 4°C. Le culot obtenu est repris dans 1 ml de tampon d'extraction (urée 8M, DTT 20 mM, Chaps 4%) et la suspension est répartie dans des microtubes contenant 0.3 g de billes de zirconium (Biospec Products, Inc). Les cellules sont broyées en utilisant l'appareil FastPrep (FP120, Bio101, Thermo electron corporation). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 3500g pendant 1 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et les billes sont lavées 2 fois avec 500µl d'eau MilliQ (centrifugation à 3500 g pendant 1 min à 4°C entre chaque lavage). Le tout est filtré une première fois à 0.45 µm puis une deuxième fois à 0.22 µm (Millipore). Les extraits protéiques sont alors dosés à l'aide du kit "MicroBC Assay Protein quantification" (Interchim) comme décrit précédemment.

4.1.5 Electrophorèse de protéines

Généralement, 5 à 20 µg de protéines sont mélangés volume à volume avec du tampon de charge (2% SDS, 20% glycérol, 5% β-mercaptoéthanol, 0,015% de bleu de bromophénol dans du Tris HCl 62,5 mM, pH 6,8) (Laemmli, 1970) et dénaturés 4 min à 95°C. Les électrophorèses dénaturantes (SDS-PAGE) sont réalisées dans un système Mini Protean II (Biorad). Le gel de migration se compose de la superposition d'un gel de séparation (12% d'acrylamide, 1% SDS, 1% persulfate d'ammonium, 0,04% TEMED dans du Tris HCl 0,375 M pH 8,8) comme partie inférieure et d'un gel de concentration (5% d'acrylamide, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium, 0,04% TEMED dans Tris HCl 0,125 M pH 6,8) comme partie supérieure. Après dépôt des échantillons, la migration s'effectue à 100 volts dans un tampon d'électrophorèse (3 g.l⁻¹ Tris base, 14,25 g.l⁻¹ glycine, 1 g.l⁻¹ SDS) jusqu'à disparition

du front de migration. Le gel est ensuite lavé dans de l'eau ultra pure (3 à 5 min), coloré pendant 10 min dans du bleu de Coomassie et enfin rincé dans la solution de décoloration (éthanol/ acétate, V/V) pendant 30 min.

Les électrophorèses non dénaturantes (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis ou BN-PAGE) sont réalisées dans le même système Mini Protean II selon le protocole décrit par Wittig *et al* (Wittig *et al.*, 2006). Dans cette méthode le bleu de Coomassie G-250 est ajouté aux échantillons afin de charger négativement les protéines.

4.1.6 Détection des protéines par immunomarquage

En vue de réaliser un Western Blot, les protéines sont transférées du gel d'électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose 0,45 μm (Amersham Bioscience) à l'aide du système Mini Protean II (Biorad). Le transfert s'effectue dans du tampon de transfert froid (6,05 g.l^{-1} Tris base, 28,8 g.l^{-1} glycine, 15 ml.l^{-1} méthanol pH 8,6), à 100 volts pendant 1 heure. La membrane est ensuite colorée pendant 20 min au rouge Ponceau afin de vérifier l'efficacité du transfert. Elle est ensuite rincée à l'eau ultra pure et séchée.

La membrane à hybrider est incubée 5 min dans du PBS 1X (2,5 g.l^{-1} NaCl, 1,07 g.l^{-1} Na_2HPO_4 , 0,39 g.l^{-1} NaH_2PO_4 , pH 7,2) puis saturée 60 min sous agitation à température ambiante ou une nuit à 4°C dans la solution de blocage (PBS 1X, 10% Régilait). La membrane est lavée 2 fois 5 min dans du PBST (PBS 1X, Tween 20 0,1%) puis incubée pendant 1h30 sous agitation avec l'anticorps adapté.

Pour les protéines portant une étiquette Histidine ou Streptavidine, la membrane est incubée pendant 1 heure avec les anticorps IgG de souris anti-His (Roche) ou anti-Strep (Novagen) couplés à la peroxydase. L'anti-His est utilisé au 1/500^{ème} et l'anti-Strep au 1/2000^{ème} dans du tampon anticorps (PBS 1X, Régilait 2%). La membrane est ensuite rincée 2 fois 5 min dans du PBST et 30 min dans du PBS. Le kit de révélation ECL (Immobilon Western, Millipore) est utilisé. La détection s'effectue en incubant la membrane dans la solution de détection (mélange 1:1 des deux réactifs, 0,125 ml/cm^2 de membrane, pendant 1min). Un film photographique est immédiatement exposé contre la membrane pendant 1 à 2 min puis développé en chambre noire.

Pour une détection des protéines chez *B. cereus* à l'aide des anticorps polyclonaux, la membrane est incubée pendant 1h30 sous agitation avec les anticorps de lapins anti-Fnr ou anti-ResD (CEA, Marcoule) épuisés et dilués au 1/2000^{ème} dans du PBS. La membrane est ensuite lavée 2 fois 5 min dans du PBST puis incubée pendant 1h sous agitation avec les anticorps secondaires de lapins dilués au 1/2000^{ème} (Sigma). La membrane est alors rincée 2

fois 5 min dans du PBST et 30 min dans du PBS et la révélation est réalisée comme indiqué précédemment.

4.1.7 Oxydation par le diamide

Le diamide est un agent d'oxydation des thiols. Sa formule chimique est présentée sur la figure 49.

Un pont disulfure (lien S-S) est un lien covalent fort qui, par oxydation, réunit les fonctions thiol de deux cystéines dans une séquence peptidique.

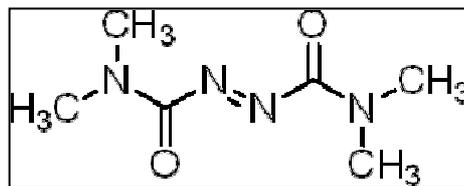


Figure 49 : Formule chimique du diamide.

Le pont disulfure est un élément des structures primaire, tertiaire (après le repliement de la protéine) ou quaternaire (lors d'association de sous-unités protéiques) de la protéine. La formation d'un pont disulfure à partir de deux cystéines s'accomplit spontanément en condition oxydante, en particulier en présence de dioxygène.

En pratique, l'oxydation d'une protéine par le diamide consiste à incuber cette protéine (2 µg) avec 1 et 10 mM de diamide puis à analyser le produit de réaction par gel SDS-PAGE 12% en condition non réductrice.

4.1.8 Phosphorylation d'un régulateur de réponse (RR)

4.1.8.1 Trans-phosphorylation par une histidine kinase (HK)

L'HK purifiée (6 µM) est incubée dans un tampon de phosphorylation (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 ; NaCl 50 mM ; EDTA 1 mM ; glycérol 10% ; DTT 4 mM ; MgCl₂ 4 mM ; [γ -³²P]-ATP 5 µCi (Amersham Biosciences). La réaction d'autophosphorylation de l' HK est réalisée à 37°C pendant 15 min. La phosphorylation du RR (9.6 µM) par l'HK est effectuée à la même température. La réaction est arrêtée par ajout d'un tampon SDS. Les produits

résultants sont analysés par SDS-PAGE 12% et les protéines marquées sont détectées à l'aide d'un PhosphoImager (Storm, Molecular dynamics).

4.1.8.2 Phosphorylation par l'acétyl phosphate

L'autophosphorylation du RR à été réalisé selon le protocole décrit par Miller *et al* (Miller A, A *et al.*, 2001) en présence d'acétyl phosphate de lithium (C₂H₅KLiO₅P, Sigma). 0.1 à 2.5 µg de protéine sont incubés 90 min à 37°C dans du tampon de phosphorylation préparé extemporanément contenant NaH₂PO₄ 20 mM, pH 8 ; MgCl₂ 10 mM ; DTT 1mM et C₂H₅KLiO₅P 32 mM.

4.1.9 Détection de la phosphorylation à l'aide du kit Pro Q Diamond

Le kit "Pro-Q® Diamond Phosphoprotein Gel Stain" (Molecular Probes) permet de détecter une protéine phosphorylée après migration de celle-ci sur un gel SDS-PAGE. Le kit contient un marqueur de taille constitué de deux protéines phosphorylées et de quatre protéines non phosphorylées (PeppermintSitch Phosphoprotein Molecular Weight Standards). Le gel est incubé dans la solution de fixation (méthanol 50%, acide acétique 10%) deux fois 30 min à température ambiante et sous agitation. Après trois lavages de 10 min dans l'eau, le gel est incubé 90 min dans la solution de coloration. Il est ensuite incubé dans la solution de décoloration (acétonitrile 20 %, acétate de sodium pH 4, 50 mM) trois fois 30 min puis lavé dans l'eau deux fois 5 min. La protéine phosphorylée est alors révélée à l'aide d'une table à UV.

4.1.10 Dosage de l'activité β-galactosidase en milieu liquide chez la levure

L'activation de *lacZ* peut être vérifiée par l'addition d'un substrat chromogène, l'ONPG ou Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside, dans le milieu. L'hydrolyse de ce substrat par la β-galactosidase codée par le gène *lacZ* se traduit par une coloration jaune. Comme l'enzyme β-galactosidase n'est pas exportée de la cellule de levure, il est nécessaire de lyser les cellules.

Une colonie de levure est inoculée dans 5 ml de milieu liquide SD sélectif dépourvu de leucine et tryptophane et incubée une nuit à 30°C sous une agitation de 250 t/min. Le lendemain, la pré-culture est vortexée pendant 1 min puis 2 ml sont transférés dans 8 ml de milieu YPD. La culture est incubée à 30°C sous une agitation de 250 t/min jusqu'à ce que la DO₆₀₀ atteigne 0.6. Les cellules contenues dans 2 ml de la culture sont centrifugées à 10000 g

pendant 30 secondes et le culot est mis en suspension dans 1 ml de tampon Z (33 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$; 67mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4, \text{H}_2\text{O}$; 0,1mM MnCl_2). Le mélange est vortexé puis à nouveau centrifugé. Le culot est repris dans 300 μl de Tampon Z + β -mercaptoéthanol (270 μl pour 100 ml de tampon Z) puis transféré dans un tube contenant 0.3 g de billes de zirconium. Le cassage est réalisé au cours de 6 cycles de 30 secondes (fastprep). Après centrifugation, le lysat obtenu est conservé dans la glace.

Le dosage de la β -Gal s'effectue de la façon suivante :

100 μl de lysat sont ajoutés dans une cuve contenant 1 ml de tampon Z + ONPG (4mg/ml dans le tampon Z (à dissoudre 1 h avant à 30°C)). Le tout est incubé à 30°C et la DO est lue entre 12h et 24h.

4.2 Purification des protéines recombinantes

4.2.1 Contrôle de l'expression des protéines recombinantes

Il est nécessaire de sélectionner une construction plasmidique permettant bien l'expression de la protéine considérée dans les cellules BL21 codon plus (DE3)-Ril (Stratagene).

Afin de sélectionner un clone exprimant la protéine d'intérêt, un protocole "rapide" d'expression est réalisé. 100 ml de milieu LB + Amp sont inoculés avec 1 ml de préculture des différents clones de B121 obtenus puis incubés à 37°C sous une agitation de 200 t/min jusqu'à obtention d'une DO_{600} de 1. L'induction est réalisée par ajout de 0.2 mM d'IPTG pour le pET100/101 et 0.4 mM pour le pET52b (+). L'incubation est poursuivie 16h à 20°C. Le lendemain les cellules sont centrifugées à 10 000g, 20 min à 4°C et le culot obtenu est repris dans 2 ml de Tampon (phosphate de sodium 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.0). Les cellules sont lysées par sonication puis centrifugées à nouveau afin de récupérer l'extrait protéique intracellulaire. Une analyse de cet extrait est réalisée par Western Blot.

4.2.2 Préparation des culots bactériens

Une colonie recombinante est inoculée dans du milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ et incubée à 37°C sous agitation (200 t/min) pendant 16 h. Cette pré-culture est utilisée pour inoculer le volume désiré de LB + Amp 100 $\mu\text{g/ml}$ (+ 50 μM fer ammonium sulfate pour Fnr) au 1:100. Pour les purifications de ResD, ResE et Fnr étiquetées en polyhistidine, le volume est de 1 l et pour Fnr étiquetée en Strep ou native, le volume de

culture est de 11.5 l (fermenteur : agitation de 450 t/min avec aération à 180 L/h). L'incubation est réalisée à 37°C sous agitation (200 t/min) jusqu'à ce que la DO_{600} atteigne 1. L'expression des protéines est ensuite induite par ajout de 0,2 mM d'IPTG pour le système pET100/101 et de 0,4 mM d'IPTG pour le système pET52b (+). L'induction est poursuivie pendant 16 h à 20°C pour Fnr et à 37°C pour les autres protéines.

Après culture, les cellules sont centrifugées à 5000 g pendant 10 min à 4°C. Les culots bactériens sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

En anaérobie : Après ajout de l'inducteur, l'aération est arrêtée et un barbotage sous argon-CO₂ (90-10) est poursuivi pendant 16 h. Les cellules sont centrifugées à 3500 t/min pendant 15 mn à 4°C dans des pots sous N₂. Le culot est lavé en tampon Tris-HCl 50 mM pH 8, dans la boîte à gants.

4.2.3 Purification des protéines étiquetées en polyhistidine par chromatographie d'affinité

Ces purifications sont réalisées par Chromatographie d'Affinité avec des ions Métalliques Immobilisés (IMAC). Il s'agit ici du Cobalt qui privilégie la pureté grâce à son affinité extrême pour les "Tags" histidines. La protéine est fixée via son tag sur la résine et éluée par compétition par ajout d'imidazole.

La figure 50 rappelle le principe de cette chromatographie sur colonne d'affinité.

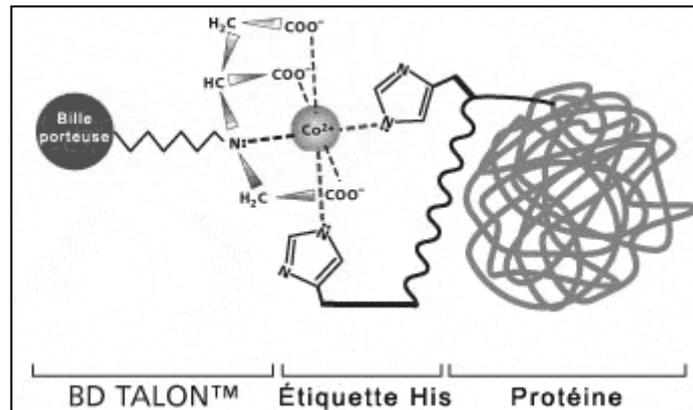


Figure 50 : Principe de l'IMAC

Les cellules sont décongelées puis mises en suspension dans 20 ml de tampon natif d'équilibration/lavage (phosphate de sodium 50 mM, NaCl 300 mM, pH 7.0) pour ResD, Fnr et PlcR. Pour la purification de ResE, en raison de sa localisation membranaire et ce malgré la délétion de sa région d'ancrage à la membrane, les cellules sont mises en suspension dans 20

ml de tampon dénaturant (phosphate de sodium 50 mM, guanidine-HCl 6 M, NaCl 300 mM, pH 7.0). Du lysosyme est ajouté à la concentration de 0,75 mg/ml et la préparation est incubée 30 min à température ambiante sous faible agitation. Les cellules sont ensuite lysées par sonication à raison de 6 cycles de 10 secondes à amplitude maximale. Cette étape est réalisée en maintenant les cellules dans la glace. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 12 000 g durant 20 min à 4°C. Le surnageant résultant constitue l'extrait à purifier.

Dans le cas particulier de PlcR, le surnageant est éliminé et le culot obtenu est lavé 2 fois avec 20 ml de tampon de lavage (phosphate de sodium 50 mM, NaCl 150 mM, triton X-100 1%, pH 7.0) (centrifugation 10 min à 12000 g pour chaque lavage). Chaque 0.1 gramme de culot contenant les corps d'inclusion est dissout dans 1 ml de tampon de dissolution (phosphate de sodium 50 mM, Urée 8 M, pH 7.0). Après 10 min de centrifugation à 12000 g, le surnageant est récupéré. Il constitue le lysat cellulaire à purifier.

Le surnageant est transféré dans un tube falcon de 15 ml puis centrifugé à 12 000 g durant 10 min à 4°C. Le surnageant (lysate protéique) est incubé 1h sous agitation modérée et à température ambiante avec 2 ml de résine chargée au Cobalt (Clontech) pré-équilibrée en tampon d'équilibration/lavage. Après équilibration de la résine, le surnageant est éliminé et la résine est lavée deux fois avec 10 ml de tampon équilibration/lavage. La résine est ensuite transférée sur une colonne fermée et laissée jusqu'à sédimentation et compactage de celle-ci dans la colonne. Après ouverture de la colonne le tampon est drainé par gravité et la colonne est lavée avec 5 ml de tampon d'équilibration/lavage. La protéine étiquetée en polyhistidine est ensuite éluée par ajout de 5 ml de tampon d'éluion (phosphate de sodium 50 mM, NaCl 300 mM, imidazole 150 mM, pH 7.0). Le produit d'éluion est récolté en 5 fractions (5 fois 1 ml) qui seront analysées par SDS-PAGE. Les fractions contenant les plus fortes concentrations de protéines et présentant la plus grande pureté sont immédiatement dessalées (élimination de l'imidazole) et concentrées par ultrafiltration (membrane de 30K, Amicon). La concentration en protéine est déterminée par dosage selon la méthode du BCA.

4.2.4 Purification de la protéine Fnr étiquetées en Streptavidine et native

La purification de la protéine Fnr a été réalisée selon deux protocoles. Dans un premier protocole nous avons entrepris une purification en anaérobie de manière à récupérer la protéine sous sa forme holo, c'est-à-dire avec son centre [Fe-S]. Dans un second protocole, nous avons réalisé la purification de la protéine en présence d'oxygène. Les étapes principales de ces deux protocoles sont proches et la différence réside dans la protection de la protéine

contre l'oxygène. En effet, en condition anaérobie, les cellules sont obtenues sous flux d'argon-CO₂ (90-10), toutes les manipulations ont lieu dans une boîte à gants (O₂<2 ppm) et les tampons sont dégazés 24h avant utilisation. Dans le protocole décrit ci-dessous, les suppléments liés à la condition d'anaérobie sont mentionnés en italique pour chaque étape.

4.2.4.1 Lyse non dénaturante des cellules

Le culot cellulaire est mis en suspension dans 120 ml de tampon A + 5 mM EDTA (25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM DTT). Le lysozyme est ajouté à une concentration finale de 0.5 mg/ml et le mélange est incubé 20 min à température ambiante.

Les cellules maintenues dans la glace, sont lysées par sonication, 3 min à une amplitude 80 avec des cycles de 5 secondes interrompus par 5 secondes d'arrêt.

L'extrait brut est placé dans des tubes d'ultracentrifugation Sorvall 45 Ti ou équivalent puis centrifugé à 43 000 t/min pendant 1 h. Le surnageant est transféré en erlen de 200 ml.

4.2.4.2 Chromatographie échangeuse d'ions DEAE

Les échangeurs d'ions sont des macromolécules insolubles portant des groupements ionisables qui ont la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant d'une solution. Les résines anioniques échangent réversiblement des anions et sont chargées positivement. Le principe de cette chromatographie est schématisé figure 51.

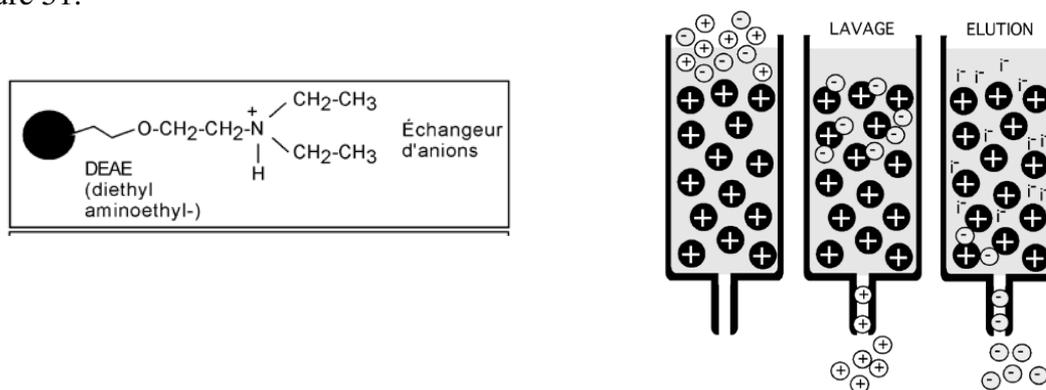


Figure 51: Principe de la chromatographie échangeuse d'ions DEAE

Fnr ne se fixe pas sur ce type de résine. On va donc s'en servir pour éliminer un maximum de contaminants et récupérer Fnr dans les fractions non retenues. Une élution n'est donc pas nécessaire à ce niveau.

D'un point de vue pratique, le surnageant est déposé sur la colonne (DE 52 Wathman, 30-40 ml) qui est ensuite lavée par environ 100 ml de tampon A. Les fractions non retenues et la fraction de lavage sont assemblées. La solution obtenue est traitée avec de la benzonase à 250 U/ μ l (1/10 000, v/v) en présence de $MgCl_2$ 1 mM pendant 20 min à température ambiante et le pH est ajusté à 7 avec du phosphate de potassium 1 M. Cette solution protéique sera ensuite analysée par chromatographie sur hydroxylapatite comme décrit ci-dessous.

4.2.4.3 Chromatographie sur hydroxylapatite HA ultrogel

Il s'agit d'une chromatographie de partage. Le phosphate de calcium cristallisé retient les protéines de deux façons:

- son calcium interagit avec les groupements acides des protéines
- son phosphate interagit avec les groupements amines

L'élution est réalisée dans un gradient de phosphate pour entrer en compétition avec ces interactions. Le principe de cette chromatographie est schématisé sur la figure 52.

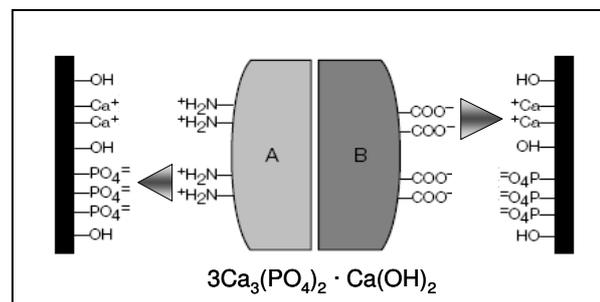


Figure 52 : Principe de la chromatographie sur hydroxylapatite

D'un point de vue pratique, la colonne (HA ultrogel, 30 ml, Pall corporation) est équilibrée en tampon D (50 mM KH_2PO_4 [pH7], 1 mM DTT) puis la fraction non retenue sur DEAE est déposée. La colonne est lavée avec environ 50 ml de tampon D et l'élution est réalisée par gradient de phosphate avec du tampon D et E (200 mM KH_2PO_4 [pH7], 1 mM DTT) en fractions de 2 ml. Les fractions obtenues sont analysées par SDS-PAGE et celles contenant la protéine Fnr sont réunies en une même fraction. Cette dernière est concentrée sur une membrane amicon 30K jusqu'à obtention d'un volume de 2ml. Cette fraction protéique sera ensuite analysée par chromatographie de gel filtration comme décrit ci-dessous.

4.2.4.4 Chromatographie de gel filtration sur Superdex SD200

Cette technique permet la séparation des molécules en fonction de leur taille et de leur forme (Chromatographie d'exclusion). On utilise pour cela des granules de gel poreux. Les grosses molécules (dont le diamètre est supérieur à celui des pores) sont exclues et sont donc éluées les premières, au niveau du volume mort. Les petites et moyennes molécules sont éluées plus tardivement, car pénétrant dans le gel, leur migration est freinée. Les solutés sont donc élués dans l'ordre inverse des masses moléculaires. Il existe une relation linéaire entre le volume d'éluion et le logarithme de la masse moléculaire.

D'un point de vue pratique, la colonne (Superdex SD200, 1,6x50 cm, Amersham Bioscience) est équilibrée par 1,5 volume (180 ml) de tampon F (50 mM KH_2PO_4 [pH7], 150 mM NaCl, 1 mM DTT) pendant une nuit à 0,2 ml/min (12 ml/h) sur appareil FPLC Kontron. La protéine purifiée (500 μ l) est déposée sur la colonne puis éluée à 0,4 ml/min (2 min/fraction). L'absorbance est suivie à 280 nm. Les fractions obtenues sont analysées par SDS-PAGE et celles contenant la protéine Fnr pure sont réunies en une même fraction puis concentrée sur une membrane amicon 30K jusqu'à obtention d'un volume de 2ml. La fraction obtenue est immédiatement conservée dans l'azote liquide.

Le DTT est ajouté dans les tampons extemporanément.

En anaérobic: Tous les tampons sont dégazés au moins 24h à l'avance en boîte à gants sous argon et les colonnes sont équilibrées dans la boîte à gants au moins 24 h à l'avance.

4.3 Analyse biochimique des centres [Fe-S]

4.3.1 Reconstitution biologique de Fnr en présence de CsdA

CsdA appartient à la machinerie d'assemblage des centres [Fe-S] appelée CSD. Cette protéine possède une activité dite cystéine désulfurase et est capable de fournir du soufre à partir d'un acide-aminé, la L-cystéine.

L'intégralité de la reconstitution est réalisée en anaérobic dans une boîte à gants (2 ppm O_2 , 18 °C). Les solutions utilisées sont rentrées la veille sous la forme de poudre et sont préparées au dernier moment dans du tampon F (tampon d'éluion de la protéine).

A 2 mg/ml de protéine Apo-Fnr, sont ajoutés 20 mM de tampon Tris-HCl 25 mM pH 8 puis 4 mM de DTT. Le tout est incubé 30 min à température ambiante. 1mM de Fer ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$) et de L cystéine sont ajoutés et la réaction est déclenchée par ajout de la

protéine CsdA d'*E. coli* (1 μ M). La reconstitution est suivie sur une période de 2 heures grâce à la réalisation d'un spectre entre 250 et 750 nm toutes les 15 min. La protéine est ensuite filtrée sur une colonne Sephadex G25 de 10 ml équilibrée en tampon F puis concentrée sur nanosep 30K. Un spectre de la protéine concentrée est réalisé. 200 μ l de protéine oxydée sont transférés dans un tube RPE et congelés immédiatement dans l'azote liquide.

4.3.2 Réduction de la protéine Fnr

La réduction du centre [Fe-S] de la protéine Fnr reconstituée est effectuée dans une cuve en quartz de 400 μ l par ajout de 10 mM de glycine neutralisée et de 10 μ M de 5-déazariboflavine. La photo-réduction est initiée par irradiation de la solution pendant 1 à 3 min à l'aide d'un projecteur de diapositives disposé à 15 cm de l'échantillon. Après illumination, la 5-déazariboflavine gagne un état excité qui peut arracher un électron à la glycine et le transmettre au centre [Fe-S] (Figure 53). Une fois la réaction terminée, le mélange réactionnel est maintenu dans le noir à l'aide d'une feuille d'aluminium afin de stopper le flux d'électrons. 200 μ l de protéine réduite sont transférés dans un tube RPE et congelés immédiatement dans l'azote liquide avant d'être analysés.

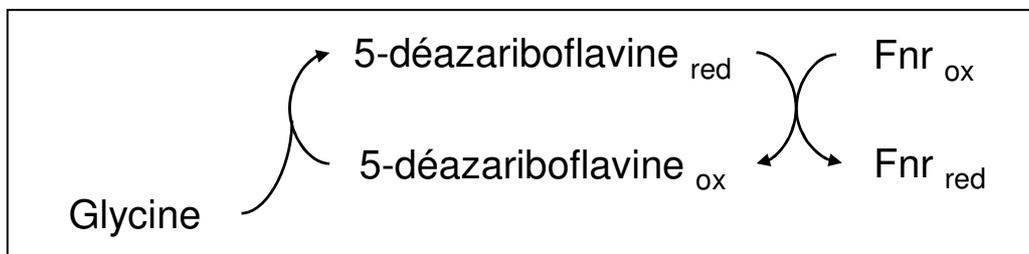


Figure 53 : Réduction de la protéine Fnr par la 5-déazariboflavine.

4.4 Mise en évidence d'interactions protéiques

4.4.1 Pontage covalent ou cross-linking

4.4.1.1 Principe

Les expériences de pontage chimique ont été réalisées à l'aide d'un réactif susceptible de générer des liaisons covalentes entre protéines présentant une affinité ionique. Ce réactif est le 1-éthyl-3(3-diméthyl-aminopropylcarbodiimide) (EDC). L'EDC est un carbodiimide qui forme des liaisons covalentes entre des groupements carboxyliques et les amines primaires portées par les chaînes latérales d'acides aminés. La réaction ne peut avoir lieu que lorsque les groupements fonctionnels amines et carboxyliques sont à proximité immédiate l'un de l'autre, c'est-à-dire lorsqu'ils sont en interaction électrostatique. Une liaison covalente entre deux protéines ne peut donc être observée que lorsque celles-ci sont associées par des interactions de ce type (Poulos & Kraut, 1980). L'EDC active sélectivement les groupes carboxyliques des acides glutamiques et aspartiques et forme un intermédiaire *o*-acyluréa qui peut alors réagir avec la fonction amine primaire d'un résidu lysine ou avec l'extrémité amino-terminale de la protéine (figure 54). Une liaison de type peptidique est formée entre les deux protéines. L'intermédiaire *o*-acyluréa est sujet à l'hydrolyse, ce qui peut limiter le rendement de la réaction de pontage chimique. Le N-hydroxysulfocinimide (sulfo-NHS) est employé en complément de l'EDC pour favoriser le pontage. Ce réactif génère un intermédiaire plus résistant à l'hydrolyse et permet de travailler à pH neutre et de favoriser la cinétique de couplage (Staros *et al.*, 1986).

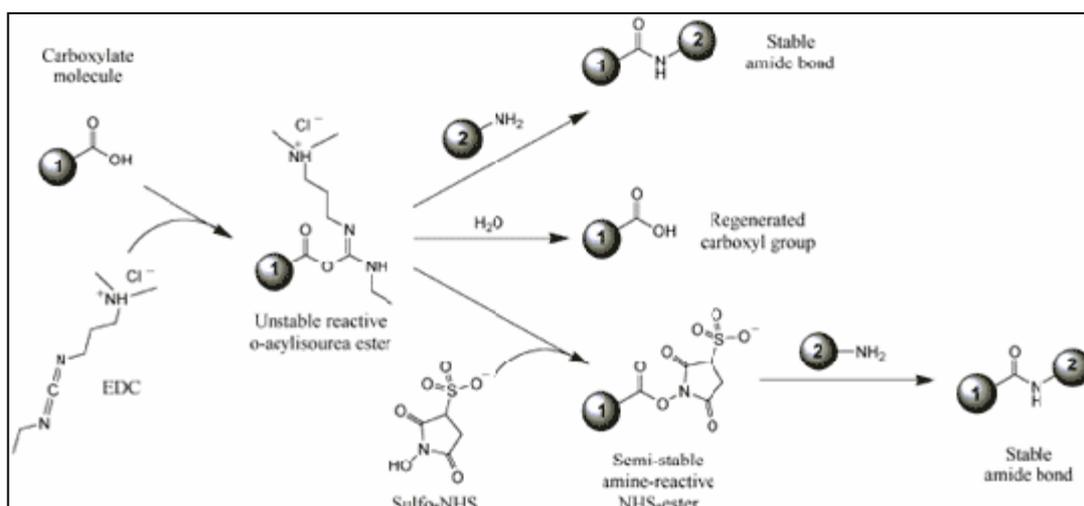


Figure 54 : Principe de la réaction de pontage chimique de deux protéines par l'EDC et le NHS.

3.1.8.2 La réaction de pontage

Les protéines purifiées dont on veut étudier l'interaction (5 μM) sont incubées en tampon MOPS 10 mM, pH 7.5 contenant 12.5 mM d'EDC et 5 mM de sulfo-NHS dans un volume total de 20 μl . La réaction est incubée à température ambiante durant 30 mn puis analysée sur gel SDS-PAGE 12% couplé à une détection via les anticorps anti-His.

4.4.2 Far Western Blot

Le Far Western Blot (ou Far Overlay) vise à détecter des interactions entre deux protéines X et Y. Cette technique dérive d'un Western Blot classique dans lequel on discrimine plusieurs étapes. Dans notre cas, la protéine X purifiée est déposée sur membrane : la protéine X est alors fixée à la membrane qui sera incubée dans une solution contenant la protéine Y préalablement marquée à la biotine. La révélation est réalisée par une méthode immunoenzymatique de type streptavidine-biotine-peroxydase

4.4.2.1 Marquage des protéines à la biotine

Le marquage des protéines à la biotine est réalisé à l'aide du kit "Biotin Labelling Kit-NH₂, Dojindo Laboratories".

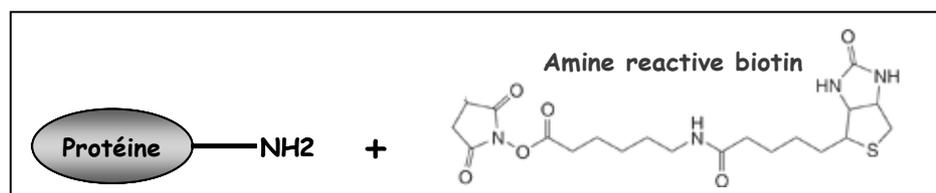


Figure 55 : Principe du marquage d'une protéine à la biotine.

4.4.2.2 Dot Far Western Blot

Les protéines purifiées sont transférées sur deux membranes de nitrocellulose (Amersham Bioscience) par la technique du "Dot Blot". L'une des membranes est colorée avec une solution de rouge ponceau (Sigma) afin de contrôler les quantités de protéines déposées et l'autre membrane est soumise au Far-Western Blot à l'aide du kit "Profound Far-Western Biotinylated-Protein : Protein Interaction, Pierce". Brièvement, la membrane est saturée pendant 1 heure à température ambiante dans un tampon de dilution puis rincée dans un tampon phosphate contenant 0.05% de Tween 20 (PBS-T). Cette dernière est ensuite incubée 1 heure dans la solution contenant la protéine marquée à la biotine à la concentration de 1

$\mu\text{g/ml}$. Après lavage dans le PBS-T, la membrane est incubée avec une solution de Streptavidine-Horseradish Peroxidase à la concentration de 0.1 mg/ml. La protéine marquée est alors visualisée par chimioluminescence. Une interaction entre la protéine fixée sur la membrane et la protéine marquée à la biotine peut ainsi être détectée.

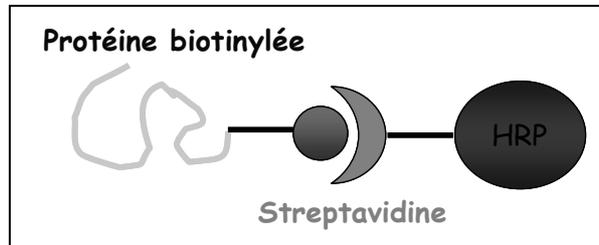


Figure 56 : Schéma représentatif de la reconnaissance biotine-streptavidine.

Résultats

Chapitre 1 : Implication du régulateur Fnr dans la toxinogénèse

1 Introduction à l'étude

La majorité des infections associées à *B. cereus* sont d'origine alimentaire et celles-ci sont classées en deux syndromes. Le syndrome diarrhéique (le plus commun) résulte de la production d'un ensemble de toxines protéiques (Hbl et Nhe) dans l'intestin grêle de l'hôte. La caractérisation d'un mutant Δfnr a montré que la protéine Fnr était essentielle pour la production de ces entérotoxines aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose (Zigha *et al.*, 2007). En effet quelle que soit la condition étudiée, la mutation du gène codant pour le régulateur Fnr conduit à la répression de l'expression des entérotoxines.

La protéine Fnr de *B. cereus* contient un domaine Crp (cAMP Receptor Protein) en N-terminal et un domaine de fixation à l'ADN de type hélice-tour-hélice. Ce dernier est suivi d'un domaine senseur constitué de 4 cystéines susceptibles de fixer un centre [Fe-S] en C-terminal. D'un point de vue structural, les protéines Fnr de *B. subtilis* et *B. cereus* présentent 80% d'homologie, suggérant un mécanisme de fonctionnement comparable avec un centre [Fe-S] qui pourrait moduler l'activité de Fnr chez *B. cereus*. Pourtant, chez ce dernier, les résultats obtenus au laboratoire ont montré que contrairement à son orthologue, la protéine Fnr de *B. cereus* pourrait être active en présence d'oxygène. Les données bibliographiques rapportent que la protéine Fnr de *B. subtilis* forme un dimère stable indépendamment de la tension en oxygène et de la présence du centre [Fe-S]. Chez cet organisme, la présence du centre métallique intact est indispensable pour que la protéine puisse lier l'ADN de façon spécifique et ainsi induire la transcription des gènes cibles (Reents *et al.*, 2006a).

Une étude bioinformatique des séquences promotrices des opérons *hbl*, *nhe*, *resDE* et des gènes *fnr* et *plcR* a été réalisée afin de rechercher des séquences potentielles de fixation pour Fnr. En combinant les données connues sur le motif de fixation de la protéine Crp d'*E. coli* (Busby & Ebright, 1999) et le logiciel "Virtual footprint ProDoric" (Munch *et al.*, 2005) nous avons mis en évidence la présence de boîtes Crp/Fnr en amont de ces séquences régulatrices. Ces boîtes pourraient être des sites de fixation pour la protéine Fnr de *B. cereus*.

Compte tenu de ces données, nous avons orienté notre travail selon deux hypothèses:

- **Le régulateur Fnr à t-il une action directe sur la régulation de la toxinogénèse comme le laisse supposer la présence de boîtes Crp/Fnr?**
- **Si oui, quel est son mécanisme d'action? Sous quelle forme la protéine est-elle active et quelle est l'importance du centre [Fe-S] ?**

Pour répondre à ces questions, nous avons surexprimé la protéine Fnr dans une souche d'*E. coli* dans la mesure où elle est capable de synthétiser un centre [4Fe-4S]. Ceci a par ailleurs été confirmé dans le cas de la protéine Fnr de *B. subtilis* (Reents *et al.*, 2006a). La purification de la protéine recombinante sous sa forme Apo et Holo a été réalisée de manière à tester son activité.

2 Stratégie envisagée

2.1 Surexpression de la protéine Fnr

L'expression de la protéine Fnr a été optimisée par l'utilisation des cellules d'*E. coli* BI21 codonplus (DE3)-RIL (Stratagene) limitant l'accumulation des codons rares qui ralentissent le ribosome.

2.2 Purification de la protéine Fnr

La purification de formes taggées a été réalisée. Nous avons choisi de produire la protéine sous cette forme car cela permet d'effectuer une purification rapide de la protéine par chromatographie d'affinité et d'en obtenir une quantité suffisante pour produire des anticorps. Ces derniers sont indispensables pour la détection de protéines *in vivo* ainsi que pour le suivi de la purification de la forme native. Notre choix s'est orienté vers deux Tags différents (histidine et streptavidine) placés en C ou N-terminal de la protéine. Cette démarche permet d'anticiper un effet négatif éventuel du Tag dû à sa nature ou son positionnement au niveau de la séquence protéique.

Le "Strep-tag" est un peptide artificiel qui se lie dans le site de liaison de la streptavidine pour la biotine. La purification, basée sur l'affinité streptavidine-biotine, est réalisée sur une résine couplée à la strep-tactin. Le "His-tag" correspond à l'ajout de plusieurs résidus Histidine permettant de purifier la protéine sur une colonne chargée au cobalt (affinité cobalt-histidine). La résine utilisée pour la purification de protéines Strep-taggées présente

l'avantage d'être compatible avec une large gamme de détergents, chélateurs et réducteurs (en particulier le DTT). C'est un point important pour la purification de la protéine Fnr.

Au cas où ces Tags perturberaient la structure et l'activité de la protéine, nous avons envisagé la production d'une protéine Fnr sous sa forme native (dépourvue de Tag).

Dans un premier temps, le gène codant pour la protéine Fnr a été cloné dans les systèmes pET101 (Invitrogen) et pET52b (+) (Novagen). Les constructions ont été réalisées de manière à obtenir trois protéines Fnr recombinantes différentes : Une protéine His-tagguée en C-terminal (Fnr_{His}), une protéine Step-tagguée en N-terminal (Fnr_{Step}) et une protéine Fnr non tagguée. La purification de la protéine Fnr_{His} a été réalisée de manière classique par chromatographie d'affinité sur résine chargée au cobalt (Clontech). La purification de la protéine Fnr_{Step} a été réalisée selon deux protocoles. Dans un premier protocole, nous avons entrepris une purification en anaérobie de manière à récupérer la protéine sous sa forme holo, c'est-à-dire avec son centre [Fe-S]. Dans un second protocole, nous avons réalisé la purification de la protéine en présence d'oxygène. Les étapes principales de ces deux protocoles sont proches et la différence réside dans la protection de la protéine de l'oxygène. En effet en condition anaérobie, les cellules sont obtenues sous flux d'argon-CO₂.

Dans un second temps, afin de mieux caractériser la protéine Fnr et son cluster [Fe-S], une purification de la protéine sous sa forme native (dépourvue de tag) a été entreprise. Pour cela, le gène codant pour la protéine Fnr a été cloné dans le pET101 de manière à ne pas exprimer de Tag. Dans cette stratégie, le codon Stop présent sur la séquence de la protéine Fnr est conservé afin de ne pas exprimer la queue His qui est en C-terminal dans ce vecteur. La protéine Fnr a été purifiée selon le protocole établi pour la protéine Fnr_{Step}.

2.3 Caractérisation biochimique et fonctionnelle

L'analyse structurale des protéines Fnr a commencé par une vérification de la présence du centre [Fe-S] par spectrophotométrie. En effet, les protéines contenant un centre [Fe-S] présentent un maximum d'absorbance caractéristique à 420 nm (Khoroshilova *et al.*, 1995). Pour approfondir cette analyse structurale, nous avons entrepris la caractérisation de la structure quaternaire de ces protéines. Ceci a été réalisé par gel filtration couplée à la diffusion dynamique de lumière (DLS). Il s'agit ici d'examiner l'état oligomérique des protéines.

Afin de déterminer si Fnr est capable de se fixer directement aux boîtes potentielles identifiées dans les régions promotrices des opérons étudiés, des expériences de retard sur gel

ont été effectuées. Les régions promotrices des opérons *resDE*, *fnr*, *nhe* et de *plcR* ont été amplifiées à cet effet. La région promotrice de l'opéron *hbl* a été divisée en deux fragments, *hbl1* (636 pb) situé entre -582 et +54 pb du site d'initiation de la transcription et *hbl2* (620 pb).

3 Résultats et discussion

3.1 Caractérisation moléculaire et fonctionnelle des protéines recombinantes Fnr_{His} et Fnr_{Strep} : Article 1

Fnr a été exprimée et purifiée sous la forme de deux protéines recombinantes, l'une possédant une étiquette histidine en C-terminal (Fnr_{His}) et l'autre une étiquette Streptavidine en N-terminal (Fnr_{Strep}). Des expériences de retard sur gel ont été effectuées pour tester la capacité de ces deux protéines recombinantes à se fixer sur les régions promotrices des gènes de structure (*hbl*, *nhe*) et de régulation des entérotoxines (*fnr*, *resDE* et *plcR*).

Les résultats ont montré que les deux protéines recombinantes étaient produites sous forme d'apoprotéines en aérobiose. Fnr_{His} est majoritairement monomérique en solution alors que Fnr_{Strep} est majoritairement dimérique. Fnr_{His} est capable de se fixer aux régions promotrices étudiées sous sa forme oxydée. Fnr_{Strep} n'est capable de se fixer sur l'ADN que sous sa forme réduite (après addition de DTT). Sous sa forme réduite, Fnr_{Strep} est majoritairement monomérique. En conclusion, apoFnr n'est capable de se fixer sur l'ADN que sous sa forme monomérique et son état d'oligomérisation dépend du POR.

La régulation en aérobiose de l'expression des entérotoxines est réalisée par l'apoFnr et son interaction avec l'ADN dépend de son état d'oligomérisation.

ApoFnr Binds as a Monomer to Promoters Regulating the Expression of Enterotoxin Genes of *Bacillus cereus*[†]

Julia Esbelin,¹ Yves Jouanneau,² Jean Armengaud,³ and Catherine Duport^{1*}

Université d'Avignon, UMR A408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, and INRA, Avignon, F-84914, France¹; Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR 5249, CEA, DSV, iRTSV, CEA-Grenoble Cedex 09, F-38054, France²; and Laboratoire de Biochimie des Systèmes Perturbés, CEA-Marcoule, SBTN, BP17171, Bagnols-sur-Cèze Cedex, F-30207, France³

Received 7 March 2008/Accepted 11 April 2008

Bacillus cereus Fnr is a member of the Crp/Fnr (cyclic AMP-binding protein/fumarate nitrate reduction regulatory protein) family of helix-turn-helix transcriptional regulators. It is essential for the expression of *hbl* and *nhe* enterotoxin genes independently of the oxygen tension in the environment. We studied aerobic Fnr binding to target sites in promoters regulating the expression of enterotoxin genes. *B. cereus* Fnr was overexpressed and purified as either a C-terminal His-tagged (Fnr_{His}) fusion protein or an N-terminal fusion protein tagged with the Strep-tag (IBA BioTAGnology) (Strep_{Fnr}). Both recombinant Fnr proteins were produced as apoforms (clusterless) and occurred as mixtures of monomers and oligomers in solution. However, apoFnr_{His} was mainly monomeric, while apoStrep_{Fnr} was mainly oligomeric, suggesting that the His-tagged C-terminal extremity may interfere with oligomerization. The oligomeric state of apoStrep_{Fnr} was dithiothreitol sensitive, underlining the importance of a disulfide bridge for apoFnr oligomerization. Electrophoretic mobility shift assays showed that monomeric apoFnr, but not oligomeric apoFnr, bound to specific sequences located in the promoter regions of the enterotoxin regulators *fnr*, *resDE*, and *plcR* and the structural genes *hbl* and *nhe*. The question of whether apoFnr binding is regulated in vivo by redox-dependent oligomerization is discussed.

The facultative anaerobic, spore-forming *Bacillus cereus* has gained notoriety as an opportunistic human pathogen that can cause a wide range of diseases from periodontitis and endophthalmitis to meningitis in immunocompromised patients. However, most of the reported illnesses involving *B. cereus* are food-borne intoxications, classified as emetic and diarrheal syndromes (17, 30). Diarrheal syndrome may result from the production in the human host's small intestine of various extracellular factors including hemolysin BL (Hbl), nonhemolytic enterotoxin (Nhe), and cytotoxin CytK (17, 26). The genes encoding these potential virulence factors belong to the PlcR regulon (1, 7, 20, 31).

B. cereus will grow efficiently by anaerobic glucose fermentation in amino acid-rich media supplemented with glucose as the major source of carbon and energy (3, 21, 29, 33, 34). The ability of *B. cereus* to grow well under these conditions is controlled by both the two-component system ResDE (4) and the redox regulator Fnr (33, 34). Unlike ResDE, *B. cereus* Fnr has been shown to be essential for fermentative growth and for enterotoxin synthesis under both anaerobiosis and aerobiosis (33, 34). Fnr protein is a member of the large Crp/Fnr (cyclic AMP-binding protein/fumarate nitrate reduction regulatory protein) superfamily of transcription factors that coordinate physiological changes in response to a variety of metabolic and environmental stimuli (16). Members of the family are pre-

dicted to be structurally related to the catabolite gene activator protein of *Escherichia coli*, Crp (also known as the cyclic AMP receptor protein) (10). Like all the members of the Crp/Fnr family, *B. cereus* Fnr contains an N-terminal region made up of antiparallel β -strands able to accommodate a nucleotide, and a C-terminal helix-turn-helix structural motif. In addition, it contains a C-terminal extension with four cysteine residues considered, in *Bacillus subtilis*, to coordinate a [4Fe-4S]⁺² center that serves as a redox sensor (27). The *B. subtilis* Fnr forms a stable dimer that is independent of both the oxygen tension in the environment and FeS cluster formation. However, the presence of an intact [4Fe-4S]⁺² cluster is required for it to bind to a specific DNA-binding site and for subsequent transcriptional activation (27).

Structurally, the predicted Fnr of *B. cereus* resembles the *B. subtilis* Fnr (27). Therefore, the FeS cluster could also be a key component required for the DNA-binding activity of *B. cereus* Fnr under anaerobiosis. However, our previous results suggested that unlike *B. subtilis* Fnr, *B. cereus* Fnr may also exist in an active state under aerobiosis and thus conserve some site-specific DNA-binding properties. To address this specificity further and elucidate the mechanism by which Fnr regulates enterotoxin gene expression in aerobically growing *B. cereus* cells, we characterized the DNA-binding activities of purified aerobic Fnr. To this end, we overproduced full-length Fnr in *Escherichia coli* with two different tags. We showed that both recombinant Fnr proteins were produced in apo forms (devoid of FeS cluster) under oxic conditions. Recombinant Fnr containing a C-terminal polyhistidine-tagged sequence was shown to be mainly monomeric in solution, while N-terminally Strep-tagged Fnr occurred mainly as oligomers. Only the monomeric forms of both recombinant apoFnr proteins were found to bind

* Corresponding author. Mailing address: UMR A408, INRA, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France. Phone: 33 4 32 72 25 07. Fax: 33 4 32 72 24 92. E-mail: catherine.duport@univ-avignon.fr.

[†] Supplemental material for this article may be found at <http://j.b.asm.org/>.

[‡] Published ahead of print on 18 April 2008.

to the promoter regions of *fnr* itself, the pleiotropic regulator genes *resDE* and *plcR*, and the structural enterotoxin genes *hbl* and *nhe*. Finally, our results pointed to some new unusual properties of Fnr that may have physiological relevance in the redox regulation of enterotoxin expression, enterotoxin expression being both directly and indirectly (via ResD and PlcR) regulated by apoFnr under aerobiosis.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Escherichia coli* strain TOP 10 (Invitrogen) [F^- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ *M15* Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^r) *endA1* *nupG*] was used as the general cloning host, and strain BL21 CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) [F^- *ompT* *hdsS*(*r_B*⁻ *m_B*⁻) *dcn*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA* Hte [*argU* *ileY* *leuW* Cam^r] was used to overexpress *fnr*. Both *E. coli* strains were routinely grown in Luria broth with vigorous agitation at 37°C. The wild-type *B. cereus* F4430/73 (32) and *fnr* mutant (34) were grown as previously described.

General molecular methods. Restriction endonuclease and T4 DNA ligase were obtained from Promega and used in accordance with the manufacturer's instructions. Genomic DNA of *B. cereus* was purified by the method of Guinebriere and Nguyen-The (11). Plasmid DNA was purified using anion-exchange columns (Promega). PCR amplification of DNA was carried out with *Taq* polymerase using the manufacturer's specifications (Roche Molecular Biochemicals) for reaction conditions. The 5' end of the *resDE* mRNA was mapped from a 5' rapid amplification of cDNA ends (5' RACE) PCR product obtained with the 3'/5' RACE kit (Roche Molecular Biochemicals). For this purpose, we used total RNA extracted from *B. cereus* F4430/73 cells harvested at μ_{max} , i.e., the maximal expression of the *resDE* operon. Briefly, the first-strand cDNA was synthesized from total RNA with *fnr*-specific primer SP1 (5'-GCCTGGTAAAGATGGCA TTG-3'), avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, and the deoxynucleotide mixture of the 3'/5' RACE kit as recommended by the manufacturer. After purification and dA tailing of the cDNA, a PCR with the dT anchor oligonucleotide primer and the specific *fnr* SP2 primer (5'-GATGATGAGGATCGTATT VGTGCG-3'), followed by a nested PCR with SP3 primer (5'-GAGAGTGGC AGCGGGTAGAG-3'), yielded a PCR product of 190 bp, as revealed by 2% agarose gel electrophoresis. This PCR product was purified and sequenced.

Cloning and overexpression of recombinant Fnr. The coding sequence for *B. cereus fnr* was PCR amplified from *B. cereus* F4430/73 genomic DNA using either primers PET101F (5'-CACCGTGGCAAACAGTATGACATTATCT-3') and PET101R (5'-ATCAATGCTACAAA CAGAAGC-3') or primers PET52F (5'-CCCGGGATGACATTATCTCAAGATTTAAAGAA-3'; SmaI restriction site in bold type) and PET52R (5'-GAGCTCCTAATCAATGCTACAAACAG AAGCA-3'; SacI restriction site in bold type). The amplicons were cloned as a blunt-end PCR product into pET101/D-TOP0 (Invitrogen) and as a SmaI-SacI fragment into the corresponding sites of pET-52b(+) (Novagen), yielding pET101*fnr* and pET52*fnr*, respectively. *B. cereus* Fnr was produced as a C-terminal fusion with a His tag (Fnr_{His}) using pET101*fnr* and as an N-terminal fusion with a Strep-tag (IBA BioTAGnology) (Strep-Fnr) using pET52*fnr* in *E. coli* BL21 CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene). Recombinant cells were grown at 37°C in Luria broth with 100 μ g ml⁻¹ ampicillin. When the optical density at 600 nm reached ~1.0, protein production was triggered by adding isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) with a final concentration of 0.2 mM (pET101*fnr*) or 0.4 mM (pET52*fnr*). Cells were grown for 16 h at 20°C.

Purification of Fnr_{His}. Cells from a 4.8-liter culture were harvested by centrifugation (10,000 \times g, 15 min), resuspended in buffer A (50 mM sodium phosphate buffer [pH 7.0], 300 mM NaCl), and incubated with 0.5 mg/ml lysozyme for 30 min under gentle agitation. Cells were lysed by sonication for 3 min at 80% of maximum amplitude using a Vibra cell ultrasonifier (Fisher Bioblock Scientific). Cell debris was removed by centrifugation at 20,000 \times g for 20 min. The supernatant was run through a 5-ml Co²⁺ immobilized metal ion affinity chromatographic column (Clontech) equilibrated with buffer A. The column was washed with 50 ml of buffer A and then with 25 ml of buffer A containing 10 mM imidazole, and the protein was eluted with 5 ml of buffer A containing 150 mM imidazole. The eluted fraction was desalted on a Sephadex G25 column (Amersham Pharmacia Biotech) and concentrated using Nanosep 30-kDa molecular-mass-cutoff devices (Omega disc membrane; Pall Filtron). Concentrated samples were run through a 104-ml Superdex SD200 column (Amersham Biosciences) equilibrated with buffer B (100 mM Tris-HCl [pH 8], 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol [DTT]). Protein was stored as pellets in liquid nitrogen.

Purification of Strep-Fnr. Cells from a 6-liter culture were harvested by centrifugation at 10,000 \times g for 15 min, resuspended in 120 ml of buffer C (25 mM Tris-HCl [pH 8], 1 mM DTT), and incubated with 0.2 mg \cdot ml⁻¹ of lysozyme and 0.5 mM EDTA for 10 min at 30°C. Cells were lysed by sonication as described above for the purification of Fnr_{His}. Cell debris was removed by centrifugation at 43,000 \times g for 1 h, and the resulting supernatant was run through a 30-ml DEAE-cellulose column (DE52; Whatman) equilibrated with buffer C. The column was then washed with the same buffer. Nonretained fractions were adjusted to pH 7 with 1 M KH₂PO₄ and run through a 30-ml hydroxyapatite agarose column (HA Ultrogel; Pall Corporation) equilibrated with buffer D (50 mM KH₂PO₄ [pH 7], 1 mM DTT). The column was developed with a linear gradient from 50 to 200 mM KH₂PO₄ at a flow rate of 2 ml/min. Fractions containing recombinant Fnr were pooled and concentrated to 48 mg \cdot ml⁻¹ by ultrafiltration through an Omega disc membrane (30-kDa cutoff, diameter, 43 mm; Pall Filtron). A polishing step was then carried out with gel filtration on a 104-ml Superdex SD200 column (Amersham Biosciences) equilibrated with buffer D containing 150 mM NaCl. The purified protein was stored as pellets in liquid nitrogen.

Protein biochemical analyses. Protein concentrations were determined by either a bicinchoninic acid assay according to the manufacturer's instructions (Interchim) or a biuret method insensitive to thiols (22). Bovine serum albumin was used as a standard. Overproduction of Fnr in induced cultures and its purification were monitored by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The Laemmli method was used for SDS-PAGE (18). Proteins were stained with Coomassie brilliant blue. The reducing agent β -mercaptoethanol was omitted to analyze the disulfide form of apoFnr. The molecular mass of apoFnr was accurately measured with an Esquire 3000plus ion trap mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray on-line ion source (Bruker Daltonics) essentially as described previously (6). Before mass measurement, purified apoFnr was desalted with a ZipTip-C18 (Millipore) and diluted in 50% acetonitrile-1% formic acid (vol/vol).

DLS. The quaternary structure of purified apoFnr in solution was measured by dynamic light scattering (DLS). Samples were centrifuged and run through a 24-ml Superdex 200 column (HR10/30) equilibrated and run at a flow rate of 0.5 ml/min with 50 mM Tris-HCl (pH 8.3) containing 120 mM NaCl and 0.05% Na₂S₂O₃ filtered at 0.1 μ m. The column was operated with an Agilent 1100 series reverse-phase high-performance liquid chromatography system equipped with a G1322A degasser, G1311A quaternary pump, and G1313A autosampler. The elution profile was monitored with a G1315B diode array detector (Agilent), a miniDawn Tristar multiangle laser static light scattering detector (three angles, 45°, 90°, and 135°) coupled to a DynaPro Titan light scattering instrument (Wyatt Technology) placed at 90° and an Optilab rEX differential refractometer (Wyatt Technology). The 90° multiangle light scattering detector was calibrated with pure toluene, and bovine serum albumin was then used to normalize the other detector (45° and 135°) in the corresponding buffer.

Chemical cross-linking of Fnr_{His}. Fnr_{His} in 10 mM 3-(*N*-morpholino)propane-sulfonic acid (MOPS) buffer (pH 7.75) was treated with protein cross-linking agents, *N*-hydroxysulfosuccinimide (5 mM) and 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) (12.5 mM). The reaction mixture contained protein at a concentration of 5 μ M in a total reaction mixture volume of 20 μ l. The reaction was allowed to proceed for 30 min at room temperature and stopped by adding 25 mM β -mercaptoethanol. The products were analyzed by 12% nondenaturing SDS-PAGE and detected by Western blotting using an anti-His antibody.

ApoFnr antiserum preparation. Polyclonal antibodies against apoFnr were generated in-house. Rabbits were immunized with a total of 2 mg of purified Fnr_{His}, administered in four equal doses over a 90-day period, and bled on day 120. Antisera specificities were checked by Western blotting.

Western blot analysis. *B. cereus* protein extracts were prepared as follows: cells were harvested by centrifugation, resuspended in buffer containing 8 M urea, 4% (wt/vol) CHAPS ([3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]propanesulfonate]), and mechanically disrupted using a FastPrep instrument (FP120; Bio101, Thermo Electron Corporation). Cell debris was removed by centrifugation (3,500 \times g, 10 min, 4°C). Proteins were then filtered and resolved by SDS-PAGE under nonreducing conditions (18). Resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham Bioscience) in a Bio-Rad liquid/liquid transfer unit. As appropriate, apoFnr was detected with either anti-His antibodies (Fnr_{His}) or anti-Strep antibodies (Strep-Fnr) or with a 1:2,000 dilution of polyclonal rabbit serum. The blotted membranes were developed with a 1:2,000 dilution of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Sigma) and an enhanced chemiluminescence substrate (Immobilon Western; Millipore).

EMSA. The 5' untranslated regions (5' UTRs) of *fnr*, *resDE*, *plcR*, *hbl*, and *nhe* were PCR amplified with the following primer pairs: FnrF (5'-CGAACCTC

AGCAGGCATA-3') and FnrR (5'-AATGTCATACGTGTTGGCCAC-3'), ResDF (5'-TGGGATCCAAAAGAGGTTG-3') and ResDR (5'-CGATCCCTCATC ATCTACAAT-3'), PlcRF (5'-TATGTTTGTGCAAGGCGAAC-3') and PlcRR (5'-CCTAATTTTTCTGCGTGCAT-3'), Hbl1F (5'-GGTAAGCAAGTGGGT GAAGC-3') and Hbl1R (5'-AATCGCAAATG CAGAGCACAA-3'), Hbl2F (5'-TTAACTTAATTCATATAACTT-3') and Hbl2R (5'-TACGCATTAAAAA TTTAAT-3'), and NheF (5'-TGTTATTACGACAGTCCAT-3') and NheR (5'-CTGTAACCAATAACCCGTG-3'). The forward primers were 5' end labeled with T4 polynucleotide kinase (Promega) and [γ - 32 P]ATP (Amersham Biosciences). The 5'- 32 P-labeled amplicons were purified using High Pure PCR product purification columns (Roche). Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed by incubating labeled DNA fragments (1,000 cpm per reaction mixture) with the specified amount of purified Fnr in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer containing 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 4 mM DTT, 4 mM MgCl₂, 0.5 μ g of bovine serum albumin, and 1 μ g of poly(dI-dC)/ml in a final volume of 10 μ l. Binding reaction mixtures were incubated for 30 min at 37°C and then loaded onto a 4% or 6% nondenaturing polyacrylamide gel run with Tris-borate-EDTA buffer at 4°C and 200 V. Labeled products were quantified using a Molecular Dynamics PhosphorImager.

RESULTS

Overexpression and purification of two recombinant Fnr proteins. From the sequence alignment of 13 *B. cereus* Fnr homologues (see Fig. S1 in the supplemental material), two possible alternative translation initiation starts could be identified for *B. cereus* F4430/73: GTG as previously defined (34) or ATG 12 nucleotides further on. Taking into account this information, two procedures were developed for the aerobic production of *B. cereus* F4430/73 Fnr in *E. coli* cells: (i) expression of a His-tagged fusion protein from pET101/D-TOPO to release a Fnr variant (Fnr_{His}) that begins with the valine encoded by the predicted start codon of *B. cereus* (34) and contains 30 additional amino acids at the C-terminal end, and (ii) expression of a protein from pET-52b(+) fused to *Strep*-tag (IBA BioTAGnology) to release a Fnr variant (Fnr_{Strep}) that contains 22 additional amino acids at the N-terminal end. In the latter variant, the first amino acid of the native Fnr is the methionine located four amino acids after the valine encoded by the predicted start codon (see Fig. S1 in the supplemental material). The Fnr_{His} protein was purified using cobalt affinity chromatography. Because preliminary tests indicated that Fnr_{Strep} bound very weakly to *Strep*-Tactin Sepharose (IBA BioTAGnology), the tagged protein was purified by means of three successive chromatography runs not based on the tag affinity. On SDS-polyacrylamide gels, purified Fnr_{His} (29 kDa) and Fnr_{Strep} (28 kDa) exhibited the expected molecular masses (see Fig. S2 in the supplemental material). The exact average molecular mass of Fnr_{Strep} determined by mass spectrometry was 27,913 \pm 2 Da. This value corresponds almost perfectly (75-ppm deviation) to the expected polypeptide sequence, except that the initial formyl-methionine is cleaved (theoretical value of 27,911 Da). This maturation probably also occurs with the Fnr_{His} protein.

UV-visible absorption spectrum of both aerobic recombinant forms of Fnr showed a single peak at 280 nm (data not shown), suggesting that there is no absorbing prosthetic group (14). This indicates that both recombinant Fnr forms were purified as apoproteins under aerobiosis.

Oligomeric state of both recombinant apoFnr proteins. DLS was used to examine the oligomeric state of the two recombinant forms of apoFnr. DLS reveals the homogeneity and oligomeric state of proteins when resolved by gel filtration based on

the scattering of visible light by particles (5). The oligomerization states of Fnr_{His} and Fnr_{Strep} were analyzed using a DynaPro Titan DLS instrument and attendant software ASTRA. Figure 1 shows the elution profiles obtained for both proteins and the molecular mass estimates derived from the light scattering signal. Besides a peak of aggregates at 16 min, Fnr_{His} was resolved into four elution peaks at 22.0 (A1), 26.6 (A2), 28.8 (A3), and 30.7 (A4) min elution time as detected on the UV trace (Fig. 1A). The molar mass across peak A1 could not be determined because of a polydisperse distribution (the molecular mass varied from 170 to 400 kDa). This strongly suggests that this peak contained aggregates that interacted with the column, but their proportion was low, as the DLS signal was very weak. In contrast, the distribution of molar masses across peaks A2, A3, and A4 was constant, indicating a monodisperse distribution (i.e., a homogeneous molecule) for each peak with molecular masses of 98 (A2), 60 (A3), and 30 (A4) kDa (\pm 3%). This indicates that Fnr_{His} occurs mainly as a mixture of trimers, dimers, and monomers in solution. Considering the relative mass ratio that can be estimated from the UV trace, the predominant form was the monomer (70%). The light scattering trace obtained with Fnr_{Strep} showed the presence of aggregates (peak B1) and three peaks with molecular masses of 157 (B2), 106 (B3), and 54 (B4) kDa (\pm 3%) (Fig. 1B). These peaks unambiguously correspond to the hexameric, tetrameric, and dimeric forms of Fnr_{Strep}, respectively. In this case, the dimeric form (33%) formed the largest population. The same DLS experiment was repeated in reducing conditions with 10 mM DTT in the elution buffer. Complete disappearance of the hexameric form and almost complete disappearance of the tetrameric form (C1) were observed (Fig. 1C). The dimeric form (C2) was thus predominant (89%). Hence, the addition of reductant affected the oligomerization state of Fnr_{Strep} in solution. Intermolecular disulfide bridges are involved in the formation of the highest oligomeric forms. In addition, the absence of monomers in reducing conditions suggests that the dimers observed were either noncovalently linked structures or DTT-resistant, covalently linked structures.

When purified Fnr_{Strep} underwent SDS-PAGE under non-reducing conditions (no DTT or β -mercaptoethanol), a multiple-band pattern was observed, revealing the presence of a mixed population of monomeric, dimeric, and higher oligomeric forms in relative ratios compatible with those found in a DLS experiment (Fig. 2A). Under reducing conditions (with DTT), the two major species were the monomeric and dimeric forms. Increasing the concentration of DTT from 10 mM to 200 mM caused the total reduction of dimeric species to monomeric forms. These data indicate that most of the protein was reticulated through disulfide bridges, but a significant amount of dimeric Fnr_{Strep} could either not be completely reduced by DTT or remained particularly stable in the electrophoresis conditions used. In contrast, only a very small fraction of Fnr_{His} was found to remain dimeric after 10 mM DTT treatment (Fig. 2B). This suggests that the oligomeric Fnr_{His} population detected by DLS contained mainly noncovalently linked structures. To investigate the ability of monomeric Fnr_{His} to form covalently linked structures, a fraction of the purified protein was treated with either the chemical cross-linker EDC or with the divalent thiol-reactive agent diamide.

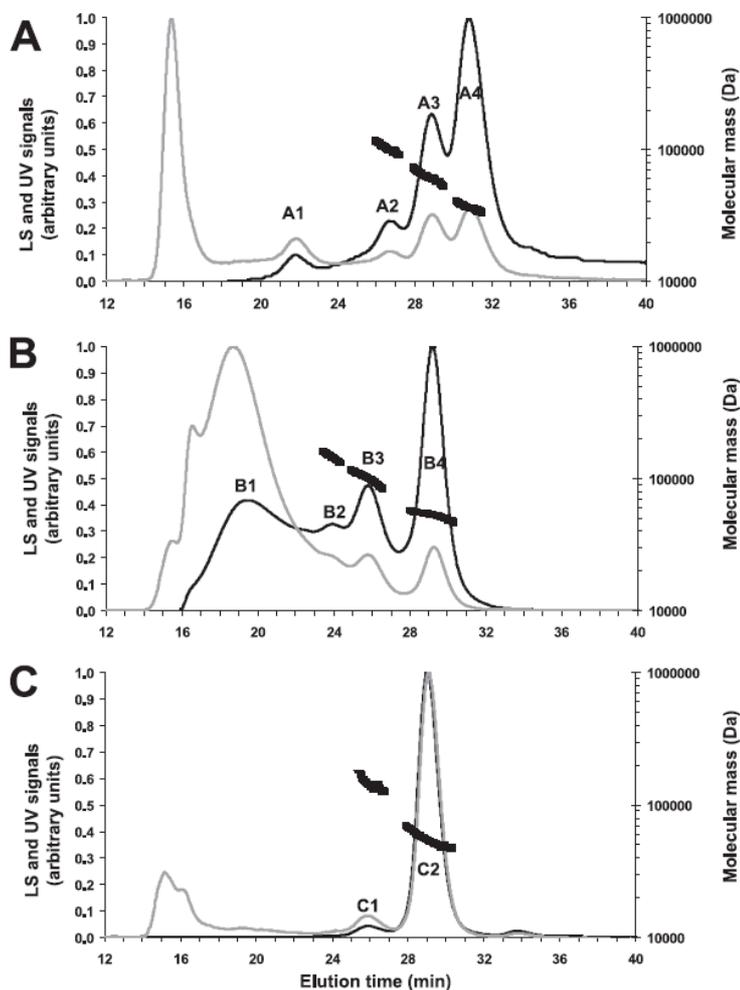


FIG. 1. Gel filtration and DLS chromatograms of purified Fnr proteins. Fnr_{His} (A), Strep_{Fnr} (B) and reduced Strep_{Fnr} (C) were injected (~300 µg in 100 µl) into a Superdex 200 column (HR 10/30) with 50 mM Tris-HCl (pH 8.3)-120 mM NaCl as the eluant at a flow rate of 0.5 ml/min. DTT (10 mM) was added to the elution buffer to determine the oligomeric state of reduced Strep_{Fnr} in panel C. The black and gray lines correspond to the light scattering (LS) signal and the UV signal recorded at 280 nm, respectively. These signals were normalized as a ratio from 0.0 to 1.0 for comparison (left y axis). The molecular mass estimates of the major peaks are also indicated by thick black broken lines (right y axis).

The first cross-linker modifies an ionic interaction into a covalent link, while the latter mimics disulfide bridge formation. Figure 2 shows the reaction products analyzed by SDS-PAGE. The formation of oligomers from monomers could be evidenced using both EDC (Fig. 2C) and diamide (Fig. 2D). Homodimers and homotrimers were the major products. As expected when using cross-linkers, these entities migrated at relative molecular weights slightly lower than the exact weights because of their more rigid structures. Surprisingly, the band corresponding to apoFnr monomer appeared as a discrete doublet after treatment with diamide, reflecting a possible induced conformational change trapped by intrapolypeptide cross-links (Fig. 2D). In conclusion, Fnr_{His} monomers were able to self-associate and form higher-order covalently linked

structures in the presence of cross-linkers. This suggests that unlike Strep_{Fnr}, Fnr_{His} does not tend to form covalently linked homodimers or, more specifically, intermolecular disulfide bridges.

Detection of endogenous apoFnr in *B. cereus* F4430/73 cells.

To determine whether the formation of disulfide-linked homodimers might be of physiological relevance, we tested the presence of various forms of endogenous apoFnr in aerobically grown *B. cereus* cells (4). Figure 3 shows the Western blot detection performed with apoFnr antiserum following SDS-PAGE under nonreducing conditions. The antiserum reacted with two bands of the sizes expected for the monomeric (~30-kDa) and dimeric forms (~60-kDa) of apoFnr in wild-type cells, but not in *fnr* mutant cells. Two other protein bands of 40

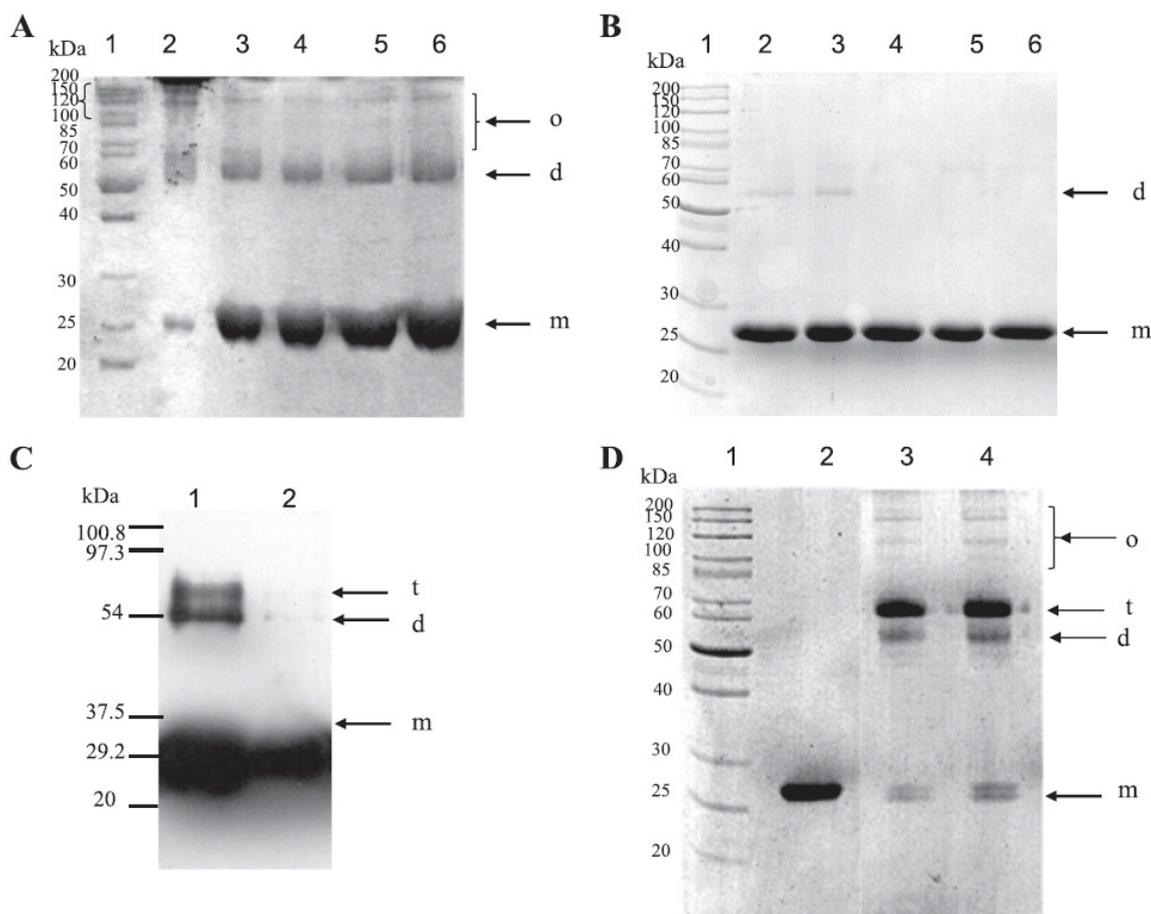


FIG. 2. SDS-PAGE analysis of the oligomeric nature of *Strep*-Fnr and Fnr_{His}. (A and B) Effect of DTT on *Strep*-Fnr (A) and Fnr_{His} (B) oligomerization. Purified proteins were incubated with 0, 10, 50, 100, or 200 mM DTT (lanes 2 to 6, respectively). Recombinant proteins were then subjected to nonreducing SDS-PAGE. The arrows show the positions of monomers (m), dimers (d), and higher oligomers (o). Lane 1 contains molecular mass standard proteins. (C) SDS-PAGE profile of Fnr_{His} cross-linked with EDC. Fnr_{His} (5 μ M) was cross-linked with EDC. Products were visualized by immunoblotting with anti-His antibody. Lane 1, cross-linked Fnr_{His}; lane 2, untreated Fnr_{His}. (D) Nondenaturing SDS-PAGE profile of Fnr_{His} cross-linked with diamide. Lane 1, molecular mass standard proteins; lane 2, untreated Fnr_{His}; lanes 3 and 4, disulfide-linked Fnr_{His} with 1 mM and 10 mM diamide, respectively. The arrows show the positions of monomers (m), dimers (d), trimers (t), and higher oligomers (o).

and 80 kDa cross-reacted with apoFnr antiserum in wild-type cells (Fig. 3, lane 3). As these bands were also observed in the *fnr* mutant cells (Fig. 3, lane 2), they were not related to Fnr. Finally, these results indicated that the apoFnr antiserum can be used efficiently for the detection of endogenous apoFnr in *B. cereus* F4430/73 cells and, more importantly, that some dimeric apoFnr could be disulfide linked in *B. cereus*.

Binding of apoFnr to the 5'UTRs of *fnr*, *resDE*, *plcR*, *hbl*, and *nhe*. The amino acid residues forming the REX₃R motif within the helix-turn-helix DNA-binding domain of Crp regulatory proteins are strictly conserved in the potential DNA-binding domain of *B. cereus* F4430/73 Fnr as in its homologues found in strains belonging to the *B. cereus* group (12). Accordingly, Fnr of *B. cereus* F4430/73 was assumed to bind to DNA motifs

similar to the TGTGAN₆TCACA consensus sequence defined in previous work (2, 16). Using the Virtual tool of the Proditoric database and the corresponding *E. coli* Crp position weight matrix, we scanned the 5'UTRs of regulatory and structural genes of *B. cereus* F4430/73 enterotoxins. Figure 4A shows the locations of predicted Fnr-binding boxes for *fnr*, *resDE*, *plcR*, *nhe*, *hbl1*, and *hbl2* promoters and their positions relative to the transcriptional start point of each gene/operon. Except for *resDE* (Fig. 4B), the transcriptional start sites were identified in previous studies (1, 4). Three putative Fnr-binding sites were found in the 5'UTRs of the enterotoxin gene regulators *fnr*, *resDE*, and *plcR*. Eight potential Fnr-binding sites were found in the *nhe* promoter region: four were located upstream of the transcriptional start site and four were downstream. The *hbl*

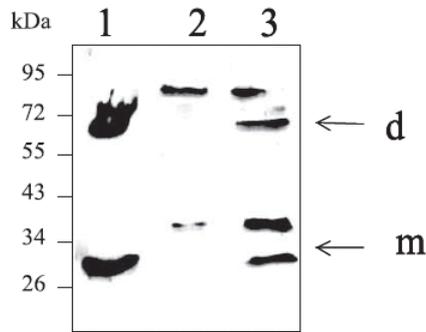


FIG. 3. Western blot detection of endogenous Fnr species from *B. cereus* cells. Lysates of wild-type *B. cereus* F4430/73 and *fnr* mutant were probed with polyclonal Fnr antiserum. Both strains were grown in regulated batch culture (pH 7.2) under aerobiosis (4). Proteins were separated by nonreducing SDS-PAGE. Lane 1, *Strep*-Fnr purified from *E. coli*; lane 2, *fnr* mutant; lane 3, wild-type strain. The putative identities shown on the right were determined for the wild-type strain on the basis of results obtained with both recombinant Fnr and *fnr* mutant strains. The arrows show the positions of monomer (m) and dimer (d) forms. The positions and masses (in kilodaltons) of molecular mass markers are given to the left of the gel.

promoter region contained 11 potential Fnr-binding sites, 4 located upstream of the +1 site and 7 downstream.

To test whether apoFnr bound to the Fnr boxes predicted from the nucleotide sequence analysis, EMSAs were performed with both *Strep*-Fnr and Fnr_{His} and DNA fragments containing 5'UTRs of *fnr*, *resDE*, *plcR*, *hbl*, and *nhe*. In view of its size (1,157 bp), the 5'UTR of *hbl* was first divided into two overlapping fragments of 636 bp (*hbl1*) and 610 bp (*hbl2*) as defined in Fig. 4A. Figure 5 shows the EMSA results for the six fragments. Fnr_{His} bound to all the regions tested, while no DNA-binding activity could be detected with *Strep*-Fnr. The specificity of the binding was evidenced from the disappearance of complexes in competition assays using 50-fold excess of homologous unlabeled promoter regions and by the absence of any competition when an unlabeled heterologous DNA was used (data not shown). EMSAs with the negative control (Fig. 5G) showed that a shift above 6 μM apoFnr should be considered the result of nonspecific binding. In addition, the behavior of apoFnr differed markedly in the gel-shift titration assay depending on the promoter regions. ApoFnr bound to *fnr* and *resDE* promoter regions in an ordered fashion giving two retarded species (complex I and II) below 6 μM. In contrast, an increasing amount of apoFnr resulted in a gradual decrease in the mobility of the protein-DNA complexes for *plcR*, *hbl*, and *nhe* promoter regions, which appeared to be stabilized at higher protein concentrations. This suggests that,

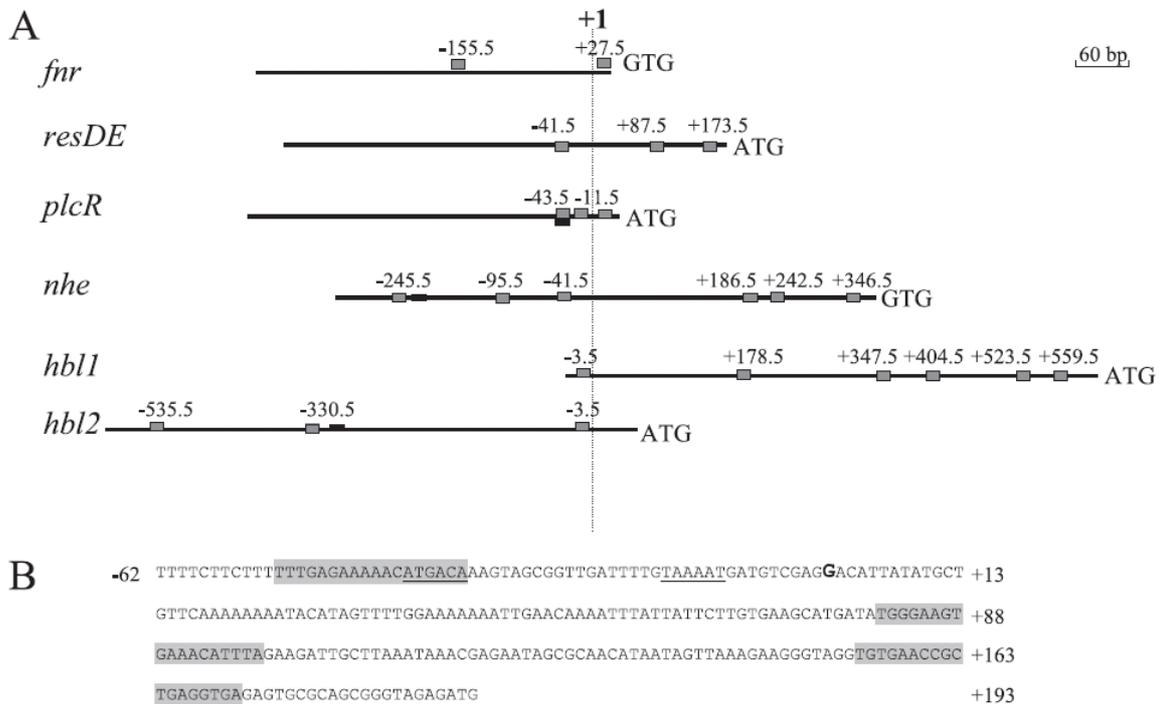


FIG. 4. Potential Fnr-binding sites in the 5' untranslated regions of *fnr*, *resDE*, *plcR*, *hbl*, and *nhe*. All numbering is relative to the transcription start site at position +1. (A) Potential Fnr-binding sites are shown relative to the transcription start site as gray boxes. PlcR boxes are shown as black boxes. (B) Genetic organization of the *resDE* promoter region. The transcriptional start site (+1) determined by 5' RACE PCR is in bold type. The putative -35 and -10 motifs are underlined. Putative Crp/Fnr boxes are indicated by a gray background.

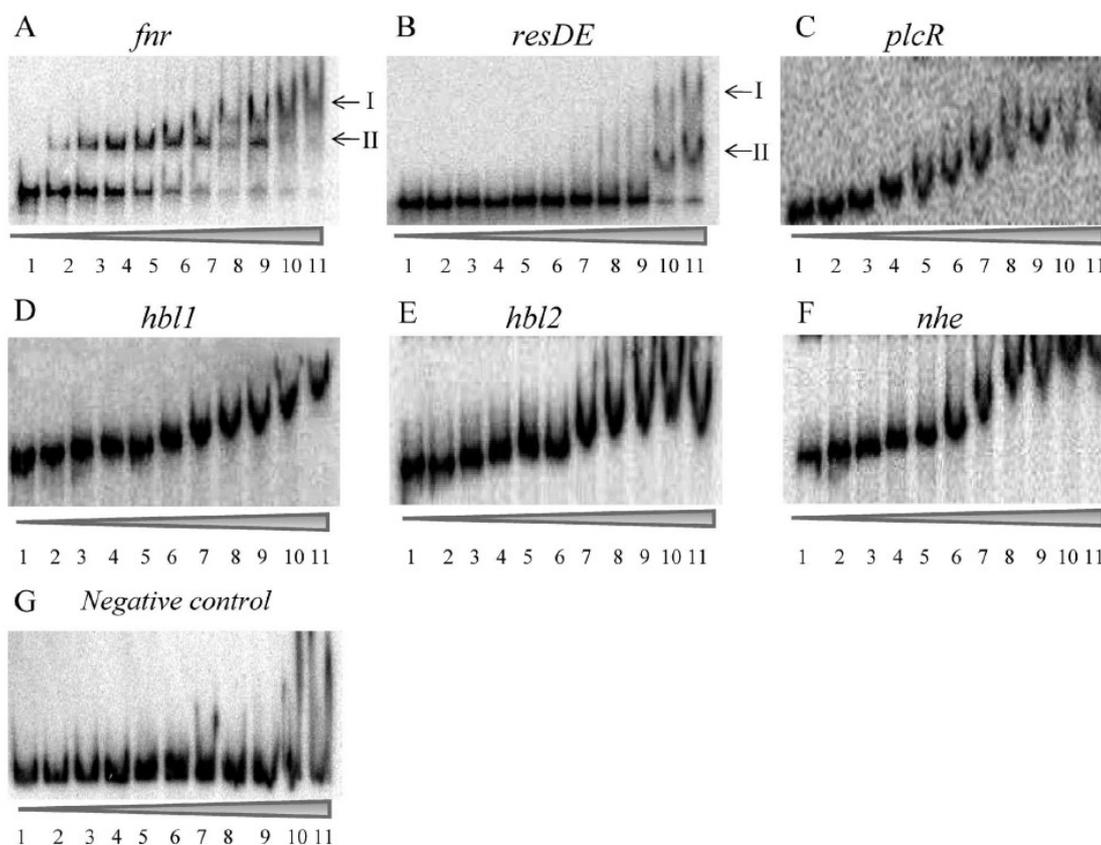


FIG. 5. Binding of apoFnr to 5'UTRs of *fnr*, *resDE*, *plcR*, *hbl*, and *nhe* genes determined by EMSAs. DNAs corresponding to *fnr* (A), *resDE* (B), *plcR* (C), *hbl1* (D), *hbl2* (E), *nhe* (F), and a negative control (G) were bound with increasing concentrations of apoFnr as indicated by the height of the triangle below the gel. The results presented are representative examples of an experiment performed in triplicate with either purified Fnr_{His} or with reduced _{Strep}Fnr (purified _{Strep}Fnr plus 200 mM DTT). Lanes 1 to 11 contain 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 μM apoFnr protein, respectively.

as more protein was added, the protein complex bound to the DNA increased proportionally in size, with the added apoFnr being distributed evenly among all the complexes. The smearing of these species during EMSA also suggested that these high-molecular-weight complexes were not stable and dissociated during electrophoresis. The EMSA data also showed that the *plcR*, *hbl*, and *nhe* 5'UTRs were bound by apoFnr with a lower affinity (equilibrium dissociation constant [K_D] of ≤ 0.4 μM) than the *resDE* and *fnr* promoter regions (K_D s of 3 and 4.5 μM, respectively).

To test whether the oligomeric state regulated the DNA-binding activity of both Fnr_{His} and _{Strep}Fnr, the effect of the reducing agent DTT (200 mM) on the binding of _{Strep}Fnr and the effect of the oxidizing agent diamide (1 mM) on the binding of Fnr_{His} to all promoter regions were investigated. Adding reductant resulted in the generation of _{Strep}Fnr-DNA complex patterns similar to those obtained with Fnr_{His} (Fig. 5). The effect of DTT was reversible, while the addition of diamide (1 mM) abolished _{Strep}Fnr binding (data not shown). Likewise,

Fnr_{His} showed no DNA-binding activity in the presence of diamide (data not shown). Thus, the oligomeric state of apoFnr was found to critically affect its binding activity. The data also indicate that apoFnr was able to bind the *fnr*, *resDE*, *plcR*, *hbl*, and *nhe* 5'UTRs only when present predominantly as a monomer.

DISCUSSION

Our previous studies showed that aerobic enterotoxin expression was regulated by both the transcriptional regulator Fnr and oxygen availability (or redox state) under aerobiosis (4, 33). In the present work, we describe experimental evidence for redox regulation of enterotoxin gene expression mediated by Fnr through its DNA-binding properties.

B. cereus apoFnr was overexpressed in *E. coli* and purified as either a C-terminal His-tagged (Fnr_{His}) or an N-terminal Strep-tagged (_{Strep}Fnr) fusion protein. Unlike Fnr_{His}, _{Strep}Fnr was purified without an affinity chromatography step. The rea-

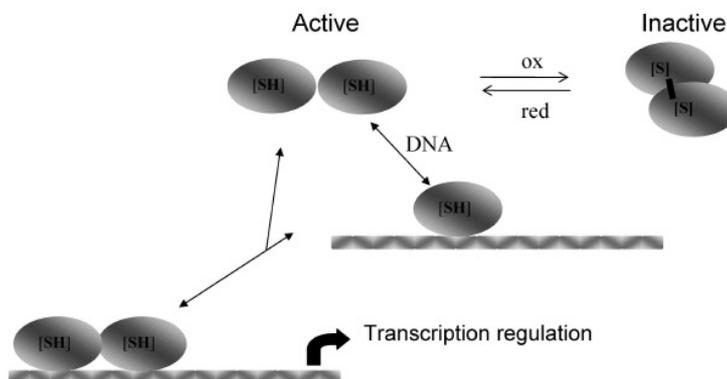


FIG. 6. Proposal for the regulation of apoFnr activity by a thiol-disulfide redox switch. Brackets indicate that one or more disulfide bonds may be involved.

son was the poor affinity of the *Strep*-tag peptide (IBA BioTAGnology) for streptavidin (Strep-Tactin) due to its fusion to the N terminus of Fnr (19). No such problem was encountered in the case of Strep-tagged *B. subtilis* Fnr (27). This different behavior may be explained by the marked difference in the two N-terminal polypeptide sequences. Both recombinant Fnr (Fnr_{His} and Strep-Fnr) were produced in multiple oligomeric apoforms. The distribution of quaternary structures was shown to differ between the two tagged variants. Purified Fnr_{His} was predominantly monomeric, while Strep-Fnr was predominantly oligomeric, and the oligomerization of Strep-Fnr appeared to be due to the formation of disulfide bridges. Data obtained from crystal structure analysis of a member of the Crp/Fnr family showed that dimerization involved the C-terminal domain (13). This suggests that extension of *B. cereus* Fnr at its C terminus may introduce steric hindrance that reduces flexibility and/or affects interdomain communication. In turn, this would result in a less permissive, locked conformation, rendering the thiol group less exposed for pairing to form the disulfide bond.

Our results showed that the active DNA-binding form of both recombinant apoFnrs was the monomer. Diamide treatment inactivated monomeric apoFnr in a DTT-reversible manner, suggesting that it was subject to redox regulation. In addition, we detected the presence of disulfide-linked endogenous dimers in *B. cereus* cells. Taken together, these findings suggest that formation of stabilized dimeric apoFnr by means of one or more SS bonds may be a regulatory mechanism that controls Fnr binding under exposure to oxidizing conditions. Figure 6 shows the scheme we propose for the reversible activation/inactivation of *B. cereus* apoFnr. It implies that this protein mediates a response to oxygen concentration and/or redox state causing the repression or activation of relevant genes. Such a thiol-based redox switch has been observed with *Desulfitobacterium dehalogenans* CrpK, a member of the Crp/Fnr family (24, 25). In this bacterium, the redox switch involves formation of an intermolecular disulfide bond that links two CprK subunits in an inactive dimer. Although it belongs to the same family, *B. cereus* Fnr contains three more cysteines than CprK does and should have the capacity to bind a FeS cluster like *B. subtilis* Fnr (27). For this reason, our findings are original. Additional work is now required to determine which of

the seven cysteine residues are involved in this redox state sensing.

Many transcription factors bind DNA to form dimeric protein-DNA complexes. For these proteins, there are two limiting pathways that can describe the route of complex assembly. The protein can dimerize first and then associate with DNA (dimer pathway), or it can follow a pathway in which two monomers bind DNA sequentially and assemble their dimerization interface while bound to DNA (monomer pathway) (15). Many regulators bind DNA by the dimer pathway, and this is the case for Fnr of *B. subtilis* and *E. coli* under anaerobiosis (27). Under aerobiosis, apoFnr is produced as an inactive monomer in *E. coli* (28) and as an inactive dimer in *B. subtilis* (27). Because only the monomeric form of *B. cereus* apoFnr binds to DNA, we propose that Fnr binding in *B. cereus* occurs via the monomer pathway under aerobiosis (Fig. 6). Binding through the monomer pathway allows a dimeric transcription factor to respond rapidly to stimuli and to locate its target site quickly without becoming entrapped kinetically at a nonspecific site (23). Therefore, in addition to a faster assembly of apoFnr-DNA complexes in response to oxygen tension in the environment allowed by the monomer pathway, an efficient way to discriminate between specific and nonspecific target sites is also provided.

Since apoFnr bound to the promoter regions of *fir* itself, the two-component system *resDE* genes, the virulence regulator *plcR* gene, and the enterotoxin genes *hbl* and *nhe*, we concluded that apoFnr directly controlled both its own expression and that of *resDE*, *plcR*, *hbl*, and *nhe* (34). The relatively low DNA-binding affinity observed for apoFnr suggests that other factors may be involved in DNA recognition as well as in protein-DNA complex stabilization (16). For example, it is conceivable that apoFnr operates with a specific oxidoreductase system or that for some other reason the cytoplasmic environment provided by *B. cereus* enhances its site-specific DNA-binding ability. In addition, interaction of apoFnr with one or more other regulatory proteins may facilitate its interaction with DNA. High-affinity binding to 5'UTRs of enterotoxin genes may require apoFnr-PlcR interaction insofar as PlcR (1) possesses binding sites close to the predicted Fnr-

binding sites (Fig. 4A). Another possible interaction partner of apoFnr is the redox regulator ResD (4).

Transcriptional regulators such as members of the Crp/Fnr family interact with the α subunit of RNA polymerase (RNAP) (10). It has been shown that the protein-protein interaction increases the affinity of both partners to the promoter site (2). The contacts established between a Crp/Fnr protein and RNAP involve three patches of surface-exposed amino acids (called activating regions 1, 2, and 3) of Crp/Fnr protein. These contacts depend on the specific architecture of each promoter. The Crp/Fnr-dependent promoters can be grouped into three classes (labeled I, II, and III) based on the number and position of the Crp/Fnr-binding sites relative to the start of transcription and on the mechanism for transcription activation (2). The upstream DNA-binding site in class I promoters is centered either at position -61.5 (i.e., its axis of symmetry is between positions -61 and -62) or one to three helical turns further upstream (i.e., -71.5 , -82.5 , or -92.5). In class II promoters, the symmetry axis of the binding site is located at position -41.5 relative to the transcription start site, thus overlapping with the -35 region. Class III promoters comprise two or more DNA-binding sites for Crp/Fnr and have various architectures according to both the spacing between the DNA-binding sites and the distance between the Crp/Fnr-DNA-binding sites and RNAP-DNA-binding sites. In the case of *B. cereus*, the locations of predicted Crp/Fnr-binding sites upstream of the transcriptional start site suggest that the *B. cereus* *fnr* promoter region is a class I activating promoter, while *resDE* and *plcR* promoter regions are class II promoters. The *nhe* and *hbl* promoters are different and may be considered class III Crp/Fnr-dependent activated promoters. However, *nhe*, *hbl*, and to a lesser extent *fnr*, *resDE*, and *plcR* promoter regions, also contain predicted Crp/Fnr boxes located close to the -10 region and/or downstream of the transcriptional start site, i.e., at positions different from those found in classical Crp/Fnr-activated promoters. Comparable results were found for *E. coli* and *B. subtilis* Fnr (9, 27), where repression of transcription is mediated by Fnr binding to sites in different locations than in activating sites. Thus, we hypothesize that the regulation of enterotoxin gene expression involves an interplay of transcriptional activation and repression by Fnr. Repression may be mediated by occupancy of sites located downstream of the $+1$ site. In conclusion, the mechanism of Fnr-dependent regulation of enterotoxin in *B. cereus* is undoubtedly complex, and further extensive studies are required to examine the essential role of the downstream binding sites. Importantly, both *hbl* and *nhe* promoters have a long UTR (Fig. 4A), making it likely that mechanisms at the posttranscriptional level also control their expression. Such regulation could involve interaction between transcriptional regulators and ribosomal proteins (8). Finally, deciphering the complexities of this Fnr-dependent regulation is necessary to fully understand the mechanisms employed by *B. cereus* to ensure optimal virulence gene expression in response to changes in oxygen tension such as those encountered during infection in a human host.

In conclusion, this work shows that unlike its homologue in *B. subtilis* (12, 27), *B. cereus* Fnr is able to function as a transcriptional factor independently of the integrity of the FeS cluster. Thus, *B. cereus* Fnr illustrates the great versatility of the archetypal Crp/Fnr structure for transducing environmen-

tal signals to the transcriptional apparatus. More importantly, this study expands our knowledge of the molecular mechanisms used in *B. cereus* to modulate the transcriptional level of enterotoxin genes in response to redox variations.

ACKNOWLEDGMENTS

J.E. held a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

We thank Christine Meyer (CEA-Grenoble) for her help and technical advice in protein purification, Bernard Fernandez (CEA-Marcoule) for conducting DLS experiments, Jean-Charles Gaillard (CEA-Marcoule) for mass spectrometry measurements, and Valérie Tanchou (CEA-Marcoule) for her kind help in the production of polyclonal antibodies.

REFERENCES

1. 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*. *Mol. Microbiol.* 32:1043–1053.
2. Busby, S., and R. H. Ebright. 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* 293:199–213.
3. Dupont, C., S. Thomassin, G. Bourel, and P. Schmitt. 2004. Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Arch. Microbiol.* 182:90–95.
4. Dupont, C., A. Zigha, E. Rosenfeld, and P. Schmitt. 2006. Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J. Bacteriol.* 188:6640–6651.
5. Folta-Stogniew, E. 2006. Oligomeric states of proteins determined by size-exclusion chromatography coupled with light scattering, absorbance, and refractive index detectors. *Methods Mol. Biol.* 328:97–112.
6. Gabant, G., J. Augier, and J. Armengaud. 2008. Assessment of solvent residues accessibility using three Sulfo-NHS-biotin reagents in parallel: application to footprint changes of a methyltransferase upon binding its substrate. *J. Mass Spectrom.* 43:360–370.
7. 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.
8. Gray, J. P., J. W. Davis II, L. Gopinathan, T. L. Leas, C. A. Nugent, and J. P. Vanden Heuvel. 2006. The ribosomal protein rpl11 associates with and inhibits the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Toxicol. Sci.* 89:535–546.
9. Green, J., A. S. Irvine, W. Meng, and J. R. Guest. 1996. FNR-DNA interactions at natural and semi-synthetic promoters. *Mol. Microbiol.* 19:125–137.
10. Green, J., C. Scott, and J. R. Guest. 2001. Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors: FNR and FLP. *Adv. Microb. Physiol.* 44:1–34.
11. Guinebretiere, M. H., and C. Nguyen-The. 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43:207–215.
12. Guinebretiere, M. H., F. L. Thompson, A. Sorokin, P. Normand, P. Dawyndt, M. Ehling-Schulz, B. Svensson, V. Sanchis, C. Nguyen-The, M. Heyndrickx, and P. De Vos. 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ. Microbiol.* 10:851–865.
13. Joyce, M. G., C. Levy, K. Gabor, S. M. Pop, B. D. Biehl, T. I. Doukov, J. M. Ryter, H. Mazon, H. Smidt, R. H. van den Heuvel, S. W. Ragsdale, J. van der Oost, and D. Leys. 2006. CprK crystal structures reveal mechanism for transcriptional control of halorespiration. *J. Biol. Chem.* 281:28318–28325.
14. Khoroshilova, N., H. Beinert, and P. J. Kiley. 1995. Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2499–2503.
15. Kohler, J. J., S. J. Metallo, T. L. Schneider, and A. Schepartz. 1999. DNA specificity enhanced by sequential binding of protein monomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:11735–11739.
16. Korner, H., H. J. Sofia, and W. G. Zumft. 2003. Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* 27:559–592.
17. Kotiranta, A., K. Lounatmaa, and M. Haapasalo. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect.* 2:189–198.
18. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
19. Maier, T., N. Drapal, M. Thanbichler, and A. Bock. 1998. Strep-tag II affinity purification: an approach to study intermediates of metalloenzyme biosynthesis. *Anal. Biochem.* 259:68–73.
20. Okstad, O. A., M. Gominet, B. Purnelle, M. Rose, D. Lereclus, and A. B. Kolsto. 1999. Sequence analysis of three *Bacillus cereus* loci carrying PlcR-regulated genes encoding degradative enzymes and enterotoxin. *Microbiology* 145:3129–3138.

21. Ouhib, O., T. Clavel, and P. Schmitt. 2006. The production of *Bacillus cereus* enterotoxins is influenced by carbohydrate and growth rate. *Curr. Microbiol.* **53**:222–226.
22. Pelley, J. W., C. W. Garner, and G. H. Little. 1978. A simple rapid biuret method for the estimation of protein in samples containing thiols. *Anal. Biochem.* **86**:341–343.
23. Pomerantz, J. L., S. A. Wolfe, and C. O. Pabo. 1998. Structure-based design of a dimeric zinc finger protein. *Biochemistry* **37**:965–970.
24. Pop, S. M., N. Gupta, A. S. Raza, and S. W. Ragsdale. 2006. Transcriptional activation of dehalorespiration. Identification of redox-active cysteines regulating dimerization and DNA binding. *J. Biol. Chem.* **281**:26382–26390.
25. Pop, S. M., R. J. Kolarik, and S. W. Ragsdale. 2004. Regulation of anaerobic dehalorespiration by the transcriptional activator CprK. *J. Biol. Chem.* **279**:49910–49918.
26. Ramarao, N., and D. Lereclus. 2006. Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes Infect.* **8**:1483–1491.
27. Reents, H., I. Gruner, U. Harmening, L. H. Bottger, G. Layer, P. Heathcote, A. X. Trautwein, D. Jahn, and E. Hartig. 2006. *Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state. *Mol. Microbiol.* **60**:1432–1445.
28. Reinhart, F., S. Achebach, T. Koch, and G. Unden. 2008. Reduced apofumarate nitrate reductase regulator (apoFNR) as the major form of FNR in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**:879–886.
29. Rosenfeld, E., C. Dupont, A. Zigha, and P. Schmitt. 2005. Characterisation of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J. Can. Microbiol.* **51**:149–158.
30. Schoeni, J. L., and A. C. Wong. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J. Food Prot.* **68**:636–648.
31. Slamti, L., and D. Lereclus. 2002. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* **21**:4550–4559.
32. Spira, W. M., and J. M. Goepfert. 1975. Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Can. J. Microbiol.* **21**:1236–1246.
33. Zigha, A., E. Rosenfeld, P. Schmitt, and C. Dupont. 2006. Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Arch. Microbiol.* **185**:222–233.
34. Zigha, A., E. Rosenfeld, P. Schmitt, and C. Dupont. 2007. The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J. Bacteriol.* **189**:2813–2824.

Ames Ancestor (YP_018775), *B. anthracis* Ames (NP_844530), *B. anthracis* Sterne (YP_028247), *B. thuringiensis* 97-27 (YP_036287), *B. cereus* E33L (YP_083528), *B. cereus* ATCC14579 (NP_831888), *B. thuringiensis* Al Hakam (YP_894717), *B. thuringiensis* ATCC 35646 (ZP_00743775), *B. cereus* G9241 (ZP_00237618), *B. weihenstephanensis* KBAB4 (ZP_01185318) and *B. cereus* NVH 391-98 (ZP_01180023). Predicted secondary structure elements of Fnr are indicated above the alignments (α -helices A to G, and β -strands 1-11). Conserved cysteine residues and the potential DNA contact sites (REX3R) in the DNA recognition helices (α_F) are indicated by a grey background. The alignment was produced by ClustalW. Secondary structure prediction was done using PredictProtein (<http://www.predictprotein.org>).

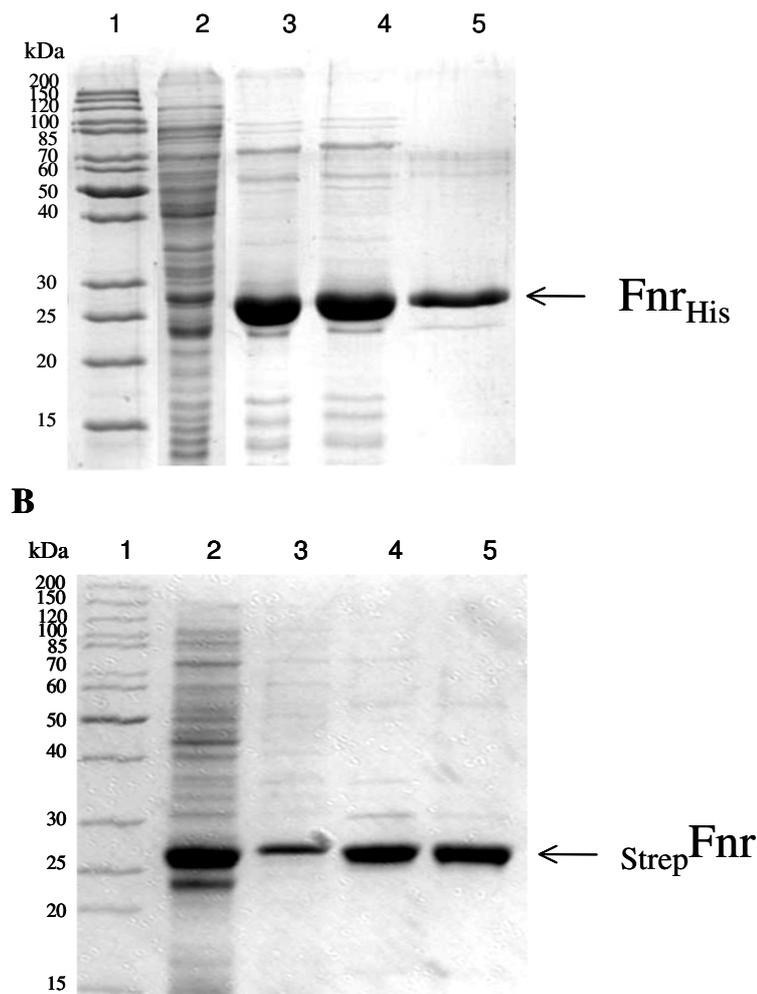


Figure S2. SDS-PAGE analysis of overproduced and purified *B. cereus* Fnr. Samples of the purification fractions were analyzed by electrophoresis on an SDS-12% polyacrylamide gel followed by Coomassie Brilliant Blue staining. The position and mass (kDa) of molecular weight markers (lanes 1) are given on the left. Panel A: Purification of Fnr_{His}. Lane 1, standard proteins. Lane 2, soluble whole cell extract from *E. coli*. Lane 3: purified protein after Co²⁺ IMAC. Lane 4: gel filtration chromatography (G25) pool. Lane 5, purified protein after Superdex 200 size exclusion chromatography. Panel B: Purification of Strep-Fnr. Lane 1, standard proteins. Lane 2, soluble whole cell extract. Lane 3, DE52 flow-through. Lane 4, hydroxyapatite pool. Lane 5, purified protein after Superdex 200 size exclusion chromatography.

3.2 Caractérisation moléculaire et fonctionnelle de la protéine Fnr native

Les purifications des protéines recombinantes Fnr_{His} et _{Strep}Fnr en anaérobiose n'ont pas permis d'obtenir de protéine présentant un centre [Fe-S] : seule la forme Apo a été obtenue. Pour éliminer un effet dû au tag positionné sur la protéine, nous avons entrepris de purifier la protéine Fnr sous sa forme native. Celle-ci a été purifiée dans les mêmes conditions que la protéine _{Strep}Fnr (Article 1).

3.2.1 Surexpression de la protéine Fnr

Nous avons entrepris la surexpression et la purification de la protéine Fnr dépourvue de Tag. La séquence codante de *Fnr* a été clonée dans le vecteur pET101 et la construction obtenue introduite dans la souche d'expression d'*E. coli* BL21 codon plus (DE3)-RIL.

Au vu de la construction génétique réalisée, la protéine Fnr exprimée a en théorie, une taille de 26.64 kDa et un pHi et 6.54 respectivement.

Différents essais nous ont montré que la surexpression était optimale à 16°C pendant 16h dans le milieu classique LB. Après induction, les cellules sont lysées par sonication et l'extrait protéique brut obtenu est analysé afin de vérifier l'expression de *fnr*. En analysant simultanément par électrophorèse un extrait protéique brut de cellules induites et de cellules non induites, on retrouve une protéine d'environ 26 kDa (figure 57 A, pistes 2 et 3) présente uniquement dans les cellules induites. Une analyse Western-Blot avec détection à l'aide de l'antisérum Fnr dilué au 1/2000^e a permis de confirmer que cette protéine correspondait bien à Fnr.

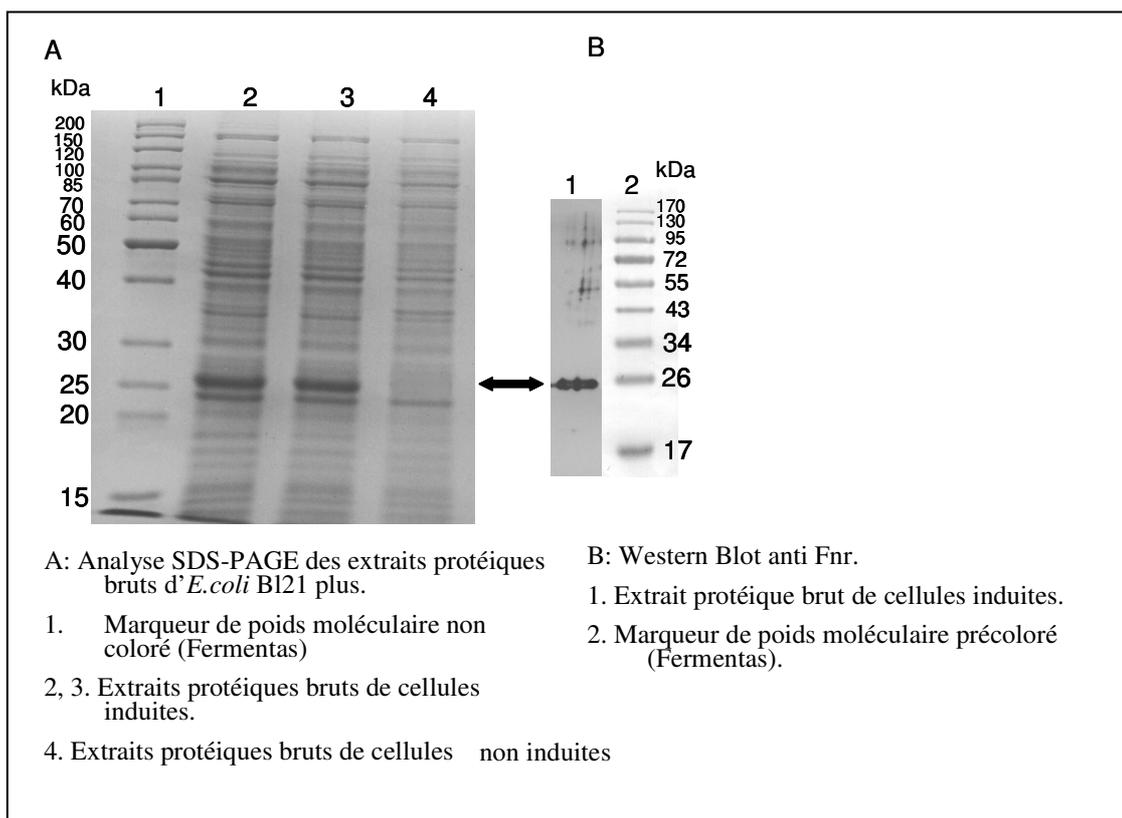


Figure 57 : Analyse de l'expression de Fnr.

3.2.2 Purification de la protéine Fnr en anaérobiose

Une fois l'expression contrôlée, Fnr a été purifiée en 3 étapes, comprenant successivement, une chromatographie échangeuse d'anion (DEAE cellulose), une chromatographie sur hydroxylapatite (HA) et une chromatographie d'exclusion. Le suivi de la purification a été réalisé via une analyse électrophorétique en gel SDS-PAGE (Figure 58).

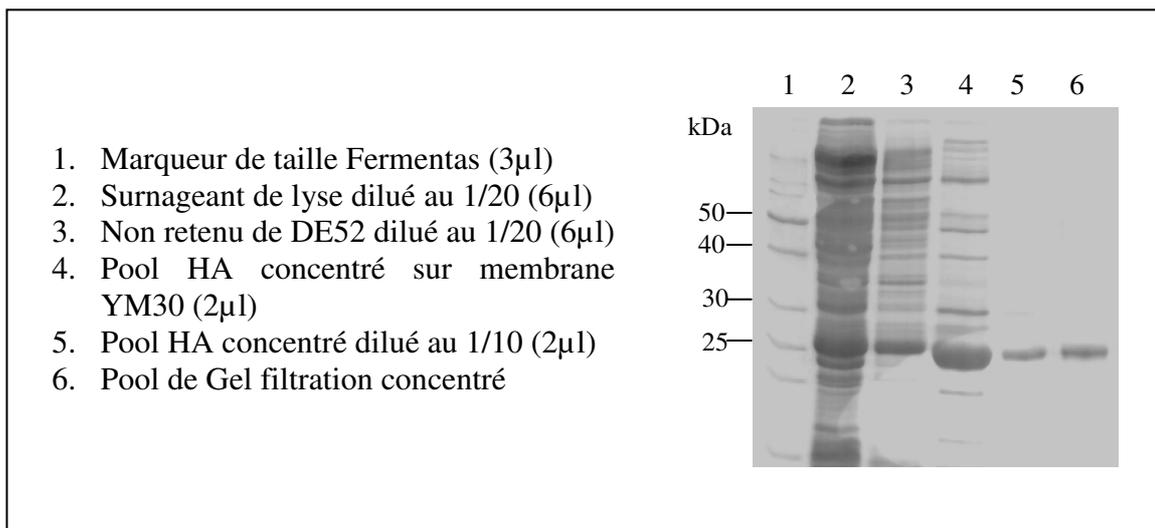


Figure 58: Analyse par gel SDS-PAGE de la purification de Fnr native. Des échantillons de protéine ont été récupérés lors des principales étapes de la purification

Lors de son passage sur DEAE, contrairement à ce qui est attendu, Fnr n'est pas retenue. Mais cette première étape nous permet d'éliminer un grand nombre de protéines qui, elles, restent fixées sur la résine. Compte tenu de son statut de facteur transcriptionnel et donc de son affinité pour l'ADN, nous avons opté pour une deuxième étape de purification sur colonne d'hydroxylapatite. La colonne HA a permis d'obtenir une fraction protéique relativement propre. Celle-ci a été concentrée sur membrane YM30 avant analyse. L'éluat de la colonne de gel filtration Superdex SD200 a montré deux pics d'absorption à une DO de 280 nm. Le pic d'éluat correspondant à 168 min est situé dans la zone théorique attendue pour une protéine d'environ 50 kDa. Son analyse en gel SDS-PAGE montre une seule bande à environ 25 kDa, ce qui suggère que Fnr pourrait être dimérique en solution. Le second pic a été identifié comme étant un contaminant absorbant à 426 nm (Figure 59).

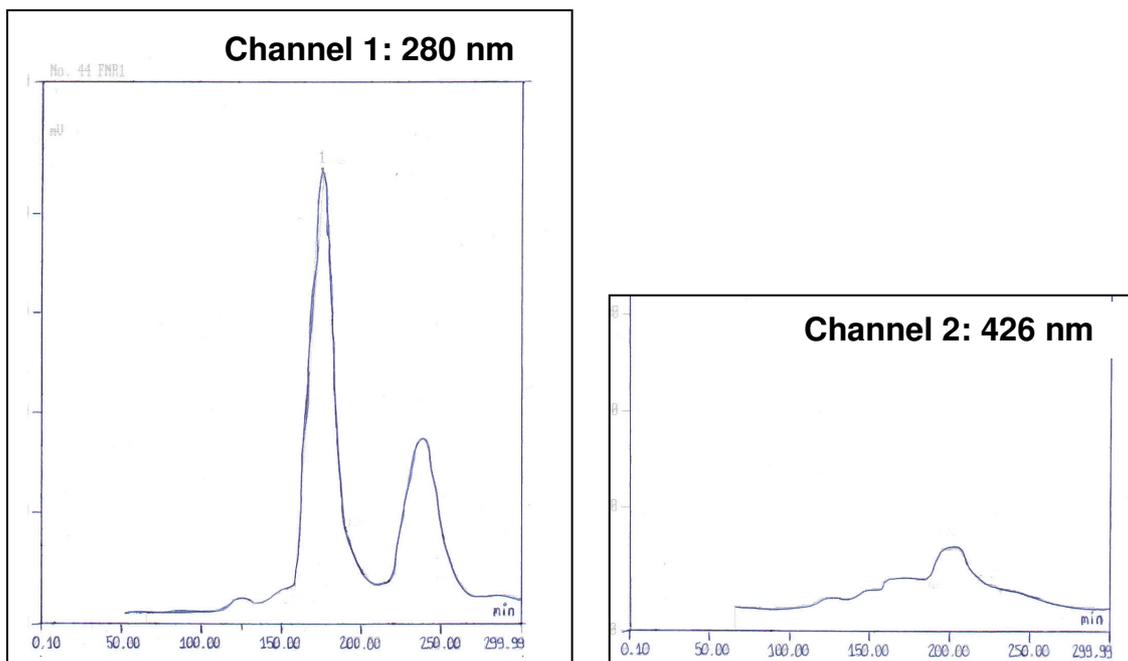


Figure 59: Diagramme d'éluion de la fraction issue de la colonne d'hydroxyapatite sur colonne Superdex SD200 en gradient de tampon phosphate. Débit : 0.4 mL/min. Injection 0.5 mL.

En conclusion, la protéine est pure à la fin de la troisième étape et la quantité de Fnr purifiée est de 5-6 mg par litre de culture de *E. coli* avec la souche BL21 codonplus (DE3)-RIL.

Malgré un respect rigoureux des conditions d'anaérobie et l'utilisation d'agents réducteurs, les solutions concentrées de protéines ne présentaient pas la couleur brune typique des protéines [Fe-S] lors de la purification. Comme l'illustre la figure 60, le spectre UV-visible montre un seul pic à 280 nm qui correspond à l'absorption des résidus aromatiques de la chaîne polypeptidique. L'absence d'autres bandes d'absorption, notamment entre 300 nm et 500 nm, montre que la protéine Fnr est obtenue principalement sous forme Apo après purification, c'est-à-dire sans cofacteur métallique.

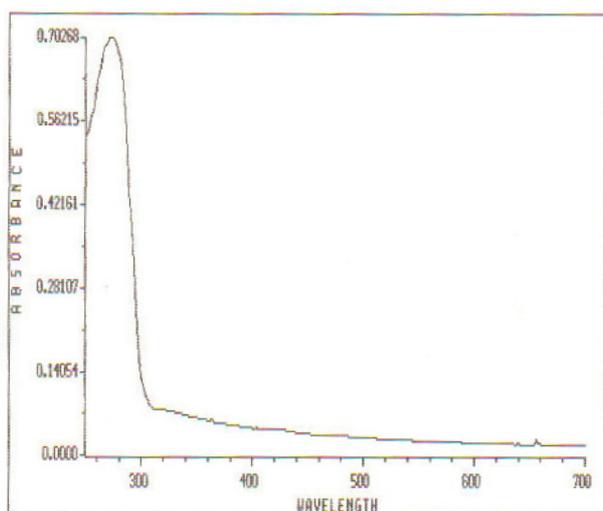


Figure 60 : Spectre d'absorption UV-Visible de Fnr native.

Nous pouvons donc en conclure que bien que dépourvue de Tag, la protéine Fnr est purifiée sous sa forme Apo, c'est à dire sans centre métallique. La protéine Fnr de *B. cereus* semble donc être beaucoup plus sensible à l'oxygène que celle de *B. subtilis* (Reents et al., 2006a).

3.2.3 Reconstitution du centre fer-soufre de la protéine Fnr

Comme décrit dans le paragraphe précédent, nous n'avons pas réussi à isoler la protéine Fnr sous sa forme holo. Nous avons donc décidé de réaliser une reconstitution du centre [Fe-S] sur la protéine purifiée. Plusieurs protocoles de reconstitution chimique du centre [Fe-S] ont été entrepris. Dans ces essais, nous avons réalisé des reconstitutions après réduction (par le DTT ou le 2-ME) ainsi que des reconstitutions après dénaturation (guanidine-HCl 6M) puis renaturation. Aucune de ces tentatives n'a permis l'incorporation d'un centre [Fe-S] au sein de la protéine Fnr. Nous avons donc opté pour une reconstitution enzymatique en présence de la protéine CsdA d'*E. coli*. Comme décrit dans le chapitre "Matériel et Méthodes, 4.3.1", la protéine CsdA appartient au système CSD et possède une activité dite cystéine désulfurase. Elle est décrite comme la meilleure cystéine désulfurase donatrice de soufre chez *E. coli* (Mihara *et al.*, 2000). On retrouve un homologue structural de cette protéine chez *B. cereus*.

Après reconstitution, le spectre UV-visible de la protéine Fnr (figure 61) comporte des bandes d'absorption à 420 nm. Elles se trouvent dans la région des bandes de transfert de charge S \rightarrow Fe (III), qui sont caractéristiques de la présence d'un centre [Fe-S]. Chez *E. coli*, il

a été montré que la reconstitution anaérobie de Fnr générait une protéine dont le spectre est distinct de celui de l'apoprotéine et typique des ferredoxines bactériennes. On constate que l'incorporation du centre métallique dans la protéine commence à T + 90 minutes, moment où l'on observe un maximum d'absorbance à 420 nm (courbe en noir). D'après ces résultats, la protéine Fnr de *B. cereus* est capable d'incorporer un centre [Fe-S].

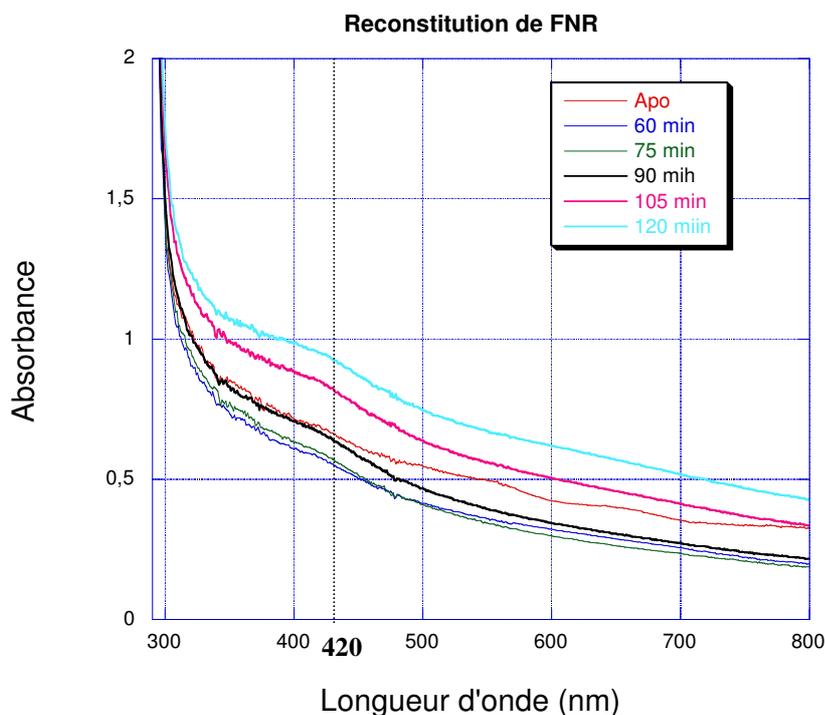


Figure 61: Spectre d'absorption UV-Visible de la protéine Fnr native, suivi de la reconstitution.

Après reconstitution, la protéine Fnr est filtrée sur une colonne de chromatographie Sephadex G25 afin d'éliminer l'excès de fer et de soufre. Un spectre UV-Visible est alors réalisé (Figure 62). Celui-ci présente bien un maximum d'absorption à 420 nm indiquant la présence du centre métallique. A ce niveau de l'expérience, la solution protéique présente une couleur brune typique des protéines portant un centre [Fe-S].

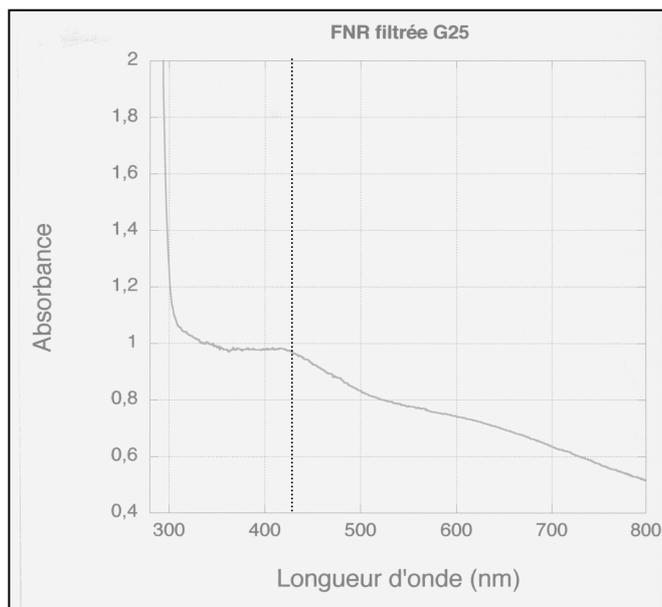


Figure 62: Spectre d'absorption UV-Visible de la protéine Fnr reconstituée.

3.2.4 Réduction de la protéine Fnr

Pour mettre en évidence les caractéristiques du centre métallique de Fnr, nous avons employé la 5-déazariboflavine ($E_m = -650$ mV) (Massey & Hemmerich, 1978) afin de réduire le centre métallique de la protéine. La réduction du centre [Fe-S] de la protéine Fnr s'effectue en boîte à gants sous atmosphère contrôlée (moins de 2 ppm d' O_2) et à 18°C. La réaction est suivie par spectroscopie d'absorption UV-visible.

La réduction induit une diminution de l'absorption à 420 nm (-0.02). Dès 1 minute l'absorption attribuée au cluster n'est plus visible (Figure 63).

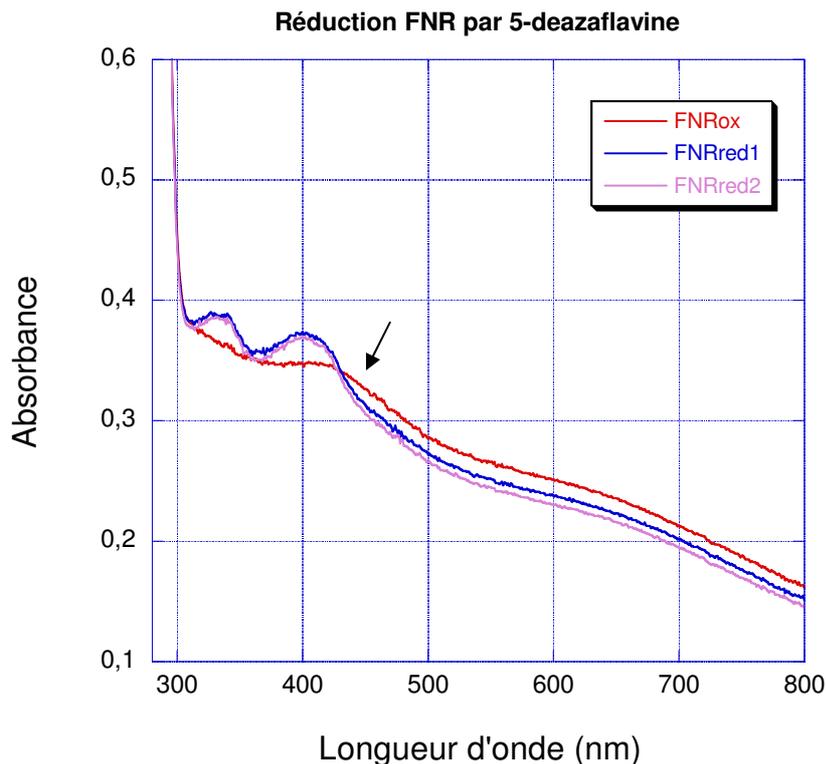


Figure 63: Spectre UV-Visible de la protéine Fnr native après réduction par la 5-déazariboflavine. Spectre de la protéine oxydée (rouge) puis suivi de la réduction après 1 min (bleu), 2 min (rose).

La réaction est très rapide. Compte tenu du potentiel d'oxydoréduction très bas de la 5-déazariboflavine, on peut en déduire que celui du centre [Fe-S] de Fnr est bien inférieur. Le résultat obtenu suggère que le centre [Fe-S] de la protéine Fnr de *B. cereus* est labile en présence d'un réducteur. En effet la réduction s'accompagne d'une diminution de la bande de transfert de charge du centre [Fe-S] à 420 nm. Le changement observé au niveau du spectre d'absorption correspond à un changement de couleur de la solution protéique qui devient plus claire. On conclut soit à un changement conformationnel du centre [Fe-S], soit à une dégradation de celui-ci.

L'apparition des pics correspondant à des absorbances de 350 et 400 nm est liée à la déazaflavine.

Chapitre 2 : Implication du système à deux composants ResDE dans la toxigenèse

1. Introduction à l'étude

L'implication des systèmes à deux composants dans la production de facteurs de virulence en réponse aux changements des conditions d'oxygénation et redox du milieu a été démontrée chez certains pathogènes bactériens. Parmi eux on retrouve *Staphylococcus aureus* (Yarwood *et al.*, 2001), *Streptococcus pneumoniae* (Echenique *et al.*, 2000; Echenique & Trombe, 2001), *Bordetella pertussis* (Bock & Gross, 2002) et *Vibrio cholerae* (Sengupta *et al.*, 2003).

Le système à deux composants ResDE de *B. cereus* présente 85% d'identité avec celui de *B. subtilis*. Ce sont des analogues fonctionnels. La protéine ResE est le senseur kinase membranaire, et la protéine ResD est le régulateur de réponse cytoplasmique. Classé dans la sous-famille de régulateurs de réponse OmpR/PhoB, ResD est composé de deux domaines typiques. Un domaine receveur N-terminal, site de la phosphorylation et pouvant être impliqué, entre autres, dans des interactions protéine-protéine et un domaine effecteur C-terminal contenant un motif hélice-tour-hélice responsable de l'interaction avec l'ADN. Bien que de structure très proches et semblant être activés par phosphorylation, les membres de la sous-famille OmpR/PhoB mettent en jeu des mécanismes de régulation différents.

Une étude a déterminé l'effet du système à deux composants ResDE sur la production des entérotoxines chez *B. cereus*. Dans celle-ci les niveaux d'expression de *hbl* et *nhe* ont été quantifiés chez des mutants $\Delta resDE$ et $\Delta resE$ en comparaison avec la souche sauvage (Duport *et al.*, 2006). Les résultats ont montré que la production des entérotoxines était abolie en absence de ResE, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. En revanche, l'inactivation des deux gènes *resD* et *resE*, n'a pas d'effet sur la production des entérotoxines. Il semble donc que ResE soit indispensable pour la synthèse de Hbl et Nhe et qu'un autre facteur puisse intervenir pour compenser l'absence de ResD. Cet autre facteur pourrait être la protéine Fnr dans la mesure où nous avons déjà identifié son rôle dans la toxigenèse (Résultats, chapitre 1).

Une étude bioinformatique des séquences promotrices des opérons *hbl*, *nhe*, *resDE*, *plcR* et du gène *fnr*, a été réalisée afin de rechercher la présence de séquences potentielles de fixation pour ResD. En combinant les données connues sur le motif de fixation de la protéine ResD de *B. subtilis* (Hartig *et al.*, 2004; Nakano *et al.*, 2000; Zhang & Hulett, 2000) et le logiciel "Virtual footprint ProDoric" (Munch *et al.*, 2005) nous avons mis en évidence la présence de boîtes de fixation potentielles pour ResD en amont de ces séquences régulatrices. L'identification de ces sites de fixation laisse supposer un effet direct de ResD sur son expression, celle des régulateurs pléiotropes *fnr* et *plcR* ainsi que celle des entérotoxines.

Compte tenu de ces données, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes:

- **Le régulateur de réponse ResD a-t-il effectivement une action directe sur la régulation de la toxinogénèse?**
- **Si oui, sous quelle forme agit-il (phosphorylée ou non)?**
- **ResD et Fnr entrent-ils en interaction pour réguler la toxinogénèse?**

Afin de mieux comprendre le mécanisme de régulation mis en jeu et répondre à ces questions, les protéines ResD et ResE ont été surexprimées chez *E. coli* puis purifiées afin de tester leur activité.

2 Stratégie envisagée

2.1 Surexpression des protéines ResD et ResE

L'expression des protéines ResD et ResE dans les vecteurs pET100/101 (Invitrogen) a été optimisée par l'utilisation des cellules d'*E. coli* B121 codonplus (DE3)-RIL (Stratagene).

2.2 Purification des protéines ResD et ResE

La purification de formes taggées en polyhistidine a été réalisée. Nous avons choisi de produire les protéines sous cette forme car cela permet d'effectuer une purification rapide par chromatographie d'affinité et d'en obtenir une quantité suffisante pour produire des anticorps. Ces derniers peuvent être utiles pour la détection de protéines *in vivo* ainsi que pour les purifier sous leur forme native. Notre choix s'est orienté vers un Tag histidine placé en C-terminal pour ResD et en N-terminal de la protéine ResE. En effet, des études réalisées sur le système à deux composants ResDE de *B. subtilis* et présentant une purification des protéines

ResD et ResE, ont montré que placés ainsi, les tags n'interféraient pas dans l'activité des protéines (Zhang & Hulett, 2000). De plus ce choix respecte la position des domaines effecteurs des protéines en faisant en sorte de ne pas placer les tags à leur niveau. En effet pour ResE, le domaine kinase étant situé en C-terminal de la protéine, le tag doit être placé en N-terminal. Pour la protéine ResD, le domaine N-terminal possédant le site de phosphorylation, il est plus judicieux de placer le tag en C-terminal.

Le gène codant pour le régulateur ResD a été cloné dans le vecteur pET101 (Invitrogen). La construction a été réalisée de manière à obtenir une protéine ResD recombinante portant un Tag histidine en C-terminal (ResD_{His}). Le gène codant pour le senseur ResE a été cloné dans le vecteur pET100 (Invitrogen) de manière à obtenir une protéine ResE recombinante portant une étiquette histidine en N-terminal (HisResE). La production de cette protéine était nécessaire dans notre étude afin de réaliser la phosphorylation de ResD. La partie transmembranaire (1 à 198 acides aminés) du senseur ResE a été tronquée afin de faciliter la purification de la protéine. En effet, l'expression hétérologue de protéines membranaires échoue souvent car ces protéines, au cours de leur synthèse, doivent être insérées dans la membrane de la cellule hôte. Cela exige la plupart du temps une purification en condition dénaturante rendant difficile l'étude structurale et fonctionnelle des protéines purifiées. Nous savons que la délétion de la partie N-terminale de la protéine ResE n'affecte pas ses propriétés catalytique (Zhang & Hulett, 2000).

2.3 Caractérisation biochimique et fonctionnelle du système ResDE

Une analyse fonctionnelle, *in vitro*, de la protéine ResE a été réalisée pour tester son activité d'autophosphorylation et de phosphorylation de la protéine ResD.

L'analyse structurale des protéines a été réalisée par gel filtration couplée à la diffusion dynamique de lumière (DLS). Il s'agit ici d'examiner l'état oligomérique des protéines.

Afin de déterminer si ResD est capable de se fixer directement aux boîtes potentielles identifiées dans les régions promotrices des opérons étudiés, des expériences de retard sur gel ont été effectuées. Les régions promotrices des opérons *resDE*, *fnr* et *nhe* et de *plcR* ont été amplifiées à cet effet. La région promotrice de l'opéron *hbl* a été divisée en deux fragments comme pour l'étude de l'activité de Fnr (Résultats, chapitre 1). Ces expériences ont été menées avec les formes phosphorylées et non phosphorylées de ResD de manière à établir

l'effet de la phosphorylation sur l'activité de ResD. Comme Fnr est aussi capable de se fixer aux régions promotrices étudiées, nous avons cherché à montrer si ce dernier pouvait lier l'ADN simultanément à ResD.

Des expériences de pontage covalent ont été réalisées afin de tester l'influence de la présence d'ADN sur l'état de phosphorylation et d'oligomérisation de ResD.

3 Résultats et discussion

3.1 Caractérisation moléculaire et fonctionnelle du système à deux composants ResDE : Article 2

Les résultats portant sur une analyse fonctionnelle de la protéine ResE ont montré qu'elle présentait, *in vitro*, une activité d'autophosphorylation et était aussi capable de phosphoryler la protéine ResD. L'analyse du régulateur de réponse ResD a montré qu'il était, en solution, majoritairement sous la forme d'un monomère et ce quel que soit son état de phosphorylation.

Les expériences de retard sur gel ont montré que le régulateur ResD était capable de se fixer aux régions promotrices des gènes *resDE*, *fnr*, *plcR*, *hbl* et *nhe* indépendamment de son état de phosphorylation. La fixation de ResD sur *plcR*, *hbl* et *nhe* est observée pour une concentration inférieure à celle nécessaire pour une fixation de ResD sur *resDE* et *fnr*. Cela suggère que ResD présente une meilleure affinité pour les régions promotrices des entérotoxines et du régulateur pléiotrope PlcR. Parallèlement à ces résultats, les expériences ont permis de conclure que ResD phosphorylé avait une meilleure affinité pour les régions promotrices de *resDE* et *fnr* tandis que ResD non phosphorylé se comportait de la même manière que ResD phosphorylé sur les régions promotrices de *plcR*, *hbl* et *nhe*. La phosphorylation de ResD n'est donc pas indispensable pour sa fixation sur l'ADN mais semble augmenter son affinité pour certaines régions promotrices de gènes dont il a le contrôle.

Les expériences de pontage covalent ont montré que ni l'état de phosphorylation ni la présence d'ADN, n'influençaient l'état d'oligomérisation de ResD qui se présente, en solution, majoritairement sous la forme d'un monomère.

Comme Fnr est aussi capable de se fixer aux régions promotrices étudiées, nous avons cherché à montrer si ce dernier pouvait lier l'ADN simultanément à ResD. Les résultats de

coopérativité ont montré que ces deux régulateurs étaient non seulement capables de lier l'ADN de manière coopérative mais pouvaient aussi interagir ensemble indépendamment de la présence de leur ADN cible.

Le système à deux composants ResDE est directement impliqué dans la virulence de *B. cereus*. Il module l'expression des gènes codant pour les entérotoxines et s'intègre dans un mécanisme de régulation impliquant le régulateur Fnr.

ResDE-Dependent Regulation of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus*: Evidence for Multiple Modes of Binding for ResD and Interaction with Fnr[†]

Julia Esbelin,^{1,2} Jean Armengaud,³ Assia Zigha,^{1,2}# and Catherine Duport^{1,2*}

Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale; INRA, Avignon F-84000, France¹; INRA, UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale; INRA, Avignon F-84000, France²; and CEA, DSV, IBEB, Lab Biochim System Perturb, Bagnols-sur-Cèze F-30207, France³

Received 9 March 2009/Accepted 17 April 2009

In the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73, the production of major virulence factors hemolysin BL (Hbl) and nonhemolytic enterotoxin (Nhe) is regulated through complex mechanisms. The two-component regulatory system ResDE is involved in the activation of *hbl* and *nhe* transcription. Here, the response regulator ResD and the sensor kinase ResE were overexpressed and purified, and autophosphorylation of ResE and transphosphorylation of ResD by ResE were demonstrated in vitro. ResD is mainly monomeric in solution, regardless of its phosphorylation state. ResD was shown to interact directly with promoter regions (*p*) of the enterotoxin regulator genes *resDE*, *fnr*, and *plcR* and the enterotoxin structural genes *nhe* and *hbl*, but with different affinities. Binding of ResD to *pplcR*, *pnhe*, and *phbl* was not dependent on the ResD phosphorylation status. In contrast, ResD phosphorylation significantly increased interactions between ResD and *presDE* and *pfnr*. Taken together, these results showed that phosphorylation of ResD results in a different target expression pattern. Furthermore, ResD and the redox activator Fnr were found to physically interact and simultaneously bind their target DNAs. We propose that unphosphorylated ResD acts as an antiactivator of Fnr, while phosphorylated ResD acts as a coactivator of Fnr. Finally, our findings represent the first molecular evidence of the role of ResDE as a sentinel system capable of sensing redox changes and coordinating a response that modulates *B. cereus* virulence.

Bacteria are often able to sense and respond to the surrounding environment via two-component systems (TCSs) (18, 22, 24, 34). In a typical TCS, a sensor kinase autophosphorylates in response to an extracellular and/or intracellular signal. Usually, a histidine residue in the sensor kinase receives a phosphoryl group from the low-molecular-weight donor ATP. This phosphoryl group is then transferred to an aspartate residue on a second protein, the response regulator (RR). Phosphorylation of the RR alters its ability to interact with either DNA or DNA and RNA polymerase and thus to activate or repress transcription in response to the signal received by the sensor histidine kinase (HK). Some HKs are bifunctional (19), not only acting as kinases but modulating the activity of their cognate RR proteins by acting as phosphatases that can remove the phosphoryl group from the RR.

ResD is an RR found in the opportunistic human pathogen *Bacillus cereus* (8). It has been proposed to classify ResD in the subfamily of RRs exemplified by OmpR and PhoB proteins from *Escherichia coli* (21). Members of this subfamily typically have two domains: an N-terminal receiver domain that acts as the phosphoryl acceptor and a C-terminal transactivation domain which contains a winged-helix-turn-helix DNA binding

motif (10, 21). The linker connecting the two domains is variable in length (6 to 15 residues). Although all members of the OmpR/PhoB subfamily share a similar three-dimensional structure and appear to be activated by phosphorylation, they use different mechanisms to regulate their DNA-binding domains and modulate transcription (2, 11, 28). *B. cereus* ResD is encoded from the *resDE* operon that also encodes ResE, a prototypical HK. Because of their genomic context, ResD and ResE are thought to act as a TCS in *B. cereus* (8, 9). Previous *in vivo* studies have shown that ResDE is required for *B. cereus* growth under low oxydoreduction (ORP) conditions (8). Such conditions favor production of the PlcR-regulated HBL (hemolysin BL) enterotoxin and Nhe (nonhemolytic enterotoxin) (7), which are recognized as major virulence factors (33). Although it plays an important role in ORP-dependent regulation of enterotoxins, the ResDE system is not essential for enterotoxin production. In contrast, the redox regulator Fnr is essential for toxinogenesis, and its redox-dependent activity was clearly demonstrated (9). Previous data also suggest that both ResDE and Fnr could belong to the same redox regulatory pathway that may function at least partially independently of the pleiotropic virulence gene regulator PlcR (8).

In the study reported here, we purified and functionally characterized ResD and ResE His-tag-labeled variants in order to better understand the complex mechanisms employed by *B. cereus* to regulate enterotoxin gene expression. We demonstrate that both unphosphorylated and phosphorylated ResD directly interact with the promoter regions of the enterotoxin regulator genes *fnr*, *resDE*, and *plcR* (14) and the enterotoxin structural operons *hbl* and *nhe*. ResD is shown to

* Corresponding author. Mailing address: UMR408, INRA, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France. Phone: 33 4 32 72 25 07. Fax: 33 4 32 72 24 92. E-mail: catherine.duport@univ-avignon.fr.

Present address: Metabolic Explorer, Biopôle Clermont-Limagne, 63360 Saint-Beauzire F-63360, France.

† Supplemental material for this article may be found at <http://j.b.asm.org/>.

‡ Published ahead of print on 24 April 2009.

exhibit multiple modes of binding, which may explain differences in the expressions of genes involved in enterotoxin expression. We evidenced a physical interaction between ResD and Fnr, and we propose that they thus potentially coregulate enterotoxin gene expression.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. *Escherichia coli* strain TOP10 (Invitrogen) [F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*Δ*M15* Δ*lacX74* *deoR* *recA1* *araD139* Δ(*ara-leu*)-7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^r) *endA1* *nupG*] was used as the general cloning host, and strain BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) [F⁻ *ompT* *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *dcn*⁺ Tet^r *gal* λ (DE3) *endA* Hte (*argU* *ileY* *leuW* Cm^r)] was used to overexpress *resD* and *resE*. Both *E. coli* strains were routinely grown in Luria broth, with vigorous agitation at 37°C. The *B. cereus* F4430/73 wild type (31) and *resE* and *resDE* mutants (8) were grown under microaerobiosis and N₂-generated anaerobiosis, as previously described (8).

General molecular methods. Restriction endonucleases and T4 DNA ligase were obtained from Promega. Genomic DNA of *B. cereus* was purified as described in reference 16. Plasmid DNA was purified using anion-exchange columns (Promega). PCR amplification of DNA was carried out with *Taq* polymerase (Roche Molecular Biochemicals).

Cloning and overexpression of *resD* and *resE*. The coding sequence for *B. cereus resD* was PCR amplified from *B. cereus* F4430/73 genomic DNA using the forward and reverse primers PET101F (5'-CACCATGGAAAATGAATCAAG AATTTTAATTGTAG-3') and PET101R (5'-GTCGTTCCACAACCTCAAATT TGTAACCTAC-3'). The nucleotide sequence of *resE* coding for the cytoplasmic domain (the amino acid residues 199 to 565) of ResE (38) was amplified from the F4430/73 genome using the forward and reverse primers PET100F (5'-CACCA TGACAGCACCGCTTCGTAATAATGCGTGAG-3') and PET100R (5'-CTAA ATTATACGATTCGGTAAATATACAG-3'). Both amplicons were introduced as blunt-end PCR products into pET101/D-TOPO and pET100/D-TOPO (Invitrogen), yielding pET101*resD* and pET100*resE*, respectively. The integrity of both inserted sequences was confirmed by DNA sequencing. The resulting constructs were transformed into *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) for expression. *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (pET101*resD*) and *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (pET100*resE*) were grown in a 1-liter Luria broth medium supplemented with 100 μg ml⁻¹ ampicillin, at 37°C. When the optical density at 600 nm reached ~1.0, expression was induced by adding 0.2 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), and cells were grown for another 16 h at 37°C before being harvested by centrifugation (10,000 × *g* for 15 min) and directly used for protein purification.

Purification of the ResD and ResE proteins. *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (pET101*resD*) cells were resuspended in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 300 mM NaCl (buffer A). *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (pET100*resE*) cells were resuspended in 50 mM sodium phosphate; 6 M guanidine-HCl; 300 mM NaCl, pH 7.0 (denaturing buffer C). Cells were incubated with 0.5 mg/ml lysozyme for 30 min under gentle agitation and sonicated for 3 min at 80% of maximum amplitude using a Vibra cell ultrasonicator (Fisher Bioblock Scientific). Cell debris was removed by centrifugation at 12,000 × *g* for 20 min. Purification of C-terminal His-tagged ResD and N-terminal His-tagged ResEΔ(1-198) was carried out using a 2-ml Co²⁺ immobilized metal affinity chromatography column (Clontech) equilibrated with buffer A and buffer C, respectively. The columns were washed with 5 ml of buffer A, and the recombinant proteins were eluted with 5 ml of buffer B (50 mM sodium phosphate [pH 7.0], 300 mM NaCl, and 150 mM imidazole). As reported above, the N-terminal His-tagged ResEΔ(1-198) was purified in denaturing conditions and allowed to renature on the column during washing and elution. To verify that the purified protein represented intact, unaggregated protein, the elution fraction was analyzed using blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) (see Fig. S1C in the supplemental material).

Protein biochemical analyses. Protein concentrations were determined by bicinchoninic acid assay (Interchim), with bovine serum albumin (BSA) used as standard. Overproductions of ResD and ResEΔ(1-198) in induced cultures and their purification were monitored by sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE (23). Proteins were stained with Coomassie brilliant blue. ResD oligomeric states were determined using BN-PAGE in which the anionic dye Coomassie blue G-250 was added to the sample buffer to impose a net negative charge upon the protein (37). The quaternary structure of purified ResD was measured in solution by dynamic light scattering (DLS), as previously described (9). Briefly, the ResD sample was applied onto a 24-ml Superdex 200 column (HR10/30) equilibrated and run at a flow rate of 0.5 ml/min with 50 mM Tris-HCl (pH 8.3) containing 120

mM NaCl and 0.05% NaN₃ filtered at 0.1 μm. The elution profile was monitored with a miniDawn Tristar multiangle laser static light scattering detector (three angles, 45°, 90°, and 135°) coupled to a DynaPro Titan light scattering instrument (Wyatt Technology) placed at 90° and an Optilab rEX differential refractometer (Wyatt Technology).

Phosphorylation assays. Purified ResE (6 μM) was incubated in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 4 mM dithiothreitol, and 4 mM MgCl₂ supplemented with 5 μCi of [γ-³²P]ATP (~6,000 Ci/mmol; Amersham Biosciences). The ResE autophosphorylation reaction was carried out at 37°C until equilibrium (15 min). *trans*-phosphorylation of ResD (9.6 μM) by phosphorylated ResE (6 μM) was performed at 37°C, according to the method used by Zhang and Hulett (38). The reactions were terminated by adding an equal volume of 6× SDS sample buffer. The resulting products were resolved by SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels (23). Labeled proteins were detected and analyzed using a PhosphorImager (Molecular Dynamics). Purified ResD (32 μM) was subjected to phosphorylation by incubation with 32 mM acetyl phosphate (AcP, Sigma) as described in references 25 and 26. Phosphorylation of ResD was evaluated using two-dimensional gel electrophoresis (29), as well as SDS-PAGE and Pro-Q diamond dye staining (Interchim) (32). Tandem mass spectrometry identification of ResD after trypsin proteolysis was carried out with a LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer (Thermo) operated as described in reference 6. Tandem mass spectrometry spectra were assigned to the ResD sequence with the MASCOT search engine (see Fig. S2C in the supplemental material).

Protein cross-linking. Purified ResD (5 μM) pretreated in the absence or presence of AcP was incubated with the protein cross-linking agents *N*-hydroxysulfosuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) as previously described (9). The resulting products were detected by Western blotting using an anti-His antibody (Roche).

Western blot analysis. Samples were resolved by SDS-PAGE and electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Bioscience) for Western blotting according to standard procedures (Bio-Rad). Membranes were probed with either anti-His antibodies or with a 1:1,000 dilution of polyclonal antibodies raised against ResD (anti-ResD) generated in-house as follows: rabbits were immunized with a total of 2 mg of purified ResD administered in four equal doses over a 90-day period and bled on day 20. The blotted membranes were developed with a 1:2,000 dilution of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Sigma) and an enhanced chemiluminescence substrate (Immobilon Western; Millipore). Quantitative analysis of the signals was carried out using ImageJ (version 1.3, NIH).

Far-Western assays. Biotinylated ResD was prepared with a biotin labeling kit-NH₂ (Dojindo Laboratories). Purified six-His-tagged proteins were spotted onto two nitrocellulose membranes (Amersham Bioscience). One membrane was stained with Ponceau S solution (Sigma) to control the amount of proteins used for the protein-protein interaction studies. The other membrane was blocked with dilution buffer (Profound far-Western biotinylated protein-protein interaction kit; Pierce) for 1 h at room temperature and washed with phosphate buffer saline containing 0.05% Tween 20 (T-PBS). The membrane was then incubated for 1 h with 1 μg/ml biotinylated ResD. After the membrane was washed with phosphate buffer saline containing 0.05% Tween 20, it was incubated with anti-streptavidin-horseradish peroxidase (HRP; 0.1 mg/ml) and ResD was visualized by chemiluminescence (Pierce). Purified ResE was blotted as a positive control. BSA and blotting buffer alone were used as negative controls.

EMSA. Fragments containing the promoter regions of *fnr*, *resDE*, *plcR*, *hbl*, and *nhe* (see Fig. S3 in the supplemental material) were amplified and end labeled as described previously (9). Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed by incubating the labeled fragments (1,000 cpm) with the specified amount of purified ResD in the presence or absence of ResE (6 μM) at 37°C for 30 min in 20 μl binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; 10% glycerol; 4 mM dithiothreitol; and 4 mM MgCl₂) containing 200 μM ATP. The samples were loaded onto a 6% native polyacrylamide gel run with Tris-borate-EDTA buffer at 4°C and 200 V. Gels were dried and analyzed using a Molecular Dynamics PhosphorImager.

RESULTS

Autophosphorylation of ResE and *trans*-phosphorylation of ResD by ResE. To demonstrate the phosphorylation activities of *B. cereus* ResDE, the cytoplasmic domain of ResE [ResEΔ(1-198)] (38) and the full-length wild-type ResD were expressed as six-histidine-tagged fusion proteins in *E. coli* and

Downloaded from jib.asm.org at INRA on June 22, 2009

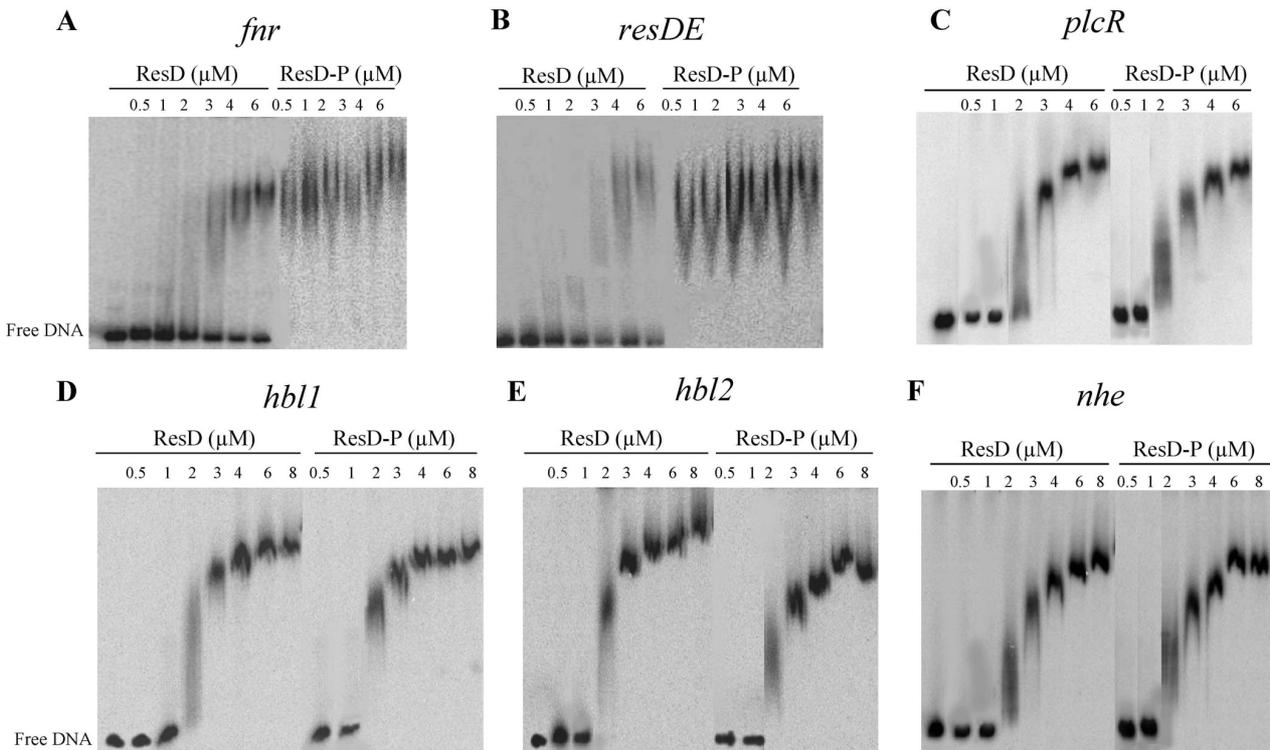


FIG. 1. Binding of ResD and ResD~P to the regulatory regions of the *fnr*, *resDE*, *plcR*, *hbl1*, *hbl2*, and *nhe* genes determined by EMSA. DNA (1,000 cpm) corresponding to *fnr* (A), *resDE* (B), *plcR* (C), *hbl1* (D), *hbl2* (E), and *nhe* (F) was incubated with increasing concentrations of ResD and ResD~P obtained after incubation with purified ResE and ATP, as indicated. The results presented are representative examples of experiments performed in triplicate. The concentrations of ResD and ResD~P used in each reaction are, from left to right, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 and eventually 8 μM. The first lane of each panel corresponds to the labeled DNA fragment alone.

purified to homogeneity (see Fig. S1A and S1B in the supplemental material). Given that in vitro autophosphorylation of HK signaling domains is a common property of TCS histidine kinases that occurs in the absence of any signaling input, ResEΔ(1–198) was subjected to autophosphorylation in the presence of [γ - 32 P]ATP (see Fig. S1D in the supplemental material). Peak autophosphorylation was observed within 15 min (data not shown). Unlike ResEΔ(1–198), ResD was not phosphorylated by ATP. Adding ResD to phosphorylated ResEΔ(1–198) resulted in dephosphorylation of ResEΔ(1–198) and transphosphorylation of ResD (see Fig. S1D in the supplemental material). A sequence alignment of ResE and ResD from *B. cereus* with their orthologs from *Bacillus subtilis*, *E. coli*, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium showed strong sequence conservation in the phosphorylatable regions of both proteins (data not shown). Consequently, autophosphorylation of ResE may occur at histidine 374 and phosphorylation of ResD should occur on aspartate 55.

DNA-binding properties of ResD. Figure 1 shows the EMSAs that were performed with both ResD and phosphorylated ResD (ResD~P) (generated after incubation with ResE and ATP) and DNA fragments (1,000 cpm) containing the promoter regions of *resDE*, *fnr*, *plcR*, *hbl1*, and *nhe* (*presDE*, *pfnr*, *pplcR*, *phbl*, and *pnhe*). In view of its size (1,157 bp), the promoter region of *hbl* was divided into two overlapping fragments of 636 bp (*hbl1*) and 610 bp (*hbl2*), as defined in Fig. S3

in the supplemental material. Both ResD and ResD~P caused mobility shifts in the six tested DNA fragments. The specificity of the binding was evidenced by (i) the disappearance of complexes in competition assays using 50-fold excess of homologous unlabeled promoter regions and the absence of any competition when unlabeled heterologous DNA was used, (ii) the absence of ResD and ResD~P binding above 8 μM with the negative control derived from the *ssu* promoter region (20), and (iii) the inability of ResE to interact with any of the six DNA fragments (see Fig. S4 in the supplemental material). Interestingly, the concentrations of ResD that were required for a mobility shift to occur with *pplcR*, *phbl*, and *pnhe* were lower than those required for a shift with *presDE* and *pfnr*, which suggests that ResD had greater affinity for *pplcR*, *phbl*, and *pnhe*. In addition, the concentration of ResD~P that was needed to form complexes with *pfnr* and *presDE* was lower than the concentration of unphosphorylated ResD. In contrast, ResD~P behaved like unphosphorylated ResD when binding to *pplcR*, *phbl*, and *pnhe*. Taken together, these data indicate that phosphorylation of ResD is not essential for DNA binding and that ResD phosphorylation affects the DNA binding affinity of some but not all target promoters. Moreover, whatever the promoter used for these assays, we observed that the gel shift not only required a high ResD or ResD~P concentration but also exhibited a smear instead of a discrete band. This kind of smearing is usually observed when a DNA-protein complex

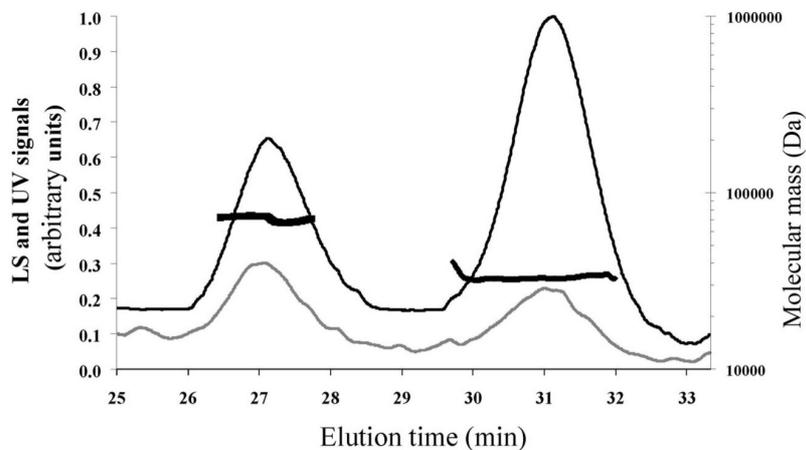


FIG. 2. Gel filtration and DLS chromatograms of purified ResD. ResD protein was desalted on a G25 gel filtration unit, concentrated on an Amicon 5,000-Da-cut-off Ultra device (Amicon), and injected ($\sim 80 \mu\text{g}$ in $70 \mu\text{l}$) into a Superdex 200 column (HR 10/30) with 50 mM Tris-HCl (pH 8.3) and with 120 mM NaCl as the eluent, at a flow rate of 0.5 ml/min. The gray and black lines correspond to the light scattering (LS) signal and the UV signal recorded at 280 nm, respectively (y axis). LS signal noise was removed by moving average smoothing. The molecular mass estimates of the two major peaks are indicated by thick black broken lines (y axis).

tends to dissociate during its migration during electrophoresis. These data suggest the existence of a weak association between ResD and its nucleic targets. Hence, the involvement of the regulator acting together with ResD is a possible means of stabilizing this interaction.

Phosphorylation or DNA binding does not influence the oligomerization state of ResD. The oligomerization state of ResD in solution was first analyzed by DLS (9). Figure 2 shows the elution profiles obtained after resolution of the ResD entities on Superdex 200 gel filtration. The molecular mass estimates were derived from the light scattering signal measured at different angles. ResD was resolved into two peaks eluting at 31.0 and 27.4 min, as detected on the UV and DLS traces (Fig. 2). The distribution of molar masses across these two peaks was constant, indicating a monodisperse distribution for each peak with molecular masses of 28 and 67 kDa ($\pm 10\%$), respectively. These values indicate that ResD exists as a mixture of monomer and dimer in solution. Considering the relative mass ratio that can be estimated from the UV trace ($2/3$ and $1/3$, respectively), the predominant form was the monomer. Analysis of purified ResD in BN-PAGE (Fig. 3A, lane 1) showed a two-band pattern, revealing the presence of a mixed population of monomeric and dimeric forms. Like in the DLS experiment (Fig. 2), the predominant form is the monomer. To test the effect of phosphorylation on the ResD oligomerization state, purified ResD was phosphorylated using AcP (see Fig. S2 in the supplemental material). Figure 4A shows that ResD~P (lane 2) exhibits the same band pattern as unphosphorylated ResD (lane 1). This indicates that phosphorylation did not promote oligomerization of ResD in solution and that both ResD and ResD~P are mainly monomeric in solution. We then quantified and compared cross-linking efficiency of ResD and ResD~P upon NHS/EDC chemical cross-linking from two independent experiments. Figure 3B shows that under the conditions examined, the two ResD forms are equally effective in forming stable cross-linked oligomers ($36\% \pm 3\%$). However, there was a slight but noticeable reduction in trimer

formation ($9\% \pm 1\%$ instead of $15\% \pm 1\%$) and a concomitant increase in dimer formation ($27\% \pm 2\%$ instead of $21\% \pm 2\%$) in the presence of ResD~P. This suggests that there is a phosphorylation-induced conformational change that could affect transiently the oligomerization state of ResD. We concluded that phosphorylation does not modify the equilibrium between monomer and dimer.

ResD and Fnr interaction when binding their target promoters. Like ResD, the redox regulator Fnr binds to *presDE*,

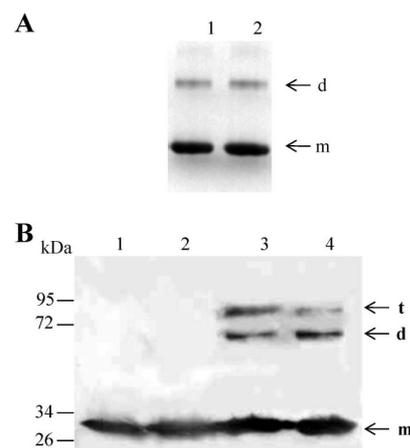


FIG. 3. Effects of phosphorylation on the oligomeric state of ResD. (A) BN-PAGE analysis of ResD and ResD~P. ResD ($2 \mu\text{g}$) was subjected to phosphorylation by acetyl phosphate as described in Materials and Methods. Lane 1, ResD; lane 2, ResD~P. (B) SDS-PAGE profile of ResD cross-linked with NHS/EDC. Cross-linking was performed as described in Materials and Methods. Proteins were visualized by immunoblotting with anti-His antibodies. Lane 1, untreated ResD; lane 2, phosphorylated ResD; lane 3, cross-linked ResD; lane 4, cross-linked ResD~P (generated with acetyl phosphate). The arrows indicate monomers (m), dimers (d), and trimers (t). The sizes of the molecular mass markers (in thousands) are indicated on the left.

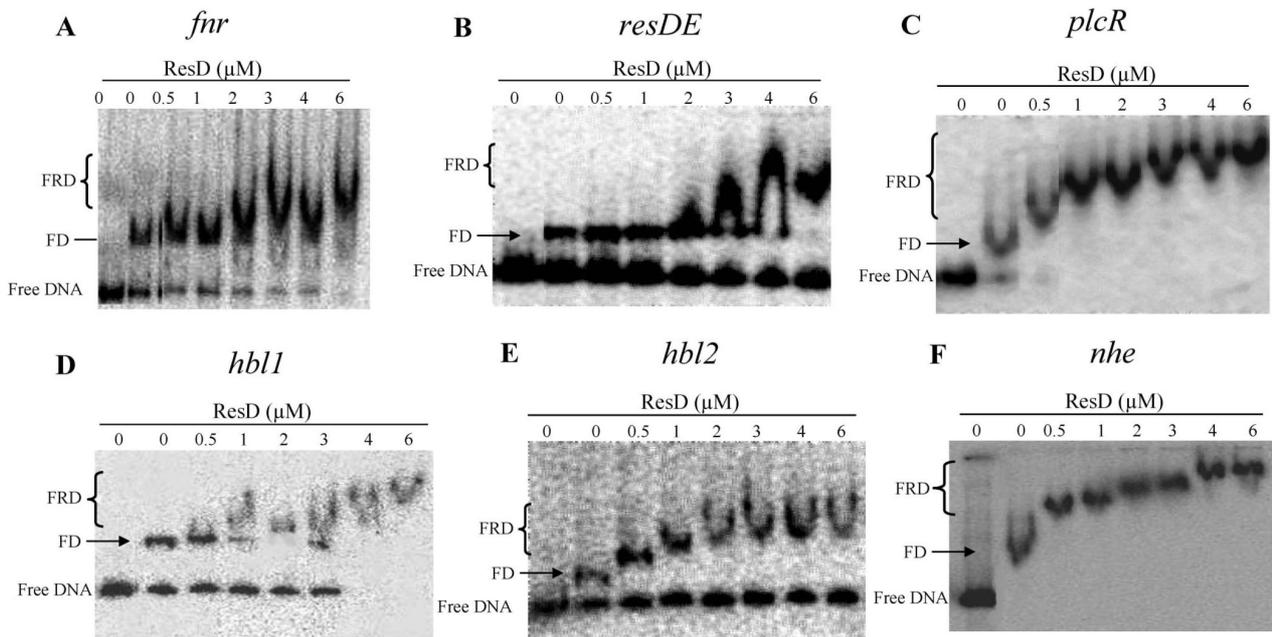


FIG. 4. Cooperative binding between ResD and Fnr on the regulatory regions of the *fnr*, *resDE*, *plcR*, *hbl1*, *hbl2*, and *nhe* genes. Cooperativity between ResD and Fnr was analyzed by EMSA. Increasing amounts of ResD were incubated with labeled DNA fragments (1,000 cpm) corresponding to the *fnr* (A), *resDE* (B), *plcR* (C), *hbl1* (D), *hbl2* (E), and *nhe* (F) regulatory regions in the presence of 0.6 μ M of Fnr. FD indicates the Fnr-DNA complex, and FRD indicates the Fnr-ResD-DNA ternary complex.

pfnr, *pplcR*, *phbl*, and *pnhe* (9). To determine whether ResD and Fnr can bind simultaneously to these DNAs, we performed a competitive EMSA. Figure 4 shows the results obtained after incubating purified Fnr and ResD with *presDE*, *pfnr*, *pplcR*, *phbl*, or *pnhe*. At a constant Fnr concentration (0.6 μ M), increasing the ResD concentration resulted in the appearance of a high-molecular-mass complex, whose mobility corresponds to an Fnr-ResD-DNA ternary complex and the disappearance of the complex containing only Fnr and DNA. This was detected with whichever of the six promoters tested. Moreover, this ternary complex is formed at a lower ResD concentration than that of the ResD-DNA binary complex at *pnhe*, *phbl*, and *pplcR* but not at *pfnr* and *presDE* (Fig. 1). The same results were obtained using phosphorylated ResD (generated after incubation with ResE and ATP). We also evidenced that for a constant amount of ResD or ResD~P, titration by increasing amounts of Fnr resulted in the formation of the Fnr-ResD-DNA complex (data not shown). To determine whether the formation of the Fnr-ResD-DNA complex may involve a direct protein-protein interaction, far-Western analysis was conducted with purified monomeric Fnr adsorbed onto a dot blot. Figure 5 shows the nitrocellulose membrane that was incubated with biotinylated ResD and then revealed after incubation with HRP-conjugated streptavidin. The direct application of proteins to nitrocellulose made it possible to test interactions under native conditions, i.e., without denaturation of the proteins. The data indicate that ResD binds directly to Fnr with a lower affinity than with itself but with higher affinity than with its cognate partner, ResE. In the control experiment, BSA did not show any binding to ResD. To examine whether phosphorylation influences protein-protein interactions, equal mo-

lar amounts of ResD~P generated with AcP (see Fig. S2 in the supplemental material) were tested by following the same protocol. Results with ResD~P were essentially identical to those obtained with ResD (data not shown), suggesting that the interaction between Fnr and ResD was not affected by the phosphorylation status of ResD. In conclusion, we evidenced a direct and specific interaction between the ResD and Fnr proteins, independently of the presence of their nucleic targets.

Endogenous ResD protein levels in the wild type and *resE* and *resDE* mutants. Although the EMSA results described above indicated that ResE-dependent phosphorylation of ResD did not affect its binding to *phbl* and *pnhe*, our previous study showed that *hbl* and *nhe* transcription was dramatically downregulated in ResE-deficient cells (*resE* mutant cells) (37).

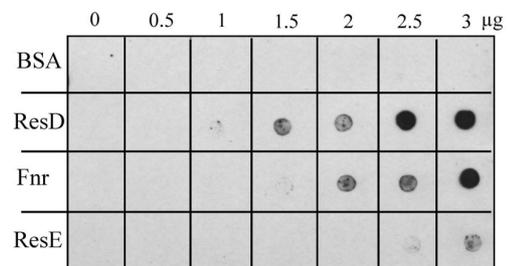


FIG. 5. Far-Western analysis of ResD-Fnr interaction. Increased amounts of purified ResD, Fnr, and ResE were spotted onto nitrocellulose membranes and incubated with biotinylated ResD, as indicated in Materials and Methods. ResD binding to proteins was detected using the streptavidin-HRP complex and visualized by chemiluminescence, with BSA used as negative control.

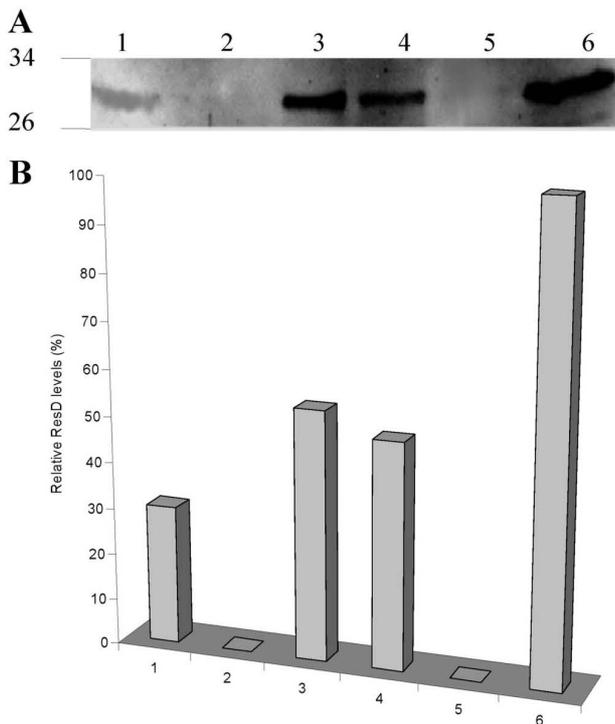


FIG. 6. Quantification of ResD levels in *B. cereus* cells by densitometric analysis of the ResD bands on the Western blot. (A) Cytoplasmic proteins (5 μ g) of the *B. cereus* F4430/73 *resE* mutant, *resDE* mutant, and wild type grown under microaerobiosis (lanes 1, 2, and 3, respectively) and under anaerobiosis (lanes 4, 5, and 6, respectively) were separated using SDS-PAGE and probed with anti-ResD polyclonal antibodies. (B) Quantitative analysis of the ResD bands was carried out using Image J (version 1.3, NIH). Relative levels can be compared to the 100% value that was arbitrarily fixed for anaerobically grown wild-type cells. High reproducibility was reached (<10%).

To determine whether the defective *hbl* and *nhe* transcription was due to the lack of the kinase activity of ResE and not to a strongly reduced level of the ResD protein, ResD protein levels were measured in *resE* mutant cells by Western blotting using anti-ResD polyclonal antibodies. A protein band corresponding to the molecular mass of ResD (~30 kDa) was detected in both microaerobically and anaerobically grown *resE* mutant and wild-type cells (Fig. 6A). This band was absent when protein extracts from *resDE* mutant cells (lacking both ResE and ResD) were studied, confirming that it was indeed ResD. Densitometric analysis of the ResD bands on two independent Western blots (Fig. 6B) revealed the relative intensities of the ResD band from anaerobically grown wild-type cells (100%) and *resE* mutant cells ($49\% \pm 5\%$) and from microaerobically grown wild-type cells ($54\% \pm 5\%$) and *resE* mutant cells ($30\% \pm 3\%$). These results indicated that (i) anaerobically grown cells contained higher levels of ResD than microaerobically grown cells, (ii) a strain lacking ResE synthesized only half as much ResD as the wild-type strain when grown in the same conditions, and (iii) anaerobically grown *resE* mutant cells exhibit levels of ResD similar to those of microaerobically grown wild-type cells. Our previous data showed that microaerobically and anaerobically grown wild-

type cells exhibited the same *nhe* and *hbl* mRNA levels and that these levels were approximately 50-fold reduced in the *resE* background under both conditions (8). Taken together, these results indicate that the level of enterotoxin gene transcription is not correlated with the intracellular ResD level. We thus conclude that ResD-dependent *hbl* and *nhe* transcription is more sensitive to the ResE-dependent ResD phosphorylation status than to the ResD level.

DISCUSSION

Although the complete set of TCSs in different members of the *B. cereus* group has been identified and confirmed as playing important roles in gene regulation (3–5), only the biological role of ResDE has thus far been studied (8, 35, 36). The molecular mechanisms responsible for signal transduction remained uncharacterized. The present study reports the biochemical properties of *B. cereus* ResDE and its link with virulence gene expression.

The signaling-transduction process is mediated by two phosphorylation events. In the first phosphorylation event, the HK is autophosphorylated at the conserved His residue in the so-called activation loop. Our study shows that *B. cereus* ResE is able to autophosphorylate in vitro in the presence of ATP. Although in vitro experiments are carried out with the cytosolic portion of ResE lacking the transmembrane region, data reported from *B. subtilis* have shown that this fragment has enzymatic activity similar to the full-length HK (13). In the second phosphorylation event, the phosphoryl group is transferred from the HK to the cognate RR, in a response regulator-catalyzed reaction. Our experiments show that the ResD-dependent phosphoryl group transfer occurs in vitro. These biochemical data suggest that the ResDE system is able to transduce cellular stress signals in vivo, in agreement with previous in vivo characterization studies (8). The genomic context and previous in vivo studies suggest that ResE may be the only biologically relevant kinase able to phosphorylate ResD. However, we cannot exclude the possibility that phosphorylation by acetyl phosphate could play an important role in modulating ResD activity in vivo, linking its phosphorylation state to the metabolic status of *B. cereus* (15).

Since putative ResD binding consensus motifs could be predicted in the enterotoxin gene promoter regions (12) (see Fig. S3 in the supplemental material), we expected to see ResD binding to these fragments. However, the ResD binding pattern within the promoter regions of the *plcR*-regulated genes *nhe*, *hbl*, and *plcR* was significantly different from that of *resDE* and *fur* promoters. First, the DNA binding affinity of unphosphorylated ResD was higher for *pnhe*, *phbl*, and *pplcR* than for *presDE* and *pfur*. Second, phosphorylation of ResD enhanced its ability to bind to *presDE* and *pfur* but not to *pnhe*, *phbl*, and *pplcR*. Third, a Fnr-ResD-DNA ternary complex was formed at a lower concentration than that of the ResD-DNA binary complex at *pnhe*, *phbl*, and *pplcR* but not at *presDE* and *pfur*. The existence of different patterns of recognition by ResD and ResD~P suggests that differences may exist in the ResD-binding affinities, depending on the different ResD binding sites in the studied promoters. We planned new specific studies to understand how differences in promoter organizations may affect ResD binding.

Previous data have established the following points. First, the enterotoxin gene promoters (*pnhe* and *phbl*) require Fnr for activation (39). Such activation probably involves direct protein-protein contact between Fnr and RNA polymerase (9). Second, ResD was also required for *pnhe* and *phbl* activation but only when phosphorylated by ResE. Third, Fnr cannot activate *pnhe* and *phbl* without ResD~P but can activate *pnhe* and *phbl* without ResD (8). The experiments presented here showed that (i) phosphorylation of ResD affects neither its oligomeric state nor its ability to interact with *phbl* and *pnhe*, (ii) ResD and ResD~P can bind to *pnhe* and *phbl* in concert with Fnr, and (iii) both ResD and ResD~P physically interact with Fnr. Taken together, these results suggest that ResD~P could interact with Fnr to form transcriptionally active ResD~P-Fnr-*pnhe-phbl* complexes and ResD could interact with Fnr to form transcriptionally inactive ResD-Fnr-*pnhe-phbl* complexes. Therefore, ResD~P may act as an Fnr coactivator and ResD as an Fnr antiactivator. However, this finding needs to be confirmed by analyzing more particularly the ResD-Fnr interaction using the holoform of Fnr instead of the apoform, as was the case in this study. The enterotoxin gene expression level depends on environmental redox conditions. In particular, low ORP conditions favored higher levels of *hbl* and *nhe* expression than high ORP conditions (8). Low ORP conditions could thus favor the formation of high levels of the ResD~P-Fnr-*pnhe-phbl* activation complex, ensuring high levels of enterotoxin gene expression. This possibility is sustained by previous and present results showing that ResD and ResE synthesis, together with Fnr synthesis, is enhanced in response to low ORP conditions (8).

Although *plcR* belongs to the same regulon as *nhe* and *hbl* (the *plcR* regulon) (14), *plcR* activation did not require ResD phosphorylation (8). This indicates that ResD phosphorylation is not a prerequisite for the activation of *pplcR* (unlike *pnhe* and *phbl*) in response to environmental stress. PlcR is known to autoactivate and activate enterotoxin gene expression by binding specific sequences in *pplcR*, *pnhe*, and *phbl* (1). The possibility that PlcR might form with Fnr, ResD, and DNA a quaternary complex is thus not excluded. In conclusion, the mechanism of ResD-dependent regulation of enterotoxin gene expression in response to redox conditions is undoubtedly complex, and further studies are required. However, deciphering the complexities of this regulation under low ORP conditions, such as those encountered in the human small intestine (17, 27, 30), represents the most critical step toward understanding the mechanisms employed by *B. cereus* to unleash optimal virulence gene expression. Finally, this study is one of the first examples of in vitro TCS reconstitution to report the characterization of important signaling and DNA binding events for *B. cereus* virulence.

ACKNOWLEDGMENTS

J.E. is supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement supérieur.

We thank our colleagues from CEA-Marcoule: Bernard Fernandez for help with the DLS experiments, Philippe Guérin for performing two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry experiments, and Valérie Tanchou for her kind help with the production of anti-ResD polyclonal antibodies.

REFERENCES

1. 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*. *Mol. Microbiol.* **32**:1043-1053.
2. Allen, M. P., K. B. Zumbrennen, and W. R. McCleary. 2001. Genetic evidence that the $\alpha 5$ helix of the receiver domain of PhoB is involved in interdomain interactions. *J. Bacteriol.* **183**:2204-2211.
3. Brillard, J., K. Susanna, C. Michaud, C. Dargaignaratz, M. Gohar, C. Nielsen-Leroux, N. Ramarao, A. B. Kolsto, C. Nguyen-The, D. Lereclus, and V. Broussolle. 2008. The YvITU two-component system is involved in *plcR* expression in *Bacillus cereus*. *BMC Microbiol.* **8**:183.
4. de Been, M., M. J. Bart, T. Abee, R. J. Siezen, and C. Francke. 2008. The identification of response regulator-specific binding sites reveals new roles of two-component systems in *Bacillus cereus* and closely related low-GC Gram-positives. *Environ. Microbiol.* **10**:2796-2809.
5. de Been, M., C. Francke, R. Moezelaar, T. Abee, and R. J. Siezen. 2006. Comparative analysis of two-component signal transduction systems of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis*. *Microbiology* **152**:3035-3048.
6. de Groot, A., R. Dulerio, P. Ortet, L. Blanchard, P. Guérin, B. Fernandez, B. Vacherie, C. Dossat, E. Jolivet, P. Signier, M. Chandler, M. Barakat, A. Dedieu, V. Barbe, T. Heulin, S. Sommer, W. Achouak, and J. Arnegand. 2009. Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. *PLoS Genet.* **5**:e1000434.
7. Duport, C., S. Thomassin, G. Bourel, and P. Schmitt. 2004. Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Arch. Microbiol.* **182**:90-95.
8. Duport, C., A. Zigha, E. Rosenfeld, and P. Schmitt. 2006. Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J. Bacteriol.* **188**:6640-6651.
9. Esbelin, J., Y. Jouanneau, J. Armengaud, and C. Duport. 2008. ApoFnr binds as a monomer to promoters regulating the expression of enterotoxin genes of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.* **190**:4242-4251.
10. Galperin, M. Y. 2006. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J. Bacteriol.* **188**:4169-4182.
11. Gao, R., Y. Tao, and A. M. Stock. 2008. System-level mapping of *Escherichia coli* response regulator dimerization with FRET hybrids. *Mol. Microbiol.* **69**:1358-1372.
12. Geng, H., Y. Zhu, K. Mullen, C. S. Zuber, and M. M. Nakano. 2007. Characterization of ResDE-dependent *fnr* transcription in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **189**:1745-1755.
13. Geng, H., P. Zuber, and M. M. Nakano. 2007. Regulation of respiratory genes by ResD-ResE signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol.* **422**:448-464.
14. Gohar, M., K. Faegri, S. Perchat, S. Ravnum, O. A. Okstad, M. Gominet, A. B. Kolsto, and D. Lereclus. 2008. The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* **3**:e2793.
15. Guerri, I., S. Bay, S. Dubrac, C. Cyncynatus, and T. Msadek. 2008. The Pta-AckA pathway controlling acetyl phosphate levels and the phosphorylation state of the DegU orphan response regulator both play a role in regulating *Listeria monocytogenes* motility and chemotaxis. *Mol. Microbiol.* **70**:1342-1357.
16. Guinebretiere, M. H., and C. Nguyen-The. 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**:207-215.
17. Guyton, A. C. 1977. Basic human physiology: normal function and mechanisms of disease, 2nd ed. Elsevier Health Sciences, Philadelphia, PA.
18. Hoch, J. A. 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:165-170.
19. Igoshin, O. A., R. Alves, and M. A. Savageau. 2008. Hysteretic and graded responses in bacterial two-component signal transduction. *Mol. Microbiol.* **68**:1196-1215.
20. Ivanova, N., A. Sorokin, I. Anderson, N. Galleron, B. Candalon, V. Kapatral, A. Bhattacharyya, G. Reznik, N. Mikhailova, A. Lapidus, L. Chu, M. Mazur, E. Goltzman, N. Larsen, M. D'Souza, T. Walunas, Y. Grechkin, G. Pusch, R. Haselkorn, M. Fonstein, S. D. Ehrlich, R. Overbeek, and N. Kyrpides. 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**:87-91.
21. Kenney, L. J. 2002. Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:135-141.
22. Khorchid, A., and M. Ikura. 2006. Bacterial histidine kinase as signal sensor and transducer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **38**:307-312.
23. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
24. Mascher, T., J. D. Hellmann, and G. Unden. 2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:910-938.
25. McCleary, W. R., and J. B. Stock. 1994. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. *J. Biol. Chem.* **269**:31567-31572.
26. Miller, A. A., N. C. Engleberg, and V. J. DiRita. 2001. Repression of viru-

- lence genes by phosphorylation-dependent oligomerization of CsrR at target promoters in *S. pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **40**:976–990.
27. Moriarty-Craige, S. E., and D. P. Jones. 2004. Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **24**:481–509.
 28. Rhee, J. E., W. Sheng, L. K. Morgan, R. Nolet, X. Liao, and L. J. Kenney. 2008. Amino acids important for DNA recognition by the response regulator OmpR. *J. Biol. Chem.* **283**:8664–8677.
 29. Ruiz, D., P. Salinas, M. L. Lopez-Redondo, M. L. Cayuela, A. Marina, and A. Contreras. 2008. Phosphorylation-independent activation of the atypical response regulator NblR. *Microbiology* **154**:3002–3015.
 30. Skinner, F. A., and J. G. Carr. 1995. *The normal microbial flora of man*. Academic, London, United Kingdom.
 31. Spira, W. M., and J. M. Goepfert. 1975. Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Can. J. Microbiol.* **21**:1236–1246.
 32. Steinberg, T. H., B. J. Agnew, K. R. Gee, W. Y. Leung, T. Goodman, B. Schulenberg, J. Hendrickson, J. M. Beechem, R. P. Haugland, and W. F. Patton. 2003. Global quantitative phosphoprotein analysis using multiplexed proteomics technology. *Proteomics* **3**:1128–1144.
 33. Stenfors Arnesen, L. P., A. Fagerlund, and P. E. Granum. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**:579–606.
 34. Stock, J., and S. Da Re. 2000. Signal transduction: response regulators on and off. *Curr. Biol.* **10**:420–424.
 35. Vetter, S. M., and P. M. Schlievert. 2007. The two-component system *Bacillus* respiratory response A and B (BrrA-BrrB) is a virulence factor regulator in *Bacillus anthracis*. *Biochemistry* **46**:7343–7352.
 36. Wilson, A. C., J. A. Hoch, and M. Perego. 2008. Virulence gene expression is independent of ResDE-regulated respiration control in *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **190**:5522–5525.
 37. Wittig, I., H. P. Braun, and H. Schagger. 2006. Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* **1**:418–428.
 38. Zhang, X., and F. M. Hulett. 2000. ResD signal transduction regulator of aerobic respiration in *Bacillus subtilis*: ctaA promoter regulation. *Mol. Microbiol.* **37**:1208–1219.
 39. Zigha, A., E. Rosenfeld, P. Schmitt, and C. Duport. 2007. The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J. Bacteriol.* **189**:2813–2824.

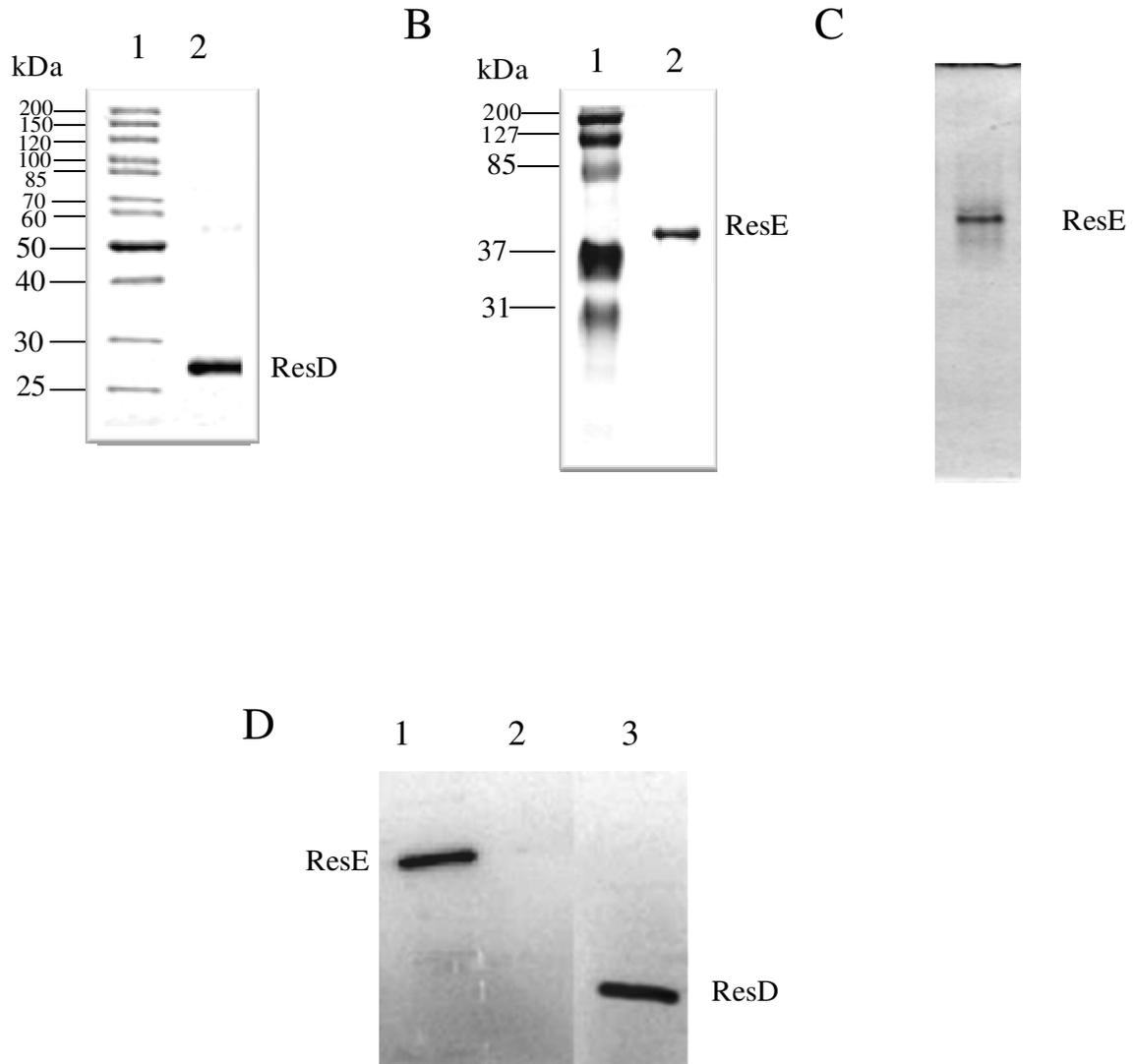
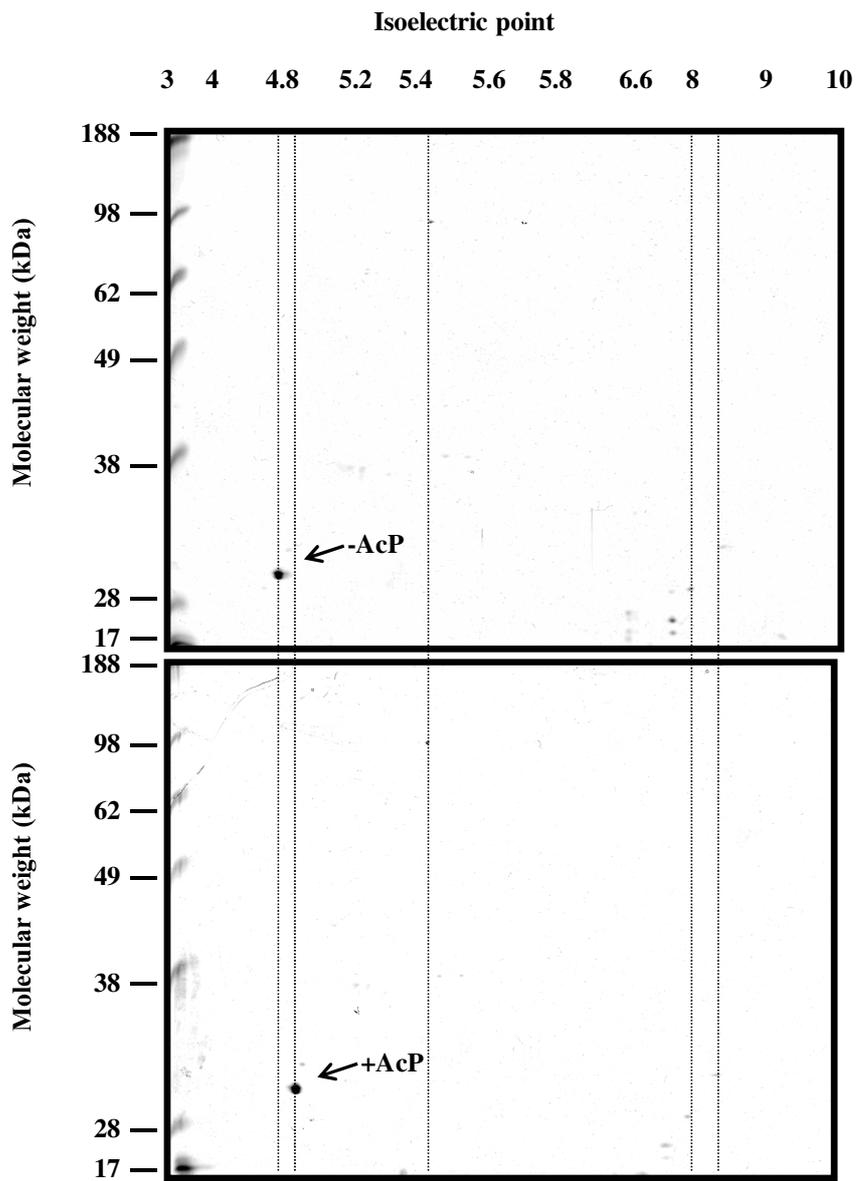
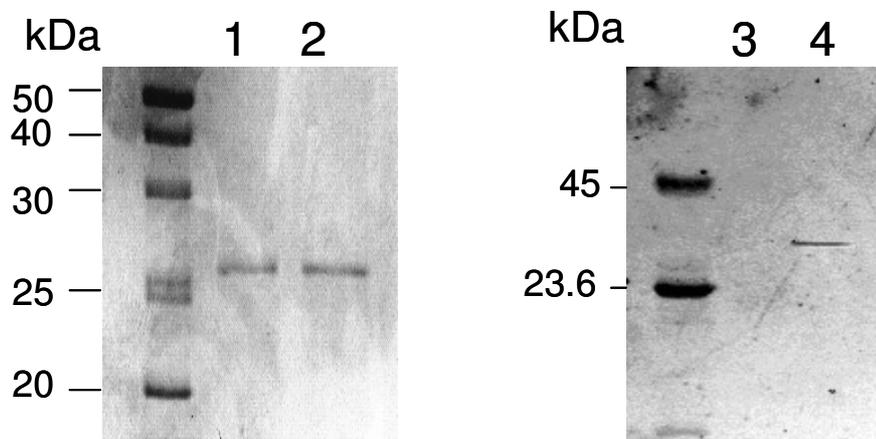


Figure S1: ResD and ResE purification and phosphorylation activities. Panel A: SDS-PAGE analysis of purified ResD. Lane 1: Unstained protein ladder (Fermentas). Lane 2: 1 μg of purified ResD. The gel was stained with Coomassie blue. **Panel B:** SDS-PAGE analysis of purified ResE. Lane 1: Pre-stained standard proteins (Bio-Rad). Lane 2: 1 μg of purified ResE Δ (1-197). The gel was stained with Coomassie blue. **Panel C:** Blue native-PAGE analysis of purified ResE. **Panel D:** Autophosphorylation of ResE and phosphotransfer between ResE and ResD. ResD (10 μM) and/or ResE (6 μM) were incubated with 5 μCi of $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ at 37°C. Reaction products were resolved by 12% SDS-PAGE. Lane 1: ResE incubated with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Lane 2: ResD incubated with $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$. Lane 3: ResD incubated with ResE and $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$

A



B



C

Match to: **ResD** Mascot Score: **661**

Nominal mass (M_r): **30794**; Calculated pI value: **5.77**

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M), Phospho (D), Phospho (ST), Phospho (Y)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **35%**

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MENESR**ILIV DDEDRIR**LL KMYLEREQYT IEEADNGDTA LEMALQNDYD
 51 LILLDLMPG KDGIEVCKGV REK**KATPIIM LTAKGEEVNR VQGFVGTDD**
 101 **YIVKPFSPRE** VVLRVKAVLR **RAVPTTFFFTQ DTTTKDVTVF PHLTIDNDAH**
 151 **RVTADGNEVN LTPKEYELL** FLAKAPDKVF **DREQLLKEV** QYEFFGDLRT
 201 VDTHTVRLRE KLSKKSPDAA KMIVTVWGVG YKFEVVNDKG NSKLEGGKPIP
 251 NPLLGLDSTR TGHHHHHH

End	Observed	z	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss	Sequence	Modification	Ions score
15	544.285	2	1086.555	1086.556	-0	0	R.ILVVDEDR.I		(Ions score 41)
15	544.285	2	1086.556	1086.556	0	0	R.ILVVDEDR.I		(Ions score 47)
15	544.285	2	1086.556	1086.556	0	0	R.ILVVDEDR.I		(Ions score 46)
15	544.285	2	1086.556	1086.556	0	0	R.ILVVDEDR.I		(Ions score 31)
17	452.921	3	1355.740	1355.741	-1	1	R.ILVVDEDRIR.R		(Ions score 20)
17	452.921	3	1355.740	1355.741	-0	1	R.ILVVDEDRIR.R		(Ions score 21)
17	678.878	2	1355.741	1355.741	-0	1	R.ILVVDEDRIR.R		(Ions score 33)
17	678.878	2	1355.741	1355.741	0	1	R.ILVVDEDRIR.R		(Ions score 36)
34	593.864	2	1185.713	1185.715	-2	1	K.KATPIIMLTAK.G		(Ions score 30)
34	593.864	2	1185.713	1185.715	-2	1	K.KATPIIMLTAK.G		(Ions score 19)
34	601.862	2	1201.710	1201.710	-1	1	K.KATPIIMLTAK.G	Oxidation(M)	(Ions score 31)
34	601.862	2	1201.710	1201.710	-0	1	K.KATPIIMLTAK.G	Oxidation(M)	(Ions score 22)
34	529.818	2	1057.620	1057.621	-0	0	K.ATPIIMLTAK.G		(Ions score 45)
34	537.815	2	1073.615	1073.615	-1	0	K.ATPIIMLTAK.G	Oxidation(M)	(Ions score 40)
34	537.815	2	1073.615	1073.615	-0	0	K.ATPIIMLTAK.G	Oxidation(M)	(Ions score 52)
109	718.700	3	2153.078	2153.079	-0	0	R.VQGFVGTDDYIVKPFSPR.E		(Ions score 11)
109	718.700	3	2153.079	2153.079	-0	0	R.VQGFVGTDDYIVKPFSPR.E		(Ions score 13)
135	571.966	3	1712.876	1712.873	1	1	R.RAVPTTFFFTQDTTK.D		(Ions score 11)
135	779.393	2	1556.772	1556.772	-0	0	R.AVPTTFFFTQDTTK.D		(Ions score 76)
135	779.393	2	1556.772	1556.772	-0	0	R.AVPTTFFFTQDTTK.D		(Ions score 69)
151	617.311	3	1848.911	1848.912	-0	0	K.DVTVFPHLTIDNDAHR.V		(Ions score 15)
151	617.311	3	1848.912	1848.912	0	0	K.DVTVFPHLTIDNDAHR.V		(Ions score 20)
164	679.351	2	1356.688	1356.689	-0	0	R.VTADGNEVNLTPE		(Ions score 73)
164	679.351	2	1356.688	1356.689	-0	0	R.VTADGNEVNLTPE		(Ions score 64)
164	679.351	2	1356.689	1356.689	0	0	R.VTADGNEVNLTPE		(Ions score 53)
164	679.352	2	1356.689	1356.689	0	0	R.VTADGNEVNLTPE		(Ions score 53)
187	574.327	2	1146.639	1146.640	-0	1	K.VFDREQLLK.E		(Ions score 23)
187	574.327	2	1146.639	1146.640	-0	1	K.VFDREQLLK.E		(Ions score 14)

Figure S2. Phosphorylation analysis with acetyl phosphate. Panel A. ResD incubated in the absence (-AcP) or presence (+AcP) were separated according to their charge/mass relation by 2D gel electrophoresis. The experimental pI of ResD (-AcP) was significantly more acidic (~1 pH unit) than expected by computation (us.expasy.org/tools/pi_tool.htm), suggesting that charges could be masked. ResD treated with AcP focused at more basic pI (+ 0.2 pH unit) than untreated ResD. **Panel B.** To determine whether the apparent shift in pI of ResD after incubation with AcP is due to specific phosphorylation, ResD was incubated in the absence (lanes 1 and 3) or presence (lanes 2 and 4) of acetyl phosphate, analyzed by 1D gel electrophoresis and stained with Coomassie brilliant blue (lanes 1 and 2) or with Pro-Q diamond (lane 3 and 4). **Panel C.** Mass spectrometry identification of ResD (spot +AcP from Panel A) after in-gel trypsin proteolysis, and LTQ-orbitrap MS/MS analysis. A sequence coverage of 35% is obtained with the MASCOT identification of nine different peptides: [7-15],[7-17],[73-84],[74-84],[91-109],[121-135],[136-151],[152-164], and [179-187].

pfnr

.....CGAACACTTCAGCAGGCATACAGTATGTACACCTAAAATTACAACGATCAATAACTGAAATACGTAATCTTGAAGTGGC
CGCTTTAAAGAATCTTTTATGTTCTTGTGCATCTCTATCCCTTTCTTCTGCTGCAATCCTTAGTAAGCTTTCATTTTTTTATTTGCCTTTATT
ATAAAAAAGAAGTACATATTTCAATGTGACTTTTCTCACATCACTTTCCCCA**TTCAAAAACCTTTTCACAAA**TCCGTTTCGTATTTTGTTCACATC
TTCAGGCCATACCTTTTACGGTCATTGAAATTTTACATATTTTTAAAAATAGCTCTTGCATTTTCATCATATTTACACTCAAAAATAGGAAAT**GT**
ATTGCTTATAAGAAGAAAGGTGATTGCT**GTG**

presDE

TGGGATCCAAAAGAGGTTTGGGCACTTATCACTTGGCTCTTTTATGCGGCAGTATTACATTTACGCCTATCAAAAAGGATGGCATGGAGAGAAGT
CAGCTTGGCTTGCAGTAATGGTTTTGCAATCATATGTTTAACTTTATTGTAGTAACTTAATTTATTTGCCGGTTTACATTTACATATGCATAGAG
AAATAAAATAGGGAGTGCATGTCACCTTCCCTATTTTATTTTTGTCAACTTTTCTTCTTT**TTGAGAAAACATGACAA**AGTAGCGGTTGATTT
TGTAATATGATGTCGAG**CA**CATTATATGCTGTTCAAAAAAATACATAGTTT**TGGAAAAAATGAACAA**AATTTATTATTTCTTGTGAAGCATG
ATATGGGAAGTGAACATTTAGAAAGATTGCTTAAATAAACGAGAATAGCGCAACATAATAGTTAAAGAAGGGTAGGTGTGAACCGCTGAGGTGA
GAGTGGCAGCGGGTAGAG**ATG**

pplcR

.....TATGTTTGTGCAAGGCGAACTTCGGTTTGATTTCCTTTGGTTTTCTTTATTTGTAGGTTGGAAATCTACATTTTTTTTTCAGTAGT
GACTTGTCTTGTGAGCTTTCGCCCATTTACCTCACCTTTTAAACTTTTATAGCAATATTTTCTTTCGTATCATTTTGAGGTTGTGTTAAT
TTCCCGATTGTTAAACCGGCTGAGCAATTTCACTTTTACTGTCACCTTTTGTCTAATTTCTGAGCATGAATAGCTTCTGTTGATAAAGGGCAAA
GAAGACCGAATGTAACGAAAGCACTAGCAAGTTTCTATAATTCATCTATAACACTCCTAATCTATTATTGTATGTGAGATGAAT**GTATGAAA**
AATTTGCCGAAATTTATATATATATGCAATTTTCATATCAAAAATTGTCGAATTCACATTATTGTAGTGGT**AT**GACAACCTCAAAAATTAGA
TTGTTCTAATGGGATGGTGAGTAAGT**ATG**

phbl

.....GCTTGTATCCGCTGTCTTCAATGTAAGACTTAGACATGGGTATAAGTATCCCAAAAATGAAAATACACTAACCA
TTATTTTGTAAAGAAAACAAAAGACAGAAGGCTGCAAGGTGTTCCAAGGAAGCTTTGCAGCTTTTTTGTAAATTTAAACCTATGTTTATAAC
GATGATACGATGATACGTTTATAGACTAATATCTTCACTGAAATATTTGTTAAATAGATATTAGGATGTT**TTGTGAAAAAATCAA**CAATATA
ACATATATTACTAAATATATCTACATTTTATGCAATTTACATAACTAAATAAAGGTAAAAAGTATAAAAAGACCTATTATATTATCTATAA
GTATTTTTCCTAAATAAAATTTCTCGGTTGAGCTAAAATAGTTATTTTAAACCGTATACACATTAATTTGTAATCATTACAATTACAGAAATG
AAATTTACGGATAACTATATTTGTATAATTTTTTTCGGTTTCATATTTTATTTAACAGTAAATATCGATCGTAATCGACAAAATTTTCTATT
TACGCATTAATAATTAATGTTTTAATGAACAACA**TA**ACTGGTATGACCAGACAGAAAGGATAAGGTTACGCTAATAGGAATTTAGTGAAGTT
GTAAGTAACATTATG**TTGAAAAATATTTTCGAA**TAGTCTATTTATTTACAAGAGGTCAAGAATCAAGTTTGTAAATAAACGTTCTTAAGTTTCT
GCATAATGCATAACAAAAGTGAAGTTATTCGCAATAAAAGTATAAGCGATGTACAGTATAATTTACCTTTTTTAGTCTAGTAAGGAGTTTGC
TGATAAACTAAGAGTAATATTTAAATTTAAATTAACAATGTTATGGCAAGATTAAGTGAAGCATTGGTTTATTGATTCTCGCGGTTCTG
TAAGTTAAACCGCAATCTAGGAAGAATTACACATTTACTATTCAGGGTGTGATTCAAAATAGTTAAATAAATTTTGTATTATTATTT
TGAAAAATAGAGTATCGAAGTGAAGGTAAGTAAATCCTTACATTTCTATTAGAAGTAAAAATAACGATATTATCCTATCTGAAAGATTTCT
CC**TTCTTAATCAGTTTACAA**AGAGAGAGGTCATACAAGTTATATGAATTAAGTTATAAAAACAATGGTAAAGGAGTGTACGGA**ATG**

pnhe

.....TGTATTACGACAGTTCATATCATTGAAAA
AATAAGAAAATTTTGAAGGATAGCTTCGTGAAAATGAAGCTATCCTTT**TTGTGTATATGCTATGCATA**ATTGCATATGAGTTTAAAAATATA
TCAATATAATTTTATCGGTTATTTGCAAGTAGTGTgTCTGTTGTGATATGTAGATATTTCAATCAATAAAGTGAATCGGATTATATTTGAA
ATAAGGACATGAAAGCTTTAAAATAAAGGGAATGAAAATACTTCTTACGTTATATAAACAGCTGTGTTTAAATGACCTT**ACAGTACAAAACAT**
ATATGAAAACAAAACGAAATTTTCATATTTACGCATGTTGTTAGTTTGAATGAATAATTTTT**TACGTAATAATATTCACTA**TGTGAATGTGGG
AATTTCTATAAAATAGAAAATTTTACAGTATTATTCATACTAAACATATGAAAAATAATAAATGTTTGTGACGATAAGTAAGTACTGTA
GCAATACGAGAGAGGTTTCATACATGGATCACGGTGAGAAGCTTCTCTATTTAATCATCTCAAATATGGGCAAGAAAATAGAAATAATAAAAT
CGGATAGTAATAGTTGCTAATACATAGGAGGAGTTAAAG**GTG**

Figure S3: Location of putative consensus ResD boxes in the enterotoxin gene regulatory regions *presDE*, *pfnr*, *pplcR*, *phbl* and *pnhe*. One full line contains 75 bases. The transcriptional start sites (+1) are designated in bold and are underlined. The predicted initiation codons are indicated in bold. The putative consensus ResD boxes are highlighted in yellow. One consensus sequence (11 of 11 matches) is present in both *fnr* (in the noncoding strand at position -135 to position -118 with respect to transcriptional start site) and in *pplcR* (9 of 11 matches in the coding strand at positions -81 to -64), which likely accommodate two ResD dimers. Two consensus sequences are present in both *resDE* (9 of 11 matches in the noncoding strand at both positions -50 to -33 and +35 to +52) and *nhe* (8 of 11 matches in the coding strand at positions -231 to -214 and 7 of 11 matches in the noncoding strand at positions +78 to +95). Three consensus sequences are present in *hbl* (9 of 11 matches in the noncoding strand at positions -340 to -325, in the coding strand at positions +74 to +91, and in the noncoding strand at positions +531 to +548).

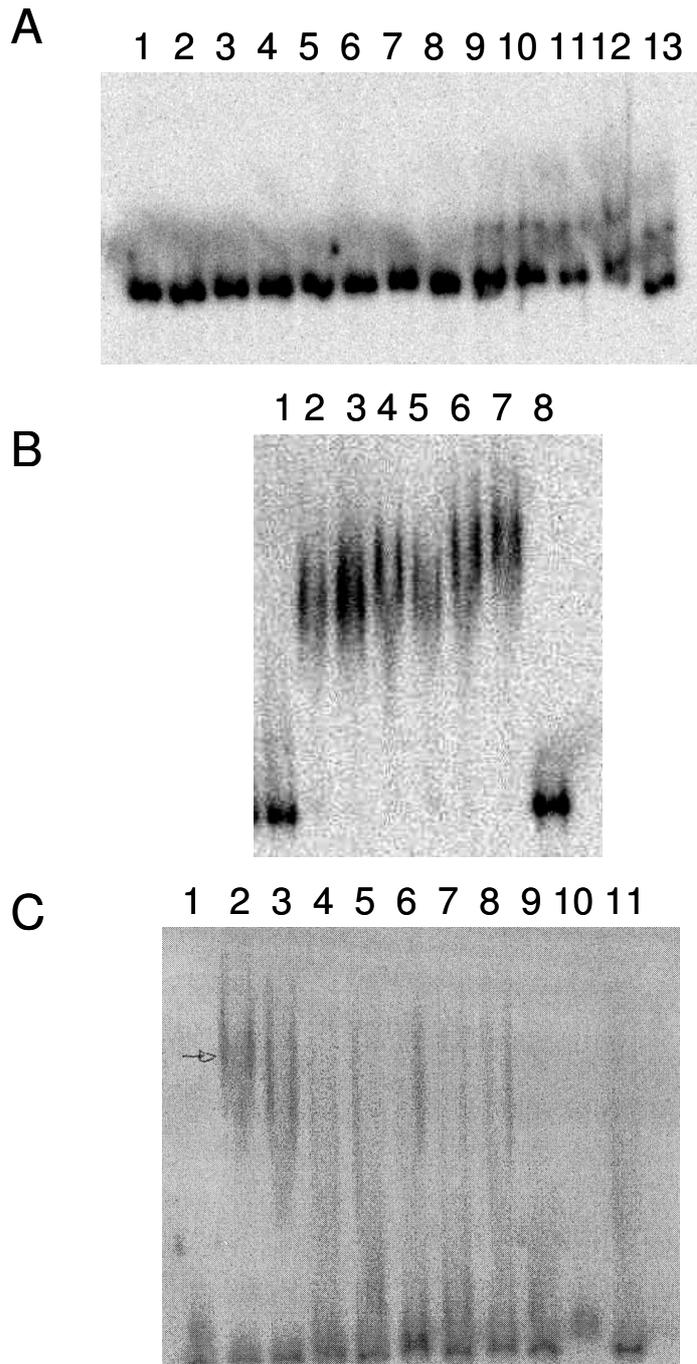


Figure S4 : Examples of gel mobility shift assays proving the specificity of ResD binding.
Panel A: Labelled DNA (1000 cpm) corresponding to negative control (*ssu* promoter region) was incubated with increasing concentration of ResD. Lanes 1 to 13 contain 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12 and 14 μM ResD, respectively. **Panel B:** Labelled DNA (1000 cpm) corresponding to *resDE* was incubated without protein (lane 1), with increasing concentration of ResD phosphorylated by ResE and ATP (0.5, 1, 2, 3, 4 and 6 μM in lanes 2 to 7, respectively) and with only ResE (1 μM , lane 8). **Panel C :** Labelled DNA (1000 cpm) corresponding to *resDE* was incubated without protein (lane 1) and with 6 μM of ResD plus increasing concentration of unlabelled DNA fragment (lanes 3 to 11). Lanes 3 to 13 contained 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 and 50-fold excess of homologous unlabelled DNA, respectively.

3.2 Expériences complémentaires

3.2.1 Mise en évidence de l'état de phosphorylation de ResD *in vitro*

Dans les expériences autres que les gels retard, les réactions de phosphorylation de ResD ont été réalisées non pas par ResE mais par l'acétyl phosphate. Nous avons donc vérifié que cette phosphorylation était efficace.

Pour contrôler l'état de phosphorylation de ResD par l'acétyl phosphate, nous avons utilisé un colorant commercial capable de révéler uniquement les protéines phosphorylées (Pro-Q® Diamond (Molecular Probes), ou ProQD). Après que le gel de polyacrylamide ait été coloré et lavé suivant la méthode, il a été soumis à une révélation par les UV. En parallèle un gel coloré au bleu de Coomassie est réalisé (Figure 64). Sur le gel coloré au bleu de Coomassie, on détecte deux bandes correspondant à la protéine ResD et ResD phosphorylée. Sur le gel coloré au ProQD on observe une seule bande correspondant à la protéine ResD phosphorylée. On constate que le niveau de coloration des phosphopeptides du marqueur de poids moléculaire (ovalbumine et β -caséine) est équivalent à celui de la protéine ResD phosphorylée. On en conclut que la protéine ResD est efficacement phosphorylée par l'acétyl phosphate.

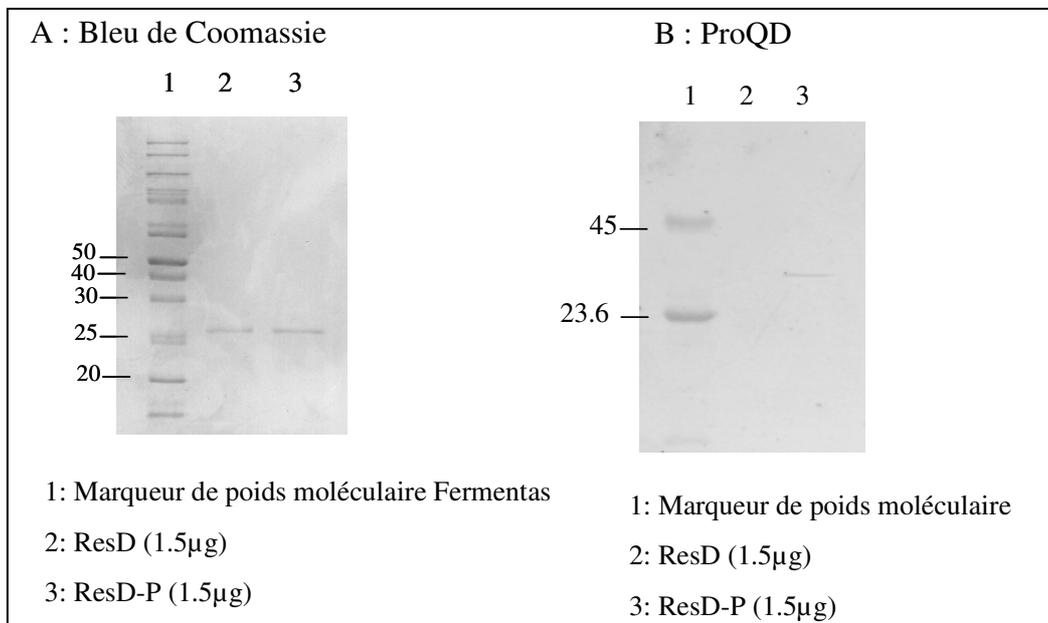


Figure 64 : Révélation de la protéine ResD phosphorylée *in vitro*.

3.2.2 Effet de l'ADN sur l'état d'oligomérisation de ResD

Nous avons montré que l'état de phosphorylation de la protéine ResD n'influçait pas son état d'oligomérisation. Mais qu'en est-il de la présence d'ADN?

La structuration des protéines régulatrices peut se produire ou être stabilisée par l'interaction avec l'ADN. Partant de ce principe, nous avons étudié l'incidence de la présence d'ADN sur l'oligomérisation de la protéine ResD. Pour cela nous avons réalisé une expérience de pontage covalent de la protéine ResD avec ou sans ADN (ici région promotrice *resDE*) dans le milieu réactionnel. Pour chaque réaction, un contrôle sans agent pontant est effectué. L'analyse du résultat après séparation des complexes protéiques par électrophorèse dénaturante est présentée figure 65. On constate (pistes 3 et 4) que la présence d'acides nucléiques ne semble pas influencer l'oligomérisation de la protéine ResD. En effet dans les deux cas (avec ou sans ADN), on retrouve le même profil avec une bande protéique correspondant au monomère de ResD (env. 30 kDa) et deux bandes supérieures correspondant au dimère et au trimère de ResD (env. 60 et 85 kDa respectivement). L'état d'oligomérisation de ResD n'est donc pas, dans ces conditions, dépendant d'une interaction avec l'ADN. On en conclut que ni la phosphorylation, ni la fixation sur l'ADN, ne modifient l'équilibre entre les formes monomérique et dimérique.

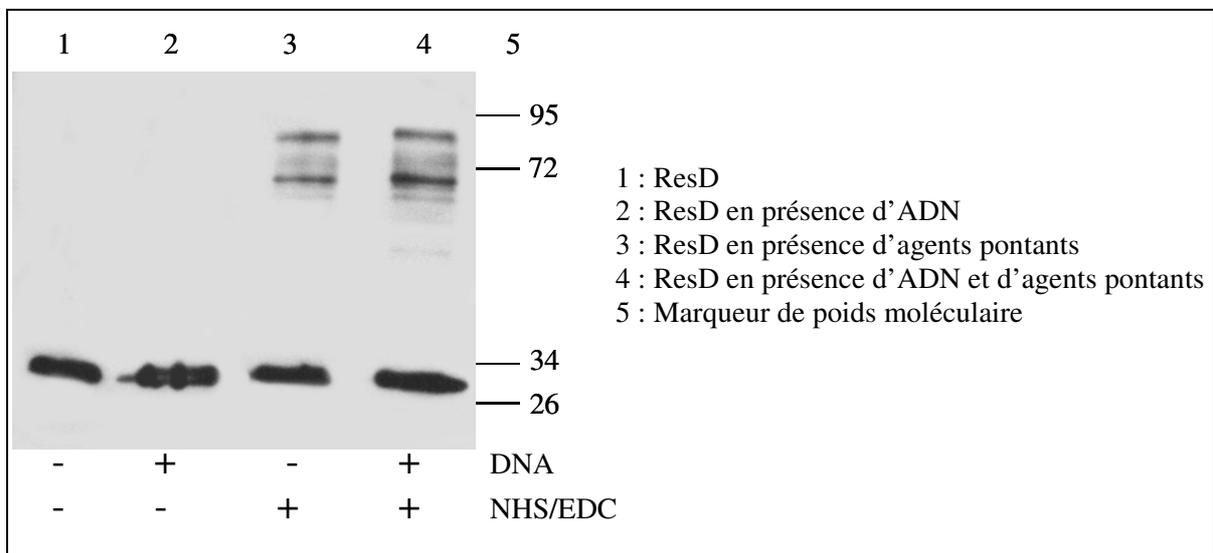


Figure 65 : Réaction de pontage covalent de ResD en présence d'ADN.

Chapitre 3 : Interaction entre les régulateurs ResD, Fnr et PlcR

1 Introduction à l'étude

Il est aujourd'hui admis que chaque protéine n'est pas une molécule isolée au sein de la cellule. Une protéine peut s'associer de façon temporaire ou permanente à d'autres en formant des unités fonctionnelles plurivalentes. La dotation d'une cellule en protéine ou protéome, apparaît comme un énorme réseau ou certaines protéines occupent des nœuds, et ont probablement une importance critique.

Nous avons montré dans cette étude, que les régulateurs Fnr et ResD, se fixaient sur les régions promotrices des gènes et opérons *fnr*, *resDE*, *plcR* et des gènes codant pour les entérotoxines Hbl et Nhe. La protéine Fnr et le système à deux composants ResDE sont donc des régulateurs de la transcription des entérotoxines chez *B. cereus*. Ces deux régulateurs viennent s'ajouter au régulateur pléiotrope PlcR déjà bien étudié. En effet, Lereclus *et al* ont montré que PlcR était un activateur de la transcription de *hbl* et *nhe* (Agaisse *et al.*, 1999; Gohar *et al.*, 2002; Gohar *et al.*, 2008; Lereclus *et al.*, 1996; Lereclus *et al.*, 2000).

Des études ont montré que l'absence de synthèse d'un des régulateurs conduisait à l'inactivation de l'expression des entérotoxines (Duport *et al.*, 2006; Slamti *et al.*, 2004; Zigha *et al.*, 2006b). Ces résultats laissent penser que ResD, Fnr et PlcR n'agiraient pas de façon indépendante et qu'ils pourraient réguler la transcription des gènes *hbl* et *nhe* via la formation d'un complexe tetrapartite.

Une étude bioinformatique des séquences promotrices des opérons *hbl* et *nhe*, a été réalisée afin d'établir la localisation des séquences potentielles de fixation pour ResD et Fnr par rapport à la boîte de régulation PlcR (Agaisse *et al.*, 1999). La figure 66 présente l'emplacement de ces différentes boîtes de régulation. Sur la région promotrice de *hbl*, on constate que les boîtes potentielles Fnr et ResD se chevauchent et sont très proches de la boîte PlcR (35 nucléotides). Sur la région promotrice de *nhe*, les trois boîtes sont chevauchantes.

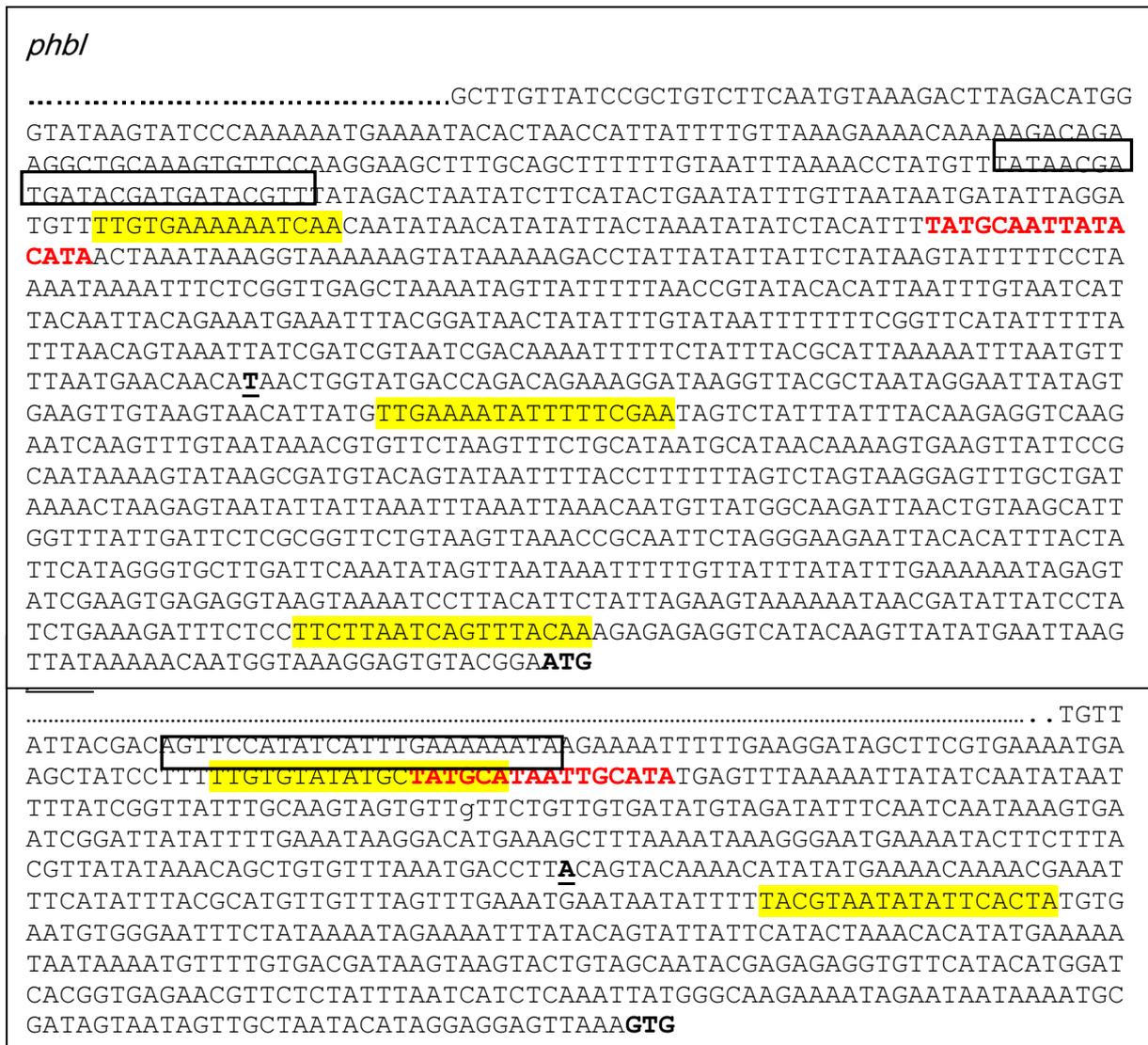


Figure 66 : Localisation des boîtes potentielles de fixation des protéines ResD (en jaune) et Fnr (encadrées) et de la boîte connue pour le régulateur PlcR (en rouge) sur les régions promotrices des gènes des entérotoxines *hbl* et *nhe*. La base correspondant au +1 de transcription est soulignée et le codon stop est indiqué en gras.

Ces données renforcent l’hypothèse d’une interaction entre les régulateurs dans la régulation de la toxinogénèse chez *B. cereus*.

Dans ce chapitre nous avons donc entrepris de répondre aux questions suivantes :

- Le régulateur PlcR interagit-il avec ResD et Fnr?
- ResD, Fnr et PlcR sont-ils des éléments d’un complexe supra-moléculaire régulant l’expression des entérotoxines?

Afin de répondre à ces questions, la protéine PlcR a été surexprimée chez *E. coli* puis purifiée. Des expériences de pontage covalent ont été réalisées et le système du double hybride chez la levure a été utilisé afin d'étudier les interactions entre les régulateurs.

2. Stratégie envisagée

2.1 Surexpression et purification du régulateur pléiotrope PlcR

L'expression de la protéine PlcR dans le vecteur pET-52b (+) a été optimisée par l'utilisation des cellules d'*E. coli* B121 codonplus (DE3)-RIL (Stratagene). La purification d'une forme doublement taggée (Strep et His) a été réalisée. Ce double tag d'affinité permet d'améliorer et de raccourcir les étapes de purification et de combiner l'utilisation de différents anticorps pour la détection de la protéine.

Le gène codant pour la protéine PlcR a été cloné aux sites SmaI et SacI du pET-52b (+). Dans cette stratégie de clonage il y a élimination en 3' du codon stop (TAA) afin de traduire la queue histidine en C-terminal. On obtient une protéine Strep taguée en N-terminal (**WSHPQFEK**) et His taguée en C-terminal (**10 His**). Après traduction, ces étiquettes peuvent être détectées en Western-Blot grâce à des anticorps spécifiques ou être utilisées pour la purification de la protéine sur colonne d'affinité. La purification est réalisée sur une résine Talon (Clontech) chargée au cobalt.

2.2 Etude des interactions protéique

2.2.1 Double hybride dans la levure

La découverte du système du double hybride en levure en 1989 par Stanley Fields *et al*, a révolutionné la manière dont les interactions protéine-protéine pouvaient être détectées. En utilisant des outils d'expression plasmidique dans des cellules de levure génétiquement modifiées, un système a été inventé pour prendre en compte la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel (GAL4). Lors de la liaison physique de la protéine X avec la protéine Y, le Domaine de liaison à l'ADN (DLA) de l'activateur transcriptionnel est amené à proximité immédiate du Domaine d'activation (DA). La reconstitution du facteur de transcription fonctionnel active la production d'un marqueur d'auxotrophie, ce qui permet à son tour aux cellules de levure de se développer dans un milieu sélectif. Ce système permet de tester l'interaction entre deux protéines connues.

L'avantage de cette technique repose sur sa grande sensibilité et le fait qu'elle permette d'identifier une interaction protéine-protéine *in vivo*. Elle permet de mettre en évidence des interactions transitoires et difficilement détectables par les méthodes traditionnelles biochimiques (coimmunoprécipitation par exemple). Le test est réalisé *in vivo* et pour détecter l'interaction, la purification de la protéine cible n'est pas nécessaire. Les protéines issues de cette méthode sont très facilement caractérisables puisque leurs domaines d'interaction sont dès lors identifiés. L'utilisation de la levure plutôt que la bactérie pour cette technique repose sur la limitation des faux positifs. En effet dans le système "levure", la présence de protéines homologues engendrant de fausses interactions avec la protéine étudiée est peu probable.

Le système utilisé dans cette étude est le Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 commercialisé par Clontech. Ce kit propose une souche de levure optimisée (AH109) afin de réduire les faux positifs (Cf Matériel et Méthodes) et les deux vecteurs permettant le clonage des gènes appâts (pGBKT7) et des gènes proies (pGADT7).

Les gènes codant pour les protéines Fnr, ResD, ResE (tronquée de sa partie transmembranaire) et PlcR ont été amplifiés à l'aide des amorces référencées dans le tableau 9. Ces dernières permettent une amplification de l'insert qui portera à ses extrémités une séquence homologue au vecteur. En parallèle, les vecteurs de double hybride ont été linéarisés par l'enzyme de restriction *EcoR1* et les deux molécules d'ADN (insert et plasmide) ont été transformées dans la souche de levure W303b. Ceci permet d'effectuer un clonage par recombinaison homologue dans la cellule de levure. Après extraction des plasmides recombinés, on obtient les constructions "appâts" et "proies" désirées :

- pGBKT7-*fnr*, pGBKT7-*resD*, pGBKT7-*resE* et pGBKT7-*plcR*
- pGADT7- *fnr*, pGADT7- *resD*, pGADT7- *resE* et pGADT7- *plcR*

La souche de levure AH109 est transformée simultanément par deux plasmides : l'un code pour la protéine recombinante fusionnée au DLA de GAL4 et portant le gène de sélection *trp1* (tryptophane), tandis que l'autre code pour la protéine fusionnée au DA et portant le gène de sélection *leu2* (leucine). Nous avons donc réalisé dix co-transformations afin de tester toutes les interactions possibles. La première étape consiste à sélectionner les levures co-transformées en les étalant sur un milieu minimum sélectif.

La deuxième étape consiste à déceler une éventuelle interaction entre les deux protéines d'intérêt. L'interaction permettra la reconstitution du transactivateur GAL4 et la transcription

des gènes rapporteurs *ade2*, *his3* et *lacZ/mel1*, permettant la synthèse d'adénine, d'histidine et de la β ou α -galactosidase.

2.2.2 Pontage covalent

La méthode du double hybride permet de montrer que deux protéines sont capables d'interagir de façon binaire lorsqu'elles coexistent dans le noyau de la levure. La technique n'est pas suffisante à elle seule pour valider l'interaction. En effet il est indispensable de combiner plusieurs méthodes pour rendre compte d'une interaction. Afin d'explorer les interactions entre les régulateurs, nous avons aussi réalisé des expériences de pontage covalent.

Les protéines ResD, Fnr et PlcR purifiées ont été incubées en présence d'agents pontants (EDC et sulfo-NHS) puis analysées sur gel SDS-PAGE 12%. La détection des protéines est réalisée à l'aide des anticorps anti-histidine après transfert sur membrane.

3 Résultats et discussion

3.1 Obtention de la protéine PlcR

Nous avons entrepris la surexpression et la purification de la protéine PlcR doublement taggée. La séquence codante de *plcR* a été clonée dans le vecteur pET52b (+) et la construction obtenue a été introduite dans la souche d'expression d'*E. coli* BL21-(DE3)-Ril codon déjà décrite. La purification a été réalisée sur une résine chargée au cobalt (Clontech).

Au vue de la construction génétique réalisée, la protéine PlcR exprimée a une taille de 38.675 kDa et un pHi théorique de 6.55. Sa séquence en acides aminés est présentée ci-dessous.



Figure 67: Séquence en acides aminés de la protéine PlcR surexprimée chez *E. coli*. En noir: la séquence du vecteur pET52b (+), en rouge: le Strep-Tag, en bleu: la séquence de PlcR et en orange: le His-Tag. La méthionine codée par le codon start est soulignée.

Après induction, les cellules sont lysées par sonication et l'extrait protéique brut obtenu est analysé afin de vérifier l'expression de la protéine PlcR. En analysant simultanément par électrophorèse un extrait protéique brut de cellules induites et de cellules non induites, on retrouve une bande (résultat non montré) présente uniquement dans les cellules induites. Une analyse Western-Blot avec détection à l'aide d'un sérum anti-His utilisé au 1/500^{ème}, a permis de vérifier que cette bande correspondait bien à la protéine PlcR (Figure 68). Cette protéine présente bien une taille d'environ 40 kDa. On la retrouve dans l'extrait protéique brut avant et après la lyse des cellules (pistes 2 et 3) mais pas dans le surnageant de lyse (piste 4). Ce résultat nous indique que la protéine PlcR est restée dans la fraction non soluble et qu'elle forme probablement des corps d'inclusion dans nos conditions d'expression. Pour cette raison nous avons adapté notre protocole de purification en ajoutant une étape permettant de récupérer ces corps d'inclusion. En effet après la lyse des cellules par sonication, les corps d'inclusion sont récupérés dans le culot par centrifugation puis lavés dans du tampon de lavage (phosphate de sodium 50 mM, NaCl 150 mM, triton X-100 1%, pH 7.0). Le culot contenant les corps d'inclusion est ensuite dissout dans du tampon de dissolution (phosphate de sodium 50 mM, Urée 8M, pH 7.0). Après centrifugation, on obtient le lysat cellulaire à purifier. La suite de la purification est réalisée de façon classique comme décrit pour les protéines ResD et Fnr.

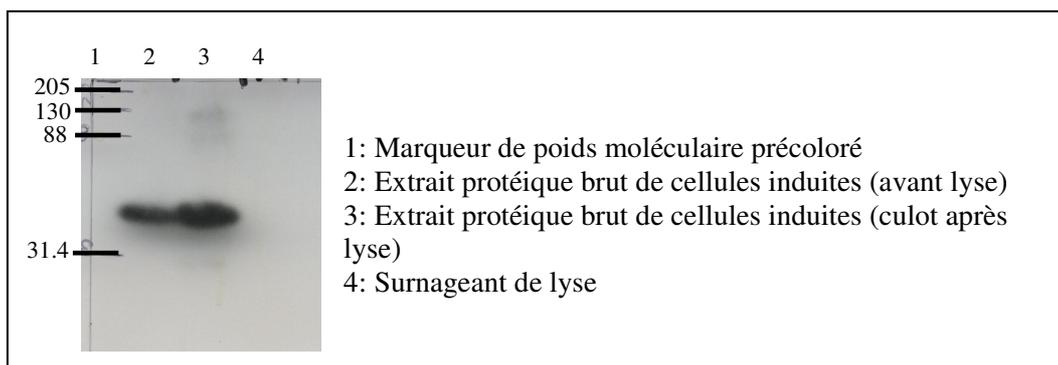


Figure 68 : Analyse de l'expression de PlcR par immunodétection avec des anticorps anti-His.

A chaque étape de la purification, un échantillon est conservé de manière à être analysé en SDS-PAGE. Le résultat obtenu est présenté figure 69.

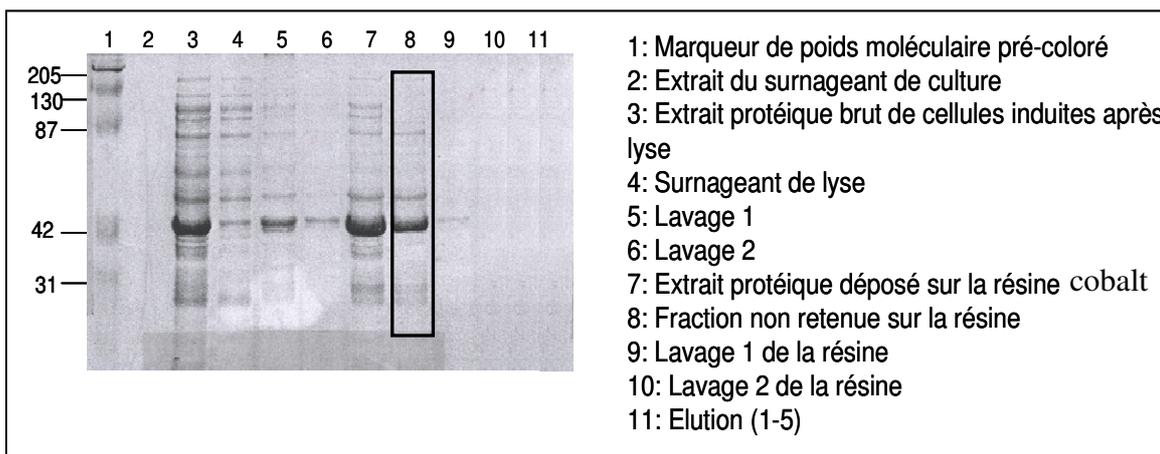


Figure 69: Analyse par gel SDS-PAGE 12% de la purification de PlcR. Des échantillons de protéines ont été récupérés lors des principales étapes de la purification.

L'électrophorèse révèle la présence d'une bande dominante qui pourrait correspondre à PlcR. Sur le gel, la taille de la protéine surexprimée, environ 42 kDa, correspond bien à la taille théorique du polypeptide qui est de 38.675 kDa.

La purification des corps d'inclusion n'a pas été une étape critique, dans la mesure où ces agrégats ont été facilement isolés par centrifugation après dissolution. En effet on retrouve bien PlcR dans le surnageant de lyse et les deux lavages des corps d'inclusion (pistes 4, 5 et 6). Si on s'intéresse aux pistes 7 et 8 qui correspondent respectivement à la fraction déposée sur la résine chargée au cobalt et celle non retenue, on constate que la protéine PlcR ne se fixe pas sur cette dernière. En effet on la retrouve concentrée dans la fraction non retenue et non

pas dans les fractions d'élution. La protéine PlcR ne s'est pas fixée sur la résine chargée au cobalt. On travaillera donc sur la fraction non retenue sur la résine qui est relativement propre malgré la présence de deux bandes contaminantes qui sont largement minoritaires en coloration au bleu de Coomassie. Cette fraction est concentrée et désalée comme présenté dans l'article n°1.

Afin d'obtenir de plus grande quantité de la protéine PlcR et surtout une protéine pure, nous envisagerons d'utiliser la souche BL21 λ DE3 co-transformée par les vecteurs d'expression pET28.16 Ω plcR et pREP4-groESL (Amrein *et al.*, 1995). Le plasmide pET28.16 Ω plcR permet l'expression d'une protéine PlcR His-tagée en C-terminal tandis que le plasmide pREP4-groESL permet l'expression des chaperons moléculaires d'*E. coli*, GroEL et GroES. Ces derniers permettent de limiter la formation d'agrégats de la protéine recombinante dans la cellule. Dans ces condition, la purification de la protéine PlcR a déjà été réalisée avec succès (Slamti & Lereclus, 2002).

3.1 Interactions entre les régulateurs : test de l'activité α -Gal

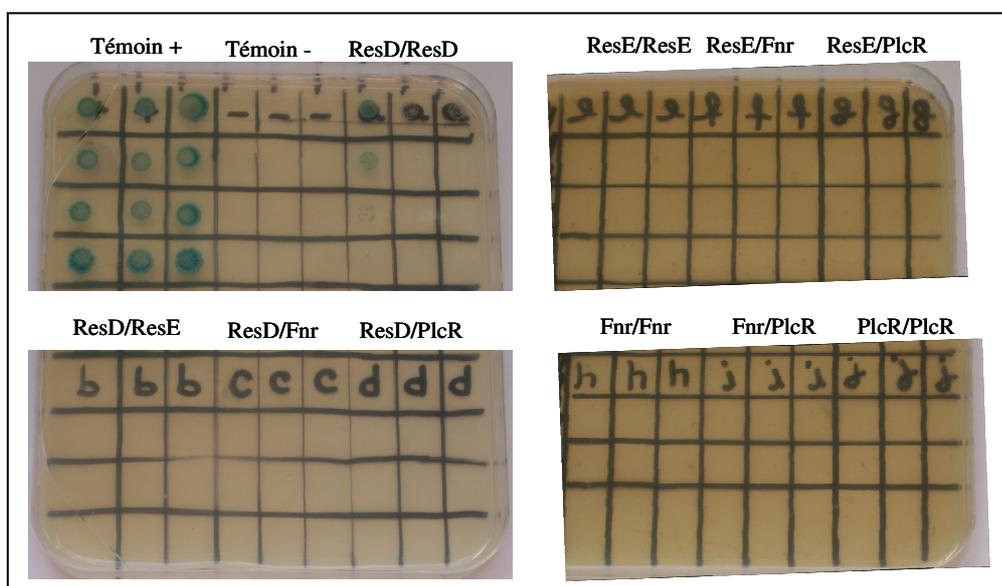


Figure 70 : Clones obtenus par le système double hybride chez la levure. Les souches de levure ont été repiquées sur SD/Trp-Leu-His en présence de X- α -Gal à raison de 3 clones différents par construction et 3 dilutions.

Nous avons testé toutes les combinaisons d'interaction possibles entre les régulateurs (ResD, ResE, Fnr, PlcR). Pour chaque interaction testée, 3 clones sont "spottés" à raison de 3 dilutions successives sur milieu minimum (SD-Trp-Leu-His + X- α -Gal). Après 72h d'incubation à 30°C, les clones ayant poussé sur ce milieu de sélection sont ceux produisant des protéines recombinantes qui interagissent.

Pour les témoins, on constate que la présence des constructions pGBKT7-53/pGADT7-T (témoin positif) est indispensable à la croissance et à la coloration bleue de la souche de levure AHI09, indiquant qu'il y a une interaction entre la protéine p53 et l'antigène T du SV40. En revanche les clones hébergeant les vecteurs du témoin négatif n'ont pas poussé indiquant que comme attendu, la laminine C ne présente pas de partenaire protéique. Nos témoins sont donc de bons indicateurs d'interaction.

Ces résultats montrent que la présence des constructions pGBKT7-*ResD*/pGADT7-*ResD* permet comme pour le témoin positif, la croissance et la coloration bleue. Par conséquent, cela pourrait démontrer que la protéine ResD s'associe en dimère. Aucune autre interaction n'est obtenue à l'aide de cette méthode dans nos conditions.

3.2 Interactions entre les régulateurs : dosage de l'activité β -Gal

En double hybride, le dosage de l'activité β galactosidase peut nous donner une idée de la force de l'interaction entre deux protéines testées. Chaque mesure représente l'activité de 3 clones différents et chaque mesure est réalisée trois fois (Figure 71).

Les résultats obtenus confirment l'interaction entre deux monomères ResD obtenue lors du test de l'activité α -Gal en double hybride. Nous confirmons aussi l'interaction entre deux monomères de Fnr observée par la méthode du pontage covalent (article 1). Par comparaison avec le témoin positif on peut conclure à une interaction positive entre ResD et PlcR, Fnr et PlcR ainsi qu'une association en dimère de ResE et PlcR (interaction ResE/ResE et PlcR/PlcR). En revanche aucune interaction n'est observée entre ResD et ResE, ResE et Fnr, ni ResE et PlcR dans ces conditions.

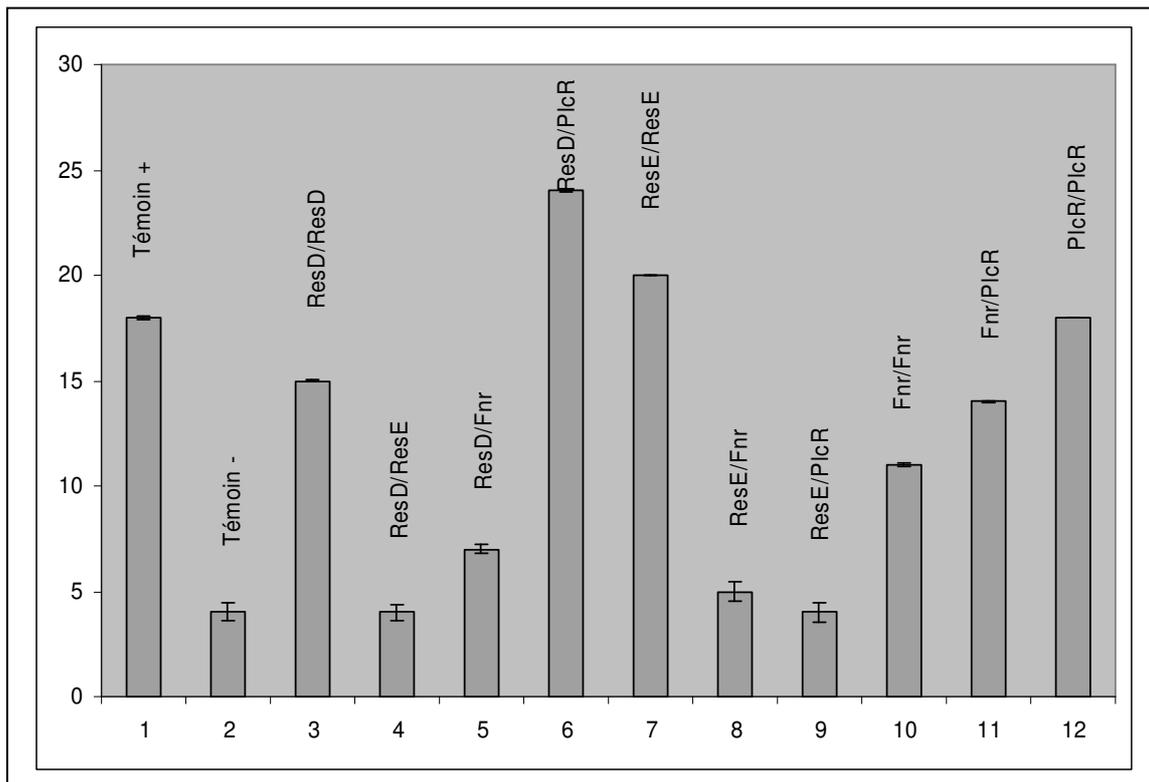


Figure 71 : Dosage de l'activité β -galactosidase des clones obtenus par le système du double hybride chez la levure. Chaque mesure représente l'activité de 3 clones différents et chaque dosage est réalisé trois fois.

Le tableau présenté ci-dessous résume les interactions mises en évidence grâce à la méthode du double hybride.

	ResD	ResE	Fnr	PlcR
ResD	+	-	+	++
ResE		++	-	-
Fnr			+	+
PlcR				++

Tableau 10 : Synthèse des interactions obtenues en double hybride.

Les résultats obtenus avec la technique du double hybride montre que les protéines ResD, ResE, Fnr et PlcR sont capables de s'associer en homodimères. Ces résultats sont en accord avec la littérature et les résultats déjà obtenus. En effet nous avons montré au cours de cette étude que les protéines Fnr (article 1) et ResD (article 2) étaient capables de former un homodimère.

La protéine ResE est une histidine kinase et ces protéines sont généralement membranaires et agissent sous leur forme homodimérique (West & Stock, 2001). Enfin, il est admis que deux monomères de PlcR se dimérisent via les domaines TPR (Declerck *et al.*, 2007). L'interaction entre Fnr et ResD confirme les résultats obtenus en Far Western Blot (article 2).

Les interactions les plus intéressantes et mises en évidence ici, sont celles entre le régulateur pléiotrope PlcR et les régulateurs redox Fnr et ResD. Elles suggèrent que ces régulateurs entrent dans un complexe moléculaire pour réguler la synthèse des entérotoxines chez *B. cereus*. Ce constat vient confirmer l'hypothèse ayant initiée cette étude. En effet la disposition des boîtes de fixation pour Fnr, ResD et PlcR sur les régions promotrices, laissait présager une action combinée de ces régulateurs.

Bien qu'il présente de nombreux avantages, le système du double hybride ne peut servir à détecter toutes les interactions protéiques. En effet, des protéines peuvent ne pas se replier correctement à l'intérieur de la cellule ou peuvent aussi ne pas être transloquées vers le noyau (comme les protéines membranaires par exemple). On suppose que ResE, qui est une protéine membranaire, entrera moins facilement en interaction avec des partenaires protéiques éventuels.

3.3 Réaction de pontage covalent entre les régulateurs

La méthode du double hybride permet de montrer que deux protéines sont capables d'interagir de façon binaire lorsqu'elles coexistent dans le noyau de la levure. La technique n'est pas suffisante en soi pour valider l'interaction. Afin d'explorer les interactions entre les régulateurs, nous avons aussi réalisé des expériences de pontage chimique.

Les protéines ResD, Fnr et PlcR purifiées ont été incubées en tampon 10 mM MOPS, pH 7.5 contenant 12.5 mM d'EDC et 5 mM de sulfo-NHS puis analysées sur gel SDS-PAGE 12%. Un mélange témoin des trois protéines sans agent réticulant a été déposé dans le puit n°1. Les puits 2 à 7 contiennent les deux protéines dont on souhaite étudier l'interaction.

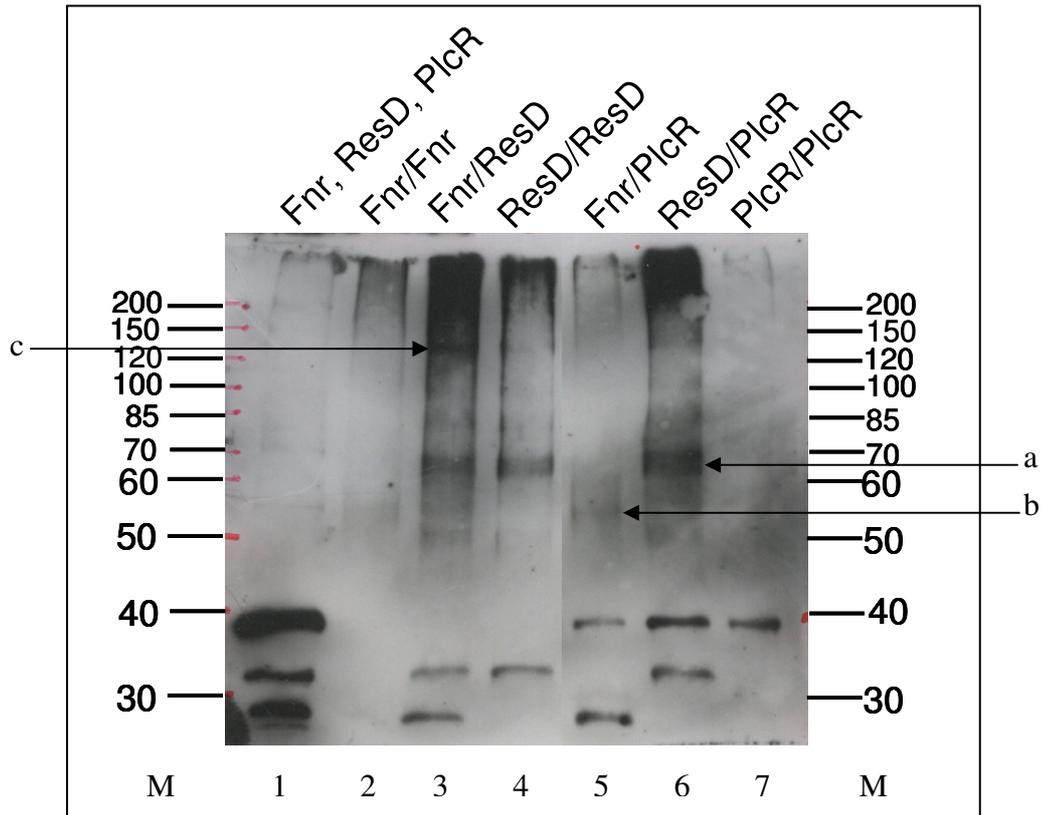


Figure 72 : Analyse SDS-PAGE couplée à une révélation anti-His des produits de pontage entre Fnr, ResD et PlcR.

Les résultats de pontage covalent montrent que ResD s'associe en dimère. Ceci est visualisé par l'apparition d'une bande à environ 65 kDa (piste 4 (complexe a)). Ce complexe est aussi retrouvé dans tous les puits présentant une migration de la protéine ResD après incubation avec les agents pontants (piste 3 et 6). Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus en double hybride.

Comme montré dans l'article 1, après réaction de pontage, Fnr se présente aussi sous la forme d'un dimère avec apparition d'une bande à environ 50 kDa (pistes 2 et 5 (complexe b)). L'incubation de PlcR avec les agents pontants ne conduit pas à la formation de structure quaternaire.

L'incubation de ResD et Fnr avec les réactifs de pontage conduit à l'apparition de deux bandes supplémentaires. Une bande à 65 kDa qui correspond au dimère de ResD déjà identifié et une bande à environ 120 kDa (piste 3 (complexe c)) qui correspond en taille au quadruple de la masse d'un monomère de ResD ou Fnr (environ 30 kDa). Il pourrait s'agir d'une association entre un dimère de ResD et un dimère de Fnr.

L'incubation de PlcR avec ResD et Fnr ne conduit pas à la formation d'oligomère dans ces conditions de pontages covalents (pistes 5, 6 et 7). Une interaction entre PlcR et les protéines ResD et Fnr ayant été mise en évidence par la technique du double hybride, on peut supposer que dans ce cas les conditions ne sont pas favorables pour que les protéines interagissent. Contrairement au double hybride, les expériences de cross-linking sont réalisées *in vitro* et les protéines étudiées présentent des extensions (tags) qui peuvent gêner leur repliement et donc leur activité.

Par la technique du double hybride, nous avons mis en évidence que le régulateur pléiotrope PlcR interagissait physiquement avec les régulateurs redox Fnr et ResD. Ceci est en accord avec la position des boîtes de fixation de ces régulateurs au niveau des régions promotrices des gènes codant pour les entérotoxines Hbl et Nhe. La régulation de la toxinogénèse pourrait donc faire intervenir un complexe protéique tripartite intégrant Fnr, ResD et PlcR.

Conclusion générale et perspectives

Les bactéries sont présentes dans la plupart des biotopes. Ces environnements sont en constante évolution, rendant les conditions de croissance de ces organismes plus ou moins favorables à leur développement. Ainsi, elles ont appris à détecter ces changements environnementaux et à adapter leur métabolisme en conséquence (Hoch, 2000). Les signaux détectés par les bactéries sont très divers et parmi eux on trouve le potentiel d'oxydoréduction. Chez les bactéries, la détection de ce signal environnemental fait intervenir des protéines dites "senseur" et il en résulte la mise en œuvre d'une réponse adaptative pouvant concerner le métabolisme ainsi que la virulence pour les organismes pathogènes. Notre modèle d'étude, *B. cereus*, est un pathogène alimentaire doté de grandes capacités métaboliques et capable de se développer dans des conditions de bas potentiel d'oxydoréduction.

Mes travaux de recherche s'inscrivent dans l'étude de la régulation de la toxinogénèse de *B. cereus*. Ils font suite à une étude réalisée sur l'effet de l'oxygène et d'un bas potentiel d'oxydoréduction sur la croissance et la toxinogénèse de la souche diarrhéique F4430/73. Cette étude avait abouti à la caractérisation de deux systèmes régulateurs impliqués dans le métabolisme mais aussi dans l'expression des entérotoxines. L'adaptation à un environnement réducteur tel que le milieu intestin où sont produites les entérotoxines, s'accompagne d'une activation de la production des toxines Hbl et Nhe. Cette activation implique au moins deux régulateurs rédox : la protéine à centre [Fe-S] Fnr et le système à deux composants ResDE. Mon travail a consisté en la caractérisation de ces deux systèmes.

Chez *B. cereus*, la production des facteurs majeurs de virulence est régulée par des mécanismes moléculaires complexes. Au début de cette étude, la protéine Fnr et le système à deux composants ResDE étaient deux nouveaux systèmes de régulation de la toxinogénèse identifiés chez *B. cereus*. Cependant leur mécanisme d'action restait totalement inconnu. Ce travail apporte les preuves moléculaires et biochimiques de leur implication dans la virulence de ce pathogène.

Nous avons montré que la protéine Fnr régulaït directement la transcription des gènes codant pour les entérotoxines Hbl et Nhe via sa fixation sur la région promotrice des gènes codant pour ces dernières. Cette étude a révélé que cette fixation de la protéine Fnr sur ses séquences d'ADN cibles, présentait plusieurs caractéristiques. Contrairement à son homologue chez *B. subtilis*, la protéine Fnr de *B. cereus* est un facteur transcriptionnel actif indépendamment de l'intégrité de son centre [Fe-S]. De plus, sous sa forme Apo, Fnr n'est capable de se fixer sur l'ADN que sous sa forme monomérique et son état d'oligomérisation dépend du POR. Un modèle de régulation de l'expression des entérotoxines en aérobiose impliquant Fnr et le POR a pu être proposé :

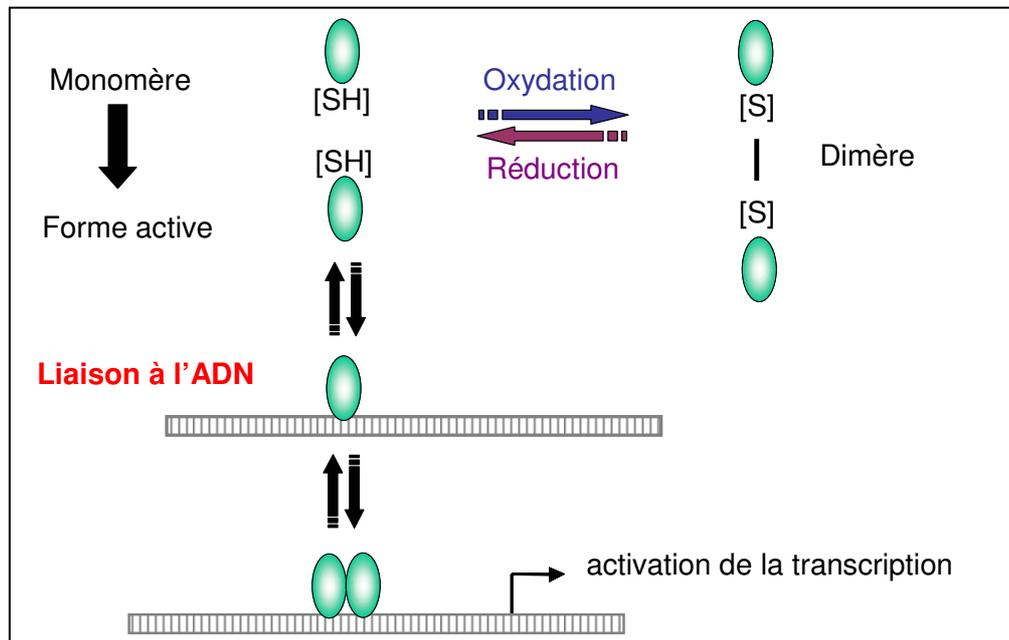


Figure 73 : Schéma hypothétique de la régulation de l'activité de l'apoFnr.

Nous avons montré que la protéine Fnr était capable d'incorporer un centre fer soufre en condition d'anaérobiose.

Afin de finaliser l'étude sur l'implication de la protéine Fnr dans la régulation de la toxigenèse, il conviendra de caractériser le domaine senseur de ce régulateur. Pour cela, nous avons entrepris une collaboration (Laboratoire de Biochimie, Biophysique et Systèmes Intégrés, CEA, Grenoble) pour déterminer, par une analyse de résonance paramagnétique électronique (RPE) après purification de l'apoprotéine et reconstitution de son centre [Fe-S], la nature et l'état d'oxydoréduction du centre [Fe-S] en anaérobiose. La RPE est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique. Elle est utilisée pour observer les entités moléculaires contenant des électrons non appariés ou des centres contenant des métaux de transition tels que le fer. Une fois la nature du centre connu, nous entreprendrons des dosages du fer et du soufre afin d'estimer la quantité présente dans la protéine Fnr. Ces données nous aideront à confirmer la nature du centre [Fe-S]. Une fois ces caractéristiques structurales établies, nous entreprendrons des expériences de retard sur gel sur les régions promotrices étudiées avec la protéine sous sa forme holo réduite et oxydée. Cette étude visera à identifier l'état redox associé au maximum d'activité du régulateur et à estimer sa sensibilité aux molécules senseurs O₂ (cas de l'aérobiose) et NO (cas de la respiration nitrate). On cherchera ensuite à déterminer les sites spécifiques de fixation de Fnr en réalisant des expériences de retard sur gel sur des séquences d'ADN plus restreintes des régions promotrices.

Les expériences menées sur le système à deux composants ResDE apportent de nouvelles données biochimiques permettant de mieux comprendre le mécanisme moléculaire responsable de la transduction du signal par ce système. Nous avons caractérisé le mécanisme de phosphorylation du senseur ResE et du régulateur ResD. Cette caractérisation a montré que ce système partage le mécanisme de base commun à tous les systèmes à deux composants. En effet nous avons montré que la protéine ResE présentait une activité d'autophosphorylation et de transphosphorylation de la protéine ResD.

Nous avons pu montrer que le régulateur ResD se lie à la séquence promotrice de son propre opéron, ce qui suggère que ce système est autorégulé, à l'instar de nombre d'autres systèmes à deux composants. ResD est capable de se fixer aux régions promotrices des gènes *ResDE*, *fnr*, *plcR*, *hbl* et *nhe* indépendamment de son état de phosphorylation et ResD présente une meilleure affinité pour les régions promotrices des entérotoxines et du régulateur pléiotrope PlcR. ResD phosphorylé (ResD-P) présente une meilleure affinité pour les régions promotrices de *resDE* et *fnr* tandis que ResD non phosphorylé se comporte de la même manière que ResD-P sur les régions promotrices de *plcR*, *hbl* et *nhe*. La phosphorylation de

ResD n'est donc pas indispensable pour sa fixation sur l'ADN mais semble augmenter son affinité pour certaines régions promotrices de gènes qu'il régule. De plus l'état de phosphorylation de ResD n'affecte ni son état d'oligomérisation ni sa capacité de fixation sur l'ADN. Enfin les deux régulateurs, ResD et Fnr, sont non seulement capables de lier l'ADN de manière coopérative mais interagissent ensemble indépendamment de la présence de leur ADN cible.

Des travaux antérieurs ont montré que ResD-P et Fnr étaient nécessaires pour l'activation de *nhe* et *hbl* et que Fnr ne pouvait pas induire leur activation en l'absence de ResD-P mais le pouvait en l'absence de ResD. En associant ces résultats à ceux obtenus au cours de cette étude, nous avons suggéré que ResD-P pourrait agir comme un co-activateur et que ResD agirait comme un anti-activateur du régulateur Fnr (voir figure ci-dessous).

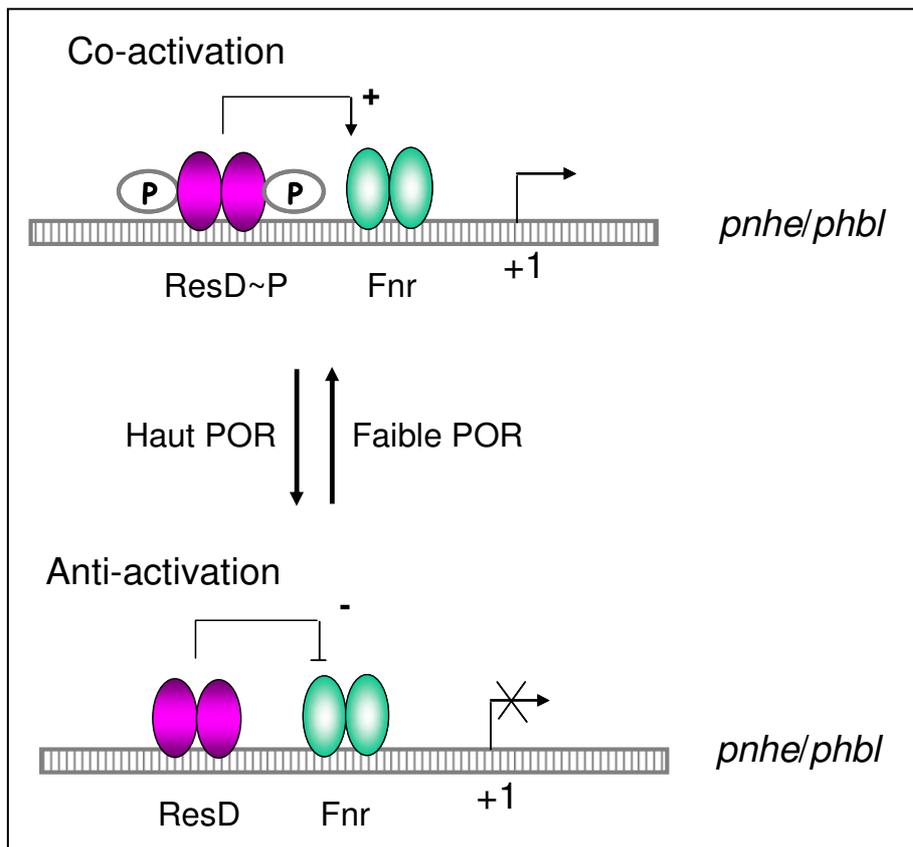


Figure 74 : Schéma hypothétique de la co-régulation de l'activité des entérotoxines par les régulateurs Fnr et ResD.

Ces résultats devront être confirmés par l'analyse de l'interaction ResD/Fnr en utilisant cette fois la forme Holo (c'est à dire reconstituée) du régulateur Fnr.

Cette étude a permis d'émettre l'hypothèse de l'implication d'un complexe triprotéique dans la régulation de la toxinogénèse. Les trois régulateurs : ResD, Fnr et PlcR semblent être capables de s'associer physiquement et on peut penser qu'ils coopèrent au sein d'un réseau complexe de régulation. Ces résultats seront à vérifier.

L'interaction entre ResD, Fnr et PlcR et la formation de complexes supramoléculaires devra être étudiée de façon plus approfondie. Des expériences utilisant la technologie BIAcore sont envisageables. Cette technique permet d'étudier les interactions moléculaires en temps réel sans marquage des interactants. Le suivi en temps réel permet de déterminer les constantes cinétiques d'association et de dissociation, et d'en déduire la valeur de la constante d'affinité. La concentration en molécules fonctionnelles, la stoechiométrie, la cartographie des sites d'interaction ainsi que certains paramètres thermodynamiques peuvent également être déterminés par cette technologie.

L'identification d'autres partenaires des régulateurs Fnr et ResD sera envisagée à l'aide d'une autre application du double hybride. Il s'agira d'un véritable crible génétique utilisant des banques de protéines de fusion réalisée à partir d'ADN génomique de *B. cereus*. Deux banques d'ADN génomique ont déjà été construites à cet effet dans le plasmide pGADT7. Celles-ci seront criblées en utilisant Fnr et ResD comme appâts.

Afin d'identifier d'autres régulateurs de la virulence de *B. cereus*, une analyse comparative du protéome des mutants $\Delta resDE$, $\Delta resE$ et Δfnr pourra aussi être envisagée. Ce type d'approche protéomique a déjà été réalisée et plusieurs facteurs de virulence ont été identifiés à partir du protéome extracellulaire de *B. cereus* ATCC14579 (Gohar *et al.*, 2002).

Cette étude apporte pour la première fois la "preuve moléculaire" de l'implication des régulateurs Fnr et ResDE dans un mécanisme pouvant moduler la virulence de *B. cereus* en réponse à un changement de l'état redox du milieu. Outre son rôle sur le mécanisme de fonctionnement de ces régulateurs, le potentiel d'oxydoréduction est un paramètre dont l'étude prend énormément d'importance. La croissance des micro-organismes est influencée par les conditions physico-chimiques de leur environnement. En effet, chaque espèce a ses propres conditions optimales de développement suivant la température, le pH, la pression osmotique ou encore le potentiel d'oxydoréduction. Ce dernier est un facteur présent dans un grand nombre d'environnement et son impact sur les produits de l'industrie agro-alimentaire lui donne un intérêt tout particulier.

Comprendre les mécanismes moléculaires qui confèrent à une bactérie pathogène l'aptitude à s'adapter, coloniser et envahir un environnement, constitue un enjeu de première importance et peut guider la conception de nouvelles stratégies de lutte contre les agents pathogènes.

Références bibliographiques

1. **Agaisse, H., Gominet, M., Okstad, O. A., Kolsto, A. B. & Lereclus, D. (1999).** PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* **32**, 1043-1053.
2. **Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. & Isobe, M. (1994).** A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* **121**, 31-34.
3. **Agata, N., Ohta, M., Arakawa, Y. & Mori, M. (1995).** The bceT gene of *Bacillus cereus* encodes an enterotoxic protein. *Microbiology* **141** (Pt 4), 983-988.
4. **Alex, L. A. & Simon, M. I. (1994).** Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *SO - Trends Genet* 1994 Apr;10(4):133-8.
5. **Amrein, K. E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N. A. & Burn, P. (1995).** Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *SO - Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Feb 14;92(4):1048-52.
6. **Andersson, A., Ronner, U. & Granum, P. E. (1995).** What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int J Food Microbiol* **28**, 145-155.
7. **Aronson, A. (2002).** Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *SO - Cell Mol Life Sci* 2002 Mar;59(3):417-25.
8. **Barrett, J. F. & Hoch, J. A. (1998).** Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. *SO - Antimicrob Agents Chemother* 1998 Jul;42(7):1529-36.
9. **Baruah, A., Lindsey, B., Zhu, Y. & Nakano, M. M. (2004).** Mutational analysis of the signal-sensing domain of ResE histidine kinase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**, 1694-1704.
10. **Bauer, C. E., Elsen, S. & Bird, T. H. (1999).** Mechanisms for redox control of gene expression. *Annu Rev Microbiol* **53**, 495-523.
11. **Beecher, D. J. & Macmillan, J. D. (1991).** Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *SO - Infect Immun* 1991 May;59(5):1778-84.
12. **Beecher, D. J. & Wong, A. C. (1994).** Improved purification and characterization of hemolysin BL, a hemolytic dermonecrotic vascular permeability factor from *Bacillus cereus*. *SO - Infect Immun* 1994 Mar;62(3):980-6.
13. **Beecher, D. J., Schoeni, J. L. & Wong, A. C. (1995).** Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *SO - Infect Immun* 1995 Nov;63(11):4423-8.

14. **Beecher, D. J., Olsen, T. W., Somers, E. B. & Wong, A. C. (2000).** Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infect Immun* **68**, 5269-5276.
15. **Bischoff, D. S. & Ordal, G. W. (1991).** Sequence and characterization of *Bacillus subtilis* CheB, a homolog of *Escherichia coli* CheY, and its role in a different mechanism of chemotaxis. *SO - J Biol Chem* 1991 Jul 5;266(19):12301-5.
16. **Bock, A. & Gross, R. (2002).** The unorthodox histidine kinases BvgS and EvgS are responsive to the oxidation status of a quinone electron carrier. *Eur J Biochem* **269**, 3479-3484.
17. **Bouillaut, L., Perchat, S., Arold, S., Zorrilla, S., Slamti, L., Henry, C., Gohar, M., Declerck, N. & Lereclus, D. (2008).** Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *SO - Nucleic Acids Res* 2008 Jun;36(11):3791-801 Epub 2008 May 20.
18. **Bourret, R. B., Hess, J. F., Borkovich, K. A., Pakula, A. A. & Simon, M. I. (1989).** Protein phosphorylation in chemotaxis and two-component regulatory systems of bacteria. *SO - J Biol Chem* 1989 May 5;264(13):7085-8.
19. **Brennan, R. G. & Matthews, B. W. (1989).** Structural basis of DNA-protein recognition. *SO - Trends Biochem Sci* 1989 Jul;14(7):286-90.
20. **Browning, D. F., Busby, S. J., Grainger, D. C., Aiba, H., Hurd, D., Browning, D. F. & Busby, S. J. (2004).** The regulation of bacterial transcription initiation
21. **Burbulys, D., Trach, K. A. & Hoch, J. A. (1991).** Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *SO - Cell* 1991 Feb 8;64(3):545-52.
22. **Busby, S. & Ebright, R. H. (1999).** Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *SO - J Mol Biol* 1999 Oct 22;293(2):199-213.
23. **Buyser, M.L., D. (2008).** investigation d'une TIAC en maison de retraite: un cocktail de *Bacillus cereus*. *bulletin Epidemiologique de l'AFSSA* **27-28**, 6.
24. **Callegan, M. C., Kane, S. T., Cochran, D. C., Gilmore, M. S., Gominet, M. & Lereclus, D. (2003).** Relationship of plcR-regulated factors to *Bacillus* endophthalmitis virulence. *Infection and Immunity* **71**, 3116-3124.
25. **Chang, C. & Shockey, J. A. (1999).** The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *SO - Curr Opin Plant Biol* 1999 Oct;2(5):352-8.
26. **Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. & Fields, S. (1991).** The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *SO - Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Nov 1;88(21):9578-82.

-
27. **Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C. & Schmitt, P. (2004).** Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol* **97**, 214-219.
28. **Compan, I. & Touati, D. (1994).** Anaerobic activation of *arcA* transcription in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA. *SO - Mol Microbiol* 1994 Mar;11(5):955-64.
29. **Constantinidou, C., Hobman, J. L., Griffiths, L., Patel, M. D., Penn, C. W., Cole, J. A. & Overton, T. W. (2006).** A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. *SO - J Biol Chem* 2006 Feb 24;281(8):4802-15 Epub 2005 Dec 22.
30. **Cossart, P. & Gicquel-Sanzey, B. (1982).** Cloning and sequence of the *crp* gene of *Escherichia coli* K 12. *SO - Nucleic Acids Res* 1982 Feb 25;10(4):1363-78.
31. **Crack, J., Green, J. & Thomson, A. J. (2004).** Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *SO - J Biol Chem* 2004 Mar 5;279(10):9278-86 Epub 2003 Nov 25.
32. **Crack, J. C., Jervis, A. J., Gaskell, A. A., White, G. F., Green, J., Thomson, A. J. & Le Brun, N. E. (2008).** Signal perception by FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *SO - Biochem Soc Trans* 2008 Dec;36(Pt 6):1144-8.
33. **Crews, S. T., Thomas, J. B. & Goodman, C. S. (1988).** The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product. *SO - Cell* 1988 Jan 15;52(1):143-51.
34. **Cruz Ramos, H., Boursier, L., Moszer, I., Kunst, F., Danchin, A. & Glaser, P. (1995).** Anaerobic transcription activation in *Bacillus subtilis*: identification of distinct FNR-dependent and -independent regulatory mechanisms. *Embo J* **14**, 5984-5994.
35. **de Been, M., Francke, C., Moezelaar, R., Abee, T. & Siezen, R. J. (2006).** Comparative analysis of two-component signal transduction systems of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis*. *Microbiology* **152**, 3035-3048.
36. **Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F., Lereclus, D. & Arold, S. T. (2007).** Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *SO - Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Nov 20;104(47):18490-5 Epub 2007 Nov 12.
37. **Di Franco, C., Beccari, E., Santini, T., Pisaneschi, G. & Tecce, G. (2002).** Colony shape as a genetic trait in the pattern-forming *Bacillus mycoides*. *SO - BMC Microbiol* 2002 Nov 13;2:33 Epub 2002 Nov 13.
38. **Dibden, D. P. & Green, J. (2005).** In vivo cycling of the *Escherichia coli* transcription factor FNR between active and inactive states. *Microbiology* **151**, 4063-4070.
39. **Drobniewski, F. A. (1993).** *Bacillus cereus* and related species. *SO - Clin Microbiol Rev* 1993 Oct;6(4):324-38.

-
40. **Duport, C., Thomassin, S., Bourel, G. & Schmitt, P. (2004).** Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Arch Microbiol* **182**, 90-95.
 41. **Duport, C., Zigha, A., Rosenfeld, E. & Schmitt, P. (2006).** Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriol* **188**, 6640-6651.
 42. **Dutta, R., Qin, L. & Inouye, M. (1999).** Histidine kinases: diversity of domain organization. *SO - Mol Microbiol* 1999 Nov;34(4):633-40.
 43. **Ebright, R. H., Ebright, Y. W. & Gunasekera, A. (1989).** Consensus DNA site for the *Escherichia coli* catabolite gene activator protein (CAP): CAP exhibits a 450-fold higher affinity for the consensus DNA site than for the *E. coli* lac DNA site. *SO - Nucleic Acids Res* 1989 Dec 25;17(24):10295-305.
 44. **Echenique, J. R., Chapuy-Regaud, S. & Trombe, M. C. (2000).** Competence regulation by oxygen in *Streptococcus pneumoniae*: involvement of ciaRH and comCDE. *Mol Microbiol* **36**, 688-696.
 45. **Echenique, J. R. & Trombe, M. C. (2001).** Competence modulation by the NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae* involves signal transduction. *J Bacteriol* **183**, 768-772.
 46. **Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E. & Rman, D. A. (2005).** Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**, 1635-1638.
 47. **Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M. H., Monthan, A., Berge, O., Fricker, M. & Svensson, B. (2006).** Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* **260**, 232-240.
 48. **Emptage, M. H., Kent, T. A., Kennedy, M. C., Beinert, H. & Munck, E. (1983).** Mossbauer and EPR studies of activated aconitase: development of a localized valence state at a subsite of the [4Fe-4S] cluster on binding of citrate. *SO - Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 Aug;80(15):4674-8.
 49. **Farr, S. B. & Kogoma, T. (1991).** Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *SO - Microbiol Rev* 1991 Dec;55(4):561-85.
 50. **Fields, S. & Song, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *SO - Nature* 1989 Jul 20;340(6230):245-6.
 51. **Fontecave, M., Choudens, S. O., Py, B. & Barras, F. (2005).** Mechanisms of iron-sulfur cluster assembly: the SUF machinery. *SO - J Biol Inorg Chem* 2005 Nov;10(7):713-21 Epub 2005 Nov 8.

-
52. **Fontecave, M. & Ollagnier-de-Choudens, S. (2008).** Iron-sulfur cluster biosynthesis in bacteria: Mechanisms of cluster assembly and transfer. *SO - Arch Biochem Biophys* 2008 Jun 15;474(2):226-37 Epub 2007 Dec 28.
53. **Frankland, G. C. & Frankland, P. R. (1887).** Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **173**, 256-287.
54. **Gardner, P. R. & Fridovich, I. (1991).** Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *SO - J Biol Chem* 1991 Jan 25;266(3):1478-83.
55. **Geng, H., Nakano, S. & Nakano, M. M. (2004).** Transcriptional activation by *Bacillus subtilis* ResD: tandem binding to target elements and phosphorylation-dependent and -independent transcriptional activation. *J Bacteriol* **186**, 2028-2037.
56. **Geng, H., Zuber, P. & Nakano, M. M. (2007).** Regulation of respiratory genes by ResD-ResE signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *SO - Methods Enzymol* 2007;422:448-64.
57. **Gohar, M., Okstad, O. A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolsto, A. B. & Lereclus, D. (2002).** Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* **2**, 784-791.
58. **Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnun, S., Okstad, O. A., Gominet, M., Kolsto, A. B. & Lereclus, D. (2008).** The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *SO - PLoS ONE* 2008 Jul 30;3(7):e2793.
59. **Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. (1949).** Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *SO - J Biol Chem* 1949 Feb;177(2):751-66.
60. **Grandvalet, C., Gominet, M. & Lereclus, D. (2001).** Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis* inhA metalloprotease gene at the onset of sporulation. *SO - Microbiology* 2001 Jul;147(Pt 7):1805-13.
61. **Granum, P. E. (1994).** *Bacillus cereus* and its toxins. *SO - Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 1994;23:61S-66S.
62. **Granum, P. E., Tomas, J. M. & Alouf, J. E. (1995).** A survey of bacterial toxins involved in food poisoning: a suggestion for bacterial food poisoning toxin nomenclature. *SO - Int J Food Microbiol* 1995 Dec;28(2):129-44.
63. **Granum, P. E. & Lund, T. (1997).** *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Lett* **157**, 223-228.
64. **Granum, P. E., O'Sullivan, K. & Lund, T. (1999).** The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* **177**, 225-229.
65. **Green, J., Bennett, B., Jordan, P., Ralph, E. T., Thomson, A. J. & Guest, J. R. (1996a).** Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch in vitro. *SO - Biochem J* 1996 Jun 15;316 (Pt 3):887-92.

-
66. **Green, J., Irvine, A. S., Meng, W. & Guest, J. R. (1996b).** FNR-DNA interactions at natural and semi-synthetic promoters. *SO - Mol Microbiol* 1996 Jan;19(1):125-37.
67. **Guyton, A. C. (1977).** *Basic Human Physiology : Normal Function and Mechanisms of Disease*, 2 edn: Elsevier Health Sciences.
68. **Hartig, E., Geng, H., Hartmann, A., Hubacek, A., Munch, R., Ye, R. W., Jahn, D. & Nakano, M. M. (2004).** *Bacillus subtilis* ResD induces expression of the potential regulatory genes yclJK upon oxygen limitation. *J Bacteriol* **186**, 6477-6484.
69. **Hauge, S. (1955).** Food poisoning caused by aerobic spore-forming *Bacilli*. *J Appl Bacteriol* **18**, 591-595.
70. **Hill, K. K., Ticknor, L. O., Okinaka, R. T. & other authors (2004).** Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1068-1080.
71. **Hoch, J. A. & Varughese, K. I. (2001).** Keeping signals straight in phosphorelay signal transduction. *SO - J Bacteriol* 2001 Sep;183(17):4941-9.
72. **Hoffman, E. C., Reyes, H., Chu, F. F., Sander, F., Conley, L. H., Brooks, B. A. & Hankinson, O. (1991).** Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *SO - Science* 1991 May 17;252(5008):954-8.
73. **Hoffmaster, A. R., Ravel, J., Rasko, D. A. & other authors (2004).** Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *SO - Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 Jun 1;101(22):8449-54 Epub 2004 May 21.
74. **Hoton, F. M., Andrup, L., Swiecicka, I. & Mahillon, J. (2005).** The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmid-borne. *SO - Microbiology* 2005 Jul;151(Pt 7):2121-4.
75. **Itou, H. & Tanaka, I. (2001).** The OmpR-family of proteins: insight into the tertiary structure and functions of two-component regulator proteins. *SO - J Biochem* 2001 Mar;129(3):343-50.
76. **Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I. & other authors (2003).** Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**, 87-91.
77. **Jackson, S. G., Goodbrand, R. B., Ahmed, R. & Kasatiya, S. (1995).** *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *SO - Lett Appl Microbiol* 1995 Aug;21(2):103-5.
78. **Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E. & Dean, D. R. (1989).** Biochemical and genetic analysis of the nifUSVWZM cluster from *Azotobacter vinelandii*. *SO - Mol Gen Genet* 1989 Oct;219(1-2):49-57.
79. **Jensen, G. B., Hansen, B. M., Eilenberg, J. & Mahillon, J. (2003).** The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ Microbiol* **5**, 631-640.

-
80. **Jobin, M. P., Clavel, T., Carlin, F. & Schmitt, P. (2002).** Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415. *Int J Food Microbiol* **79**, 65-73.
81. **Johnson, D. C., Dean, D. R., Smith, A. D. & Johnson, M. K. (2005).** Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. **74**, 247-281.
82. **Johnson, M. K., Bennett, D. E., Morningstar, J. E., Adams, M. W. & Mortenson, L. E. (1985).** The iron-sulfur cluster composition of *Escherichia coli* nitrate reductase. *SO - J Biol Chem* 1985 May 10;260(9):5456-63.
83. **Kenney, L. J. (2002).** Structure/function relationships in OmpR and other winged-helix transcription factors. *SO - Curr Opin Microbiol* 2002 Apr;5(2):135-41.
84. **Khoroshilova, N., Beinert, H. & Kiley, P. J. (1995).** Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding. *SO - Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Mar 28;92(7):2499-503.
85. **Kiley, P. J. & Beinert, H. (1998).** Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster. *SO - FEMS Microbiol Rev* 1998 Dec;22(5):341-52.
86. **Kiley, P. J. & Beinert, H. (2003).** The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 181-185.
87. **Klichko, V. I., Miller, J., Wu, A., Popov, S. G. & Alibek, K. (2003).** Anaerobic induction of *Bacillus anthracis* hemolytic activity. *Biochem Biophys Res Commun* **303**, 855-862.
88. **Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S. & Adhya, S. (1993).** Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *SO - Annu Rev Biochem* 1993;62:749-95.
89. **Kramer, J. M. a. G., R.J. (1989).** *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *Foodborne Bacterial Pathogens*, 21-70.
90. **Krebs, C., Agar, J. N., Smith, A. D., Frazzon, J., Dean, D. R., Huynh, B. H. & Johnson, M. K. (2001).** IscA, an alternate scaffold for Fe-S cluster biosynthesis. *SO - Biochemistry* 2001 Nov 20;40(46):14069-80.
91. **Krishnan, H. H., Ghosh, A., Paul, K. & Chowdhury, R. (2004).** Effect of anaerobiosis on expression of virulence factors in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **72**, 3961-3967.
92. **Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *SO - Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
93. **Lamberg, K. E. & Kiley, P. J. (2000).** FNR-dependent activation of the class II *dmsA* and *narG* promoters of *Escherichia coli* requires FNR-activating regions 1 and 3. *SO - Mol Microbiol* 2000 Nov;38(4):817-27.
94. **Lampidis, R., Gross, R., Sokolovic, Z., Goebel, W. & Kreft, J. (1994).** The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria*

- monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. *Mol Microbiol* **13**, 141-151.
95. **Landini, P. & Zehnder, A. J. (2002)**. The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol* **184**, 1522-1529.
96. **Larsen, M. H., Kallipolitis, B. H., Christiansen, J. K., Olsen, J. E. & Ingmer, H. (2006)**. The response regulator ResD modulates virulence gene expression in response to carbohydrates in *Listeria monocytogenes*. *SO - Mol Microbiol* 2006 Sep;61(6):1622-35.
97. **Laub, M. T. & Goulian, M. (2007)**. Specificity in two-component signal transduction pathways. *SO - Annu Rev Genet* 2007;41:121-45.
98. **Layer, G., Ollagnier-de Choudens, S., Sanakis, Y. & Fontecave, M. (2006)**. Iron-sulfur cluster biosynthesis: characterization of *Escherichia coli* CYaY as an iron donor for the assembly of [2Fe-2S] clusters in the scaffold IscU. *SO - J Biol Chem* 2006 Jun 16;281(24):16256-63 Epub 2006 Apr 9.
99. **Lazazzera, B. A., Bates, D. M. & Kiley, P. J. (1993)**. The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state. *SO - Genes Dev* 1993 Oct;7(10):1993-2005.
100. **Leclerc, G. J., Tartera, C. & Metcalf, E. S. (1998)**. Environmental regulation of *Salmonella typhi* invasion-defective mutants. *Infect Immun* **66**, 682-691.
101. **Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Salamitou, S. & Sanchis, V. (1996)**. Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *J Bacteriol* **178**, 2749-2756.
102. **Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S. & Gominet, M. (2000)**. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int J Med Microbiol* **290**, 295-299.
103. **Li, B. & Fields, S. (1993)**. Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *SO - FASEB J* 1993 Jul;7(10):957-63.
104. **Lindback, T., Fagerlund, A., Rodland, M. S. & Granum, P. E. (2004)**. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *SO - Microbiology* 2004 Dec;150(Pt 12):3959-67.
105. **Loiseau, L., Ollagnier-de-Choudens, S., Nachin, L., Fontecave, M. & Barras, F. (2003)**. Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *SO - J Biol Chem* 2003 Oct 3;278(40):38352-9 Epub 2003 Jul 21.

-
106. **Loiseau, L., Ollagnier-de Choudens, S., Lascoux, D., Forest, E., Fontecave, M. & Barras, F. (2005).** Analysis of the heteromeric CsdA-CsdE cysteine desulfurase, assisting Fe-S cluster biogenesis in *Escherichia coli*. *SO - J Biol Chem* 2005 Jul 22;280(29):26760-9 Epub 2005 May 18.
107. **Loomis, W. F., Shaulsky, G. & Wang, N. (1997).** Histidine kinases in signal transduction pathways of eukaryotes. *SO - J Cell Sci* 1997 May;110 (Pt 10):1141-5.
108. **Lund, T., De Buyser, M. L. & Granum, P. E. (2000).** A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* **38**, 254-261.
109. **Magalhaes, J. G., Tattoli, I. & Girardin, S. E. (2007).** The intestinal epithelium barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* (sous presse)
110. **Margulis, L., Jorgensen, J. Z., Dolan, S., Kolchinsky, R., Rainey, F. A. & Lo, S. C. (1998).** The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 1236-1241.
111. **Massey, V. & Hemmerich, P. (1978).** Photoreduction of flavoproteins and other biological compounds catalyzed by deazaflavins. *SO - Biochemistry* 1978 Jan 10;17(1):9-16.
112. **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.
113. **Mettert, E. L. & Kiley, P. J. (2005).** ClpXP-dependent proteolysis of FNR upon loss of its O₂-sensing [4Fe-4S] cluster. *SO - J Mol Biol* 2005 Nov 25;354(2):220-32 Epub 2005 Oct 7.
114. **Mettert, E. L., Outten, F. W., Wanta, B. & Kiley, P. J. (2008).** The Impact of O₂ on the Fe-S Cluster Biogenesis Requirements of *Escherichia coli* FNR. *SO - J Mol Biol* 2008 Oct 10.
115. **Mignot, T., Mock, M., Robichon, D., Landier, A., Lereclus, D. & Fouet, A. (2001).** The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Molecular Microbiology* **42**, 1189-1198.
116. **Mihara, H., Kurihara, T., Yoshimura, T. & Esaki, N. (2000).** Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*: mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *SO - J Biochem* 2000 Apr;127(4):559-67.
117. **Mikkola, R., Saris, N. E., Grigoriev, P. A., Andersson, M. A. & Salkinoja-Salonen, M. S. (1999).** Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Eur J Biochem* **263**, 112-117.
118. **Mizuno, T. & Tanaka, I. (1997).** Structure of the DNA-binding domain of the OmpR family of response regulators. *SO - Mol Microbiol* 1997 May;24(3):665-7.
-

-
119. **Mock, M. & Fouet, A. (2001).** Anthrax. *Annu Rev Microbiol* **55**, 647-671.
120. **Moore, L. J. & Kiley, P. J. (2001).** Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor. *SO - J Biol Chem* 2001 Dec 7;276(49):45744-50 Epub 2001 Oct 1.
121. **Moravek, M., Wegscheider, M., Schulz, A., Dietrich, R., Burk, C. & Martlbauer, E. (2004).** Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*. *SO - FEMS Microbiol Lett* 2004 Sep 1;238(1):107-13.
122. **Moriarty-Craige, S. E. & Jones, D. P. (2004).** Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr* **24**, 481-509.
123. **Mortenson, L. E., Valentine, R. C. & Carnahan, J. E. (1962).** An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*. *SO - Biochem Biophys Res Commun* 1962 Jun 4;7:448-52.
124. **Munch, R., Hiller, K., Grote, A., Scheer, M., Klein, J., Schobert, M. & Jahn, D. (2005).** Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *SO - Bioinformatics* 2005 Nov 15;21(22):4187-9 Epub 2005 Aug 18.
125. **Nachin, L., Loiseau, L., Expert, D. & Barras, F. (2003).** SufC: an unorthodox cytoplasmic ABC/ATPase required for [Fe-S] biogenesis under oxidative stress. *SO - EMBO J* 2003 Feb 3;22(3):427-37.
126. **Nakano, M. M., Zuber, P., Glaser, P., Danchin, A. & Hulett, F. M. (1996).** Two-component regulatory proteins ResD-ResE are required for transcriptional activation of *fnr* upon oxygen limitation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**, 3796-3802.
127. **Nakano, M. M. & Zuber, P. (1998).** Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *SO - Annu Rev Microbiol* 1998;52:165-90.
128. **Nakano, M. M., Zhu, Y., Lacelle, M., Zhang, X. & Hulett, F. M. (2000).** Interaction of ResD with regulatory regions of anaerobically induced genes in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **37**, 1198-1207.
129. **Nambu, J. R., Lewis, J. O., Wharton, K. A., Jr. & Crews, S. T. (1991).** The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development. *SO - Cell* 1991 Dec 20;67(6):1157-67.
130. **Nixon, B. T., Ronson, C. W. & Ausubel, F. M. (1986).** Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes *ntrB* and *ntrC*. *SO - Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Oct;83(20):7850-4.
131. **Ollagnier-de Choudens, S., Loiseau, L., Sanakis, Y., Barras, F. & Fontecave, M. (2005).** Quinolate synthetase, an iron-sulfur enzyme in NAD biosynthesis. *SO - FEBS Lett* 2005 Jul 4;579(17):3737-43.

-
132. **Ota, I. M. & Varshavsky, A. (1993).** A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *SO - Science* 1993 Oct 22;262(5133):566-9.
133. **Outten, F. W., Wood, M. J., Munoz, F. M. & Storz, G. (2003).** The SufE protein and the SufBCD complex enhance SufS cysteine desulfurase activity as part of a sulfur transfer pathway for Fe-S cluster assembly in *Escherichia coli*. *SO - J Biol Chem* 2003 Nov 14;278(46):45713-9 Epub 2003 Aug 26.
134. **Outten, F. W., Djaman, O. & Storz, G. (2004).** A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *SO - Mol Microbiol* 2004 May;52(3):861-72.
135. **Outten, F. W. (2007).** Iron-sulfur clusters as oxygen-responsive molecular switches. *SO - Nat Chem Biol* 2007 Apr;3(4):206-7.
136. **Overton, T. W., Whitehead, R., Li, Y., Snyder, L. A., Saunders, N. J., Smith, H. & Cole, J. A. (2006).** Coordinated regulation of the *Neisseria gonorrhoeae*-truncated denitrification pathway by the nitric oxide-sensitive repressor, NsrR, and nitrite-insensitive NarQ-NarP. *SO - J Biol Chem* 2006 Nov 3;281(44):33115-26 Epub 2006 Sep 5.
137. **Parkinson, J. S. & Kofoid, E. C. (1992).** Communication modules in bacterial signaling proteins. *SO - Annu Rev Genet* 1992;26:71-112.
138. **Pastore, C., Adinolfi, S., Huynen, M. A., Rybin, V., Martin, S., Mayer, M., Bukau, B. & Pastore, A. (2006).** YfhJ, a molecular adaptor in iron-sulfur cluster formation or a frataxin-like protein? *SO - Structure* 2006 May;14(5):857-67.
139. **Perraud, A. L., Weiss, V. & Gross, R. (1999).** Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *SO - Trends Microbiol* 1999 Mar;7(3):115-20.
140. **Pomerantsev, A. P., Kalnin, K. V., Osorio, M. & Leppla, S. H. (2003).** Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infect Immun* 71, 6591-6606.
141. **Poulos, T. L. & Kraut, J. (1980).** A hypothetical model of the cytochrome c peroxidase . cytochrome c electron transfer complex. *SO - J Biol Chem* 1980 Nov 10;255(21):10322-30.
142. **Pratt, L. A. & Silhavy, T. J. (1995).** Identification of base pairs important for OmpR-DNA interaction. *SO - Mol Microbiol* 1995 Aug;17(3):565-73.
143. **Puri-Taneja, A., Schau, M., Chen, Y. & Hulett, F. M. (2007).** Regulators of the *Bacillus subtilis* cydABCD operon: identification of a negative regulator, CcpA, and a positive regulator, ResD. *SO - J Bacteriol* 2007 May;189(9):3348-58 Epub 2007 Feb 23.
144. **Ramarao, N. & Lereclus, D. (2005).** The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B-cereus* group to escape macrophages. *Cellular Microbiology* 7, 1357-1364.
145. **Rasko, D. A., Altherr, M. R., Han, C. S. & Ravel, J. (2005).** Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *SO - FEMS Microbiol Rev* 2005 Apr;29(2):303-29.

-
146. **Reents, H., Gruner, I., Harmening, U., Bottger, L. H., Layer, G., Heathcote, P., Trautwein, A. X., Jahn, D. & Hartig, E. (2006a).** *Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state. *Mol Microbiol* **60**, 1432-1445.
147. **Reents, H., Munch, R., Dammeyer, T., Jahn, D. & Hartig, E. (2006b).** The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**, 1103-1112.
148. **Ruzicka, F. J. & Beinert, H. (1978).** The soluble "high potential" type iron-sulfur protein from mitochondria is aconitase. *SO - J Biol Chem* 1978 Apr 25;253(8):2514-7.
149. **Sambrook, J. & Gething, M. J. (1989).** Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature* **342**, 224-225.
150. **Sawers, G. & Bock, A. (1988).** Anaerobic regulation of pyruvate formate-lyase from *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **170**, 5330-5336.
151. **Schoeni, J. L. & Wong, A. C. (2005).** *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *SO - J Food Prot* 2005 Mar;68(3):636-48.
152. **Schwartz, C. J., Djaman, O., Imlay, J. A. & Kiley, P. J. (2000).** The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *SO - Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Aug 1;97(16):9009-14.
153. **Sengupta, N., Paul, K. & Chowdhury, R. (2003).** The global regulator ArcA modulates expression of virulence factors in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **71**, 5583-5589.
154. **Shaw, D. J., Rice, D. W. & Guest, J. R. (1983).** Homology between CAP and Fnr, a regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **166**, 241-247.
155. **Shinagawa, K., Ueno, Y., Hu, D., Ueda, S. & Sugii, S. (1996).** Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *SO - J Vet Med Sci* 1996 Oct;58(10):1027-9.
156. **Slamti, L. & Lereclus, D. (2002).** A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Embo J* **21**, 4550-4559.
157. **Slamti, L., Perchat, S., Gominet, M. & other authors (2004).** Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J Bacteriol* **186**, 3531-3538.
158. **Spira, W. M. & Goepfert, J. M. (1975).** Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Can J Microbiol* **21**, 1236-1246.
159. **Spiro, S., Gaston, K. L., Bell, A. I., Roberts, R. E., Busby, S. J. & Guest, J. R. (1990).** Interconversion of the DNA-binding specificities of two related transcription regulators, CRP and FNR. *SO - Mol Microbiol* 1990 Nov;4(11):1831-8.

-
160. **Spiro, S. & Guest, J. R. (1990).** FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *SO - FEMS Microbiol Rev* 1990 Aug;6(4):399-428.
161. **Staros, J. V., Wright, R. W. & Swingle, D. M. (1986).** Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *SO - Anal Biochem* 1986 Jul;156(1):220-2.
162. **Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. & Granum, P. E. (2008).** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *SO - FEMS Microbiol Rev* 2008 Jul;32(4):579-606 Epub 2008 Apr 15.
163. **Stock, J. B., Ninfa, A. J. & Stock, A. M. (1989).** Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *SO - Microbiol Rev* 1989 Dec;53(4):450-90.
164. **Sun, G., Sharkova, E., Chesnut, R., Birkey, S., Duggan, M. F., Sorokin, A., Pujic, P., Ehrlich, S. D. & Hulett, F. M. (1996).** Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**, 1374-1385.
165. **Takahashi, Y. & Nakamura, M. (1999).** Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *SO - J Biochem* 1999 Nov;126(5):917-26.
166. **Takahashi, Y. & Tokumoto, U. (2002).** A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *SO - J Biol Chem* 2002 Aug 9;277(32):28380-3 Epub 2002 Jun 27.
167. **Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C. & Faille, C. (2006).** Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. *SO - Int J Food Microbiol* 2006 Aug 1;110(3):254-62 Epub 2006 Jun 21.
168. **Tokumoto, U. & Takahashi, Y. (2001).** Genetic analysis of the isc operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *SO - J Biochem* 2001 Jul;130(1):63-71.
169. **Turell, M. J. & Knudson, G. B. (1987).** Mechanical transmission of *Bacillus anthracis* by stable flies (*Stomoxys calcitrans*) and mosquitoes (*Aedes aegypti* and *Aedes taeniorhynchus*). *SO - Infect Immun* 1987 Aug;55(8):1859-61.
170. **Van der Auwera, G. A., Timmerly, S., Hoton, F. & Mahillon, J. (2007).** Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *SO - Int J Food Microbiol* 2007 Jan 25;113(2):164-72 Epub 2006 Sep 25.
171. **Vetter, S. M. & Schlievert, P. M. (2007).** The Two-Component System *Bacillus* Respiratory Response A and B (BrrA-BrrB) Is a Virulence Factor Regulator in *Bacillus anthracis*. *SO - Biochemistry* 2007 Jun 26;46(25):7343-52 Epub 2007 May 31.
172. **Waterman, S. R. & Small, P. L. (1998).** Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *SO - Appl Environ Microbiol* 1998 Oct;64(10):3882-6.

-
173. **Weinrauch, Y., Penchev, R., Dubnau, E., Smith, I. & Dubnau, D. (1990).** A *Bacillus subtilis* regulatory gene product for genetic competence and sporulation resembles sensor protein members of the bacterial two-component signal-transduction systems. *SO - Genes Dev* 1990 May;4(5):860-72.
174. **West, A. H. & Stock, A. M. (2001).** Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *SO - Trends Biochem Sci* 2001 Jun;26(6):369-76.
175. **Whalon, M. E. & Wingerd, B. A. (2003).** Bt: mode of action and use. *SO - Arch Insect Biochem Physiol* 2003 Dec;54(4):200-11.
176. **Wijman, J. G., de Leeuw, P. P., Moezelaar, R., Zwietering, M. H. & Abee, T. (2007).** Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *SO - Appl Environ Microbiol* 2007 Mar;73(5):1481-8 Epub 2007 Jan 5.
177. **Wilson, A. C., Hoch, J. A., Perego, M. & other authors (2008).** Virulence gene expression is independent of ResDE-regulated respiration control in *Bacillus anthracis*
178. **Wing, H. J., Williams, S. M. & Busby, S. J. (1995).** Spacing requirements for transcription activation by Escherichia coli FNR protein. *SO - J Bacteriol* 1995 Dec;177(23):6704-10.
179. **Wittig, I., Braun, H. P. & Schagger, H. (2006).** Blue native PAGE. *SO - Nat Protoc* 2006;1(1):418-28.
180. **Yarwood, J. M., McCormick, J. K. & Schlievert, P. M. (2001).** Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **183**, 1113-1123.
181. **Zhang, X. & Hulett, F. M. (2000).** ResD signal transduction regulator of aerobic respiration in *Bacillus subtilis*: ctaA promoter regulation. *Mol Microbiol* **37**, 1208-1219.
182. **Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. & Dean, D. R. (1993).** Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *SO - Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Apr 1;90(7):2754-8.
183. **Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L. & Dean, D. R. (1994).** Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *SO - Biochemistry* 1994 Apr 19;33(15):4714-20.
184. **Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P. & Duport, C. (2006a).** Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression *Arch Microbiol* **185**, 222-233.
185. **Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P. & Duport, C. (2006b).** Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Arch Microbiol* **185**, 222-233.
186. **Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P. & Duport, C. (2007).** The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *SO - J Bacteriol* 2007 Apr;189(7):2813-24 Epub 2007 Jan 26.
-

Valorisation du travail de thèse

Publications scientifiques

1-Article

Esbelin J., Jouanneau Y., Armengaud J and Duport C. 2008. **ApoFnr binds as a monomer to promoters regulating the expression of enterotoxin genes of *Bacillus cereus*.** *J. Bacteriol.* **2008 Jun;190(12):4242-51.**

2-Article

Esbelin J., Armengaud J., Zigha A and Duport C. 2009. **ResDE-dependent regulation of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus*: evidences for multiple modes of binding for ResD and interaction with Fnr.** *J. Bacteriol.* [Epub ahead of print].

2- Communications scientifiques

Esbelin J, Zigha A, Duport C (2006) "**Régulation de la toxinogénèse chez *Bacillus cereus* en réponse à un stress réducteur**" (Poster). Journées de l'école doctorale d'Avignon, Fontaine de Vaucluse, France, 15-18 Octobre.

Esbelin J, Zigha A, Duport C (2007) "**Régulation de la toxinogénèse chez *Bacillus cereus* : Mécanisme d'action**" (Poster). 3^{ème} Colloque d'Ecologie Microbienne, La Grande Motte, France, 15-18 Octobre.

Esbelin J (2008) "**Régulation de la toxinogénèse chez *Bacillus cereus* : implication du régulateur Fnr**" (communication orale). Journée de l'école doctorale SP-SA Montpellier II.

Esbelin J., Jouanneau Y., Armengaud J., and Duport C. 5-9 AOUT 2008. "**ApoFnr binds as a monomer to promoters regulating the expression of enterotoxin genes of *Bacillus cereus***" (Poster). 12^{ème} Congrès International de bactériologie et de microbiologie- IUMS.

Esbelin J et Duport C. 19-20 mai 2009. "**La protéine Fnr et le système à deux composants ResDE, des régulateurs majeurs de la synthèse des entérotoxines de *Bacillus cereus***" (communication orale). 6^{ème} journées du réseau *Bacillus cereus*.

Esbelin J, Zigha A, Duport C (2007) "**Régulation de la toxinogénèse chez *Bacillus cereus* : Mécanisme d'action**" (Poster). 3^{ème} Colloque d'Ecologie Microbienne, La Grande Motte, France, 15-18 Octobre.

**REGULATION DE LA TOXINOGENESE CHEZ *BACILLUS CEREUS* :
MECANISME D'ACTION**

J. ESBELIN, A. ZIGHA, C. DUPORT

UMR A408 INRA/Université d'Avignon, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9
Julia.Esbelin@avignon.inra.fr

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste à l'origine de deux types de toxi-infections alimentaires. L'une causée par un petit peptide toxique (céréulide) est à l'origine du syndrome émétique, et l'autre causée par un ensemble de toxines protéiques produites dans l'intestin grêle (HBL, Nhe et CytK) est à l'origine du syndrome diarrhéique. L'expansion des plats cuisinés et les traitements thermiques modérés, font de cet organisme un pathogène émergent pour lequel il est important de comprendre le mécanisme de toxinogénèse.

Des études récentes ont mis en évidence deux nouveaux systèmes de régulation des entérotoxines qui agissent, en partie, indépendamment du régulateur pléiotrope connu, PlcR (Phospholipase C Regulator). Il s'agit du système à deux composants ResDE (1) et de la protéine Fnr (Fumarate Nitrate Reductase) (2), tous deux étant également des régulateurs du métabolisme fermentaire de *B. cereus*.

Cette étude vise d'une part à étudier la fixation de ces régulateurs sur des séquences spécifiques de *hbl* et *nhe* et d'autre part l'existence d'interactions protéiques. Pour cela les régulateurs ont été exprimé chez *E. Coli* et purifié pour la mise en œuvre de techniques visant à étudier leur mécanisme d'action.

Après analyse des séquences, *in silico*, des expériences de retard sur gel menées sur les régions promotrices des entérotoxines, montrent une action directe de ResD et Fnr au niveau transcriptionnel sur la production des toxines HBL et Nhe. Des expériences de Far-Western et Cross-linking montrent qu'il existe des interactions entre les régulateurs (Fnr/ResD, Fnr/PlcR). L'ensemble de ces résultats confirme l'implication de la voie de régulation impliquant le système ResDE et la protéine Fnr et ceci via une action directe et dépendante, en partie, de la formation de complexes protéiques.

(1) Duport C, Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P. (2006) Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriol*, 188(18):6640-51.

(2) Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. (2007) The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J Bacteriol*. 189(7):2813-24.



Régulation de la toxigenèse chez *Bacillus cereus* : Mécanisme d'action



Julia Esbelin, Assia Zigha, Catherine Duport

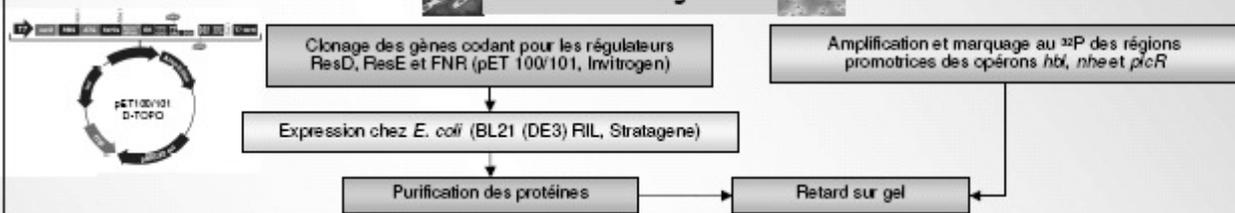
UMR A408 (SQPOV) INRA-UAPV, Avignon F-84914, France, Julia.Esbelin@avignon.inra.fr

Introduction

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste à l'origine de deux types de toxi-infections alimentaires. L'une causée par un petit peptide toxique (céréulide) est à l'origine du syndrome émétique, et l'autre causée par un ensemble de toxines protéiques produites dans l'intestin grêle (HBL, Nhe et CytK) est à l'origine du syndrome diarrhéique. Des études récentes ont mis en évidence deux nouveaux systèmes de régulation des entérotoxines qui agissent, en partie, indépendamment du régulateur pléiotrope connu, PlcR (Phospholipase C Regulator). Il s'agit du système à deux composants ResD (régulateur) – ResE (senseur) (1) et de la protéine à centre [Fe-S] FNR (Fumarate Nitrate Reductase) (2). Tous deux sont également des régulateurs, en présence et en l'absence d'oxygène, du métabolisme carboné de *B. cereus*. La présence de boîtes potentielles de fixation des régulateurs ResD et FNR au niveau des régions promotrices de *hbl*, *nhe* et aussi *plcR* nous a conduit aux hypothèses émises dans cette étude. Les régulateurs ResDE et FNR ont-ils sur la toxigenèse :

- Une action directe par fixation sur les régions promotrices de *hbl* et *nhe* ? Et/ou
- Une action indirecte par fixation sur la région promotrice de *plcR* ?

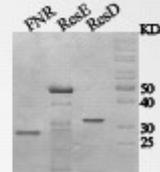
Méthodologie



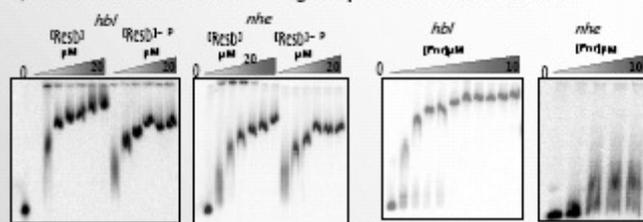
Résultats

1) Purification des protéines ResD, ResE et FNR en aérobiose

Après analyse SDS-PAGE la pureté des protéines FNR et ResD a été estimée à plus de 90%. L'analyse de son spectre UV-Visible a montré que la protéine FNR se trouvait sous forme d'apoprotéine (absence de centre [Fe-S]). La protéine ResE (tronquée de sa partie transmembranaire) présente une pureté estimée à 70% et reste fonctionnelle sous cette forme. Sa capacité à phosphoryler ResD a été en effet vérifiée lors de tests *in vitro*.



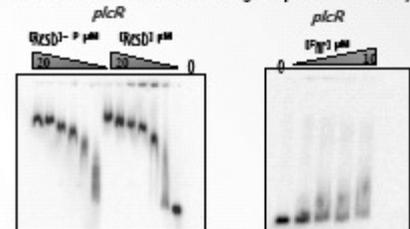
2) ResD et FNR se fixent sur les régions promotrices de *hbl* et *nhe*



Retard sur gel des régions promotrices des entérotoxines en présence de ResD, ResD-P et FNR

ResD, phosphorylé ou non et apo-FNR interagissent avec *hbl* et *nhe* entraînant ainsi un retard de migration des fragments d'ADN. Ce retard est d'autant plus important que la [] en protéine est élevée.

3) ResD et FNR se fixent sur la région promotrice de *plcR*



Retard sur gel de la région promotrice de *plcR* en présence de ResD, ResD-P et FNR

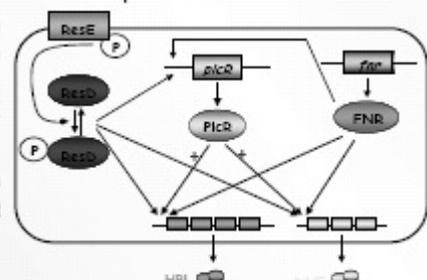
ResD, ResD-P et apo-FNR interagissent avec *plcR* entraînant ainsi un retard de migration du fragment d'ADN.

Conclusion/perspectives

Cette étude nous a conduit à envisager que le système à deux composants ResDE et la protéine FNR, pourraient réguler en présence d'oxygène, l'expression de la toxigenèse. Cette régulation s'effectuerait à la fois directement (fixation sur les régions promotrices de *hbl* et *nhe*) mais aussi indirectement en contrôlant l'expression de PlcR (fixation sur la région promotrice du régulateur *plcR*). Ces résultats sont en accord avec la présence de boîtes spécifiques de fixation pour les régulateurs ResD et FNR sur ces mêmes séquences promotrices.

Des études complémentaires sont en cours afin de quantifier l'affinité de chaque régulateur et des expériences d'empreintes à la DNase I permettront d'identifier les boîtes de fixation de ResD et FNR (identification d'un consensus).

Modèle hypothétique de régulation de la transcription des entérotoxines en aérobiose



(1) Duport C, Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P. (2006) Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* (2) Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. (2007) The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F443073. *J Bacteriol.* 189(18):6540-51. *J Bacteriol.* 190(7):2813-24.

Esbelin J (2008) "**Régulation de la toxinogénèse chez *Bacillus cereus* : implication du régulateur Fnr**" (communication orale). Journée de l'école doctorale SP-SA Montpellier II.

Régulation de la toxinogénèse chez *Bacillus cereus* : implication du régulateur Fnr

J. ESBELIN, C. DUPORT

UMR A408 INRA/Université d'Avignon, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9

Julia.Esbelin@avignon.inra.fr

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste à l'origine de deux types de toxi-infections alimentaires. Le syndrome diarrhéique (le plus commun) résulte de la production d'entérotoxines (HBL, Nhe et CytK) dans l'intestin grêle de l'hôte. L'expression des entérotoxines Hbl et Nhe est sous le contrôle transcriptionnel du régulateur de virulence PlcR et des régulateurs globaux ResDE (1) et Fnr (2). Fnr est une protéine de 230 acides aminés contenant un domaine Crp en N-terminal et un domaine de fixation à l'ADN de type HTH suivi d'un domaine senseur constitué de 4 cystéines (capable de fixer un centre Fe-S) en C-terminal. L'objectif du travail présenté était de déterminer si Fnr régulait directement la transcription des gènes codant pour les entérotoxines, autrement dit de déterminer si Fnr était capable de se fixer au niveau des régions promotrices des opérons *hbl* et *nhe*.

Afin de tester cette hypothèse, Fnr a été exprimée et purifiée sous la forme de deux protéines recombinantes, l'une possédant une étiquette histidine en C ter (Fnr_{His}) et l'autre une étiquette Streptavidine en N ter (Fnr_{Strep}). Des expériences de retard sur gel ont été effectuées pour tester la capacité de ces deux protéines recombinantes à se fixer sur les régions promotrices des gènes de structure et de régulation des entérotoxines.

Les résultats ont montré que les deux protéines recombinantes étaient produites sous forme d'apoprotéines en aérobiose. Fnr_{His} est majoritairement monomérique en solution alors que Fnr_{Strep} est majoritairement dimérique. Fnr_{His} est capable de se fixer aux régions promotrices étudiées sous sa forme native (oxydée). Fnr_{Strep} n'est capable de se fixer sur l'ADN que sous sa forme réduite (après addition de DTT). Sous sa forme réduite, Fnr_{Strep} est majoritairement monomérique. En conclusion, apoFnr n'est capable de se fixer sur l'ADN que sous sa forme monomérique et son état d'oligomérisation dépend du POR. Un modèle de régulation de l'expression des entérotoxines en aérobiose impliquant Fnr et le POR a été proposé (3).

(1) Duport C, Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P. (2006) Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriol*, 188(18):6640-51.

(2) Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. (2007) The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J Bacteriol*. 189(7):2813-24.

(3) Esbelin J, Jouanneau Y, Armengaud J, Duport C. (2008) ApoFnr binds as a monomer to promoters regulating the expression of enterotoxin genes of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*. doi:10.1128/JB.00336-08.

Esbelin J., Jouanneau Y., Armengaud J., and Duport C. 5-9 AOUT 2008. "**ApoFnr binds as a monomer to promoters regulating the expression of enterotoxin genes of *Bacillus cereus***" (Poster). 12^{ème} Congrès International de bactériologie et de microbiologie- IUMS.

FNR-dependent regulation of *Bacillus cereus* enterotoxin expression under aerobiosis

J. ESBELIN, C. DUPORT

Université d'Avignon/UMR A408 INRA, site Agroparc
84914 Avignon cedex 9
Julia.Esbelin@avignon.inra.fr

Bacillus cereus is an opportunistic pathogen responsible of two types of food-borne diseases, classified as emetic and diarrhoeal syndromes. The diarrhoeal syndrome results from the production of enterotoxins (Hbl, Nhe and CytK) in the host small intestine, which is characterized by an anaerobic atmosphere and low oxidoreduction potential (ORP). The ability of *B. cereus* to produce enterotoxins and grow well under these conditions is controlled by both the two component system ResDE (1) and the redox regulator Fnr (Fumarate Nitrate Reductase) (2). Fnr, which belongs to the Crp family of transcriptional regulators is also essential for enterotoxin expression under oxic conditions (2). This suggests that *B. cereus* could exist in an active state under aerobiosis and thus conserve some site-specific DNA binding properties.

To test this hypothesis, Fnr was overexpressed and purified both as a C-terminal His-tagged (Fnr_{His}) and a N-terminal Strep-tagged (Fnr_{Strep}) fusion protein. EMSA_s were then used to test the ability of Fnr_{His} and Fnr_{Strep} to bind to *fnr*, *resDE*, *hbl*, *nhe* and *plcR* promoter regions.

The results showed that both recombinant Fnr was produced as an apoform and was able to bind all the tested target sequences only under its monomeric form. Therefore, the aerobic regulation of enterotoxin is regulated by apoFnr both directly and indirectly (via ResDE and PlcR). In addition, interaction of apoFnr with its specific sequences depends of its oligomeric state.

(1) Duport C, Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P. (2006) Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. J Bacteriol, 188(18):6640-51.

(2) Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. (2007) The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. J Bacteriol. 189(7):2813-24.

FNR-dependent regulation of *Bacillus cereus* enterotoxin expression under aerobiosis

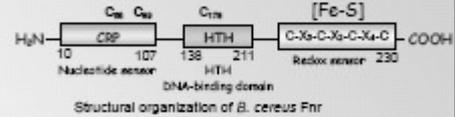
Julia Esbelin and Catherine Duport

Université d'Avignon UMR A408 (SQPOV) INRA-UAPV, Avignon F-84914, France, Julia.Esbelin@avignon.inra.fr

Introduction

Fnr is a member of the Crp/Fnr family of transcriptional regulators and has been shown to be essential for both fermentative metabolism and production of enterotoxin Nhe and Hbl in the foodborne pathogen *Bacillus cereus*.

In *B. cereus*, PlcR (Phospholipase C Regulator) is the major virulence regulator and the two component system ResDE act in synergy with Fnr to control the expression of fermentative and enterotoxin genes (1, 2).

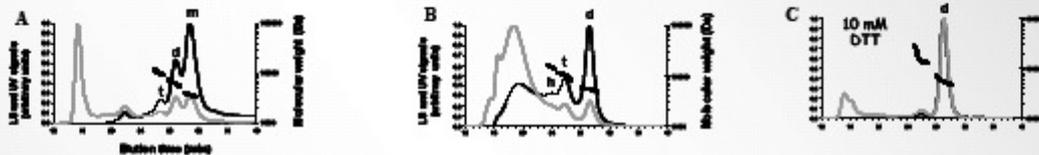


Aim of the study : To understand the mechanism by which Fnr regulates enterotoxin gene expression under aerobiosis by characterizing the DNA-binding activities of two purified recombinant Fnr (N-ter Strep and C-ter His Tagged recombinant Fnr)

Results

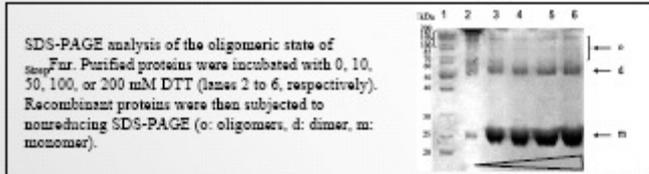
1) Biochemical analyses and oligomeric states of the two recombinant apoFnr proteins

- UV-visible absorption spectrum of recombinant forms of Fnr showed that both proteins were purified as apoproteins under aerobiosis
- Fnr_{His} occurs mainly as a monomer in solution and Fnr_{Strep} as a mixture of oligomers that can be reduced with DTT

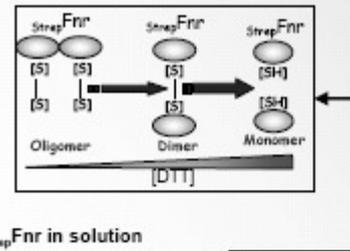


DLS chromatograms of purified Fnr proteins: Fnr_{His} (A), Strep-Fnr (B) and Strep-Fnr with DTT 10 mM (C). The black and gray lines correspond to the light scattering (LS) signal and the UV signal recorded at 280 nm, respectively. These signals were normalized as a ratio from 0.0 to 1.0 for comparison (left y axis). The molecular mass estimates of the major peaks are also indicated by thick black broken lines (right y axis).

- Addition of reducing agent affected the oligomeric state of Strep-Fnr

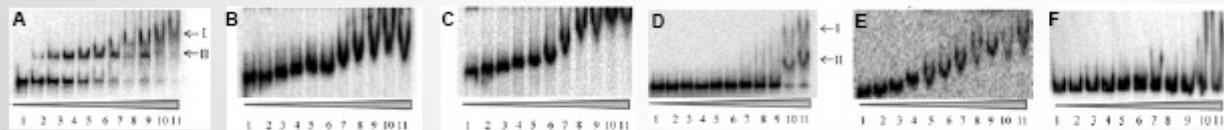


SDS-PAGE analysis of the oligomeric state of Strep-Fnr. Purified proteins were incubated with 0, 10, 30, 100, or 200 mM DTT (lanes 2 to 6, respectively). Recombinant proteins were then subjected to nonreducing SDS-PAGE (o: oligomers, d: dimer, m: monomer).



Addition of reducing agent affected the oligomerization state of Strep-Fnr in solution
Intermolecular disulfide bridges are involved in the formation of the highest oligomeric forms

2) Binding activities of recombinant apoFnr to the 5'UTRs of *fnr*, *hbl*, *nhe*, *resDE* and *plcR*



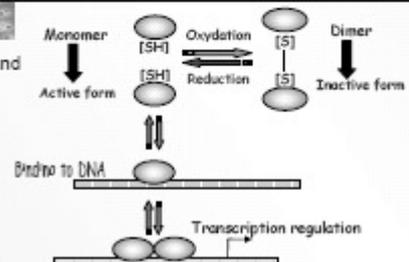
DNAs corresponding to *fnr* (A), *hbl* (B), *nhe* (C), *resDE* (D), *plcR* (E), and a negative control (F) were bound with increasing concentrations of apoFnr. Experiments were performed in triplicate with either purified Fnr_{His} or with reduced Strep-Fnr (purified Strep-Fnr plus 200 mM DTT). Lanes 1 to 11 contain 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 3, 4, 5, and 6 μM apoFnr protein, respectively.

- Fnr_{His} bound to all the promoter regions tested, while no DNA-binding activity could be detected with Strep-Fnr (data not shown)
- Adding reducing agent resulted in the generation of Strep-Fnr-DNA complex patterns similar to those obtained with Fnr_{His}

Conclusion

- ApoFnr directly controls its own expression and the expression of the enterotoxin genes *hbl* and *nhe*, the two component system *resDE* and the virulence regulator *plcR* gene.
- ApoFnr is able to bind to the *fnr*, *hbl*, *nhe*, *resDE* and *plcR* 5'UTRs only when present predominantly as a monomer.
- Interaction of apoFnr with its specific sequences depends of its oligomeric state.

A model for the regulation is proposed as illustrated (3).



(1) Duport C, Zlgha A, Rosenfeld E, Schmitt P. (2006). J Bacteriol, 188(18):6640-51.

(2) Zlgha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. (2007). J Bacteriol, 189(7):2813-24.

(3) Esbelin J, Jouanneau Y, Armengaud J, Duport C. (2008). J Bacteriol, 190(12): 4242-51

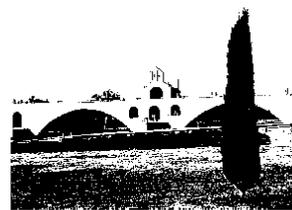
Eselin J et Duport C. 19-20 mai 2009. "La protéine Fnr et le système à deux composants ResDE, des régulateurs majeurs de la synthèse des entérotoxines de *Bacillus cereus*" (communication orale). 6^{ème} journées du réseau *Bacillus cereus*.

Réseau *cereus*

19 & 20 mai 2009



Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
Site Sainte Marthe (centre ville), bâtiment nord, salle 2e07
74 rue Louis Pasteur 84 029 Avignon cedex 1



La protéine Fnr et le système à deux composants ResDE, des régulateurs majeurs de la synthèse des entérotoxines de *Bacillus cereus*

Julia Esbelin, Catherine Duport

UMR A408 INRA/Université d'Avignon, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste à l'origine de deux types de toxi-infections alimentaires classées en syndrome émétique ou diarrhéique. Le syndrome diarrhéique (le plus commun) résulte de la production d'entérotoxines (Hbl, Nhe et CytK) au niveau de l'intestin grêle de l'hôte, caractérisé par une atmosphère anaérobie et un faible potentiel d'oxydo-réduction (POR). La capacité de *B. cereus* à se développer et à produire des entérotoxines dans ces conditions est sous le contrôle de deux systèmes qui agissent, en partie, indépendamment du régulateur pléiotrope connu, PlcR (Phospholipase C Regulator). Il s'agit du système à deux composants ResDE (1) et de la protéine Fnr (Fumarate Nitrate Reductase) (2), tous deux étant également des régulateurs du métabolisme fermentaire de *B. cereus*. Le but de cette étude était de caractériser d'un point de vue fonctionnel l'implication du régulateur Fnr et du système ResDE dans la toxigenèse de *B. cereus*. Les résultats ont montré qu'en aérobiose, la régulation de la transcription de *hbl* et *nhe* était sous le contrôle direct et indirect de Fnr et de ResD. En aérobiose, la fixation de Fnr (forme Apo) sur les régions promotrices étudiées (*pnhe*, *phbl*, *presDE*, *pfnr*, *pplcR*) dépend des conditions redox (3). L'affinité de ResD pour *pnhe*, *phbl*, *presDE*, *pfnr* et *pplcR* dépend des séquences de ces régions promotrices et son affinité pour les régions promotrices *presDE* et *pfnr* dépend de son état de phosphorylation. ResD et ApoFnr sont capables de se fixer simultanément sur les régions promotrices étudiées et sont également capables d'interagir physiquement en l'absence d'ADN. Nous avons proposé un modèle de régulation de la toxigenèse dans lequel ResDE et Fnr pourraient agir en synergie (4).

(1) Duport C, Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P. (2006) Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriol.* 188(18):6640-51.

(2) Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. (2007) The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J Bacteriol.* 189(7):2813-24.

(3) Esbelin J, Jouanneau Y, Armengaud J, Duport C. (2008) ApoFnr binds as a monomer to promoters regulating the expression of enterotoxin genes of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol.* 190(12):4242-51.

(4) Esbelin J, Armengaud J, Zigha A, Duport C. (2009) ResDE-dependent regulation of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus*: evidence for multiple modes of binding for ResD and interaction with Fnr. Accepted for publication in the *Journal of Bacteriology*.

