



HAL
open science

Métabolisme et toxinogénèse de *Bacillus cereus* : rôles de l'enzyme fermentaire LdhA et du régulateur rédox Rex

Sabrina Laouami

► To cite this version:

Sabrina Laouami. Métabolisme et toxinogénèse de *Bacillus cereus* : rôles de l'enzyme fermentaire LdhA et du régulateur rédox Rex. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2012. Français. NNT : 2012AVIG0325 . tel-00921771

HAL Id: tel-00921771

<https://theses.hal.science/tel-00921771>

Submitted on 21 Dec 2013

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 et Agrosciences »
Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse

TITRE :

Métabolisme et toxinogénèse de *Bacillus cereus* : Rôles de l'enzyme fermentaire LdhA et du régulateur rédox Rex.

THESE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'AVIGNON ET DES PAYS DE VAUCLUSE

Disciplines : Génétique et Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par

Sabrina LAOUAMI

Le 20 décembre 2012

JURY

M. Philippe Schmitt	Professeur à l'Université d'Avignon	Président
M. Yves Jouanneau	Directeur de recherche CNRS Grenoble	Rapporteur
M. Eric Rosenfeld	Maître de conférences à l'Université de la Rochelle	Rapporteur
M. Jean Armengaud	Directeur de recherche CEA Marcoule	Examineur
Mme Catherine Duport	Professeur à l'Université d'Avignon	Directrice de thèse

Université d'Avignon et des pays de Vaucluse, UMR A408, Sécurité et qualité des produits d'origine végétale, INRA, Avignon

Remerciements

Ce travail a été réalisé au sein de l'unité « Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale » UMR A408, INRA et grâce au soutien financier de l'INRA, de la région PACA et de l'université d'Avignon. Je tiens à remercier Monsieur Christophe Nguyen-The, directeur de l'UMR A408, pour m'avoir accueilli dans son unité de recherche.

Je remercie Catherine Duport, ma directrice de recherche pour sa confiance, sa grande disponibilité, son aide et ses conseils avisés. Je la remercie également pour m'avoir donné l'occasion de participer aux enseignements à l'université d'Avignon.

J'adresse mes respectueux remerciements aux membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse.

Un grand merci à tous ceux qui font parti ou qui sont passés par l'équipe SQPOV!

Merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et qui ont contribué au bon déroulement de ce travail.

Merci à Thierry pour m'avoir guidé au début sur les chemins de l'enseignement, merci pour sa gentillesse, et son aide, surtout lors de l'utilisation des fermenteurs! Merci à Véro et Julien pour leurs conseils et leurs gentillesse. Merci aux deux Stéph, à Bénédicte et à Claire pour m'avoir si souvent aidé à trouver les produits dans les placards! Merci à Alain pour sa bonne humeur ! Merci à Marie-Hélène, ma voisine de bureau, pour ses conseils, ses encouragements et sa grande gentillesse. J'ai bien aimé nos discussions.

Merci à David, à Jean François, à Cécile et à tous ceux qui sont passés dans le bureau du labo de bioch pour avoir égayé mes moments de manip.

Je remercie chaleureusement tous les étudiants ou CDD qui, comme moi, sont ou ont été de passage au laboratoire et à qui je dois l'ambiance sympathique dans laquelle j'ai travaillé pendant ces années de thèse : Kahina, Khadidja, Julia, Franck, Caro, Gérémy, Benoît, Amina, Stella, Aline, Mélissa, Jordane, Sabine, Orlane, Nicolas, Christelle, Aida, Téf, Chala, Sara et Julien.

Un merci particulier à Amina pour son amitié, sa bonne humeur, son soutien et sa gentillesse. Tu as su me remonté le moral dans les moments difficiles. Merci pour tous les bons moments passés ensemble. Sache que je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi! Un deuxième merci particulier à Imane et à Gaëlle. Voila j'y suis, c'est la fin! Les années sur les bancs de la fac paraissent loin aujourd'hui! Merci pour votre amitié, vos encouragements, votre soutien, votre écoute. A vous trois, je vous souhaite un futur à la hauteur de vos attentes!

Je remercie mon cher mari, Chafiq. Je sais que ces derniers temps ça n'a pas été facile pour toi. Merci d'être aussi optimiste et d'avoir su calmer mes doutes. Tu as su me changer les idées lorsqu' il le fallait ! Merci pour ta présence car je pense que sans toi les choses auraient été bien plus difficiles. Le meilleur reste à venir Inch'Allah !

Maman et Papa, je tiens à vous féliciter, car c'est d'abord votre réussite avant d'être la mienne. Avec Yasmina, Leïla et Inès, même à des centaines de kilomètres, vous avez toujours été là pour moi. Merci pour votre aide, votre soutien et vos encouragements apportés tout au long de mes études.

Je dédie ce travail à toute ma famille de France et d'Algérie.

Sommaire

Sommaire	1
Liste des principales abréviations	6
Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
Chapitre I : Etude bibliographique	13
1. <i>Bacillus cereus</i>	13
1.1. Historique et incidence de <i>Bacillus cereus</i> en tant que pathogène alimentaire	13
1.2. Caractéristiques et taxonomie	14
1.3. Cycle de vie	17
1.4. Pathologies des infections à <i>B. cereus sensu stricto</i>	18
1.4.1. Les infections locales, systémiques et respiratoires	18
1.4.2. Les atteintes digestives	19
1.5. Survie de <i>Bacillus cereus</i> dans le tractus digestif	20
1.5.1. Le pH	20
1.5.2 Les sels biliaires	21
1.5.3. La pression en oxygène	21
1.5.4. Le potentiel d'oxydoréduction	22
1.5.6. Le microbiote intestinal	22
2. Les facteurs de pathogénicité	23
2.1. La toxine émétique	23
2.2. Les entérotoxines	25
2.2.1. L'hémolysine BL	25
2.2.2. L'entérotoxine Nhe (Non-Hemolytic Enterotoxin)	25
2.2.3. La cytotoxine K (CytK)	26
2.2.4. L'entérotoxine FM (EntFM ou CwpFM)	27

2.2.5. Les hémolysines.....	27
2.2.6. Les autres facteurs de virulence.....	28
3. Régulation de la production des facteurs de pathogénicité.....	28
3.1. Les régulateurs répondant au signal de densité de population.....	29
3.1.1. Le régulateur pléiotrope PlcR.....	29
3.1.1.1. Le système PlcR/PapR.....	29
3.1.1.2. Le régulon PlcR.....	31
3.1.1.3. Importance de PlcR dans la pathogénicité.....	32
3.1.2. Le régulateur NprR.....	33
3.2. Les régulateurs liés indirectement à la densité de population.....	33
3.2.1. AbrB.....	33
3.2.2. YvfTU.....	34
3.3. Les régulateurs répondant au signal de présence ou d'absence de nutriments.....	34
3.3.1. Le régulateur pléiotrope CodY.....	34
3.3.1.1. CodY chez <i>B. subtilis</i>	34
3.3.1.2. CodY et la réponse stringente.....	36
3.3.1.3. CodY chez <i>B. cereus</i>	38
3.3.2. Le régulateur CcpA.....	39
3.3.2.1. La répression/activation catabolique : définition et mécanisme d'action.....	39
3.3.2.2. CcpA chez <i>B. cereus</i>	42
3.4. Le régulateur répondant au signal de disponibilité en fer.....	43
3.4.1. Le régulateur Fur.....	44
3.5. Les régulateurs répondant aux signaux de pression en oxygène et de potentiel d'oxydoréduction.....	45
3.5.1. Le régulateur Fnr.....	48
3.5.1.1. Fnr chez <i>E. coli</i>	48
3.5.1.2. Fnr chez <i>B. cereus</i>	49

3.5.2. Le système à deux composants ResD/ResE	50
3.5.3. Le régulateur OhrR.....	51
3.6. Un régulateur dont le signal n'a pas été déterminé.	53
3.7. Conclusion.....	54
Objectifs.....	55
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	59
1. Souches bactériennes et plasmides	59
1.1 Souches bactériennes	59
1.1.1 Souches de <i>Bacillus cereus</i>	59
1.1.2 Souches d' <i>Escherichia coli</i>	59
1.2 Plasmides.....	59
2. Milieux de culture et conditions de culture.....	62
2.1 Milieux de culture.....	62
2.1.1 Le milieu MOD	62
2.1.2 Le milieu LB	62
2.2 Conditions de culture	62
3. Suivi de la croissance.....	63
3.1. Mesure du taux de croissance.....	63
3.2. Mesure de la biomasse	63
4. Techniques de biologie moléculaire	63
4.1 Techniques générales	63
4.1.1 Extraction d'ADN génomique.....	63
4.1.2 Extraction des plasmides.....	63
4.1.3 Amplification par PCR	64
4.1.4 Analyse et séparation de fragments d'ADN.....	64
4.2 RACE PCR.....	64

4.3	Quantification relative des ARNm par RT-PCR en temps réel (SYBR Green).....	65
4.4	Transformation bactérienne	67
4.5	Clonage moléculaire	67
4.5.1	Clonage de séquences d'ADN	67
4.5.2	Construction des mutants Δrex	67
4.5.3	Apport de la copie sauvage du gène <i>rex</i> chez les mutants	68
4.5.4	Clonage du gène <i>rex</i> dans le vecteur pET101 et du gène <i>ldhA</i> dans le vecteur pET100	68
4.6	Technique de retard sur gel	69
5.	Techniques de biochimie.....	70
5.1	Dosage du glucose et des métabolites.....	70
5.2	Dosage des protéines selon la méthode du BCA	70
5.3	Dosage de l'activité enzymatique de LdhA	70
5.4	Dosage de l'entérotoxine Nhe.....	71
5.5	Électrophorèse de protéines.....	71
5.6	Production et purification des protéines.....	72
5.6.1	Synthèse de LdhA <i>in vitro</i>	72
5.6.2	Production des protéines LdhA et Rex	72
5.6.3	Purification des protéines LdhA et Rex	73
6.	La protéomique.....	74
7.	Test de résistance au peroxyde d'hydrogène	74
Chapitre III : Implication de l'enzyme LdhA dans le métabolisme et la toxinogénèse de <i>B. cereus</i>		77
1.	Introduction à l'étude.....	77
2.	Résultats	80
3.	Discussion	95
Chapitre IV : Implication du régulateur Rex dans le catabolisme et la toxinogénèse.		98

1. Introduction à l'étude.....	98
2. Résultats.....	100
3. Discussion.....	117
Chapitre V : Rôle de LdhA dans la régulation des toxines.....	120
1. Introduction à l'étude.....	120
2. Résultats.....	121
3. Conclusion.....	123
Chapitre VI : Conclusion générale et perspectives.....	126
Annexe.....	135
Références bibliographiques.....	145
Publication.....	162

Liste des principales abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine 5'-diphosphate
ARN :	Acide ribonucléique
ATCC :	American Type Culture Collection
ATP :	Adénosine 5'-triphosphate
BCAA :	Acides aminés ramifiés
CcpA :	Catabolite control protein A
CRP :	Cyclic AMP receptor protein
CytK :	Cytotoxine K
Da :	Dalton (unité de masse, un dalton représente le douzième de la masse d'un atome de carbone 12, soit $1,66 \cdot 10^{-24}$ g)
DO :	Densité optique
EMSA :	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EntFM :	Entérotoxine FM
FBP :	Fructose-1,6-biphosphate
Fnr :	Fumarate and nitrate
Fur :	Ferric uptake regulator
Hbl :	Hémolysine BL
HlyI :	Hémolysine I
HlyII :	Hémolysine II
HTH :	Hélice-tour-hélice
IPTG :	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
Kb :	Kilobase
LB :	Milieu de culture Lysogeny Broth
LdhA :	L-lactate déshydrogénase

NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide
Nhe :	Entérotoxine non hémolytique
NprR :	Neutral protease R
Pb :	Paire de base
PCR :	Réaction de polymérisation en chaîne
PlcR :	Phospholipase C Regulator
POR :	Potentiel d'oxydoréduction
RNPP :	Famille de protéine Rap/NrpR/PlcR/PrgX
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SDS :	Dodécylsulfate de sodium
TBE :	Tris borate EDTA
TEMED :	Tetramethylethylenediamine
TIA :	Toxi-infection alimentaire
TIAC:	Toxi-infection alimentaire collectives
UFC :	Unité Formatrice de Colonie

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes formes de <i>Bacillus cereus</i> (ATCC 14579).....	15
Figure 2 : Représentation des cycles de vie de <i>B. cereus</i>	17
Figure 3 : Infections à <i>B. cereus</i> chez l'Homme.....	18
Figure 4 : Représentation schématique de l'appareil digestif et des villosités intestinales.....	20
Figure 5 : Comparaison de la composition en acides aminés du céréulide.....	23
Figure 6 : Représentation schématique du regroupement <i>ces</i>	24
Figure 7 : Représentation schématique de l'opéron <i>nhe</i>	26
Figure 8 : Effet moléculaire de la fixation de PapR sur PlcR.....	30
Figure 9 : Structure des protéines RNPP.....	31
Figure 10 : Les gènes régulés par PlcR.....	32
Figure 11 : Structure de CodY.....	35
Figure 12 : Représentation schématique de la synthèse protéique.....	37
Figure 13 : Modèle de régulation métabolique de la compétence chez <i>B. subtilis</i>	38
Figure 14 : Phénomène de diauxie observé par Monod.....	40
Figure 15 : Mécanisme de répression/activation catabolique.....	42
Figure 16 : Représentation schématique de la position des sites <i>cre</i> et <i>plcR</i>	43
Figure 17 : Mécanismes d'actions de la protéine Fur.....	45
Figure 18 : Métabolisme respiro-fermentaire chez <i>B. cereus</i>	47
Figure 19 : Les différents états de la protéine Fnr.....	49
Figure 20 : Fixation à l'ADN de la forme apo et holo-Fnr.....	50
Figure 21 : Les différents types d'oxydation de la protéine OhrR.....	52
Figure 22 : Les réseaux de régulations des facteurs de pathogénicités chez <i>B. cereus</i>	54
Figure 23 : PCR en temps réel en présence de SYBR green.....	66
Figure 24 : Principe de la technique de retard sur gel.....	69
Figure 25 : Schéma représentant les voies de production des métabolites.....	79
Figure 26 : Production spécifique de toxine Nhe.....	81
Figure 27 : Produits du métabolisme fermentaire.....	84
Figure 28A : Organisation génétique des gènes <i>ldhA-pfo</i>	88
Figure 28B : Alignement des séquences en acides aminés de LdhA, LdhB et LdhC.....	89
Figure 29 : Expression des gènes <i>ldhA</i> , <i>ldhB</i> et <i>ldhC</i>	90
Figure 30 : Représentation schématique de la fixation de Rex à l'ADN.....	99
Figure 31 : Alignement des séquences en acides aminés des protéines Rex chez les souches ATCC14579 et F4430/73.....	101
Figure 32 : Environnement génétique du gène <i>rex</i> chez la souche ATCC14579.....	101
Figure 33 : Impact de la mutation <i>rex</i> sur le protéome globale.....	106
Figure 34 : Rôle du gène <i>rex</i> dans la survie des souches de <i>B. cereus</i> ATCC 14579 et F4430/73 en présence de peroxyde d'hydrogène.....	112
Figure 35 : Expériences de retard sur gel avec les protéines Rex-ATCC et Rex-F4430.....	114
Figure 36 : Boîtes de fixation putatives à Rex.....	115
Figure 37 : Expérience de retard sur gel en présence de la protéine Rex-ATCC.....	116
Figure 38 : Expérience de retard sur gel avec la protéine Rex-ATCC en présence de NADH ou de NAD ⁺	117

Figure 39 : Analyse par gel SDS-PAGE 12% de la purification de LdhA.....	121
Figure 40 : Mesure de la densité optique en fonction du temps du mélange réactionnel : LdhA, pyruvate et NADH.....	122
Figure 41 : Expériences de retard sur gel en présence de la protéine LdhA et des régions promotrices des gènes <i>nhe</i> et <i>cytK</i>	123
Figure 42 : Analyse sur gel SDS-PAGE de la surproduction et de la purification de la protéine Rex chez <i>B. cereus</i>	140
Figure 43 : Analyse par Western Blot des protéines Rex-ATCC et Rex-F4430.....	140
Figure 44 : Spectre d'absorption UV-visible de la protéine Rex-F4430.....	141

Liste des tableaux

Tableau 1 : Diversité génétique et écologique de <i>B. cereus</i>	16
Tableau 2 : Liste des souches bactériennes utilisées.....	60
Tableau 3 : Liste des plasmides utilisés.....	61
Tableau 4 : Paramètres de croissance des souches F4430/73, F4810/72, F837/76 et PA.....	82
Tableau 5: Taux d'induction ou de répression des gènes impliqués dans le catabolisme du glucose et la synthèse d'entérotoxines chez les souches F4810/72, F837/76 et PA comparé à la souche F4430/73.....	86
Tableau 6. Paramètres de croissance, produits du métabolisme et quantités de toxine Nhe des mutants <i>ldhA</i> , <i>pfo</i> et de la souche sauvage F4430/73.....	92
Tableau 7 : Taux d'induction ou de répression des gènes impliqués dans le catabolisme du glucose et la synthèse d'entérotoxines chez les mutants <i>ldhA</i> et <i>pfo</i> par rapport à la souche sauvage F4430/73.....	93
Tableau 8: Paramètres de croissance et production de Nhe des cultures non contrôlées des mutants <i>ldhA</i> , <i>pfo</i> , <i>ldhB</i> et <i>ldhC</i> ainsi que de la souche sauvage F4430/73.....	94
Tableau 9: Taux d'induction ou de répression des gènes codant des toxines ou des toxines potentielles induites par la mutation <i>ldhA</i>	95
Tableau 10 : Taux d'induction ou de répression du gène <i>rex</i> chez la souche F4430/73.....	102
Tableau 11 : Paramètres de croissance et produits du métabolisme des mutants ATCC 14579 Δ <i>rex</i> et F4430/73 Δ <i>rex</i> et des souches sauvages ATCC 14579 et F4430/73.....	104
Tableau 12 : Taux d'induction ou de répression des gènes de toxines et des gènes du métabolisme chez la souche ATCC 14579 Δ <i>rex</i>	110
Tableau 13 : Amorces utilisées.....	135
Tableau 14 : Analyse protéomique du protéome intracellulaire du mutant ATCC14579 Δ <i>rex</i> comparé à celui de la souche sauvage.....	138
Tableau 15 : Analyse protéomique du surnageant de culture du mutant ATCC14579 Δ <i>rex</i> comparé à celui de la souche sauvage ATCC 14579.....	139

Etude bibliographique

Chapitre I : Etude bibliographique

1. *Bacillus cereus*

1.1. Historique et incidence de *Bacillus cereus* en tant que pathogène alimentaire.

Bacillus cereus fut isolé pour la première fois par Frankland et Frankland en 1887 au Royaume Uni, à partir de l'air d'une étable. Cette souche dénommée ATCC 14579 est considérée comme la souche type de *Bacillus cereus*.

De 1947 à 1949, Steinar Hauge en Norvège enquêta sur quatre cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) affectant environ 600 personnes. Le véhicule alimentaire était une sauce à la vanille préparée à partir d'amidon de maïs riche en spores de *B. cereus*. Le dessert a été préparé et entreposé à température ambiante jusqu'à ce qu'il soit servi et mangé le lendemain. Tous les individus ayant mangé le dessert présentaient des symptômes cliniques d'une intoxication alimentaire caractérisée par des crampes abdominales et une diarrhée. Pour fournir les preuves que *B. cereus* était la cause de cette intoxication alimentaire, Hauge inocula une sauce vanille à 10^4 cellules de *B. cereus* par mL, attendit 24 heures puis l'ingéra. Après 13 heures, il souffrit des mêmes symptômes (Hauge, 1955).

En 1971, une intoxication à *B. cereus* d'un type différent dit « émétique » a été décrite pour la première fois au Royaume Uni. Ce type d'intoxication a été caractérisé par une crise aiguë de nausées et de vomissements qui apparaissent rapidement (de 0.5 heure à 6 heures après la consommation du repas incriminé (Ehling-Schulz, *et al.*, 2004)). La plupart des foyers de type émétique décrits étaient associés à une consommation de riz cuit ou de féculents (Mortimer & McCann, 1974).

Les syndromes diarrhéique et émétique sont généralement bénins, à durée limitée et ne nécessitent pas d'intervention médicale. Néanmoins ces dernières années plusieurs cas sévères et quelques cas mortels de toxi-infections à *B. cereus* ont été rapportés indiquant que la virulence de *B. cereus* ne doit pas être sous-estimée ((Mahler, *et al.*, 1997), (Lund, *et al.*, 2000, Dierick, *et al.*, 2005), (Naranjo, *et al.*, 2011)).

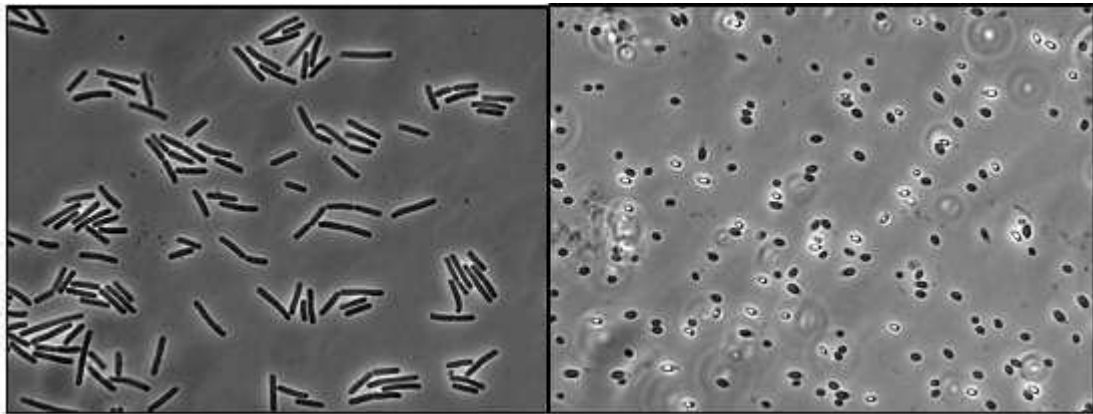
L'incidence réelle de *B. cereus* en tant que pathogène alimentaire est difficile à évaluer pour plusieurs raisons. D'une part, les toxi-infections à *B. cereus* ne sont pas à déclaration obligatoire : elles sont donc probablement sous-estimées dans les listes officielles. D'autre

part, la courte durée et la bénignité des symptômes ne motivent pas le patient à consulter un médecin. Enfin, les cas de TIAC à *B. cereus* ne sont pas toujours attribués à cette bactérie car le symptôme émétique ressemble à une toxi-infection à *Staphylococcus aureus* et le symptôme diarrhéique peut être associé à une toxi-infection à *Clostridium perfringens*. C'est dans ce contexte que l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS) a classé *B. cereus* comme étant la quatrième cause de TIAC en France (INVS, 2009).

1.2. Caractéristiques et taxonomie.

Bacillus cereus aussi appelé *Bacillus cereus sensu stricto* (ss) fait parti morphologiquement et de part sa phylogénie à un groupe de bactéries que l'on nomme : groupe *B. cereus* ou *B. cereus sensu lato*.

Outre les caractères généraux du genre *Bacillus*, les espèces du groupe *Bacillus cereus* sont des bacilles de grande taille ($>1.0 \mu\text{m}$) à Gram positif, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche. Ils se distinguent des autres *Bacillus* essentiellement par leur aptitude à croître en anaérobiose. Les espèces du groupe *cereus* sont très répandues dans la nature et sont souvent isolées du sol, de la poussière ou de la surface de végétaux, ce qui favorise leur propagation dans les aliments. Certaines espèces sont aussi capables d'infecter des mammifères et/ou des insectes (Drobniewski, 1993, Kotiranta, *et al.*, 2000). La capacité à produire des spores leur permet de résister à des environnements extrêmes tels que la pasteurisation ou l'acidité rencontrée dans l'estomac mais aussi à adhérer aux matériaux utilisés au cours de la chaîne de fabrication des plats cuisinés (Lequette, *et al.*, 2011, Mols & Abee, 2011, Ceuppens, *et al.*, 2012). La gamme de température de croissance varie en fonction des souches et s'étend de 5°C à 50°C.



INRA

Figure 1 : Les différentes formes de *Bacillus cereus* (ATCC 14579) : cellules végétatives à gauche et spores dormantes (corps réfringent) ou spores en germination (corps opaque) à droite sous microscopie optique.

Le groupe *B. cereus* inclut six espèces génétiquement apparentées :

- *B. anthracis*, responsable de la maladie du charbon (Mock & Fouet, 2001).
- *B. thuringiensis*, qui synthétise un cristal parasporal contenant des toxines létales pour les insectes (Schnepf, *et al.*, 1998).
- *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* forment des colonies rhizoïdes (Nakamura, 1998).
- *B. weihenstephanensis* est une espèce psychrotolérante pouvant se développer à des températures de réfrigération comprises entre 4°C et 7°C (Lechner, *et al.*, 1998).
- *B. cereus sensu stricto* aussi appelé *B. cereus*, reconnu comme agent causal de toxi-infections alimentaires (TIA) mais aussi responsable dans une moindre mesure d'infections opportunistes locales et systémiques (Bottone, 2010, Logan, 2012).

Plusieurs études basées sur différents types d'analyses tels que les profils AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), MLST (MultiLocus Sequence Typing), MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis), les séquences des gènes ribosomiaux et la séquence du gène *panC* ont montré que ces espèces se répartissent en sept groupes phylogénétiques, chacun se divisant en sous-groupes (Guinebretiere, *et al.*, 2008, Tourasse, *et al.*, 2011). Le groupe phylogénétique I inclut l'espèce *B. pseudomycoïdes*. Les groupes II, III, IV, V contiennent les espèces *B. cereus* et *B. thuringiensis*. *B. anthracis* est quant à lui présent

uniquement dans le groupe III. *B. weihenstephanensis* et *B. pseudomycoïdes* appartiennent au groupe VI. Le groupe VII contient une espèce nouvellement décrite : *B. cytotoxicus* (Guinebretiere, *et al.*, 2012). Ainsi une souche de *B. cereus* peut être plus proche phylogénétiquement d'une souche de *B. anthracis* que d'une autre souche de *B. cereus*.

Groupe Phylogénétique	Espèces	Sous groupes	Gamme de T°C de croissance	% de souches comprenant :				
				<i>hbl</i>	<i>cytK2</i>	<i>cytK1</i>	<i>nhe</i>	<i>ces</i>
I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	I-1	10-43	41	0	0	100	0
		I-2		71	0			
II	<i>B. cereus</i> II, <i>B. thuringiensis</i> II	II	7-40	61	13	0	100	0
III	<i>B. cereus</i> III, <i>B. thuringiensis</i> III, <i>emetic B. cereus</i>	III-1		67	73			0
		III-2		12	31			31
		III-3	15-45	14	57	0	100	7
		III-4	<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> III-4, <i>B. thuringiensis</i> III-4		14	39		
IV	<i>B. cereus</i> IV, <i>B. thuringiensis</i> IV	IV-1	10-45	97	79			
		IV-2		97	97	0	100	0
		IV-3		86	79			
V	<i>B. cereus</i> V, <i>B. thuringiensis</i> V	V	8-40	88	6	0	100	0
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycoïdes</i> , <i>B. thuringiensis</i> VI	VI-1	5-37	83	0		100	
		VI-2		60	0	0	100	0
VII	<i>B. cytotoxicus</i> sp. nov.	VII	20-50	0	0	100	100	0

Tableau 1 : Diversité génétique et écologique de *B. cereus* d'après Guinebretiere, *et al.*, 2008.

1.3. Cycle de vie

La connaissance de l'écologie de *B. cereus* dans le sol est loin d'être complète. Les premiers travaux favorisaient un modèle où *B. cereus sensu lato* existe dans le sol sous forme de spore, puis germe et croît en interaction symbiotique avec un hôte invertébré ou en tant que pathogène chez un hôte vertébré ou invertébré (Margulis, *et al.*, 1998), (Jensen, *et al.*, 2003). Ce mode de vie de *B. cereus* a été complété par les travaux de Vilain et collaborateurs qui montrent que *B. cereus* est aussi capable de germer, de se multiplier et par la suite de sporuler dans le sol prouvant ainsi que *B. cereus* peut également adopter un mode de vie saprophyte (Vilain, *et al.*, 2006).

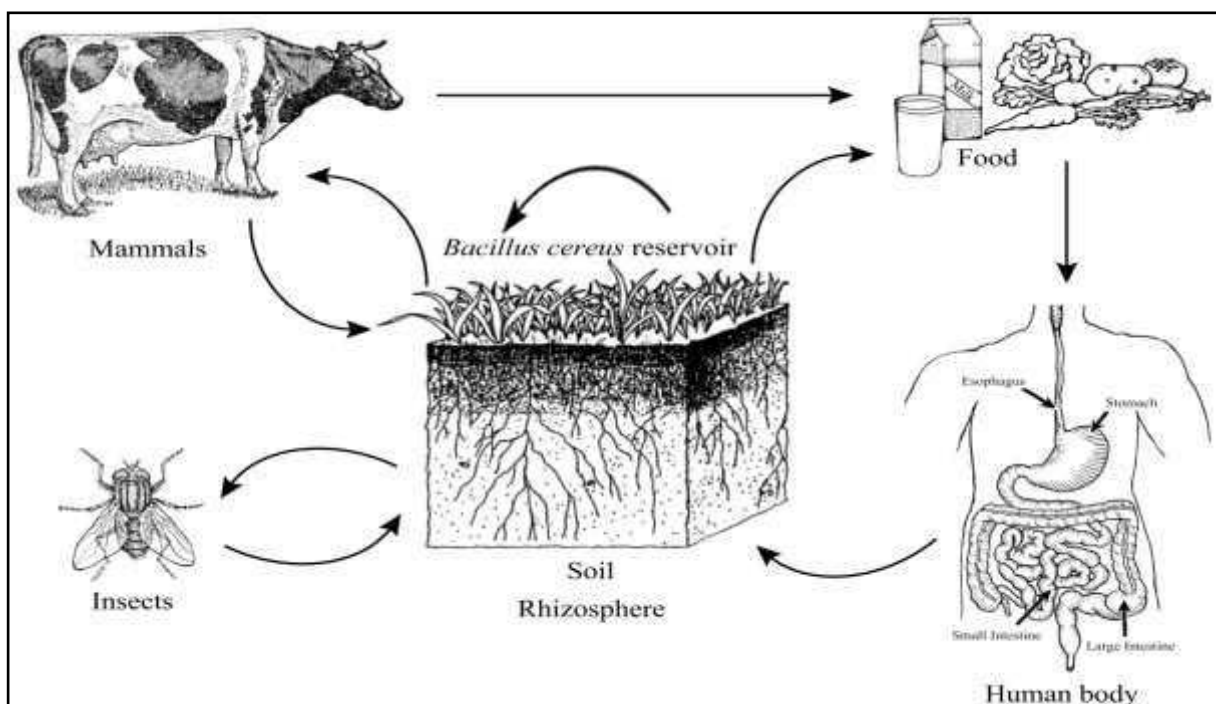


Figure 2 : Représentation des cycles de vie de *B. cereus*, d'après (Mols & Abee, 2011).

Les auteurs décrivent un phénotype multicellulaire avec un mode de croissance filamenteux qui permettrait à *B. cereus* de se déplacer dans le sol. La forme filamenteuse de *B. cereus*, aussi décrite par Margulis et collaborateurs, existe également au niveau de l'intestin d'insecte (Margulis, *et al.*, 1998). Ainsi le mode de croissance filamenteux serait associé aux modes de vie saprophytique et symbiotique de *B. cereus* tandis que le mode de croissance rapide serait associé à un cycle de vie en tant qu'agent infectieux. Il est à noter que les souches de *B. cereus* ne sont pas toutes responsables de pathologie chez l'hôte. Plusieurs souches sont inoffensives et certaines sont utilisées comme probiotiques (Cutting, 2011)

La présence de *B. cereus* dans plusieurs eaux de rivières a été rapportée en Norvège (Ostensvik, *et al.*, 2004). Ce réservoir hydro-tellurique pourrait également être à l'origine de la dissémination de *B. cereus* dans l'environnement et de son entrée dans la chaîne de transformation des aliments.

1.4. Pathologies des infections à *B. cereus sensu stricto*

Les infections à *B. cereus* peuvent être classées en deux catégories. D'une part les toxi-infections alimentaires et d'autre part les infections locales, systémiques ou respiratoires.

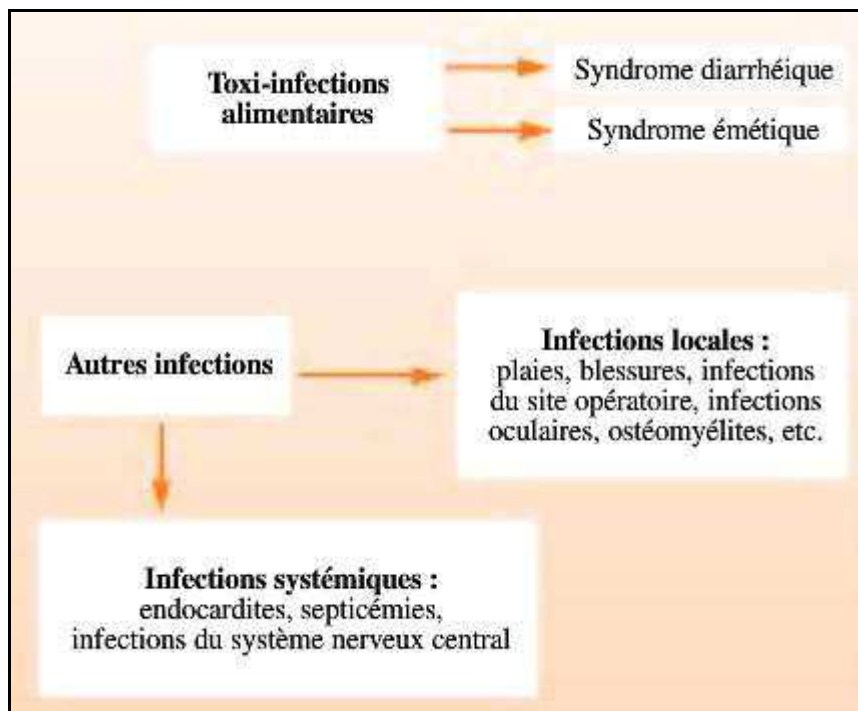


Figure 3 : Infections à *B. cereus* chez l'Homme d'après Teyssou *et al.*, 1998.

1.4.1. Les infections locales, systémiques et respiratoires

Les infections locales ou systémiques sont généralement opportunistes et interviennent sur un terrain prédisposé : plaie, blessure et brûlure pour les infections locales, immunodépression et cathétérisme pour les infections systémiques (Bottone, 2010).

Des cas d'affection du système respiratoire suivie de septicémie chez des personnes en bonne santé ont été rapportées. Les symptômes s'apparentaient à ceux rencontrés lors d'une infection à *B. anthracis*. Dans la littérature, les auteurs parlent alors de « Maladie de type Anthrax » causée par *B. cereus*. Les souches incriminées appartiennent au même sous-groupe phylogénétique que les souches de *B. anthracis* (Miller, *et al.*, 1997, Hoffmaster, *et al.*, 2004, Hoffmaster, *et al.*, 2006, Okinaka, *et al.*, 2006, Avashia, *et al.*, 2007, Wilson, *et al.*, 2011).

1.4.2. Les atteintes digestives

B. cereus peut être rencontré dans une grande variété d'aliments tels que les pâtes, le riz, les produits laitiers, les denrées alimentaires séchées, la viande, les légumes, les fruits, les céréales, les épices ou les fruits de mer.

Les toxi-infections alimentaires (TIA) à *B. cereus* se manifestent par deux types de syndrome : le syndrome émétique et le syndrome diarrhéique. Ces deux types de syndromes sont causés par différents facteurs de virulence (Arnesen, *et al.*, 2008). Le syndrome émétique, caractérisé par une courte période d'incubation (1 à 5 heures après ingestion des aliments), est dû à l'ingestion d'une toxine nommée céréulide préformée dans les aliments. Le syndrome diarrhéique est le plus fréquent en Europe et en Amérique du Nord. Il se caractérise par une période d'incubation de 8 à 16 heures, des crampes abdominales et une diarrhée et serait dû à la production d'entérotoxines par des cellules végétatives dans l'intestin grêle de l'hôte. Ce syndrome fait suite à l'ingestion d'aliments contaminés par des cellules végétatives ou des spores bactériennes (Clavel, *et al.*, 2004, Ceuppens, *et al.*, 2012). Il ne semble pas résulter de l'ingestion de toxines préformées dans les aliments car les toxines incriminées sont thermosensibles et sensibles aux protéases du tube digestif (Turnbull, *et al.*, 1979, Granum, *et al.*, 1993). Lors d'une TIAC à *B. cereus*, un grand nombre de bactéries est généralement dénombré dans les aliments impliqués. Dans les cas du syndrome diarrhéique la dose infectieuse exacte n'est pas connue mais semble être dans la gamme de 10^5 à 10^8 bactéries ou spores totales (Tsigarida, *et al.*, 2009). Le nombre de cellules de *B. cereus* nécessaire pour produire assez de toxine émétique n'a pas été déterminé. Cependant dans les cas de syndrome émétique le nombre de bactéries retrouvés dans les aliments était en moyenne de 10^5 Unités Formatrices de Colonie (UFC) par gramme (Arnesen, *et al.*, 2008).

1.5. Survie de *Bacillus cereus* dans le tractus digestif

Il est généralement supposé que le syndrome diarrhéique est causé par la production *de novo* d'entérotoxines par des cellules végétatives en croissance dans l'intestin grêle. Deux observations supportent cette hypothèse. Premièrement, les entérotoxines responsables du syndrome diarrhéique sont sensibles à l'acidité et aux enzymes digestives (Turnbull, *et al.*, 1979, Granum, *et al.*, 1993). Deuxièmement, les nutriments étant majoritairement absorbés au niveau de l'intestin grêle, le colon présente un environnement moins favorable à la croissance de *B. cereus*. La survie et la croissance de *B. cereus* lors du passage gastro-intestinal semblent donc être les conditions préalables à l'établissement du syndrome diarrhéique. Toutefois, cette survie est conditionnée par de nombreux obstacles tels que l'exposition à un faible pH gastrique, les enzymes digestives, les sels biliaires, les variations de pression en oxygène et de potentiel d'oxydoréduction (POR), et la concurrence pour l'espace et les éléments nutritifs avec la flore intestinale endogène.

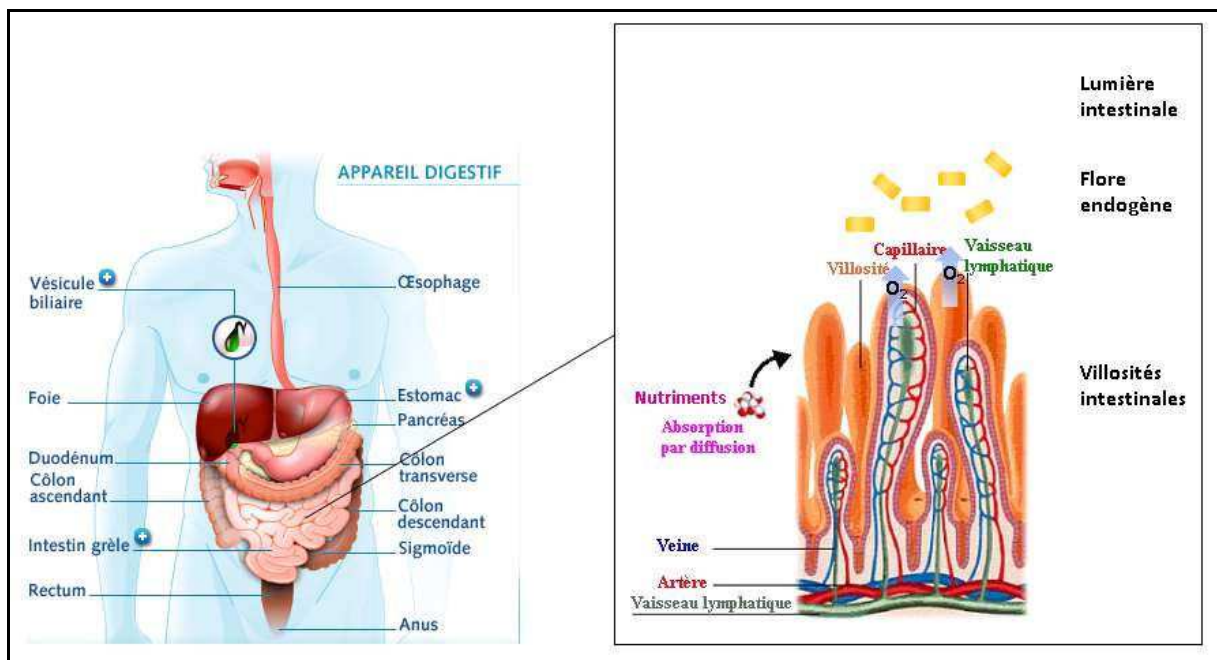


Figure 4 : Représentation schématique de l'appareil digestif et des villosités intestinales. D'après crohn.enoina.fr.

1.5.1. Le pH

Dans l'estomac, un pH de 1.5 est atteint à jeun et augmente entre 3 et 5 au cours de l'alimentation (Cotter & Hill, 2003). Plusieurs expériences ont montré que *B. cereus* est capable de se développer à bas pH et que ce développement est facilité par une pré-exposition

à un pH acide non létale (Jobin, *et al.*, 2002, Thomassin, *et al.*, 2006). Il a également été montré que les spores survivent d'avantage à l'acidité gastrique que les cellules végétatives et que cette survie est dépendante du type d'aliment ingéré. Un meilleur taux de survie est observé lorsque *B. cereus* est cultivé dans un milieu gastrique contenant du lait ou en présence de glutamate, d'arginine ou de lysine. Cependant les études réalisées sont descriptives et les mécanismes qui entrent en jeu dans cette protection n'ont pas été déterminés (Clavel, *et al.*, 2004, Senouci-Rezkallah, *et al.*, 2011, Ceuppens, *et al.*, 2012).

1.5.2 Les sels biliaires

La sécrétion de sels biliaires a pour but d'émulsionner et de dissoudre les graisses ingérées mais présente aussi un rôle bactéricide qui est obtenu grâce à la désagrégation des lipides membranaires. De plus il a été rapporté que les sels biliaires sont capables d'entrer dans les cellules bactériennes et d'y occasionner un stress oxydant ainsi que des dommages à l'ADN (Merritt & Donaldson, 2009). Il a été montré que la tolérance de *B. cereus* aux sels biliaires est dépendante du type de souches, de la forme sous laquelle *B. cereus* est ingéré (spore ou cellule végétative), du type de nourriture et de la concentration en sels biliaires (Clavel, *et al.*, 2007, Merritt & Donaldson, 2009).

1.5.3. La pression en oxygène

La pression en oxygène est un paramètre important de la croissance bactérienne. De ce paramètre dépendra l'orientation du métabolisme vers une respiration aérobie ou vers un métabolisme fermentaire. Dans l'intestin, site initial supposé de l'infection, la pression en oxygène est variable. Bien que l'intestin soit majoritairement dépourvu d'oxygène du fait de la présence d'une flore endogène aéro-anaérobie facultative (Magalhaes, *et al.*, 2007), il existe des microenvironnements aérobies situés à la proche périphérie des microvillosités intestinales. Cette oxygénation est due à la diffusion de l'oxygène des capillaires sanguins vers la surface des villosités (Marteyn, *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré que *B. cereus* peut modifier son métabolisme en fonction des conditions d'oxygénation, se développer et sécréter des entérotoxines que ce soit en aérobiose, en anaérobiose ou en micro-aérobiose ($pO_2=1\%$) (Dupont, *et al.*, 2004, Zigha, *et al.*, 2006, Clair, *et al.*, 2010, Messaoudi, *et al.*, 2010).

1.5.4. Le potentiel d'oxydoréduction

Un autre facteur abiotique présent dans l'intestin comme dans tout milieu biologique est le potentiel d'oxydoréduction (POR ou Eh) qui s'exprime en Volts. C'est une mesure de la capacité du milieu à être oxydé ou réduit. Cette capacité dépend des réactions d'oxydoréductions qui s'y déroulent. Une réaction d'oxydoréduction met en jeu deux couples d'oxydoréduction. Le transfert d'électrons se réalise entre le composé réduit du couple ayant le plus faible potentiel standard (E'°), et l'oxydant du couple ayant le plus grand E'° . La valeur du potentiel standard permet de situer un couple sur une échelle des couples rédox. Par exemple l'oxygène est un très bon accepteur d'électrons car son potentiel standard est très élevé ($E'^{\circ}_{O_2/H_2O} = + 0.82 \text{ V}$) et le dihydrogène est un fort donneur d'électrons car son potentiel standard est très bas ($E'^{\circ}_{H_2/2H^+} = -0.421 \text{ V}$). Le maintien du POR dans l'intestin dépend fortement des couples cystéine/cystine et glutathion oxydé/glutathion réduit à fort pouvoir réducteur qui participent au maintien de l'homéostasie rédox ($E'^{\circ}_{CysSS/Cys} = -0.340 \text{ V}$ et $E'^{\circ}_{GSSG/GSH} = -0.240 \text{ V}$). Selon Moriarty-Craige et collaborateurs, la valeur du POR au niveau du lumen serait environ de -150 mV. Cependant, aucune étude n'a réellement mesuré le POR dans l'intestin humain. Il faut aussi garder en mémoire qu'il existe en périphérie des microvillosités intestinales, des microenvironnements aérobies dans lesquels le potentiel d'oxydoréduction pourrait atteindre des valeurs positives (Moriarty-Craige & Jones, 2004, Marteyn, *et al.*, 2010, Circu & Aw, 2012). Des études menées au laboratoire ont montré que *B. cereus* est capable de se développer en présence comme en absence d'oxygène et à bas POR comme à haut POR en anaérobiose. Ceci s'explique par sa capacité à moduler son protéome et à réorienter efficacement ses voies métaboliques (Zigha, *et al.*, 2006, Clair, *et al.*, 2010, Clair, *et al.*, 2012). Par ailleurs, il a été montré qu'il adaptait sa capacité de production des facteurs de virulence aux conditions rédox rencontrées (Clair, *et al.*, 2010). Nous verrons par la suite, dans ce manuscrit, que plusieurs régulateurs rédox chez *B. cereus* modulent l'expression des entérotoxines et des enzymes du métabolisme en réponse aux changements de POR.

1.5.6. Le microbiote intestinal

Une étude *in vitro* a évalué l'impact du microbiote intestinal sur la survie et la croissance de *B. cereus*. Il a été montré, par des expériences de compétitions avec des bactéries de la flore commensale, que le taux de prolifération des cellules végétatives de *B.*

cereus est proportionnel à la quantité de l'inoculum. Les auteurs observent un fort taux de prolifération (2.42 log UFC/mL) lorsque *B. cereus* est inoculé avec un ratio de 1 bactérie de *B. cereus* sur 9 bactéries de la flore commensale et une légère augmentation du nombre de bactéries (+0.78 log UFC/mL) lorsque le taux d'inoculation est de 1 sur 100000 (Ceuppens, *et al.*, 2012). Ces expériences montrent que *B. cereus* est capable de se multiplier en présence d'autres espèces bactériennes.

2. Les facteurs de pathogénicité

Comme décrit précédemment, *B. cereus* tire son pouvoir pathogène de sa capacité d'adaptation aux conditions environnementales et de sa capacité à sécréter des toxines. Alors que le syndrome émétique a pour agent étiologique une toxine unique, le syndrome diarrhéique est probablement causé par la combinaison et l'action synergique de plusieurs toxines et enzymes de dégradation (Stenfors Arnesen, *et al.*, 2008).

2.1. La toxine émétique

Le céréulide est la toxine responsable du syndrome émétique qui, du fait de sa production dans l'aliment, est un exemple typique d'intoxication. Le céréulide est un cyclo-dodecadepsipeptide cyclique (c'est-à-dire qu'il est composé de l'alternance de douze acides aminés et esters) (Agata, *et al.*, 1994). Sa structure ressemble fortement à celle de la valinomycine connue pour être un ionophore à l'ion potassium.

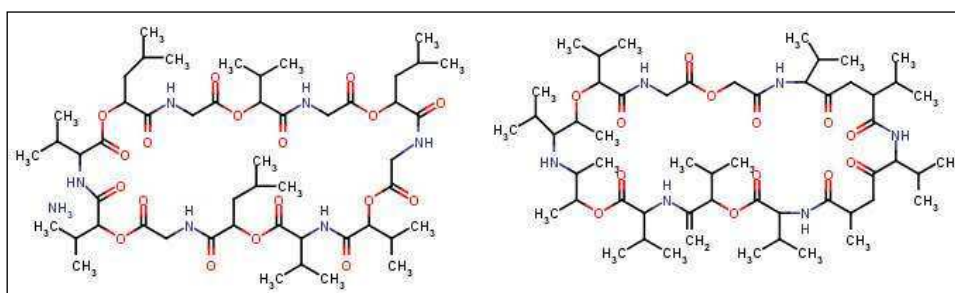


Figure 5 : Comparaison de la composition en acides aminés du céréulide [D-Ala – D-O-Leu – L-Val – L-O-Val]₃ (à gauche) et de la valinomycine connue pour entraîner la perméabilisation des membranes biologiques à l'ion potassium [D-Val – L-O-Ala – L-Val – D-O-Val]₃ (à droite) (Teplova, *et al.*, 2006).

Le céréulide est le produit d'une synthèse peptidique non-ribosomale. Il est issu de l'assemblage de sous-unités via des peptide-synthases non ribosomales (NRPSs). Le gène *cesH* et l'opéron *cesPTABCD* codent cette machinerie. Les gènes *ces* sont portés par le plasmide pBCE présent uniquement chez des souches de deux sous-groupes du groupe III de *B. cereus sensu lato* (Ehling-Schulz, *et al.*, 2004, Guinebretiere, *et al.*, 2008). La figure 6 présente une vue d'ensemble de l'organisation génétique des gènes *ces*. Ce locus de 24 kpb comprend le gène *cesP* codant la 4'-phosphopantéthéinyle transférase essentielle pour l'amorçage des peptides non ribosomaux, le gène *cesT* codant potentiellement une thioestérase de type II qui élimine les monomères mal amorcés, et les gènes de structure *cesA* et *cesB* codant des protéines responsables de l'assemblage du peptide. En outre, un gène codant une hydrolase potentielle (*cesH*) a été trouvé dans la région 5' et des gènes *cesC/D* codant potentiellement un transporteur ABC dans la partie 3' du locus.

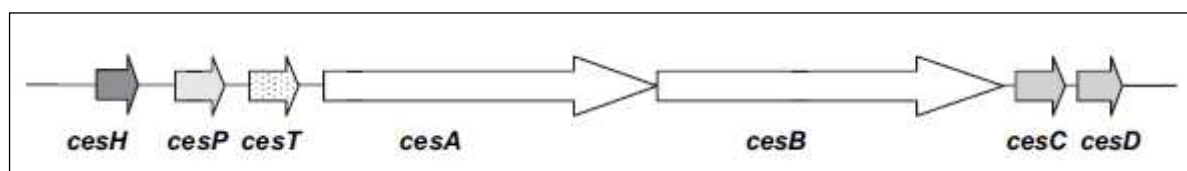


Figure 6 : Représentation schématique du regroupement *ces*. Il contient le gène *cesH* qui coderait une hydrolase, le gène *cesP* qui code une 4'-phosphopantéthéinyle transférase, le gène *cesT* qui code une thioestérase de type II, deux gènes *cesA* et *cesB* codant les modules NRPS et les gènes *cesC* et *cesD* qui coderaient un transporteur ABC, d'après (Dommel, *et al.*, 2011).

Le céréulide est extrêmement stable et résiste à une large gamme de pH ainsi qu'à des hautes températures (121°C pendant 15 min), ce qui lui permet de ne pas être détruit par l'acide gastrique, par les enzymes protéolytiques du tractus intestinal ainsi que par la cuisson des aliments (Agata, *et al.*, 1994, Shinagawa, *et al.*, 1996). Le mécanisme par lequel le céréulide cause une nausée chez l'Homme n'a pas été déterminé. Cependant, il a été montré chez la souris qu'une fois dans le duodénum, le céréulide se fixe au récepteur 5-HT₃, présent notamment au niveau des terminaisons vagues du tube digestif. Cette fixation entraîne une stimulation du nerf vague afférent et provoque le vomissement (Agata, *et al.*, 1995). D'autre part, le céréulide est capable d'inhiber l'oxydation des acides gras au niveau de la mitochondrie en formant un canal dans sa membrane (Mikkola, *et al.*, 1999). Il a également

été montré que le céréulide cause des dommages cellulaires et inhibe l'activité des Natural Killers qui sont des cellules impliquées dans la réponse immunitaire (Paananen, *et al.*, 2002).

2.2. Les entérotoxines

2.2.1. L'hémolysine BL

La première entérotoxine décrite est l'hémolysine BL (Hbl). Cette entérotoxine est composée de trois sous-unités comprenant deux composants lytiques L2 et L1 codés par *hblC* et *hblD* respectivement et la protéine de liaison B codée par *hblA* (Heinrichs, *et al.*, 1993, Ryan, *et al.*, 1997). Un quatrième composant HblB', dont la fonction est inconnue, codé par le gène *hblB'*, est produit chez la souche ATCC 14579 (Clair, *et al.*, 2010). Hbl est une toxine hémolytique, cytotoxique, dermonécrotique et elle entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire. L'établissement du syndrome diarrhéique par cette toxine a été montré *in vitro* par l'accumulation de liquide dans une anse iléale de lapin ligaturée (Beecher, *et al.*, 1995). L'interaction des trois sous-unités est nécessaire pour la formation du pore transmembranaire et le ratio optimal des composants L2, L1 et B requis pour une cytotoxicité maximale est de 1 : 1 : 1. Chacun des composants de Hbl est sécrété via le système Sec et se lie à la membrane cellulaire de manière indépendante. Cependant, les composants L2 et L1 présentent une vitesse de fixation plus rapide que le composant B (Beecher & Wong, 1997, Beecher & Wong, 2000, Fagerlund, *et al.*, 2010). L'alignement des séquences en acides aminés montre 20 à 24% d'identité entre les composants L2, L1 et B. De plus, l'analyse structurale de ces protéines indique qu'elles sont presque entièrement constituées d'hélices alpha. Enfin, plusieurs souches de *B. cereus* présentent plusieurs copies des gènes *hbl* dans leur génome. Par exemple, la souche F837/76 possède un deuxième ensemble de gène *hbl* (Beecher & Wong, 1997, Schoeni & Wong, 1999). Toutes ces données suggèrent que les gènes *hbl* résultent de la duplication d'un gène ancestral commun.

2.2.2. L'entérotoxine Nhe (Non-Hemolytic Enterotoxin)

L'entérotoxine Nhe se présente également sous la forme d'un complexe protéique tripartite comprenant NheA, NheB et NheC, codées par l'opéron *nheABC* (Granum, *et al.*, 1999). Cet opéron est systématiquement retrouvé chez les souches de *B. cereus* isolées de TIAC (Guinebretiere, *et al.*, 2008). L'entérotoxine Nhe présente une cytotoxicité équivalente

à Hbl mais ne possède pas de caractère hémolytique. Nhe est capable de former des pores et de perturber l'intégrité de la membrane plasmique de cellules épithéliales entraînant ainsi une lyse cellulaire (Lindback, *et al.*, 2004, Fagerlund, *et al.*, 2008, Haug, *et al.*, 2010). Les trois composants sont indispensables pour l'activité biologique. L'activité cytotoxique maximale de Nhe sur cellules épithéliales (Cellules Vero) est obtenue avec un ratio molaire de 10:10:1 pour NheA, NheB et NheC respectivement. Il a été montré qu'un excès de NheC inhibe la fixation de NheB. La faible quantité de NheC par rapport à celle de NheA et NheB est due à la présence d'un atténuateur de transcription situé en amont du gène *nheC*. Cet atténuateur de transcription stoppe la transcription 9 fois sur 10. De plus, un ordre de fixation des trois composés sur les cellules épithéliales doit être respecté afin de conserver l'activité cytotoxique. NheA ne possède pas la capacité de se fixer directement aux cellules cibles. NheB et NheC qui présentent une région hydrophobe sont responsables de l'adhérence de la toxine aux cellules cibles (Lindback, *et al.*, 2004, Lindback, *et al.*, 2010). Les composants de Nhe présentent des homologies entre eux mais aussi avec les composants de Hbl. NheB est identique à 44% à NheC. Les pourcentages d'identité entre NheB et L1 et NheC et B sont 37% et 25% respectivement. Ces données supposent une origine commune entre les gènes *hbl* et *nhe*.

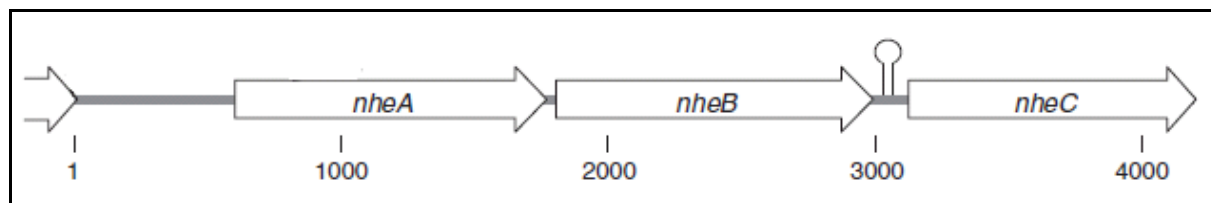


Figure 7 : Représentation schématique de l'opéron *nhe*. La région inversée répétée en amont de *nheC* est indiquée par une structure en tige boucle, d'après (Arnesen, *et al.*, 2008).

2.2.3. La cytotoxine K (CytK)

La cytotoxine CytK fut découverte pour la première fois en 1998 chez une souche du groupe VII (NVH391/98), isolée d'une toxi-infection alimentaire qui a causé la mort de trois personnes en France (Lund, *et al.*, 2000). Cette protéine de 34 kDa, codée par *cytK*, appartient à la famille des protéines à structure en tonneau β capables de former des pores. CytK est nécrotique, hémolytique et cytotoxique pour l'épithélium intestinal (Hardy, *et al.*, 2001). Deux variants du gène *cytK* ont été caractérisés : (i) *cytK1* correspondant au variant original, présent chez toutes les souches du groupe VII et (ii) *cytK2* présent chez la majorité

des souches des autres groupes. Les séquences en acides aminés des protéines CytK1 et CytK2 sont à 89% identiques. Cependant il a été montré que CytK1 est cinq fois plus toxique que CytK2 sur cellules épithéliales de type Caco-2 et Vero (Fagerlund, *et al.*, 2004).

2.2.4. L'entérotoxine FM (EntFM ou CwpFM)

L'entérotoxine EntFM (45kDa) a été isolée pour la première fois chez la souche FM1 et a été appelée ainsi car elle était suspectée de causer une forte accumulation de liquide lorsqu'elle était administrée à une anse intestinale ligaturée de souris (Asano, *et al.*, 1997). Les deux études qui ont été faites sur EntFM ne sont pas en accord sur son rôle possible. Une première étude a montré que le mutant *entFM* de la souche Cx5 présentait à la fois une forte réduction de cytotoxicité sur cellules Vero et une activité hémolytique fortement diminuée par rapport à la souche sauvage (Luxanani, *et al.*, 2003). Une autre étude réalisée chez la souche *Bt407 cry-* (Bc407) n'observe pas de différence de cytotoxicité chez le mutant dépourvu du gène *entFM*. Cette étude met en évidence l'implication d'EntFM dans la motilité, l'adhérence aux cellules épithéliales et la formation de biofilm. De plus, les auteurs montrent que cette protéine dont la séquence en acides aminés est très conservée au sein du groupe *B. cereus*, présente un domaine NlpC/P60 caractéristique des peptidases de la paroi cellulaire et ont proposé de la nommer CwpFM (Cell wall peptidase FM) (Tran, *et al.*, 2010).

2.2.5. Les hémolysines

La céréolysine ou hémolysine I codée par le gène *clo*, fait partie de la famille des hémolysines à thiols. Cette famille regroupe les cytolysines se liant au cholestérol des cellules cibles et causant ainsi la formation de larges pores transmembranaires (Brillard & Lereclus, 2007).

L'hémolysine II codée par *hem2* appartient comme CytK à la famille des protéines à structure en tonneau β capables de former des pores. Son activité hémolytique a été démontrée vis-à-vis d'érythrocytes humains. HlyII présente également une activité cytotoxique envers différents types de cellules humaines (Miles, *et al.*, 2002, Andreeva, *et al.*, 2006, Andreeva, *et al.*, 2007). Cette hémolysine entraîne l'apoptose des macrophages et joue un rôle dans la pathogénicité. Il a été montré que le mutant $\Delta hlyII$ inoculé chez la souris induit

une plus faible mortalité que la souche sauvage. De plus, l'administration de HlyII purifiée par voie intraveineuse entraîne une forte mortalité chez la souris (Tran, *et al.*, 2011).

L'hémolysine III codée par *hem3*, possède une activité dépendante de la température. Elle est capable de se lier au niveau de la membrane des érythrocytes, d'y former des pores puis d'entraîner leur lyse à 37°C mais pas à 4°C (Baida & Kuzmin, 1996).

La céréolysine AB est un complexe formé par deux phospholipases : la sphingomyélinase (SM-PLC) et la phosphatidylcholine phospholipase (PC-PLC). Elle présente également une activité cytolytique (Gilmore, *et al.*, 1989).

2.2.6. Les autres facteurs de virulence

Outre les entérotoxines et les hémolysines, *B. cereus* sécrète d'autres facteurs qui lui permettent par exemple de contourner le système immunitaire de l'hôte telle que la métalloprotéase InhA1 impliquée dans l'échappement aux macrophages (Ramarao & Lereclus, 2005, Guillemet, *et al.*, 2010). D'autres facteurs permettent d'adhérer aux tissus ou d'acquérir des nutriments, tels que les nombreuses protéases synthétisées par *B. cereus* ou encore IlsA qui est une protéine de surface permettant l'acquisition du fer (Andersson, *et al.*, 1998). Enfin, une protéine remarquable dont le rôle est mal compris dans la pathogenèse est l'ADP-ribosyltransférase C3cer. Elle cible les Rho GTPases des cellules cibles et perturbe le cytosquelette d'actine (Wilde, *et al.*, 2002, Wilde, *et al.*, 2003).

3. Régulation de la production des facteurs de pathogénicité.

Les bactéries sont capables de détecter leur environnement et de réagir en conséquence. En général, la production des facteurs de virulence est un mécanisme finement régulé chez les bactéries. Ceci leur permet de sécréter ces facteurs uniquement lorsqu'elles en ont besoin, par exemple en présence de carence nutritive. De plus, sécréter continuellement des toxines serait un désavantage sélectif pour elles car la synthèse et le transport de toxines requièrent de l'énergie. Plusieurs systèmes de régulation des facteurs de pathogénicité faisant intervenir différents régulateurs ont été mis en évidence ces dernières années chez *B. cereus sensu stricto*. Chacun de ces régulateurs répond aux signaux de l'environnement perçus par la

bactérie. Bien que les souches de *B. cereus* soient phylogénétiquement apparentées, nous devons garder en mémoire qu'au niveau phénotypique chaque souche est potentiellement différente. Pour preuve, le niveau de production des entérotoxines Hbl et Nhe est variable chez des souches cultivées dans les mêmes conditions (Guinebretiere, *et al.*, 2002, Moravek, *et al.*, 2006). Ainsi, ce qui a été démontré pour une souche ne doit pas constituer une vérité pour l'ensemble.

3.1. Les régulateurs répondant au signal de densité de population

La détection du quorum (quorum sensing) permet à une population bactérienne de synchroniser l'expression ou la répression de gènes particuliers en fonction de sa densité. Ainsi les bactéries adaptent et coordonnent leurs comportements en communauté. Les systèmes détecteurs de quorum sont largement utilisés chez les bactéries, ils sont présents à la fois chez les bactéries à Gram positif ou négatif et ils coordonnent des fonctions essentielles à l'adaptation aux conditions environnementales telles que la virulence, la formation de biofilm, la sporulation, la compétence, etc. Les cellules bactériennes communiquent entre elles en sécrétant de petites molécules appelées auto-inducteur dont la quantité augmente avec la population bactérienne. La modulation de l'expression de certains gènes se réalise lorsque la concentration de l'auto-inducteur atteint un certain seuil (Waters & Bassler, 2005). L'auto-inducteur est dépendant de l'espèce bactérienne mais peut être reconnu par des espèces bactériennes différentes voire même par des espèces eucaryotes (Fong, *et al.*, 2001, Mathesius, *et al.*, 2003).

3.1.1. Le régulateur pléiotrope PlcR

3.1.1.1. Le système PlcR/PapR

Le régulateur PlcR (Phospholipase C Regulator, 34 kDa) appartient à la famille des récepteurs à quorum sensing intracellulaire RNPP (Rap/NrpR/PlcR/PrgX) (Declerck, *et al.*, 2007). PlcR est capable de se fixer sur ses régions opératrices uniquement sous sa forme activée, c'est-à-dire sous la forme du complexe PlcR- auto-inducteur PapR mature (Peptide activating PlcR). PapR est codé par le gène *papR* et régulé par PlcR. PapR est un peptide de 48 acides aminés qui semble être sécrété via le système Sec. Une fois dans le milieu extracellulaire, PapR est mûré en un peptide de plus petite taille par la protéase NprB puis est réimportée dans la cellule via l'oligopeptide perméase OppABCDE où il interagit avec

PlcR. Le complexe PlcR- auto-inducteur PapR mature va par la suite activer la transcription de *plcR* et *papR* et aura pour effet d'amplifier le système (Slamti & Lereclus, 2002, Pomerantsev, *et al.*, 2009). Une diversité dans la séquence du peptide mature PapR permet de mettre en évidence quatre classes de paires « PlcR-PapR » qui définissent quatre formes de « phérotypes » au sein du groupe *cereus sensu lato*. De plus une faible inter-réactivité a été observée entre les formes hétérologues de PapR et de PlcR (Slamti & Lereclus, 2005). PlcR a été cristallisé complexé avec PapR sous la forme d'un dimère asymétrique. La partie N-terminale de PlcR comprend un domaine de liaison à l'ADN de type hélice-tour-hélice (HTH) et sa partie C-terminale contient cinq motifs TPR incluant un domaine contenant 11 hélices impliquées dans l'interaction avec PapR. La modélisation de la structure du complexe en fonction de l'angle de diffraction des rayons X suggère que la liaison de PapR déclenche un changement de conformation des dimères de PlcR qui voient leur domaine TPR se fermer et leur domaine HTH s'ouvrir permettant ainsi la fixation à l'ADN (Declerck, *et al.*, 2007).

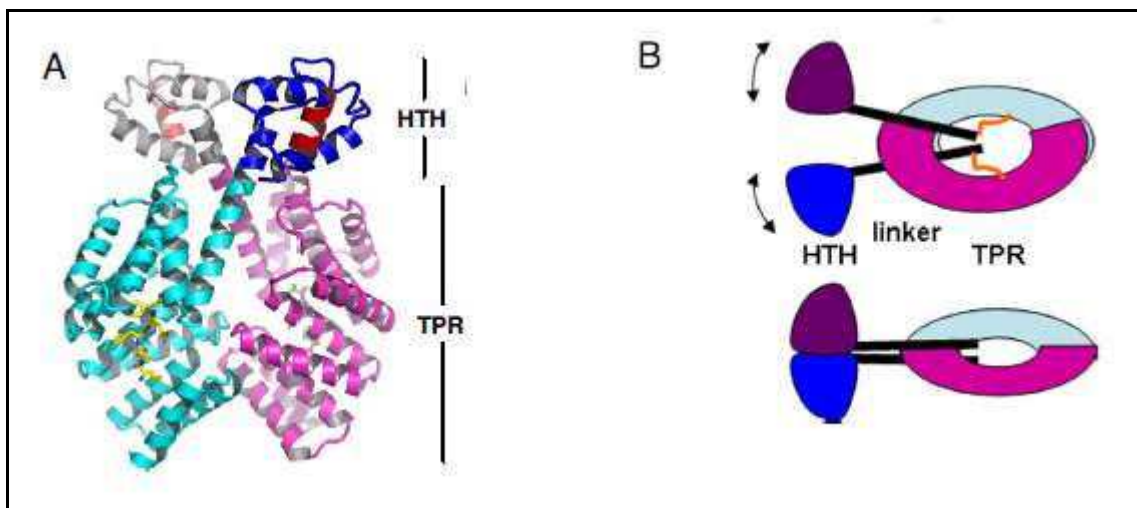


Figure 8 : Effet moléculaire de la fixation de PapR sur PlcR. (A) Structure tertiaire du dimère PlcR lié au peptide PapR (jaune). Les domaines hélice-tour-hélice sont représentés en gris et bleu, les domaines TPR sont représentés en bleu cyan et rose. (B) Schéma illustrant le réarrangement des domaines TRP suite à la fixation de PapR. D'après (Declerck, *et al.*, 2007).

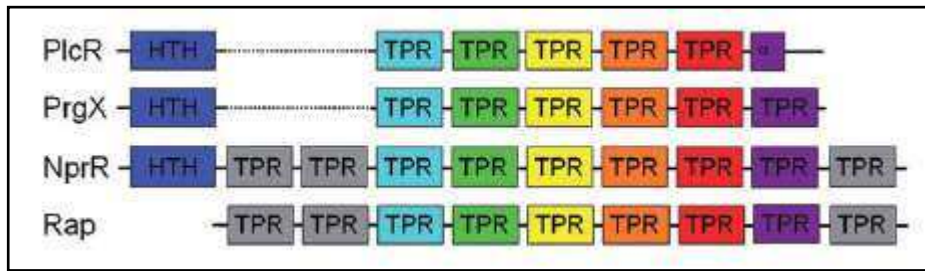


Figure 9 : Représentation schématique de la structure des protéines de la famille des RNPP. Le domaine N-terminal HTH de liaison à l'ADN est représenté en bleu, les six domaines TPR conservés sont en cyan, vert, jaune, orange, rouge et violet respectivement. Les trois domaines TPR additionnels présents chez les protéines NprR et Rap sont représentés en gris d'après (Perchat, *et al.*, 2011).

3.1.1.2. Le régulon PlcR

Chez *B. cereus*, PlcR a été le premier régulateur étudié dont l'activité est dépendante du quorum sensing. PlcR est un régulateur pléiotrope impliqué notamment dans l'activation de nombreux gènes de pathogénicité incluant *hbl*, *nhe*, *cytK*, des gènes codant des protéases et des gènes codant des phospholipases. Il a été montré qu'au début de la phase stationnaire de croissance, les produits des gènes du régulon PlcR représentent environ 50% du protéome extracellulaire (Gohar, *et al.*, 2002). De plus, une liste de 45 gènes régulés directement par PlcR a été établie en recherchant les boîtes de fixation de PlcR *in silico* et en couplant ces résultats à des études comparatives du transcriptome et du protéome du mutant ATCC 14579 Δ *plcR* et de la souche sauvage. Une liste exhaustive des membres potentiels du régulon PlcR a été établie par Ivanova *et al.*, 2003. Cette liste met en évidence la diversité des fonctions occupées par les protéines du régulon. PlcR régulerait potentiellement d'autres régulateurs, des protéines de dégradations, des enzymes du métabolisme, des protéines de motilité et de chimiotactisme, des peptides antibactériens ainsi qu'une variété de protéines impliquées dans le transport actif dont des pompes à efflux d'antibiotiques (Ivanova, *et al.*, 2003). L'étude *in silico* a également révélé que les gènes régulés par PlcR sont dispersés le long du chromosome et ne constituent pas un îlot de pathogénicité (Gohar, *et al.*, 2008). La séquence opératrice reconnue par PlcR est très conservée et forme le palindrome suivant : TATGNAN₄TNCATA (Agaisse, *et al.*, 1999, Gohar, *et al.*, 2008).

PlcR s'auto-active et l'expression de son gène est réprimé lors de l'entrée en sporulation par la fixation de Spo0A~P sur les deux boîtes Spo0A qui encadrent la boîte PlcR (Lereclus, *et al.*, 2000).

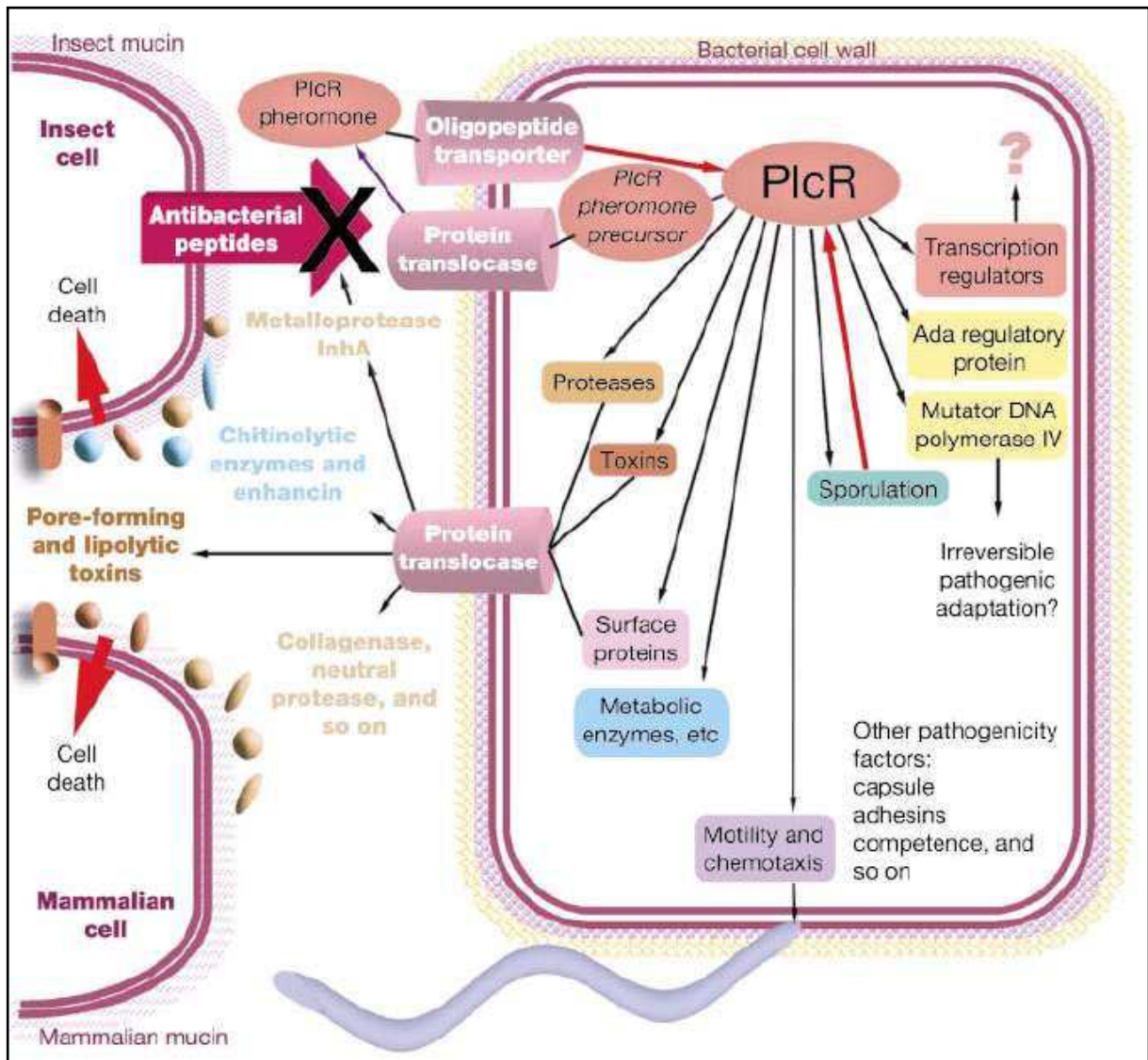


Figure 10 : Représentation schématique des catégories de gènes régulés ou régulés de manière potentielle par PlcR d'après (Ivanova, *et al.*, 2003).

3.1.1.3. Importance de PlcR dans la pathogénicité

Un lien direct a été mis en évidence entre le régulon PlcR et la virulence de *B. cereus* et de *B. thuringiensis*. La délétion du gène *plcR* entraîne une réduction de la virulence par ingestion chez l'insecte *G. mellonella*, par instillation nasale chez la souris et par injection

intraoculaire chez le lapin (Salamitou, *et al.*, 2000, Callegan, *et al.*, 2003). Le surnageant de culture du mutant *plcR* voit diminuer ses propriétés cytotoxiques sur les hémocytes de *G. mellonella* ainsi que sur les cellules épithéliales de type HeLa par rapport à la souche sauvage (Salamitou, *et al.*, 2000, Ramarao & Lereclus, 2006). Chez *B. anthracis*, PlcR n'est pas fonctionnel du fait de la présence d'une mutation non-sens localisée dans le gène *plcR* conduisant à la production d'une protéine tronquée (Salamitou, *et al.*, 2000, Slamti, *et al.*, 2004).

3.1.2. Le régulateur NprR

Le régulateur NprR (Neutral protease R) est un régulateur transcriptionnel membre de la famille des protéines RNPP dont l'activité est dépendante du quorum. Ce régulateur est activé en début de phase stationnaire lorsqu'il interagit avec le peptide auto-inducteur mature NrpX. Le système de maturation de NrpX est similaire à celui de PapR. Le peptide NrpX est sécrété, mûri puis importé dans les bactéries sous la forme d'un heptapeptide. Le complexe NprR/NrpX active la transcription des gènes codant des enzymes de dégradation telles que des protéases et des lipases (Perchat, *et al.*, 2011, Dubois, *et al.*, 2012, Rocha, *et al.*, 2012).

3.2. Les régulateurs liés indirectement à la densité de population

3.2.1. AbrB

Chez *B. subtilis*, AbrB est un régulateur pléiotrope qui réprime ou active l'expression de gènes ayant un rôle dans le passage de l'état quiescent vers l'état de croissance et dans le passage de l'état de croissance vers l'état de phase stationnaire (Strauch, *et al.*, 1989, O'Reilly & Devine, 1997, Saile & Koehler, 2002).

Chez *B. cereus*, AbrB réprime l'expression des gènes *ces* en se fixant sur la région promotrice de l'opéron *ces*. Il a été montré que l'expression de *abrB* est maximale pendant la phase de latence et au début de la phase exponentielle puis décline jusqu'au milieu de la phase exponentielle de croissance. Pendant la phase stationnaire, le régulateur majeur de l'entrée en sporulation Spo0A est produit et inhibe l'expression de *abrB*, permettant ainsi la production de céroïde (Lucking, *et al.*, 2009).

3.2.2. YvfTU

Pendant la phase stationnaire, le système à deux composants YvfTU active l'expression de *plcR*. Cependant, le signal environnemental auquel répond YvfTU est inconnu. La délétion de *yvfTU* entraîne une faible diminution de la virulence de *B. cereus* chez l'insecte et une modification de l'expression des gènes régulés par PlcR de 24% (Brillard, *et al.*, 2008).

3.3. Les régulateurs répondant au signal de présence ou d'absence de nutriments

Les multiples modes de vie de *B. cereus* amènent cette bactérie à rencontrer des environnements aux conditions nutritives variables aussi bien en quantité qu'en qualité. Les nutriments sont souvent présents en faible concentration, disponibles de façon transitoire ou inaccessibles. Pour faire face à de telles variations, *B. cereus* s'adapte en modulant l'expression d'un certain nombre de gènes dont ceux des facteurs de virulence via des régulateurs sensibles aux signaux de carence nutritive ou d'abondance en nutriments.

3.3.1. Le régulateur pléiotrope CodY

3.3.1.1. CodY chez *B. subtilis*

Le régulateur CodY a été mis en évidence pour la première fois chez *Bacillus subtilis* comme étant un répresseur de l'opéron *dppABCDE* codant la dipeptide perméase (Slack, *et al.*, 1995). Retrouvé uniquement chez les bactéries à Gram positif à faible pourcentage en GC, il a été montré quelques années plus tard que ce régulateur est un facteur important pour la réponse adaptative à la limitation nutritive. Chez *B. subtilis*, plusieurs centaines de gènes sont sous le contrôle de CodY et 70 unités de transcription possèderaient un site de fixation à CodY (Molle, *et al.*, 2003). Les gènes impliqués dans la réponse adaptative codent notamment des enzymes de dégradation, des systèmes de transport, des enzymes du métabolisme, des protéines participant à l'activation du système de compétence, des protéines impliquées dans la synthèse d'antibiotiques, des protéines de sporulation et la flagelline (Sonenshein, 2005, Sonenshein, 2007). La plupart des gènes contrôlés par CodY sont réprimés en phase exponentielle de croissance. Néanmoins, certains voient leur transcription activée par CodY, ce qui est le cas de l'acétate kinase *ackA* (Shivers, *et al.*, 2006).

CodY est un dimère de 29 kDa dont la capacité de liaison à l'ADN est renforcée par deux types de co-répresseurs : le GTP et les acides aminés ramifiés (BCAA) (leucine, isoleucine et valine).

La cristallographie de CodY a permis de mettre en évidence deux domaines chez cette protéine : un domaine N-terminal qui comprend un domaine GAF (nommé ainsi car il est retrouvé chez les protéines suivantes : cGMP-spécifiques des phosphodiésterases, Adénylclases et le régulateur FhlA activant la transcription d'une Formiate hydrogène lyase) et un domaine hélice-tour-hélice de fixation à l'ADN (Levdikov, *et al.*, 2006).

La fixation des BCAA se réalise au niveau d'une poche du domaine GAF grâce aux acides aminés R61, F71 et F98 (Villapakkam, *et al.*, 2009). La fixation du co-répresseur induit un important changement de conformation qui est probablement transmis au domaine C-terminal de façon à réguler la fixation de CodY à l'ADN (Levdikov, *et al.*, 2009). La fixation du GTP, quant à elle ne se fait pas au niveau du domaine GAF mais probablement au niveau du domaine hélice-tour-hélice (Levdikov, *et al.*, 2006, Levdikov, *et al.*, 2009).

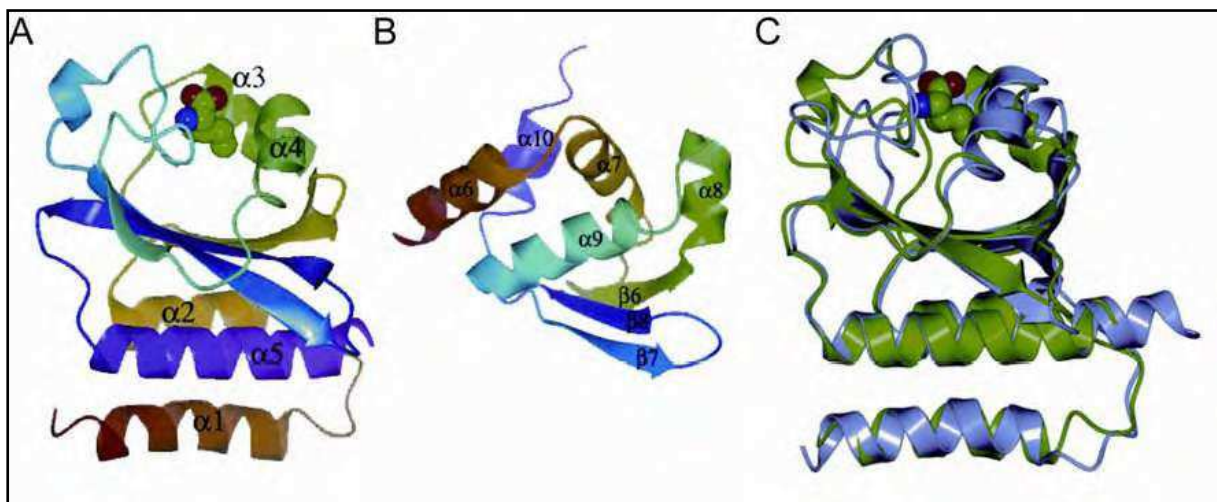


Figure 11 : Structure de CodY

A. Structure du domaine GAF en présence de BCAA. B. Structure du domaine C-terminal de CodY contenant le domaine HTH. C. Changement de conformation du domaine GAF en présence (vert) ou en absence (violet) de BCAA. (Levdikov *et al.*, 2009 ; Levdikov *et al.*, 2006)

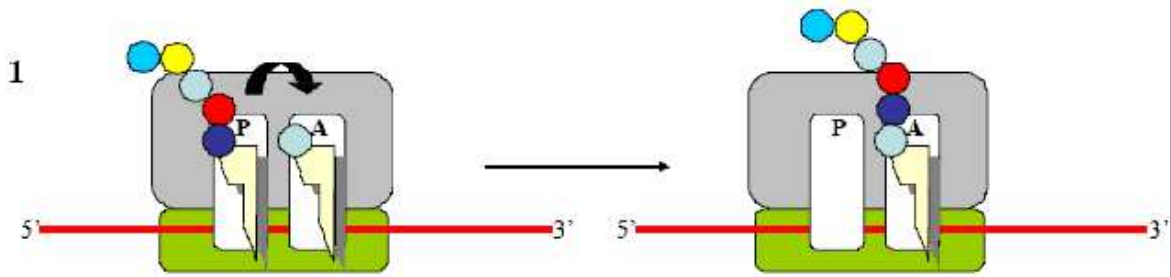
3.3.1.2. CodY et la réponse stringente

Chez les bactéries possédant une protéine CodY liant le GTP, il existe un phénomène d'interconnexion entre la réponse stringente et la répression par CodY.

La réponse stringente est un mécanisme de survie mis en place par les bactéries lorsque les conditions de croissance sont défavorables et dans lesquelles l'apport d'acides aminés est insuffisant pour assurer une synthèse protéique normale. Les bactéries économisent ainsi leurs ressources en court-circuitant de nombreuses voies métaboliques (préférant synthétiser les acides aminés non présents dans le milieu) et en s'engageant dans un minimum d'activités jusqu'à ce que l'apport nutritif augmente. La réponse stringente engendre l'accumulation de deux nucléotides inhabituels qui sont le ppGpp (guanosine tetraphosphate) et le pppGpp (guanosine pentaphosphate). Ces deux composés sont formés grâce à la protéine RelA associée au ribosome lorsqu'il n'y a pas d'aminoacyl-ARNt disponible pour répondre à un codon particulier. Un ARNt correspondant non chargé pénètre dans le site A du ribosome et déclenche une réaction stérile. RelA produit alors du ppGpp par transfert d'un groupement pyrophosphate de l'ATP au GDP et du pppGpp par transfert d'un groupement pyrophosphate de l'ATP au GTP (Haseltine, *et al.*, 1972, Haseltine & Block, 1973, Potrykus & Cashel, 2008).

L'augmentation de (p)ppGpp conduit à un appauvrissement de la concentration de GTP dans la cellule. Le GTP n'étant plus disponible, il n'est donc plus lié à CodY, cela entraîne un changement de conformation de CodY et l'expression des gènes régulés par celui-ci est modifiée (Handke, *et al.*, 2008).

Synthèse protéique normale :



Site A : site d'entrée de l'aminoacyl-ARNt

Site P : site contenant le peptidyl-ARNt

Conditions stringentes :

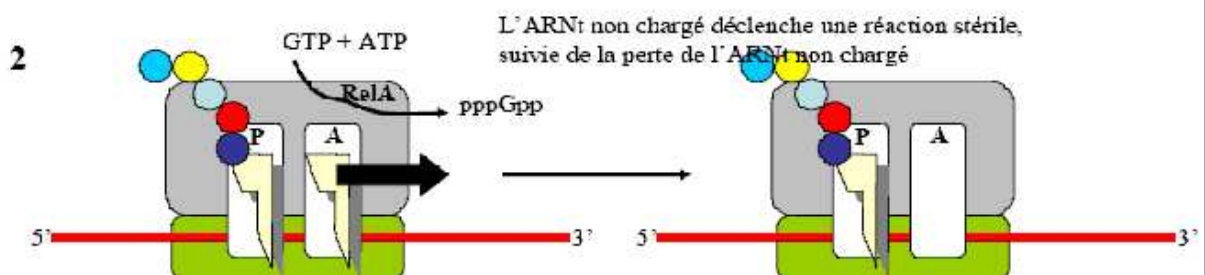


Figure 12 : Représentation schématique de la synthèse protéique normale et de la pause de traduction lors de la réponse stringente d'après la présentation de Khelif Ala eddine.

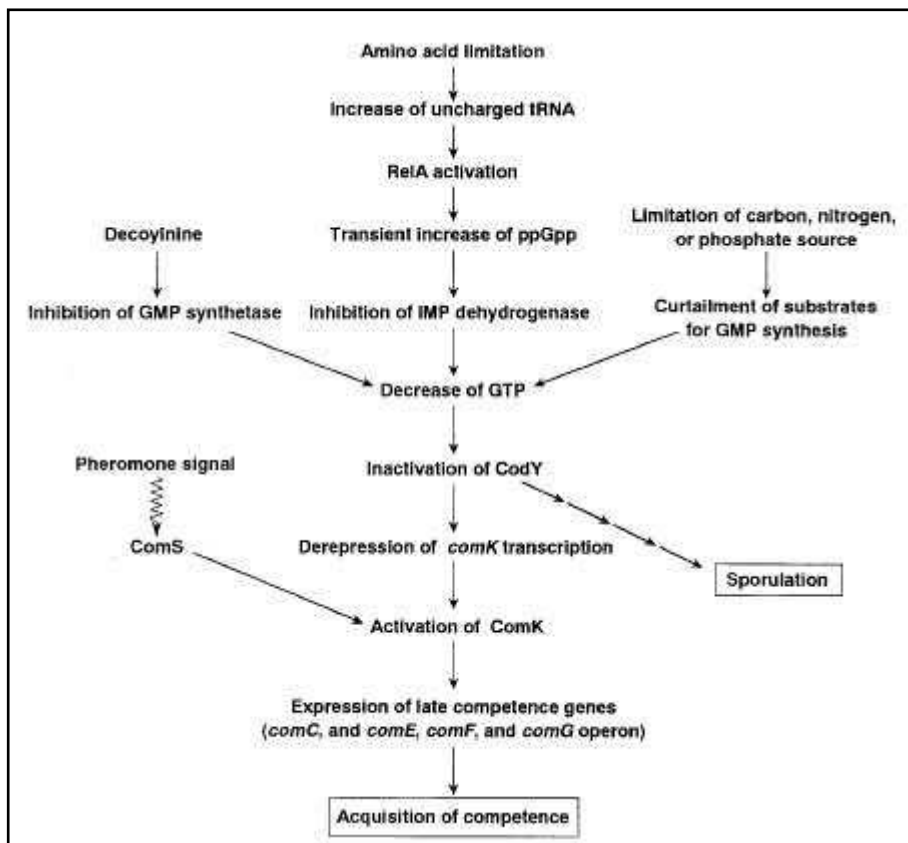


Figure 13 : Modèle de régulation métabolique de la compétence chez *B. subtilis*. L'induction de la compétence en réponse à une carence nutritionnelle est due à l'activation de RelA qui permet la production de (p)ppGpp et la diminution de GTP. CodY dérègle alors les promoteurs des gènes régulant la compétence (Inaoka & Ochi, 2002).

3.3.1.3. CodY chez *B. cereus*

En 2008, Hsueh et collaborateurs ont criblé des mutants de transposition générés chez la souche UW101C vis-à-vis de leur capacité à former un biofilm. Un mutant chez lequel le transposon s'est placé dans le gène *codY* présentait une formation de biofilm défectueuse. L'ajout d'acides aminés dans le milieu prolonge la durée du biofilm chez la souche sauvage et non chez le mutant. De plus, l'addition dans le milieu d'un inhibiteur de la synthèse de GTP entraîne une diminution de la formation de biofilm chez la souche sauvage par rapport au mutant. Les auteurs montrent enfin que la protéine CodY de *B. cereus* est aussi capable de réguler directement la transcription du gène *dpp* en réponse aux variations de concentrations de GTP et d'acides aminés (Hsueh, *et al.*, 2008).

Ces résultats, montrant que CodY est important pour la formation de biofilm chez la souche UW101C ne sont pas observés chez la souche ATCC 14579 où la délétion de *codY* entraîne une augmentation de la formation de biofilm suggérant que CodY réprime la

formation de biofilm (Lindback, *et al.*, 2012). L'étude du transcriptome du mutant ATCC 14579 Δ *codY* indique que, plusieurs gènes impliqués dans la formation de biofilm, le transport d'acides aminés, ainsi que des gènes codant des enzymes du métabolisme, sont induits tandis que les gènes associés à la mobilité et des gènes du régulon PlcR sont réprimés par rapport à la souche sauvage. Les auteurs mettent également en lumière le rôle de CodY dans la production de toxines en montrant que chez le mutant *codY* une diminution de l'activité hémolytique est observée ainsi qu'une diminution de la quantité des protéines CytK et Nhe (Lindback, *et al.*, 2012).

Une dernière étude réalisée chez la souche émétique F4810/72 met également en avant le rôle de CodY dans la virulence (Frenzel, *et al.*, 2012). Chez le mutant les quantités des transcrits du gène de la toxine Nhe, du gène de la phosphatidylcholine phospholipase PC-PLC, du gène de l'hémolysine I et du gène de la métalloprotéase InhA2 sont diminuées tandis que celles des gènes des métalloprotéases InhA1 et InhA3, du gène de la protéase Npr599 et du gène *cesA* du céréulide sont augmentées par rapport à la souche sauvage. CodY est un répresseur direct de *inhA1* et de l'opéron *ces*. Il a également été montré que la répression de l'opéron *ces* est médiée par la présence dans le milieu de BCAA. Par contre CodY ne constitue pas un activateur direct de *nhe* ou de *plcB*.

CodY joue donc un rôle important dans la croissance, la virulence et la persistance de *B. cereus* à différents environnements.

3.3.2. Le régulateur CcpA

3.3.2.1. La répression/activation catabolique : définition et mécanisme d'action

La répression catabolique fut décrite pour la première fois par Jacques Monod lorsqu'il cultiva *B. subtilis* dans un milieu défini en présence de deux glucides (le glucose et le sorbitol). Il observa alors deux phases de croissance distinctes séparées par un temps de latence et appela ce phénomène, la diauxie. Il montra par la suite que les glucides étaient utilisés hiérarchiquement. *B. subtilis* préfère dans un premier temps, cataboliser un certain type de sources de carbone qui est utilisé pendant la première phase de croissance et utilise, dans la deuxième phase des sources de carbone moins favorables. La présence dans le milieu

d'une source de carbone préférée entraîne la répression de la synthèse des enzymes nécessaires au transport et au catabolisme des sources de carbone moins appréciées. Le terme de répression catabolique fut introduit pour définir ce phénomène. La répression catabolique est également impliquée dans la répression de certains procédés anaboliques tels que la synthèse de certaines enzymes extracellulaires ou la synthèse de métabolites secondaires qui ne seront pas produits tant que la source de carbone et d'énergie préférentielle est présente. L'effet inverse est également observé et se nomme l'activation catabolique.

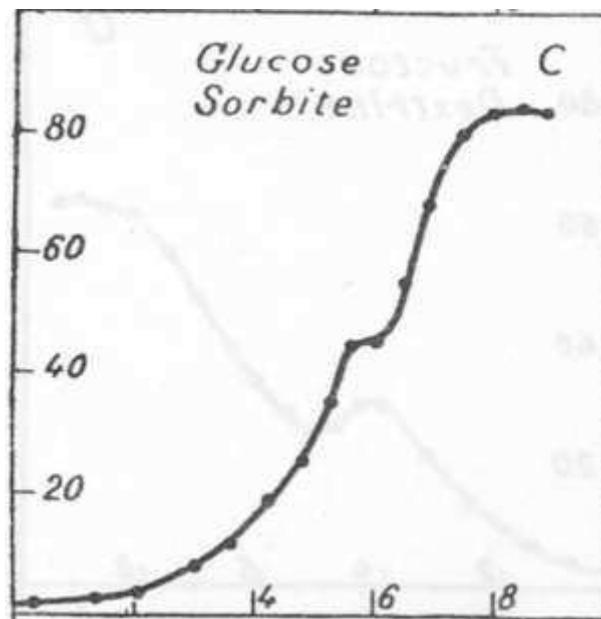


Figure 14 : Phénomène de diauxie observé par Monod, d'après Monod, 1942.

Ce n'est qu'au milieu des années 90 qu'un mécanisme expliquant la répression catabolique chez *B. subtilis* fut identifié et par extension, un mécanisme général fut proposé pouvant expliquer ce phénomène pour l'ensemble des bactéries à Gram positif à bas pourcentage en GC.

La répression ou l'activation catabolique implique le régulateur CcpA (catabolite control protein A). CcpA appartient à la famille de régulateurs transcriptionnels LacI/GalR. Ces derniers sont constitués d'un domaine N-terminal d'une soixantaine de résidus qui fixe l'ADN et d'un domaine C-terminal régulateur (Weickert & Adhya, 1992).

Le domaine C-terminal est lui-même constitué de deux sous-domaines séparés par une région charnière permettant l'existence d'un état ouvert et d'un état fermé de la protéine. Ce domaine C-terminal est également le domaine de dimérisation (Lewis, 2005). Des analyses de

mutants du domaine C-terminal de CcpA montrent aussi que ces derniers résidus sont impliqués dans la reconnaissance de co-effecteurs (Kraus, *et al.*, 1998). Les protéines HPr ou Crh phosphorylées sur leur sérine 46 (Pser46HPr et Pser46Crh) constituent les co-effecteurs de CcpA. Les complexes CcpA:Pser46HPr ou CcpA:Pser46Crh se fixent à l'ADN au niveau de séquences spécifiques appelées séquences *cre* (catabolite responsive element) (Deutscher, *et al.*, 1995, Hueck & Hillen, 1995, Fujita, 2009). Lorsque les séquences *cre* sont situées en amont du promoteur, l'expression des gènes est activée (c'est l'activation catabolique), alors que lorsqu'elles sont situées au niveau du promoteur, en aval de celui-ci voire dans la séquence codante du gène, l'expression est inhibée (c'est la répression catabolique) (Fujita, 2009).

La répression /activation catabolique s'opère via l'augmentation de fructose-1,6-biphosphate (FBP) lors des premières étapes de dégradation du glucose. La forte concentration en FBP induit l'activité de la kinase HPrK/P qui phosphoryle les protéines HPr et Crh sur leur serine 46.

Chez *B. subtilis*, 10 % du génome sont régulés par CcpA, ce qui équivaut l'expression d'environ 300 à 400 gènes (Moreno, *et al.*, 2001).

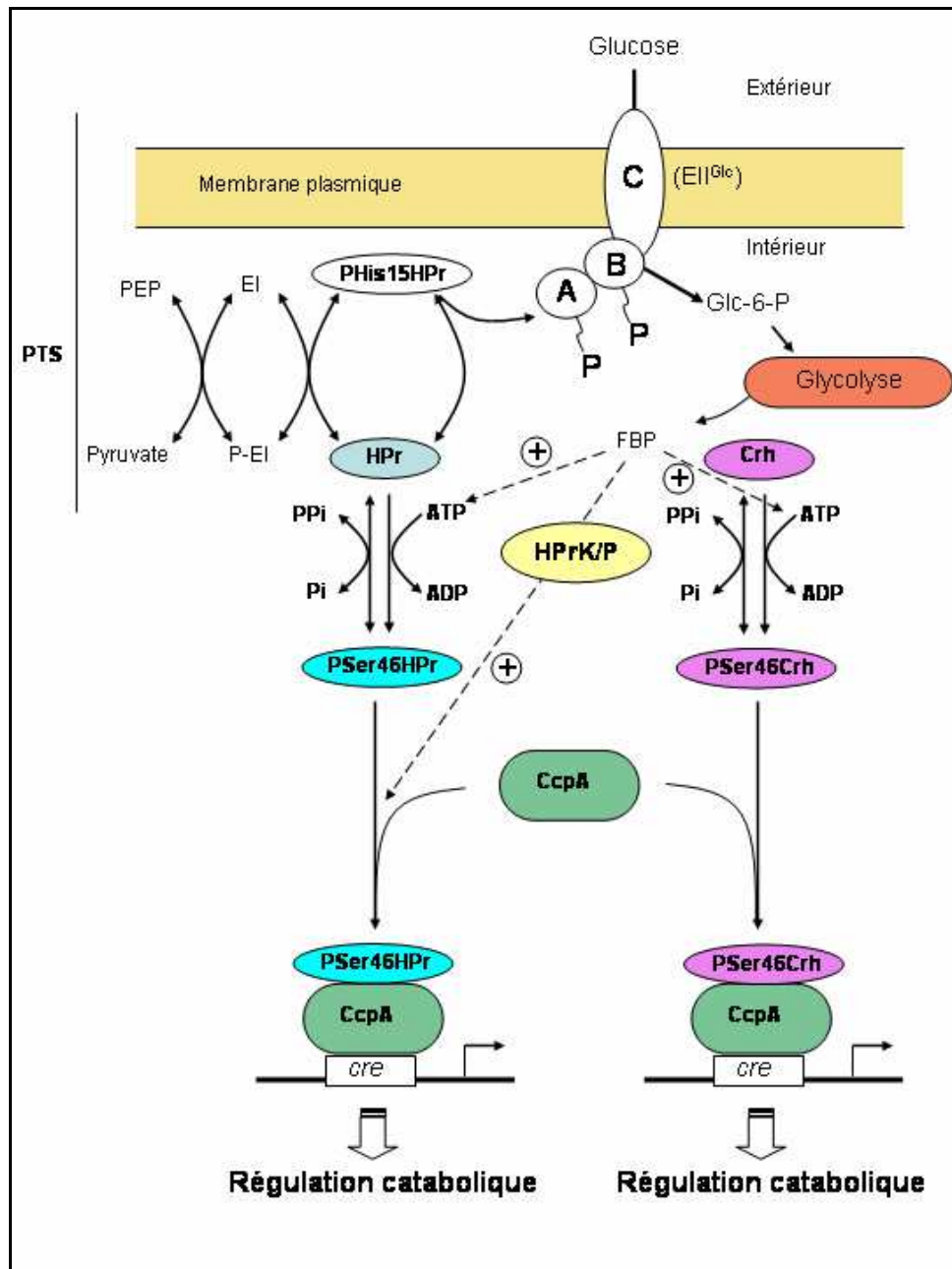


Figure 15 : Mécanisme de répression/activation catabolique médié par le régulateur CcpA et les co-effecteurs PSer46HPr et PSer46Crh chez *Bacillus subtilis*, d'après Deutscher *et al.*, 2002.

3.3.2.2. CcpA chez *B. cereus*

La protéine CcpA de *B. cereus* présente 76% d'identité avec la protéine CcpA de *B. subtilis*. Chez *B. cereus* F4430/73, il a été observé en anaérobiose que l'augmentation de la concentration en glucose dans le milieu entraîne une réduction de l'expression des gènes de l'entérotoxine Hbl (Duport, *et al.*, 2004).

Chez la souche ATCC 14579, CcpA est impliquée dans l'optimisation de l'utilisation du glucose ainsi que dans la répression de la néoglucogenèse et des voies métaboliques alternatives. La délétion de *ccpA* entraîne une augmentation de la sécrétion des entérotoxines Nhe et Hbl. Des sites *cre* potentiels ont été identifiés au niveau des régions promotrices et dans les gènes *nhe* et *hbl* (van der Voort, *et al.*, 2008).

Le glucose fonctionnerait ainsi comme une molécule signal. Dans le tractus intestinal, l'absence de glucose entrainerait la levée de la répression des entérotoxines Nhe et Hbl ainsi que la possibilité pour *B. cereus* d'utiliser les substrats présents.

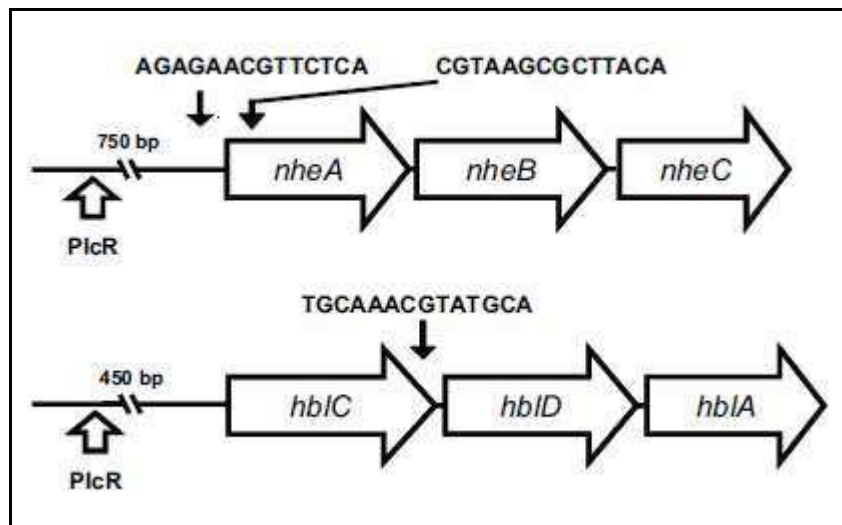


Figure 16 : Représentation schématique de la position des sites *cre* et *plcR* au niveau des opérons *nhe* et *hbl* chez *B. cereus* ATCC 14579 d'après (van der Voort, *et al.*, 2008).

3.4. Le régulateur répondant au signal de disponibilité en fer

Que ce soit chez la bactérie ou chez l'hôte, le fer joue un rôle essentiel dans un nombre varié de processus cellulaires. Par exemple, il joue le rôle de co-facteur enzymatique dans le métabolisme et pour le transport d'électrons. Chez l'hôte, le fer libre est très peu disponible car souvent séquestré par des protéines telles que la transferrine, l'hémoglobine ou la myoglobine.

Afin de faire face aux variations de concentration en fer, plusieurs bactéries pathogènes régulent l'expression de nombreux gènes, dont leurs facteurs de virulence, en réponse à la disponibilité en fer.

3.4.1. Le régulateur Fur

Chez les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif à faible pourcentage en GC, le régulateur transcriptionnel Fur (Ferric uptake regulator) présente une activité dépendante du fer (Carpenter, *et al.*, 2009). Fur est une protéine de 17 kDa fonctionnant en dimère et a pour co-facteur le fer Fe^{2+} . Cette protéine possède deux domaines : un domaine N-terminal avec un motif hélice-tour-hélice permettant la fixation à l'ADN et un domaine C-terminal contenant un domaine riche en histidines impliqué à la fois dans l'interaction avec le fer et dans la formation de dimères. Le mécanisme d'action de ce régulateur a été décrit pour la première fois chez *Escherichia coli* (Stojiljkovic & Hantke, 1995).

Le mécanisme d'action de Fur n'est pas le même chez toutes les espèces bactériennes. Chez *E.coli*, quand le fer est disponible, Fur se lie au fer et dimérise, le complexe fer-dimères de Fur se lie à la séquence consensus GATAATGATAATCATTATC appelée « boîte fur » située au niveau des régions -35 et -10 des promoteurs (Escolar, *et al.*, 1999). Cette fixation à l'ADN empêche la fixation de l'ARN polymérase au promoteur et donc la transcription du gène cible. Chez *Helicobacter pilori* et *Campylobacter jejuni*, Fur réprime l'expression de gènes en absence du co-facteur Fe^{2+} (apo-Fur) et chez *Helicobacter pilori*, *Neisseria meningitidis* ou *Pseudomonas aeruginosa*, Fur fonctionne comme activateur en présence ou en absence de fer (Carpenter, *et al.*, 2009).

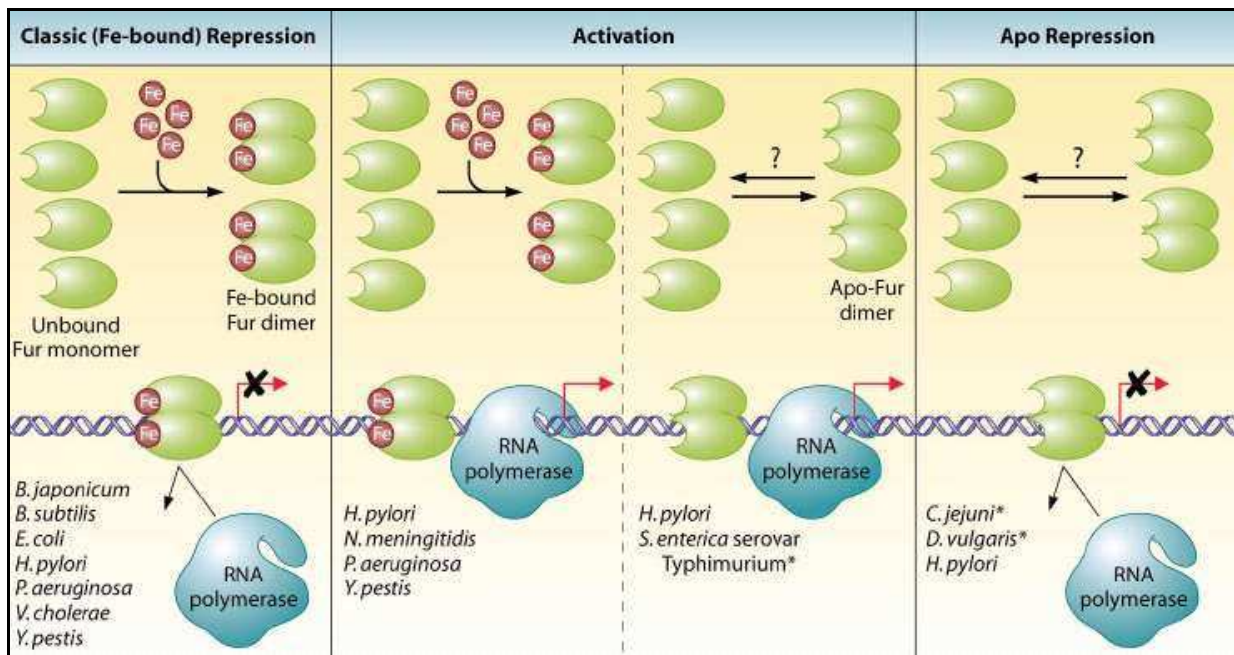


Figure 17 : Mécanismes d'actions de la protéine Fur liée ou non liée au fer chez différentes espèces bactériennes d'après (Carpenter, *et al.*, 2009).

Chez *B. cereus*, lorsque la concentration en fer est élevée, Fur se lie à la région promotrice de *hlyII* codant l'hémolysine II et empêche sa transcription en masquant le site de fixation de l'ARN polymérase. Aucune étude n'indique si Fur lie le fer chez *B. cereus*. Lorsque le fer n'est pas disponible, *B. cereus* produit de l'hémolysine II qui permet la dissociation des érythrocytes afin d'utiliser l'hémoglobine et l'hème comme source de fer pour sa croissance. De plus, il a été montré que Fur est également important dans la résistance au stress oxydant. (Harvie, *et al.*, 2005, Sineva, *et al.*, 2012).

3.5. Les régulateurs répondant aux signaux de pression en oxygène et de potentiel d'oxydoréduction

La respiration aérobie est un processus fondamental à de nombreuses cellules vivantes. Dans ce processus, les électrons produits lors de l'oxydation de donneurs d'électrons (comme le NADH issu de la glycolyse et du cycle de Krebs) sont transférés de manière séquentielle à travers une série de transporteurs membranaires ou associés à la membrane, et terminent leur transfert par la réduction de l'accepteur final d'électrons de haut potentiel rédox : l'oxygène.

L'énergie libérée lors de ce processus de transfert d'électrons est utilisée pour entraîner la translocation de protons à travers la membrane afin de générer un gradient électrochimique qui peut être utilisé pour une variété de mécanismes, tels que la synthèse d'ATP ou de transport actif. Les cellules bactériennes peuvent également produire de l'ATP en utilisant d'autres accepteurs finaux d'électrons (tel que le nitrate en anaérobiose). Ce mécanisme est nommé la respiration anaérobie.

En absence d'oxygène ou d'autres accepteurs finaux d'électrons, la synthèse d'ATP a lieu par phosphorylation au niveau du substrat. La réoxydation des co-enzymes réduits produits au cours de la glycolyse se réalise grâce à la réduction du pyruvate ou de dérivés du pyruvate. La fermentation donne lieu à une faible production d'énergie car la différence de potentiel rédox entre le donneur et l'accepteur d'électrons est faible.

Ces changements de pression en oxygène et de disponibilité des autres accepteurs d'électrons nécessitent que les bactéries détectent et réagissent en conséquence afin de réorganiser leurs voies métaboliques. Les bactéries peuvent détecter l'oxygène par une interaction directe de cette molécule avec un récepteur membranaire (par exemple, FixL (Rodgers & Lukat-Rodgers, 2005)) ou par interaction avec un facteur de transcription cytoplasmique (par exemple, Fnr (Crack, *et al.*, 2008, Fleischhacker & Kiley, 2011)). Un troisième type de perception est la détection des changements de l'état d'oxydoréduction des molécules dans la cellule. Des systèmes « rédox-sensibles » (comme par exemple : ArcBA, RegBA / PrrBA, RoxSR, RegSR, ActSR, ResDE, et Rex) capables d'intégrer une réponse à des signaux multiples et divers (par exemple, l'état rédox du pool d'ubiquinone ou de ménaquinone, l'état réduit/oxydé des cystéines, le transport des électrons à oxydases terminales, ou le ratio $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$) activent ou répriment l'expression de gènes cibles (Bauer, *et al.*, 1999, Green & Paget, 2004, Green, *et al.*, 2009, Antelmann & Helmann, 2011). Ici, nous détaillerons uniquement les protéines et réseaux de régulation impliqués dans l'adaptation métabolique et le contrôle rédox ayant un lien avec la virulence chez *B. cereus*.

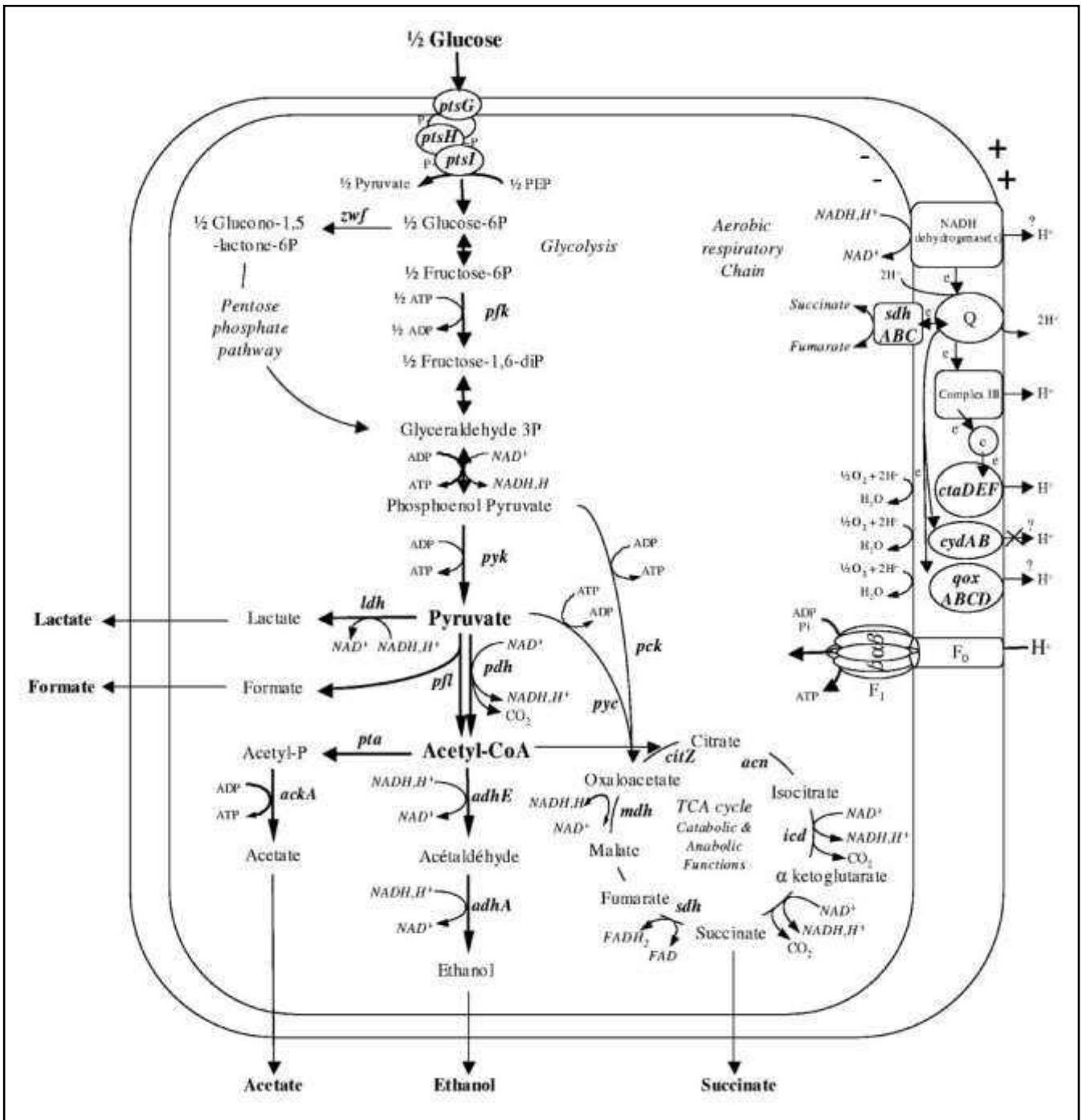


Figure 18 : Métabolisme respiro-fermentaire chez *B. cereus*. Les enzymes ont été annotées selon leur nom de gène d'après (Duport, *et al.*, 2006) .

3.5.1. Le régulateur Fnr

La protéine Fnr (fumarate and nitrate reductase) est un régulateur transcriptionnel sensible à l'O₂. Cette protéine appartient à la superfamille des facteurs de transcription CRP (cyclic AMP receptor protein). Ces facteurs de transcription induisent des changements physiologiques en réponse à une variété de signaux métaboliques et environnementaux (Green, *et al.*, 2001, Crack, *et al.*, 2008, Dufour, *et al.*, 2010, Fleischhacker & Kiley, 2011).

Les membres de la famille Crp sont structurellement apparentés. Ils sont composés de quatre domaines fonctionnels distincts : (i) un domaine senseur, (ii) un domaine constitué d'une série de brins β impliqué dans l'interaction avec l'ARN polymérase, (iii) un long domaine en hélice alpha intervenant dans la dimérisation, et (iv) un domaine C-terminal comprenant un motif hélice-tour-hélice impliqué dans la fixation à l'ADN.

3.5.1.1. Fnr chez *E. coli*

La protéine Fnr d'*E. coli* est la mieux caractérisée. Chez cette bactérie, Fnr agit comme un capteur direct d'oxygène et est l'un des régulateurs principaux de l'expression de gènes impliqués dans la transition entre la croissance aérobie et anaérobie. En absence d'oxygène, Fnr est dans son état actif et est capable de se lier à l'ADN au niveau des boîtes Fnr (palindrome symétrique TTGAT(N4)ATCAA). Une fois fixée sur l'ADN, Fnr active la transcription des gènes cibles en recrutant l'ARN polymérase ou réprime leur transcription en empêchant la formation du complexe ADN:ARN polymérase (Crack, *et al.*, 2008).

De manière générale, Fnr active l'expression de gènes dont les produits sont impliqués dans le métabolisme anaérobie tels que l'opéron *nar* (nitrate réductase), l'opéron *dms* (DMSO réductase) ou l'opéron *frd* (fumarate réductase) et réprime les gènes dont les produits sont impliqués dans le métabolisme aérobie tels que l'opéron *sdh* (succinate deshydrogénase) et le gène *ndh* (NADH deshydrogénase II) (Tolla & Savageau, 2011).

La forme active de Fnr est obtenue grâce à la fixation d'un centre fer-soufre [4Fe-4S]²⁺ par monomère. La présence des centres [4Fe-4S]²⁺ favorise la dimérisation de Fnr et sa capacité à se lier spécifiquement à l'ADN (Lazazzera, *et al.*, 1996, Crack, *et al.*, 2007).

En présence d'oxygène, le centre [4Fe-4S]²⁺ est converti rapidement en un centre intermédiaire [3Fe-4S]²⁺ puis lentement en un centre [2Fe-2S]²⁺ (Bauer, *et al.*, 1999).

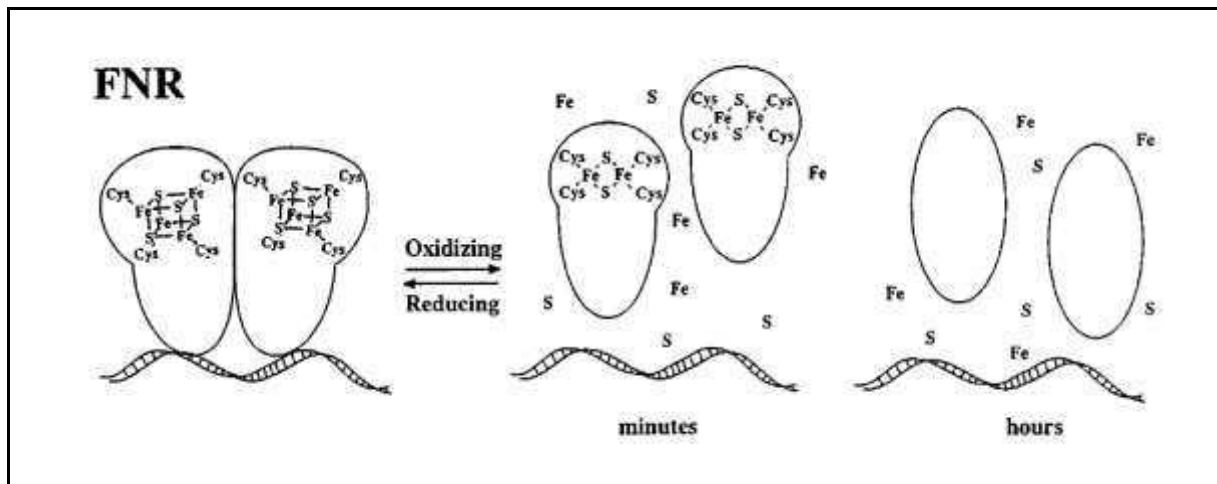


Figure 19 : Représentation schématique illustrant les différents états de la protéine Fnr (fixée ou non à l'ADN chez *E. coli* d'après (Bauer, *et al.*, 1999)).

3.5.1.2. Fnr chez *B. cereus*

La protéine Fnr de *B. cereus* présente une structure différente de celle de son homologue chez *E. coli*. Elle s'apparente davantage à la protéine Fnr de *B. subtilis* avec laquelle elle partage 80 % d'homologie. Chez *B. cereus*, Fnr présente un domaine Crp en position N-terminale et un domaine hélice-tour-hélice de fixation à l'ADN en position C-terminale. Comme son homologue chez *B. subtilis*, Fnr chez *B. cereus* présente un domaine hélice-tour-hélice qui est suivi d'un domaine senseur. Au niveau de ce domaine senseur, Fnr possède trois cystéines et un acide aspartique qui constituent les ligands du centre fer-soufre chez *B. subtilis* (Reents, *et al.*, 2006, Gruner, *et al.*, 2011, Esbelin, *et al.*, 2012).

A la différence d'*E. coli* et de *B. subtilis*, Fnr de *B. cereus* est capable de se fixer à l'ADN sous sa forme apo-Fnr (c'est-à-dire sans son centre fer-soufre) et holo-Fnr (c'est-à-dire avec son centre fer-soufre). Sous sa forme apo-Fnr, le degré d'oligomérisation de la protéine est influencé par le potentiel d'oxydoréduction. Lorsque la forme apo-Fnr est oxydée, elle forme un dimère où les deux protéines sont liées de manière covalente. Lorsque la forme apo-Fnr est réduite, elle forme un dimère non covalent (Esbelin, *et al.*, 2008). Il a été montré que chez *B. cereus*, Fnr se fixe au niveau des régions promotrices des régulateurs transcriptionnels PlcR et ResD et se lie également aux régions promotrices des gènes codant les entérotoxines Nhe et Hbl. De plus, Fnr est capable de former des complexes avec les protéines ResD et PlcR (Esbelin, *et al.*, 2008, Esbelin, *et al.*, 2009, Esbelin, *et al.*, 2012). Fnr jouerait le rôle

d'activateur de l'expression des entérotoxines car chez le mutant Δfnr de la souche F4430/73 la quantité des transcrits des gènes *nhe* et *hbl* est diminuée et la quantité de ces toxines est fortement diminuée dans le surnageant de culture par rapport à la souche sauvage. Enfin la protéine Fnr est essentielle chez *B. cereus* pour la croissance fermentaire (Zigha, *et al.*, 2007, Esbelin, *et al.*, 2008, Messaoudi, *et al.*, 2010, Esbelin, *et al.*, 2012).

Fnr permet à *B. cereus* de détecter les changements d'état d'oxydo-réduction, permettant ainsi à cette bactérie de s'adapter à l'environnement de son hôte humain.

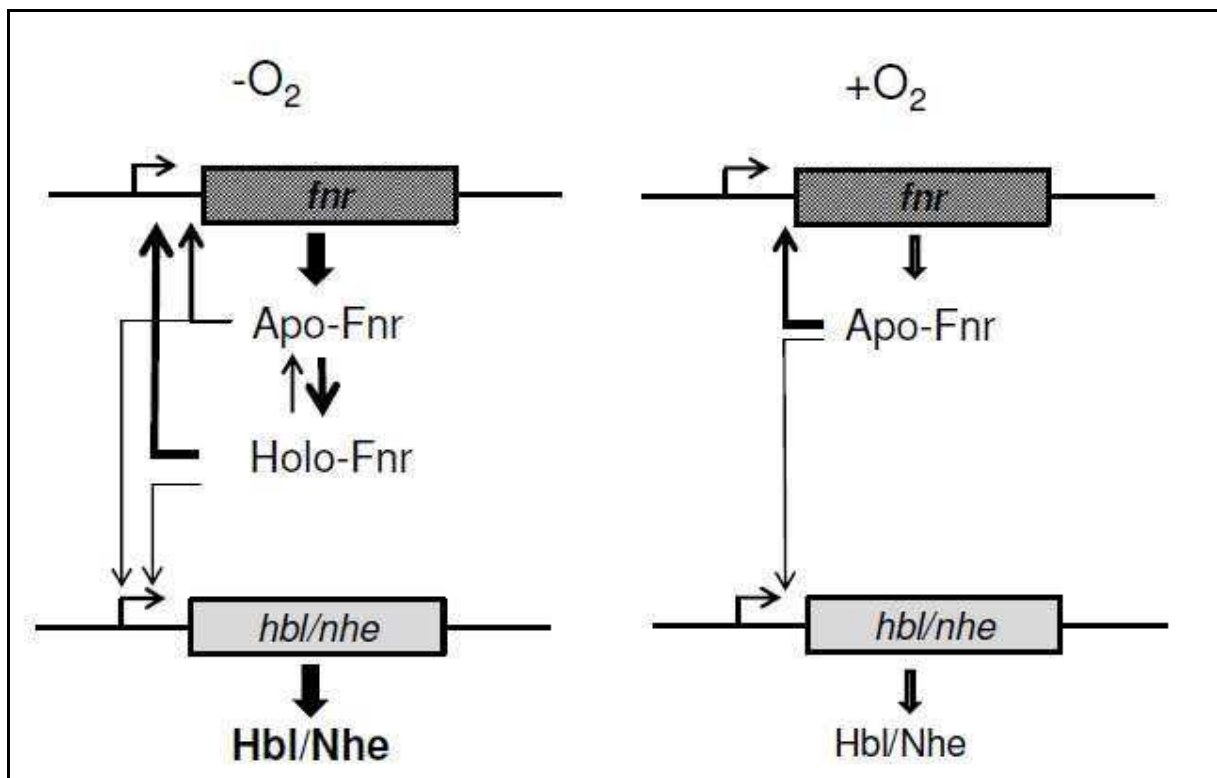


Figure 20 : Représentation schématique de la fixation à l'ADN de la forme apo et holo-Fnr en fonction de la présence et de l'absence d'oxygène d'après (Esbelin, *et al.*, 2012).

3.5.2. Le système à deux composants ResD/ResE

Chez *B. subtilis*, le système à deux composants ResD/ResE joue un rôle important dans la respiration aérobie et anaérobie (Geng, *et al.*, 2007). ResE est un senseur qui possède deux domaines transmembranaires et un large domaine extra-cytoplasmique. En position C-terminale, le second domaine transmembranaire est suivi par un domaine HAMP (connu chez d'autres protéines pour transmettre le signal), un domaine PAS (connu par ailleurs comme étant impliqué dans la perception du signal) puis un domaine histidine kinase. Le signal perçu

par ResE est supposé être l'état rédox de la cellule (Baruah, *et al.*, 2004). Lorsque le signal est perçu, ResE s'autophosphoryle et transmet son phosphate sur un résidu aspartate du régulateur de réponse ResD. ResE possède également une activité phosphatase qui déphosphoryle ResD.

ResD active la transcription de gènes en interagissant avec la sous-unité alpha de l'ARN polymérase (Geng, *et al.*, 2007). Chez *B. subtilis*, le système ResD/ResE active la transcription de gènes impliqués dans le transfert des électrons à l'oxygène ou au nitrate ainsi que les gènes codant des facteurs de transcription comme Fnr (Geng, *et al.*, 2007, Geng, *et al.*, 2007).

Les protéines ResD/E de *B. cereus* partagent 85 % d'identité avec leurs homologues chez *B. subtilis*. Chez *B. cereus* la caractérisation du double mutant *resD/E* et du mutant *resE* a permis de mettre en évidence l'importance de ce système à deux composants dans le métabolisme lorsque cette bactérie est cultivée à bas potentiel d'oxydoréduction. La production des entérotoxines Nhe et Hbl est abolie chez le mutant *resE* quelles que soient les conditions d'oxygénation tandis que la double mutation n'a aucun effet sur la production de ces entérotoxines. Ces données suggèrent que *resE* est indispensable à la production des entérotoxines lorsque *resD* est exprimé. Lorsque les deux sont absents un autre système de régulation doit probablement prendre le relais (Duport, *et al.*, 2006). Des expériences de retard sur gel ont montré que ResD se fixe aux régions promotrices de *plcR*, *fnr*, *resDE*, *nhe* et *hbl*. La fixation en amont des gènes *plcR*, *nhe* et *hbl* n'est pas dépendante du niveau de phosphorylation de ResD. Par contre ResD phosphorylé a une affinité plus grande vis-à-vis des régions promotrices des gènes *fnr* et *resDE*. Enfin ResD est capable de former un complexe avec Fnr et se lie ensemble au niveau de leurs séquences cibles (Duport, *et al.*, 2006, Esbelin, *et al.*, 2009, Esbelin, *et al.*, 2012)

3.5.3. Le régulateur OhrR

La protéine OhrR est à la fois un senseur rédox et un régulateur transcriptionnel impliqué dans la réponse au stress oxydant. Ce régulateur est un membre de la famille des protéines MarR (Multiple Antibiotic Resistance).

La structure de OhrR a été étudiée chez *Bacillus subtilis* et chez *Xanthomonas campestris* (Hong, *et al.*, 2005, Newberry, *et al.*, 2007).

L'inactivation d'OhrR se réalise par l'oxydation d'une ou de deux cystéines. Cette oxydation ne permet plus à OhrR de se fixer à l'ADN (Fuangthong & Helmann, 2002). Chez *Bacillus subtilis*, OhrR ne contient qu'une seule cystéine. L'oxydation de cette cystéine conduit à la formation d'un pont disulfure avec soit (i) un thiol de faible poids moléculaire, (ii) un sulfénamide cyclique, (iii) un acide sulfinique ou sulfonique (Eiamphungporn, *et al.*, 2009). Des études récentes montrent que la formation du pont disulfure avec un acide sulfinique ne suffit pas à empêcher la fixation à l'ADN et d'autres modifications sont nécessaires (Lee, *et al.*, 2007, Newberry, *et al.*, 2007).

Chez d'autres bactéries, comme *X. campestris*, OhrR contient une seconde cystéine située à l'extrémité COOH de la protéine (C127 pour *X. campestris*). Cette seconde cystéine sert à la formation d'un pontage disulfure entre deux monomères de OhrR (Panmanee, *et al.*, 2006).

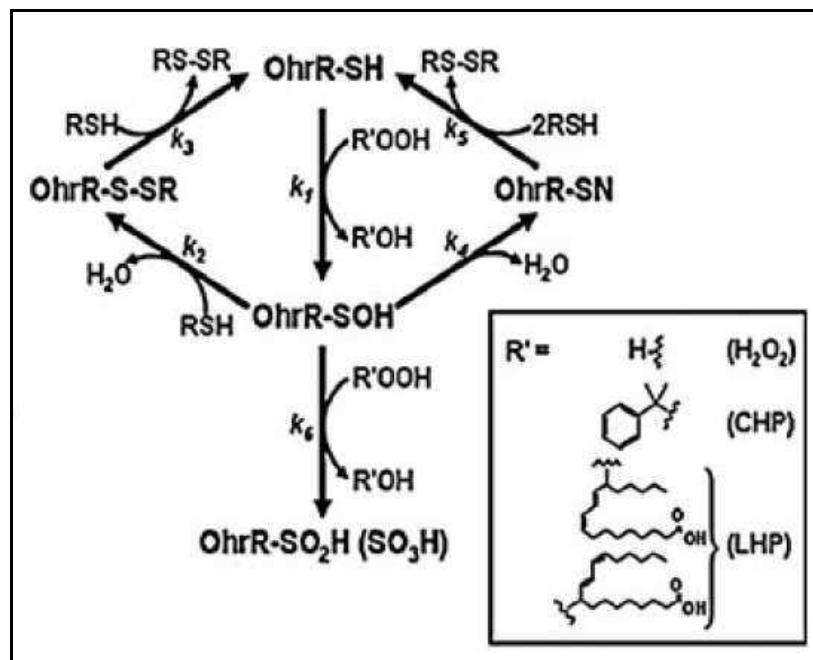


Figure 21 : Schéma représentant les différents types d'oxydation de la protéine OhrR (OhrR-SH) par différents types de peroxydes organiques, d'après (Helmann, 2011).

Chez *B. cereus*, OhrR contient deux cystéines en position N-terminale et deux cystéines en position C-terminale, ce qui rend cette protéine particulière par rapport à ses homologues chez d'autres espèces bactériennes qui n'en possèdent qu'une, deux ou trois (Meunier-Jamin, *et al.*, 2004). La caractérisation du mutant *ohrR* chez la souche ATCC14579 a montré que cette protéine est importante pour l'adaptation de *B. cereus* aux conditions du

tractus intestinal mais également dans la résistance au stress oxydant et dans la motilité. Chez le mutant *ohrR*, une augmentation de la quantité des toxines est observée, de plus OhrR est capable de se fixer directement sur les régions promotrices des toxines ((Clair, *et al.*, 2012) et (Clair *et al.*, 2012 en préparation)).

3.6. Un régulateur dont le signal n'a pas été déterminé.

Le régulateur HlyIIR n'a pas de signal associé et la voie de signalisation à laquelle il appartient est inconnue. Ce régulateur appartient à la famille des régulateurs TetR. Les protéines appartenant à cette famille sont souvent des répresseurs de la transcription et sont impliquées dans le contrôle transcriptionnel de pompes à efflux. Elles permettent la résistance à plusieurs antibiotiques, interviennent dans la réponse aux stress osmotiques, chimiques et toxiques, dans le contrôle des voies cataboliques, et dans la pathogénicité (Ramos, *et al.*, 2005). Chez *B. cereus*, HlyIIR est capable d'interagir avec Fur (Sineva, *et al.*, 2012) et agit comme répresseur de la transcription de HlyII (Budarina, *et al.*, 2004, Rodikova, *et al.*, 2007).

3.7. Conclusion

La pathogénicité de *B. cereus* est régit par un système complexe de régulateurs permettant à cette bactérie d'adapter son comportement en réponse à différents signaux du milieu extérieur. La complexité de ce système résulte du nombre de régulateurs et de leurs interactions. Ce système de régulation multiple, répondant à différents signaux de l'environnement, permettrait à *B. cereus* d'affiner, de moduler et d'adapter facilement son comportement. La figure 22 synthétise le rôle des différents régulateurs sur l'expression des facteurs de pathogénicité ainsi que les signaux environnementaux auxquels ces régulateurs répondent.

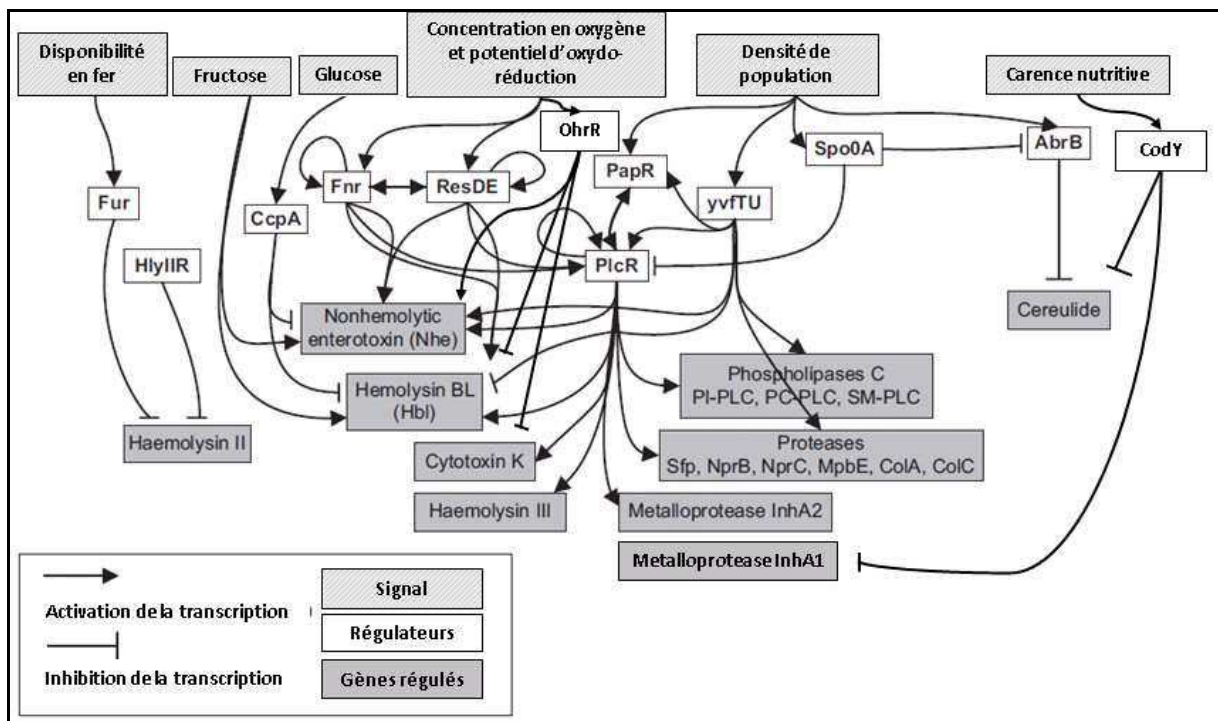


Figure 22 : Représentation schématique des réseaux de régulations des facteurs de pathogénicité chez *B. cereus*, d'après (Ceuppens, *et al.*, 2011).

Objectifs

Au laboratoire plusieurs travaux ont montré que la production des toxines Nhe et Hbl est liée au métabolisme cellulaire. La quantité de production de ces toxines varie en fonction de la source de carbone, de la concentration en glucides, de la phase de croissance ainsi que des conditions d'oxygénation (Duport C, *et al.*, 2004, Zigha A, *et al.*, 2006, Ouhib O, *et al.*, 2006, Messaoudi K, *et al.*, 2010). Les mécanismes moléculaires permettant d'expliquer ce lien ne sont pas totalement élucidés.

Bien que génétiquement proches toutes les souches de *B. cereus* ne sont pas capables d'engendrer une toxi-infection alimentaire. Pour qu'une souche soit pathogène il faut qu'elle soit à la fois capable de produire des toxines et capable de croître dans l'intestin. Le ou les éléments qui permettront de faire le lien entre ces deux capacités pourront peut-être constituer un ou des marqueurs de pathogénicité utile(s) pour l'identification des souches pathogènes.

Mon travail de thèse est une contribution à l'étude des mécanismes qui régissent la pathogénicité de *B. cereus*. Il est composé de trois parties. Dans une première partie nous avons mis en évidence l'importance d'une enzyme impliquée à la fois dans le métabolisme fermentaire et dans la production de toxines. Les deuxième et troisième parties de cette thèse ont été réalisées parallèlement et s'intéressent à élucider les mécanismes par lesquels cette enzyme intervient dans la toxinogénèse.

Matériel et Méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

1. Souches bactériennes et plasmides

1.1 Souches bactériennes

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude ainsi que leurs principales caractéristiques sont présentées dans le tableau 2.

1.1.1 Souches de *Bacillus cereus*

Les quatre souches de *B. cereus* utilisées dans ce travail sont : la souche de référence ATCC14579 isolée de l'air d'une étable et dont le génome a été séquencé (Ivanova *et al.*, 2003), la souche diarrhéique F4430/73 isolée d'une TIAC, la souche émétique F4810/72 dont le génome est séquencé, la souche F837/76 isolée d'une infection de prostate et dont le génome est séquencé et la souche PA isolé d'aliments. Les mutants F4430/73 Δ *ldhA*, F4430/73 Δ *ldhB*, F4430/73 Δ *ldhC* ont été construits au laboratoire.

1.1.2 Souches d'*Escherichia coli*

Les souches d'*E. coli* Top10 et ET12567 ont été utilisées comme cellules hôtes pour les clonages. La souche BL21 StarTM(DE3) a été utilisée comme cellule hôte pour la production des protéines recombinantes LdhA et Rex.

1.2 Plasmides

Les plasmides utilisés dans cette étude ainsi que leurs principales caractéristiques sont présentés dans le tableau 3.

Souches bactériennes	Caractéristique/Phénotype/Génotype	Source ou référence
<i>Bacillus cereus</i>		
ATCC14579	Obtenu de la collection américaine des cultures types	Ivanova <i>et al.</i> , 2002
F4430/73	Souche isolée d'une TIAC	Spira et Goepfert, 1975
F4810/72 (AH187)	Souche émétique	Ehling-Schulz <i>et al.</i> , 2005
F837/76 (DSM4222)	Isolée d'une infection de prostate	Guinebretière <i>et al.</i> , 2005
PA (INRA PA)	Isolée d'aliment	Guinebretière <i>et al.</i> , 2008
F4430/73 Δ <i>ldhA</i>	Mutation du gène <i>ldhA</i> par insertion du gène de résistance à la spectinomycine	Laouami <i>et al.</i> , 2011
F4430/73 Δ <i>ldhB</i>	Mutation du gène <i>ldhB</i> par insertion du gène de résistance à la spectinomycine	Laouami <i>et al.</i> , 2011
F4430/73 Δ <i>ldhC</i>	Mutation du gène <i>ldhC</i> par insertion du gène de résistance à la spectinomycine	Laouami <i>et al.</i> , 2011
ATCC14579 Δ <i>rex</i>	Délétion du gène <i>rex</i> par insertion en lieu et place du gène de résistance à la spectinomycine	Ce travail
F4430/73 Δ <i>rex</i>	Délétion du gène <i>rex</i> par insertion en lieu et place du gène de résistance à la spectinomycine	Ce travail
<i>Escherichia coli</i>		
Top 10	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen™
ET12567	F- <i>dam-13</i> ::Tn9 <i>dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202</i> ::Tn10 <i>galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1</i>	Collection du laboratoire
BL21 Star™(DE3)	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-, mB-) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen™

Tableau 2 : Liste des souches bactériennes utilisées.

Plasmides	Caractères d'intérêts	Source ou référence
pCR TM 4-TOPO®	Vecteur de clonage Amp ^r Kan ^r	Invitrogen TM
pCR-XL-TOPO®	Vecteur de clonage Zeo ^r Kan ^r	Invitrogen TM
pMAD	Vecteur navette Amp ^r Em ^r	Arnaud <i>et al.</i> ,2004
pDIA	Plasmide portant la cassette de résistance à la spectinomycine	Martin-Verstraete
pHT304	Vecteur de clonage Amp ^r Ery ^r , répliquatif chez <i>B. cereus</i>	Arantes et Lereclus, 1991
pET100	Vecteur d'expression permettant l'insertion d'une étiquette polyhistidine en position N-terminale	Invitrogen TM
pET101	Vecteur d'expression permettant l'insertion d'une étiquette polyhistidine en position C-terminale	Invitrogen TM
pCR4mutrex1	pCR TM 4-TOPO® dans lequel l'amplicon de 840-pb obtenu avec le couple d'amorces rex1F et rex2R et correspondant à la région 5' avoisinante du gène <i>rex</i> a été inséré au site de clonage rapide	Ce travail
pCR4mutrex2	pCR TM 4-TOPO® dans lequel l'amplicon de 827-pb obtenu avec le couple d'amorces rex3F et rex4R et correspondant à la région 3' avoisinante du gène <i>rex</i> a été inséré au site de clonage rapide	Ce travail
pCR4mutrex3	pCR4mutrex2 dans lequel l'insert (840-pb) du pCR4mutrex1 a été introduit entre les sites <i>PstI</i> et <i>SmaI</i> .	Ce travail
pCR4mutrex4	pCR4mutrex3 dans lequel le gène de résistance à la spectinomycine a été introduit au site <i>SmaI</i>	Ce travail
pMAD Δ <i>rex</i>	pMAD dans lequel un fragment de 3067-pb obtenu par digestion du pCR4mutrex4 avec l'enzyme <i>EcoRI</i> a été cloné au site <i>EcoRI</i> .	Ce travail
pHT304rexATCC	pHT304 dans lequel le gène <i>rex</i> de la souche ATCC14579 sous le contrôle de son promoteur a été inséré entre les sites <i>BamHI</i> et <i>SacI</i> .	Ce travail
pHT304rexF4430	pHT304 dans lequel le gène <i>rex</i> de la souche F4430/73 sous le contrôle de son promoteur a été inséré entre les sites <i>BamHI</i> et <i>SacI</i> .	Ce travail

Tableau 3 : Liste des plasmides utilisés. Symboles : Amp, ampicilline ; Kan, kanamycine ; Ery, érythromycine ; Zeo, zéocine ; Δ , délétion ; r, résistant.

2. Milieux de culture et conditions de culture

2.1 Milieux de culture

2.1.1 Le milieu MOD

C'est un milieu riche en acides aminés (L-arginine 2,6 mM ; L-aspartate 6,8 mM ; L-cystéine 0,33 mM ; L-glutamate 13,6 mM ; glycine 5,2 mM ; L-histidine 2,3 mM ; L-isoleucine 5,3 mM ; L-leucine 10,4 mM ; L-lysine-HCl 8,1 mM ; L-méthionine 2,7 mM ; L-phénylalanine 1,7 mM ; L-sérine 6,3 mM ; L-thréonine 5,9 mM ; L-tyrosine 0,23 mM ; L-valine 7,8 mM) (Glatz et Goepfert, 1976) et modifié en sels (K_2HPO_4 1g.l⁻¹ ; $(NH_4)_2SO_4$ 6g.l⁻¹ ; $MgSO_4$ (7H₂O) 0.04 g.l⁻¹). Le pH initial de culture est de 7,2. Ce milieu est complété avec 30 mM de glucose comme source de carbone.

2.1.2 Le milieu LB

Le milieu Lysogeny broth (LB) est composé de pastone 10 g.l⁻¹, extrait de levure 5 g.l⁻¹, NaCl 10 g.l⁻¹ et ajusté à pH 7.2. Selon les besoins des expériences, ce milieu a été additionné d'antibiotique(s) Nous avons utilisé la kanamycine à 50 µg.ml⁻¹, l'ampiciline à 100 µg.ml⁻¹, l'érythromycine à 10 µg.ml⁻¹ ou la spectinomycine à 275 µg.ml⁻¹).

2.2 Conditions de culture

Les cultures ont été réalisées soit en condition non régulée pour *E. coli* et *B. cereus* soit en condition régulée pour *B. cereus*. Pour la condition non régulée les souches ont été cultivées à 37°C en tubes Hungate (croissance sans oxygène) ou en Erlenmeyer (croissance avec oxygène) sous une agitation de 200 tours par minute dans l'incubateur MaxQ 4000 (thermo Scientific). Les cultures en conditions régulées ont été réalisées dans un bioréacteur d'une capacité maximale de 2L (Discovery 100 ; Inceltech, Toulouse, France) équipé d'une sonde à température, d'une sonde pH (Mettler Toledo Inpro 3030/3100), d'une sonde oxygène (Mettler Inpro 6000 séries 02 sensors 12/25) et d'une sonde d'oxydo-réduction (Mettler Toledo analyse industrielle Sarl, Paris, France). Les conditions et les paramètres de cultures choisis sont : volume de culture : 1,3 litres ; milieu de culture : MOD ; température : 37°C ; pH 7,2, agitation : 300 tours par minute ; pO₂ : 0% ou 100% maintenue par bullage d'azote ou d'air. Le milieu MOD et le glucose ont été stérilisés séparément. Le glucose a été ajouté stérilement au moment de l'inoculation.

3. Suivi de la croissance

3.1. Mesure du taux de croissance

La croissance a été suivie au cours du temps par mesure de la densité optique (DO) à 560 nm. Des prélèvements de culture ont été réalisés au taux de croissance maximale (μ_{\max}) et en phase stationnaire (1h30 après l'obtention de la DO maximale). Le taux de croissance spécifique (μ) a été déterminé en utilisant la méthode modifiée de l'équation de Gompertz (Zwietering, *et al.*, 1990).

3.2. Mesure de la biomasse

La biomasse a été déterminée par la méthode de filtration à l'aide d'un appareil à vide (Biobloc Scientific, Illkirch, France). Un aliquot de culture (50 ml) a été filtrée à travers un filtre Standard GS 0.22 μ m (Millipore), qui est ensuite lavé avec 150 ml d'eau physiologique, puis séché à 37°C jusqu'à la stabilité des pesées (environ 3 jours).

4. Techniques de biologie moléculaire

4.1 Techniques générales

4.1.1 Extraction d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique de *B. cereus* a été réalisée suivant la méthode décrite par Guinebretière et Nguyen-The (2003) (Guinebretiere & Nguyen-The, 2003). Dix millilitres d'une culture sur la nuit de *B. cereus* sont centrifugés (9500g, 5 min). Les culots bactériens sont repris dans 500 μ l de tampon TES (0.2M NaCl, 0.2M Tris pH 8.8, 0.02 M EDTA) et dans 50 μ l de SDS à 20% puis incubés pendant 60 min à 55°C. Le lysat est ensuite traité à la RNase (10 mg/ml) pendant 30 min à 65°C. L'ADN est purifié par extraction au phénol/chloroforme et précipité avec de l'alcool absolu (2 volumes) en présence d'acétate de sodium 3M pH 4.8 (0.1 volume) pendant 1 heure à -20°C. Après centrifugation, 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.

4.1.2 Extraction des plasmides

Les extractions de plasmides ont été effectuées avec le kit « PureYield™ Plasmid Miniprep System » (Promega) selon les recommandations du fabricant.

4.1.3 Amplification par PCR

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été réalisées à l'aide du thermocycleur 2720 d'Applied Biosystems. Une première étape de dénaturation à 94°C pendant 5 min a été suivie de 30 cycles successifs composés de 3 étapes : (i) la dénaturation de l'ADN bicaténaire pendant 1 min à 94°C, (ii) l'hybridation des oligonucléotides complémentaires à l'ADN monocaténaire pendant 1 min à 55°C (variable selon les couples d'amorces) et (iii) l'élongation par l'ADN polymérase avec une durée d'une minute par kilobase (kb) amplifié. Le trentième cycle a été suivi d'une phase d'élongation à 72°C pendant une durée de 10 min. Le mélange réactionnel (50 µl) comprenait 0,1 mM de désoxy-adenosine triphosphate (dATP), désoxy-cytosine triphosphate (dCTP), désoxy-thymidine triphosphate (dTTP), désoxy-guanosine triphosphate (dGTP) (Sigma), 0,025 mM d'amorces (Eurogentec), 5 ng de matrice et 1 unité de polymérase (AmpliTaq Gold® polymérase (Applied Biosystems) ou « Expand™ High Fidelity PCR System (Roche) ». Le tampon utilisé est celui du fabricant. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 13 en annexe.

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

4.1.4 Analyse et séparation de fragments d'ADN

La taille des acides nucléiques a été estimée à l'aide du marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec), après électrophorèse (100 volts) dans un gel à 1% d'agarose immergé dans une solution tampon de TAE (40 mM Tris, 0.1% acide acétique, 2 mM EDTA , pH 8.5), coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0,2 µg/ml) puis visualisation sous lumière ultraviolette.

4.2 RACE PCR

Cette technique permet l'amplification d'une séquence d'acide nucléique à partir d'un ARN messager. Elle permet de déterminer le site d'initiation de la transcription d'un gène. Elle a été mise en oeuvre 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. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 13 en annexe.

4.3 Quantification relative des ARNm par RT-PCR en temps réel (SYBR Green)

La PCR quantitative en temps réel a été appliquée pour la mesure relative de l'expression de gènes, c'est-à-dire la quantification des ARN messagers (ARNm) par rapport à un contrôle interne. Cette technique repose sur l'utilisation d'un agent fluorescent qui se fixe à l'ADN et d'un système de détection de fluorescence correspondant. L'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés au cours de la PCR. Ceci permet d'établir une relation proportionnelle entre quantité de matrices initiales et quantité d'ADN complémentaires (ADNc) amplifiés après un certain nombre de cycles de PCR. L'analyse de la quantité de produits amplifiés s'effectue pendant la phase exponentielle d'amplification, car c'est pendant cette phase que le taux d'amplification est constant. L'ajout d'un agent fluorescent au mélange de PCR permet une quantification par détection de l'intensité de fluorescence à chaque cycle PCR. A chaque échantillon correspond un cycle seuil, noté C_T (cycle threshold). Il correspond au cycle à partir duquel l'intensité de la fluorescence est significativement différente du bruit de fond. Ce C_T est inversement proportionnel au nombre initial de copies de matrice. Plus la quantité de matrice est grande, plus le C_T est petit. L'agent fluorescent utilisé au laboratoire est le SYBR Green qui s'intercale dans l'ADN double brin (figure 23).

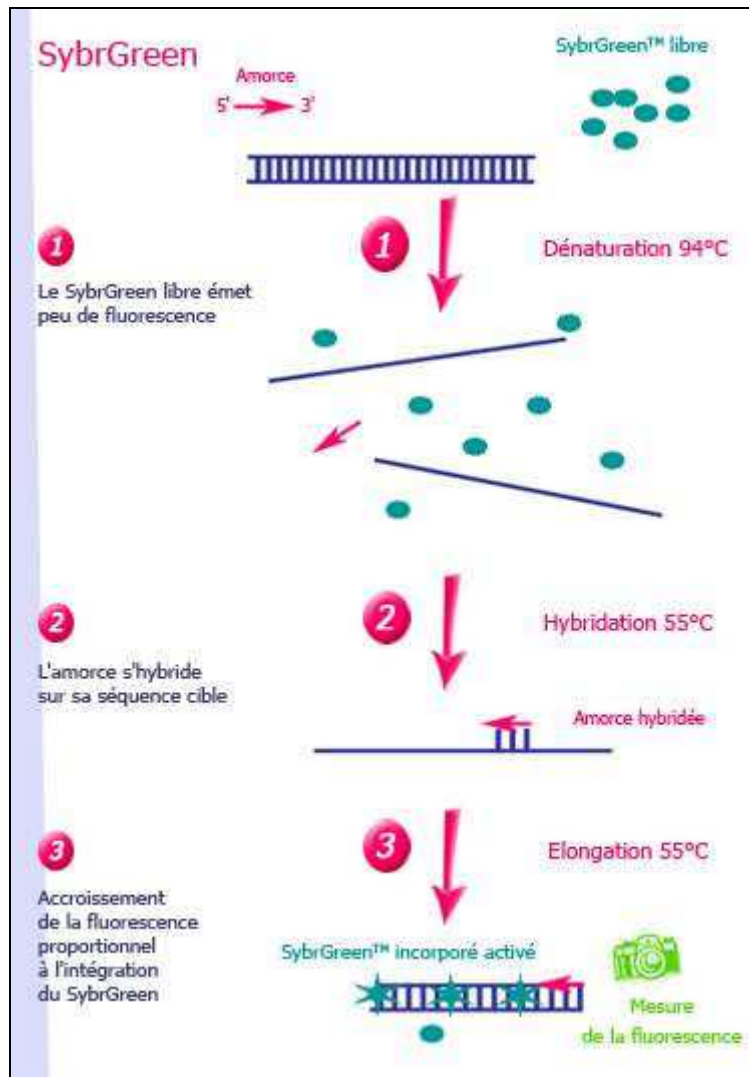


Figure 23 : PCR en temps réel en présence de SYBR green (www.ilm.pf/PCRtempsreel).

Les mesures de l'expression des gènes après extraction des ARNm, ont été réalisées sur des échantillons de cultures dont les cellules ont été séparées du surnageant de culture par centrifugation (1000g, 5min à 4°C), lavées dans du tampon phosphate (pH 7.0) et conservées dans du TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) à -80°C. Les surnageants de culture ont été conservés à -20°C.

Les ARN totaux ont été extraits des cellules en utilisant le kit Rneasy (Qiagen, France). Les réactions d'amplification par RT-PCR en temps réel ont été réalisées en utilisant les réactifs du kit « LightCycler RNA amplification kit SYBER Green I » avec l'appareil LightCycler (Roche Diagnostics, Meylan, France). Pour chaque échantillon, les mesures ont été répétées deux fois. La spécificité de l'amplicon a été vérifiée par des analyses des courbes de fusion et par électrophorèse sur gel d'agarose.

Les conditions de réalisation des réactions ont été optimisées selon les instructions fournies par le fabricant. Les échantillons ont été quantifiés avec le logiciel LightCycler version 3.5 et standardisés par rapport au niveau d'expression du gène *ssu* codant les ARN 16S. Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau 13 en annexe.

4.4 Transformation bactérienne

E. coli et *B. cereus* ont été respectivement rendues chimio-compétentes et électro-compétentes par un traitement au chlorure de calcium (50 mM) froid et des lavages à l'eau froide. *E. coli* a été transformée par de l'ADN exogène lors d'un choc thermique (passage brutal des cellules de 0°C à 42°C) alors que *B. cereus* a reçu l'ADN étranger par choc électrique en utilisant l'appareillage « Gene Pulser » (Bio-Rad). Les clones bactériens transformés ont été sélectionnés sur une gélose LB contenant l'antibiotique d'intérêt.

4.5 Clonage moléculaire

4.5.1 Clonage de séquences d'ADN

L'ADN plasmidique a été fragmenté par des endonucléases selon les recommandations du fabricant (Promega). Après purification, le plasmide et les inserts digérés ont été ligaturés en présence de l'ADN ligase du bactériophage T4 (LigaFast™ Rapid DNA Ligation System, Invitrogen) pendant 15 min à 25°C. Afin de favoriser le clonage, la concentration de l'ADN étranger est 5 fois plus élevée que celle du vecteur. Des fragments d'ADN ont été également clonés à l'aide du Kit «TOPO® TA Cloning® Kit» (Invitrogen) lorsque cela s'est avéré utile.

4.5.2 Construction des mutants Δrex

Les deux mutants ATCC 14579 Δrex et F4430/73 Δrex ont été construits par recombinaison homologue. La stratégie employée est la même pour les deux mutants construits. Pour chacun des mutants une région de 609 paires de bases (-pb) a été remplacée par un fragment d'ADN exogène de 1400-pb contenant la cassette de résistance à la spectinomycine. Un fragment de 840-pb possédant à son extrémité un site de coupure *SmaI* et un fragment de 827-pb possédant à son extrémité 5' un site de coupure à *SmaI* ont été amplifiés par PCR en utilisant respectivement les oligonucléotides rex1F-rx2R et rex3F-rx4R et les ADN génomiques des souches ATCC 14579 ou F4430/73. Ces fragments correspondent aux régions avoisinantes du

gène *rex* (BC_0291). Ces deux fragments ont été clonés dans le plasmide TA cloning pCR4-TOPO® générant ainsi les plasmides pCR4mutrex1 et pCR4mutrex2. Après vérification de la séquence des inserts pCR4mutrex1 a été digéré par *PstI* et *SmaI* libérant ainsi son insert. Après purification sur gel de l'insert celui-ci a été cloné dans le plasmide pCR4mutrex2 entre les sites *PstI* et *SmaI* générant ainsi le plasmide pCR4mutrex3. Le plasmide pDIA a été digéré par l'enzyme de restriction *SmaI*, libérant ainsi la cassette de résistance à la spectinomycine. Cette cassette a été clonée au niveau du site *SmaI* du plasmide pCR4mutrex3, ce qui a aboutit à la production du pCR4mutrex4. Le plasmide pCR4mutrex4 a été digéré par *EcoRI* et la construction de 3067-pb ainsi libérée, correspondant à la région amont du gène *rex*, au gène de résistance à la spectinomycine et à la région aval du gène *rex* a été clonée au site *EcoRI* du plasmide pMAD donnant lieu au plasmide pMAD Δ *rex*. Le plasmide pMAD Δ *rex* a été utilisé pour transformer la souche ATCC 14579 ou la souche F4430/73.

Le plasmide pMAD porte une origine de répllication thermosensible et un gène exprimant une bêta-galactosidase de façon constitutive permettant une détection rapide et simple d'événement de double recombinaison sur milieu salin contenant du X-Gal (Arnaud *et al.*, 2004). Après une incubation à 42°C et plusieurs repiquages sur du milieu LB gélosé contenant les antibiotiques appropriés et du X-Gal, nous avons obtenus des clones blancs. Chez ces clones, l'événement de double recombinaison a été vérifié par PCR en utilisant des amorces situées en amont et en aval de la région de recombinaison homologue.

4.5.3 Apport de la copie sauvage du gène *rex* chez les mutants

Afin d'apporter la copie sauvage du gène *rex* chez les souches mutantes, le gène *rex* ainsi que sa région promotrice ont été amplifiés par PCR grâce aux amorces *rexcompF* et *rexcompR* et ont été clonés dans le plasmide pCRXL-TOPO. L'insert a ensuite été extrait de ce plasmide par coupure avec *BamHI* et *SacI*, puis cloné dans le plasmide pHT304 préalablement digéré par les mêmes enzymes. L'intégrité des inserts des vecteurs recombinants (pHT304*rex*ATCC et pHT304*rex*F4430) ont été vérifiés par PCR.

4.5.4 Clonage du gène *rex* dans le vecteur pET101 et du gène *ldhA* dans le vecteur pET100

Le gène *rex* a été amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique de la souche ATCC 14579 et de la souche F4430/73 avec les amorces *pET101rexF* et *pET101rexR*. Les amplicons provenant de chaque souche ont été clonés chacun dans le plasmide pET101 (Invitrogen).

Pour chaque plasmide, la bonne conformité des séquences d'ADN clonées a été vérifiée par séquençage. La même procédure a été suivie pour le clonage du gène *ldhA* dans le plasmide pET100. Les amorces utilisées pour les réactions de PCR sont répertoriées dans le tableau 13 en annexe. Ces constructions ont été par la suite introduites chez *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene).

4.6 Technique de retard sur gel

La technique de retard sur gel ou EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) permet d'étudier une interaction entre un acide nucléique et une protéine. Un complexe ADN-protéine ou ARN-protéine migre moins vite dans un gel non-dénaturant qu'un ADN ou un ARN seul. L'illustration présente le cas de deux sites portés sur un même fragment. Si les deux sites fixent la même protéine, l'apparition du second complexe sera fonction de la concentration en protéine dans la réaction.

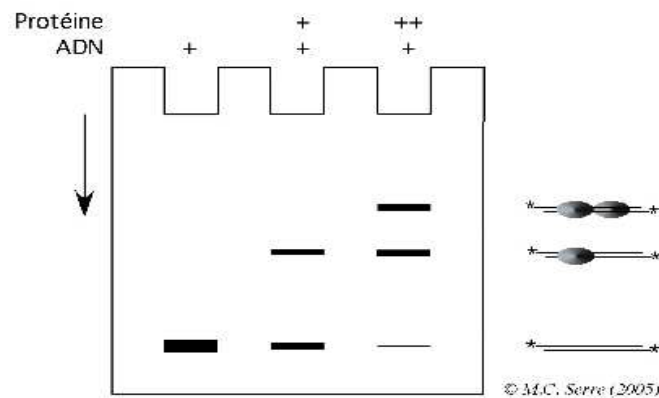


Figure 24 : Représentation schématique du principe de la technique de retard sur gel.

Les expériences de retard sur gel ont été effectuées en utilisant le kit Lightshift chimiluminescence EMSA (Pierce, Rockford, IL) selon les instructions du fabricant. Les régions promotrices des gènes étudiés ont été amplifiées par PCR avec les amorces biotinylées présentées dans le tableau 13 en annexe. Après purification des amplicons, les réactions EMSA ont été réalisées par incubation des fragments d'ADN biotinylés (0.5ng/μl)

avec différentes quantités de protéine purifiée en présence de 1 µl de tampon de liaison 10X (Tris-base pH 7.5 500 mM, KCl 500 mM, EDTA 100 mM, glycérol 10%, DTT 40 mM, MgCl₂ 40 mM), 1 µg/µl poly d(IC), glycérol 5%, 4 mM de MgCl₂, et le volume final a été porté à 10 µl avec de l'eau ultra-pure. Les mélanges réactionnels ont été incubés pendant 30 min à 37 ° C et ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 4% non dénaturant (acrylamide/bisacrylamide, 29:1, sous forme liquide, Biorad). L'électrophorèse a été réalisée à 100 Volts pendant 1 heure à une température de 25°C dans un tampon TBE 0.5X pH8. Avant dépôt des échantillons, ce gel avait subi un pré-run à 100 Volts pendant une heure. Les fragments d'ADN ont ensuite été transférés sur une membrane Amersham Hybond-N⁺ (GE Healthcare) à 4°C dans un tampon TBE 0.5X à 200 mA pendant 30 min. Les sondes d'ADN biotinylées ont été visualisées en utilisant le kit Amersham ECL Hyperfilm (GE Healthcare) selon les instructions du fabricant.

5. Techniques de biochimie

5.1 Dosage du glucose et des métabolites

Les concentrations de D-glucose, de L-lactate, d'acétate, de formiate, d'éthanol, et de succinate ont été déterminées par dosage enzymatique en utilisant les kits commerciaux suivant les instructions des fournisseurs des kits Biosentec (Toulouse) et r-biopharm (Saint Didier du Mont d'Or). Pour chaque échantillon les dosages ont été répétés deux fois.

5.2 Dosage des protéines selon la méthode du BCA

Cette méthode est un dosage colorimétrique des protéines, basé sur l'acide bicinchonique (BCA). 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 (Smith, *et al.*, 1985). Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode fournie avec le kit « MicroBC Assay Protein quantification » (Interchim).

5.3 Dosage de l'activité enzymatique de LdhA

L'activité de la lactate déshydrogénase a été testée en présence de pyruvate et d'enzyme purifiée. Le mélange d'essai (1 ml) contenait un tampon phosphate à pH 6,6, 0,3 mM de NADH, 3 mM de 1,6-diphosphate de fructose, 5 mM MgCl₂, et 5 à 10 µl de protéine purifiée

(10 µg / µl). La réaction est initiée avec l'ajout de pyruvate (20 mM). L'oxydation du NADH a été suivie par la diminution de l'absorbance à 340 nm au cours du temps. L'activité de la lactate déshydrogénase correspond à la pente de la droite rapportée au coefficient d'extinction molaire du NADH.

5.4 Dosage de l'entérotoxine Nhe

La protéine NheA de l'entérotoxine diarrhéique Nhe a été détectée en utilisant le test *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin-Visual ImmunoAssay (BDE-VIA) mis au point par Tecra selon les recommandations du fabricant. Il s'agit d'un test ELISA Sandwich. Les concentrations de Nhe sont estimées en DO mesurée à 450 nm par gramme de biomasse. La sensibilité du test est de 1 ng.ml⁻¹.

5.5 Électrophorèse de protéines

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 62,5 mM de Tris HCl, pH 6,8) 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) en partie inférieure et d'un gel de compactage (5% d'acrylamide, 0,1% SDS, 0,1% persulfate d'ammonium, 0,04% TEMED dans du Tris HCl 0,125 M, pH 6,8) en 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). Le gel est ensuite lavé dans de l'eau ultra pure (3 à 5 min), coloré pendant 10 min dans du bleu de Coomassie ou de l'Impérial protein stain (Thermo scientific) et enfin rincé dans la solution de décoloration (éthanol/ acétate V/V) pendant 30 min. L'échelle de poids moléculaire utilisé est le Prestained SDS-PAGE standards Low Range (Biorad).

5.6 Production et purification des protéines

5.6.1 Synthèse de LdhA *in vitro*

La synthèse de LdhA *in vitro* a été réalisée par Francois Alberto en utilisant le kit « rapid-translation system RTS 500 *E. coli* HY selon les instructions du fabricant (Roche Diagnostics) et comme décrit dans l'article Laouami *et al.*, 2011.

5.6.2 Production des protéines LdhA et Rex

Après avoir vérifié la présence de l'insert (gène *ldhA* ou gène *rex*) par double digestion dans les vecteurs d'expression pET100 et pET101, il est nécessaire de sélectionner un clone permettant la meilleure production de la protéine. Pour cela la transformation des cellules BL21-(DE3)-Ril codon plus (Stratagene) a été effectuée suivant les recommandations du fournisseur. Afin de sélectionner un clone produisant la protéine Rex ou LdhA, un protocole « rapide » d'expression est réalisé. 100 ml de milieu LB liquide + Amp sont inoculés avec 1 ml de préculture des différents clones de BL21 recombinants obtenus puis incubés à 37°C sous une agitation de 200 tours par minute (incubateur MaxQ 4000, thermo Scientific) jusqu'à obtention d'une DO₆₀₀ de 0.5. L'induction est réalisée par addition de 0.5 mM d'IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) et l'incubation est poursuivie pendant 3 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 10 000g pendant 20 min à 4°C et le culot obtenu est repris dans 2 ml de tampon d'extraction (50 mM Tris pH 8, 0,3 M de NaCl, 10% de glycérol). Les cellules sont lysées par sonication puis centrifugées à nouveau afin de récupérer l'extrait protéique intracellulaire. Dix ml d'extrait protéique intracellulaire sont déposés sur un gel SDS-PAGE. Après migration, 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 1X (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 incubée pendant 5 min dans du PBS 1X (2,5 g.l⁻¹ NaCl, 1,07 g.l⁻¹ Na₂HPO₄, 0,39 g.l⁻¹ NaH₂PO₄, 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 pendant 5 min dans du PBS 1X puis incubée pendant 1h30 sous agitation avec des anticorps de souris anti-His dilués au 1/2000^{ème} dans du PBS. La membrane est ensuite lavée 2 fois pendant 5 min dans du PBS puis incubée pendant 1h sous agitation avec les anticorps secondaires anti-souris liés à une peroxydase (enzyme HRP)

dilués au 1/2000^{ème} (Sigma). La membrane est alors rincée pendant 40 min dans du PBS puis incubé avec du luminol (issu du kit de révélation SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate). L'enzyme HRP va catalyser la réaction de photoluminescence avec le luminol. Ensuite la révélation se fait sur film photographique en chambre noire. Un film photographique est immédiatement exposé contre la membrane pendant 30 secondes à 20 min puis développé en incubant la membrane dans la solution de détection (Kodak) pendant 1 min puis dans la solution de fixation pendant 1 min (Kodak).

5.6.3 Purification des protéines LdhA et Rex

Les cellules *E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL portant les plasmides d'expression pET101 :*rex* et pET100 :*ldhA* ont été cultivées dans 1 litre de milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 µg.ml⁻¹, à 37°C avec une agitation de 200 tours par minute. Lorsque la densité optique à 600 nm atteint environ 0,5, l'expression a été induite par addition de 0,5 mM d'IPTG et la croissance s'est poursuivie pendant quatre heures supplémentaires à 37°C. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5000 g pendant 10 min à 4°C. Les culots cellulaires ont été remis en suspension dans 20 ml de tampon d'extraction froid dans la glace (50 mM Tris pH 8, NaCl 0,3 M, glycérol 10%) additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (un comprimé de « Complete Mini, EDTA free » (Roche)). La suspension cellulaire a été congelée à -20°C. Le jour suivant, les cellules sont décongelées sur la glace et incubées avec 2 mM de PMSF (flurorure de phenylméthanesulfonyle) et 0,5 mg/ml de lysozyme pendant 45 min sous agitation douce à 4°C puis le mélange est soumis aux ultrasons pendant 5 min à 4°C à 80% d'amplitude maximale à l'aide du Vibra Cell ultrasonicator (Fisher Bioblock Scientific). Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation à 9000 g pendant 30 min à 4°C. Les purifications sont réalisées par chromatographie d'affinité avec des ions métalliques immobilisés (IMAC). Le Cobalt possède une grande affinité pour les peptides polyhistidines. Les lysats sont donc mélangés à 2 ml de billes Co²⁺ (immobilized TALON metal affinity chromatography column (Clontech)) préalablement équilibrée avec du tampon d'extraction. Après passage de la totalité du lysat à travers la colonne, celle-ci est lavée avec 30 ml de tampon d'extraction contenant 20 mM d'imidazole. Les protéines ont été éluées avec 3 ml de tampon d'éluion (tampon d'extraction contenant 200 mM d'imidazole). L'éluat est collecté en six fractions qui sont analysées par SDS-PAGE.

6. La protéomique

La protéomique a été réalisée au CEA de Marcoule par Gérémy Clair suivant les mêmes modalités que celles décrites par Clair *et al.*, 2010, 2012.

7. Test de résistance au peroxyde d'hydrogène

Les bactéries cultivées sur la nuit ont été diluées dans 12 ml de milieu MOD (dans des tubes Hungate pour les croissances en anaérobiose) ou dans 30 ml de milieu MOD (en Erlenmeyer pour les croissances en aérobiose) afin d'obtenir une densité optique (DO) de 0,02 à 560 nm. La croissance bactérienne des cultures a été suivie en mesurant la densité optique à 560 nm. Lorsque la DO a atteint une valeur de 0,2 en anaérobiose ou de 0,4 en aérobiose, du peroxyde d'hydrogène à 10 mM finale en anaérobiose et à 20 mM finale en aérobiose a été ajouté au milieu de culture. Les bactéries sont dénombrées avant et 20 min après l'addition du peroxyde d'hydrogène dans le milieu de culture. La mortalité est exprimée par le rapport N_0/N où N_0 et N représentent respectivement le nombre de bactéries contenu dans le milieu de culture avant l'addition du peroxyde d'hydrogène et 20 min après l'addition du peroxyde d'hydrogène.

Résultats

Chapitre III : Implication de l'enzyme LdhA dans le métabolisme et la toxinogénèse de *B. cereus*

1. Introduction à l'étude

Bacillus cereus exprime un grand nombre de facteurs impliqués ou potentiellement impliqués dans la pathogénicité. Parmi ces facteurs il y a des hémolysines, des entérotoxines, des phospholipases, des métalloprotéases et des collagénases (Stenfors Arnesen, *et al.*, 2008, Clair, *et al.*, 2010). La contribution de chacun de ces facteurs dans le syndrome diarrhéique n'a pas été entièrement élucidée. Des travaux ont montré que toutes les souches isolées de TIA diarrhéiques étaient capables de synthétiser Nhe. Par contre, elles n'ont pas toutes la capacité de synthétiser Hbl et/ou Cyt K (Guinebretière *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que la cytotoxicité d'une souche diarrhéique était fortement dépendante du taux de production de Nhe lorsque *B. cereus* est cultivé en aérobose sur un milieu riche (BHI) (Moravek, *et al.*, 2006). Cela suggère que Nhe pourrait être une toxine importante du pouvoir entérotoxigène d'une souche de *B. cereus*. Enfin, des travaux menés au laboratoire ont montré que la transcription de *nhe* est maximale au début de la phase exponentielle de croissance (Zigha, *et al.*, 2006). Ceci laisse à supposer qu'il existe un lien entre le catabolisme des glucides et le système de régulation de la toxine Nhe.

Des études précédemment réalisées au laboratoire ont montré que *B. cereus* catabolise les glucides, tel que le glucose, principalement via la glycolyse et dans une moindre mesure via la voie des pentoses phosphates (Zigha, *et al.*, 2006). La glycolyse produit deux molécules de pyruvate par molécule de glucose et réduit dans le même temps deux molécules de NAD^+ en NADH. Le devenir catabolique du pyruvate est déterminé par la disponibilité en oxygène. En anaérobiose lors de la croissance fermentaire, le pyruvate et l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) servent d'accepteurs d'électrons. Les enzymes catalysant la réduction du pyruvate et de l'acétyl-CoA sont la lactate déshydrogénase (Ldh), la malate déshydrogénase (Mdh), la succinate déshydrogénase (Sdh), la pyruvate formate lyase (Pfl), l'aldehyde déshydrogénase (AdhE) et l'alcool déshydrogénase (AdhA). La Ldh catalyse la réduction du pyruvate en lactate, la Mdh et la Sdh catalysent successivement la réduction du pyruvate en malate puis du malate en succinate. La Pfl convertit le pyruvate en acétyl-CoA. La production d'acétate est dépendante des enzymes phosphotransacétylase (Pta) et acétate kinase (Ack) (figure 25). Les principaux produits de fermentation sont les acides mixtes tels que l'acide lactique, l'acide

succinique, l'acide acétique, l'acide formique et l'éthanol. L'acide lactique est le produit de fermentation majoritaire et représente plus de 65 % des produits de dégradation du glucose chez la souche de *B. cereus* F4430/73. Les acides acétiques et formiques sont tous les deux produits en quantité similaire (chacun représente 15 % du total de production). L'éthanol et le succinate sont des produits minoritaires (ils représentent respectivement moins de 3 % et 2 % du total des produits formés) (Rosenfeld, *et al.*, 2005, Duport, *et al.*, 2006). La production des sous-produits de fermentation dans des proportions appropriées aide au maintien de l'équilibre rédox en anaérobiose et maximise le rendement en ATP par molécule de glucose. Ceci dans le but de permettre un taux de croissance élevé et un meilleur rendement cellulaire.

En aérobiose le complexe pyruvate déshydrogénase (Pdh) réalise la liaison entre la glycolyse et le cycle de Krebs en catalysant la production d'acétyl-CoA à partir du pyruvate. Le NADH généré pendant l'oxydation complète du glucose est ré-oxydé en NAD⁺ via la chaîne respiratoire et donne lieu à la production d'ATP. Dans ces conditions, la production d'acétate peut avoir lieu lorsque la vitesse d'entrée du carbone au niveau du cycle de Krebs excède sa capacité (Rosenfeld, *et al.*, 2005, Duport, *et al.*, 2006).

Le maintien de l'équilibre rédox est une condition *sine qua non* pour la croissance. *B. cereus* réoriente les flux cataboliques en contrôlant la production des enzymes du métabolisme. Le contrôle se fait au niveau de la régulation des concentrations en enzymes, au niveau de leur activité, et/ou au niveau de la régulation de leur expression.

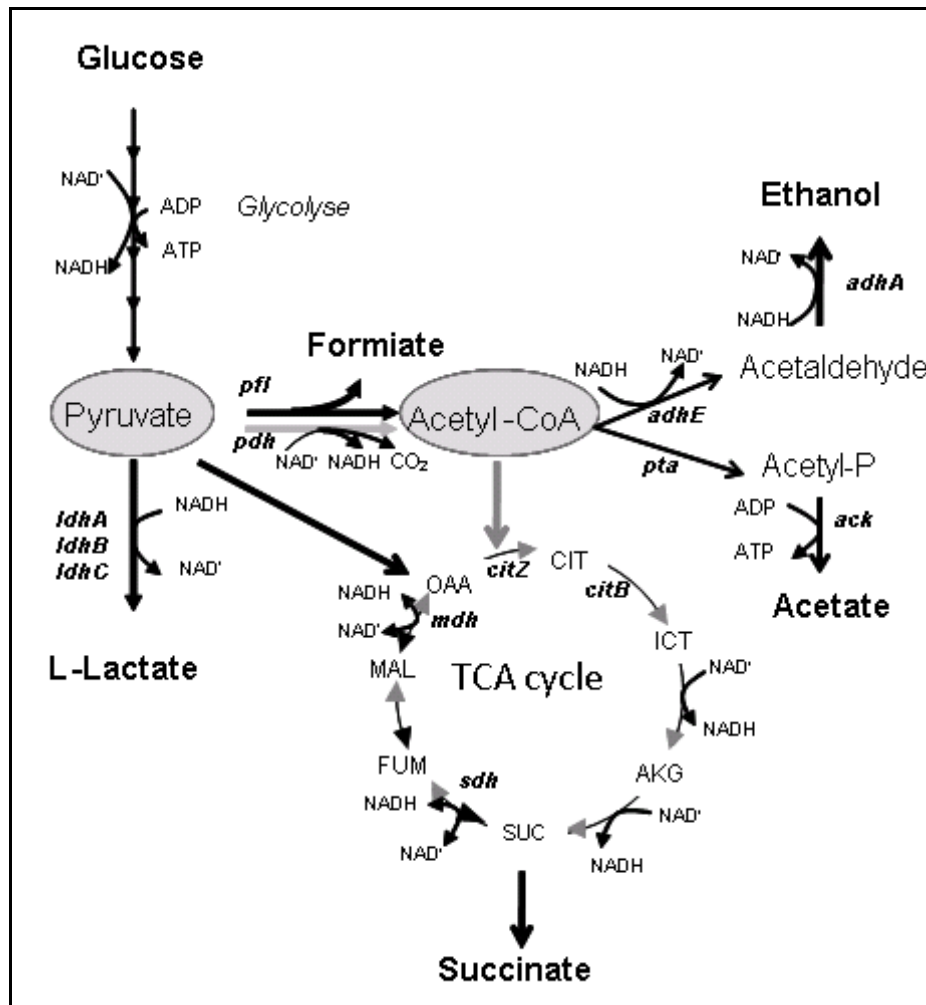


Figure 25 : Schéma représentant les voies de production des métabolites. Les réactions sont représentées par les noms des gènes correspondants : *ldhA*, *ldhB*, and *ldhC*, L-lactate déshydrogénase; *pfl*, pyruvate formiate lyase; *pdh*, pyruvate déshydrogénase; *pta*, phosphotransacétylase; *ack*, acétate kinase; *adhE*, acétaldéhyde déshydrogénase; *adhA*, alcool déshydrogénase; *mdh*, malate déshydrogénase; *sdh*, succinate déshydrogénase; *citB*, aconitase hydratase; *citZ*, citrate synthase. Les réactions fonctionnant pendant l'aérobiose sont représentées par des flèches grises, et les réactions fonctionnant pendant l'anaérobiose sont représentées par des flèches noires. CIT, citrate; ICT, isocitrate; AKG, α -cétoglutarate; SUC, succinate; FUM, fumarate; MAL, malate; OAA, oxaloacetate; TCA, cycle de Krebs.

Chez *B. cereus* l'expression de la plupart des gènes codant des enzymes du métabolisme est modulée par le système à deux composants ResDE, la protéine Fnr et la protéine CcpA. Ces trois systèmes de régulation contribuent également à la virulence de *B. cereus* (Duport, *et al.*, 2006, Zigha, *et al.*, 2007, van der Voort, *et al.*, 2008). Dans le but de comprendre les mécanismes qui font le lien entre les signaux métaboliques et la virulence, nous avons comparé les capacités métaboliques et les capacités de production de la toxine

Nhe de quatre souches de *B. cereus*. Les souches ont été sélectionnées via-à-vis de leur provenance (isolées de TIAC ou non). Nous avons sélectionné la souche F4430/73 (isolée de TIAC entraînant un syndrome de type diarrhéique), la souche F4810/72 (isolée de TIAC entraînant un syndrome de type émétique), la souche F837/76 (isolée d'une infection de prostate) et la souche PA (isolée d'aliments).

2. Résultats

Capacité de sécrétion de la toxine Nhe des souches F4810/72, F837/76, PA et F4430/73

Dans un premier temps, nous avons voulu savoir quelle était la capacité de production de la toxine Nhe de chacune des souches sélectionnées. Afin de se rapprocher des conditions existant dans l'intestin les souches F4430/73, F4810/72, F837/76 et PA ont été cultivées en milieu minimum (milieu MOD) en présence d'une source de carbone limitante (glucose à 30 mM) et à un pH de 7,2 en anaérobiose ($pO_2=0\%$) et en aérobiose ($pO_2=100\%$).

Des travaux réalisés précédemment au laboratoire ont montré que chez *B. cereus*, le taux de production spécifique de la toxine Nhe est maximale en début de phase exponentielle de croissance lorsque $\mu = \mu_{max}$ ((Zigha, *et al.*, 2006) et données non publiées). Nous avons donc comparé le taux de production spécifique de la toxine Nhe de chacune des souches sur des échantillons prélevés lorsque le taux de croissance était maximal (μ_{max}).

En anaérobiose comme en aérobiose, les souches F4810/72, F837/76 et PA secrètent moins de toxine Nhe que la souche F4430/73 (figure 26). Parmi les souches F837/76 et PA, la souche F4810/72 est la meilleure productrice de toxine Nhe (1,1 et 0,4 U.g⁻¹ de biomasse en anaérobiose et en aérobiose respectivement contre 0,2 et 0,002 pour la souche F837/76 et 0,5 et 0,01 pour la souche PA).

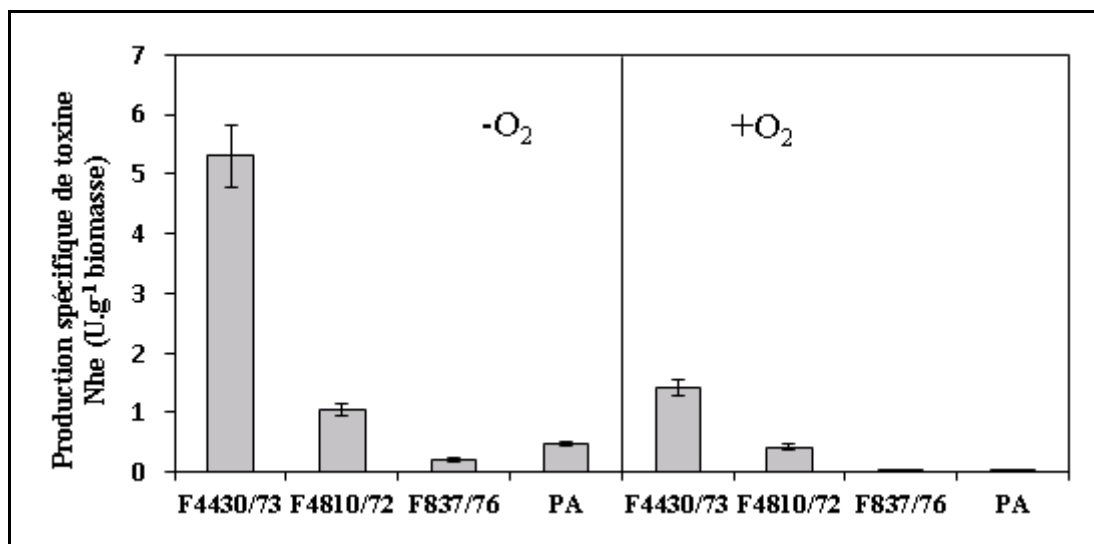


Figure 26 : Production spécifique de toxine Nhe. Les croissances ont été réalisées en anaérobiose et en aérobie en bioréacteur dans du milieu MOD contenant 30 mM de glucose.

Capacité fermentaire et respiratoire des souches F4810/72, F837/76, PA et F4430/73

Nous avons comparé les capacités de croissance des souches F4810/72, F837/76, PA et F4430/73. Les paramètres de croissances de ces souches sont présentés dans le tableau 4.

En anaérobiose les souches F4810/72, F837/76 et PA ont des croissances significativement plus lentes que la souche F4430/73 et atteignent leur phase stationnaire de croissance avec une biomasse finale plus faible. Ceci s'explique par le fait qu'elles consomment moins rapidement le glucose et en quantité moins importante. La souche F4810/72 présente le rendement de croissance le plus élevé.

En aérobie, les souches F837/76 et PA ont un taux de croissance légèrement plus bas que les deux autres souches. Cependant, la biomasse finale et le rendement de croissance sont significativement plus élevés avec les souches F4810/72, F837/76 et PA qu'avec la souche F4430/73, alors que la vitesse de consommation du glucose pour ces trois souches est plus faible. Ces résultats indiquent que le flux glycolytique est plus faible en anaérobiose et en aérobie chez les souches F4810/72, F837/76 et PA que chez la souche F4430/73.

Tableau 4 : Paramètres de croissance des souches F4430/73, F4810/72, F837/76 et PA cultivées en batch régulé dans le milieu MOD contenant 30 mM de glucose (pH = 7.2).

Les croissances ont été réalisées en anaérobiose sous un flux d'azote ($pO_2 = 0\%$) et en aérobiose ($pO_2 = 100\%$). Les valeurs sont la moyenne de deux valeurs de deux cultures indépendantes. Les écarts-types étant tous inférieurs à 10%, ils ne sont pas mentionnés.

^a La biomasse finale et la consommation du glucose ont été déterminées en fin de croissance, 1.5 h après que la DO_{560} atteigne sa valeur maximale.

	Croissance en anaérobiose				Croissance en aérobiose			
	F4430/73	F4810/72	F837/76	PA	F4430/73	F4810/72	F837/76	PA
Taux maximal de croissance (μ, h^{-1})	0,9	0,5	0,5	0,5	1,4	1,3	1,1	1,1
Biomasse finale ($g.l^{-1}$) ^a	0,8	0,3	0,3	0,3	2,6	2,9	3,7	3,0
Glucose consommé (%) ^a	100	28	42	35	100	100	100	100
Rendement de croissance (g de biomasse. mol^{-1} de glucose)	26	34	27	24	86	97	123	100
Taux maximal de consommation spécifique du glucose ($mmol. mg^{-1} h^{-1}$)	35	6	11	7	16	13	9	11

La quantification des métabolites indique que le lactate est le produit de fermentation majoritaire chez les quatre souches (figure 27). Les souches F4810/72, F837/76 et PA produisent des quantités de lactate plus faible que la souche F4430/73. Par contre le formiate, l'acétate (excepté pour la souche PA) et l'éthanol sont produits en quantités plus élevées. Ceci suggère qu'en anaérobiose le flux de carbone partant du pyruvate vers le lactate est plus faible chez les souches F4810/72, F837/76 et PA par rapport à la souche F4430/73. Cela suggère également que le flux de carbone partant du pyruvate et aboutissant à la formation d'éthanol est plus élevé chez les souches F4810/72 et F837/76 par rapport à la souche F4430/73.

En présence d'oxygène, l'éthanol, le formiate et le succinate ne sont pas détectés dans le surnageant de culture des quatre souches. Les quantités de lactate sécrétées sont semblables pour les quatre souches tandis que les quantités d'acétate produites par les souches F4810/72, F837/76 et PA sont plus faibles par rapport à celle produite par la souche F4430/73. Les résultats indiquent qu'il y a une meilleure entrée du carbone au niveau du cycle de Krebs chez les souches F4810/72, F837/76 et PA, ce qui leur permet d'atteindre une biomasse finale supérieure par rapport à celle de la F4430/73.

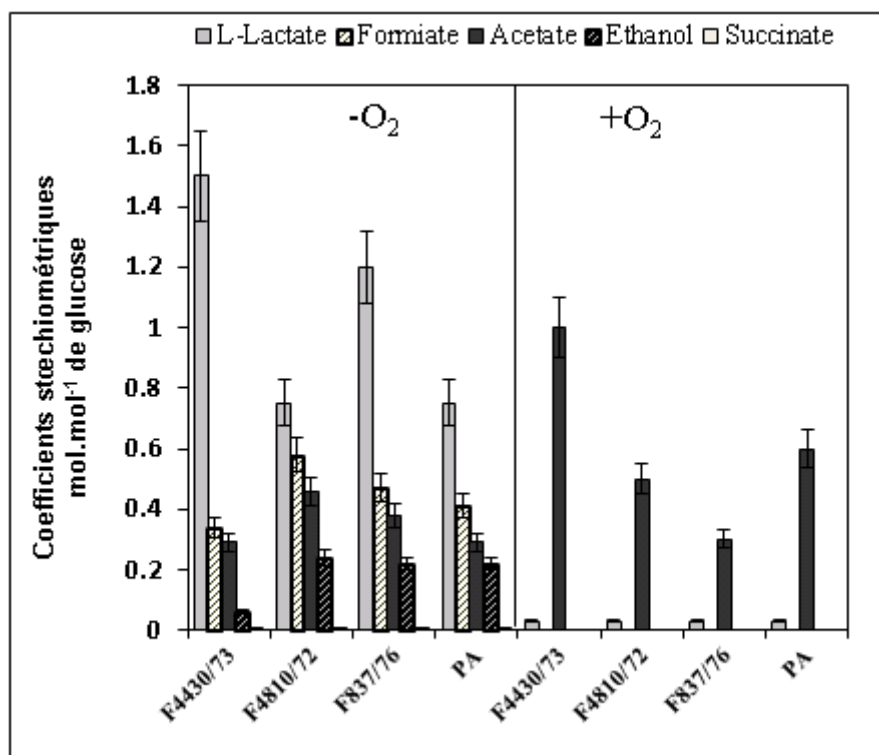


Figure 27 : Produits du métabolisme fermentaire des cultures en batch régulé des souches F4430/73, F4810/72, F837/76 et PA.

Profil d'expression des gènes du métabolisme des souches F4810/72, F837/76, PA et F4430/73 cultivées en anaérobiose et en aérobie

Dans le but de savoir si les réorientations du flux glycolytique observées chez nos quatre souches ainsi que les différences de production de la toxine Nhe étaient dues à une différence d'expression des gènes du métabolisme, du gène *nheA*, des régulateurs du métabolisme et/ou de la toxinogénèse, des expériences de RT-PCR en temps réel ont été réalisées. Le tableau 5 présente les résultats obtenus. Les souches F4810/72, F837/76 et PA présentent un profil d'expression des gènes du métabolisme différent par rapport à la souche F4430/73. Que ce soit en absence ou en présence d'oxygène, le profil d'expression des gènes *ldhA*, *ldhB* et *ldhC* (codant des lactate déshydrogénases), diffère de manière significative chez les souches F4810/72, F837/76 et PA par rapport à la souche F4430/73. En aérobie et en anaérobiose, l'expression de *ldhA* est modérément réduite chez la souche F4810/72 et sévèrement réduite chez les souches F837/76 et PA. L'expression de *ldhB* diffère suivant les

souches et les conditions. Enfin l'expression de *ldhC* est inversement corrélée à celle de *ldhA* chez les souches F4810/72, F837/76 et PA que ce soit en aérobiose ou en anaérobiose ($r = -0,63$; $p < 0,05$) (les valeurs ont été soumises au test statistique du coefficient de corrélation de Pearson). Comme pour *ldhA*, *adhE* qui code une enzyme clé de la voie de production d'éthanol et *citZ* qui code une enzyme qui régit l'entrée du carbone dans le cycle de Krebs, voient leurs expressions significativement diminuées chez les souches F4810/72, F837/76 et PA par rapport à la souche F4430/73 en aérobiose et en anaérobiose.

La quantité de transcrit *nhe* est fortement réduite chez les souches F4810/72, F837/76 et PA par rapport à la souche F4430/73 que ce soit en anaérobiose ou en aérobiose. Ceci peut expliquer les faibles quantités de toxine Nhe sécrétées chez ces trois souches. La différence d'expression de *nhe* n'est pas corrélée à une différence d'expression des régulateurs *plcR*, *resD*, *fnr* et *ccpA*. Les gènes *ldhA*, *adhE* et *citZ* voient la quantité de leur transcrit corrélé de manière significative ($p < 0,05$) avec la quantité de transcrit *nhe* ($r = +0,62$; $+0,91$ et $+0,77$ respectivement pour ces trois gènes). Ceci suggère l'existence d'un lien entre la régulation de ces gènes du métabolisme et *nhe*.

Dans le but de valider un tel lien, la caractérisation du mutant F4430/73 Δ *ldhA* a été entreprise. Le mutant *ldhA* a été construit chez la souche F4430/73 car cette souche présente la meilleure capacité de croissance dans des conditions mimant les conditions intestinales. L'intestin étant de façon très majoritaire dépourvu d'oxygène, la souche F4430/73 est la souche qui présente un taux de croissance maximal, une biomasse finale et un niveau de production de la toxine Nhe plus élevés en anaérobiose par rapport aux autres souches. Ces résultats semblent être en lien avec le fait que la souche F4430/73 a été responsable d'une TIAC.

Taux d'induction ou de répression ^a

Gène	Croissance en anaérobiose			Croissance en aérobiose		
	F4810/72	F837/76	PA	F4810/72	F837/76	PA
Catabolisme du glucose						
<i>ldhA</i>	-2,5	-100	-100	-2,0	-100	-100
<i>ldhB</i>	+2,5	+2,0	-5,0	-50	-100	-5,0
<i>ldhC</i>	+3,2	+6,2	+6,5	+2,2	+12,3	+5,4
<i>pfl</i>	-4,0	-1,2	-2,2	-1,4	-3,7	-3,1
<i>pdhA</i>	+1,4	+1,9	+1,6	-1,1	+1,0	+1,0
<i>pta</i>	-5,0	-3,3	-3,8	-2,5	-2,0	+1,5
<i>ackA</i>	-3,3	-2,3	+1,6	-1,7	-1,5	+2,0
<i>adhE</i>	-7,7	-4,8	-7,7	-4,5	-33,3	-3,7
<i>adhA</i>	-1,1	+1,7	+1,7	+2,3	-1,8	+1,1
<i>sdhA</i>	-2,2	+1,0	-2,5	+3,0	+2,9	+2,4
<i>citZ</i>	-100	-100	-16,0	-50,0	-33,0	-2,7
<i>citB</i>	+1,1	-12,5	-10,0	+2,0	+1,5	-2,3
<i>mdh</i>	+1,6	+4,8	+4,9	-1,1	-1,1	+1,2
Entérotoxine						
<i>nhe</i>	-10	-100	-100	-3,1	-500	-14,3
Régulateurs						
<i>plcR</i>	+3,0	+1,4	+4,2	+2,9	+1,1	-1,1
<i>resD</i>	+4,0	+3,2	+5,6	+2,2	+1,9	+2,3
<i>fnr</i>	+6,7	+6,2	+7,5	-1,8	+2,4	+1,5
<i>ccpA</i>	-1,4	-1,1	-2,3	-3,6	-1,7	-1,2

Tableau 5 : Taux d'induction ou de répression des gènes impliqués dans le catabolisme du glucose et la synthèse d'entérotoxines chez les souches F4810/72, F837/76 et PA comparé à la souche F4430/73. Les croissances ont été réalisées en anaérobiose et en aérobiose en bioréacteur dans du milieu MOD contenant 30 mM de glucose. ^a Chaque valeur représente la moyenne de la quantité d'ARNm d'un échantillon d'une souche rapporté à la quantité d'ARNm d'un échantillon de la souche F4430/73. Chaque valeur représente la moyenne de deux mesures provenant de deux cultures indépendantes. Les échantillons ont été pris en début de phase exponentielle ($\mu = \mu_{\max}$). Seuls les ratios ≤ -2 et $\geq +2$ ont été considérés comme significatifs ($p \leq 0,05$). Les signes + et - indiquent que les gènes sont surexprimés (+) ou sous-exprimés (-). Les fonds gris et noir indiquent respectivement les gènes surexprimés et sous-exprimés de manière significative.

Analyse de la séquence du locus *ldhA* chez *B.cereus* F4430/73.

L'étude de la région génique du gène *ldhA* indique que chez la souche F4430/73 comme chez la souche séquencée ATCC 14579, le gène *ldhA* semble être en opéron avec le gène *pfo*. Des expériences de RT-PCR ont démontré que ces deux gènes sont effectivement co-transcrits en anaérobiose et en aérobiose. Le début de la transcription a été localisé par 5'RACE-PCR à 48 paires de base (pb) en amont du codon d'initiation de la traduction du gène *ldhA* (figure 28A). L'analyse de la région promotrice a mis en évidence l'existence de boîtes de fixation des régulateurs Fnr et ResD (Cruz Ramos, *et al.*, 2000, Hartig, *et al.*, 2004, Duport, *et al.*, 2006, Zigha, *et al.*, 2007).

Chez la souche F4430/73, le gène *ldhA* code une protéine de 416 acides aminés qui appartient à la famille de protéines lactate déshydrogénases/malate déshydrogénases (LDH/MDH). L'alignement de la séquence protéique de LdhA avec les séquences protéiques des deux autres lactate déshydrogénases synthétisées par *B. cereus* (LdhB et LdhC) montre que LdhA ne partage pas plus de 50 % d'identité avec LdhB et LdhC (figure 28B). Ceci est également vrai lorsque nous alignons LdhA avec les séquences protéiques des lactate déshydrogénases d'autres bactéries à Gram positif. Par exemple LdhA présente 47 % d'identité et 70 % de similarité avec LctE de *B. subtilis*.

Le gène *pfo* coderait une protéine de 340 acides aminés comprenant un domaine transmembranaire de 10 hélices α . Chez la souche ATCC 14579, cette protéine a été annotée comme pouvant être un régulateur de la perfringolysine O. Chez la souche F4430/73, nous n'observons aucune similarité entre *pfo* et ce régulateur. Pfo présente les mêmes caractéristiques hydrophobes que les perméases. Enfin en dehors du groupe *B. cereus* aucun orthologue à *pfo* n'a pu être trouvé dans le génome d'autres bactéries, ce qui suppose que ce gène pourrait être spécifique au groupe *B. cereus*.

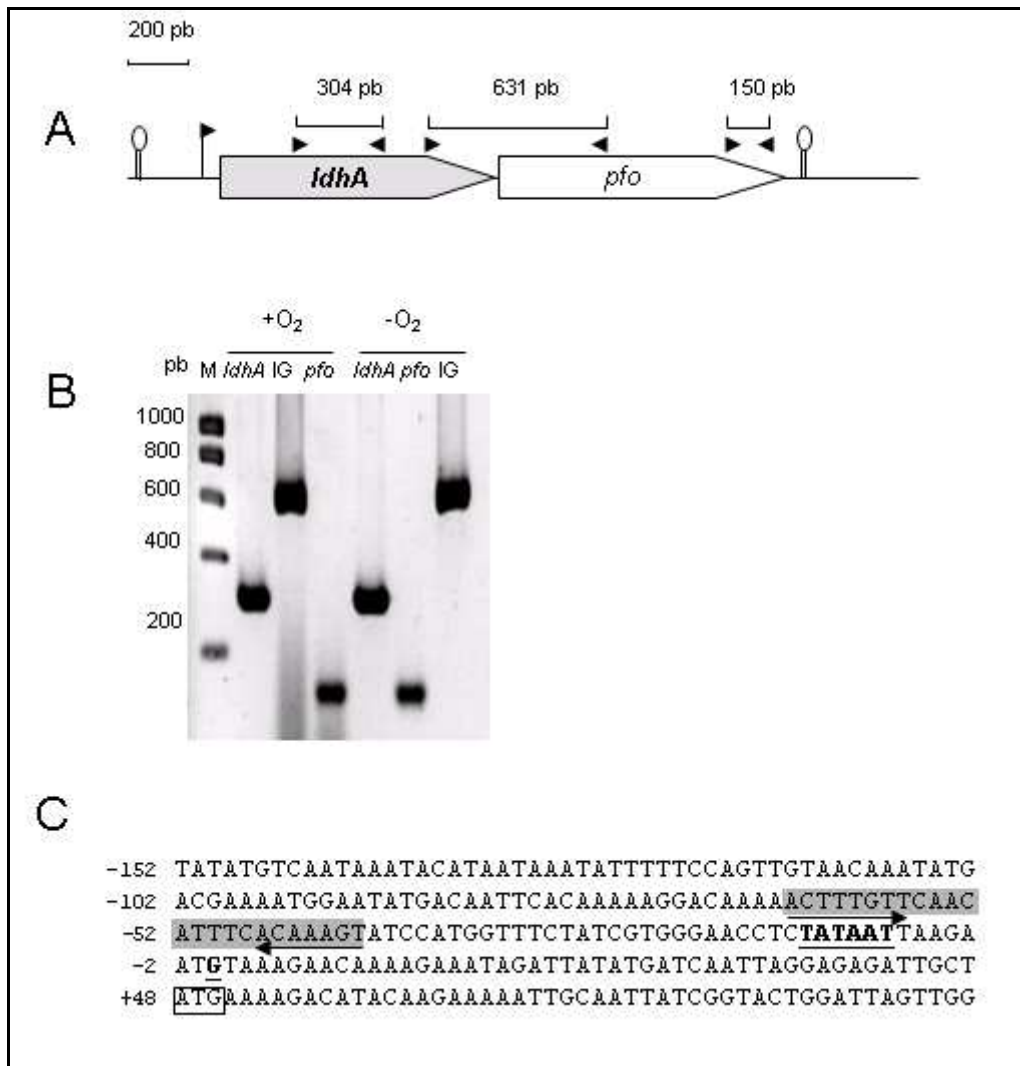


Figure 28A : Organisation génétique, séquences régulatrices et expressions des gènes *ldhA-pfo* chez la souche F4430/73. (A) Les petites flèches représentent la position et la direction des amorces utilisées pour la RT-PCR. La taille attendue des produits PCR est indiquée au dessus de chaque couple d'amorces. (B) RT-PCR réalisée chez la souche F4430/73 avec les amorces amplifiant une partie du gène *ldhA*, une partie du gène *pfo* et la région intergénique (IG). (C) Séquence nucléotidique de la région promotrice du gène *ldhA* chez la souche F4430/73. Le site d'initiation de la transcription (+1) et la séquence -10 sont en gras et soulignés. Une séquence opératrice potentielle est surlignée en gris, le codon d'initiation de la traduction est encadré, et une séquence inversée répétée est indiquée par des flèches.

```

LdhB MKKGINRVVVLVGTGAVGCSYAYCMINQAVAEFVLVDVNEAKAEGEAMD 50
LdhC MKKGINRVVVLVGTGAVGCSYAYSMINQGVAEFVLVDVNEAKAEGEAMD 50
LdhA MKRHRTRKIAIIGIGLVGSSCAYSIVNQGICEELLILIDINHERAVGEAMD 50

LdhB SHAVPFAPAPTRVWKGSYEDCKDADLVVITAGLPQKPGETRDLVEKNAK 100
LdhC SHAVPFSPSPTKVWSGSYADCKDADLVVITAGLPQKPGETRDLVEKNTK 100
LdhA SHCINFINIRTKVYAGSYEDCKDMDIVITAGPAPKPGQSRLDTLGASAK 100

LdhB IFKQIVRSIMDSGFDGIFLIATNPVDILTYVTWKESGLPKERVIGSGTTL 150
LdhC IFKQIVRGIMDSGFDGIFLIATNPVDILTYVTWKESGLPKERVIGSGTTL 150
LdhA IMESVVGGMASGFDGIFLIASNPVDITTYQVWKL SGLPRNRVIGTGTSL 150

LdhB DSARFRYMLGEYFDIGPHNIHAYIIGEHGDTLPVWSHVSIG-IQKLQTL 199
LdhC DSARFRYMLGDYLDVDPNRVHAYIVGEHGDTELPVWSHATIG-VQKLETI 199
LdhA DSSRLRTTILSEMLHVDPRSIHGYSLGEHGD SGMVAWSHVTVGGKPILOIL 200

LdhB LEKDNTYNQEDLDKIFINVRDAAYHI IERKGATYYGIGMSLLRVTKAILN 249
LdhC LANNEQYKQEDLDKIFENVRDAAYQVIERKGATYYGIGMSLLRVTKAILN 249
LdhA EEQKEREGEIDLDEIVEKTAKAGWEIYKRKGTYYGIGNSLAYIASSIFN 250
          *   *

LdhB DENSVLTVSAYLEGQYGOKDVIYIGVPAVLNRCGVREI LEVELSEDEELKF 299
LdhC NENSVLTVSAYLEGQYGEKDAYVGVPAVINREGVREIVELELNEDEKAKF 299
LdhA DDHRVIAVSAILDGEYGEYDICTGVPAITITRDGIREVVELNLTEDEESRF 300

LdhB DHSVQVLKETMAPVL- 314
LdhC AHSVKVLKETMAPVL- 314
LdhA AKSNDILRDYMKTIGY 316

```

Figure 28B : Alignement des séquences en acides aminés de LdhA, LdhB et LdhC. Les acides aminés identiques et similaires sont représentés en noir et gris respectivement. L'emplacement des résidus tyrosine connu pour être important pour la fixation à l'ADN de lactate déshydrogénase eucaryote est représenté par un astérisque.

Expression du gène *ldhA* et production de LdhA.

Dans le but de démontrer que les gènes *ldhA*, *ldhB* et *ldhC* de la souche F4430/73 codent des lactate déshydrogénases, nous les avons exprimés *in vitro* en présence des chaperons GroES et GroEL. La figure 29 montre que LdhA (figure 29A), comme LdhB et LdhC (figure 29B), ont été synthétisées *in vitro* avec succès. En utilisant le pyruvate comme substrat et le NADH comme co-substrat, l'activité spécifique de la protéine LdhA a été déterminée. LdhA possède une activité spécifique de $40 \pm 4 \text{ U.mg}^{-1}$, LdhB possède une activité spécifique de $50 \pm 6 \text{ U.mg}^{-1}$ et LdhC présente une activité spécifique de $83 \pm 10 \text{ U.mg}^{-1}$. Ces résultats démontrent que les gènes *ldhA*, *ldhB* et *ldhC* de la souche F4430/73 codent des lactate déshydrogénases fonctionnelles.

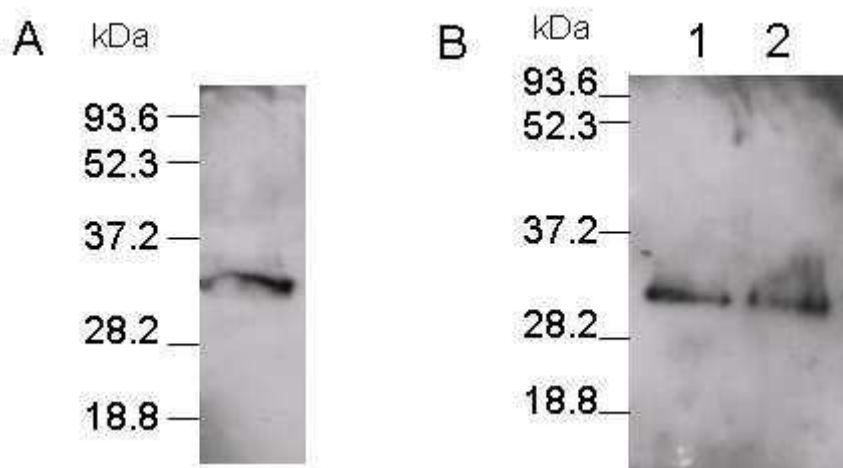


Figure 29 : Expression des gènes *ldhA*, *ldhB* et *ldhC*. Les lactate déshydrogénases ont été produites en utilisant le kit RTS 500 *E.coli* HY en présence de GroES et GroEL. Les protéines LdhA, LdhB et LdhC ont été visualisées par Western blot en utilisant un anticorps anti-His. (A) LdhA 34,6 kDa, (B) LdhB (34,5 kDa), (C) LdhC (34,7 kDa). L'échelle de poids moléculaire est indiquée sur la gauche en kDa.

Caractéristiques physiologiques du mutant F4430/73 Δ *ldhA*

Le mutant *ldhA* a été construit chez la souche F4430/73 par introduction d'une cassette de résistance à la spectinomycine. Afin de prouver l'effet non polaire de la disruption du gène *ldhA*, le mutant F4430/73 Δ *pf0* a été construit par le même type de construction. Les caractéristiques de croissance en anaérobiose et en aérobie des mutants F4430/73 Δ *ldhA* et F4430/73 Δ *pf0* ont été comparées à celles de la souche sauvage (tableau 6).

En aérobiose, les paramètres de croissance des mutants F4430/73 Δ *ldhA* et F4430/73 Δ *pfo* sont semblables à la souche sauvage. En anaérobiose alors que la disruption *pfo* n'a pas d'effet sur les différents paramètres de croissance, la disruption de *ldhA* altère sévèrement la croissance. Cela indique que LdhA est requise pour une croissance fermentaire optimale. Le mutant *ldhA* produit moins de lactate (0,15 mol/mol de glucose pour le mutant *ldhA* contre 0,23). Ceci indique un défaut au niveau de la voie de régénération du NAD⁺ lors de la transformation du pyruvate en lactate. Le mutant *ldhA* sécrète également moins de formiate que la souche sauvage. Le mutant *pfo* sécrète à la fois moins de formiate et plus d'acétate. Le ratio éthanol/acétate est plus élevé chez le mutant *ldhA* tandis que la valeur du NADH recouvré est identique chez les trois souches. Cela indique qu'il y a chez le mutant *ldhA* une régénération efficace du NAD⁺ malgré une plus grande disponibilité en NADH qui pourrait être due à l'absence de LdhA (Sanchez, *et al.*, 2005). Par rapport à la souche sauvage, la mutation *ldhA* entraîne une augmentation de la quantité de transcrit *ldhB* en aérobiose et en anaérobiose (tableau 7). Cette augmentation est plus marquée en anaérobiose. Cela suggère qu'en l'absence de LdhA, LdhB est synthétisé en plus grande quantité. Cependant l'augmentation de la synthèse de LdhB chez le mutant *ldhA* ne permet pas de récupérer un taux de croissance maximal identique à celui de la souche sauvage. Ceci indique que LdhB et LdhC ont un rôle moins important dans le catabolisme du glucose par rapport à LdhA.

En anaérobiose comme en aérobiose, la sécrétion de la toxine Nhe est significativement réduite chez le mutant *ldhA*, mais pas chez le mutant *pfo*. La diminution de sécrétion de toxine Nhe est corrélée à une diminution de la quantité de transcrit *nhe*. Ceci indique que la production de la toxine Nhe est régulée au niveau transcriptionnel en présence comme en absence d'oxygène. Aucune corrélation n'a été observée entre la quantité de transcrit des régulateurs *plcR*, *resD*, *fnr* et *ccpA* et la quantité de transcrit *nhe*.

L'expression de *pfo* n'est pas affecté par la mutation *ldhA* en présence d'oxygène ce qui confirme l'effet non polaire de la mutation. Par contre, en anaérobiose, nous observons une diminution de la quantité des transcrits *pfo* chez le mutant *ldhA*, ce qui suggère un rôle possible de LdhA sur la régulation de la transcription de l'opéron *ldhA-pfo*. Enfin, la complémentation du gène *ldhA* a été entreprise. L'apport en trans, sur un plasmide, des copies sauvages des gènes *ldhA* et de l'opéron *ldhA-pfo* a permis une restauration partielle de la croissance fermentaire et de la production de toxine Nhe (le mutant ainsi complémenté produit deux fois plus de toxine Nhe que le mutant).

Tableau 6 : Paramètres de croissance, produits du métabolisme et quantités de toxine Nhe des mutants *ldhA*, *pfo* et de la souche sauvage F4430/73 (wt) cultivés en batch régulé (pH=7,2). Les croissances ont été réalisées en anaérobiose sous flux d'azote ($pO_2 = 0\%$) et en aérobie ($pO_2 = 100\%$). Les valeurs sont les moyennes de trois échantillons provenant de deux cultures indépendantes. Les rendements des produits finaux ont été calculés en phase stationnaire. Les écarts-types obtenus sont tous inférieurs à 10%, ils ne sont pas mentionnés. Nz : la valeur est proche de zéro. Nd : non déterminé. ^aLe NADH recouvré a été calculé en faisant le rapport du NADH produit sur le NADH consommé.

	Croissance en anaérobiose			Croissance en aérobie		
	wt	<i>ldhA</i>	<i>pfo</i>	wt	<i>ldhA</i>	<i>pfo</i>
Paramètres de croissance						
Taux maximal de croissance (μ , h^{-1})	0,9	0,5	1,0	1,4	1,4	1,1
Biomasse finale ($g.l^{-1}$)	0,8	1,0	0,9	2,6	2,5	2,6
Glucose consommé (%)	100	100	100	100	100	100
Rendement de croissance (g de biomasse/mol de glucose)	26	33	30	86	83	86
Taux maximal de consommation spécifique du glucose ($mmol. mg^{-1} h^{-1}$)	35	15	34	16	17	13
Coefficients stœchiométriques ($mol.mol\ glucose^{-1}$)						
Lactate	1,50	1,60	1,70	0,03	0,04	nz
Acétate	0,29	0,26	0,37	1,0	2,0	2,0
Formiate	0,34	0,24	0,19	nz	nz	nz
Ethanol	0,06	0,07	0,08	nz	nz	nz
Succinate	0,01	0,01	0,01	nz	nz	nz
Ethanol/Acétate	0,21	0,27	0,21	nd	nd	nd
Carbone recouvré	0,92	0,94	1,0	nd	nd	nd
NADH recouvré ^a	1,1	1,1	1,2	nd	nd	nd
Quantité totale de toxine Nhe ($U.g^{-1}$ de biomasse)	5,30	1,25	4,35	1,41	0,09	1,29

Taux d'induction ou de répression

Gène	Croissance en anaérobiose		Croissance en aérobiose	
	<i>ldhA</i>	<i>pfo</i>	<i>ldhA</i>	<i>pfo</i>
Catabolisme du glucose				
<i>ldhA</i>	ND	+1,2	ND	+1,5
<i>pfo</i>	-4,0	ND	-1,1	ND
<i>ldhB</i>	+32,0	-3,4	+2,4	+1,1
<i>ldhC</i>	-1,4	+1,2	+1,0	-1,2
<i>pfl</i>	+1,4	-1,1	+2,8	+3,5
<i>pdhA</i>	-1,5	+1,5	+1,0	+1,2
<i>pta</i>	-2,0	+1,3	-2,4	+1,9
<i>ackA</i>	+2,4	+5,8	+2,3	+10,8
<i>adhE</i>	+3,9	-1,7	+5,8	+2,6
<i>adhA</i>	+2,7	-2,4	+2,6	+1,9
<i>sdhA</i>	+1,0	+1,5	+2,1	+3,4
<i>citZ</i>	-2,7	+3,2	+1,4	+2,4
<i>citB</i>	+1,4	+1,0	+2,6	+1,6
<i>mdh</i>	-1,3	+1,1	+2,1	+1,3
Entérotoxine				
<i>nhe</i>	-166	+1,8	-12,6	+2,4
Régulateurs				
<i>plcR</i>	-2,2	+1,2	-1,6	+1,6
<i>resD</i>	-1,3	+1,2	+1,2	+2,6
<i>fnr</i>	-1,2	-1,1	+1,4	+1,1
<i>ccpA</i>	-1,1	+1,1	+1,1	+4,8

Tableau 7 : Niveau d'expression des gènes impliqués dans le catabolisme du glucose et la synthèse d'entérotoxines chez les mutants *ldhA* et *pfo* par rapport à la souche sauvage F4430/73^{ab}.

^a Les croissances ont été réalisées en anaérobiose et en aérobiose en bioréacteur dans du milieu MOD contenant une concentration de 30 mM de glucose.

^b Chaque valeur représente la moyenne de la quantité d'ARNm d'un échantillon d'une souche rapportée à la quantité d'ARNm d'un échantillon de la souche F4430/73. Chaque valeur représente la moyenne de deux mesures provenant de deux cultures indépendantes. Les échantillons ont été pris en début de phase exponentielle ($\mu = \mu_{\max}$). Seuls les ratios ≤ -2 et $\geq +2$ ont été considérés comme significatifs ($p \leq 0.05$). Les signes + et - indiquent que les gènes sont surexprimés (+) ou sous-exprimés (-). Les fonds gris et noir indiquent respectivement les gènes surexprimés et sous-exprimés de manière significative. ND, non détectable.

Fonction des gènes *ldhA*, *ldhB* et *ldhC* dans le métabolisme et la virulence de *B. cereus*.

Afin de déterminer la contribution des protéines LdhB et LdhC dans le catabolisme du glucose et dans la production de la toxine Nhe, les mutants F4430/73 Δ *ldhB* et F4430/73 Δ *ldhC* ont été caractérisés. Les capacités de croissance et de production de la toxine Nhe des mutants et de la souche sauvage en anaérobiose et aérobiose ont été évaluées en cultures non contrôlées. Contrairement à la mutation du gène *ldhA*, les mutations des gènes *ldhB* et *ldhC* ne perturbent ni la croissance fermentaire, ni la sécrétion de Nhe (tableau 8). LdhA, contrairement à LdhB et à LdhC, jouerait un rôle important dans la croissance de *B. cereus* et dans la production de la toxine Nhe.

B. cereus sécrète en plus de la toxine Nhe plusieurs autres toxines (Clair, *et al.*, 2010). Nous avons donc déterminé l'effet de la mutation *ldhA* sur la quantité des transcrits des gènes codant ces autres toxines. Le tableau 9 montre que tous ces gènes sont réprimés chez le mutant F4430/73 Δ *ldhA*, ce qui suggère que *ldhA* pourrait participer au réseau de régulation de la toxinogénèse chez la souche *B. cereus* F4430/73.

Enfin, la mutation du gène *ldhA* a également été réalisée chez les souches ATCC 14579 et F837/76. La mutation *ldhA* chez ces deux souches entraîne une diminution de la croissance fermentaire et une diminution de la production de la toxine Nhe. Ceci laisse à supposer que LdhA jouerait un rôle majeur chez plusieurs espèces du groupe *B. cereus*.

	Croissance en anaérobiose					Croissance en aérobiose				
	wt	<i>ldhA</i>	<i>pfo</i>	<i>ldhB</i>	<i>ldhC</i>	wt	<i>ldhA</i>	<i>pfo</i>	<i>ldhB</i>	<i>ldhC</i>
Taux maximal de croissance (μ , h ⁻¹)	0,90	0,45	0,82	0,94	0,96	1,40	1,33	1,43	1,48	1,35
DO ₅₆₀ finale	0,42	0,17	0,42	0,37	0,42	1,49	1,56	1,51	1,51	1,39
Quantité totale de Nhe (U.DO ₅₆₀ ⁻¹)	12,90	0,13	10,10	12,40	13,90	6,10	0,52	5,20	5,00	5,10

Tableau 8: Paramètres de croissance et production de Nhe des cultures non contrôlées des mutants *ldhA*, *pfo*, *ldhB* et *ldhC* ainsi que de la souche sauvage F4430/73 (wt). Les croissances ont été réalisées en anaérobiose et en aérobiose. Les valeurs sont les moyennes de deux cultures indépendantes. Les écarts types, tous inférieures à 15%, ne sont pas mentionnés.

Taux d'induction ou de répression ^a		
gène	Croissance en anaérobiose	Croissance en aérobiose
<i>hbl</i>	-15.4	-4.1
<i>cytK</i>	-123	-18.5
<i>hlyI</i>	-3.7	-8.9
<i>entFM</i>	-2.0	-2.7
<i>entA</i>	-3.4	-3.4
<i>entB</i>	-8.1	-2.0
<i>entC</i>	-6.7	-4.3

Tableau 9: Niveau d'expression des gènes codant des toxines induites par la mutation *ldhA*. Les croissances ont été réalisées en anaérobiose et en aérobiose en bioréacteur dans du milieu MOD contenant 30 mM de glucose.

^a Chaque valeur représente la moyenne de la quantité d'ARNm d'un échantillon d'une souche rapportée à la quantité d'ARNm d'un échantillon de la souche F4430/73. Chaque valeur représente la moyenne de deux mesures provenant de deux cultures indépendantes. Les échantillons ont été pris en début de phase exponentielle ($\mu = \mu_{\max}$). Seuls les ratios ≤ -2 et $\geq +2$ ont été considérés comme significatifs ($p \leq 0.05$). Les signes + et - indiquent que les gènes sont surexprimés (+) ou sous-exprimés (-).

3. Discussion

Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que la L-lactate déshydrogénase A avait un rôle dans le métabolisme fermentaire mais aussi dans la toxinogénèse de *B. cereus*. LdhA devient ainsi la première enzyme importante à la fois pour le catabolisme du glucose et pour la toxinogénèse chez *B. cereus*.

Les espèces du groupe *cereus* contiennent trois gènes codant des lactate déshydrogénases : *ldhA*, *ldhB* et *ldhC*. La séquence de chacun de ces gènes est très conservée au sein du groupe.

Dans cette étude nous avons montré que ces codent des lactate déshydrogénases fonctionnelles. Conformément aux études précédemment réalisées au laboratoire (Messaoudi, *et al.*, 2010), l'expression de ces gènes est détectable en anaérobiose comme en aérobiose. Cette expression est également confirmée par la production de lactate en présence et en absence d'oxygène.

En aérobiose comme en anaérobiose, nous observons chez les souches F4810/72, F837/76 et PA une faible expression de *ldhA* couplée à une forte expression de *ldhC*, tandis que chez la souche F4430/73 la mutation du gène *ldhA* entraîne une plus forte expression de *ldhB*. Cela suggère que le réseau de régulation qui coordonne l'expression des lactate déshydrogénases agit indépendamment de la présence en oxygène et de manière différente suivant les souches de *B. cereus* comme cela a également été montré chez *Staphylococcus aureus* (Richardson, *et al.*, 2008).

Nos travaux soutiennent également l'importance de LdhA dans la croissance fermentaire. En effet, en condition fermentaire, les souches F4810/72, F837/76 et PA présentent une plus faible expression de *ldhA*, ce qui engendre un taux maximal de croissance (μ_{max}) plus faible par rapport à la souche F4430/73. De plus, le mutant F4430/73 Δ *ldhA* présente un taux de croissance maximal (μ_{max}) diminué en anaérobiose par rapport à la souche sauvage.

Nos résultats présentent également l'importance de *ldhA* dans la toxinogénèse. La capacité d'expression de *nhe* est faible chez les souches exprimant faiblement *ldhA*. A l'inverse la souche F4430/73 exprimant fortement *ldhA* possède la plus forte capacité d'expression de *nhe*. Chez le mutant F4430/73 Δ *ldhA*, le gène *nhe* et les gènes d'autres toxines sont réprimés.

Comment LdhA agit-elle sur l'expression des entérotoxines ?

En anaérobiose, le défaut de synthèse de LdhA pourrait entraîner un défaut de réoxydation du NADH, ce qui pourrait impacter de manière transitoire sur la balance rédox. Cet impact sur la balance rédox entrainerait indirectement une répression de l'expression des entérotoxines.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'activation de l'expression du gène *nhe* en anaérobiose implique les régulateurs rédox Fnr et ResDE (Duport, *et al.*, 2006, Zigha, *et al.*, 2007). Ces régulateurs sont connus pour activer leur propre transcription en réponse aux changements de potentiel d'oxydoréduction (Esbelin, *et al.*, 2008, Esbelin, *et al.*, 2009). Contrairement à la quantité de transcrit *nhe*, les quantités des transcrits *resD* et *fnr* ainsi que celle de *plcR* ne diffèrent pas entre le mutant *ldhA* et la souche sauvage. Cela suggère qu'il existe un ou des autres éléments qui permettent d'expliquer la différence d'expression du gène *nhe* chez le mutant *ldhA*.

Chez *B. subtilis* (Larsson, *et al.*, 2005) et chez d'autres bactéries à Gram positif (Somerville & Proctor, 2009) les variations de concentrations en NAD^+/NADH sont détectées via le régulateur transcriptionnel Rex. *B. cereus* possède un gène homologue à *rex*. Des séquences potentielles de fixation à Rex ont été identifiées au niveau des régions promotrices des gènes *resD*, *fnr*, *ldhA*, *ldhB* et *nhe*. En aérobiose, la participation de Rex semble plus discutable car aucune différence permettant de mettre en avant un déséquilibre de la balance rédox n'a été observée entre la souche mutante et la souche sauvage. D'un autre côté les régulateurs ResDE, Fnr et PlcR, connus pour être des activateurs de l'expression de *nhe* en aérobiose (Gohar, *et al.*, 2005, Duport, *et al.*, 2006, Zigha, *et al.*, 2007), ne voient pas la quantité de leurs transcrits différée entre la souche mutante et la souche sauvage. Cependant nous ne pouvons pas exclure que chez le mutant *ldhA*, une modification post-transcriptionnelle des régulateurs ResDE, Fnr et PlcR ou une modification de production du peptide PapR, par exemple, soit à l'origine du défaut d'expression de la toxine Nhe.

De manière intéressante, les variations de quantités des transcrits *ldhA* et *nhe* sont corrélées de façon significative. Nous émettons l'hypothèse d'un effet direct de LdhA sur le contrôle de l'expression de *nhe* en aérobiose et/ou en anaérobiose. Cette hypothèse est confortée d'une part par le fait que LdhA est de part sa structure très différente des autres lactate déshydrogénases de *B. cereus* (Cattaneo, *et al.*, 1985, Grosse, *et al.*, 1986). D'autre part, il a été montré que chez les eucaryotes les lactate déshydrogénases peuvent se lier à de l'ADN simple brin et il a été suggéré qu'elles pourraient constituer des co-activateurs de la transcription (Cattaneo, *et al.*, 1985, Grosse, *et al.*, 1986). Il a été montré chez une lactate déshydrogénase isolée du foie de rat que le résidu tyrosine 238, se trouvant à proximité du site de fixation au co-enzyme, est important pour la fixation de cette protéine à de l'ADN simple brin (Williams, *et al.*, 1985). Chez *B. cereus*, *ldhA* possède ce résidu tyrosine. La position et l'environnement structural de ce résidu diffèrent chez LdhB et LdhC (Eventoff, *et al.*, 1977, Arai, *et al.*, 2010). Nous émettons donc l'hypothèse suivante : LdhA pourrait être un co-régulateur appartenant à un complexe de régulation impliquant ResD et Fnr (peut-être Rex). Cet ensemble régulerait la transcription des toxines dont l'expression est affectée par la mutation *ldhA*. La troisième partie de mon travail de thèse s'intéressera à vérifier si LdhA est capable de se lier directement au niveau des régions promotrices de gènes codant des toxines.

Chapitre IV : Implication du régulateur Rex dans le catabolisme et la toxinogénèse.

1. Introduction à l'étude

L'étude de la physiologie et du profil d'expression du gène de la toxine Nhe chez différentes souches de *B. cereus* nous a permis de mettre en évidence un rôle de la L-lactate déshydrogénase (LdhA) dans le métabolisme et la toxinogénèse de *B. cereus*. Cependant le mécanisme d'action par lequel la protéine LdhA agit sur l'expression des toxines demeure inconnu. Une des hypothèses proposées est que l'effet de LdhA sur l'expression des toxines est un effet indirect qui impliquerait le régulateur Rex.

Rex est une protéine très conservée parmi les bactéries à Gram positif (Racheev, *et al.*, 2011). Cette protéine connue pour avoir une fonction de répresseur transcriptionnel joue un rôle clé dans la transcription de gènes du métabolisme en réponse au ratio NAD^+/NADH chez différentes espèces bactériennes telles que *S. coelicolor* (Brekasis & Paget, 2003), *B. subtilis* (Schau, *et al.*, 2004, Larsson, *et al.*, 2005, Gyan, *et al.*, 2006, Wang, *et al.*, 2008) et *S. aureus* (Pagels, *et al.*, 2010).

Rex (YdiH) est une protéine dont la masse moléculaire est comprise selon les espèces entre 22.8 kDa et 26.8 kDa. La cristallographie de la protéine Rex chez *T. aquaticus*, *T. thermophilus* et *B. subtilis* a montré que Rex se fixe à l'ADN sous forme de dimère. Chaque sous-unité comprend un domaine hélice-tour-hélice de fixation à l'ADN en position N-terminale et un domaine de fixation au NAD^+/NADH en position C-terminale (Sickmier, *et al.*, 2005, Wang, *et al.*, 2008, Wang, *et al.*, 2011). Chez *S. coelicolor*, *B. subtilis* et *T. aquaticus*, il a été montré que le régulateur Rex est capable de se lier au NAD^+ et au NADH mais possède une plus grande affinité pour le NADH (Brekasis & Paget, 2003, Sickmier, *et al.*, 2005, Gyan, *et al.*, 2006, Wang, *et al.*, 2008). Chez *B. subtilis*, il a été montré que l'association de Rex avec le NADH abolie la formation du complexe Rex-ADN tandis que l'association de Rex avec le NAD^+ augmente l'affinité de Rex à l'ADN (Gyan, *et al.*, 2006, Wang, *et al.*, 2008). En d'autre terme, lorsque la concentration de NADH augmente par rapport à la concentration de NAD^+ , Rex se dissocie de sa séquence opératrice (5' TTGTGAANNNTTCACAA 3'), ce qui permet la transcription des gènes cibles (Pagels, *et al.*, 2010).

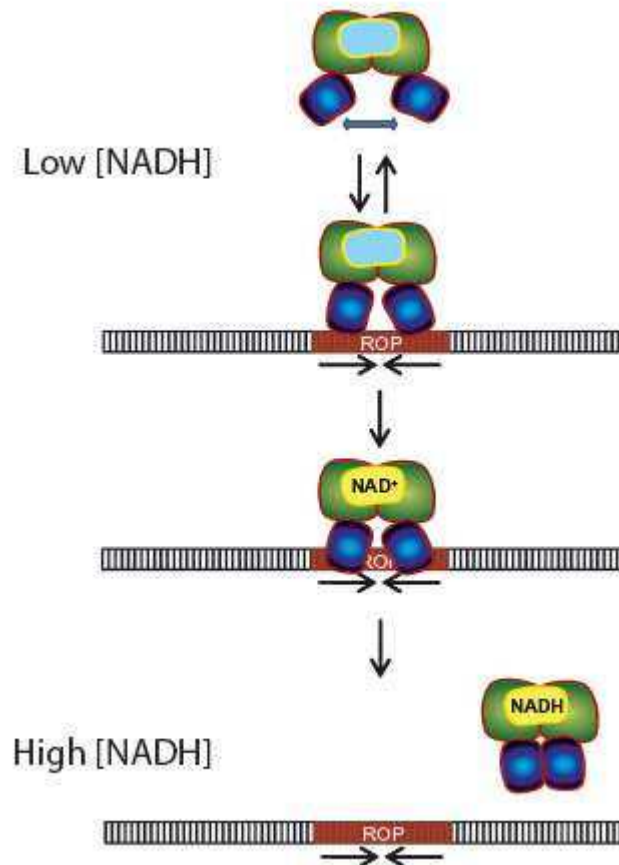


Figure 30 : Représentation schématique de la fixation de Rex à l'ADN, d'après (Wang, *et al.*, 2008).

Pendant la glycolyse, les concentrations de NADH augmentent de manière transitoire dans la cellule. Cette augmentation transitoire s'opère également lors de l'activation du cycle de Krebs. Il a été montré que Rex régule la transcription de gènes dont les protéines permettent de diminuer le taux de NADH intracellulaire, ce qui participe au maintien de la balance redox. Le complexe Rex-NADH se dissocie des sites répresseurs de gènes requis pour (i) la synthèse des composants de la chaîne de transport d'électrons (tel que l'opéron *cydABCD* chez *B. subtilis*), (ii) la régulation du métabolisme de l'azote et du métabolisme fermentaire, (iii) la synthèse d'enzymes fermentaires (tel que l'opéron *ldh-lctP* chez *B. subtilis*) (Pagels *et al.*, 2010, Larsson *et al.*, 2005).

Chez *S. aureus*, Rex est capable de se fixer sur la région promotrice du gène *lukM* qui code une cytotoxine : la leukocidine. Il a également été montré que le complexe Rex-NAD⁺ régule le système à deux composants SrrAB connu pour réguler positivement l'expression des toxines chez *S. aureus* (Pagels, *et al.*, 2010).

B. cereus possède un gène codant une protéine similaire à Rex. Des séquences présentant des homologies avec les boîtes de fixation à la protéine Rex ont été identifiées au niveau des régions promotrices des gènes *resD*, *fnr*, *ldhA* et *nhe*. Rex pourrait jouer un rôle dans la régulation du métabolisme et de la toxinogénèse chez *B. cereus*. Pour le déterminer, nous avons entrepris (i) de construire le mutant *rex* chez les souches de *B. cereus* F4430/73 et ATCC 14579, (ii) de comparer les protéomes des mutants et des souches sauvages en début de phase exponentielle de croissance (phase pendant laquelle la quantité spécifique de toxine Nhe est la plus forte), (iii) d'établir le phénotype de la souche mutante et (iv) de déterminer si Rex régule directement les gènes du métabolisme, de régulateurs et de toxines en se fixant directement sur leurs régions promotrices. La souche F4430/73 n'étant pas séquencée, l'étude protéomique se réalisera uniquement chez la souche séquencée ATCC 14579 (ces deux souches appartiennent au même sous-groupe phylogénétique (Guinebretiere, *et al.*, 2008)).

2. Résultats

Le gène *rex* et son expression chez les souches ATCC 1579 et F4430/73.

Dans un premier temps nous avons cherché à savoir si la séquence de la protéine Rex ainsi que son expression étaient identiques chez les souches F4430/73 et ATCC 14579.

L'étude *in silico* du génome de la souche séquencée ATCC 14579 a permis d'identifier la phase ouverte de lecture *BC0291* comme étant homologue à 90 % au gène *rex* de *B. subtilis* (Larsson, *et al.*, 2005). Nous avons amplifié, cloné et séquencé la séquence d'ADN comprenant la région promotrice et l'ORF *rex* chez la souche non séquencée F4430/73. La séquence d'ADN de 1045 pb ainsi obtenue est différente de 4 bases de celle de l'ATCC 14579. Un changement d'une base est localisé dans le cadre ouvert de lecture et une délétion de 3 bases est observée au niveau de la région promotrice. Le polypeptide Rex de la souche F4430/73 diffère d'un acide aminé avec le polypeptide Rex de la souche ATCC14579 (figure 31). Cette différence se situe en position 170 : une glutamine chez la souche F4430/73 remplace une histidine chez la souche ATCC 14579. Un site d'initiation de la transcription a été identifié par 5' RACE-PCR à 41 paires de base du site d'initiation de la traduction (ATG). En amont du site d'initiation de la transcription nous pouvons identifier une séquence qui pourrait être le site de fixation au facteur σA (TATAC(N17)TAAACT). Le codon stop (TAA) chevauche une séquence inversée répétée pouvant être associée à un terminateur de

transcription (AAAACGCAGAGG(N6)CCTCTGCGTTTT). La présence de ce terminateur de transcription indique que *rex* serait transcrit de manière monocistronique.

ATCC14579	MDQQRIPQATARRLPLYRFIQNL SL SGRQRVSSAELSEAVRVD SATIRRDFS YFGALGKR GYGYNVNYLLSFFRETLDQDDITRVALIGVGNLGTAF LH	100
F4430	MDQQRIPQATARRLPLYRFIQNL SL SGRQRVSSAELSEAVRVD SATIRRDFS YFGALGKR GYGYNVNYLLSFFRETLDQDDITRVALIGVGNLGTAF LH	

ATCC14579	YNFTRNNMTR I EMAFDVSEERVGT E IGGIPVYH L DELEERLSND IQVAILTV PATVAQAVADRLAETS V HGILNFTPARLN V SENI R IHHIDLAVELQTL	200
F4430	YNFTRNNMTR I EMAFDVSEERVGT E IGGIPVYH L DELEERLSND IQVAILTV PATVAQAVADRLAETS V QGILNFTPARLN V SENI R IHHIDLAVELQTL	

ATCC14579	VYFLRNYPQ	
F4430	VYFLRNYPQ	

Figure 31 : Alignement des séquences en acides aminés des protéines Rex chez les souches ATCC 14579 et F4430/73. Le domaine HTH est souligné, le domaine de fixation au NAD⁺/NADH est surligné en gris. La différence d'un acide aminé est indiquée par le symbole deux points.

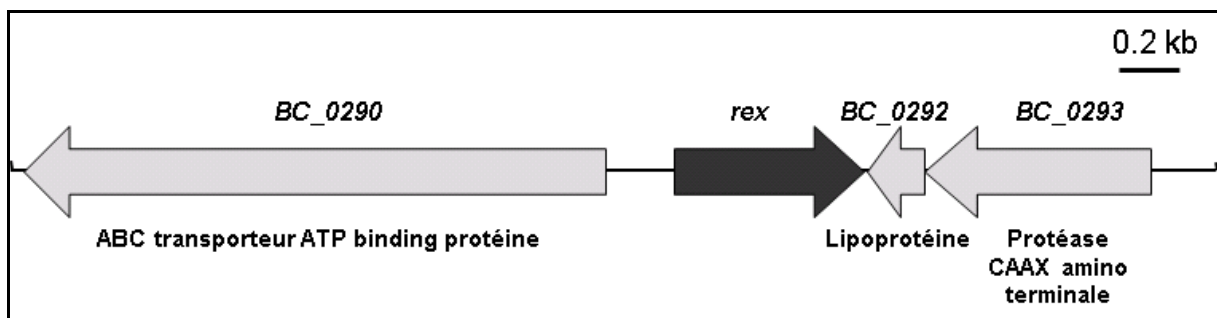


Figure 32 : Environnement génétique du gène *rex* chez la souche ATCC14579.

Des expériences de qRT-PCR ont montré que l'expression de *rex* est significativement supérieure chez des cellules cultivées en aérobiose par rapport à des cellules cultivées en anaérobiose. En anaérobiose, *rex* est plus exprimé chez la souche ATCC 14579 par rapport à la souche F4430/73 (tableau 10).

Taux d'induction ou de répression ^a		
gène	Croissance en anaérobiose	Croissance en aérobiose
<i>rex</i> chez la souche F4430/73	-3,53	-1.64

Tableau 10 : Niveau d'expression du gène *rex* chez la souche F4430/73. Les croissances ont été réalisées en anaérobiose et en aérobiose en bioréacteur dans du milieu MOD contenant 30 mM de glucose.

^a Chaque valeur représente la moyenne de la quantité d'ARNm d'un échantillon de la souche F4430/73 rapportée à la quantité d'ARNm d'un échantillon de la souche ATCC 14579. Chaque valeur représente la moyenne de trois mesures provenant de trois cultures indépendantes. Les échantillons ont été pris en début de phase exponentielle ($\mu = \mu_{\max}$). Seuls les ratios ≤ -2 et $\geq +2$ ont été considérés comme significatifs ($p \leq 0.05$) et sont en gras. Le symbole – indiquent que les gènes sont sous-exprimés.

Paramètres de croissance des mutants ATCC 14579 Δ *rex* et F4430/73 Δ *rex*.

Afin d'évaluer le rôle du gène *rex* dans le métabolisme et dans la toxinogénèse de *B. cereus*, des mutants ne synthétisant plus Rex ont été construits par délétion du gène *rex* et insertion en lieu et place du gène de résistance à la spectinomycine. Les souches ATCC 14579, ATCC 14579 Δ *rex*, F4430/73 et F4430/73 Δ *rex* ont été cultivées en anaérobiose (pO₂=0%) et en aérobiose (pO₂=100%) en bioréacteur dans du milieu MOD contenant une concentration de glucose à 30 mM. Les paramètres de croissance des souches ATCC 14579, ATCC 14579 Δ *rex*, F4430/73 et F4430/73 Δ *rex* sont présentés dans le tableau 11.

En aérobiose, comme en anaérobiose, l'absence de *rex* tend à induire une augmentation du taux de croissance maximal. Cet effet est plus marqué chez la souche F4430/73 et pourrait être la résultante d'un flux glycolytique plus élevé. En anaérobiose, les mutants *rex* sécrètent moins de lactate que les souches sauvages. Le ratio éthanol/acétate des mutants *rex* est plus élevé alors que le NADH recouvré est similaire. Cela indique que chez les mutants *rex*, le flux glycolytique est davantage orienté vers le nœud de l'acétylCoA (tableau 11). En aérobiose les mutants *rex* sécrètent environ 8 fois plus de lactate que les souches sauvages tout en maintenant un haut niveau de sécrétion d'acétate. Ces résultats indiquent qu'en anaérobiose la mutation du gène *rex* affecte la répartition du flux glycolytique

au niveau du pyruvate en favorisant la voie pyruvate-acétylCoA, alors qu'en aérobiose chez les mutants *rex*, le flux glycolytique est majoritairement orienté vers la voie pyruvate-lactate.

Ces résultats montrent que Rex est bien impliqué dans la régulation du métabolisme central chez *B. cereus* en aérobiose et en anaérobiose.

Tableau 11 : Paramètres de croissance et produits du métabolisme des mutants ATCC 14579 Δ *rex* et F4430/73 Δ *rex* et des souches sauvages ATCC 14579 et F4430/73 (WT). Les croissances ont été réalisées en anaérobiose sous flux d'azote (pO₂ = 0%, POR=-10mV) et en aérobie (pO₂ = 100%, POR=+140mV). Les valeurs sont les moyennes de trois échantillons provenant de trois cultures indépendantes. Les rendements des produits finaux ont été calculés en phase stationnaire. Les écarts-types supérieurs à 10% ne sont pas mentionnés. Nz : le rendement est inférieur à 0.01. Nd : non déterminé.

^aLe rendement en ATP a été calculé en moles d'ATP produit par moles de glucose consommé et équivaut à $Y_{lactate} + Y_{éthanol} + 2*_{acétate}$.

^bLe NADH recouvré a été calculé en faisant le rapport du NADH produit sur le NADH consommé (donc NAD⁺ produit) et équivaut à $(lactate + 2*acétate + 2*éthanol - formate)/(lactate + 2*éthanol)$.

	Croissance en anaérobiose				Croissance en aérobie			
	ATCC14579		F4430/73		ATCC14579		F4430/73	
	WT	Δ <i>rex</i>	WT	Δ <i>rex</i>	WT	Δ <i>rex</i>	WT	Δ <i>rex</i>
Taux maximal de croissance (μ_{max}) (h ⁻¹)	0,84 ± 0,04	0,89 ± 0,08	0,86 ± 0,04	0,92 ± 0,02	1,22 ± 0,11	1,31 ± 0,14	1,47 ± 0,01	1,69 ± 0,18
Biomasse finale (g.l ⁻¹)	0,78 ± 0,01	0,83 ± 0,06	0,77 ± 0,01	0,88 ± 0,01	2,38 ± 0,12	2,31 ± 0,12	2,32 ± 0,17	2,15 ± 0,05
Rendement de croissance (g de biomasse. mol of glucose ⁻¹)	26 ± 1	28 ± 1	26 ± 1	29 ± 1	79 ± 1	77 ± 1	77 ± 1	72 ± 1
Taux maximal de consommation spécifique du glucose (mmol.g ⁻¹ .h ⁻¹)	32 ± 2	32 ± 2	33 ± 2	32 ± 2	15 ± 1	17 ± 2	19 ± 2	23 ± 2
Coefficients stœchiométriques (mol.mol glucose ⁻¹)								
Lactate ($Y_{lactate}$)	1,33 ± 0,01	1,25 ± 0,10	1,45 ± 0,01	1,23 ± 0,10	0,05 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Acétate ($Y_{acétate}$)	0,32 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,44 ± 0,01	1,05 ± 0,01	0,69 ± 0,03	1,00 ± 0,01	1,45 ± 0,41
Formiate ($Y_{formiate}$)	0,23 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,73 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	NZ	NZ
Ethanol ($Y_{éthanol}$)	0,13 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,27 ± 0,01	NZ	NZ	NZ	NZ
Succinate ($Y_{succinate}$)	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	NZ	NZ
Ethanol versus Acétate	0,40	0,50	0,48	0,61				
Rendement en ATP ^a	2,10	2,15	2,17	2,38	ND	ND	ND	ND
NADH recouvré ^b	1,2	1,2	1,2	1,1	ND	ND	ND	ND

Impact de la mutation *rex* sur le protéome de la souche ATCC 14579.

Afin d'obtenir une vision plus globale du rôle du régulateur Rex, les études comparatives des protéomes et des exoprotéomes des souches ATCC14579 et ATCC 14579 Δ *rex* ont été entreprises. Pour chaque condition trois mesures provenant de trois cultures indépendantes ont été obtenues. Un total de 1450 protéines intracellulaires et 170 protéines extracellulaires a été identifié (figure 33).

L'analyse du protéome intracellulaire a montré que 140 protéines (ou 9.6 % des protéines identifiées) étaient synthétisées différemment chez le mutant en anaérobiose. Parmi ces 140 protéines, 89 sont synthétisées en quantités plus importantes et 51 sont synthétisées en quantité moins importante. En aérobiose, 127 protéines (ou 8.7 % des protéines identifiées) voient leur abondance varier chez le mutant *rex*. Parmi ces protéines, 82 sont présentes en quantité plus abondantes et 45 sont moins abondantes chez le mutant *rex* par rapport à la souche sauvage. Seules 6 protéines varient similairement en aérobiose et en anaérobiose (3 sont surproduites et 3 sont sous-produites) chez le mutant *rex*.

Au niveau de l'exoprotéome, 41 protéines (ou 24 % des protéines identifiées) voient leur quantité varier en anaérobiose et 65 protéines (ou 38 % des protéines identifiées) voient leur quantité varier en aérobiose chez le mutant *rex* comparativement à la souche sauvage. Chez le mutant *rex*, 17 protéines surproduites le sont à la fois en anaérobiose et en aérobiose. Seuls 5 protéines sont moins abondantes à la fois en aérobiose et en anaérobiose (figure 33).

Les résultats obtenus suggèrent que : (i) L'impact de Rex sur le remodelage de l'exoprotéome est plus important lorsque les cellules sont cultivées en condition d'aérobiose. (ii) Au niveau du protéome intracellulaire, le nombre plus important de protéines surproduites par rapport au nombre de protéines sous produites nous indique que Rex agit préférentiellement comme un répresseur. Et (iii), en début de phase exponentielle, le modulon de Rex diffère très significativement entre la condition aérobie et la condition anaérobie.

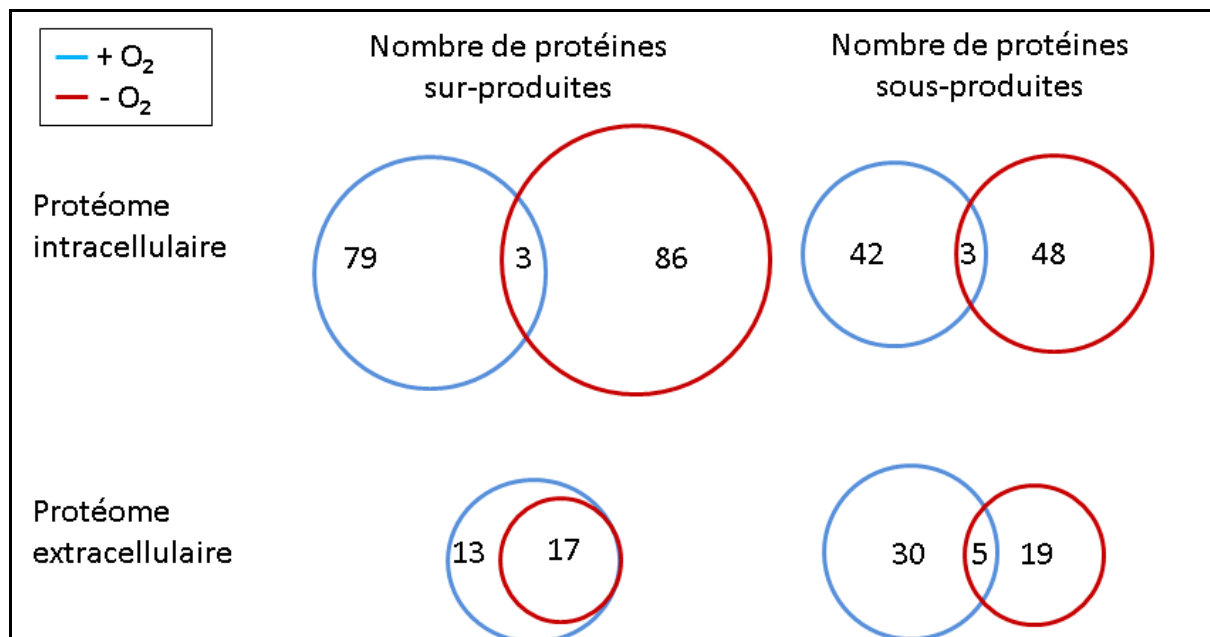


Figure 33 : Impact de la mutation *rex* sur le protéome global chez la souche ATCC 14579.

Globalement, en aérobie comme en anaérobie, *rex* n'influence pas de manière significative l'abondance des protéines participant au catabolisme des glucides (tableaux 14 et 15 en annexe). Néanmoins le changement le plus significatif ($|\log_2| \geq 1$) est observé en anaérobie pour l'enzyme activant la pyruvate formate lyase (PflA) et pour la malate déshydrogénase (Mdh) ($\log_2 = -1$ et $\log_2 = 1.7$ respectivement). PflA est la seule enzyme capable d'activer la pyruvate formate lyase, PflB. L'activation de la PflB se réalise par l'intégration d'un radical glycyle en présence de pyruvate et de S-adenosyl méthionine (Vey, *et al.*, 2008). De part son centre fer-souffre, PflB est connue pour sa grande sensibilité à l'oxygène et aux espèces réactives de l'oxygène (ROS). En anaérobie, PflB catalyse la conversion du pyruvate en acétyl-CoA et en formiate. En absence d'oxygène les résultats obtenus indiquent que PflB comme PflA sont significativement moins abondantes lorsque la protéine Rex est absente (PflB : $\log_2 = -0.3$, p-value=0.053) et PflA : $\log_2 = -1$, p-value= 0.048). La protéine Mdh catalyse de manière NADH-dépendante, la réduction de l'oxaloacétate en malate. En anaérobie cette réaction constitue la première étape de la voie de formation du succinate. En comparaison avec la souche sauvage, nous observons chez le mutant *rex* une diminution de la quantité intracellulaire de la PflA et une augmentation de celle de la Mdh. Ceci ne corrèle pas avec les quantités de formiate et de succinate sécrétées. Ces données supposent que la mutation du gène *rex* a un impact sur l'activité de ces enzymes.

Parmi les protéines qui présentent une surproduction significative en aérobiose, il y a l'aldehyde déshydrogénase (DhsA), la 6-phosphogluconolactonase (Pgl) et la sous-unité B de l'ATP-synthase (\log_2 des variations sont respectivement de 2,5; 1,3 et 1,4. DhsA catalyse la réduction de l'acétaldéhyde en acétate en aérobiose. Cette enzyme pourrait donc contribuer à absorber l'excédent du flux glycolytique arrivant à l'entrée du cycle de Krebs vers la production d'acétate. L'acétate kinase (Ack) permet aussi de réorienter ce flux vers la production d'acétate (Clair, *et al.*, 2012). L'absence de Rex entraîne une augmentation de la quantité de DhsA et une augmentation mais qui est non significative de Ack. Ces données indiquent que la diminution de la production d'acétate observée chez le mutant *rex* ne peut pas s'expliquer par une diminution de la production des enzymes DhsA et Ack. Cette observation suppose également que l'absence de Rex impacte sur l'activité de ces enzymes.

Ces résultats indiquent que Rex contribue au catabolisme du glucose en anaérobiose comme en aérobiose chez *B. cereus*. Cependant en début de phase exponentielle, Rex jouerait davantage un rôle dans la régulation de l'activité que dans le contrôle de l'abondance des enzymes clés du métabolisme. Chez le mutant *rex*, la liste des protéines présentant un changement dans leur production par rapport au sauvage inclut également des protéines appartenant au métabolisme des acides aminés, des nucléotides et des lipides. Il y a également des protéines ayant un rôle dans le repliement d'autres protéines, des protéines de réponse au stress, des protéines associées à la pathogénicité, des protéines d'assemblage de la paroi, des protéines impliquées dans le transport et un certain nombre de protéines de fonctions inconnues. L'absence de la protéine Rex a donc un impact sur des protéines de différentes fonctions.

Nous constatons que les conditions de croissance affectent de manière différentielle des protéines appartenant à une même catégorie de fonction. Par exemple, ceci est particulièrement marqué pour les protéines ayant une fonction dans l'assemblage de la paroi et les protéines associées au transport. Parmi les 11 protéines classées dans la catégorie synthèse de la paroi, 6 présentent une surproduction significative chez le mutant *rex* en anaérobiose tandis que 2 présentent des changements significatifs en aérobiose. Seule une protéine annotée comme étant une prélioprotéine diacylglyceryltransférase (NP_834827.1, Lgt) présente un changement de quantité significatif à la fois en aérobiose et en anaérobiose. Lgt est une protéine requise pour la modification des résidus cystéine au niveau des lipides présents au niveau des prélioprotéines chez les bactéries à Gram positif (Wichgers Schreur,

et al., 2011). Lgt est plus abondante en anaérobiose et moins abondante en aérobiose chez le mutant *rex*.

Nos données indiquent également que les protéines d'origine phagique sont fortement modulées en anaérobiose. En particulier, cinq protéines sont fortement surproduites en anaérobiose ($\log_2 > 1.5$, $p < 0.05$) par rapport à la souche sauvage. Ces protéines ont des fonctions inconnues. Elles pourraient apporter un avantage à *B. cereus* notamment lorsque les conditions environnementales sont défavorables. Il a été montré que les protéines provenant de prophage permettent à *E. coli* de résister aux chocs de pression osmotique, aux stress acide et oxydant. Ces protéines permettent également d'augmenter le taux maximal de croissance et ont une influence sur la formation de biofilm (Wang, *et al.*, 2010). Parmi les protéines de réponse au stress oxydant, il y a la protéine anti-oxydante OhrA qui est significativement surproduite en aérobiose ($\log_2 = 2.029$, $p\text{-value} = 0.015$) mais dont la quantité reste inchangée en anaérobiose chez le mutant. La surproduction de OhrA en aérobiose pourrait entraîner une meilleure résistance au stress oxydant chez le mutant dans cette condition (Clair, *et al.*, 2012).

Au niveau de l'exoprotéome, en anaérobiose, les trois composants de Nhe, EntA, EntC et le composant L1 de Hbl voient leurs quantités augmenter chez le mutant (tableau 15 en annexe). En aérobiose, les trois composants de Nhe, les trois composants de Hbl, CytK, EntA, EntC, HlyII et EntFM, voient leurs quantités augmenter en absence de Rex. Comme les toxines, plusieurs enzymes de dégradation et d'adhérence comprenant Npr2 et HhoA, des composants du flagelle et des protéines appartenant à la paroi voient leur quantité augmenter en aérobiose chez le mutant. Cependant plusieurs protéines du métabolisme, des protéines chaperons, des enzymes ayant un rôle antioxydant, des protéines ribosomales ainsi que des protéines à fonction inconnue prédites comme étant cytoplasmiques sont présentes en plus faible quantité au niveau de l'exoprotéome du mutant *rex* par rapport à la souche sauvage. Ces résultats indiquent que Rex contribue à la biogénèse de l'exoprotéome en diminuant la sécrétion des facteurs de virulence indépendamment de la présence ou de l'absence d'oxygène. L'augmentation de la sécrétion de toxines, des protéines du flagelle, d'enzymes de dégradation et d'adhérence, et la diminution de la quantité des protéines « cytoplasmiques » observée au niveau de l'exoprotéome chez le mutant pourraient être dues à une différence dans l'expression des gènes codant ces protéines. Nous avons donc cherché à savoir si les quantités de transcrits des gènes codant les protéines cytoplasmiques excrétées et des toxines sécrétées étaient différentes (tableau 12). Seuls les gènes *pta* et *fba* qui codent respectivement

une phosphotransacétylase et une fructose bisphosphate aldolase présentent une diminution d'expression en aérobiose qui peut être corrélée à une diminution de quantité des protéines Pta et Fba (les \log_2 des variations sont respectivement de -2,12 et de -3,64 en aérobiose). Pour les autres gènes testés, aucune différence de quantité des transcrits ne peut être corrélée à la quantité de leur protéine respective observée au niveau de l'exoprotéome. Ces résultats suggèrent que Rex module l'exoprotéome en agissant pour certaines protéines sur leur transcription et pour d'autres de manière post-transcriptionnelle.

Taux d'induction ou de répression ^a		
Gènes et fonctions	Croissance en anaérobiose	Croissance en aérobie
Toxines		
<i>nhe</i>	-1.25	-1.80
<i>hbl</i>	-1.83	-1.26
<i>cytK</i>	-1.09	-1.93
<i>entA</i>	-1.07	-1.48
<i>entB</i>	-1.1	+1.62
<i>entC</i>	-1.01	-2.44
<i>entFM</i>	-1.07	-2.80
<i>hlyI</i>	-1.42	-1.80
<i>hlyII</i>	+1.52	+1.57
Gènes du métabolisme		
<i>fba</i>	-1.94	-3.27
<i>eno</i>	-1.52	-2.76
<i>pfk</i>	-1.3	-3.46
<i>pta</i>	-1.43	-3.90

Tableau 12 : Niveau d'expression des gènes de toxines et des gènes du métabolisme chez la souche ATCC 14579 Δ *rex*. Les croissances ont été réalisées en anaérobiose et en aérobie en bioréacteur dans du milieu MOD contenant 30 mM de glucose.

^a Chaque valeur représente la moyenne de la quantité d'ARNm d'un échantillon de la souche ATCC 14579 Δ *rex* rapporté à la quantité d'ARNm d'un échantillon de la souche ATCC 14579. Chaque valeur représente la moyenne de trois mesures provenant de trois cultures indépendantes. Les échantillons ont été pris en début de phase exponentielle ($\mu = \mu_{\max}$). Seuls les ratios ≤ -2 et $\geq +2$ ont été considérés comme significatifs ($p \leq 0.05$) et sont indiqués en gras. Les signes + et - indiquent que les gènes sont surexprimés (+) ou sous-exprimés (-).

Test de résistance au stress oxydant des souches ATCC 14579, ATCC 14579 Δ rex, F4430/73 et F4430/73 Δ rex.

L'étude protéomique nous a permis de mettre en évidence une augmentation de la production en aérobiose de la protéine OhrA connue pour être impliquée dans la résistance au stress oxydant chez *B. cereus* (Clair *et al.*, 2012). Nous avons donc testé la résistance des mutants ATCC 14579, ATCC 14579 Δ rex, F4430/73 et F4430/73 Δ rex vis-à-vis d'un stress oxydant provoqué par le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Les cellules présent en phase exponentielle de croissance ont été traitées pendant 20 minutes avec 20 mM de H₂O₂ en aérobiose et avec 10 mM de H₂O₂ en anaérobiose.

La figure 34 montre qu'en aérobiose la mortalité cellulaire est plus importante chez les souches sauvages. En anaérobiose nous observons l'effet inverse, les mutants *rex* présentent une mortalité cellulaire plus forte par rapport aux souches sauvages. Enfin en anaérobiose nous observons que la mortalité de la souche ATCC 14579 est beaucoup plus forte par rapport à la souche F4430/73. Ces données indiquent que chez *B. cereus*, la protéine Rex restreint les défenses antioxydantes en aérobiose et permet en anaérobiose une meilleure réponse des cellules vis-à-vis d'un stress oxydant. Rex peut donc être considéré comme un facteur important de la réponse au stress oxydant.

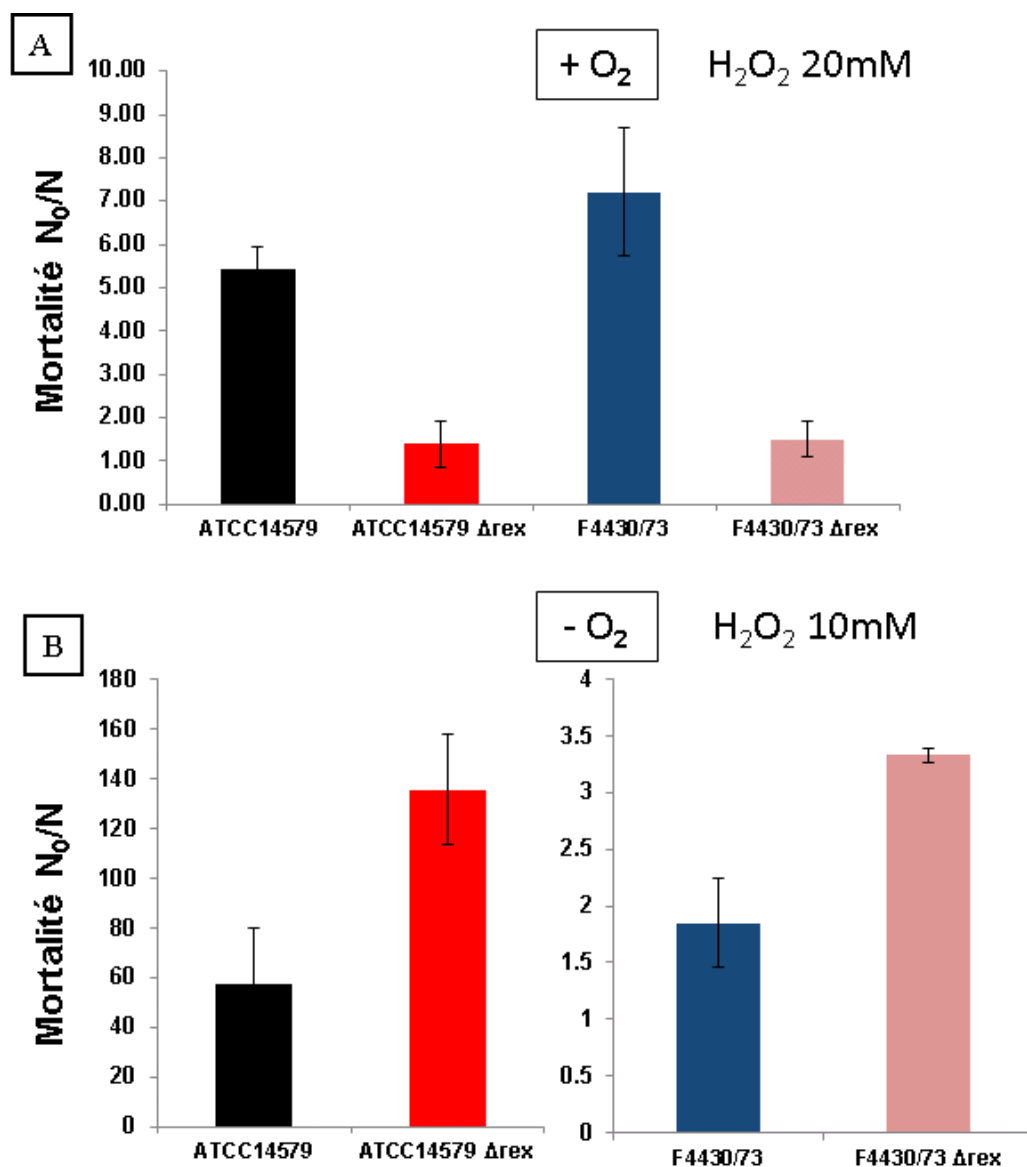


Figure 34 : Rôle du gène *rex* dans la survie des souches de *B. cereus* ATCC 14579 et F4430/73 en présence de peroxyde d'hydrogène. Les moyennes et les écarts types ont été obtenus à partir d'au moins 3 expériences indépendantes. N₀ et N représentent respectivement le nombre de bactéries avant traitement et le nombre de bactéries 20 minutes après le traitement.

Test de complémentation des mutants ATCC14579Δ*rex* et F4430/73Δ*rex*.

L'unité d'expression *rex* de chaque souche a été clonée dans le plasmide pHT304 puis la construction a été introduite chez les mutants ATCC14579Δ*rex* et F4430/73Δ*rex*. La restauration du phénotype sauvage chez les mutants *rex* n'a pas pu être obtenue lors des tests de résistance au stress oxydant. Dans une cellule bactérienne, le pHT304 est un plasmide

présent en plusieurs copies (Arantes & Lereclus, 1991). La non restauration du phénotype sauvage suggère qu'un contrôle régulé de l'expression du gène *rex* est nécessaire pour compléter le phénotype sauvage lors d'un stress oxydant.

Analyse fonctionnelle des protéines Rex des souches ATCC14579 et F4430/73.

Afin de vérifier si Rex présente chez *B. cereus* les mêmes caractéristiques régulatrices que ses homologues chez *B. subtilis* et *S. aureus* nous avons : (i) étiqueté les protéines Rex des souches ATCC14579 (appelée Rex-ATCC) et F4430/73 (appelée Rex-F4430) en ajoutant à leur extrémité C-terminale une queue poly-histidine. (ii) Puis, nous avons surproduit et purifié ces protéines (voir figure 42 et figure 43 en annexe). (iii) Nous avons vérifié que la protéine Rex n'a pas été purifiée sous sa forme complexée au NADH en réalisant un spectre d'absorption entre les longueurs d'ondes 250 nm et 450 nm et en vérifiant qu'il n'y a pas de pic d'absorbance à 340 nm caractéristique du NADH (figure 44 en annexe) (iv) Enfin nous avons réalisé des expériences de retard sur gel en utilisant les régions promotrices du gène *rex* et du gène *ldhA*. La séquence du gène de la sous-unité ribosomale 16S (*ssu*) a été prise comme témoin négatif.

Les résultats présentés sur la figure 35 montrent que les protéines Rex-ATCC et Rex-F4430 permettent d'obtenir un retard de la migration du fragment *ldhA* dès 0,08 μ M. Elles semblent donc avoir la même affinité pour cette région promotrice, ce qui est compatible avec le fait qu'elles présentent une parfaite identité de séquence en acides aminés au niveau de leur séquence supposé de fixation à l'ADN (figure 35). Aucun retard de migration n'est observé avec les séquences de la région promotrice de *ssu* et du gène *plcR*. Dans un deuxième temps, nous avons voulu tester si les co-facteurs NAD^+ et NADH interviennent dans la fixation de Rex sur les régions promotrices comme cela est le cas chez d'autres espèces bactériennes. Des expériences de retard sur gel avec la région promotrice *ldhA* et la protéine Rex en présence et en absence de NADH et de NAD^+ ont été réalisées (figure 35 B). La présence de NADH diminue la capacité de liaison de Rex à l'ADN tandis que la présence de NAD^+ tend à augmenter la capacité de liaison à l'ADN. Ceci montre que concernant la fixation sur la région promotrice du gène *ldhA* les protéines Rex-ATCC et Rex-F4430 fonctionnent comme leurs orthologues chez *B. subtilis* et *S. aureus* (Wang, *et al.*, 2008, Pagels, *et al.*, 2010).

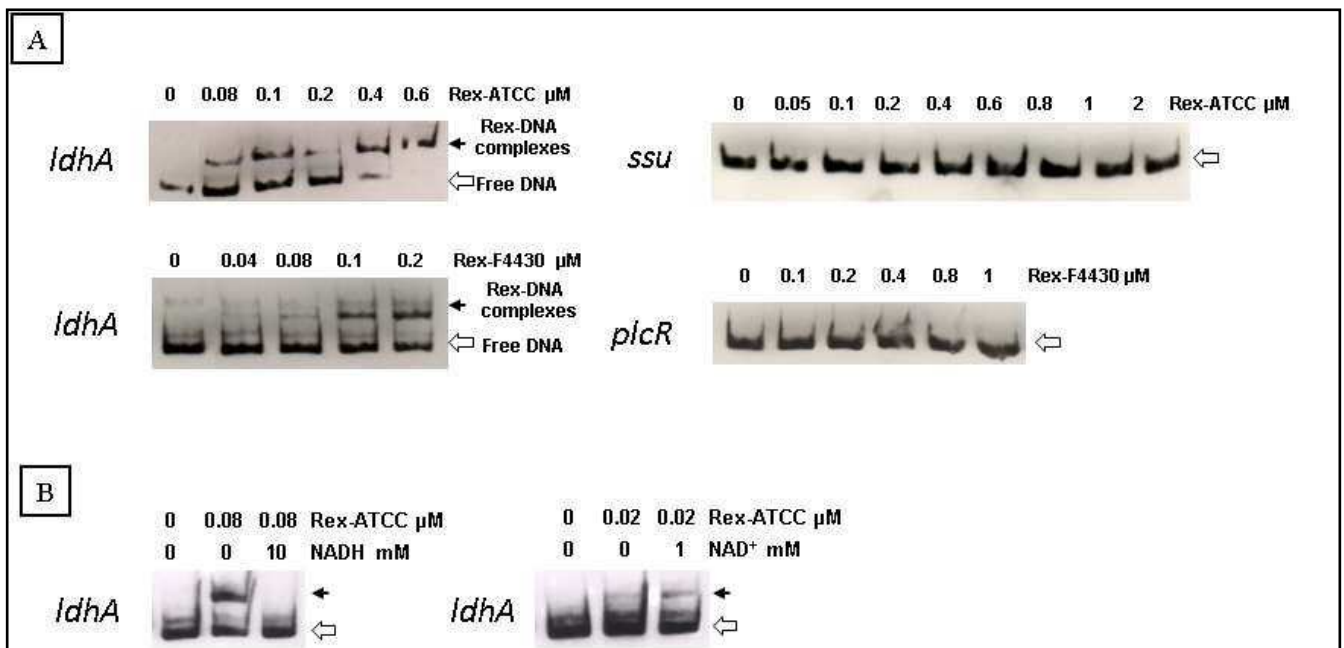


Figure 35 : Expériences de retard sur gel avec les protéines Rex-ATCC et Rex-F4430 en présence des régions promotrices du gène *ldhA* avec et sans NAD⁺/NADH, du gène *ssu* et du gène *plcR*.

En nous basant sur la séquence consensus de fixation à Rex déterminée chez d'autres espèces bactériennes (5'-TTGTGAA(N4)TTCACAA-3' (Ravcheev, *et al.*, 2012)), nous avons pu mettre en évidence des zones de fixation possible à Rex au niveau des régions promotrices des gènes *ldhA*, *resDE*, *fnr* et *ohrRA* ainsi que celles des gènes des entérotoxines *nhe*, *hbl*, *entFM* et *hlyI* (figure 36).

Boîtes Rex putatives		
Séquence consensus		TTGTGAA-N4-TTCACAA
Gènes	<i>nhe</i>	<u>TTGTGAT</u>-N10-<u>TTCAATCAA</u>
	<i>hbl</i>	<u>TTGTGAA</u>-N3-<u>ATCAACAA</u>
	<i>entFM</i>	<u>TTGTGAA</u>-N8-<u>TT.ACAA</u>
	<i>hlyI</i>	<u>TTGTAGG</u>-N18-<u>TTAATCAA</u>
	<i>ldhA</i>	<u>TTGTTCA</u>-N4-<u>TTCACAA</u>
	<i>resDE</i>	<u>TTGAGAA</u>-N4-<u>ATGAACA</u>
	<i>fnr</i>	<u>TTCAAAA</u>-N4-<u>TTCACAA</u>
	<i>ohrRA</i>	<u>TTGTGCA</u>-N11-<u>TT.AGAA</u>

Figure 36 : Boîtes de fixation putatives à Rex situées dans la région promotrice de gènes de toxine, du gène *ldhA* et de gènes de régulateurs.

Des expériences de retard sur gel ont confirmé que la protéine Rex est capable de se fixer sur ces régions promotrices. La figure 37 montre qu'un retard complet est obtenu avec le fragment *hbl* dont la séquence de fixation à Rex contient deux nucléotides de différence par rapport à la séquence consensus. Un retard de migration partiel est obtenu avec les séquences appartenant aux régions promotrices de *fnr*, *resDE*, *ohrRA*, *nhe*, *entFM* et *hlyI*. Aucun retard de migration n'est observé avec les régions promotrices de *plcR* et celles des gènes de toxines *entA*, *entB*, *entC* et *cytK*. De plus, nous constatons qu'en présence de 10 mM de NADH, le complexe Rex-ADN n'est plus visible pour les régions promotrices des gènes *fnr* et *resD* (figure 38). Une diminution de la quantité d'ADN retardé est obtenue pour les régions promotrices des gènes *hbl*, *nhe* et *ohrRA* (figure 38). En présence de NAD⁺, nous observons une légère augmentation de la quantité d'ADN retardé pour les régions promotrices des gènes *resD* et *ohrRA* (figure 38). En présence de NAD⁺ ou de NADH, la protéine Rex de *B. cereus* fonctionne comme ces homologues chez *B. subtilis* et chez *S. aureus*. Ces résultats montrent pour la première fois la fixation de Rex sur des régions promotrices de gènes de toxines ainsi que sa fixation sur des régulateurs de toxines chez *B. cereus*.

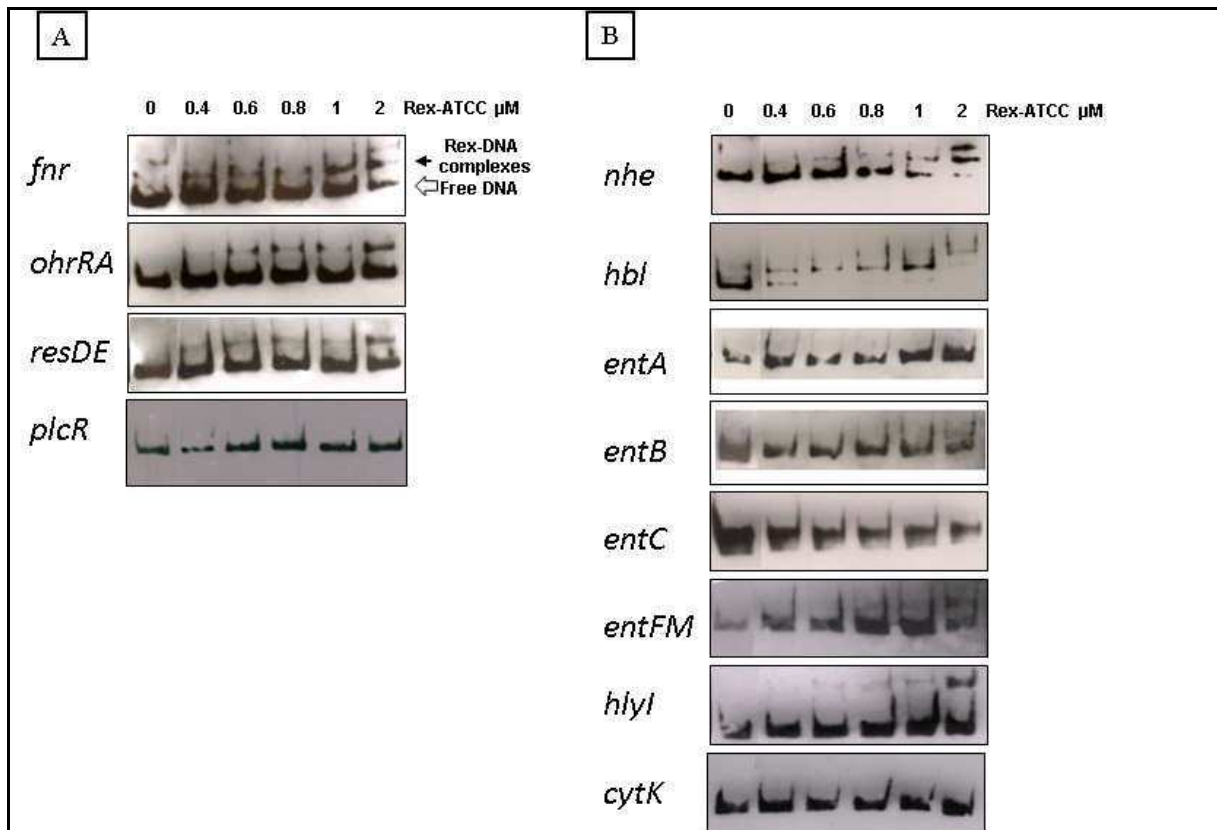


Figure 37 : Expérience de retard sur gel en présence de la protéine Rex-ATCC et de (A) régions promotrices de gènes de régulateurs et en présence (B) de régions promotrices de gènes de toxines.

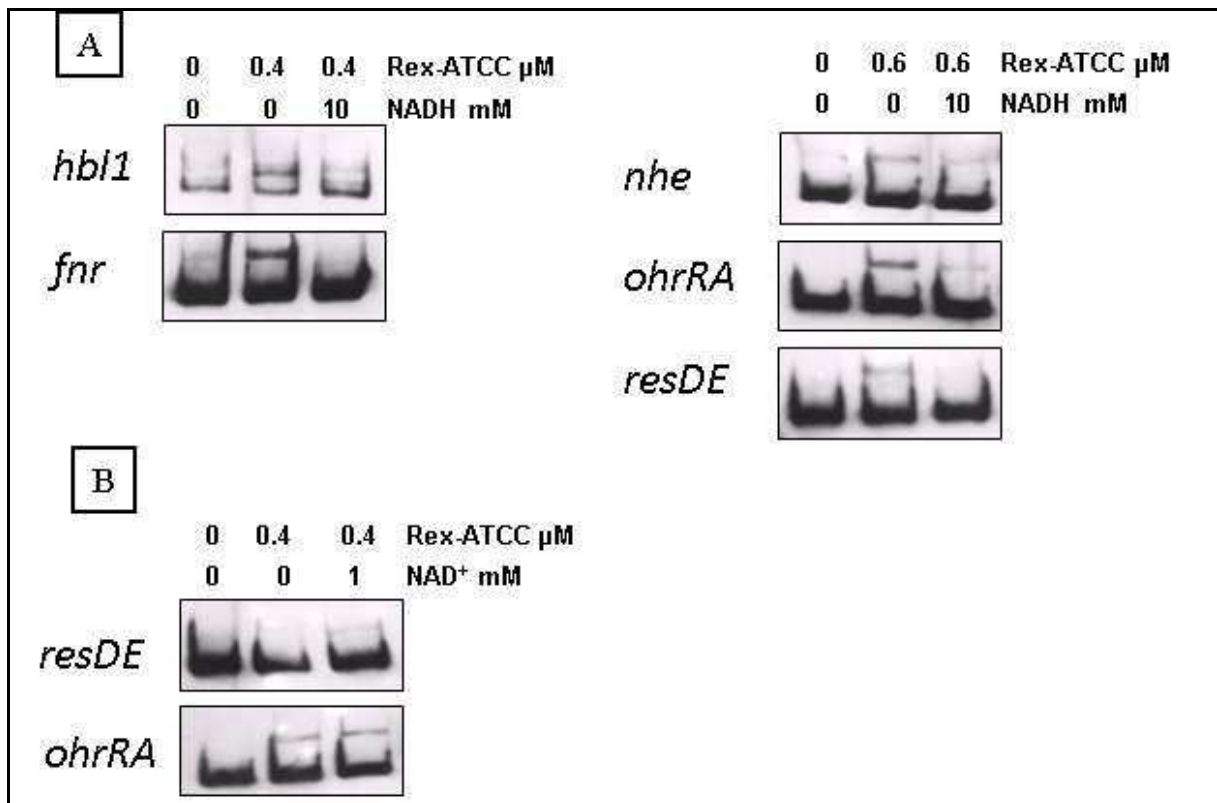


Figure 38 : (A) Expériences de retard sur gel avec la protéine Rex-ATCC en présence de NADH et de régions promotrices de gènes de toxines et de gènes de régulateurs. (B) expériences de retard sur gel avec la protéine Rex-ATCC en présence de NAD⁺ et de régions promotrices de gènes de régulateurs.

3. Discussion

La caractérisation des mutants *rex* chez les souches de *B. cereus* ATCC 14579 et F4430/73, l'étude protéomique chez la souche ATCC 14579 et l'étude fonctionnelle des protéines Rex-ATCC et Rex-F4430, nous ont permis de mettre en évidence le rôle de Rex dans le métabolisme, dans la modulation de l'exoprotéome, dans la toxino-génèse ainsi que son rôle dans la réponse au stress oxydant. Dans cette étude, nous avons montré que Rex est exprimé en anaérobiose et en aérobiose chez les souches ATCC 14579 et F4430/73. Rex est significativement plus exprimé chez les cellules cultivées en aérobiose. Cela suggère un rôle plus important de cette protéine dans cette condition. Cette hypothèse est corroborée par le plus grand impact de Rex sur le protéome sur le protéome intracellulaire et extracellulaire en aérobiose.

Les résultats présentés dans cette étude indiquent que Rex est impliqué dans la régulation du métabolisme central en aérobiose et en anaérobiose. L'étude des paramètres de croissance en anaérobiose et en aérobiose indique que Rex n'est pas indispensable au développement de *B. cereus*. L'absence de *rex* tend à entraîner à la fois en aérobiose et en anaérobiose une augmentation du taux de croissance maximal du fait d'un flux glycolytique plus élevé. Ces résultats suggèrent que *B. cereus* est capable de restreindre ses capacités de croissance. De récents travaux réalisés au laboratoire ont également montré que *B. cereus* est capable de restreindre ces capacités de croissance via le régulateur OhrR (Clair, *et al.*, 2012). Cependant comme pour le mutant *ohrR*, nous observons que la délétion du gène *rex* impacte sur des fonctions importantes pour la virulence telle que la résistance au stress oxydant. En anaérobiose et en présence de peroxyde d'hydrogène, l'absence de Rex entraîne une augmentation de la mortalité. Hors la résistance au stress oxydant est une fonction importante de la virulence et permet aux bactéries d'échapper au système immunitaire (Trivedi, *et al.*, 2012).

Grâce à l'étude protéomique, nous avons pu mettre en évidence le rôle pléiotrope du régulateur Rex. La mutation *rex* impacte sur différentes catégories de protéines dont notamment des protéines du métabolisme des acides aminés, des nucléotides et des lipides, des protéines chaperons, des protéines de réponse au stress, des protéines de synthèse de la paroi, des protéines impliquées dans le transport et des protéines associées à la pathogénicité. De manière intéressante le modulon Rex est très majoritairement différent entre la condition aérobiose et la condition anaérobiose. Cependant l'effet direct de la mutation *rex* sur le protéome est difficile à déterminer étant donné que cette mutation entraîne des différences de quantités d'autres régulateurs et que Rex est capable de se fixer aux régions promotrices de *resD*, *fnr* et *ohrR*. La détermination de la séquence consensus à Rex chez *B. cereus* grâce à la technique d'empreinte à la DNase, nous permettra de rechercher dans le génome les gènes pouvant être régulés directement par Rex.

La protéine OhrA est connue pour être impliquée dans la résistance au stress oxydant chez *B. cereus* (Clair *et al.*, 2012). L'augmentation de la quantité de OhrA en aérobiose chez le mutant *rex*, peut être corrélée à une plus faible mortalité des mutants *rex* lorsqu'ils sont soumis à un stress oxydant en aérobiose. De plus nous avons montré que Rex se fixe sur la région promotrice de *ohrRA*. Cela suggère que l'augmentation de la quantité de OhrA en aérobiose est une conséquence directe de l'absence de Rex. Concernant la forte mortalité des

mutants en anaérobiose, la réponse n'est pas claire. Richardson et collaborateurs ont montré que chez *S. aureus*, en anaérobiose comme en aérobiose, la production de lactate permet à cette bactérie lorsqu'elle est soumise à un stress oxydant de maintenir son équilibre rédox et de résister au stress oxydant (Richardson, *et al.*, 2008). La plus faible quantité de lactate produit chez le mutant *rex* pourrait être à l'origine de sa plus faible résistance au stress oxydant. De manière intéressante la mutation *rex* entraîne une augmentation de la sécrétion des facteurs de virulence ou associés à la virulence et une diminution de la sécrétion de protéines « cytoplasmiques ». Pour les protéines testées (hormis pour Pta et Fba), ces différences de sécrétion ne sont pas corrélées à une différence de quantité des transcrits. Ceci suggère que Rex module l'exoprotéome de manière post-transcriptionnelle, soit via un impact sur la mise en place des systèmes de sécrétion au niveau de la membrane plasmique, soit via un impact de Rex sur la mise en conformation des protéines. Ces deux hypothèses sont probables étant donné que nous observons des variations de quantité des protéines impliquées dans la biosynthèse de l'enveloppe et des variations de quantité de protéines chaperons et de protéines participant au système de traduction chez le mutant *rex* en aérobiose et en anaérobiose.

Bien que Rex n'impacte pas directement sur la transcription des gènes de toxine en début de phase exponentielle, les études de retard sur gel montrent que Rex est capable de se fixer aux régions promotrices de gènes de toxines, et de gène de régulateurs de toxines et du gène *ldhA*. L'ajout de NAD^+ favorise la fixation de Rex aux régions promotrices des gènes *resD* et *ohrRA*, tandis que l'ajout de NADH diminue, voire inhibe la fixation de Rex à l'ADN des régions promotrices des gènes *hbl*, *fnr*, *nhe*, *ohrRA* et *resD*. Ces résultats supposent que le taux de NADH/NAD^+ intracellulaire aura une importance sur l'expression des gènes régulés par Rex chez *B. cereus*. Cela suppose qu'en début de phase exponentielle, Rex peut intervenir dans la régulation des toxines lorsque l'équilibre rédox n'est pas maintenu.

Chapitre V : Rôle de LdhA dans la régulation des toxines.

1. Introduction à l'étude

Chez des espèces eucaryotes, il a été montré que LdhA possède une double fonction. En plus d'être une enzyme du métabolisme fermentaire, celle-ci est capable de se lier à de l'ADN simple brin de la même manière que les protéines SSB (single strand binding). Grosse et collaborateurs ont montré que la fixation de LdhA à l'ADN stimule la formation du complexe ADN polymérase α -primase lors de la réplication (Grosse, *et al.*, 1986). Les mêmes auteurs montrent qu'une autre enzyme du métabolisme : la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase présente également les mêmes propriétés de fixation à l'ADN. Les auteurs mettent en évidence une affinité plus grande de ces protéines vis-à-vis de l'ADN simple brin par rapport à l'ADN double brin. Plusieurs autres études relatent la fixation de LdhA à l'ADN (Cattaneo, *et al.*, 1985, Williams, *et al.*, 1985, Dai, *et al.*, 2008). Aujourd'hui, le concept : une protéine, plusieurs fonctions, semble être un paradigme en pleine expansion. Ces protéines possédant plus d'une fonction connue, sont appelées en terme anglo-saxon « moonlighting proteins » (Jeffery, 1999, Jeffery, 2003). Une étude récente rapporte le caractère « moonlighting » de LdhA. Cette enzyme connue pour être une enzyme du métabolisme et également capable de se complexer avec d'autres protéines et de réguler ainsi la transcription de gènes (He, *et al.*, 2012).

Chez *B. cereus*, LdhA est importante pour la croissance fermentaire et la mutation du gène *ldhA* entraîne une diminution de la quantité des transcrits de toxines. Les protéines LdhA sont à 100% identiques entre les souches ATCC14579 et F4430/73. Dans la mesure où il a été montré que LdhA est capable de se fixer à l'ADN chez d'autres espèces, nous testerons dans cette troisième partie l'hypothèse d'un effet direct de LdhA sur la variation de l'expression de toxines. Nous avons donc cloné *ldhA* dans le vecteur d'expression pET100, exprimé cette protéine chez *E.coli* BL21 et purifié cette protéine sur colonne d'affinité. Nous avons ensuite réalisé des expériences de retard sur gel entre LdhA et les régions promotrices des gènes *nhe* et *cytK*. Ces deux gènes présentaient les variations en quantité de transcrits les plus fortes chez le mutant F4430/73 Δ *ldhA*.

2. Résultats

Purification de la protéine LdhA étiquetée en position C-terminale

La purification de LdhA via un système *in vitro* telle que présenté dans l'article Laouami *et al.*, 2011, ne nous permet pas d'obtenir des concentrations en protéine suffisantes pour réaliser des expériences de retard sur gel. Nous décidons donc d'opter pour une purification de LdhA via l'expression hétérologue de ce gène chez la souche BL21. Le protocole de purification est décrit dans le chapitre « Matériel et Méthodes ».

Après purification, l'électrophorèse révèle la présence d'une bande d'environ 37 kDa. Cela correspond à notre protéine dont la taille théorique est de 34,7 kDa avec sa queue poly-histidine (environ 3kDa) (figure 39).

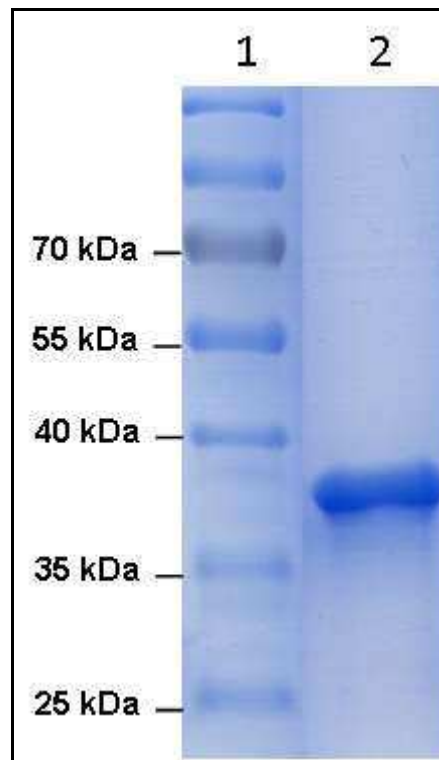


Figure 39 : Analyse par gel SDS-PAGE 12% de la purification de LdhA. Piste 1 : Marqueur de poids moléculaire, piste 2 : Elution.

Vérification de la fonctionnalité de LdhA

Afin de vérifier la bonne conformité de LdhA nous avons mesuré son activité en utilisant le pyruvate comme substrat et le NADH comme co-substrat (figure 40). L'activité spécifique de LdhA est de 2.44U/ μ g ce qui est très inférieure à l'activité spécifique de LdhA produite via un système d'expression *in vitro* qui possédait quant à elle, une activité spécifique de 40000U/ μ g. Ces résultats suggèrent que LdhA a été purifiée avec une mauvaise mise en conformation, ce qui pourrait expliquer l'activité réduite observée chez cette protéine.

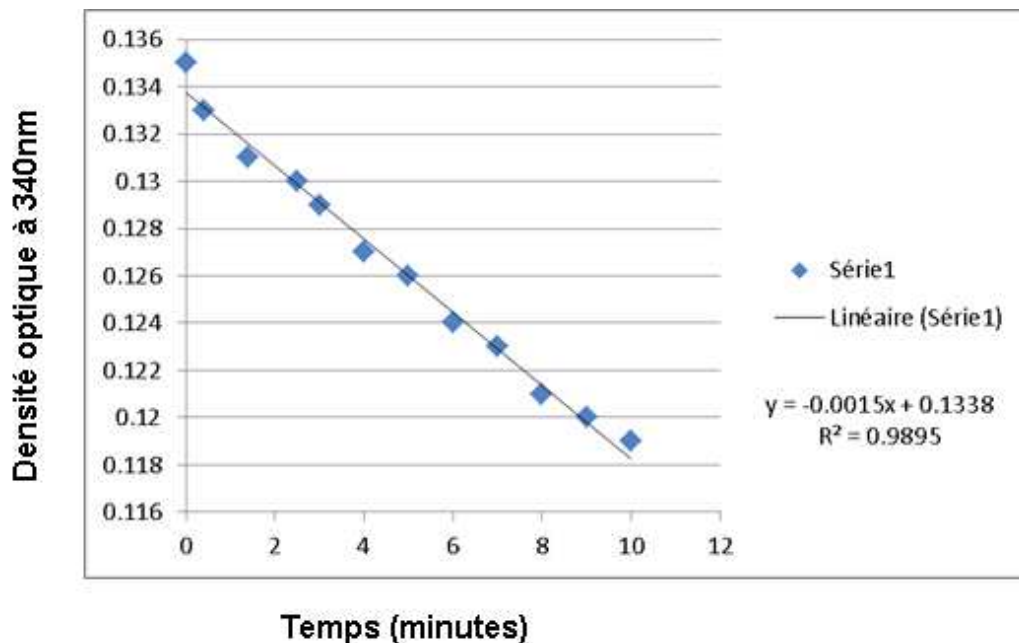


Figure 40 : Mesure de la densité optique en fonction du temps du mélange réactionnel : LdhA, pyruvate et NADH.

Expérience de retard sur gel.

Afin de déterminer si LdhA est capable de se fixer sur l'ADN, des expériences de retard sur gel ont été réalisées en présence de LdhA et des régions promotrices de *nhe* et *cytK*. Ces deux gènes voient leurs expressions fortement diminuer chez le mutant F4430/73 Δ *ldhA*. Dans la mesure où les expériences de retard sur gel ont été mise au point avec de l'ADN double brin, nous décidons de tester dans un premier temps la fixation de LdhA sur de l'ADN double brin.

Aucun retard de migration n'est visible pour les deux régions promotrices et ce même avec de très fortes concentrations de protéines (figure 41).

Des expériences de retard sur gel avec ajout du cofacteur NADH et/ou avec de l'ADN simple brin sont à prévoir afin de valider ou d'infirmer l'absence de fixation de LdhA à l'ADN.

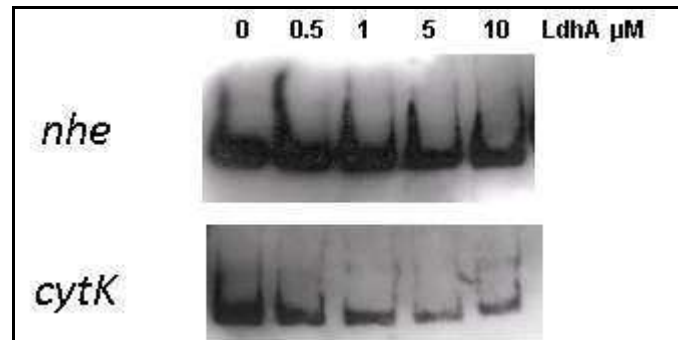


Figure 41 : Expériences de retard sur gel en présence de la protéine LdhA et des régions promotrices des gènes *nhe* et *cytK*.

3. Conclusion

Les résultats présentés dans cette étude sont encore préliminaires. La purification de LdhA via un système d'expression hétérologue chez *E. coli* a été réussie cependant l'activité de LdhA ainsi purifiée est très inférieure à l'activité de LdhA obtenue via un système d'expression *in vitro*. Ceci peut être dû à une mauvaise mise en conformation de LdhA ou au fait que LdhA a peut-être été purifiée avec des contaminants non visibles sur le gel. Une mise au point de la purification de LdhA est nécessaire avant de tester son interaction avec les régions promotrices d'entérotoxines. Cette mise au point fera intervenir des protéines chaperons telles que GroES et GroEL comme cela a été fait lors de la purification de LdhA via un système d'expression *in vitro*.

Conclusion générale et perspectives

Chapitre VI : Conclusion générale et perspectives

Bacillus cereus est capable de coloniser et de s'adapter à différents biotopes. Parmi les biotopes rencontrés il y a le tractus digestif et en particulier l'intestin où certaines souches de *B. cereus*, suite à la production d'entérotoxines et de facteurs de pathogénicité, sont à l'origine de toxi-infections alimentaires (Stenfors Arnesen, *et al.*, 2008).

La pathogénicité de *B. cereus* est régie par de nombreux régulateurs répondant à différents signaux de l'environnement (Ceuppens, *et al.*, 2011). Les raisons pour lesquelles certaines souches de *B. cereus* peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires tandis que d'autres sont inoffensives restent inconnues.

Ce travail de thèse est une contribution à la compréhension des mécanismes qui régissent la pathogénicité de *B. cereus*.

Des travaux menés précédemment au laboratoire ont montré que la production des toxines Nhe et Hbl est liée au métabolisme cellulaire (Ouhib, *et al.*, 2006, Zigha, *et al.*, 2006). Au début de mon étude, seul le système à deux composants ResDE, la protéine Fnr, et la protéine CcpA étaient connus pour moduler à la fois l'expression de la plupart des enzymes du métabolisme et certains gènes de pathogénicité.

1. LdhA, une enzyme importante pour le métabolisme et la toxinogénèse de *B. cereus*.

Dans le but d'identifier le ou les éléments clés qui pourraient permettre d'identifier les souches pathogènes, nous avons comparé les capacités de croissance et de production de la toxine Nhe de quatre souches de *B. cereus*. Dans des conditions mimant celles rencontrées dans l'intestin, la souche diarrhéique F4430/73 présente la meilleure capacité de croissance en condition fermentaire et la meilleure capacité de production de l'entérotoxine Nhe par rapport aux souches F4810/72, F837/76 et PA. Les résultats ont montré que la quantité des transcrits des régulateurs connus des toxines ne pouvait pas constituer un marqueur de pathogénicité. De manière intéressante les quantités de transcrit du gène *ldhA* et du gène *nhe* sont corrélées de façon significative. Les travaux ont mis à jour le rôle de l'enzyme fermentaire LdhA dans le métabolisme et la toxinogénèse de *B. cereus*. La souche mutante F4430/73 Δ *ldhA* voit sa capacité de croissance réduite en condition fermentaire et voit l'expression des gènes codant

les toxines diminuée en aérobiose et en anaérobiose par rapport à la souche sauvage. Ces effets ne sont pas observés chez les mutants des deux autres gènes codant des L-lactate déshydrogénases (*ldhB* et *ldhC*). Cela indique que LdhA contrairement à LdhB et LdhC joue un rôle majeur dans le métabolisme et la toxinogénèse de *B. cereus*. LdhA semble ainsi posséder plusieurs fonctions chez *B. cereus*. La multiplicité des fonctions des lactate déshydrogénases est connue chez des espèces eucaryotes où il a été montré que LdhA peut se fixer à l'ADN seule (Williams, *et al.*, 1985) ou en complexe avec d'autres protéines et participe à la transcription de gènes (He, *et al.*, 2012). Nos résultats présentent pour la première fois l'importance d'une enzyme du métabolisme dans la virulence de *B. cereus*. L'importance dans la virulence d'enzyme du métabolisme chez d'autres espèces bactériennes a également été observée. Chez *S. aureus*, il a été montré que LdhA est impliquée dans la virulence et dans la résistance au stress oxydant (Richardson, *et al.*, 2008). Chez *Streptococcus pneumoniae*, l'enzyme Pfl est importante pour la virulence (Yesilkaya, *et al.*, 2009). Cependant aucune étude n'a encore disséqué le mécanisme par lequel ces enzymes interviennent dans la virulence de ces espèces bactériennes.

2. Comment LdhA intervient-elle sur l'expression des gènes de toxines ?

Pour expliquer la diminution de la quantité des transcrits de toxines observée chez le mutant *ldhA*, nous avons émis les hypothèses suivantes : (i) Soit l'effet de la mutation *ldhA* sur l'expression des gènes de toxines est un effet indirect via un déséquilibre rédox transitoire. Ce déséquilibre serait détecté par le régulateur rédox Rex. (ii) Soit l'effet de la mutation *ldhA* sur l'expression des gènes de toxines est dû à un effet direct. LdhA se fixerait sur les régions promotrices seule comme cela a été montré chez des espèces eucaryotes (Cattaneo, *et al.*, 1985, Williams, *et al.*, 1985, Grosse, *et al.*, 1986) ou en complexe avec d'autres protéines (He, *et al.*, 2012).

Pour répondre à la première hypothèse nous avons entrepris de construire des mutants *rex* chez la souche séquencée ATCC14579 et chez la souche F4430/73. La caractérisation des mutants *rex* a mis en évidence le fait que Rex n'intervient pas dans la régulation transcriptionnelle des toxines en début de phase exponentielle. L'hypothèse d'un effet indirect de la mutation *ldhA* via Rex est donc à exclure. Chez *B. cereus*, nous avons montré qu'en présence de NADH, Rex voit son affinité diminuée pour l'ADN. En absence de LdhA, la

balance rédox est transitoirement déséquilibrée dans le sens du NADH. Cela suggère que Rex ne se fixerait plus à l'ADN. Il ne peut donc pas être responsable de la diminution de la quantité d'expression des gènes de toxines observée chez le mutant *ldhA*. Bien entendu, cette supposition est vraie uniquement si Rex a un rôle de répresseur chez *B. cereus*. Hors, nous n'avons pas pu statuer sur le rôle répresseur ou activateur de Rex sur l'expression des toxines. La mesure de la quantité des transcrits des gènes de toxines et des gènes de régulateurs des toxines à différents moments de la croissance est nécessaire pour pouvoir déterminer le rôle de Rex.

Concernant l'hypothèse d'un effet direct de LdhA sur l'expression des gènes de toxines, les expériences de retard sur gel avec LdhA et les régions promotrices des gènes *nhe* et *cytK* n'ont pas montré de retard de migration. Cependant LdhA purifiée via un système d'expression hétérologue chez *E. coli* présentait une faible activité spécifique ce qui suggère que LdhA a été purifiée sous une mauvaise conformation. Une mise au point de la purification de LdhA est nécessaire avant de tester sa fixation à l'ADN. L'ajout des protéines chaperons GroES et GroEL, comme cela a été fait lors de la purification de LdhA *in vitro*, semble nécessaire à la bonne mise en conformation de la protéine. Etant donné que chez des espèces eucaryotes il a été montré que LdhA était capable de se fixer à de l'ADN simple brin (Williams, *et al.*, 1985), des expériences de retard sur gel avec de l'ADN simple brin et/ou en présence du co-facteur NADH sont à prévoir. La formation ou non de complexes protéiques entre LdhA et d'autres protéines est également à vérifier notamment par Far-Western avec les protéines déjà purifiées au laboratoire (Rex, Fnr, ResD et PlcR). La formation de complexe de LdhA avec d'autre partenaire protéique pourra également être vérifiée grâce à la technique de Tap-Tag.

Une troisième hypothèse peut expliquer l'effet de la mutation *ldhA* sur l'expression des gènes de toxines. Il a été montré qu'un déséquilibre de la balance rédox générerait un stress oxydant (Mols & Abee, 2011). Un déséquilibre transitoire de la balance $NAD^+/NADH$ pourrait donc générer un stress oxydant qui impacterait sur l'expression des gènes de toxines. Des travaux préliminaires au laboratoire indiquent que la mutation *ldhA* induit une résistance modifiée vis-à-vis d'un stress oxydant par rapport à la souche sauvage.

Enfin une étude protéomique du mutant *ldhA* nous permettra d'obtenir de nouvelles pistes à explorer.

3. Rex est un régulateur pléiotrope chez *B. cereus*.

La caractérisation des mutants *rex* nous a permis de mettre en évidence le rôle de Rex dans le métabolisme, dans la toxinogénèse et dans la réponse au stress oxydant.

Nous avons montré que Rex n'est pas indispensable pour la croissance de *B. cereus*, mais il participe à son métabolisme en anaérobiose et en aérobiose. Cette protéine permettrait à *B. cereus* d'affiner la régulation de son métabolisme. L'étude protéomique nous apprend que la mutation du gène *rex* entraîne des modifications de production de protéines appartenant à différentes fonctions. Rex semble donc avoir un rôle pléiotrope.

Au niveau du protéome extracellulaire et que ce soit en aérobiose ou en anaérobiose, nous observons chez le mutant *rex* une diminution de la quantité des protéines dites « cytoplasmiques ». Cette diminution n'est pas, pour la totalité des protéines testées, corrélée à une diminution de l'expression de ces protéines. Pour confirmer ce résultat, la mesure de l'expression des gènes des protéines « cytoplasmiques » sur un plus grand nombre de gènes est nécessaire. Plusieurs études rapportent la présence de protéines « cytoplasmiques » dans le milieu extracellulaire (Bendtsen, *et al.*, 2005). Certains auteurs expliquent la présence de ces protéines par une possible lyse des cellules, d'autres précisent que ces protéines ont été exportées dans le milieu extracellulaire par des cellules intactes et que le mécanisme de transport de ces protéines est inconnu (Bendtsen, *et al.*, 2005). Plusieurs protéines impliquées dans la formation de la membrane et de la paroi voient leur quantité variées principalement en anaérobiose chez le mutant *rex*. Sous microscopie optique les mutants *rex* n'ont pas de différence morphologique avec les souches sauvages. Des tests de résistance à des antibiotiques ciblant la membrane plasmique ou la paroi sont envisageables pour valider l'hypothèse de l'importance de Rex dans la biogénèse de l'enveloppe bactérienne. Si des différences de résistance sont observées, une étude de microscopie électronique peut être envisagée. L'étude du protéome membranaire nous permettra de mieux comprendre les différences de quantité des protéines sécrétées entre la souche mutante et la souche sauvage. Notamment dans le but de savoir s'il existe des différences dans la quantité des transporteurs membranaires ou des différences de composition de l'enveloppe bactérienne. Au niveau du protéome extracellulaire, en aérobiose comme en anaérobiose, nous avons observé chez le mutant *rex* une augmentation de la quantité de toxines et de protéines pouvant être associées à la pathogénicité. Pour les gènes de toxines testés nous n'observons aucune corrélation entre le

niveau d'expression des gènes et la quantité des toxines sécrétées. Ces données suggèrent un rôle de Rex dans le transport des toxines. L'étude de la séquence signal des toxines Nhe, Hbl, CytK, HlyII, EntFM, EntA et EntC nous indique que toutes ces toxines sont ou seraient sécrétées via le système Sec (Fagerlund, *et al.*, 2010). HlyI serait quant à elle sécrétée via le système de sécrétion Tat. HlyI n'est pas retrouvée dans le protéome extracellulaire et est trouvée en quantité plus importante au niveau du protéome intracellulaire du mutant *rex* en aérobiose. Ces résultats indiquent que Rex jouerait un rôle dans la sécrétion. L'absence de Rex semble favoriser le système Sec au détriment des autres systèmes de sécrétion. L'étude du protéome membranaire nous permettra de répondre à cette hypothèse. Un test de cytotoxicité sur cellule épithéliales de type Caco-2 des surnageants de la souche sauvage et du mutant *rex* nous permettra de savoir si l'augmentation de la quantité des toxines peut être corrélée à une augmentation de la cytotoxicité du mutant *rex*.

Chez *Streptococcus mutans*, il a été montré que Rex est important pour la résistance au stress oxydant généré par le peroxyde d'hydrogène en aérobiose (Bitoun, *et al.*, 2011, Bitoun, *et al.*, 2012). Chez *B. cereus*, nous observons l'effet inverse. Rex est impliqué dans la résistance au stress oxydant en anaérobiose. La fonction de la protéine Rex semble avoir évolué en fonction de la niche écologique de l'espèce à laquelle elle appartient (Ravcheev, *et al.*, 2012). Dans l'intestin *B. cereus* doit résister au stress oxydant en condition d'anaérobiose. *Streptococcus mutans* est quant à lui un pathogène de la cavité buccale et doit donc résister au stress oxydant en condition d'aérobiose.

L'étude comparative des protéomes de la souche mutante ATCC 14579 Δ *rex* et de la souche sauvage ATCC 14579 ouvre de nombreuses pistes à explorer. L'étude du rôle pléiotrope du régulateur Rex devra être poursuivie. Des différences dans la quantité de protéines constituantes du flagelle sont notamment observées en aérobiose et en anaérobiose. Des tests de mobilités sont donc à prévoir afin de confirmer si ces différences ont une répercussion physiologique.

ResD, Fnr et PlcR connus pour réguler directement les toxines Nhe et Hbl, peuvent interagir entre eux (Esbelin J, *et al.*, 2012). L'interaction de Rex avec d'autres protéines n'est pas improbable. Des expériences de Far-Western avec les protéines ResD, Fnr et PlcR seront à

tester. L'utilisation de la technique Tap-Tag nous permettra d'isoler d'autres partenaires protéiques.

B. cereus possède un système complexe de régulateurs lui permettant d'adapter son comportement à l'environnement extérieur. Plusieurs régulateurs répondant à différents signaux lui permettent de moduler sa virulence. A ce système complexe, s'ajoute les protéines LdhA et Rex. Ces deux protéines sont impliquées à la fois dans le métabolisme et la toxino-génèse de *B. cereus*. Cependant, des travaux supplémentaires sont nécessaires à la fois pour déterminer comment LdhA agit sur l'expression des gènes de toxines et pour définir l'effet activateur ou répresseur du régulateur Rex sur l'expression des gènes de toxines.

Annexe

Annexe

Tableau 13 : Amorces utilisées

Amorces	Séquence (5' vers 3')
Complémentation	
rexcompF	CGGGATCCCGTTCGAAAGCGCGTTTACTTG
rexcompR	CGAGCTCGGATTTTAATTTGGCACTTCGCC
ldhA1compF	TATTCGCTCGTTTTCTTTTG
ldhA1compR	TGCTAACGCAGCTGATGAAG
ldhA2compF	TATTCGCTCGTTTTCTTTTG
ldhA2compR	TGCTAACGCAGCTGATGAAG
Expression hétérologue chez <i>E. coli</i>	
rexE1	ACCATGGATCAGCAAAAGATTCCA
rexE2	TTGTGGATAGTTTTTCAAAAAGTAAAC
ldhAE1	ATGAAAAGACATACAAGAAAAATT
ldhAE2	GTAACCAATTGTTTTTCATAT
EMSA	
ldhAbioF	ACCTGCTAATCCGATGATTG
ldhAbioR	GGATCCAATAATCCAGTAC
plcRbioF	GTAACGAAAGCACTAGCAAG
plcRR	CTGCGTGCATACTTACTCAC
fnrbioF	CGAACACTTCAGCAGGCATA
fnrR	AATGTCATACTGTTTGCCAC
nhebioF	TGTTATTACGACAGTTCCAT
nheR	CTGTAACCAATAACCCTGTG
resDbioF	GCCGGTTTACATTCATATGC
resDR	CATTTTCCATCTCTACCCGC
cytcKbioF	AATTTTTAAGAACGGCTGTAATGG
cytKR	ACGTTTCATACAATCACTTCCTTTT
entAbioF	CATAACTAAATTTCCATTCAAAC
entAR	GTTGACCTCATTATAGCAACC
entBbioF	GTGTGAAGAAGGGCATGGAG
entBR	GCTGTTGCTGCGCCAATTAC
entCbioF	AACTATATTACCCATAAAAACGG
entCR	CCCAAGACCAAAAACCTGCTG
entFMbiotF	ATAAAGTTCACATGAAGTTCACACG
entFMR	TTTTTCATAAGTTGTCTTTACTTCCTT
hblBFbio	TTAATAAATCCTTATATAACAGAAAGG
hblBR	CATTCGTATTCTCCTAT
hlyIR	GAAAAATCACCCCGTTCTTT
hlyIbioF	TAATGAGGGCATAAAGATAAATCA
hlyIIbioF	TAATAGTTATCAATAATAGTGAGAGGA
hlyIIR	TTTTTCATACAGACAGCCACTCC
ohrRbioF	TCCTCCGTATGTAATAAAGG

ohrRR CAAAGTTGGTTATCTAGATGC
ssubioF GGTAGTCCACGCCGTAAACG
ssuR GACAACCATGCACCACCTG

Construction du mutant *rex*

rex1F GCCATGTTAATGTTTCGATGTCT
rex2R ATCTTTTAGCAGTGGCTTGTGG
rex3F GTTTACTTTTTGAAAACTATCCACAA
rex4R TGCATTATGTATCGTGCTTTGG

RACE-PCR

ldhASP1 CCAGTACCGATTACGCGATT
ldhASP2 TAATCTTCGCACTCGCTCCT
ldhASP3 GTTCTTCGCAAATCCCTTGA

RT-PCR

ldhARTF AGGAGCGAGTGCGAAGATTA
ldhARTR AATTGGCTTTCCACCAACAG
pfoRTF GAACCTAATATGGCCGCAAA
pfoRTR TTTCGTATCCCTCGGAATTG
IGRTF GATCACCGTGTATTGCTGT
IGRTR CAATTCCGAGGGATACGAAA

RT-PCR en temps réel

ackF CGCGATTAACGCAGGAAGCT
ackR CGCCGCCGTGAACAACACGG
adhAF ACATATCCTCATACGCCAGG
adhAR CCGCCTGTAGCACCCGTTAC
adhEF CGCACTTGGTGGTGGTTCAG
adhER TCTGCTGTTACATGTGGTGG
ccpAF ACCGCCCAAATGCGGTAGCACG
ccpAR CTGATGGCGTTTCATTTTGCTC
citBF CAATCGCAGCAAACGACTTA
citBR GCTGATGGCCAAATATCGTT
citZF TGATCCACGTGCAAAACACT
citZR CGGACGAATTAAACGGTTGT
cytKF TTACGCTCAAACGACGTCAC
cytKR GGAAAGAAGGCTGAATGTAT
enoF GAAATGGCTGGTTTCGATGT
enoR CTTCAGCACCCATACGGATT
entAF ATAGCAACAGCAGCGGTTTT
entAR CCCAGCACGTACGTTTAAT
entBF CACAACCTGCTACCGCAGAAA
entBR ACAAATTCGCCGTTACATGA
entCF GCAGCTTTAGCAGGAGCAGT
entCR GACGCATTCGTAAGTGCAGA
entFMF ACCCATGTGAGAAGGACCTG
entFMF ATCTTCAATCGCTGGATTCTG
fbaR TGCTGCGGAAGAAGAAAAAT

fbaF	TTACGAGCGTGTGCGTATTC
fnrR	TCTTCACAAGCRATTTTCACRTTT
fnrF	GAAGAATGCAAACRAARTTCCG
hblF	CAAGGTGCAGATGTTGATGC
hblR	GCCACTGCGTGGACATATAA
hlyIF	ATCGCAAGCGCTCTTAATGT
hlyIR	CATAACAGGTGGAGCCGAAT
ldhAF	TAATAATATCAACTGGGTTCGATGC
ldhAR	ATCATGAACGTGCAGTTGGGGAAGC
ldhBF	TTGGAGCGGTAGCTATGCAG
ldhBR	AACGGAAACGAGCAGAGTCT
ldhCF	CAGTCCAACACTAGAGTATGG
ldhCR	AGCGGAAACGAGCAGAATC
nheF	AGCGCTTACGCTAAGGAGGG
nheR	CCTGCTAGTTCATAIAGCTT
pdhF	CGGTGCTATGGTTCACGCTG
pdhR	TCAGCAGCTGCAACACGTAC
pfkF	TCGTCTGAAGCGTGGTAGTG
pfkR	GCTTTTGAGCTAACGCTTCG
pflF	GATGCATACGGACGTGGACG
pflR	CAAGACTCATTGCAGCTCCG
plcRF	ACCCAAGTATGGATATATTRCAAGGTATHGCAGC
plcRR	ACATRATATTGCCATTGAAGAAAYTGCTG
ptaF	CAGTTCGTCCAGCACTTCAA
ptaR	TCTGGAGATTTTCGCAGAACC
resDF	TAACAATTGATAAIGATGCICAICG
resDR	TCAGTCGTTTACAACCTCAA
sdhAF	AACAATGCGGTTTCTTACGG
sdhAR	TGTGGATCGATGAACGCTAA
hlyIIF	TCTTCAAATGGTGGGAAGG
hlyIIR	GGGCAGCTTTATGGAATTGA

F: Sens, R: Anti-sens

Dans les séquences, Y est C ou T; R est A ou G; H est A, C, ou T.

Tableau 14 : Analyse comparative du protéome intracellulaire du mutant ATCC14579 Δ *rex* et de la souche sauvage ATCC 14579. Les changements d'abondance sont exprimés en \log_2 . Par soucis de clareté, sont présentées les protéines présentant au moins une différence significative d'abondance. Les couleurs correspondent à un changement de \log_2 :

De -15 à -2.5	De -2.5 à -1.5	De -1.5 à -1
De -1 à -0.5	De -0.5 à 0	De 0 à 0.5
De 0.5 à 1	De 1 à 1.5	De 1.5 à 2.5
De 2.5 à 15	ND	

ND :Les valeurs sont non significatives.

Tableau 15 : Analyse comparative des exoprotéomes des souches ATCC14579 Δ *rex* et ATCC 14579. Les changements d'abondance sont exprimés en \log_2 . Ici sont présentées les protéines présentant au moins une différence significative d'abondance. Les couleurs correspondent à un changement de \log_2 :

De -15 à -2.5	De -1.5 à -1	De -0.5 à 0
De 0 à 0.5	De 0.5 à 1	De 1 à 1.5
De 1.5 à 2.5	De 2.5 à 15	ND

ND :Les valeurs sont non significatives.

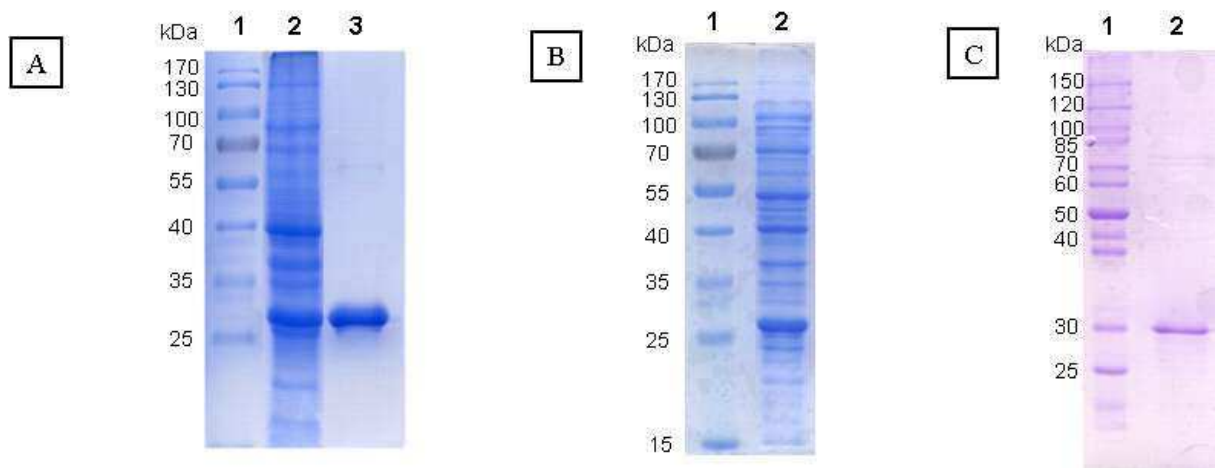


Figure 42 : Analyse sur gel SDS-PAGE de la surproduction et de la purification de la protéine Rex chez *B. cereus*. Des échantillons des fractions de purification ont été analysés par électrophorèse sur gel SDS-PAGE 12%. Sur les figures A et B le gel a été coloré au bleu de coomassie et sur la figure C le gel a été coloré avec de l'Imperial™ Protein Stain (Thermo Scientific). Figure A, purification de la protéine Rex-F4430, piste 1, marqueur de poids moléculaire, piste 2, extraits protéiques bruts d'*E. coli* BL21, piste 3, protéine Rex-F4430. Figure B et C, purification de la protéine Rex-ATCC. Figure B, piste 1, marqueur de poids moléculaire, piste 2, extraits protéiques bruts d'*E. coli* BL21. Figure C, piste 1 marqueur de poids moléculaire, piste 2, protéine Rex-ATCC.

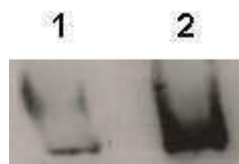


Figure 43 : Analyse par Western Blot des protéines Rex-ATCC (piste 1) et Rex-F4430 (piste 2) suite à leur migration par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 12% en condition non dénaturante.

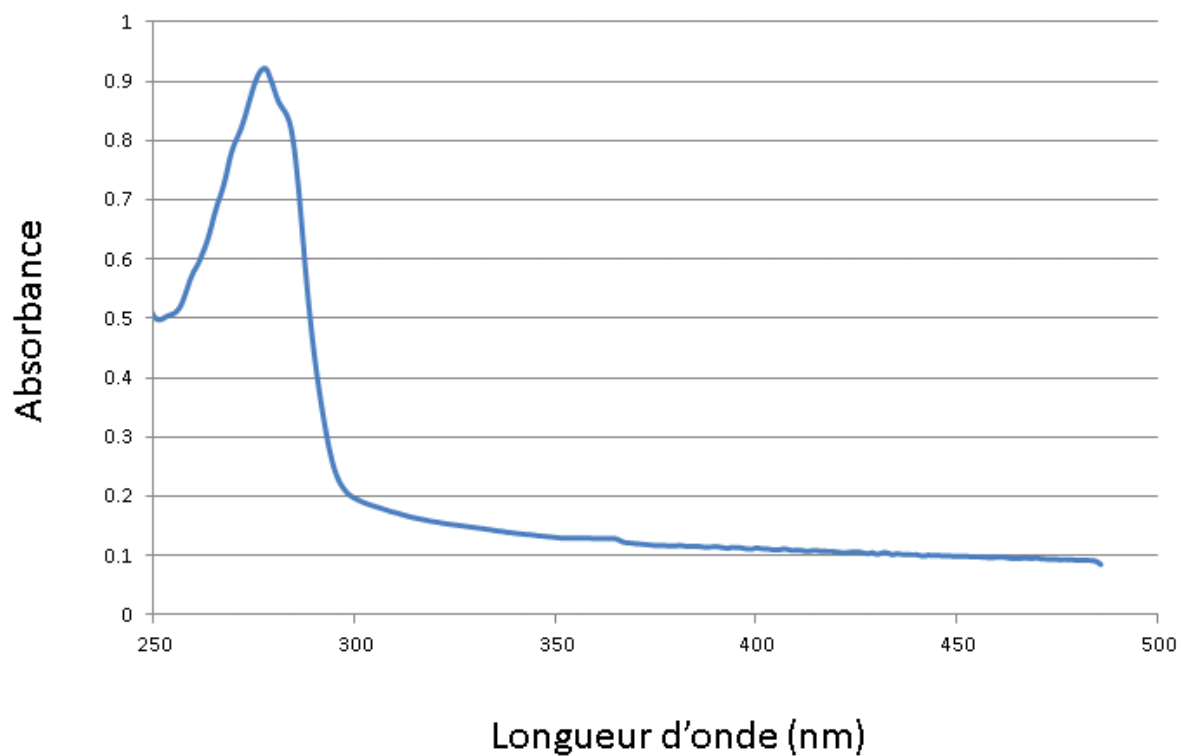


Figure 44 : Spectre d'absorption UV-visible de la protéine Rex-F4430. Un spectre d'absorption identique a été obtenu pour la protéine Rex-ATCC.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB & Lereclus D (1999)** PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* **32**: 1043-1053.
- Agata N, Ohta M, Mori M & Isobe M (1995)** A NOVEL DODECADEPSIPEPTIDE, CEREULIDE, IS AN EMETIC TOXIN OF *BACILLUS-CEREUS*. *Fems Microbiology Letters* **129**: 17-19.
- 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.
- Andersson A, Granum PE & Ronner U (1998)** The adhesion of *Bacillus cereus* spores to epithelial cells might be an additional virulence mechanism. *Int J Food Microbiol* **39**: 93-99.
- Andreeva ZI, Nesterenko VF, Yurkov IS, Budarina ZI, Sineva EV & Solonin AS (2006)** Purification and cytotoxic properties of *Bacillus cereus* hemolysin II. *Protein Expr Purif* **47**: 186-193.
- Andreeva ZI, Nesterenko VF, Fomkina MG, et al. (2007)** The properties of *Bacillus cereus* hemolysin II pores depend on environmental conditions. *Biochim Biophys Acta* **2**: 253-263.
- Antelmann H & Helmann JD (2011)** Thiol-based redox switches and gene regulation. *Antioxid Redox Signal* **14**: 1049-1063.
- Arai K, Ishimitsu T, Fushinobu S, Uchikoba H, Matsuzawa H & Taguchi H (2010)** Active and inactive state structures of unliganded *Lactobacillus casei* allosteric L-lactate dehydrogenase. *Proteins* **78**: 681-694.
- Arantes O & Lereclus D (1991)** Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. *Gene* **108**: 115-119.
- Arnesen LPS, Fagerlund A & Granum PE (2008)** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiology Reviews* **32**: 579-606.
- Asano SI, Nukumizu Y, Bando H, Iizuka T & Yamamoto T (1997)** Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1054-1057.
- Avashia SB, Riggins WS, Lindley C, et al. (2007)** Fatal pneumonia among metalworkers due to inhalation exposure to *Bacillus cereus* containing *Bacillus anthracis* toxin genes. *Clinical Infectious Diseases* **44**: 414-416.
- Baida GE & Kuzmin NP (1996)** Mechanism of action of hemolysin III from *Bacillus cereus*. *Biochim Biophys Acta* **23**: 122-124.
- Baruah A, Lindsey B, Zhu Y & Nakano MM (2004)** Mutational analysis of the signal-sensing domain of ResE histidine kinase from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **186**: 1694-1704.
- Bauer CE, Elsen S & Bird TH (1999)** Mechanisms for redox control of gene expression. *Annu Rev Microbiol* **53**: 495-523.
- Beecher DJ & Wong AC (1997)** Tripartite hemolysin BL from *Bacillus cereus*. Hemolytic analysis of component interactions and a model for its characteristic paradoxical zone phenomenon. *J Biol Chem* **272**: 233-239.

- Beecher DJ & Wong AC (2000)** Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate. *Microbiology* **146**: 1371-1380.
- Beecher DJ, Schoeni JL & Wong AC (1995)** Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* **63**: 4423-4428.
- Bendtsen JD, Kiemer L, Fausboll A & Brunak S (2005)** Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiol* **5**: 58.
- Bitoun JP, Nguyen AH, Fan Y, Burne RA & Wen ZT (2011)** Transcriptional repressor Rex is involved in regulation of oxidative stress response and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* **320**: 110-117.
- Bitoun JP, Liao S, Yao X, Xie GG & Wen ZT (2012)** The Redox-Sensing Regulator Rex Modulates Central Carbon Metabolism, Stress Tolerance Response and Biofilm Formation by *Streptococcus mutans*. *PLoS One* **7**: 13.
- Bottone EJ (2010)** *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* **23**: 382-+.
- Brekasis D & Paget MS (2003)** A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Embo J* **22**: 4856-4865.
- Brillard J & Lereclus D (2007)** Characterization of a small PlcR-regulated gene co-expressed with cereolysin O. *BMC Microbiol* **7**: 52.
- Brillard J, Susanna K, Michaud C, et al. (2008)** The YvfTU two-component system is involved in plcR expression in *Bacillus cereus*. *BMC Microbiol* **8**: 183.
- Budarina ZI, Nikitin DV, Zenkin N, et al. (2004)** A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* haemolysin II. *Microbiology* **150**: 3691-3701.
- Callegan MC, Kane ST, Cochran DC, Gilmore MS, Gominet M & Lereclus D (2003)** Relationship of plcR-regulated factors to *Bacillus endophthalmitis* virulence. *Infect Immun* **71**: 3116-3124.
- Carpenter BM, Whitmire JM & Merrell DS (2009)** This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis. *Infect Immun* **77**: 2590-2601.
- Cattaneo A, Biocca S, Corvaja N & Calissano P (1985)** Nuclear localization of a lactic dehydrogenase with single-stranded DNA-binding properties. *Exp Cell Res* **161**: 130-140.
- Ceuppens S, Rajkovic A, Heyndrickx M, Tsilia V, Van De Wiele T, Boon N & Uyttendaele M (2011)** Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Crit Rev Microbiol* **37**: 188-213.
- Ceuppens S, Van de Wiele T, Rajkovic A, Ferrer-Cabaceran T, Heyndrickx M, Boon N & Uyttendaele M (2012)** Impact of intestinal microbiota and gastrointestinal conditions on the *in vitro* survival and growth of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* **155**: 241-246.
- Ceuppens S, Uyttendaele M, Drieskens K, Heyndrickx M, Rajkovic A, Boon N & Van de Wiele T (2012)** Survival and germination of *Bacillus cereus* spores during *in vitro* simulation of

gastrointestinal transit occurred without outgrowth and enterotoxin production. *Appl Environ Microbiol* **24**: 24.

Circu ML & Aw TY (2012) Intestinal redox biology and oxidative stress. *Semin Cell Dev Biol* **30**: 30.

Clair G, Armengaud J & Duport C (2012) Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Mol Cell Proteomics* **11**: 9.

Clair G, Roussi S, Armengaud J & Duport C (2010) Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Mol Cell Proteomics* **9**: 1486-1498.

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. *Journal of Applied Microbiology* **97**: 214-219.

Clavel T, Carlin F, Dargaignaratz C, Lairon D, Nguyen-The C & Schmitt P (2007) Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and Haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media. *J Appl Microbiol* **103**: 1568-1575.

Cotter PD & Hill C (2003) Surviving the acid test: Responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 429-+.

Crack JC, Green J, Cheesman MR, Le Brun NE & Thomson AJ (2007) Superoxide-mediated amplification of the oxygen-induced switch from [4Fe-4S] to [2Fe-2S] clusters in the transcriptional regulator FNR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 2092-2097.

Crack JC, Gaskell AA, Green J, Cheesman MR, Le Brun NE & Thomson AJ (2008) Influence of the environment on the [4Fe-4S]₂⁺ to [2Fe-2S]₂⁺ cluster switch in the transcriptional regulator FNR. *J Am Chem Soc* **130**: 1749-1758.

Cruz Ramos H, Hoffmann T, Marino M, et al. (2000) Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J Bacteriol* **182**: 3072-3080.

Cutting SM (2011) *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology* **28**: 214-220.

Dai RP, Yu FX, Goh SR, et al. (2008) Histone 2B (H2B) expression is confined to a proper NAD⁺/NADH redox status. *J Biol Chem* **283**: 26894-26901.

Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, et al. (2007) Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18490-18495.

Deutscher J, Kuster E, Bergstedt U, Charrier V & Hillen W (1995) Protein kinase-dependent HPr/CcpA interaction links glycolytic activity to carbon catabolite repression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* **15**: 1049-1053.

Deutscher J, Galinier A & Martin-Verstraete I (2002) Carbohydrate Uptake and Metabolism in *Bacillus subtilis* and its Closest Relatives. From Genes to Cells. 129-150.

Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, et al. (2005) Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 4277-4279.

- Dommel MK, Lucking G, Scherer S & Ehling-Schulz M (2011)** Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. *Food Microbiol* **28**: 284-290.
- Drobniewski FA (1993)** *BACILLUS-CEREUS* AND RELATED SPECIES. *Clinical Microbiology Reviews* **6**: 324-338.
- Dubois T, Faegri K, Perchat S, et al. (2012)** Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS Pathog* **8**: 12.
- Dufour YS, Kiley PJ & Donohue TJ (2010)** Reconstruction of the core and extended regulons of global transcription factors. *PLoS Genet* **6**.
- Duport C, Thomassin S, Bourel G & Schmitt P (2004)** Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Archives of Microbiology* **182**: 90-95.
- 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. *Journal of Bacteriology* **188**: 6640-6651.
- Ehling-Schulz M, Fricker M & Scherer S (2004)** *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res* **48**: 479-487.
- Ehling-Schulz M, Fricker M & Scherer S (2004)** *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition & Food Research* **48**: 479-487.
- Eiamphungporn W, Soonsanga S, Lee JW & Helmann JD (2009)** Oxidation of a single active site suffices for the functional inactivation of the dimeric *Bacillus subtilis* OhrR repressor *in vitro*. *Nucleic Acids Res* **37**: 1174-1181.
- Esbelin J, Jouanneau Y & Duport C (2012)** *Bacillus cereus* fnr binds a [4Fe-4 S] cluster and forms a ternary complex with ResD and PlcR. *BMC Microbiol* **12**: 125.
- 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**: 4242-4251.
- 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. *Journal of Bacteriology* **191**: 4419-4426.
- Escolar L, Perez-Martin J & de Lorenzo V (1999)** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**: 6223-6229.
- Eventoff W, Rossmann MG, Taylor SS, Torff HJ, Meyer H, Keil W & Kiltz HH (1977)** Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 2677-2681.
- Fagerlund A, Lindback T & Granum PE (2010)** *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC Microbiol* **10**: 304.
- Fagerlund A, Ween O, Lund T, Hardy SP & Granum PE (2004)** Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* **150**: 2689-2697.

Fagerlund A, Lindback T, Storset AK, Granum PE & Hardy SP (2008) *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* **154**: 693-704.

Fleischhacker AS & Kiley PJ (2011) Iron-containing transcription factors and their roles as sensors. *Curr Opin Chem Biol* **15**: 335-341.

Fong KP, Chung WO, Lamont RJ & Demuth DR (2001) Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. *Infect Immun* **69**: 7625-7634.

Frenzel E, Doll V, Pauthner M, Lucking G, Scherer S & Ehling-Schulz M (2012) CodY orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. *Mol Microbiol* **85**: 67-88.

Fuangthong M & Helmann JD (2002) The OhrR repressor senses organic hydroperoxides by reversible formation of a cysteine-sulfenic acid derivative. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6690-6695.

Fujita Y (2009) Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 245-259.

Geng H, Zuber P & Nakano MM (2007) Regulation of respiratory genes by ResD-ResE signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol* **422**: 448-464.

Geng H, Zhu Y, Mullen K, Zuber CS & Nakano MM (2007) Characterization of ResDE-dependent fnr transcription in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**: 1745-1755.

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

Glatz BA & Goepfert JM (1976) Defined conditions for synthesis of *Bacillus cereus* enterotoxin by fermenter-grown cultures. *Applied and environmental Microbiology* **32** (3): 400-404.

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

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

Gohar M, Faegri K, Perchat S, et al. (2008) The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* **3**.

Granum PE, Brynstad S & Kramer JM (1993) ANALYSIS OF ENTEROTOXIN PRODUCTION BY *BACILLUS-CEREUS* FROM DAIRY-PRODUCTS, FOOD POISONING INCIDENTS AND NONGASTROINTESTINAL INFECTIONS. *International Journal of Food Microbiology* **17**: 269-279.

Granum PE, O'Sullivan K & Lund T (1999) The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett* **177**: 225-229.

Green J & Paget MS (2004) Bacterial redox sensors. *Nat Rev Microbiol* **2**: 954-966.

- Green J, Scott C & Guest JR (2001)** Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors: FNR and FLP. *Adv Microb Physiol* **44**: 1-34.
- Green J, Crack JC, Thomson AJ & LeBrun NE (2009)** Bacterial sensors of oxygen. *Curr Opin Microbiol* **12**: 145-151.
- Grosse F, Nasheuer HP, Scholtissek S & Schomburg U (1986)** Lactate dehydrogenase and glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase are single-stranded DNA-binding proteins that affect the DNA-polymerase-alpha-primase complex. *Eur J Biochem* **160**: 459-467.
- Gruner I, Fradrich C, Bottger LH, Trautwein AX, Jahn D & Hartig E (2011)** Aspartate 141 is the fourth ligand of the oxygen-sensing [4Fe-4S]²⁺ cluster of *Bacillus subtilis* transcriptional regulator Fnr. *J Biol Chem* **286**: 2017-2021.
- Guillemet E, Cadot C, Tran SL, Guinebretiere MH, Lereclus D & Ramarao N (2010)** The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *J Bacteriol* **192**: 286-294.
- Guinebretiere MH & Nguyen-The C (2003)** Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* **43**: 207-215.
- Guinebretiere MH, Broussolle V & Nguyen-The C (2002)* Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol* **40**: 3053-3056.
- Guinebretiere MH, Thompson FL, Sorokin A, et al. (2008)** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* **10**: 851-865.
- Guinebretiere MH, Thompson FL, Sorokin A, et al. (2008)** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol* **10**: 851-865.
- Guinebretiere MH, Auger S, Galleron N, et al. (2012)** *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol* **17**: 17.
- Gyan S, Shiohira Y, Sato I, Takeuchi M & Sato T (2006)** Regulatory loop between redox sensing of the NADH/NAD(+) ratio by Rex (YdiH) and oxidation of NADH by NADH dehydrogenase Ndh in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**: 7062-7071.
- Handke LD, Shivers RP & Sonenshein AL (2008)** Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *J Bacteriol* **190**: 798-806.
- Hardy SP, Lund T & Granum PE (2001)** CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol Lett* **197**: 47-51.
- Hartig E, Geng H, Hartmann A, et al. (2004)** *Bacillus subtilis* ResD induces expression of the potential regulatory genes yclJK upon oxygen limitation. *J Bacteriol* **186**: 6477-6484.
- Harvie DR, Vilchez S, Steggles JR & Ellar DJ (2005)** *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology* **151**: 569-577.
- Haseltine WA & Block R (1973)** Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 1564-1568.

- Haseltine WA, Block R, Gilbert W & Weber K (1972)** MSI and MSII made on ribosome in idling step of protein synthesis. *Nature* **238**: 381-384.
- Haug TM, Sand SL, Sand O, Phung D, Granum PE & Hardy SP (2010)** Formation of very large conductance channels by *Bacillus cereus* Nhe in Vero and GH(4) cells identifies NheA + B as the inherent pore-forming structure. *J Membr Biol* **237**: 1-11.
- Hauge, S. (1955)** Food poisoning caused by aerobic spore-forming Bacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **18**, 591-595.
- He H, Lee MC, Zheng LL, Zheng L & Luo Y (2012)** Integration of the Metabolic/Redox State, Histone Gene Switching, DNA Replication and S-phase Progression by Moonlighting Metabolic Enzymes. *Biosci Rep* **8**: 8.
- Heinrichs JH, Beecher DJ, MacMillan JD & Zilinskas BA (1993)** Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **175**: 6760-6766.
- Helmann JD (2011)** Bacillithiol, a new player in bacterial redox homeostasis. *Antioxid Redox Signal* **15**: 123-133.
- Hoffmaster AR, Hill KK, Gee JE, et al. (2006)** Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: Strains are closely related to *Bacillus anthracis* and Harbor *B-anthraxis* virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 3352-3360.
- Hoffmaster AR, Ravel J, Rasko DA, et al. (2004)** Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8449-8454.
- Hong M, Fuangthong M, Helmann JD & Brennan RG (2005)** Structure of an OhrR-ohrA operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. *Mol Cell* **20**: 131-141.
- Hsueh YH, Somers EB & Wong AC (2008)** Characterization of the codY gene and its influence on biofilm formation in *Bacillus cereus*. *Arch Microbiol* **189**: 557-568.
- Hueck CJ & Hillen W (1995)** Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria? *Mol Microbiol* **15**: 395-401.
- Inaoka T & Ochi K (2002)** RelA protein is involved in induction of genetic competence in certain *Bacillus subtilis* strains by moderating the level of intracellular GTP. *J Bacteriol* **184**: 3923-3930.
- Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, et al. (2003)** Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**: 87-91.
- Jeffery CJ (1999)** Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* **24**: 8-11.
- Jeffery CJ (2003)** Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet* **19**: 415-417.
- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J & Mahillon J (2003)** The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* **5**: 631-640.

Jobin MP, Clavel T, Carlin F & Schmitt P (2002) Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415. *International Journal of Food Microbiology* **79**: 65-73.

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

Kramer, JM & Gilbert RJ (1989) *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Foodborne Bacterial Pathogens (Doyle MP, ed) pp. 21-70. Marcel Dekker, New York

Kraus A, Kuster E, Wagner A, Hoffmann K & Hillen W (1998) Identification of a co-repressor binding site in catabolite control protein CcpA. *Mol Microbiol* **30**: 955-963.

Laouami S, Messaoudi K, Alberto F, Clavel T & Dupont C (2011) Lactate dehydrogenase A promotes communication between carbohydrate catabolism and virulence in *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **193**: 1757-1766.

Larsson JT, Rogstam A & von Wachenfeldt C (2005) Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **151**: 3323-3335.

Lazazzera BA, Beinert H, Khoroshilova N, Kennedy MC & Kiley PJ (1996) DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen. *J Biol Chem* **271**: 2762-2768.

Lechner S, Mayr R, Francis KP, et al. (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1373-1382.

Lee JW, Soonsanga S & Helmann JD (2007) A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8743-8748.

Lequette Y, Garenaux E, Tauveron G, et al. (2011) Role Played by Exosporium Glycoproteins in the Surface Properties of *Bacillus cereus* Spores and in Their Adhesion to Stainless Steel. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 4905-4911.

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.

Levdikov VM, Blagova E, Joseph P, Sonenshein AL & Wilkinson AJ (2006) The structure of CodY, a GTP- and isoleucine-responsive regulator of stationary phase and virulence in gram-positive bacteria. *J Biol Chem* **281**: 11366-11373.

Levdikov VM, Blagova E, Colledge VL, Lebedev AA, Williamson DC, Sonenshein AL & Wilkinson AJ (2009) Structural rearrangement accompanying ligand binding in the GAF domain of CodY from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* **390**: 1007-1018.

Lewis M (2005) The lac repressor. *C R Biol* **328**: 521-548.

Lindback T, Fagerlund A, Rodland MS & Granum PE (2004) Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* **150**: 3959-3967.

Lindback T, Mols M, Basset C, Granum PE, Kuipers OP & Kovacs AT (2012) CodY, a pleiotropic regulator, influences multicellular behaviour and efficient production of virulence factors in *Bacillus cereus*. *Environ Microbiol* **28**: 1462-2920.

Lindback T, Hardy SP, Dietrich R, et al. (2010) Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components. *Infect Immun* **78**: 3813-3821.

Logan NA (2012) Bacillus and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol* **112**: 417-429.

Lucking G, Dommel MK, Scherer S, Fouet A & Ehling-Schulz M (2009) Cereulide synthesis in emetic *Bacillus cereus* is controlled by the transition state regulator AbrB, but not by the virulence regulator PlcR. *Microbiology* **155**: 922-931.

Lund T, De Buyser ML & Granum PE (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* **38**: 254-261.

Luxananil P, Butrapet S, Atomi H, Imanaka T & Panyim S (2003) A decrease in cytotoxic and haemolytic activities by inactivation of a single enterotoxin gene in *Bacillus cereus* Cx5. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **19**: 831-837.

Magalhaes JG, Tattoli I & Girardin SE (2007) The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* **19**: 106-115.

Mahler H, Pasi A, Kramer JM, Schulte P, Scoging AC, Bar W & Krahenbuhl S (1997) Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England Journal of Medicine* **336**: 1142-1148.

Margulis L, Jorgensen JZ, Dolan S, Kolchinsky R, Rainey FA & Lo SC (1998) The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 1236-1241.

Marteyn B, West NP, Browning DF, et al. (2010) Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen *in vivo*. *Nature* **465**: 355-358.

Mathesius U, Mulders S, Gao M, Teplitski M, Caetano-Anolles G, Rolfe BG & Bauer WD (2003) Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1444-1449.

Merritt ME & Donaldson JR (2009) Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *J Med Microbiol* **58**: 1533-1541.

Messaoudi K, Clavel T, Schmitt P & Dupont C (2010) Fnr mediates carbohydrate-dependent regulation of catabolic and enterotoxin genes in *Bacillus cereus* F4430/73. *Res Microbiol* **161**: 30-39.

Meunier-Jamin C, Kapp U, Leonard GA & McSweeney S (2004) The structure of the organic hydroperoxide resistance protein from *Deinococcus radiodurans*. Do conformational changes facilitate recycling of the redox disulfide? *J Biol Chem* **279**: 25830-25837.

Mikkola R, Saris NEL, Grigoriev PA, Andersson MA & Salkinoja-Salonen MS (1999) Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide - The emetic toxin of *B-cereus*. *European Journal of Biochemistry* **263**: 112-117.

Miles G, Bayley H & Cheley S (2002) Properties of *Bacillus cereus* hemolysin II: a heptameric transmembrane pore. *Protein Sci* **11**: 1813-1824.

- Miller JM, Hair JG, Hebert M, Hebert L, Roberts FJ & Weyant RS (1997)** Fulminating bacteremia and pneumonia due to *Bacillus cereus* (vol 35, pg 504, 1997). *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 1294-1294.
- Mock M & Fouet A (2001)** ANTHRAX. *Annual Review of Microbiology* **55**: 647-671.
- Molle V, Nakaura Y, Shivers RP, Yamaguchi H, Losick R, Fujita Y & Sonenshein AL (2003)** Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J Bacteriol* **185**: 1911-1922.
- Mols M & Abee T (2011)** *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environmental Microbiology* **13**: 2835-2843.
- Mols M & Abee T (2011)** Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environ Microbiol* **13**: 1387-1394.
- Monod, J. (1942)** Recherches sur la croissance des cultures bactériennes.: Université de Paris, France.
- Moravek M, Dietrich R, Buerk C, et al. (2006)** Determination of the toxic potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiol Lett* **257**: 293-298.
- Moreno MS, Schneider BL, Maile RR, Weyler W & Saier MH, Jr. (2001)** Catabolite repression mediated by the CcpA protein in *Bacillus subtilis*: novel modes of regulation revealed by whole-genome analyses. *Mol Microbiol* **39**: 1366-1381.
- Moriarty-Craige SE & Jones DP (2004)** Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr* **24**: 481-509.
- Mortimer PR & McCann G (1974)** Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet* **1**: 1043-1045.
- Nakamura LK (1998)** *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1031-1035.
- Naranjo M, Denayer S, Botteldoorn N, et al. (2011)** Sudden Death of a Young Adult Associated with *Bacillus cereus* Food Poisoning. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 4379-4381.
- Newberry KJ, Fuangthong M, Panmanee W, Mongkolsuk S & Brennan RG (2007)** Structural mechanism of organic hydroperoxide induction of the transcription regulator OhrR. *Mol Cell* **28**: 652-664.
- O'Reilly M & Devine KM (1997)** Expression of AbrB, a transition state regulator from *Bacillus subtilis*, is growth phase dependent in a manner resembling that of Fis, the nucleoid binding protein from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 522-529.
- Okinaka R, Pearson T & Keim P (2006)** Anthrax, but not *Bacillus anthracis*? *Plos Pathogens* **2**: 1025-1027.
- Ostensvik O, From C, Heidenreich B, O'Sullivan K & Granum PE (2004)** Cytotoxic *Bacillus* spp. belonging to the *B-cereus* and *B-subtilis* groups in Norwegian surface waters. *Journal of Applied Microbiology* **96**: 987-993.

- Ouhib O, Clavel T & Schmitt P (2006)** The production of *Bacillus cereus* enterotoxins is influenced by carbohydrate and growth rate. *Curr Microbiol* **53**: 222-226.
- Paananen A, Mikkola R, Sareneva T, et al. (2002)** Inhibition of human natural killer cell activity by cereulide, an emetic toxin from *Bacillus cereus*. *Clin Exp Immunol* **129**: 420-428.
- Pagels M, Fuchs S, Pane-Farre J, et al. (2010)** Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **76**: 1142-1161.
- Panmanee W, Vattanaviboon P, Poole LB & Mongkolsuk S (2006)** Novel organic hydroperoxide-sensing and responding mechanisms for OhrR, a major bacterial sensor and regulator of organic hydroperoxide stress. *J Bacteriol* **188**: 1389-1395.
- Perchat S, Dubois T, Zouhir S, et al. (2011)** A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Mol Microbiol* **82**: 619-633.
- Pomerantsev AP, Pomerantseva OM, Camp AS, Mukkamala R, Goldman S & Leppla SH (2009)** PapR peptide maturation: role of the NprB protease in *Bacillus cereus* 569 PlcR/PapR global gene regulation. *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**: 361-377.
- Potrykus K & Cashel M (2008)** (p)ppGpp: Still Magical? *Annual Review of Microbiology*, Vol. 62 ed.eds, p. 35-51. Annual Reviews, Palo Alto.
- Ramarao N & Lereclus D (2005)** The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B. cereus* group to escape macrophages. *Cell Microbiol* **7**: 1357-1364.
- Ramarao N & Lereclus D (2006)** Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes Infect* **8**: 1483-1491.
- Ramos JL, Martinez-Bueno M, Molina-Henares AJ, et al. (2005)** The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 326-356.
- Ravcheev DA, Li X, Latif H, et al. (2012)** Transcriptional regulation of central carbon and energy metabolism in bacteria by redox-responsive repressor Rex. *J Bacteriol* **194**: 1145-1157.
- Reents H, Gruner I, Harmening U, et al. (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.
- Richardson AR, Libby SJ & Fang FC (2008)** A nitric oxide-inducible lactate dehydrogenase enables *Staphylococcus aureus* to resist innate immunity. *Science* **319**: 1672-1676.
- Rocha J, Flores V, Cabrera R, et al. (2012)** Evolution and some functions of the NprR-NprRB quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *Appl Microbiol Biotechnol* **94**: 1069-1078.
- Rodgers KR & Lukat-Rodgers GS (2005)** Insights into heme-based O₂ sensing from structure-function relationships in the FixL proteins. *J Inorg Biochem* **99**: 963-977.
- Rodikova EA, Kovalevskiy OV, Mayorov SG, et al. (2007)** Two HlyIIR dimers bind to a long perfect inverted repeat in the operator of the hemolysin II gene from *Bacillus cereus*. *FEBS Lett* **581**: 1190-1196.

Rosenfeld E, Duport C, Zigha A & Schmitt P (2005) Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Canadian Journal of Microbiology* **51**: 149-158.

Ryan PA, Macmillan JD & Zilinskas BA (1997) Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **179**: 2551-2556.

Saile E & Koehler TM (2002) Control of anthrax toxin gene expression by the transition state regulator abrB. *J Bacteriol* **184**: 370-380.

Salamitou S, Ramisse F, Brehelin M, et al. (2000) The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology-Uk* **146**: 2825-2832.

Sanchez AM, Bennett GN & San KY (2005) Effect of different levels of NADH availability on metabolic fluxes of *Escherichia coli* chemostat cultures in defined medium. *J Biotechnol* **117**: 395-405.

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

Schau M, Chen Y & Hulett FM (2004) *Bacillus subtilis* YdiH is a direct negative regulator of the cydABCD operon. *J Bacteriol* **186**: 4585-4595.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 775-+.

Schoeni JL & Wong AC (1999) Heterogeneity observed in the components of hemolysin BL, an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* **53**: 159-167.

Senouci-Rezkallah K, Schmitt P & Jobin MP (2011) Amino acids improve acid tolerance and internal pH maintenance in *Bacillus cereus* ATCC14579 strain. *Food Microbiol* **28**: 364-372.

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. *J Vet Med Sci* **58**: 1027-1029.

Shinagawa, K (1990) Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *International Journal of Food Microbiology*. **10**: 125-142.

Shivers RP, Dineen SS & Sonenshein AL (2006) Positive regulation of *Bacillus subtilis* ackA by CodY and CcpA: establishing a potential hierarchy in carbon flow. *Mol Microbiol* **62**: 811-822.

Sickmier EA, Brekasis D, Paranawithana S, Bonanno JB, Paget MS, Burley SK & Kielkopf CL (2005) X-ray structure of a Rex-family repressor/NADH complex insights into the mechanism of redox sensing. *Structure* **13**: 43-54.

Sineva E, Shadrin A, Rodikova EA, et al. (2012) Iron regulates expression of *Bacillus cereus* hemolysin II via global regulator Fur. *J Bacteriol* **194**: 3327-3335.

- Slack FJ, Serron P, Joyce E & Sonenshein AL (1995)** A GENE REQUIRED FOR NUTRITIONAL REPRESSON OF THE *BACILLUS-SUBTILIS* DIPEPTIDE PERMEASE OPERON. *Molecular Microbiology* **15**: 689-702.
- Slamti L & Lereclus D (2002)** A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Embo J* **21**: 4550-4559.
- Slamti L & Lereclus D (2005)** Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **187**: 1182-1187.
- Slamti L, Perchat S, Gominet M, et al. (2004)** Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J Bacteriol* **186**: 3531-3538.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. (1985)** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.
- Somerville GA & Proctor RA (2009)** At the crossroads of bacterial metabolism and virulence factor synthesis in *Staphylococci*. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 233-248.
- Sonenshein AL (2005)** CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* **8**: 203-207.
- Sonenshein AL (2007)** Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **5**: 917-927.
- Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A & Granum PE (2008)** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 579-606.
- Stojiljkovic I & Hantke K (1995)** Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet* **247**: 199-205.
- Strauch MA, Spiegelman GB, Perego M, Johnson WC, Burbulys D & Hoch JA (1989)** The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. *Embo J* **8**: 1615-1621.
- Teplova VV, Mikkola R, Tonshin AA, Saris NE & Salkinoja-Salonen MS (2006)** The higher toxicity of cereulide relative to valinomycin is due to its higher affinity for potassium at physiological plasma concentration. *Toxicol Appl Pharmacol* **210**: 39-46.
- Teyssou R, Hance P, Nicand E, Nizou JY, Buisson Y (1998)** Les infections à *Bacillus cereus* : bactériologie, clinique et traitement. La lettre de l'Infectiologue Tome XIII-n°3.
- Thomassin S, Jobin MP & Schmitt P (2006)** The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH. *Arch Microbiol* **186**: 229-239.
- Tolla DA & Savageau MA (2011)** Phenotypic repertoire of the FNR regulatory network in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **79**: 149-165.
- Tourasse NJ, Helgason E, Klevan A, et al. (2011)** Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiology* **28**: 236-244.

Tran SL, Guillemet E, Gohar M, Lereclus D & Ramarao N (2010) CwpFM (EntFM) Is a *Bacillus cereus* Potential Cell Wall Peptidase Implicated in Adhesion, Biofilm Formation, and Virulence. *Journal of Bacteriology* **192**: 2638-2642.

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

Trivedi A, Singh N, Bhat SA, Gupta P & Kumar A (2012) Redox biology of tuberculosis pathogenesis. *Adv Microb Physiol* **60**: 263-324.

Tsigarida E, Hugas M & Robinson T (2009) The EFSA Scientific Panel on Biological Hazards first mandate: May 2003-may 2006. Insight into scientific advice on food hygiene and microbiology. *Trends in Food Science & Technology* **20**: 587-594.

Turnbull PCB, Kramer JM, Jorgensen K, Gilbert RJ & Melling J (1979) PROPERTIES AND PRODUCTION CHARACTERISTICS OF VOMITING, DIARRHEAL, AND NECROTIZING TOXINS OF *BACILLUS-CEREUS*. *American Journal of Clinical Nutrition* **32**: 219-228.

van der Voort M, Kuipers OP, Buist G, de Vos WM & Abee T (2008) Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579. *BMC Microbiol* **8**: 62.

Vey JL, Yang J, Li M, Broderick WE, Broderick JB & Drennan CL (2008) Structural basis for glycyl radical formation by pyruvate formate-lyase activating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 16137-16141.

Vilain S, Luo Y, Hildreth MB & Brozel VS (2006) Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4970-4977.

Villapakkam AC, Handke LD, Belitsky BR, Levnikov VM, Wilkinson AJ & Sonenshein AL (2009) Genetic and biochemical analysis of the interaction of *Bacillus subtilis* CodY with branched-chain amino acids. *J Bacteriol* **191**: 6865-6876.

Wang E, Bauer MC, Rogstam A, Linse S, Logan DT & von Wachenfeldt C (2008) Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex. *Mol Microbiol* **69**: 466-478.

Wang E, Ikonen TP, Knaapila M, Svergun D, Logan DT & von Wachenfeldt C (2011) Small-angle X-ray scattering study of a Rex family repressor: conformational response to NADH and NAD⁺ binding in solution. *J Mol Biol* **408**: 670-683.

Wang X, Kim Y, Ma Q, Hong SH, Pokusaeva K, Sturino JM & Wood TK (2010) Cryptic prophages help bacteria cope with adverse environments. *Nat Commun* **1**.

Waters CM & Bassler BL (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 319-346.

Weickert MJ & Adhya S (1992) A family of bacterial regulators homologous to Gal and Lac repressors. *J Biol Chem* **267**: 15869-15874.

Wichgers Schreur PJ, Rebel JM, Smits MA, van Putten JP & Smith HE (2011) Lgt processing is an essential step in *Streptococcus suis* lipoprotein mediated innate immune activation. *PLoS One* **6**: 19.

- Wilde C, Vogelsgesang M & Aktories K (2003)** Rho-specific *Bacillus cereus* ADP-ribosyltransferase C3cer cloning and characterization. *Biochemistry* **42**: 9694-9702.
- Wilde C, Barth H, Sehr P, Han L, Schmidt M, Just I & Aktories K (2002)** Interaction of the Rho-ADP-ribosylating C3 exoenzyme with RalA. *J Biol Chem* **277**: 14771-14776.
- Williams KR, Reddigari S & Patel GL (1985)** Identification of a nucleic acid helix-destabilizing protein from rat liver as lactate dehydrogenase-5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 5260-5264.
- Wilson MK, Vergis JM, Alem F, et al. (2011)** *Bacillus cereus* G9241 Makes Anthrax Toxin and Capsule like Highly Virulent *B. anthracis* Ames but Behaves like Attenuated Toxigenic Nonencapsulated *B. anthracis* Sterne in Rabbits and Mice. *Infection and Immunity* **79**: 3012-3019.
- Yesilkaya H, Spissu F, Carvalho SM, et al. (2009)** Pyruvate formate lyase is required for pneumococcal fermentative metabolism and virulence. *Infect Immun* **77**: 5418-5427.
- Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P & Duport C (2006)** Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Archives of Microbiology* **185**: 222-233.
- 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. *Journal of Bacteriology* **189**: 2813-2824.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM & van 't Riet K (1990)** Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1875-1881.

Publication
