ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

AgroParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET INDUSTRIES DU VIVANT ET DE L'ENVIRONNEMENT
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY FOR LIFE, FOOD AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Ecole Doctorale ABIES
Agriculture
Agriculture
Alimentation
Food
Biologie
Biology
Environnement
Environment
Santé
Health

Doctorat ParisTech

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech)

Spécialité : Microbiologie

présentée et soutenue publiquement par

Philippe DUHUTREL

le 17 mai 2011

Métabolisme du fer et de l'hème chez *Lactobacillus sakei*

Directrice de thèse : **Marie-Christine CHAMPOMIER VERGÈS**

Jury

Mme Dominique EXPERT	Présidente du jury
M Pierre CORNELIS	Rapporteur
M Emmanuel LESUISSE	Rapporteur
M Philippe GAUDU	Examinateur
M Philippe LEMANCEAU	Examinateur
Mme Marie-Christine CHAMPOMIER VERGÈS	Directrice de thèse

INRA, AgroParisTech
Unité Mixte de Recherche MICALIS
Equipe Flore Lactique et Ecosystème Carné
Bât 526, Domaine de Vilvert, 78350 Jouy en Josas

INRA

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Flore Lactique et Ecosystème Carné de l'UMR MICALIS à l'INRA de Jouy en Josas.

Merci vivement à l'ensemble des membres du jury, Mme Dominique Expert, Mme Marie Champomier Vergès, M Pierre Cornelis, M Philippe Gaudu, M Philippe Lemanceau et M Emmanuel Lesuisse pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à Marie Champomier Vergès, My Super-Mentor, pour m'avoir encadré durant ces trois années. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, pour ton investissement et les nombreuses heures de discussions passées ensemble, tes conseils et ton aide précieuse tout au long de ce travail. Merci également de ta disponibilité et de ton soutien dans mes choix personnels.

Merci aussi à Monique Zagorec qui m'a accueilli au sein de l'unité FLEC me permettant de mener à bien ce projet. Je suis heureux d'avoir pu bénéficier de ton expérience et de tes conseils avisés : merci pour tout cela.

Merci à Stéphane Chaillou, qui m'a accepté dans sa caverne durant les derniers mois de rédaction et pour tous ces bons moments et discussions partagés durant nos longues foulées.

A Christian Bordat, alias Maitre Bordat, ton jeune Padawan te remercie pour cette initiation à la microscopie électronique et l'apprentissage minutieux que cela nécessite.

A Thierry Meylheuc, mon autre Maitre de microscopie électronique, nos sessions StarWars et les franches rigolades qui les ont encadrés sont d'excellents souvenirs.

Finalement, la microscopie électronique à pour moi ressemblé à un parcours initiatique dont le message Jedi serait « -Il n'y a pas d'ignorance, il y a la connaissance ».

Mes plus vifs remerciements aux autres membres de l'équipe FLEC sans qui ce travail n'aurait pu aboutir :

Fabienne Baraige, dite Babaonémo, technicienne de choc pour tout ce travail réalisé et les litres de MCD utilisés (que de manips…), ta bonne humeur, ta bonne volonté et pour ton amitié.

Isabelle Lucquin, alias Zaz', et son côté « Bounty » sans égal : merci pour ta bonne humeur, les fous rires que l'on te doit ont énormément contribué à l'ambiance chaleureuse du labo.

Morgan Guilbaud, dite Clochette, pour ces grands moments de confidences au coin de la paillasse, et nos nombreuses rigolades qui m'ont permis de relativiser durant mes périodes de doutes.

Patricia Anglade, dite Patounette pour ses sachets de tisane recyclables et nos agréables discussions.

Anne-Marie LeCoq et Anne Goubet pour leur incroyable croyance envers les profondes pensées de JCVD et les moments de philosophie qui en ont découlé. Ces dernières resteront pour moi insondables.

Je tiens également à remercier l'ensemble des stagiaires que j'ai eu plaisir à côtoyer :

Fabrizio Chiaramonte pour ton incroyable calme, William Turpin (finalement c'est super lourd une machine à laver), Rhys Jones, José Curiel et tous les autres.

Un grand merci aux membres de l'équipe Doc'J pour ces bons moments : cafés, colloques, soirées, karting et laser Game.

Enfin, un grand merci à ma famille :

Maman pour m'avoir encouragé dans mes choix et soutenu tout au long de mon parcours avec ses hauts et ses bas.

Je pense tout particulièrement à ma femme Aurore qui m'a supporté mais surtout soutenu et cru en moi pendant ces trois années particulièrement durant la rédaction et à ma fille chérie, Rose, mon petit soleil à qui je dois de bien courtes nuits mais tant de bonheur.

Abbréviations

2DE : électrophorèse à deux dimensions

ATCC : American Type Culture Collection

ADN : acide désoxyribonucléique

dNTP : désoxynucléotides

EMBL : European Molecular Biology Laboratory

EDTA : ethylenediamine tetra acetic acid

EELS : Electron Energy Loss Spectroscopy

EFTEM : Energy-Filtered TEM

EryR : resistant à l'érythromycine

IEF : Iso Electro Focalisation

kDa : kilo Dalton

LAB: bactéries lactiques

M : molaire

MCD or CDM: milieu chimiquement défini

MRS : milieu de Man, Rogosa and Sharpe

OD_{600}: Densité Optique à 600 nm

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

RNA : acide ribonucléique

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RT-qPCR : Reverse-Transcription quantitative Polymerisation Chain Reaction

SDS : sodium dodecyl sulfate

SEM : Scanning Electron Microscopy

SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry

subsp : sous-espèce

TEM : Transmission Electron Microscopy

ufc : unité formant colonie

Liste des figures et tableaux non inclus dans les publications

Figure 1 : morphologie de *L. sakei* observée par microscopie électronique à balayage (Plateforme MIMA2, Massy, France).
Figure 2 : Acquisition et devenir du fer et de l'hème chez les bactéries.
Figure 3 : Système FeoABC. Représentation schématique de l'acquisition du fer FeII par le système Feo chez *E. coli* (Cartron *et al.*, 2006).
Figure 4 : Exemples de sidérophores représentatifs et leurs producteurs naturels.
Figure 5 : Représentation schématique de l'acquisition du fer par l'utilisation des sidérophores chez une bactérie à Gram négatif, *Pseudomonas* [selon (Cornelis, 2010)].
Figure 6 : Utilisation du fer complexé à la transferrine par *N. gonorrhoeae* (Siburt *et al.*, 2009).
Figure 7: Représentation schématique des régions génomiques codant pour les composants des systèmes Isd chez *S. aureus*.
Figure 8 : Représentation schématique de l'acquisition directe de l'hème chez *S. aureus* [selon (Tong & Guo, 2009)].
Figure 9 : Régions génétiques des systèmes Isd-like chez *L. monocytogenes*, *C. tetani* et *B. anthracis* [selon (Skaar & Schneewind, 2004)].
Figure 10 : Devenir du fer dans le cytoplasme [selon (Anzaldi & Skaar, 2010)].
Figure 11 : Alignement de séquences de membres des sous-familles Fur, Zur et PerR (Sheikh & Taylor, 2009).
Figure 12 : Comparaison des interprétations de la Fur-box [selon (Baichoo & Helmann, 2002)].
Figure 13 : Représentation schématique de la chaîne de transport minimale d'électrons chez les bactéries lactiques (Lechardeur *et al.*, 2011).
Figure 14 : Principe de la microscopie électronique en perte d'énergie (EELS).
Figure 15 : Principe de la spectrométrie de masse à ionisation secondaire (nanoSIMS)
Figure 16 : Arbre phylogénétique de protéines Fur-like
Figure 17 : Effet de différentes sources A) Hème 5 µM, B) Transferrine 5 µM, C) Hème 1µM et D) Hème 40 µM, sur la croissance et la survie chez les différents mutants de transporteurs.
Figure 18 : Activité catalase des mutants de transporteurs
Figure 19 : Transcription relative de *lsa1366*
Figure 20 : Croissance et survie des mutants *lsa1831* (RV4067) et *lsa1194-1195* (RV4069)

Tableau 1 : souches et plasmides utilisées dans le chapitre 4.
Tableau 2 : Transporteurs cibles de *L. sakei* avec une affiliation au transport de fer ou d'hème.

Valorisation du travail

Articles :

1) P. Duhutrel, C. Bordat, T.-D. Wu, M. Zagorec, J.-L. Guerquin-Kern and M.-C. Champomier-Vergès. Iron sources used by the non pathogenic lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* as revealed by Electron Energy Loss Spectroscopy and Secondary Ions Mass Spectrometry. Applied and Environmental Microbiology, **76**,560-565.

2) P. Duhutrel, F. Baraige, S. Chaillou, M. Zagorec, and M.-C. Champomier Vergès. Characterization of the three Fur paralogs in the Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. Manuscript en preparation.

3) P. Duhutrel, F. Baraige, S. Chaillou, M. Zagorec, and M.-C. Champomier Vergès. Iron and Heme trigger differents responses in *L. sakei*. Manuscript en preparation.

Posters :

1) P. Duhutrel, C. Bordat, J.-L. Guerquin Kern, M. Zagorec and M.-C. Champomier Vergès. Iron sources used by the non pathogenic lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* revealed by Electron Energy Loss Spectroscopy and Secondary Ions Mass Spectrometry imaging. Congrès International BioMetals, 14-18 Juillet 2008, Saint Jacques de Compostelle, Espagne.

2) P. Duhutrel, C. Bordat, J.-L. Guerquin Kern, M. Zagorec and M.-C. Champomier Vergès. Utilisation du fer par une bactérie lactique de la viande : *Lactobacillus sakei*. Journées des Microbiologistes de l'INRA, 5-7 Mai 2010, Futuroscope, Poitiers, France.

3) P. Duhutrel, C. Bordat, J.-L. Guerquin Kern, M. Zagorec and M.-C. Champomier Vergès. Utilisation du fer par une bactérie lactique de la viande, *Lactobacillus sakei*. Colloque Doc'J, INRA, 10-11 Mai 2010, Jouy en Josas, France.

Communications orales :

1) P. Duhutrel, C. Bordat, J.-L. Guerquin Kern, M. Zagorec et M.-C. Champomier Vergès. Utilisation du fer par *Lactobacillus sakei*. Colloque du Club des Bactéries Lactiques, 27-29 mai 2009, Toulouse, France.

2) P. Duhutrel, C. Bordat, J.-L. Guerquin Kern, F. Baraige, S. Chaillou, M. Zagorec, M.-C. Champomier Vergès. *Lactobacillus sakei* utilise le fer et ça lui donne du ressort ! Journées « Sciences du Muscle et Technologies des Viandes » (JSMTV), 19-20 octobre 2010, Clermont-Ferrand, France.

3) P. Duhutrel, C. Bordat, J.-L. Guerquin Kern, F. Baraige, S. Chaillou, M. Zagorec, M.-C. Champomier Vergès. Utilisation du fer par *Lactobacillus sakei*. Colloque du Club des Bactéries Lactiques, 27-29 octobre 2010, Nancy, France.

4) P. Duhutrel, C. Bordat, J.-L. Guerquin Kern, F. Baraige, S. Chaillou, M. Zagorec, M.-C. Champomier Vergès. Iron metabolism in *Lactobacillus sakei*. Fermented Meats, 13.-16 April 2011, Munich, Allemagne.

TABLE DES MATIÈRES

1 INTRODUCTION 9

2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 3

2.1 L'ECOSYSTEME DES PRODUITS CARNES 3
2.1.1 Introduction générale 3
2.1.2 Bactéries pathogènes de la viande 4
2.1.3 Bactéries d'altération de la viande 5
2.1.4 Bactéries positives de la viande 6
2.1.5 Bioconservation 6
2.2 *LACTOBACILLUS SAKEI* 7
2.2.1 Habitats de l'espèce 7
2.2.2 Adaptation à son habitat 8
2.2.3 Diversité de l'espèce 10
2.2.4 Utilisation pour la bioconservation 11
2.3 HOMEOSTASIE DU FER ET DE L'HEME CHEZ LES BACTERIES 14
2.3.1 Aspects généraux 14
2.3.2 Sources de Fer dans l'environnement bactérien 16
2.3.2.1 Sources de fer libre 16
2.3.2.2 Sources de fer complexé 17
2.3.2.3 Autres sources de fer 19
2.3.3 Transport du fer par les bactéries 19
2.3.3.1 Acquisition du fer libre 21
2.3.3.2 Aquisition du fer complexé 26
2.3.3.2.1 Acquisition indirecte 26
2.3.3.2.2 Acquisition directe 26
2.3.3.3 Acquisition de l'hème 29
2.3.3.3.1 Acquisition directe chez les bactéries à Gram négatif 30
2.3.3.3.2 Le récepteur bipartite 30
2.3.3.3.3 Acquisition indirecte chez les bactéries à Gram négatif 30
2.3.3.3.4 Acquisition directe de l'hème chez les bactéries Gram positif 31
2.3.3.3.5 Acquisition indirecte de l'hème par production d'hémophores chez *B. anthracis* 35
2.3.3.4 Senseurs et systèmes d'efflux de l'hème 36
2.3.4 Devenir du fer et de l'hème dans le cytoplasme 38
2.3.4.1 Devenir du fer 38
2.3.4.1.1 Co-facteur protéique 38
2.3.4.1.2 Toxicité 39
2.3.4.1.3 Séquestration du fer 40
2.3.4.2 Devenir de l'hème 42
2.3.4.2.1 Les utilisations principales 42
2.3.4.2.2 Libération du fer 42
2.3.5 Régulation du fer intracellulaire par les bactéries 43
2.3.5.1 Les régulateurs de transcription fer-dépendants de la famille Fur 43
2.3.5.1.1 Les Fur 44
2.3.5.1.2 Modes d'action de la protéine 45
2.3.5.1.3 Les régulateurs qui répondent à d'autres métaux 49
2.3.5.1.4 Les régulateurs qui répondent à d'autres signaux 51
2.4 METABOLISME DU FER ET DE L'HEME CHEZ LES BACTERIES LACTIQUES 52
2.4.1 Le cas de Lactobacillus sakei 53

3 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS 55

4 RÉSULTATS 57

4.1 CHAPITRE 1 : LES SOURCES DE FER UTILISEES PAR *L. SAKEI* 57
4.1.1 Contexte et objectifs 57
4.1.2 Méthodologie 57
4.1.3 Résultats principaux 59
4.1.3.1 Effet physiologique des sources de fer sur *L. sakei* 59
4.1.3.2 Analyse du fer intracellulaire 60

4.1.4 Publication 1 : Iron Sources Used by the Nonpathogenic Lactic Acid Bacterium Lactobacillus sakei as Revealed by Electron Energy Loss Spectroscopy and Secondary-Ion Mass Spectrometry *60*
4.2 CHAPITRE 2 : REGULATION DU FER INTRACELLULAIRE CHEZ *L. SAKEI* 23K 67
4.2.1 Contexte et objectifs *67*
4.2.2 Stratégie *67*
4.2.3 Résultats principaux *67*
4.2.4 Publication 2 : Characterization of three Fur paralogs in the Lactic Acid Bacterium Lactobacillus sakei 23K *69*
4.3 CHAPITRE 3 : L'HEME ET LE FER INDUISENT DES REPONSES DIFFERENTES 114
4.3.1 Contexte et objectifs *114*
4.3.2 Méthodologie *114*
4.3.3 Résultats principaux *114*
4.3.4 Publication 3 : Heme and iron trigger different response in Lactobacillus sakei *115*
4.4 CHAPITRE 4 : TRANSPORT DU FER ET DE L'HEME CHEZ *L. SAKEI* 23K 148
4.4.1 Contexte et objectifs *148*
4.4.2 Méthodologie *148*
4.4.3 Résultats *149*
4.4.4 Conclusions *155*
5 DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES 156
6 RÉFÉRENCES 168

1 INTRODUCTION

Lactobacillus sakei est une bactérie lactique alimentaire, fréquemment isolée de produits animaux tels la viande, le saucisson sec ou le poisson fumé mais aussi d'autres produits comme la choucroute ou le levain. *L. sakei* fait partie de la flore naturelle de la viande fraîche, son habitat préférentiel, et en devient la flore dominante lors de la conservation sous vide et au froid.

Les lactobacilles sont généralement connus pour ne pas être exigeants en fer pour leur croissance. La séquence du génome de la souche *L. sakei* 23K a cependant révélé un équipement complet dédié au métabolisme du fer chez cette espèce. Cette dernière possède des régulateurs de transcription fer-dépendants de la famille Fur (Ferric Uptake Regulator), des transporteurs, à force proton-motrice et de type ATP Binding Cassette, présentant de fortes homologies avec des systèmes décrits chez d'autres espèces et impliqués dans le transport du fer libre et complexé, ainsi qu'une catalase hème-dépendante. Le but de ce projet de thèse est de comprendre pourquoi une bactérie, appartenant à un groupe décrit pour ne pas avoir besoin du fer, possède pourtant un équipement génétique dédié au métabolisme de ce métal.

La première question de cette étude a donc été de savoir si cette bactérie pouvait réellement utiliser le fer.

La deuxième question était de comprendre comment les régulateurs de transcription fer dépendants contribuaient à cette réponse.

La troisième question était de savoir quel était le devenir intra cellulaire du fer.

Pour bien comprendre l'intérêt pour *L. sakei* d'utiliser le fer, nous présenterons une revue bibliographique qui dans un premier temps s'intéressera à l'habitat de *L. sakei.* Nous nous intéresserons ensuite plus particulièrement à l'espèce *L. sakei* pour détailler quels atouts elle possède vis-à-vis de cet habitat. Enfin, nous explorerons les moyens d'utilisation et de régulation du fer chez les bactéries, un élément indispensable pour certaines espèces et à première vue non essentiel pour d'autres. Nous verrons comment des espèces de différents habitats capturent, stockent et gèrent cette ressource.

Nous montrerons, par nos résultats, que *L. sakei* n'est en fait pas indifférente à la présence de fer, notamment sous forme complexée. Cette ressource lui permet d'accroître sa survie en phase stationnaire. Pour démontrer l'accumulation de fer dans le cytoplasme, nous

avons développé une méthodologie d'analyse qui repose sur une approche de microscopie électronique, la perte d'énergie. Cette technique nous a permis de réaliser une cartographie fine du fer intracellulaire.

Nous montrerons que *i*) *L. sakei* utilise les sources de fer de son environnement carné, *ii*) chacun des régulateurs Fur de *L. sakei* appartient à une famille fonctionnelle différente et a un rôle différent dans la physiologie de la bactérie et *iii*) le fer et l'hème induisent des réponses différentes.

Nous étudierons l'implication de différents systèmes de transport dans le métabolisme du fer.

Nous présenterons nos différents résultats et les perspectives qu'ouvre cette étude.

Ce projet de thèse a été financé par une allocation de recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) et mené au sein de l'équipe Flore Lactique et Écosystèmes Carnés (FLEC), Unité Mixte de Recherche MICALIS de l'INRA de Jouy en Josas.

2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 L'écosystème des produits carnés

2.1.1 Introduction générale

Les produits carnés représentent une grande variété de produits de consommation courante dans l'alimentation humaine. Ces produits d'origine animale, frais ou transformés, sont principalement issus de viandes bovine, porcine, ovine ou de volailles et constituent un écosystème à la fois riche et sélectif pour les bactéries résidentes. Les produits carnés frais, en particulier les viandes rouges peuvent être conservées à froid selon 2 modes : conservation à l'air ou sous atmosphère modifiée. Si dans le premier cas la composition gazeuse est unique, elle est variable dans le second cas, avec absence de gaz dans le cas de la conservation sous-vide et avec utilisation de concentrations différentes en O_2, CO_2 et N_2 suivant les pratiques de conservation sous atmosphère protectrice. Les types de conservation influencent de manière diverse les espèces bactériennes. Cependant, ces différentes atmosphères gazeuses agissent de pair avec le substrat lui-même. En effet, la composition biochimique de la matrice, combinée à ces atmosphères variables et stressantes, va constituer de véritables barrières sélectives (Leistner, 1992) favorables aux espèces les mieux adaptées au substrat (Labadie, 1999). Même si la composition des viandes est dépendante de l'origine et de l'espèce animale dont elles sont issues, elles partagent des caractéristiques communes (Fischer & Augustini, 1977). Les viandes contiennent peu de peptides et d'acides aminés assimilables directement par les bactéries et sont pauvres en glucose. En revanche, elles sont riches en fer et en lactate et possèdent un pH acide proche de 5-6. Une telle composition que nous pourrions considérer comme pauvre, associée aux modes de conservation au froid et avec des teneurs variables en gaz, va sélectionner une flore spécifique de la viande.

Même si ils sont initialement stériles, les muscles animaux sont contaminés par différentes espèces bactériennes provenant des animaux (cuir ou flore intestinale) ou de l'environnement de conditionnement (Small *et al.*, 2006). Les espèces qui colonisent l'environnement carné peuvent être divisées en trois groupes : *i*) les bactéries pathogènes pour l'Homme, *ii*) les bactéries d'altération de la viande et *iii*) les bactéries positives pour l'écosystème carné (Champomier Vergès *et al.*, 2010). Des méthodes de conservation associées à des règles d'hygiène strictes sont mises en œuvre afin de limiter le développement

des flores négatives et de potentiellement favoriser celui des flores positives. Comme nous l'avons déjà dit, pour les bactéries résidentes de cet écosystème, ces méthodes de conservation constituent de véritables conditions de stress : variations de la teneur en oxygène, basse température, salinité ou encore modifications du pH. De plus, les aliments à base de muscles transformés sont très sensibles aux réactions d'oxydoréduction dues à la présence d'espèces réactives de l'oxygène (Morrissey *et al.*, 1998). Le hachage par exemple, augmente la surface du produit carné en contact avec le milieu et libère entre autres des molécules oxydantes comme le fer ou l'hème qui catalysent les réactions redox (McBride *et al.*, 2007). Ce procédé peut ainsi entrainer une inhibition de certaines espèces, comme *Yersinia enterocolitica* (Doherty *et al.*, 1995). Cet effet barrière (Leistner, 1992) est donc délétère pour certaines espèces, notamment les bactéries d'altération ou pathogènes, ou au contraire peut favoriser le développement d'espèces positives, appartenant le plus souvent au groupe des bactéries lactiques, comme l'espèce *L. sakei*. Le fait de provoquer le développement de flores positives fait appel à la notion de bioconservation.

2.1.2 Bactéries pathogènes de la viande

Heureusement pour les produits carnés, qu'ils soient frais ou transformés, la contamination par des bactéries potentiellement dangereuses pour la santé du consommateur n'est qu'occasionnelle. Le taux acceptable de contamination par ces espèces répond à des normes strictes au niveau national ou européen, propres à chaque espèce, et fait l'objet de nombreux contrôles depuis l'éleveur jusqu'aux ateliers de découpe et de transformation. Les bactéries pathogènes le plus souvent incriminées dans les cas d'infections alimentaires dues aux produits carnés sont *Escherichia coli* O157:H7 (Nastasijevic *et al.*, 2009), *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens, Clostridium difficile* (Broda *et al.*, 2009, Moschonas *et al.*, 2009), *Salmonella spp* et *Campylobacter*. Ces flores ne sont pas en mesure de dominer la flore naturelle et ne sont donc généralement présentes qu'en faibles quantités. De ce fait, elles ne modifient pas les qualités organoleptiques et visuelles des produits, ce qui rend leur détection plus délicate. Leur pouvoir pathogène est généralement très élévé et quelques bactéries peuvent suffir (100 cfu/gramme pour *Listeria* par exemple) à rendre les consommateurs malades.

Rappelons cependant que 25% des cas de toxi-infections alimentaires sont dues aux produits carnés. Même si le nombre de cas d'infections baisse, la crainte des consommateurs conduit à une demande pour une meilleure qualité hygiénique des aliments avec un minimum de procédés, peu de conservateurs ou d'additifs et un maintient des qualités organoleptiques.

2.1.3 Bactéries d'altération de la viande

Contrairement aux espèces pathogènes, ces espèces bactériennes n'engendrent pas systématiquement de risques sanitaires graves pour le consommateur mais elles constituent en revanche un problème économique important pour les producteurs de la filière viande. Un développement important de ces bactéries, ou la production de certains métabolites génèrent des modifications du goût, de la couleur ou de la texture du produit. Ces altérations sont généralement bien visibles : gonflement de l'emballage, odeur désagréable ou modification de la couleur du produit. Ceci conduit au retrait du marché et à la destruction pure et simple de lots entiers de viande.

Dans la viande bovine, les espèces d'altération les plus fréquemment retrouvées sont *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Brochothrix thermosphacta* ainsi que des entérobactéries des genres *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Acinetobacter* ou *Providencia*. Il a également été décrit des espèces de *Clostridium* ainsi que quelques espèces de bactéries lactiques des genres *Leuconostoc*, *Weissella* et *Carnobacterium* (Champomier Vergès *et al.*, 2010).

L'espèce *P. fragi* est fréquemment isolée de la viande bovine conservée au froid, sur laquelle son développement en grande quantité provoque un aspect poisseux. Cette espèce de l'environnement étant psychrotrophe, elle constitue une flore qui se développe aisément dans les abattoirs où elle va coloniser la surface des viandes stockées.

B. thermosphacta est une bactérie qui se développe sur la viande avec comme conséquence la production d'une odeur rance (Ercolini *et al.*, 2006). Alors que la viande constitue une niche écologique importante pour cette espèce, *B. thermosphacta* est relativement sensible aux procédés de transformation de la viande. Ainsi, elle se développe aisément à la surface de pièces de viande stockées indifféremment en aérobiose ou anaérobiose mais elle n'est capable de croître que sur la viande hachée issue de pièces stockées en conditions aérobies (Crowley *et al.*, 2010).

Dans la viande, le développement de *Leuconostoc gasicomitatum* produit du gaz conduisant au gonflement de l'emballage, à une odeur acide et à un verdissement de la viande rouge (Vihavainen & Bjorkroth, 2009). D'autres bactéries lactiques, *Weissella viridescens* et *Weissella hellenica*, conduisent également à des phénomènes d'altération de la viande (Champomier Vergès *et al.*, 2010). A noter que les genres *Leuconostoc* et *Weissala* sont génétiquement proches (Schillinger *et al.*, 2008).

2.1.4 Bactéries positives de la viande

Ces bactéries sont inoffensives aussi bien pour la santé humaine que pour le produit, et peuvent pour certaines être bénéfiques au produit. Les espèces du groupe des bactéries lactiques constituent généralement la majeure partie de ces bactéries. Les bactéries de ce groupe possèdent un rôle important dans l'économie industrielle pour la production et la conservation de nombreux produits alimentaires et sont aussi décrites comme ayant un effet positif sur la santé humaine (Williams, 2010). Les bactéries lactiques qui colonisent la viande appartiennent aux espèces *L. sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fuchuensis* et *Lactobacillus plantarum* ou encore des bactéries du genre *Pediococcus*. D'autres espèces n'appartenant pas au groupe des bactéries lactiques se développent également comme *Staphylococcus xylosus* et *Staphylococcus carnosus*.

Ces espèces, qui peuvent se développer en grand nombre sur la matrice carnée, sont capables de produire des molécules antibactériennes (bactériocines, acide lactique et H_2O_2) et d'entrer en compétition pour les nutriments avec les autres espèces de l'écosystème. Elles génèrent donc une barrière naturelle contre d'autres espèces négatives de l'écosystème. Ces aptitudes à dominer l'écosystème font que certaines espèces comme *L. sakei* et *S. xylosus* sont utilisées depuis les années 1950 comme ferments pour la production du saucisson sec.

2.1.5 Bioconservation

La bioconservation est une méthode naturelle de conservation des aliments. Elle est définie comme l'utilisation de la flore naturelle ou de ses métabolites pour conserver les aliments (Stiles, 1996, Champomier Vergès *et al.*, 2010). On parle alors de cultures protectrices qui sont décrites comme "des cultures antagonistes, ajoutées aux aliments pour inhiber la croissance de bactéries pathogènes et/ou allonger leur durée de conservation en modifiant le moins possible leurs qualités organoleptiques" (Lucke, 2000). Les bactéries lactiques jouent ici un rôle majeur car elles sont propres à la consommation (QPS = Qualified Presumption of Safety) et durant la modification et la conservation, elles dominent naturellement la flore endogène de nombreux produits et notamment les viandes (Vignolo *et al.*, 2008).

Encore controversée dans les produits de la mer (Leroi, 2010), la bioconservation des produits laitiers et carnés grâce aux bactéries lactiques est en plein essor. Les bactéries lactiques ont une large distribution naturelle dans ces produits de consommation quotidienne. Dans la viande, l'espèce *L. sakei* représente la flore dominante utilisée dans de nombreux

procédés industriels et serait alors un candidat de choix pour la bioconservation. Pour mieux comprendre l'implantation de cette espèce dans la matrice carnée, nous allons commencer par présenter cette bactérie.

2.2 *Lactobacillus sakei*

L'origine du nom de cette espèce trouve ses racines en 1934 lorsqu'elle est isolée en tant que contaminant de la fermentation de l'alcool de riz japonais, le saké (Katagiri *et al.*, 1934, Kagermeier-Callaway & Lauer, 1995). Initialement nommée *L. sake*, elle est rebaptisée *L. sakei* en 1997 selon les recommandations deTrüper et de Clari (Truper & de Clari, 1997).

L'hétérogénéité phénotypique de l'espèce et la proximité avec une autre espèce résidente de la viande, *L. curvatus*, ont par le passé rendu difficile l'identification correcte des souches de *L. sakei*. La fermentation du mélibiose et l'hydrolyse de l'arginine par la voie arginine désiminase sont deux critères phénotypiques utilisés pour distinguer les deux espèces : *L. sakei* est positif aux deux tests tandis que *L. curvatus* y est négatif (Montel, 1985, Klein *et al.*, 1996a). Par ailleurs, des expériences d'hybridation ADN-ADN ont montré que *L. curvatus* et *L. sakei* sont clairement séparés au niveau génomique avec moins de 50% d'identité (Champomier *et al.*, 1987). Alors que l'hétérogénéité phénotypique de l'espèce était connue, des travaux récents ont révélé également la grande diversité génomique de l'espèce avec 25% de variation de la taille des génomes (Chaillou *et al.*, 2009).

2.2.1 Habitats de l'espèce

La viande est l'habitat naturel de *L. sakei* même si son réservoir naturel reste inconnu. L'espèce *L. sakei* montre une large diversité de profils fermentaires, la rendant difficile à classer sur cet aspect phénotypique. Des hybridations ADN-ADN sur 13 souches ont permis de démontrer qu'il s'agit pourtant d'un groupe génomique homogène (Champomier *et al.*, 1987). Cette homogénéité a été confirmée par les travaux ultérieurs d'autres équipes (Korkeala *et al.*, 1988, Hertel *et al.*, 1991, Klein *et al.*, 1996a). Nous savons aussi que *L. sakei* devient la flore dominante lorsque la viande est conservée sous vide.

Plusieurs études ont montré que *L. sakei* était capable de mener une fermentation naturelle dans différents produits comme le salami grec (Samelis *et al.*, 1994) ou la saucisse sèche italienne (Conter *et al.*, 2005) mais n'est pas retrouvée dans la saucisse sèche turque (Adiguzel & Atasever, 2009). *L. sakei* est cependant une des bactéries le plus fréquemment utilisée comme culture starter pour la fermentation de la viande (Ammor *et al.*, 2005a,

Cocconcelli, 2007). Ajoutée à 10^6 cfu/g, elle peut atteindre 10^8 cfu/g dans le produit fini (Ammor *et al.*, 2005b).

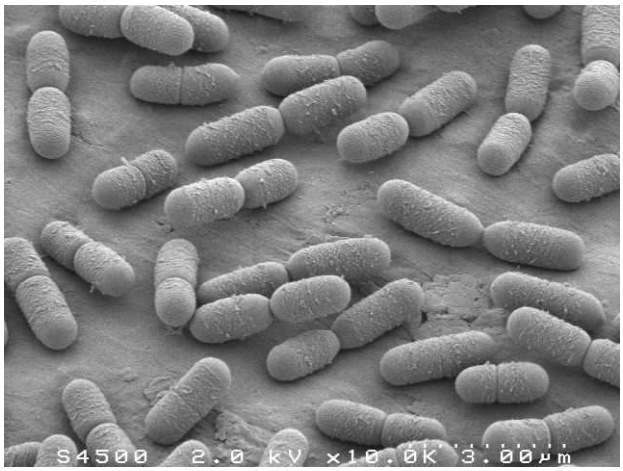
Cependant, la viande n'est pas l'unique écosystème alimentaire où *L. sakei* peut être trouvée. Quelques souches ont été isolées de l'ensilage, de la choucroute, du levain et du poisson fumé (Champomier Vergès *et al.*, 2002) et même récemment d'anchois crûs ou salés ou de poulpe sèché salé (Najjari *et al.*, 2008) et de Kimchi (Park *et al.*, 2008).

Par ailleurs, la présence de *L. sakei* a été décrite dans les fèces humains (Walter *et al.*, 2001, Heilig *et al.*, 2002, Dal Bello *et al.*, 2003, Chiaramonte *et al.*, 2009, Qin *et al.*, 2010) et on a estimé sa concentration à 10^6 cfu/g de fèces. Il a été montré également que dans le tractus digestif murin, son implantation n'est que transitoire (Chiaramonte *et al.*, 2009). On peut cependant penser que cette espèce appartient au microbiote d'animaux utilisés pour la production de viande, bien que sa présence n'ait pas encore été décrite chez d'autres mammifères que l'Homme et seulement récemment dans les intestins de salmonidés (Balcazar *et al.*, 2007).

2.2.2 Adaptation à son habitat

L. sakei se présente sous forme de bâtonnets (Figure 1) avec des extrémités arrondies (0,6 à 0,8 µm par 2 à 3 µm de long), souvent courbés ou irréguliers particulièrement en phase stationnaire de croissance et groupés par paires ou chaînes courtes. Le GC% du chromosome est de 42-44 mol%. Aucune croissance n'est possible à 45°C même si la plupart des souches peuvent pousser de 4°C à 42°C. *L. sakei* appartient au groupe hétérofermentaire facultatif (Klein *et al.*, 1996a, Stiles & Holzapfel, 1997).

Figure 1 : morphologie de *L. sakei* observée par microscopie électronique à balayage (Plateforme MIMA2, Massy, France).



Pour mieux comprendre les facteurs impliqués dans l'adaptation de *L. sakei* à la viande, il est intéressant de considérer cet environnement comme un substrat nutritionnel permettant le développement sélectif de diverses espèces bactériennes qui y coexistent, y croissent et rivalisent.

Parmi ces contraintes technologiques et nutritives, les bactéries de la viande doivent se procurer des éléments essentiels à leur développement, notamment le fer.

L'arginine présente dans la viande peut être catabolisée par l'arginine desiminase (Zuniga *et al.*, 1998, Champomier Vergès *et al.*, 1999). Le glucose et le ribose sont les sucres principaux de la viande. *L. sakei* 23K possède peu de transporteurs pour l'assimilation des sucres. On note la présence de six systèmes phosphotransférase (PTS) pour importer le glucose et le mannose, le N-acétylglucosamine, le fructose, le saccharose, le tréhalose et le cellobiose. Certaines souches de *L. sakei* sont aussi capables de fermenter le lactose et le galactose (Lauret *et al.*, 1996). *L. sakei* est hétérofermentaire facultative, ainsi la fermentation des héxoses est homolactique et réalisée par glycolyse anaérobie. Le ribose, l'arabinose et le gluconate sont eux fermentés par la voie hétérolactique, aussi appelée voie phosphocétolase. Des voies cataboliques existent pour trois carbohydrates : *i*) le glycérol, *ii*) le malate et *iii*) le citrate (Chaillou *et al.*, 2005). Le D-lactate et le L-lactate sont produits pendant la fermentation des sucres, mais seule la L-lactate déhydrogénase est présente, la conversion du L-lactate en D-lactate étant catalysée par une lactate-racémase (Maleret *et al.*, 1998). La séquence du génome a également permis d'identifier des gènes dont les produits seraient impliqués dans des voies cataboliques atypiques pour des lactobacilles, comme le catabolisme de l'acide sialique et la voie glycolytique alternative du méthylglyoxal utile en conditions de carence en glucose.

La séquence du génome de la souche *L. sakei* 23K a permis de mieux comprendre quels peuvent être les facteurs d'adaptation de cette espèce à l'écosystème carné (Chaillou *et al.*, 2005). La viande est un substrat riche en protéines libérant des acides aminés pendant son vieillissement. *L. sakei* 23K est une bactérie auxotrophe pour tous les acides aminés exceptés les acides aspartique et glutamique, probablement obtenus par déamination de l'asparagine et de la glutamine (Lauret *et al.*, 1996, Chaillou *et al.*, 2005).

Les procédés technologiques de traitement de la viande génèrent des changements de teneurs en oxygène et de potentiel redox, conduisant à la formation de molécules toxiques comme l'ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et d'hydropéroxydes organiques. *L. sakei* est aussi capable de croître à basse température (4°C) et jusqu'à 9% de sels (Marceau *et al.*, 2004), des conditions rencontrées lors du stockage ou de la conservation des produits carnés. L'analyse du génome a révélé que *L. sakei* 23K est bien équipée pour faire face aux variations d'oxygène et possède notamment des enzymes permettant d'éliminer les espèces réactives de l'oxygène : elle

possède une superoxyde-dismutase (SodA), deux NADH oxydases (Nox), quatre péroxydases et une catalase hème-dépendante (KatA) (Chaillou *et al.*, 2005).
Aucune protéine contenant des domaines de fixation au mucus n'a été identifiée mais on retrouve de nombreux clusters génétiques CSC (Clusters of Surface Complexes) qui pourraient être impliqués dans l'adhésion à la matrice carnée. Une protéine candidate pour la formation de biofilm montre 37% d'homologie avec la protéine BAP (Biofilm Associated Protein) décrite chez *S. aureus* (Lasa & Penades, 2006).

Une autre originalité a également été dévoilée. Alors que les lactobacilles sont considérés comme une exception dans le monde microbien car ils n'exigent pas de fer pour leur croissance (Archibald, 1983, Bruyneel *et al.*, 1989, Weinberg, 1997, Imbert & Blondeau, 1998), le génome a révélé la présence de gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme du fer. Ainsi *L. sakei* possède deux opérons codant pour des ABC transporteurs potentiellement impliqués dans le transport de fer complexé dont un de type Fhu, deux opérons codants pour des ABC transporteurs à Manganèse-Fer de type MtsABC, trois régulateurs de transcription de la famille Fur (Ferric Uptake Regulator) ainsi qu'un régulateur de type DtxR, sans oublier la catalase (KatA) hème-dépendante déjà connue (Knauf *et al.*, 1992). Par ailleurs, *L. sakei* ne possède pas de voie de synthèse de l'hème. Il est donc logique de penser que l'adaptation de *L. sakei* à l'écosystème carné puisse également passer par une/des fonctionalité(s) en lien avec le métabolisme du fer et de l'hème dont la viande est riche.

L. sakei semble donc être une bactérie lactique bien adaptée à sa niche écologique où elle est naturellement présente. En particulier, l'analyse du génome met en avant la présence d'équipements spécifiques permettant à *L. sakei* de gérer les stress oxydants, les sources de carbone et les éléments essentiels, ainsi que de proliférer et de coloniser la surface de la viande.

2.2.3 Diversité de l'espèce

Des études basées sur des caractéristiques biochimiques et physiologiques ont décrit une grande hétérogénéité phénotypique des souches de *L. sakei*. Des empreintes protéiques cellulaires totales et une analyse RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) ont conduit à conclure que l'espèce *L. sakei* pourrait être divisée en deux sous-groupes (Klein *et al.*, 1996b, Berthier & Ehrlich, 1999). Ces sous-groupes sont décrits comme les deux sous-espèces *L. sakei* subsp. *sakei* et *L. sakei* subsp. *carnosus*. McLeod *et al* (McLeod *et al.*, 2008)

ont examiné en 2008 la biodiversité de 10 souches de *L. sakei* isolées de l'alimentation en utilisant des tests phénotypiques et des techniques d'empreinte protéomique identifiant deux groupes génétiques. Cependant, ces groupes génétiques ne sont pas corrélés avec des groupes phénotypiques obtenus en analysant la fermentation des sucres. Chaillou *et al* (Chaillou *et al.*, 2009) en 2009, après analyse *in silico* du génome de *L. sakei* 23K ont identifié 27 îlôts génomiques et près de 50 gènes probablement issus de transferts horizontaux. Des expériences d'hybridation soustractive ont permis d'identifier de nouveaux gènes absents de la souche séquencée. Une collection de 73 souches sélectionnées pour représenter une large diversité d'origine de substrats carnés et de zones géographiques a été criblée sur la présence ou l'absence d'une soixantaine de gènes discrimants. Ainsi, une dizaine de clusters de souches ont été décrits. L'étude révèle une large dispersion de l'origine des souches au sein des clusters. Cette étude a également révélé les différences de taille des génomes de l'espèce *L. sakei*, s'étalant de 1815 kb à 2310 kb soit près de 25% de variation. On notera ici que la taille moyenne des génomes de *L. sakei* subsp *sakei* est de 2100 kb contre 2000 kb pour la sous espèce *carnosus*, rendant ce caractère non efficace pour distinguer les sous-espèces. Cette étude, menée sur un pannel plus large que la précédente (73 souches contre 10) montre clairement que l'espèce *L. sakei* est représentée par un ensemble de 10 clusters génomiques. En se référant au système de classification déjà établi, basé sur des profils protéiques et principalement sur celui de la protéine Gap, la sous-espèce *carnosus* représenterait 7 clusters et la sous-espèce *sakei* 3 clusters. Une hétérogénéité génomique ressort au sein des clusters, tels par exemple, des réarrangements génomiques, des intégrations ou des délétions. L'ensemble de ces observations suggère des phénomènes adaptatifs de l'espèce aux différents habitats qu'elle colonise.

2.2.4 Utilisation pour la bioconservation

Dans les produits carnés, sa capacité à coloniser cet écosystème fait de *L. sakei* un candidat intéressant pour la bioconservation. Dès 1999, il a été observé que des souches de bactéries lactiques isolées de plats cuisinés à base de viande montraient des effets inhibiteurs sur la croissance de *L. monocytogenes* et *E. coli* O157:H7 (Bredholt *et al.*, 1999). Les cinq bactéries lactiques utilisées pour l'étude appartenaient toutes à l'espèce *L. sakei* et il a alors été proposé pour la première fois d'utiliser cette espèce comme culture protectrice pour la conservation des produits carnés. En effet, *L. sakei* peut produire du péroxyde d'hydrogène à partir de l'oxygène et les souches produisant du péroxyde d'hydrogène ont souvent des effets antibactériens contre des contaminants dans la nourriture (Condon, 1987). Cependant, la

production de péroxyde d'hydrogène peut affecter la qualité du produit fini en apportant entre autre des défauts de coloration ou une saveur rance (Hertel *et al.*, 1998). Toutefois, *L. sakei* possède une catalase hème-dépendante (KatA) qui réduit le péroxyde d'hydrogène et est active dans l'écosystème carné riche en hème ce qui minimise ce problème. Comme *L. sakei* 23K ne possède pas de voies cataboliques pour l'histamine et la tyrosine (Chaillou *et al.*, 2005), elle ne produit pas d'amines biogènes néfastes pour la santé humaine. On note également la présence de quelques gènes qui pourraient être impliqués dans la production d'hypothiocyanate, molécule bactériostatique efficace contre les bactéries à Gram négatif, bien que leur fonction n'ait pu être démontrée (Jones *et al.*, 2008).

Une autre caractéristique importante pour la bioconservation est la capacité des bactéries à produire des bactériocines. Bien que la séquence du génome de la souche 23K ne révèle pas de gènes complets codant pour des bactériocines, l'espèce *L. sakei* est connue pour être productrice de ces molécules. Les bactériocines produites par des souches de *L. sakei* sont appelées sakacines. Les sakacines K, A, M, P, G, T, X et la lactocine S ont été isolées et caractérisées de souches de *L. sakei* (Sobrino *et al.*, 1992, Tichaczek *et al.*, 1994, Hugas *et al.*, 1995, Champomier Vergès *et al.*, 2002, Simon *et al.*, 2002, Vaughan *et al.*, 2004) et possèdent des effets inhibiteurs contre des espèces d'*Enterococcus*, de *Carnobacterium*, et contre *L. monocytogenes*. De plus, il a été montré que des cultures de la souche *L. sakei* 10A, non bactériocinogenique, pourraient prolonger la durée conservation de plats de viande préparées (Vermeiren *et al.*, 2006b). *L. sakei* possède également la capacité à inhiber la croissance de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé, sans produire de sakacineP (Katla *et al.*, 2001), et de *Listeria innocua* dans le jambon en tranches (Hequet *et al.*, 2007). Une souche de *L. sakei* a montré, lorsqu'elle est combinée avec *L. curvatus*, une activité anti-*Listeria* sur la viande de bœuf fraîche et sur la viande de volaille (Dortu *et al.*, 2008). En utilisant des cultures starters sélectionnées à partir de la flore endogène, il est possible d'améliorer la sécurité sanitaire pendant la préparation de saucissons secs français, en inhibant *L. monocytogenes* (Talon *et al.*, 2008).

Outre sa faculté à produire des composés antibactériens, *L. sakei* pourrait priver les bactéries pathogènes ou d'altération de certaines ressources, que ce soit les sucres ou bien encore des éléments essentiels à leur développement comme le fer. Cette dernière hypothèse a d'ailleurs été formulée par Kot *et al* en 1995 (Kot *et al.*, 1995). En effet, le fer est un élément essentiel à la croissance des bactéries pathogènes et d'altération (Champomier *et al.*, 1987, Ratledge & Dover, 2000). Dans ce cas, si la flore endogène, par définition importante et adaptée, est capable d'importer le fer, elle prive potentiellement les espèces indésirables de cette ressource. Contrairement aux bactéries lactiques et notamment aux lactobacilles, des

bactéries comme *L. monocytogenes* sont affectées dans leur développement en absence de fer (Simon *et al.*, 1995, Jin *et al.*, 2006).Cet effet n'est d'ailleurs pas sans rappeler l'une des plus importantes défenses innées du corps humain où le fer est virtuellement inaccessible (10^{-18} M) pour les bactéries pathogènes (Bullen *et al.*, 1999).

2.3 Homéostasie du Fer et de l'Hème chez les bactéries

2.3.1 Aspects généraux

Le fer est l'un des éléments les plus abondants sur Terre. Il représente près de 34% en masse de la planète (Morgan & Anders, 1980). Appartenant à la première série des métaux de transition, il possède une excellente conductivité des électrons. Cette propriété en fait un co-facteur essentiel dans les systèmes biologiques, des bactéries à l'Homme. Les besoins intracellulaires en fer peuvent représenter jusqu'à 1,8% du poids sec chez les bactéries (Rouf, 1964). Bien qu'il s'agisse d'un élément très abondant, il est très peu accessible.

En présence d'oxygène, le fer est rapidemment oxydé sous formes d'oxydes de FeII (rare), de FeIII ou FeII/III qui sont minéralisés respectivement en wustite, hématite et magnétite. En solution, le fer est présent sous deux formes ioniques : ferreuse (FeII), en conditions réductrices (solubilité 0,1 M à pH 7) ou ferrique (FeIII), soluble en milieu acide (et seulement 10^{-18} M à pH 7).

Dans notre atmosphère, riche en oxygène, le fer libre est donc majoritairement minéralisé et peu accessible pour les bactéries telles *Pseudomonas fluorescens* (Mirleau *et al.*, 2000), *Listeria monocytogenes* (Barchini & Cowart, 1996) ou *Agrobacterium tumefaciens* qui peuplent les milieux acellulaires, aquatiques ou le sol. En conditions anaérobies, le fer libre se trouve sous forme réduite ou ferreuse soluble et plus accessible aux organismes vivants. Ces conditions sont par exemple rencontrées par les bactéries du tractus digestif, les bactéries des fonds marins ou les bactéries utilisées dans les boues d'épuration qui sont des environnements pauvres en O_2. Quel que soit leur habitat, environnement ou système biologique, la plupart des bactéries doivent faire face à une carence quasi perpétuelle en fer (Weinberg, 1978).

L'Homme et les animaux acquièrent le fer par leur alimentation, même s'ils absorbent mieux le fer de la viande (fer héminique) que des plantes (fer non héminique). Dans les systèmes biologiques, le fer est très rarement libre car il est très réactif et la majorité de cet élément est sous forme de fer héminique, c'est-à-dire lié à la molécule de protoporphyrine IX (PPIX). Plus de 95% du fer dans le corps humain est localisé à l'intérieur des cellules, inclus le plus souvent dans des protéines à hème ou hémoprotéines comme l'hémoglobine dans les érythrocytes ou la myoglobine dans les muscles. Le fer et l'hème restant sont extracellulaires et sont peu tolérés par l'organisme qui les prend en charge rapidemment grâce à des protéines circulantes comme la transferrine pour l'ion fer ou l'hémopexine pour la molécule d'hème. Finalement, dans les fluides humains, le niveau de fer disponible est si bas que ceci les rend

bactériostatiques (Griffiths & Williams, 1999). Les bactéries pathogènes sont donc confrontées à une faible accessibilité au fer (Bullen *et al.*, 1999). Des bactéries comme *S. aureus* ou *L. monocytogenes* ont absolument besoin du fer pour se multiplier. Elles à s'en procurent aux détriments de leur hôte ce qui conduit aux processus infectieux (Skaar & Schneewind, 2004, Jin *et al.*, 2006). Pour ces bactéries, il s'agit d'un signal pour activer l'expression d'un panel de protéines nécessaires à la survie et à la colonisation, comme des gènes codant pour des transporteurs ou des hémolysines.

Le fer possède un rôle important comme centre catalytique d'enzymes d'oxydoréduction. Ces enzymes sont impliquées dans le transport d'électrons, l'activation de l'oxygène, la résistance aux stress péroxydes, la photosynthèse et la synthèse de molécules comme les acides aminés ou l'ADN. La quantité de fer nécessaire pour assurer une croissance optimale est propre à chacune des espèces bactériennes et si elles sont difficiles d'accès, les ressources en fer pour les bactéries sont nombreuses. Le fer est donc un élément important pour le développement bactérien mais aussi pour la virulence lors d'infections, c'est pourquoi beaucoup d'études ont été menées chez des espèces pathogènes.

Comme pour les nutriments, les bactéries doivent accumuler le fer dans leur cytoplasme contre son gradient de concentration et ce même si le fer est soluble. Cette accumulation exclut les transports par diffusion simple qui ne pourraient permettre d'assurer les besoins. C'est aussi vrai pour la molécule d'hème qui malgré sa potentielle diffusion au travers des porines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Genco & Dixon, 2001), ne peut pas diffuser librement au travers des membranes plasmiques des bactéries (Light & Olson, 1990, Létoffé *et al.*, 2006). Ceci nécessite alors des systèmes de transport spécialisés qui utilisent de l'énergie.

Dans l'hème, le fer est encore plus réactif, son utilisation doit également être finement régulée car l'hème peut présenter un effet toxique pour les cellules bactériennes à trop forte concentration. Le seuil de sensibilité à l'hème varie selon les espèces. Ainsi, on observe une toxicité chez *Helicobacter pylori* dès 15,6 nM (Senkovich *et al.*, 2010) alors que *Corynebacterium diphteriae* peut tolérer jusqu'à 10 µM (Bibb & Schmitt, 2010).

La surcharge en fer ou en hème étant toxique pour les bactéries, leur acquisition et leur utilisation doivent donc être finement régulées. Ainsi, les gènes impliqués dans l'utilisation du fer sont exprimés quand le fer est présent à l'inverse des gènes impliqués dans son acquisition qui sont plus fortement exprimés en cas de faible abondance dans des espèces comme *E. coli* ou *Salmonella typhimurium* (Hantke, 2001). La disponibilité en fer est perçue au niveau du cytoplasme par des régulateurs de transcription spécialisés, fer-dépendants, le plus souvent de

la famille des Ferric Uptake Regulators (Fur). Ces régulateurs sont généralement des répresseurs en présence de fer. Ils vont se fixer aux promoteurs de gènes de transport par exemple. Ceci permet à la cellule de maintenir un taux convenable de fer.

Pour résumer, le fer est un élément abondant (Andrews *et al.*, 2003, Morgan & Anders, 1980), important pour la cellule, difficile d'accès et très réactif. Nous allons maintenant détailler les propriétés des sources de fer à portée des bactéries, et quels systèmes ces dernières ont développé pour acquérir et réguler cet élément.

2.3.2 Sources de Fer dans l'environnement bactérien

2.3.2.1 Sources de fer libre

Malgré sa forte abondance sur Terre, le fer libre est très peu accessible biologiquement et n'est disponible qu'en conditions anaérobies ou réductrices.

Fer insoluble ou minéralisé

En conditions aérobies, le fer est présent majoritairement sous forme ferrique et se trouve minéralisé sous des formes très difficiles d'accès pour les bactéries. La réduction du fer ferrique en fer ferreux est une étape primordiale pour incorporer le fer dans les enzymes.

Alors que cette étape est généralement cytoplasmique, certaines bactéries ont développé des systèmes de réductases extracellulaires dont l'existence a été à plusieurs reprises mentionnée (Schröder *et al.*, 2003). L'activité de telles enzymes a été détectée dans des bactéries comme *L. monocytogenes* où l'enzyme serait liée à la surface ou sécrétée dans le milieu. Cette activité est dépendante de la présence du NADH, de flavine mononucléotide (FMN) et de Mg^{2+} mais l'enzyme n'a pu être purifiée (Barchini & Cowart, 1996). La seule réductase extracelullaire qui ait été isolée est celle de *Mycobacterium paratuberculosis* mais chez qui la flavine ne semble pas requise pour l'activité (Homuth *et al.*, 1998). Cette activité réductase extracellulaire a pourtant pu être détectée chez *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *S. typhimurium* (Vartivarian & Cowart, 1999).

Grâce à cette activité, le fer insoluble ou minéralisé pourrait constituer une source pour de nombreuses bactéries.

2.3.2.2 Sources de fer complexé

Hème

La forme la plus abondante de fer dans les systèmes biologiques (à hauteur de 95%) est le fer héminique ou hème. Nommé hémine lorsque le fer est oxydé ou hématine lorsqu'il est réduit, pour une meilleure compréhension, il ne sera utilisé que le terme hème.
L'hème est une molécule circulaire, la protoporphyrine IX, contenant en son centre un atome de fer lié par quatre résidus pyrolle (noyau tétrapyrolle). Les porphyrines sont les co-facteurs enzymatiques les plus colorés et les plus abondants dans la nature (Modun & Williams, 1999), que ce soit dans la chlorophylle (Mg-tétrapyrrole) ou l'hémoglobine (Fe-tétrapyrrole).

L'hème peut représenter pour les bactéries soit une source de fer et de porphyrine pour des espèces comme *S. aureus* (Skaar *et al.*, 2004b), *Enterococcus faecalis* (Frankenberg *et al.*, 2002), ou *Haemophilus influenzae* (Morton *et al.*, 2009), soit uniquement une source de porphyrine comme chez l'espèce *Lactococcus lactis* (Pedersen *et al.*, 2008).

Hémoprotéines

Dans les systèmes biologiques, la quasi-totalité de l'hème est associée aux hémoprotéines comme l'hémoglobine ou la myoglobine qui peuvent constituer elles-mêmes des sources de fer et/ou de porphyrine pour les bactéries.

L'hémoglobine (80 kDa) est la protéine de transport de l'oxygène, qui est localisée dans les érythrocytes. Elle se présente sous la forme d'un tétramère (2α et 2β) et chaque sous-unité fixe une molécule d'hème de façon covalente. L'hémoglobine, ajoutée dans un milieu déplétée en fer, est suffisante comme seule source de fer pour supporter la croissance de bactéries comme *Yersinia pestis* (Thompson *et al.*, 1999) ou *Neisseria meningitidis* (Bracken *et al.*, 1999).

La myoglobine (17 kDa) est une protéine abondante dans le muscle et lui confère sa couleur rouge. Contrairement à l'hémoglobine, l'hème n'est pas lié de façon covalente à la protéine et aucun système de transport spécifique de la myoglobine n'a été décrit. Aucune interaction directe de la myoglobine avec la surface bactérienne n'a été montrée jusqu'à présent, et il est donc vraisemblable que l'utilisation de la myoglobine relève des systèmes de transport d'hème uniquement.

Hémopexine et Haptoglobine

Dans certaines circonstances, comme lors de la lyse des érythrocytes, l'hème et l'hémoglobine peuvent se retrouver libres dans la circulation sanguine.

Molécule hautement réactive, l'hème est fixée immédiatement par l'hémopexine (Tolosano & Altruda, 2002). L'hémopexine constitue une source de fer pour certaines bactéries comme *H. influenzae*. Ainsi, le système HxuCBA de *H. influenzae* est capable d'utiliser spécifiquement le complexe hème-hémopexine comme source de fer et d'hème (Miethke & Marahiel, 2007). Récemment, l'intéraction de HxuA avec l'hème ou l'hème-hémopexine a été démontrée (Fournier *et al.*, 2011).

L'hémoglobine libre n'est pas tolérée par le corps, elle est donc rapidemment prise en charge par l'haptoglobine. Ce complexe haptoglobine-hémoglobine peut également constituer une source de fer ou d'hème pour des bactéries comme *N. meningitidis* (Lewis & Dyer, 1995).

Transferrine/lactoferrine

Les protéines synthétisées par l'hôte pour fixer et/ou transporter le fer libre, telles que la transferrine et la lactoferrine constituent un réservoir important de fer pour les bactéries.

La transferrine est une protéine du sérum, elle fait partie du système immunitaire inné et sert au transport et au contrôle de la concentration de fer libre. Elle est constituée d'une seule chaîne protéique bilobée d'approximativement 80 kDa.

La transferrine possède deux sites de fixation du fer. Le site a est plutôt associé à la fixation du fer à bas pH et est localisé dans la région NH_2 terminale. Le site b est localisé dans la région C-terminale et fixerait le fer à des valeurs de pH neutres ou physiologiques. Ces sites semblent posséder des rôles fonctionnels distincts (Fletcher & Huehns, 1968). La transferrine n'est généralement saturée qu'à 30% soit environ 100 mg/100 ml de fer alors qu'elle peut en fixer jusqu'à environ 360 mg. La transferrine humaine possède une forte affinité pour le fer ferrique (FeIII) de l'ordre de 10^{20} M^{-1} à pH 7.4, qui décroit avec la baisse des valeurs de pH (Aisen *et al.*, 1978, Moos & Morgan, 2000).

La lactoferrine est une glycoprotéine présente dans les sécrétions, comme le lait ou la salive, qui fixe le fer. Bien que présentant une forte ressemblance avec la transferrine, la lactoferrine n'est que peu décrite comme source de fer si ce n'est pour les espèces du genre *Neisseria* (Schryvers & Morris, 1988, Legrain *et al.*, 1993). En revanche, son pouvoir antibactérien est souvent mentionné (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009). Elle pourrait être utilisée comme agent antibactérien en thérapeutique humaine (Ochoa & Cleary, 2009) et elle est

utilisée pour limiter la contamination bactérienne sur la viande aux Etats-Unis (Al-Nabulsi & Holley, 2007, del Olmo *et al.*, 2009) mais pas en Europe ni en Australie (http://www.meatupdate.csiro.au/new/Activated%20Lactoferrin.pdf).

2.3.2.3 Autres sources de fer

Sidérophores

Les sidérophores, molécules de taille inférieure à 1 kDa, sécrétés pour acquérir le fer de nombreuses sources, par certaines bactéries, comme les *Pseudomonas* (Cornelis, 2010) ou les *Staphylococci* (Beasley & Heinrichs, 2010), peuvent constituer une source de fer pour les bactéries qui cohabitent au sein du même environnement. Ainsi, certaines bactéries ne produisent pas de sidérophores mais se servent de ceux produits par d'autres espèces comme c'est le cas pour *L. monocytogenes* (Simon *et al.*, 1995 , Jin *et al.*, 2006), *P. fragi* (Champomier Vergès *et al.*, 1996) ou encore *S. aureus* (Grigg *et al.*, 2010). Cette dernière espèce est ainsi capable à la fois d'en produire et d'utiliser ceux produits par d'autres espèces.

Ferritines de l'hôte

Les ferritines constituent une famille de molécules sphériques destinées à séquestrer le fer dans le cytoplasme des cellules eucaryotes comme procaryotes et en cas de carence fournissent le fer à la cellule. En cas de lyse de la cellule, elles se retrouvent dans l'environnement et pourraient ainsi constituer une source de fer pour les bactéries (Wandersman & Delepelaire, 2004).

***S. aureus* comme source de fer**

Une étude a montré que *P. aeruginosa* était capable de lyser et d'utiliser *S. aureus* comme source de fer (Mashburn *et al.*, 2005). L'analyse de l'expression de gènes, induits en conditions de carence en fer chez *P. aeruginosa*, menée en co-culture avec *S. aureus* montre que *P. aeruginosa* perçoit cette co-culture comme une condition d'abondance en fer. Les mécanismes conduisant à la lyse de *S. aureus* ne sont pas encore bien compris.

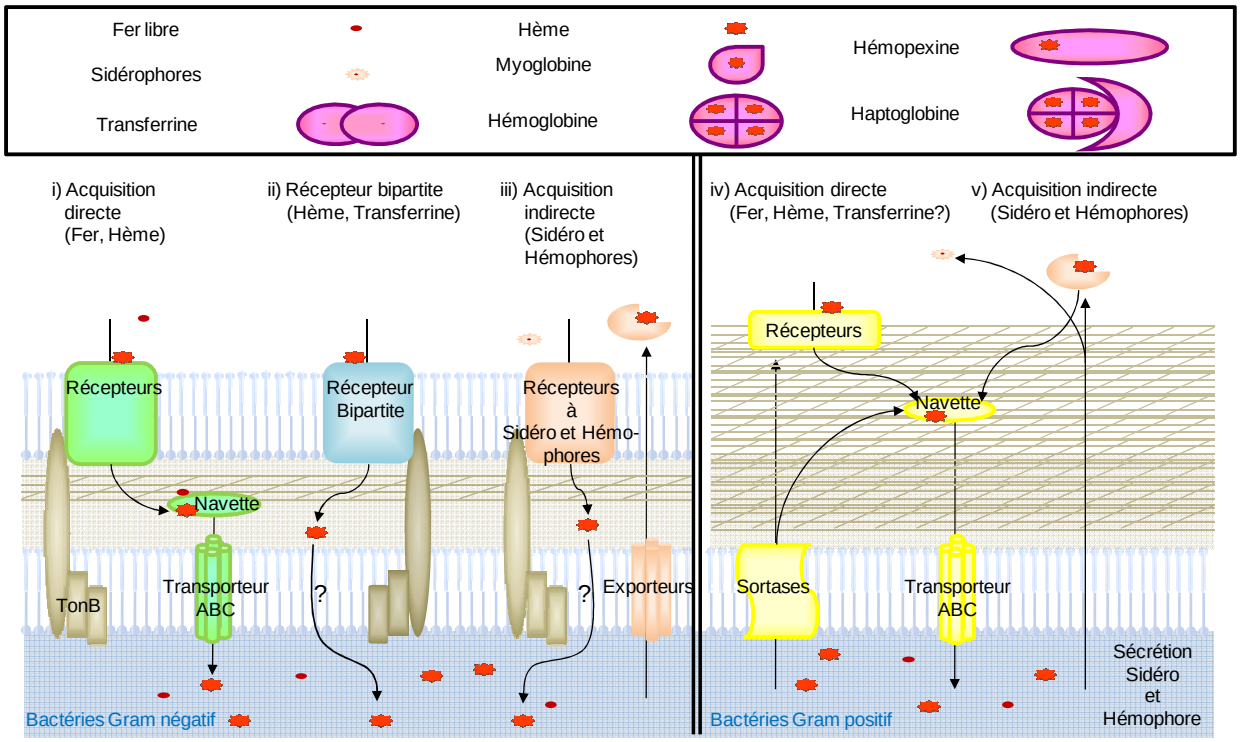
2.3.3 Transport du fer par les bactéries

Pour importer le fer au travers de la membrane plasmique, les bactéries font appel à des systèmes qui utilisent de l'énergie. Ce sont soit des systèmes de transport à force proton motrice qui se servent du gradient de protons généré par des pompes pour accumuler des

composés contre leur gradient de concentration ou soit le plus souvent des systèmes ATP Binding Cassette (ABC).

Les bactéries ont développé des stratégies variées pour se procurer le précieux métal de transition qu'est le fer. Son transport par les bactéries doit être considéré selon trois aspects : *i*) la nature du fer (libre ou lié), *ii*) la nature de la paroi bactérienne (mécanismes différents pour les bactéries à Gram positif et Gram négatif) et *iii*) la nature de l'interaction avec l'élément : directe (impliquant un contact avec la bactérie) ou indirecte par l'intermédaire d'un composé produit par la bactérie. Les complexes formés par ces molécules avec le fer ou l'hème sont alors reconnus par des récepteurs à la surface des cellules. Cela représente au final cinq voies d'acquisition du fer par les bactéries dont la figure 2 est une représentation schématique.

Figure 2 : Acquisition et devenir du fer et de l'hème chez les bactéries. Présentation des principales sources de fer et d'hème de l'environnement des bactéries. Cinq types de systèmes d'acquisition ont été décrits. Le fer et l'hème sont respectivement représentés par une petite sphère et un octogone rouges [selon (Anzaldi & Skaar, 2010)].



Chez les bactéries à Gram négatif, les sources de fer sont transportées vers le cytoplasme en empruntant des voies spécifiques selon le schéma suivant (Figure 2 i) : un récepteur spécifique à la membrane externe, une protéine navette périplasmique (PBP = periplasmic binding protein) qui va permettre de mener le substrat vers un transporteur ABC à

la membrane interne (Braun, 2001). Les systèmes d'acquisition du fer sont généralement bien décrits chez les bactéries pathogènes (Jacques, 2004 , Wandersman & Delepelaire, 2004) et plus particulièrement chez *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Y. pestis* (Perry & Brubaker, 1979) ou encore *H. influenzae* (Stull, 1987).

Chez les bactéries à Gram positif, l'utilisation ou du moins la démonstration de l'utilisation de différentes sources de fer comme la transferrine, l'hémoglobine ou la myoglobine a été démontrée plus récemment que chez les Gram négatif (Modun & Williams, 1999 , Drazek *et al.*, 2000 , Sebulsky *et al.*, 2000, Vanderpool & Armstrong, 2001 , Taylor & Heinrichs, 2002, Lei *et al.*, 2002, Mazmanian *et al.*, 2003). Contrairement à celle des bactéries à Gram négatif, l'enveloppe des bactéries à Gram positif est composée d'une seule membrane mais surtout d'une paroi épaisse. Cette paroi est une structure complexe composée de saccules de muréine et de polysaccharides, d'acides téichoiques et de protéines difficile à traverser (Navarre & Schneewind, 1999).

Chez les bactéries à Gram positif, les sources de fer sont prises en charge suivant un schéma qui diffère de celui des bactéries à Gram négatif : des protéines affines liées à la paroi ou à la membrane (équivalentes aux protéines navettes des bactéries à Gram négatif) sont secondées par un ABC transporteur qui permet le passage au travers de la membrane plasmique. Il peut exister plusieurs récepteurs sélectifs qui utilisent un système ABC commun (Figure2 iv) (Krewulak & Vogel, 2008). Les protéines affines sont exposées à la surface. Elles sont soit liées grâce une extrémité amino-terminale hydrophobe dans la membrane plasmique soit liées de façon covalente au peptidoglycane grâce à la présence d'un motif de type LPXTG (ou NPQTN) dans leur région carboxy-terminale. Cette liaison au peptidoglycane est obtenue par l'action d'enzymes spécialisées appelées sortases ou transpeptidases (Ton-That *et al.*, 2004, Maresso & Schneewind, 2006). Il existe 4 types de sortases (A, B, C et D) mais seule l'implication des deux premières est avérée dans le métabolisme du fer.

2.3.3.1 Acquisition du fer libre

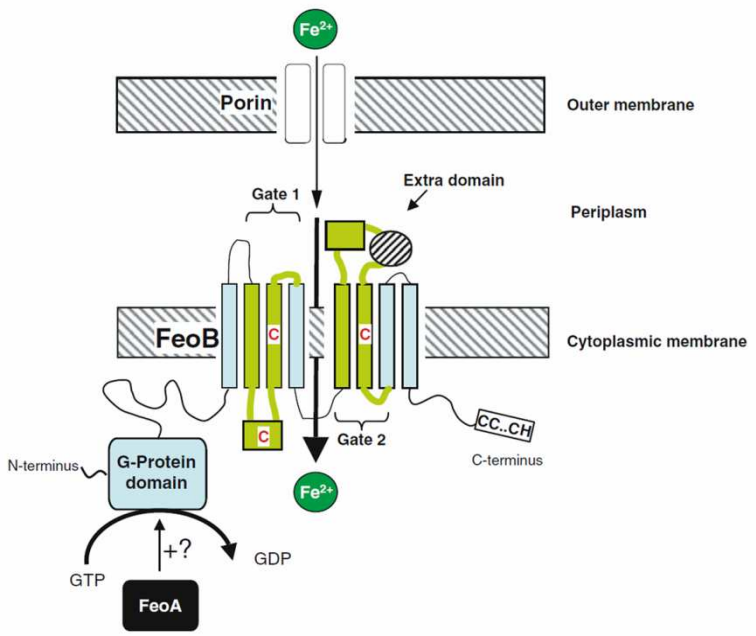
Acquisition directe

Du fait de la faible solubilité du fer, ce mode d'acquisition du fer libre n'est possible que pour le fer ferreux (FeII) et dépend de systèmes situés dans la membrane plasmique.

Si des systèmes de transport à force proton motrice de type MntH, initialement décrits pour le transport du manganèse, ont été montrés expérimentalemnt capables d'importer le FeII comme par exemple chez *L. lactis* (Turner *et al.*, 2007), dans la majorité des cas pour

traverser la membrane plasmique des bactéries à Gram négatif ou à Gram positif, le FeII est pris en charge par des systèmes de transport de type FeoABC (***Fe***rr***o***us iron transport), représenté chez *E. coli* en figure 3 (Cartron *et al.*, 2006). Ces systèmes de type Feo ont été particulièrement bien décrits chez *E. coli* (Kammler *et al.*, 1993) ou *L. monocytogenes* (Jin *et al.*, 2006).

Figure 3 : Système FeoABC. Représentation schématique de l'acquisition du fer FeII par le système Feo chez *E. coli.* (Cartron *et al.*, 2006).



Chez *E. coli* le système est constitué de 3 protéines : FeoA, FeoB et FeoC. La protéine FeoA est une petite protéine de 75 acides aminés dont la fonction est inconnue. La protéine présente des similarités dans sa séquence peptidique avec le domaine C-terminal du régulateur DtxR suggérant une fonction liée à la régulation par le fer. La protéine FeoB est une perméase utilisant l'énergie issue du GTP grâce à sa région N-terminale qui présente des homologies avec des domaines de protéines G. Enfin, la protéine FeoC est une petite protéine de 78 acides aminés qui possède des répétitions de cystéines semblables à celles nécessaires à la fixation de clusters Fer-Soufre, ainsi qu'un domaine hélice-tour-hélice dans sa région amino-terminale ce qui suggère une fixation à l'ADN et donc une fonction de régulateurs de transcription redox et/ou métal dépendant.

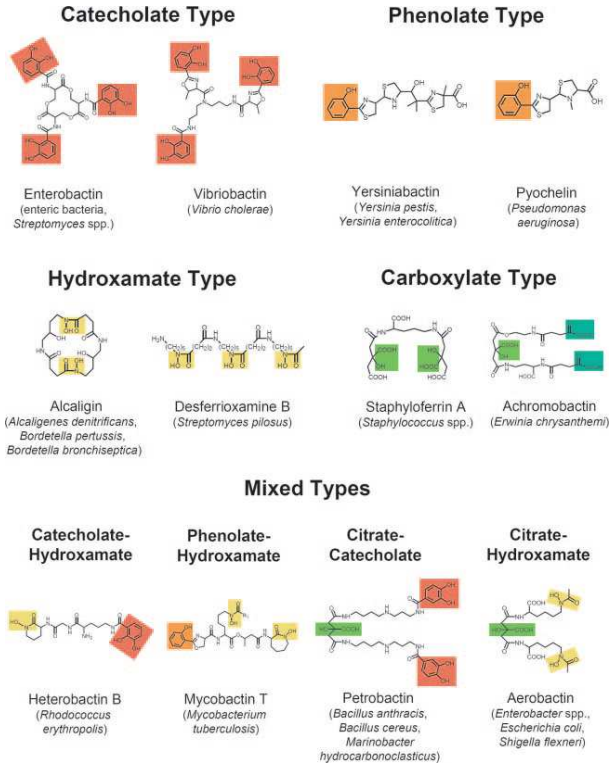
Par ailleurs, une implication de FeoB dans la virulence a été montré chez *L. monocytogenes* (Jin *et al.*, 2006) mais aussi chez *Streptococcus suis* (Aranda *et al.*, 2009). Chez ces espèces une régulation par le régulateur transcriptionnel Fur a en outre été montrée.

Des homologues du système Feo sont retrouvés chez de nombreuses espèces à Gram positif et à Gram négatif (Cartron *et al.*, 2006). Les génomes de différentes bactéries lactiques en hébergent également et leur fonctionnlité a été montrée chez *Streptococcus thermophilus* lors de son interaction avec une autre bactérie lactique, *Lactobacillus delbrueckii* (Herve-Jimenez *et al.*, 2009).

Acquisition indirecte du fer libre par les sidérophores

La synthèse de sidérophores constitue le mode majeur et probablement le plus performant, d'acquisition du fer par les bactéries. Il est très répandu et très étudié chez les bactéries à Gram négatif.

Figure 4 : Exemples de sidérophores représentatifs et leurs producteurs naturels. Les ligands impliqués dans coordination du fer sont surlignés : catécholates en rouge, phénolates en orange, hydroxamates en jaune pâle, α-hydroxy-carboxylates en vert clair, et les α-céto-carboxylates en bleu-vert (Miethke & Marahiel, 2007).



Les sidérophores sont de petites molécules, d'une taille inférieure à 1 kDa et hautement électronégatives, qui fixent le fer ferrique avec une très forte affinité, supérieure à $10^{30}M^{-1}$ (Crosa & Walsh, 2002, Andrews *et al.*, 2003). Ils sont classés en trois voire quatre

groupes principaux (Figure 4) selon la nature du ligand pour le fer : *i*) les hydroxamates, *ii*) les catécholates et *iii*) les carboxylates et un groupe émergent iv) mélange de ligands (Miethke & Marahiel, 2007).

Les sidérophores sont synthétisés dans le cytoplasme en réponse à une faible disponibilité en fer intracellulaire et exportés pour solubiliser le fer dans le milieu environnant. Plus de 500 sidérophores, aussi bien chez les bactéries à Gram positif que négatif, ont été décrits (Wandersman & Delepelaire, 2004).
Il existe deux voies principales de biosynthèse des sidérophores (Barry & Challis, 2009) : l'une menée par une famille multienzymatique modulaire (ou Non Ribosomal Peptide Synthetase = NRPS) (Crosa & Walsh, 2002) et l'autre dite NRPS indépendante (NRPS Independent Synthetase = NIS) (Challis, 2005).

La voie NRPS est utilisée pour la biosynthèse de sidérophores de type catécholate comme l'entérobactine d'*E. coli*, de *Shigella spp*, de *Salmonella enterica* et de *Klebsiella spp*., la yersiniabactine de *Yersinia spp*., la pyochéline et la pyoverdine de *P. aeruginosa*, la vibriobactine de *Vibrio cholerae* et la mycobactine de *M. tuberculosis* (Miethke & Marahiel, 2007).

Les hydroxamates et carboxylates sont eux généralement assemblés par la voie NIS (Challis, 2005). Cette voie de synthèse, moins décrite que la voie NRPS, fait intervenir de nombreuses enzymes telles que des monooxygénases, des décarboxylases, des amino-transférases, des acyltransférases, des amino-acide-ligases et les aldolases (Challis, 2005). Parmi les sidérophores synthétisés par cette voie on retrouve l'aérobactine de *E. coli*, l'alcaligine de *Bordetella pertussis* et *Bordetella bronchiseptica* et la staphylobactine de *S. aureus* (Miethke & Marahiel, 2007).

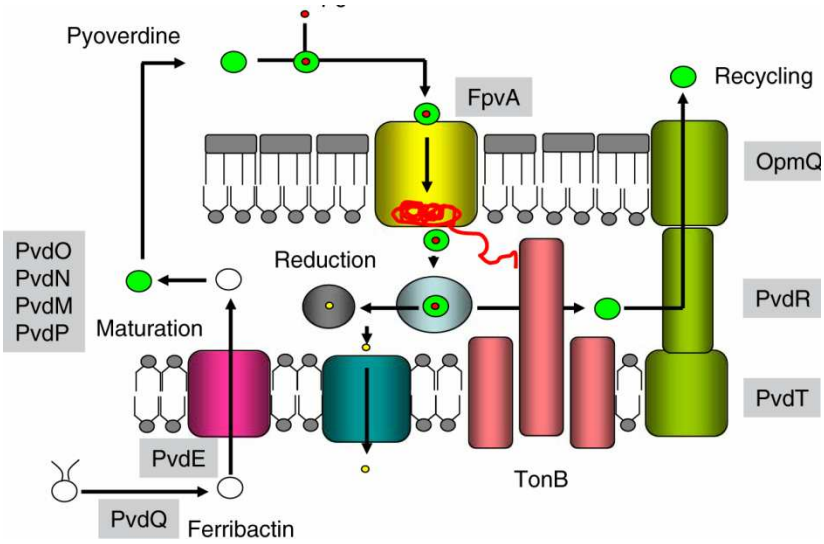
Il existe également un mode de synthèse qualifié d'hybride comme c'est le cas pour la pétrobactine chez *Bacillus anthracis* qui fait intervenir les voies NRPS et NIS (Barry & Challis, 2009).

La biosynthèse et la sécrétion des sidérophores est associée à la synthèse de récepteurs pour récupérer les complexes ferri-sidérophores du milieu (Figure 5). Ces récepteurs sont parfois capables de reconnaître plusieurs sidérophores. Par ailleurs, certaines espèces comme *L. monocytogenes* (Simon *et al.*, 1995, Coulanges *et al.*, 1996) sont capables d'utiliser des sidérophores qu'elles ne produisent pas, voire ne produisent aucun sidérophore mais sont capables d'utiliser ceux produits par d'autres espèces de leur environnement. On parle alors de l'utilisation de xénosidérophores comme chez *P. fragi* (Champomier Vergès *et al.*, 1996),

L. monocytogenes (Jin *et al.*, 2006), *Neisseria gonorrhoeae* (Strange *et al.*, 2011) ou *S. aureus* (Sebulsky *et al.*, 2000, Skaar *et al.*, 2004b).

Chez les bactéries à Gram négatif, un récepteur situé dans la membrane externe, délivre les complexes ferri-sidérophores aux récepteurs situés dans la membrane cytoplasmique. Chez *E. coli*, 6 récepteurs (Cir, FecA, FepA, FhuA, FhuE et Fiu) sont capables de reconnaitre des sidérophores variés alors que seule l'entérobactine est synthétisée (Hantke, 2001). Ces récepteurs, localisés dans la membrane externe, sont bien décrits et pour certains cristallisés comme FepA (Buchanan *et al.*, 1999) et FhuA (Ferguson *et al.*, 1998). Ils constituent de larges porines qui forment des tonneaux béta fermés par leur extrémité amino-terminale (Cornelis, 2010). Ces récepteurs nécessitent de l'énergie qui leur est transmise par le système TonB (Letain & Postle, 1997 , Moeck & Coulton, 1998), qui transfère l'énergie de la membrane interne à la membrane externe (Braun *et al.*, 1999).

Figure 5 : Représentation schématique de l'acquisition du fer par l'utilisation des sidérophores chez une bactérie à Gram négatif, *Pseudomonas* [selon (Cornelis, 2010)].



Certaines bactéries à Gram positif, comme *S. aureus*, produisent également des sidérophores (Courcol *et al.*, 1997, Dale *et al.*, 2004a, Park *et al.*, 2005). Cette espèce produit 4 sidérophores différents : la staphyloferrine A, la staphyloferrine B, l'auréochéline et la staphylobactine (Dale *et al.*, 2004a). Les complexes ferri-sidérophores peuvent être reconnus par au moins 4 systèmes de transport décrits : *sir*ABC, *fhu*ABC, *sit*ABC, et *sst*ABCD (Sebulsky *et al.*, 2000, Morrissey *et al.*, 2000, Cabrera *et al.*, 2001, Sebulsky & Heinrichs, 2001, Dale *et al.*, 2004a, Dale *et al.*, 2004b). Par exemple, le système SirABC reconnait spécifiquement la staphylobactine (Dale *et al.*, 2004b).

2.3.3.2 Aquisition du fer complexé

2.3.3.2.1 Acquisition indirecte

Elle se fait par l'intermédaire des sidérophores. Très efficaces pour solubiliser le fer, les sidérophores s'avèrent également très efficaces pour récupérer le fer complexé à la transferrine ou à la lactoferrine. Leur affinité très élevée pour le fer ferrique, 10^{-49}M pour l'entérobactine (Loomis & Raymond, 1991), surpasse celle de la transferrine, 10^{-30}M à pH 7.4 (Aisen *et al.*, 1978) ce qui conduit à la récupération du fer par les sidérophores, eux-mêmes capter ensuite par les bactéries. Cependant, dans un milieu circulant, comme la circulation sanguine, certaines bactéries peuvent avoir intérêt à disposer d'un système d'acquisition directe du fer complexé, sous peine de voir leurs ferri-sidérophores se diluer dans l'environnement.

2.3.3.2.2 Acquisition directe

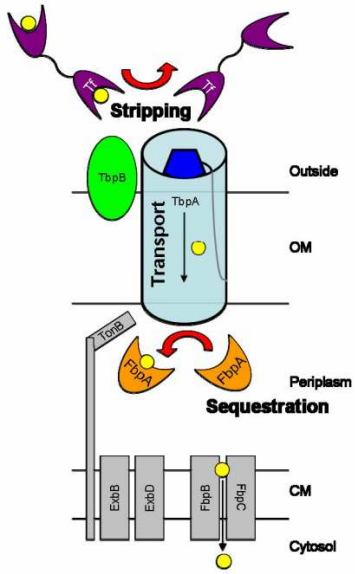
Plusieurs espèces bactériennes ont été décrites comme capables d'utiliser le fer de la transferrine et de la lactoferrine directement. Par exemple, la transferrine constitue une source de fer utilisée par des bactéries comme *P. fragi* (Champomier Vergès *et al.*, 1996), *C. diphteriae* (Schmitt, 1997) ou encore *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis* (Modun *et al.*, 1998) respectivement dans et sur l'hôte. C'est chez *Neisseria* que le système a été le mieux détaillé (Schryvers & Morris, 1988).

Chez *Neisseria*, l'acquisition du fer à partir de la transferrine se fait grâce aux Transferrin binding proteins TbpA et TbpB et à partir de la lactoferrine par LbpA et LbpB que l'on appelle aussi récepteur bipartite. Les gènes codant pour ces protéines sont arrangés en opérons (Legrain *et al.*, 1993) et régulés par le fer, probablement via un régulateur de la famille Fur (Schryvers & Morris, 1988). Des mutants déficients des protéines TbpB (Anderson *et al.*, 1994) et LbpB sont toujours capables, mais moins efficacement, d'acquérir le fer (Schryvers & Stojiljkovic, 1999). Ceci suggère que le système ancestral repose sur TbpA et LbpA et fait de TbpB et LbpB des protéines qui accélèrent l'acquisition (GrayOwen & Schryvers, 1996, Schryvers & Stojiljkovic, 1999, Retzer *et al.*, 1999, Siburt *et al.*, 2009).
L'identité de séquence des Tbp avec le récepteur aux sidérophores FepA de *E. coli* (Buchanan *et al.*, 1999) et d'autres protéines Ton-B dépendantes, suggère que ces protéines sont des protéines de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif (GrayOwen & Schryvers, 1996) formant un canal pour le fer.

TbpA et TbpB sont de grandes protéines (TbpA ~100 kDa et TbpB ~66 à 85 kDa) qui se fixent sélectivement à la transferrine ou à la lactoferrine de l'hôte ou d'espèces proches (Schryvers & Morris, 1988, GrayOwen & Schryvers, 1996). Cette sélectivité est attribuée aux protéines TbpB et LbpB qui intéragissent avec chacun des lobes de la transferrine et de la lactoferrine (Ling *et al.*, 2010). Chez *Moraxella catarrhalis*, une sélectivité de TbpB pour la forme chargée de la transferrine humaine a été démontrée (Yu & Schryvers, 1993, Retzer *et al.*, 1999). Cette sélectivité peut être due à la modification de conformation de la transferrine entre la forme chargée (holo ou fermée) et la forme déchargée du fer (apo ou ouverte) (Jeffrey *et al.*, 1998).

Les liaisons qui existent entre TbpB et l'holo-Transferrine humaine (hTh) sont fortes et nécessitent une dénaturation par chauffage en présence d'urée et SDS pour être rompues (Vonder Haar *et al.*, 1994). Du côté de la transferrine, de nombreux peptides issus de différentes régions de la protéine sont reconnus par la protéine TbpB. La fixation de ces peptides est observée qu'ils appartiennent à un lobe ou l'autre de la transferrine. Des études suggèrent que les protéines TbpB de *N. meningitidis* et *M. catarrhalis* sont bilobées et que chacun des lobes interagit avec ceux de la transferrine. Expérimentalement, les protéines TbpB et LbpB ne sont pas indispensables mais elles permettent d'augmenter l'efficacité d'acquisition et d'assurer la sélectivité vis-à-vis des protéines de l'hôte (Retzer *et al.*, 1999, Ling *et al.*, 2010). La transferrine ainsi disposée près des protéines TbpA va alors être déchargée de son fer et ce dernier va être acheminé vers le périplasme par TbpA. Une fois dans le périplasme, le fer est pris en charge par des protéines périplasmiques telles que FbpA chez *H. influenzae* (Khan *et al.*, 2007). FbpA conduit alors le fer vers un ABC transporteur de la membrane interne pour qu'il soit internalisé. La protéine FbpA est nécessaire à l'utilisation du fer à partir de différentes sources comme la lactoferrine mais pas à partir des sources héminiques (Khan *et al.*, 2007, Siburt *et al.*, 2009, Ling *et al.*, 2010) et favoriserait directement le passage du fer au travers de la membrane externe (Figure 6).

Figure 6 : Utilisation du fer complexé à la transferrine par *N. gonorrhoeae*. Les protéines TbpA et TbpB constituent le récepteur à la membrane externe. Dans le périplasme, le fer est séquestré par la protéine FbpA qui le dirige vers la membrane plasmique. Ce processus requiert l'énergie délivré par le complexe TonB-ExbB-ExbD (Siburt *et al.*, 2009).



Les bactéries à Gram positif, comme *S. aureus, S. epidermidis* ou *L. monocytogenes* sont également capables d'utiliser la transferrine comme seule source de fer pour assurer leur croissance. Chez *Listeria,* l'utilisation de la transferrine a été démontrée mais aucun transporteur spécifique n'a été détecté (Jin *et al.*, 2006).

Les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis* expriment à leur surface des récepteurs spécifiques à la transferrine (Modun *et al.*, 1994). Ils correspondent à une protéine unique de 42 kDa identifiée sur gel d'acrylamide nommée initialement Tpn (Transferrin-binding protein). Ces récepteurs sont saturables et régulés par le fer au moins chez *S. epidermidis*. Ils montrent également une meilleure affinité pour la transferrine humaine. La dissociation transferrine / récepteur ne s'effectue qu'à relativement haute température soit 37°C pour *S. epidermidis* et 65°C pour *S. aureus* (Modun *et al.*, 1994), assurant une forte affinité dans leurs habitats respectifs, à savoir la peau et les fluides extracellulaires où de telles températures ne peuvent être atteintes. Même si *S. aureus* est capable de synthétiser 4 sidérophores différents (Sebulsky *et al.*, 2000, Dale *et al.*, 2004a, Dale *et al.*, 2004b), dans un tampon PBS, ces derniers ne permettent pas de capturer le fer de la transferrine alors que *S. aureus* est toujours capable de croître (Modun *et al.*, 1998). Ceci montre qu'il existe bien un autre mode d'acquisition qui est médié par le récepteur à la transferrine (Modun *et al.*, 1998). Comme chez les bactéries à Gram négatif, ce mode d'acquisition nécessite de l'énergie. Cependant

l'acquisition du fer à partir de la transferrine reste mal comprise (Modun *et al.*, 1994, Modun *et al.*, 1998, Modun & Williams, 1999, Taylor & Heinrichs, 2002, Park *et al.*, 2005). Les différentes études menées pour comprendre et mieux définir la protéine impliquée dans le transport ont, dans un premier temps, montré qu'il s'agissait d'une protéine de la glycolyse, glyceraldehyde 3 phopho dehydrogénase GAPDH (Modun & Williams, 1999). Cependant, une étude ultérieure contredit le rôle de la GAPDH en rapportant que la mutation du gène *gap* n'influence pas la fixation de la transferrine (Taylor & Heinrichs, 2002). Les auteurs de cette étude suggèrent alors qu'une autre protéine de surface nommée SbtA (Surface binding protein A) possédant un motif LPKTG serait impliquée. Une étude ultérieure a montré que cette protéine de fixation de la transferrine est codée par un gène appartenant à un groupe de gènes codant pour des protéines de surface, le cluster *isd* (Iron-regulated surface determinant) (Mazmanian *et al.*, 2002, Mazmanian *et al.*, 2003). Parallèlement, une autre équipe avait mis en évidence ce même cluster de gènes régulé par le fer et nommé *frp* (Fur regulated proteins) en décrivant 2 protéines induites en absence de fer, FrpA et FrpB, de 40 kDa et 87 kDa respectivement (Morrissey *et al.*, 2002). Cette équipe a montré que ces protéines n'étaient pas requises pour assurer la croissance de *S. aureus* en conditions limitantes en fer, notamment dans le sérum, où les hémoprotéines sont absentes.

Ces différentes études montrent qu'il est difficile d'identifier et de caractériser le ou les système(s) d'acquisition du fer complexé à la transferrine chez les bactéries à Gram positif.

2.3.3.3 Acquisition de l'hème

Rappelons tout d'abord que l'hème (~620 Da) est capable de diffuser librement au travers des porines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif (Genco & Dixon, 2001). Cependant, à l'image du fer, l'hème ne pourra pas être accumulé dans le cytoplasme ce qui rend cette contribution négligeable pour la croissance et le maintien des bactéries.

Avec près de 30 récepteurs de la membrane externe connus, la description des systèmes de transport de l'hème des bactéries à Gram négatif est bien plus étoffée que celle des systèmes de même fonction chez les bactéries à Gram positif (Wandersman & Stojiljkovic, 2000). La plus grande partie des études menées sur les sytèmes de capture de l'hème a été réalisée sur les bactéries à Gram négatif, et moins d'informations sont disponibles sur les voies de capture de l'hème chez les bactéries à Gram positif même si des connaissances ont été apportées ces dernières années.

Trois modes majeurs d'acquisition ont été décrits chez les bactéries à Gram négatif et deux chez les bactéries à Gram positif.

2.3.3.3.1 Acquisition directe chez les bactéries à Gram négatif

Un premier système bien caractérisé implique la liaison directe de l'hème ou de protéines à hème, comme l'hémoglobine ou le complexe hémoglobine-haptoglobine, à des récepteurs spécifiques TonB dépendants de la membrane externe.
Une fois dans le périplasme, l'hème est alors pris en charge par des protéines navettes périplasmiques (PBP = Periplasmic Binding Protein) et transporté dans la cellule par des ABC transporteurs. Les systèmes les mieux étudiés sont le système *hem*R-*hem*STUV chez *Y. enterocolitica* (Stojiljkovic & Hantke, 1992, Bracken *et al.*, 1999), le système *hmu*RSTUV chez *Y. pestis* (Hornung *et al.*, 1996, Thompson *et al.*, 1999), le système *shu*ASTUV chez *Shigella dysenteriae* (Eakanunkul *et al.*, 2005, Burkhard & Wilks, 2007), le système *phu*RSTUVW chez *P. aeruginosa* (Lansky *et al.*, 2006, Ho *et al.*, 2007, Tong & Guo, 2007) et *hem*R chez *Serratia marcescens* (Benevides-Matos *et al.*, 2008, Benevides-Matos & Biville, 2010).

2.3.3.3.2 Le récepteur bipartite

Décrit chez *N. meningitidis* le récepteur HpuAB constitue le second mode d'acquisition de l'hème (Lewis & Dyer, 1995). HpuAB est composé d'un récepteur externe TonB-dépendant HpuB et d'une lipoprotéine accessoire HpuA (Lewis & Dyer, 1995, Lewis *et al.*, 1997) qui est analogue au récepteur bipartite à la transferrine Tbp1 /Tbp2 (Cornelissen & Sparling, 1994, Anderson *et al.*, 1994, Perkins-Balding *et al.*, 2004). Il a été montré que le récepteur bipartite HpuAB de *N. meningitidis* est capable de transporter la porphyrine intacte depuis l'hémoglobine ou le complexe hémoglobine-haptoglobine (Lewis *et al.*, 1998).

2.3.3.3.3 Acquisition indirecte chez les bactéries à Gram négatif

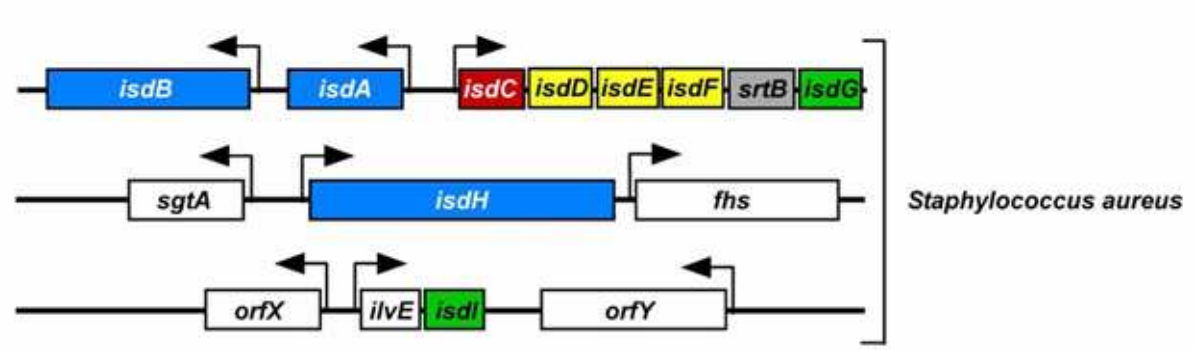
Un dernier mode d'acquisition de l'hème est composé d'un récepteur à la membrane externe, d'un ABC transporteur et d'hémophores extracellulaires. Ceci correspond à un mode d'acquisition indirecte de l'hème. Le mieux décrit est le système *hasR-hasADEB* chez *S.*

marcescens (Ghigo *et al.*, 1997, Cescau *et al.*, 2007, Létoffé *et al.*, 2008). Les hémophores servent à capter l'hème libre ou à l'extraire des hémoprotéines du milieu externe et à le mener vers la surface bactérienne où le complexe interagit avec un récepteur spécifique aux hémophores, TonB-dépendant (Woloszczuk *et al.*, 1980, Zou *et al.*, 1999, Benevides-Matos *et al.*, 2008). Comme pour le récepteur-transporteur de fer associé à la membrane externe, HasR posséderait une extension amino-terminale prolongée par une sorte de bouchon qui viendrait fermer le tunnel, formé par le reste du récepteur dans la membrane (Tong & Guo, 2009). L'hème est ensuite pris en charge par une protéine navette puis un ABC transporteur.
E. coli K12 n'est pas naturellement capable d'utiliser l'hème. Si elle exprime le récepteur HasR, elle devient en mesure de se servir de l'hème (Létoffé *et al.*, 2006). Ainsi, il a été montré que dans cette condition, l'utilisation de l'hème passe par les protéines DppA ou MppA également connues comme transporteurs de dipeptides. Ces protéines constituent les PBP et l'ABC transporteur DppBCDF permet à l'hème de traverser la membrane interne (Létoffé *et al.*, 2006).

2.3.3.3.4 Acquisition directe de l'hème chez les bactéries Gram positif

Chez les bactéries à Gram positif, c'est chez *S. aureus* que le transport de l'hème a été le mieux étudié. L'espèce *S. aureus* possède un système complet d'acquisition de l'hème, codé par un cluster de gènes nommés *isd* pour *i*ron-regulated *s*urface *d*eterminants dont l'organisation génétique est représentée ci-dessous (Figure 7). Il est important de noter qu'il s'agit ici du système mis en jeu dans l'utilisation de la transferrine. Un tel système est également présent chez d'autres espèces notamment des pathogènes comme *L. monocytogenes*, *Clostridium tetani* ou *B. anthracis* (Figure 9). En plus du système Isd, *S. aureus* possède un système moins étudié nommé Hts (Heme Transport System) (Skaar & Schneewind, 2004).

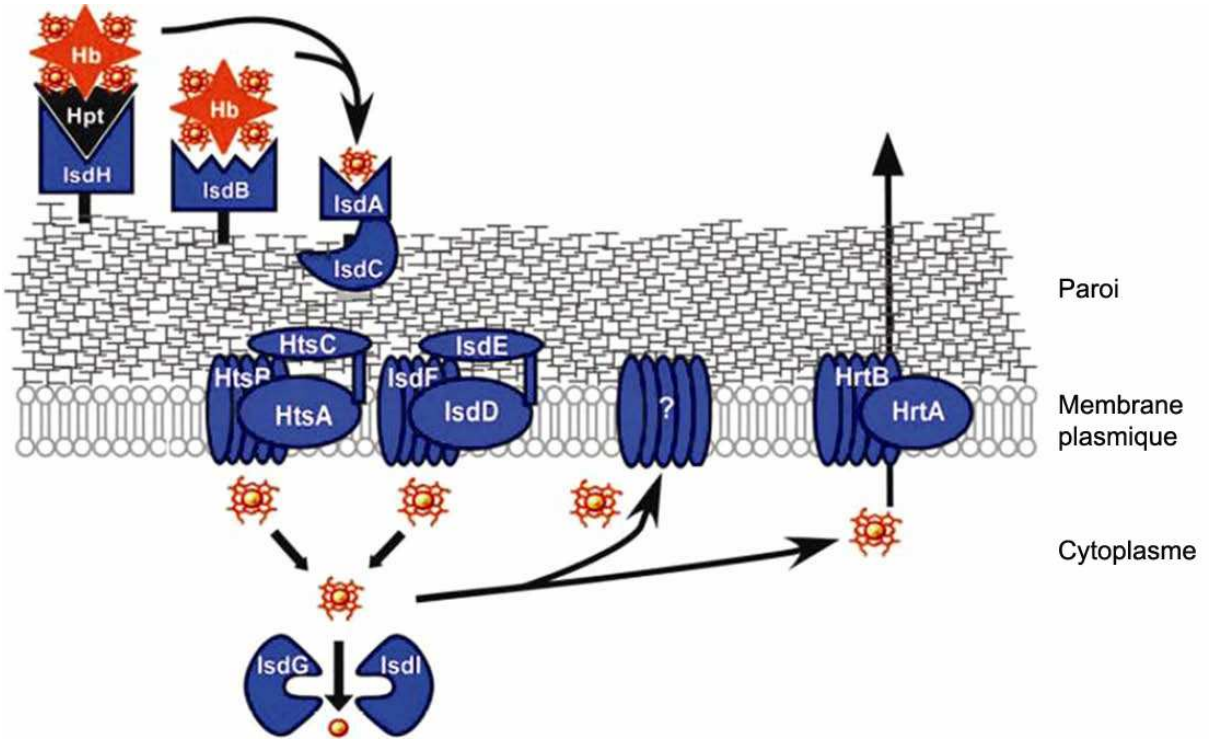
Figure 7: Représentation schématique des régions génomiques codant pour les composants des systèmes Isd chez *S. aureus*. Les trois lignes représentent les trois regions génomiques distinctes présentes chez cette espèce (Skaar & Schneewind, 2004). Les gènes en bleu représentent les protéines ancrées à la surface par un motif LPXTG, en rouge par un motif NPQTN, en jaune les composants du transporteur ABC et en vert les protéines dégradant l'hème.



Au cours de l'infection, *S. aureus* libère l'hémoglobine des érythrocytes en produisant des hémolysines (gène *hla*). L'hémoglobine relarguée va ainsi pouvoir être utilisée par la bactérie (Mazmanian *et al.*, 2003).

Le processus de capture proprement dite commence alors par la fixation de l'hémoglobine, ou du complexe hémoglobine-haptoglobine, à la surface bactérienne grâce aux récepteurs spécifiques IsdB et IsdH (Figure 8). L'hème est alors extrait de l'hémoglobine grâce aux protéines IsdA et IsdB, transféré à la protéine de paroi IsdC et traverse ensuite la membrane plasmique grâce aux protéines de translocation IsdD, E et F. Les protéines réceptrices IsdA, IsdB et IsdH, possèdent un motif d'ancrage LPXTG alors que la protéine « navette » IsdC possède un motif NPQTN qui pourrait permettre d'ancrer plus profondémment la protéine et ainsi de transporter l'hème au travers de la paroi (Zhu *et al.*, 2008b, Torres *et al.*, 2006). Une analyse par dichroïsme magnétique circulaire (DMC) de la protéine IsdA recombinante de *S. aureus* suggère qu'elle serait liée par un résidu tyrosine à une molécule d'hème de façon penta-coordonée (comme c'est le cas pour IsdC) avec un haut niveau énergétique (Vermeiren *et al.*, 2006a).

Figure 8 : Représentation schématique de l'acquisition directe de l'hème chez *S. aureus* [selon (Tong & Guo, 2009)].



Une étude *in vitro* récente (Liu *et al.*, 2008) a montré que l'hème peut être directement transféré des protéines IsdA vers IsdC grâce à des interactions protéine-protéine et que ce processus est rapide et dirigé par affinité.

Pishany *et al* ont montré que les protéines IsdA et IsdB de *S. aureus* sont exprimées différemment en fonction du statut en fer de la bactérie. Moins le fer est disponible, plus les protéines IsdA et IsdB sont exposées à la surface bactérienne. Lorsque les conditions ne sont pas très limitantes en fer, les protéines IsdB et IsdA sont peu présentes à la surface bactérienne. En revanche, lorsque les conditions deviennent plus limitantes, ces protéines sont distribuées plus abondamment et uniformément à la surface bactérienne. De plus, les protéines IsdA et IsdB colocalisent à la surface bactérienne (Pishchany *et al.*, 2009).

Les protéines Isd (IsdH, IsdB, IsdA, IsdC et IsdE) partagent une conformation proche et possèdent un motif NEAT pour *NEA*r iron *T*ransporter. Leur appellation résulte du fait de leur présence dans des gènes proches de gènes potentiels de transport de ferri-sidérophores. Ces motifs répétés ont été identifiés et définis par l'équipe de Andrade *et al* en 2002 en alignant de nombreux gènes et opérons impliqués dans le transport du fer avec pour base *fec*A chez *E. coli* (Andrade *et al.*, 2002). Ces motifs de 125 résidus sont exposés à la surface en

simple ou multiple copie(s) dans la séquence et sont le plus souvent retrouvés chez des espèces pathogènes comme *L. monocytogenes* ou *S. aureus*.

Il est possible de distinguer 4 familles de NEAT ; *i*) la première principalement représentée dans la protéine IsdH servirait de récepteur à l'hémoglobine et à l'haptoglobine ; *ii*) la deuxième présente dans IsdC servirait à fixer l'hème ; *iii*) la troisième servirait d'adhésine, *iv*) quant à la dernière sa fonction n'est guère définie (Pilpa *et al.*, 2006). Ainsi, au sein d'une même protéine, il peut exister des spécialisations fonctionnelles si plusieurs motifs NEAT sont présents comme c'est le cas de la protéine IsdC de *S. aureus* (Pilpa *et al.*, 2009). Les motifs NEAT sont aussi retrouvés dans la protéine IsdE de *S. aureus* où ils servent à la fixation de l'hème (Grigg *et al.*, 2007).

Chez *B. cereus* et *B. anthracis*, des protéines impliquées dans la virulence, homologues aux protéines de la couche S (S-Layer Homology protéines), possèdent ces motifs NEAT et sont capables de fixer et diriger l'hème vers le système Isd (Tarlovsky *et al.*, 2010, Daou *et al.*, 2009). Ceci conforte l'importance des motifs NEAT dans les phénomènes d'acquistion et transport de l'hème mais suggère aussi que les systèmes Isd ou Hts et homologues peuvent acquérir l'hème à partir d'autres protéines de surface.

Chez *C. diphteriae*, les récepteurs de membrane externe sont absents tout comme le système TonB. Une protéine HemT-like, HmuT, jouerait le rôle de récepteurs à hème (Schmitt & Drazek, 2001, Burkhard & Wilks, 2008). Cependant, la capture de l'hème nécessite la présence d'ABC transporteurs fonctionnels, non seulement chez *C. diphteriae* (Burkhard & Wilks, 2008) mais aussi chez *S. pyogenes* (Lei *et al.*, 2002, Bates *et al.*, 2003, Lei *et al.*, 2003) et *S. aureus* (Skaar *et al.*, 2004b). Chez *S. pyogenes*, des protéines de surface, nommées Shr ou Shp, et la lipoprotéine d'un ABC transporteur, HtsA ou SiaA, ont été récemment décrites (Liu & Lei, 2005, Zhu *et al.*, 2008a). La protéine Shr de *S. pyogenes* peut fixer l'hème et le transférer à la protéine de fixation de l'hème Shp (Zhu *et al.*, 2008a). Shp peut alors à son tour transférer l'hème à l'apoprotéine HtsA (ou SiaA) qui a été caractérisée récemment et qui permet le transport de l'hème à travers la paroi (Sook *et al.*, 2008).

Ces différents exemples relatent la diversité de protéines pouvant être impliquées dans les processus d'acquisition de l'hème chez les bactéries.

Déterminants structurels qui assurent la fixation de l'hème aux protéines Isd

La protéine IsdC possède une structure particulière où le site de fixation de l'hème se trouve repoussé à l'extrémité du cœur hydrophobe, formant une structure proéminente en épingle à cheveux sur laquelle vient reposer l'hème (Sharp *et al.*, 2007). Le fer de l'hème est

penta-coordonné car il est pris en charge par la Tyr-132, ce qui le déplace du plan tétrapyrolle. Sur la face opposée de l'hème, un petit fragment peptidique hélicoïdal forme une sorte de lèvre qui vient embrasser l'hème. Cette caractéristique structurelle, où l'hème se trouve comme pincé à l'extrémité, pourrait jouer un rôle dans le mécanisme de fixation/relargage de l'hème par des changements de conformation.

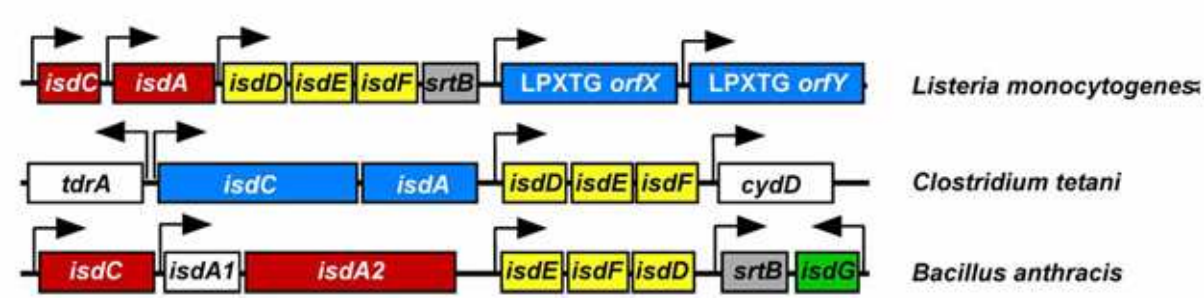
La structure de la protéine IsdE révèle une topologie bilobée où une seule molécule d'hème se lie dans le sillon formé par ces deux lobes et seuls 19% de l'hème restent accessibles. Une poche hydrophobe va assurer la liaison au noyau tétrapyrolle. Le fer de l'hème y est héxacoordoné dans un axe formé par un résidu Met-78 de la région N-terminale et un résidu His-229 de la région C-terminale (Grigg *et al.*, 2007).

Ces deux exemples montrent que malgré une capacité commune de fixation de la molécule d'hème, les résidus nécessaires à la fixation de l'hème chez ces deux protéines sont différents.

2.3.3.3.5 Acquisition indirecte de l'hème par production d'hémophores chez *B. anthracis*

B. anthracis est la seule espèce à Gram positif dans laquelle la capture de l'hème par des hémophores a été décrite (Figure 2 *iii*) (Stauff *et al.*, 2008). Cette espèce possède pourtant un système Isd proche de celui de *S. aureus* à quelques différences près (Maresso *et al.*, 2006, Gat *et al.*, 2008). Elle possède deux protéines IsdX1 et IsdX2, codées par les genes *isd*A1 et *isd*A2, que l'on ne retrouve ni dans le système Isd de *S. aureus* ni dans les systèmes Isd de *Clostridium tetani* ou *L. monocytogenes* [(Figure 9) (Maresso & Schneewind, 2006, Fabian *et al.*, 2009)]. Ces protéines sont en fait des hémophores qui sont sécrétés dans le milieu extracellulaire. IsdX1 est capable de récupérer l'hème de l'hémoglobine et de la transférer à IsdC ou IsdX2 (Fabian *et al.*, 2009). IsdX2 est également sécrétée mais une partie des protéines restent associées à la cellule. Le système Isd de *B. anthracis* passe ensuite par les mêmes étapes que chez *S. aureus*. Alors que le rôle de IsdX1 est bien éclairci, d'autres études restent à mener pour mieux définir le rôle et la localisation de IsdX2 (Fabian *et al.*, 2009).

Figure 9 : Régions génétiques des systèmes Isd-like chez *L. monocytogenes*, *C. tetani* et *B. anthracis* [selon (Skaar & Schneewind, 2004)]. Les gènes en bleu représentent les protéines ancrées à la surface par un motif LPXTG, en rouge par un motif NPQTN, en jaune les composants du transporteur ABC et en vert les protéines dégradant l'hème.



2.3.3.4 Senseurs et systèmes d'efflux de l'hème

Du fait de sa toxicité, l'hème est un composé dont la concentration intracellulaire doit être finement régulée. Certaines espèces ont ainsi développé des systèmes sensibles à la présence de l'hème à leur surface. C'est le cas de l'espèce pathogène *S. aureus* qui est capable de s'accomoder de la présence de fortes concentrations d'hème.

Cette adaptation est due à l'implication du système à deux composants, HssRS pour Heme Sensing System, dans la régulation de l'opéron *hrtAB* codant pour le système d'efflux d'hème HrtAB, Heme Regulated Transport system (Friedman *et al.*, 2006, Torres *et al.*, 2007).

Le système à deux composantes HssRS est constitué d'une protéine senseur histidine kinase HssS et d'un régulateur HssR. Lorsque la protéine senseur HssS perçoit l'hème, elle phosphoryle le régulateur HssR qui va se fixer à une séquence inversée répétée en amont du gène *hrt*A activant alors sa transcription (Stauff *et al.*, 2007).

Chez *S. aureus*, une analyse des protéines modulées par l'hème a montré que la protéine HrtA codant pour une ATPase était exprimée 45 fois plus en réponse à la présence d'hème. La protéine HrtA est nécessaire à la protection contre les effets toxiques de l'hème. Un mutant dans le gène de cette protéine induit une importante réponse transcriptionnelle en présence d'hème se rapportant à la réponse stringente (Stauff *et al.*, 2008). La protéine HrtB possède le rôle de perméase dans le système (Friedman *et al.*, 2006). Chez *S. aureus*, l'inactivation des gènes *hrtA* et *hrtB* conduit à un fort défaut de croissance lorsque l'hème est la seule source de fer. Ce phénomène n'est pas observé lorsque le $FeSO_4$ constitue la source de fer (Friedman *et al.*, 2006). De plus, l'inactivation des gènes *hrtAB* ou *hssRS* conduit à une virulence plus importante (Torres *et al.*, 2007). En fait, le système HrtAB permet l'efflux de

l'excédant d'hème intracellulaire, préservant ainsi la cellule des effets toxiques de la molécule et assure ainsi l'homéostasie de l'hème (Torres *et al.*, 2007).

Des systèmes à deux composants ont été détectés chez des espèces comme *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *B. cereus* et *B. anthracis*, *L. monocytogenes* et *E. faecalis*, ce qui en fait un système propre aux bactéries à Gram positif (Torres *et al.*, 2007) même s'il n'est pas retrouvé chez *B. subtilis* (Stauff *et al.*, 2007). Une étude récente montre que le système mis en évidence chez *B. anthracis* est plus réactif / sensible à l'hème que celui de *S. aureus* (Stauff & Skaar, 2009).
Le système de transport est également présent chez d'autres bactéries comme *S. agalactiae* (Fernandez *et al.*, 2010), *B. anthracis* (Stauff & Skaar, 2009) et *L. lactis* (Pedersen *et al.*, 2008).
La régulation du système d'export de l'hème par le système senseur/regulateur n'a été jusqu'à présent rapporté que chez *S. aureus* et chez *B. anthracis* (Anzaldi & Skaar, 2010).

Chez *L. lactis* (Pedersen *et al.*, 2008) et chez *B. anthracis* (Stauff & Skaar, 2009), la mutation des gènes homologues à *hrtAB* de *S. aureus* conduit à une sensibilité à l'hème. Chez *L. lactis*, les gènes homologues à *hrtAB* (*ygfCBA*) sont spécificiquement induits par l'hème et les protéines codées par ces opérons possèdent une forte homologie avec les protéines HrtA (45 à 46%) et HrtB (26 à 29%) de *S. aureus*. Notons ici la présence du gène *ygfC*, codant pour un régulateur de transcription potentiel, ce qui semble confirmer qu'à la différence de *S. aureus* et *B. anthracis*, les homologues *hrtAB* de *L. lactis* ne répondraient pas à un système à deux composantes (HssRS) (Pedersen *et al.*, 2008, Fernandez *et al.*, 2010).
Plus récemment, il a été décrit chez *S. agalactiae* la présence d'homologues aux gènes *hrtAB* ainsi que deux opérons semblables à ceux de *L. lactis* ici nommés *pefAB* et *pefRCD* pour *p*orphyrin-regulated *ef*flux (Fernandez *et al.*, 2010). Le gène *pef*R code pour un régulateur de transcription, capable de se fixer spécificiquement aux promoteurs de *pefAB* et *pefRCD* et d'en activer la transcription. Le régulateur PefR se fixe aux promoteurs en présence d'hème ou de porphyrine IX (PPIX) de façon dose-réponse et indépendemment de la présence de fer. De façon très intéressante, en dessous de 1 µM d'hème (mais pas de PPIX) les gènes *hrtAB* sont très peu activés contrairement aux opérons *pef* ce qui suggère des rôles spécifiques pour ces deux types proches de systèmes d'efflux (Fernandez *et al.*, 2010).

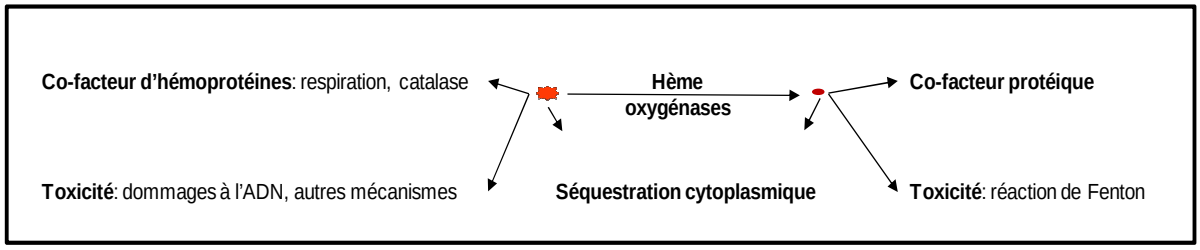
Ainsi, les systèmes senseur/expulseur d'hème permettent de maintenir une croissance cellulaire en présence de fortes concentrations d'hème. Ceci montre que les bactéries ont

développé des mécanismes pour se protéger des effets néfastes de l'hème en jaugeant sa concentration dans le milieu extracellulaire.

2.3.4 Devenir du fer et de l'hème dans le cytoplasme

Lorsque l'on parle du devenir du fer intracellulaire, nous entendons généralement l'ion fer ainsi que le fer inclus dans les porphyrines donc la molécule d'hème. Cependant, ces deux formes de fer peuvent avoir des destinées bien différentes comme le schématise la figure 10. Le fer et l'hème sont utilisés dans de nombreuses réactions biologiques comme la photosynthèse, la fixation de l'azote (N_2), la méthanogénèse, la production et la consommation de l'hydrogène (H_2), la respiration, le cycle de l'acide trichloroacétique (TCA), le transport de l'oxygène, la régulation de gènes, la synthèse et la réparation d'ADN (Andrews *et al.*, 2003).

Figure 10 : Devenir du fer dans le cytoplasme [selon (Anzaldi & Skaar, 2010)]



2.3.4.1 Devenir du fer

2.3.4.1.1 Co-facteur protéique

Le fer est un élément vital pour les bactéries ce qui est en grande partie dû à son implication dans de nombreux processus physiologiques.

C'est un co-facteur incorporé dans des enzymes en lien avec le métabolisme énergétique comme les hydrogénases de type 1 et 2 (Blokesch *et al.*, 2004) convertissant les protons H^+ en dihydrogène ce qui permettrait principalement un maintien du potentiel redox cellulaire en diminuant le pouvoir réducteur de la cellule. Ces hydrogénases, en collaboration avec les formate-déhydrogénases, participent au transfert d'électrons, grâce au fer, dans les fermentations d'acides aminés. (Graentzdoerffer *et al.*, 2003). En s'incluant dans des clusters fer-soufre, le fer possède aussi un rôle dans la fixation de l'azote en étant partie intégrante du

co-facteur FeMo-co des nitrogénases à molybdène, principalement décrites chez les microorganismes diazotrophiques (Rubio & Ludden, 2008).

C'est aussi un co-facteur d'enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN depuis longtemps connues chez *B. subtilis* (Arceneaux & Byers, 1977). Son implication dans la protection contre les agents alkylants est également bien connue chez *E. coli*. Chez cette espèce, en réponse aux agents alkylants, il y a induction de l'expression des gènes *ada*, *alkA*, *alkB* et *aidB*. Le gène *alkB* code pour la protéine AlkB fer-dépendante qui est une dioxygénase permettant la réparation de l'ADN, endommagé par ces même agents alkylants. AlkA catalyse la déméthylation oxydative des bases A et C de l'ADN impliquant l'alpha-cétoglutarate, l'oxygène et le Fer (FeII) qui va permettre de restaurer les bases A et C non-méthylées (Wrzesinski *et al.*, 2010).

Toujours en lien avec les acides nucléiques, le fer permet de réguler l'expression de nombreux gènes grâce à des régulateurs de transcription fer-dépendants. En tant que co-facteur de ces régulateurs, le fer permet la régulation de nombreuses fonctions, aspect que nous traiterons plus tard. Il permet notamment la régulation de systèmes d'acquisition comme le cluster de gènes pour la biosynthèse de l'acide dihydroxybenzoique (DHBA = chélateur de fer) et de sidérophores comme le catéchol chez *Streptomyces* (Patzer & Braun, 2010). Il permet aussi la régulation de la transcription en jouant le rôle de co-facteur du régulateur Fnr (Green *et al.*, 1996). Le fer des clusters Fe-S inclus dans ces activateurs de transcription Fnr permet la transcription de gènes en réponse à l'anoxie (Ralph *et al.*, 2001).

2.3.4.1.2 Toxicité

Le fer réduit, FeII, présent dans le cytoplasme est un élément très réactif qui peut conduire à des réactions non souhaitées et toxiques pour les cellules (Halliwell & Gutteridge, 1984, Touati, 2000) et à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). L'une des réactions les plus connue est la réaction de Fenton ($Fe^{2+}_{(aq)} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+}_{(aq)} + OH^-_{(aq)} + {}^{\cdot}OH$) qui conduit à la formation du radical hydroxyle. Ces radicaux attaquent l'ADN et les lipides membranaires.

D'une manière générale, les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'hème que les bactéries à Gram négatif (Anzaldi & Skaar, 2010). Même si la toxicité de l'hème est connue depuis longtemps, tous les mécanismes aboutissant à cette toxicité n'ont pas encore été élucidés.

L'hème peut s'intercaler dans les membranes et catalyser des réactions redox non souhaitées. Même si cet aspect peut être dû à la présence de fer en son centre, des porphyrines sans fer peuvent aussi être toxiques pour la cellule (Stojiljkovic *et al.*, 1999, Ma *et al.*, 2009).

Inclus dans les clusters fer soufre (Fe-S), le fer possède un rôle clé dans la résistance aux stress oxydants en tant que senseur intracellulaire de ces stress et de la limitation en fer. Plus de 100 protéines contenant des clusters Fe-S ont été décrites (Kiley & Beinert) et sont impliquées dans de nombreux processus comme la photosynthèse ou la respiration (Benjamin *et al.*, 2010).

Dans le système SoxRS, décrit chez *E. coli*, qui régule l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress superoxyde, la protéine SoxR possède un cluster Fe-S (Koo *et al.*, 2003, Benjamin *et al.*, 2010).
La synthèse des clusters Fe-S est régulée par la disponibilité en fer et l'état d'oxydation de la cellule grâce à trois régulateurs ; *i*) IscR, *ii*) OxyR et *iii*) Fur (Schwartz *et al.*, 2001, Benjamin *et al.*, 2010). Lorsque la protéine IscR possède un cluster Fe-S intact, elle réprime la transcription de la machinerie Isc, responsable de la synthèse de base des clusters Fe-S, et de près de 40 gènes chez *E. coli* (Giel *et al.*, 2006). Indépendemment de son cluster Fe-S (Nesbit *et al.*, 2009), IscR est impliquée avec OxyR et Fur dans la régulation de la machinerie Suf (Patzer & Hantke, 1999), une autre voie de synthèse des clusters Fe-S. Sous forme oxydée, IscR et OxyR activent la transcription de Suf, tout comme Fur en cas de carence en fer. Chez la bactérie phyto-pathogène, *Erwinia chrysanthemi*, la machinerie Suf est également contrôlée par le régulateur Fur (Nachin *et al.*, 2001).
Ainsi, la machinerie Suf serait synthétisée principalement en cas de stress oxydant ou de carence en fer (Outten *et al.*, 2004, Benjamin *et al.*, 2010).

2.3.4.1.3 Séquestration du fer

Le fer étant un élément très réactif, une fois dans le cytosol bactérien, il est important pour les bactéries de le maintenir séquestré sous une forme stable.

Les ferritines, au sens large, permettent de séquestrer et minéraliser le fer. Elles représentent une classe de protéines répandues chez les animaux, les plantes ainsi que chez les bactéries. Il en existe trois types ; *i*) les ferritines, trouvées chez les procaryotes et également chez les eucaryotes, *ii*) les bactérioferritines, uniquement présentes chez les eubactéries, capables de fixer l'hème (Andrews *et al.*, 1995, Carrondo, 2003) et *iii*) les ferritines

dodécamériques de type Dps pour Dna-binding Protein from Starved cells, présentes uniquement chez les procaryotes mais où elles sont très représentées, (Smith, 2004). Les Dps servent à la fois à séquestrer le fer et à protéger l'ADN (Smith, 2004). Les deux premiers types de ferritines sont formés de 24 sous-unités alors que les Dps ne sont formées que de 12 sous-unités. Ces trois formes de stockage du fer peuvent coéxister au sein d'une même espèce (Andrews *et al.*, 2003).

Les ferritines possèdent un rôle double, d'une part elles constituent une forme de réserve lors de carence en fer et d'autre part elles protègent les cellules des espèces réactives de l'oxygène (Chasteen & Harrison, 1999).

Chez *E. coli* et chez *E. chrysanthemi* qui possèdent toutes deux des gènes codant pour une ferritine et une bactérioferritine, *ftnA* et *bfrA* respectivement, des mutants *ftnA* et *ftnA*/*bfrA* présentent des difficultés à croître en milieu carencé en fer mais seulement après une pré-culture dans un milieu riche en fer (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999, Boughammoura *et al.*, 2008). Ceci montre que les ferritines ont à la fois un rôle protecteur et aussi un rôle important dans la fourniture de fer en cas de carence.

L'incorporation du fer dans les ferritines est réalisée grâce à la protéine Dpr (Dps-like Protein regulator) qui favorise l'incorporation du fer dans les protéines Dps (Pulliainen *et al.*, 2005).

Chez le pathogène humain et porcin, *Streptococcus suis*, des mutations Dpr ou Dps rendent la bactérie sensible aux stress péroxydes et altèrent sa croissance (Pulliainen *et al.*, 2005). La résistance à un antibiotique fer-dépendant, la streptonigrine, est plus faible dans le mutant *dpr* indiquant un plus grand pool de fer dans le cytoplasme. La surexpression de Dpr augmente cette résistance suggérant une meilleure séquestration du fer (Pulliainen *et al.*, 2005).

Cette capacité de séquestrer le fer par les ferritines est un facteur important dans les processus de virulence. Chez *L.* monocytogenes (Dussurget *et al.*, 2005), un mutant *dps* est sensible au stress péroxyde, au stress froid ou chaud et présente une croissance ralentie en faible et forte concentration en fer. Cette mutation réduit également la production du facteur de virulence, listerio-lysine O, de *L. monocytogenes* (Dussurget *et al.*, 2005).

2.3.4.2 Devenir de l'hème

Une fois dans le cytoplasme, l'hème peut être utilisé soit comme une source de porphyrine soit comme une source de fer.

2.3.4.2.1 Les utilisations principales

Chez certaines bactéries, comme chez les eucaryotes, l'hème peut être incorporé dans la catalase (de type KatA) ce qui va permettre la dismutation du péroxyde d'hydrogène selon la réaction : $2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$. Cette réaction va permettre aux bactéries de mieux résister aux stress oxydants comme chez des espèces telles que *L. sakei* (Hertel *et al.*, 1998), *S. aureus* (Masmoudi *et al.*, 2011) ou encore *P. aeruginosa* (Ma *et al.*, 1999). Chez cette dernière, l'hème peut aussi être séquestré dans des ferritines, telles que la bactérioferritine Bfrα qui contribuerait à augmenter l'activité catalase en fournissant l'hème à l'enzyme (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999, Ma *et al.*, 1999) lorsque les conditions deviennent limitantes.

L'hème est connu pour son rôle dans la respiration car il est incorporé dans les cytochromes respiratoires. Ces cytochromes respiratoires constituent les accepteurs finaux d'électrons qui vont réduire l'oxygène en eau en présence d'ions H^+. C'est beaucoup plus récemment qu'on a montré que certaines espèces fermentaires comme les bactéries lactiques telles *L. lactis* ou *E. faecalis* pouvaient aussi respirer (Pedersen *et al.*, 2008, Brooijmans *et al.*, 2009).

L'hème peut être incorporé dans d'autres protéines de membranes que les cytochromes impliquées dans la réduction des oxydes de manganèse et de vanadium extracellulaire chez *Shewanella oneidensis* (Myers & Myers, 2004) ayant ici une utilisation à but nutritif en solubilisant ces éléments pour la cellule.

2.3.4.2.2 Libération du fer

Les hème-oxygénases représentent une famille de protéines qui peuvent se fixer à l'hème et le dégrader, libérant ainsi le fer qui peut être utilisé pour les besoins cellulaires. C'est aussi un moyen de détoxification de l'hème présent chez de nombreuses espèces comme *Neisseria*, *Clostridium*, *Listeria*, *Campylobacter* ou *Pseudomonas*.

Une fois dans le cytoplasme, l'hème est pris en charge par les protéines IsdG et IsdI chez *S. aureus*, ou par HmuO chez *C. diphteriae*, conduisant à l'extraction du fer de l'hème (Schmitt, 1997, Skaar *et al.*, 2004a, Wu *et al.*, 2005). La séparation de l'hème et du fer

conduit à la libération du FeII et de staphylobiline ou de biliverdine (Frankenberg-Dinkel, 2004). Ces protéines sont également représentées chez des espèces comme *Deinococcus radiodurans*, *P. aeruginosa*, *Agrobacterium tumefaciens* et des cyanobactéries (Anzaldi & Skaar, 2010).

Chez *E. coli*, la prise en charge de l'hème par une protéine de type Dyp-peroxidase (YfeX) conduit à la libération du fer en restituant la protoporphyrin IX intacte (Létoffé *et al.*, 2009).

2.3.5 Régulation du fer intracellulaire par les bactéries

Il existe des régulateurs de transcription qui régulent la concentration du fer intracellulaire en fonction de sa disponibilité en coordonant la transcription de gènes impliqués dans son acquisition ou sa séquestration. La majorité des bactéries régulent ainsi leurs besoins en fer grâce aux régulateurs Fur pour Ferric Uptake Regulator (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999, Escolar *et al.*, 1999, Hantke, 2001, Braun, 2003).

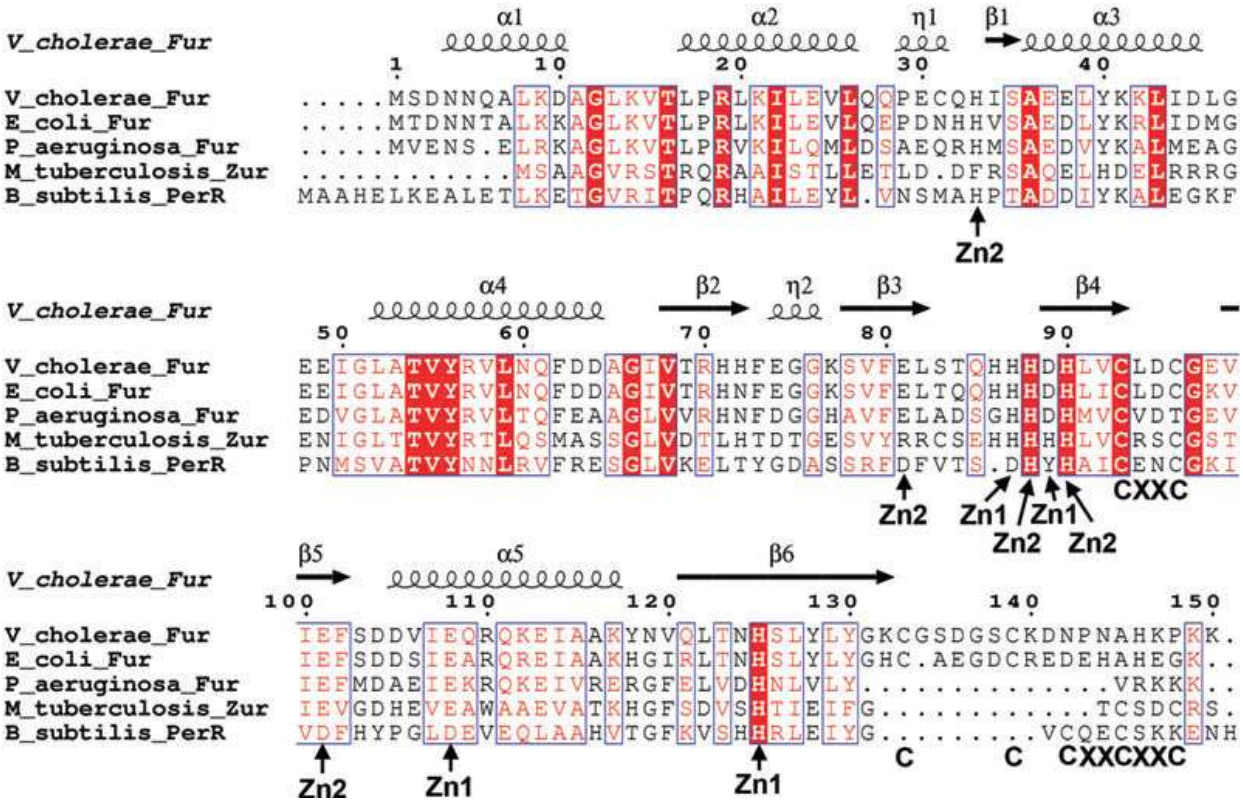
2.3.5.1 Les régulateurs de transcription fer-dépendants de la famille Fur

La famille la plus représentée de régulateurs de transcription fer-dépendant est la famille Fur. La protéine la plus décrite de cette famille est la protéine Fur_{Ec} étudiée chez *E. coli* (Hantke, 1981). Cette protéine Fur_{Ec} est définie comme un senseur de fer, répresseur de l'expression de gènes codant pour les systèmes d'acquisition du fer. Les régulateurs de la famille Fur sont très répandus chez les bactéries et le nombre détecté d'homologues ne cesse d'augmenter. En 2007, Lee et Helmann estimaient leur nombre à environ 800 (Lee & Helmann, 2007). Aujourd'hui, ce nombre dépasse les 3400 homologues (PFAM PF01475 ~3416 et EMBL Interpro IPR002481 ~5131).

Ces différents homologues peuvent être divisés en trois classes : *i*) la plus documentée est constituée des homologues Fur qui régulent l'homéostasie du fer dans la cellule et peuvent aussi être impliqués dans l'acido-résistance (Hall & Foster, 1996) ou la protection contre les stress oxydant (Escolar *et al.*, 1999, Touati, 2000, Hantke, 2001, Horsburgh *et al.*, 2001b, Baichoo *et al.*, 2002, van Vliet *et al.*, 2002, Lee & Helmann, 2007, Giedroc, 2009, López-Gomollón *et al.*, 2009, Jittawuttipoka *et al.*, 2010), *ii*) la deuxième classe contient des protéines Fur-like qui contrôlent l'homéostasie d'autres métaux comme le zinc (Zur) (Gaballa *et al.*, 2002), le nickel (Nur) (An *et al.*, 2009) ou le manganèse (Mur) (Lee & Helmann, 2007, Platero *et al.*, 2007) et enfin *iii*) les protéines de la troisième classe, type PerR, se spécialisent

dans la réponse au stress oxydant mais ne sont pas directement impliquées dans la réponse au fer (Fuangthong *et al.*, 2002, Mongkolsuk & Helmann, 2002, Fuangthong & Helmann, 2003, Moore *et al.*, 2004, Brenot *et al.*, 2005, Hillmann *et al.*, 2009, Giedroc, 2009, Jacquamet *et al.*, 2009). L'alignement de membres de la famille Fur fonctionnellement séparés montre qu'ils partagent une structure commune conservée comme le présente la Figure 11.

Figure 11 : Alignement de séquences de membres des sous-familles Fur, Zur et PerR (Sheikh & Taylor, 2009). La structure secondaire de la protéine Fur_{Vc} de *V. cholerae* est représentée au-dessus de l'alignement.



2.3.5.1.1 Les Fur

Ces régulateurs sont qualifiés de répresseurs positifs, c'est-à-dire qu'ils se fixent à l'ADN en présence de fer comme co-répresseur (Andrews *et al.*, 2003).

Les protéines de la famille Fur sont de petite taille (~135 résidus) et présentent une séquence en acide aminé assez conservée. Ces protéines sont généralement associées en homo-dimères dont la conformation change lors de la fixation du co-represseur fer (Escolar *et al.*, 1999). Chaque dimère contient 2 domaines : un domaine amino-terminal de fixation à l'ADN, résidus ~ 1 à 83, et un domaine carboxy-terminal de dimérisation, résidus ~ 84 à 135

(Pohl *et al.*, 2003, Pecqueur *et al.*, 2006, Sheikh & Taylor, 2009). La résolution de la structure cristalline du régulateur Fur de *P. aeruginosa* (Fur_{Pa}) a montré qu'en l'absence de fer les régions amino-terminales de chacun des monomères semblaient assez éloignées (Pohl *et al.*, 2003) ce qui est cohérent avec une moindre affinité du régulateur pour l'ADN, dans cette condition physiologique.

Deux sites distincts de fixation des métaux ont été décrits. D'après la structure cristalline de la protéine Fur_{Pa} (Pohl *et al.*, 2003), un premier site se trouve dans le domaine de dimérisation où le zinc, utilisé pour l'étude, est hexacoordonné par les chaînes latérales des résidus His-86, Asp-88 (bidentate), Glu-107, His-124 et une molécule d'eau. Le second site se trouve à l'interface des domaines de fixation à l'ADN et de dimérisation, le zinc se trouvant tétracoordonné par les chaînes latérales des résidus His-32, Glu-80, His-89 et Glu-100.
Des expériences d'échange de métaux (zinc par fer) semblent indiquer un échange possible au site 1 qui serait alors le site régulateur de Fur_{Pa}. La position entre les domaines amino- et carboxy-terminaux du site 2 en ferait le site de fixation du zinc structural (Pohl *et al.*, 2003).
D'autres études, basées sur des mutations ponctuelles, réalisées sur les protéines Fur d'autres espèces comme *B. subtilis*, *S. typhimurium* et *V. cholerae* (Fur_{Vc}) montrent que seules des mutations dans le site 2 altèrent la fixation du fer. Ainsi, l'idée la plus soutenue actuellement est que le site 2 serait le site régulateur alors que le site 1 ne jouerait qu'un rôle secondaire voire qu'il n'y aurait pas de zinc structural [pour revue (Lee & Helmann, 2007)]. Cette hypothèse est confortée par une simulation *in silico* de la protéine Fur_{Ec} (Ahmad *et al.*, 2009). Les resultats de cette simulation suggèrent que le site 2 serait en fait le site senseur du fer de la protéine. Elle suggère également que le FeII y est héxacoordonné ce qui est en accord avec l'idée soutenue par Lee & Helmann (Lee & Helmann, 2007). Différentes études sur la protéine Fur_{Vc} de *V. cholerae* montrent également que des substitutions dans le site 2 annulent la réponse au fer alors que des substitutions dans le site 1 ne conduisent qu'à une réduction de la réponse. Ces études confortent l'hypothèse formulée par Lee et Helmann (Lee & Helmann, 2007, Sheikh & Taylor, 2009).

2.3.5.1.2 Modes d'action de la protéine

La présence de fer va donc le plus souvent conduire à la répression de l'expression des gènes de transport ou de synthèse de sidérophores évitant ainsi une surcharge cytosolique de fer.

Les protéines cytoplasmiques de séquestration du fer, telles les ferritines, sont elles produites en présence de fer et de Fur. Chez *E. coli*, des gènes codant pour des protéines à fer

(*sodB*), à cluster Fe/S (*acnA*, *fumA-B*) ou de séquestration du fer (*bfr*, *ftnA*) sont ainsi plus transcrits en présence de fer et de Fur, exepté pour le gène codant la ferritine (*pfr*) chez *H. pylori* (Delany *et al.*, 2001b), où étonnamment, seul l'apo-Fur se fixe à l'ADN [pour revue (Andrews *et al.*, 2003, McHugh *et al.*, 2003)].

i) Fixation directe de la protéine à l'ADN.

La fixation à l'ADN en présence du co-répresseur FeII bloque l'accès du promoteur à l'ARN polymérase, empéchant la transcription des gènes cibles. A l'inverse, en absence de son co-répresseur, le répresseur libère la région promotrice de gènes cibles, la polymérase pouvant alors démarrer la transcription (de Lorenzo *et al.*, 1987, Escolar *et al.*, 1999).

A côté de ce mécanisme classique, la protéine Fur peut aussi fixer la molécule d'hème. En effet, Fur est une protéine riche en Histidine (Figure 11) (Hantke, 1981), un ligand de choix pour la molécule d'hème. Ainsi, Smith *et al*. ont montré que la protéine Fur_{Ec} était capable de fixer la molécule d'hème, vraisemblablement au même site (résidus Histidine) que le manganèse utilisé pour mimer le fer (Smith *et al.*, 1996). Ces auteurs ont observé par dichroïsme circulaire que l'hème comme le manganèse modifiaient la conformation de Fur_{Ec}, faisant ainsi de Fur une protéine capable de répondre directement à la présence d'hème dans le cytoplasme.

Pour assurer sa fonction, la protéine Fe-Fur reconnaît une séquence opératrice sur l'ADN appelée boîte Fur, située dans la région promotrice des gènes cibles (de Lorenzo *et al.*, 1987, Escolar *et al.*, 1999). La séquence de la boîte Fur est conservée entre les espèces mais ses interprétations sont variées.

Des expériences de protection à la DNAse I de divers promoteurs de gènes régulés par Fur chez *E.coli* ont permis de définir une séquence consensus de fixation du régulateur Fe-Fur (de Lorenzo *et al.*, 1987, Escolar *et al.*, 1999). La protection observée est de l'ordre de 30 pb et il est généralement admis que cette protection contient la boîte Fur consensus de 19 pb, GATAATGATAATCATTATC, qui est soit inversée répétée (de Lorenzo *et al.*, 1987) soit vue comme la succession (6-6-1-6) de l'héxamère NATWAT (Escolar *et al.*, 1999, Hantke, 2001). A l'origine, la séquence Fur-box était considérée comme le site de fixation d'un seul homo-dimère Fur (de Lorenzo *et al.*, 1987). De plus récentes études chez *B. subtilis* suggèrent un motif minimum inversé répété de 15 pb (7-1-7) représenté dans la Figure 12, qui est nécessaire à la fixation d'un dimère, ainsi le consensus de 19 pb permettrait la fixation de 2 homo-diméres Fur (Baichoo & Helmann, 2002).

Les nombreuses études menées sur les régulateurs de cette famille conduisent en effet, à controverser la séquence Fur-box. Par exemple, l'étude chez *B. subtilis* a conduit à une réinterprétation de la séquence consensus. L'analyse de 19 séquences promotrices de gènes démontrés expérimentalement comme régulés par Fur révèle un consensus de 21 pb. Ce consensus serait constitué de la répétition de motifs heptamériques inversés répétés (7-1-7) et se recouvrant [$(7\text{-}1\text{-}7)_2$] pour Fur chez *B. subtilis* (Figure 12) (Baichoo & Helmann, 2002).

Figure 12 : Comparaison des interprétations de la Fur-box [selon (Baichoo & Helmann, 2002)]. (A) La Fur box classiquement décrite (19 pb inversée-répétée) (B) Fur-box constituée de répétitions de l'héxamère NATWAT. (C) Fur-box proposée chez *B. subtilis* constiuée de 2 heptamères inverses répétés se chevauchant [(7-1-7)2] constituant une séquence de 21 pb.



Alors que la protéine Fur_{Hp} se fixe au promoteur du gène *frpB* (acquisition du fer) (Delany *et al.*, 2001a), pour réprimer sa transcription en présence de fer, grâce à une boîte Fur consensus (Escolar *et al.*, 1999), elle se fixe aussi au promoteur du gène *pfr* (ferritine) grâce à une séquence opératrice qui ne correspond pas à une boîte Fur, ce qui entraine l'activation de la transcription de ce gène (Delany *et al.*, 2001b). Cette fixation de Fur se fait sans l'aide du co-facteur FeII et ce dernier réduit l'affinité de Fur pour l'ADN (Delany *et al.*, 2001b, Ernst *et al.*, 2005). Dans le promoteur P*pfr*, la protéine apo-Fur protège jusqu'à 3 régions (+5/-36 ; -49/-85 ; -110/-148). Chacune de ses régions possède un nucléotide sensible à la DNAse I en son centre. Les auteurs suggèrent donc que les deux sites de chaque région sont liés indépendamment et simultanément par Fur plutôt que de façon coopérative ainsi la paire de bases non protégée correspondrait à la jonction entre les protéines.

Ceci a constitué la mise en évidence d'une régulation directe et activatrice de la protéine Fur chez *H. pylori* (Ernst *et al.*, 2005). Cette activation étant médiée par la protéine apo-Fur.

ii) Régulation indirecte grâce à un ARN antisens

A côté de cette activation directe, un mode d'activation indirecte a été décrit. Une analyse du modulon Fur chez *E. coli* a montré qu'il y avait à la fois des gènes réprimés et des gènes induits par le régulateur Fur. Les gènes induits par Fur chez *E. coli* ne possèdent pas de séquence régulatrice de type Fur-box (McHugh *et al.*, 2003) et aucune fixation de Fur n'a été décrite sur ces promoteurs.

L'activation du gène *sodB* par Fur chez *E. coli* K12 a été bien étudiée. Il a été montré que la protéine Fur faisait intervenir un élément *cis* palindromique en +1 de transcription ainsi qu'une région de 14 pb AT-riche en aval (Dubrac & Touati, 2000). Dans cette étude, un système rapporteur (P*sodB-lacZ*) montre une activité β-galactosidase 7 fois plus élevée et que l'ARNm de *sodB* est trois fois plus stable en présence de Fur, suggérant une régulation post-transcriptionelle. Dans une étude ultérieure, cette équipe a montré que Fur ne modifiait pas la transcription de *sodB*, le répresseur ne se fixant qu'avec une faible affinité au promoteur P*sodB* et ne se liait pas non plus à l'ARNm suggérant un intermédiaire dans cette régulation. L'intermédiaire probable à l'activation de transcription médiée par Fur a été décrit à la même période par une autre équipe (Massé & Gottesman, 2002). Il s'agit d'un petit ARN de 90 nucléotides nommé RyhB. Cet ARN est négativement contrôlé par Fur de sorte que le taux de RyhB est inversement proportionnel à celui des gènes induits par Fe-Fur, *sdhCDAB, acnA, fumA, ftnA, bfr* et *sodB* chez *E. coli* (Massé & Gottesman, 2002). RyhB présentant une forte homologie avec les séquences promotrices des gènes régulés, agirait donc comme un ARN antisens, comme cela a été démontré chez les eucaryotes. Ce système d'activation indirecte de la transcription médiée par RyhB requiert un autre intermédiaire, la protéine Hfq. Cette dernière se fixe aux ARNs cibles, comme il a déjà été montré pour d'autres systèmes de régulation impliquant des ARNs (Massé & Gottesman, 2002). Ainsi, la transcription des gènes cibles ne se trouve pas modifiée et RyhB ne se fixe que sur les ARN messagers.

Même si ce mode d'activation indirecte a ouvert de nouvelles perspectives sur le mode d'action du régulateur global Fur, ici décrit pour le gène *sodB* via un ARNs, ce mécanisme n'est mis en évidence que dans quelques espèces comme ici *E. coli* et aussi chez *E. chrysanthemi* (Boughammoura *et al.*, 2008).

2.3.5.1.3 Les régulateurs qui répondent à d'autres métaux

Les Zur

La capacité des membres de la famille Fur à répondre spécifiquement *in vivo* au zinc a été montrée en parallèle chez *E. coli* (Patzer & Hantke, 1998) et chez *B. subtilis* (Gaballa & Helmann, 1998).

Chez *E. coli*, la transcription de 2 opérons codant pour un système de transport a été montrée comme régulée par la présence de fer. Ces opérons (*znuA-znuBC*) codent pour un système de transport spécifique du zinc (ZnuABC). Les souches mutantes de ces opérons cultivées en présence d'un chélateur de fer (EDTA) ont des difficultés de croissance mais elles sont compensées par l'ajout de zinc. La protéine Zur se fixe sur la région promotrice de *znuA* et *znuCB* (Patzer & Hantke, 1998, Patzer & Hantke, 2000). Par ailleurs, la protéine Zur_{Ec} est une protéine sensible à de faibles concentrations de zinc de l'ordre du femtomolaire (Outten & O'Halloran, 2001, Outten *et al.*, 2001). Ceci montre que les bactéries régulent très finement l'homéostasie des métaux même si ces derniers ne sont pas hautement toxiques pour la cellule.

Chez *B. subtilis*, la protéine Zur régule également deux opérons impliqués dans le transport du zinc mais à partir de deux promoteurs distants (Gaballa & Helmann, 1998). Comme chez *E. coli*, un retard de croissance est observé dans les mutants de ces systèmes de transport en présence d'EDTA, retard qui est compensé par l'ajout de zinc.
L'analyse globale du régulon Zur chez *B. subtilis* en utilisant des micropuces à ADN a permis de détecter des gènes supplémentaires régulés portant ce nombre à 3 opérons codant pour des systèmes de transport du zinc chez cette espèce (Gaballa *et al.*, 2002). A partir de l'alignement des 4 promoteurs régulés par Zur chez *B. subtilis*, les auteurs proposent de définir une boîte Zur de reconnaissance de l'ADN de 28 pb contenant un seul motif 7-1-7 connu pour les boîtes des régulateurs de la famille Fur. Ainsi, les protéines Zur chez *B. subtilis* reconnaissent une séquence palindromique imparfaite proche de la boîte Fur mais possédant trois bases en plus à chaque extrémité aaaTCGTAATNATTACGAttt (Fuangthong & Helmann, 2003).

Les protéines de la sous-famille Zur montrent une forte spécificité pour la régulation de l'acquisition du zinc. Comprendre comment ces protéines, si proches des protéines Fur, sont devenues spécifiques à ce métal a été rendu possible grâce à la structure cristalline de la protéine FurB de *Mycobacterium tuberculosis* (Lucarelli *et al.*, 2007). FurB est en fait une protéine Zur car elle régule l'acquisition du zinc et elle est capable de se fixer au promoteur des gènes *znuABC*. Les auteurs décrivent deux sites de fixation du métal comme pour la

majorité des protéines Fur. Cependant, le site 1 serait coordonné de façon tétrahédrique par les chaines latérales des résidus His-81, His-83, Cys-76 et Asp-62 alors que dans le site 1 des protéines Fur est coordonné de façon octahédrique. Ces différences de coordination seraient la clé de la sélectivité de la protéine Zur pour le zinc. En effet, la superposition des régions amino-terminales de fixation à l'ADN des protéines Fur_{Pa} et Zur_{Mt} ne montre guère de différences (Lucarelli *et al.*, 2007). Le second site de fixation est considéré comme le site structural de la protéine Zur.

Les Mur

De même que pour les Zur, une sous-famille Mur de régulateurs Fur a été décrite. Chez *Sinorhizobium meliloti*, un répresseur Mur répondant spécifiquement au manganèse régule un système d'acquisition de ce métal, le système MntABCD (Platero *et al.*, 2007). Même si ce répresseur est capable de se fixer à son promoteur cible en présence de fer ou de zinc, cette fixation est moins stable que celle générée en présence de manganèse. Les auteurs de cette étude montrent que la protéine Mur n'est capable de se fixer qu'avec une faible affinité à une boîte Fur consensus (de Lorenzo *et al.*, 1987). En revanche, deux boîtes Mur (MRS1 et MRS2) possédent des caractères propres aux boîtes Fur mais est spécifique à la protéine Mur (MRS1 : TGCAATT-N7-AATTGCA et MRS2 : TGCAAAT-N7-AATCGCA). La protéine Mur possède une autre propriété propre à la famille Fur qui est de se fixer à l'ADN en dimère ou du moins deux monomères. Une autre protéine Mur a aussi été décrite chez *Rhizobium leguminosarum* (Diaz-Mireles *et al.*, 2005).

Les Nur

Comme pour le represseur FurB (Zur) de *M. tuberculosis*, une structure cristalline a été résolue pour la protéine Nur (Nickel uptake regulator) chez *Streptomyces coelicolor* (An *et al.*, 2009). Là encore, malgré une forte homologie de séquence, des modifications de sites de fixation du métal, de reconnaissance de l'ADN conduisent cette protéine vers une spécialisation dans la réponse au nickel et comme pour certaines protéines Fur-like, PerR, vers une réponse au stress oxydant.

2.3.5.1.4 Les régulateurs qui répondent à d'autres signaux

Une sous-famille un peu à part chez les Fur-like est celle des protéines spécialisées dans la réponse à d'autres signaux commes les stress oxydants ou la disponibilité en hème : PerR ou Irr.

Comme pour les régulateurs Fur, les PerR sont des répresseurs en présence de fer, sensibles à la présence d'oxydants. Ainsi, ils utilisent un mécanisme particulier de régulation médié par le métal qui va transmettre l'oxydation à la protéine (Metal-Catalysed Oxidation : MCO) (Mongkolsuk & Helmann, 2002, Postle, 1993, Lee & Helmann, 2006) pour des valeurs de l'ordre du micromolaire de péroxyde d'hydrogène. PerR est un régulateur global de la réponse au stress oxydants chez plusieurs espèces comme *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. pyogenes* et *L. monocytogenes* (Bsat *et al.*, 1998, Horsburgh *et al.*, 2001b, Moore & Helmann, 2005, Brenot *et al.*, 2005, Rea *et al.*, 2005, Giedroc, 2009). La protéine PerR contrôle la transcription de gènes impliqués dans la séquestration de fer, la réponse au stress oxydant avec par exemple la catalase (Horsburgh *et al.*, 2001b, Horsburgh *et al.*, 2001a, Lee & Helmann, 2006, Lee & Helmann, 2007).

La structure cristalline de la protéine apo-PerR de *B. subtilis* montre une forte homologie structurelle entre les protéines Fur_{Pa} et $PerR_{Bs}$ malgré une faible homologie de séquence, notamment dans les régions de fixation à l'ADN et de dimérisation (Traore *et al.*, 2006) dont les modèles se superposent avec peu de déviation. Plus récemment, la structure de la protéine active $PerR_{Bs}$ comparée à la forme non-active montre de que les structure secondaires sont similiaires pour les domaines N et C terminals mais l'orientation d'un domaine par rapport à l'autre est différente (Jacquamet *et al.*, 2009). Cette structure cristalline confirme l'observation faite sur le cristal de l'apo-PerR qui montrait un site Zinc structural coordonné par 4 résidus Cystéine et un site actif pentacoordonné par des résidus Histidine et Aspartate (Traore *et al.*, 2006, Jacquamet *et al.*, 2009). Cette pentacoordination forme un site pyramidal où le résidu His93 occupe la position apicale (Jacquamet *et al.*, 2009).

Les protéines PerR chez *B. subtilis* reconnaissent une séquence qui diffère de la boîte Fur consensus de 15 pb TT**T**ATAATNATTAT**A**A décrite chez cette espèce (Fuangthong & Helmann, 2003).

2.4 Métabolisme du fer et de l'hème chez les Bactéries Lactiques

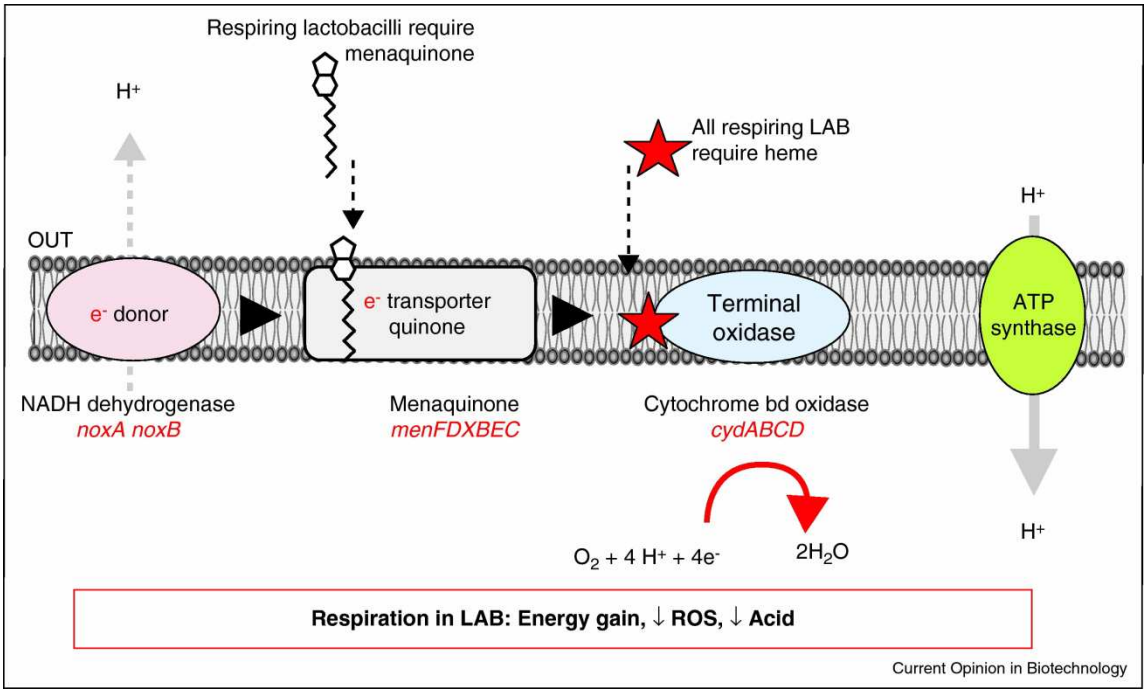
Alors que le fer est un élément central et essentiel pour la majorité des bactéries, certaines semblent pourtant échapper à cette règle. Pendant longtemps, les bactéries lactiques (LAB) ont fait figure d'exception (Archibald, 1983, Bruyneel *et al.*, 1989, Weinberg, 1997) qualifiée même d'anomalie par certains auteurs, du fait de l'absence de besoins en fer pour leur croissance. Que le milieu soit supplémenté ou carencé en fer, aucune différence de croissance n'était observable et les essais de caractérisation de production de sidérophores furent sans succès (Pandey *et al.*, 1994, Imbert & Blondeau, 1998). Cependant, des études avaient montré la présence de fer associé au culot bactérien de bactéries lactiques et bifidobactéries (Kot *et al.*, 1995).

Le séquençage de plusieurs génomes de bactéries lactiques a révélé l'existence chez ces espèces de gènes impliqués dans le transport du fer, voire de cytochromes. Il a aussi été montré que l'addition d'hème ou d'hème et de ménaquinones conduisait à une augmentation de biomasse et contribuait à rendre les bactéries plus résistantes aux stress oxydants et acides par le biais de la respiration (Duwat *et al.*, 2001, Brooijmans *et al.*, 2009, Lechardeur *et al.*, 2011). Ces études détaillées ont montré que ce phénomène de respiration est observé pour les espèces *L. plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacilllus brevis, Lactobacillus paralimentarius, Streptococcus entericus, Lactococcus garviae* et *L. lactis* (Brooijmans *et al.*, 2009; Lechardeur *et al.*, 2011). Ainsi, de nombreuses LAB sont équipées génétiquement pour la respiration avec notamment la présence des gènes *noxA*, *cydAB* (codant pour les cytochromes de type bd) et des gènes de synthèse des ménaquinones (Brooijmans *et al.*, 2009, Lechardeur *et al.*, 2011).

Chez *L. lactis*, la bacterie commence à respirer lorsque le glucose se raréfie. La protéine du contrôle catabolique CcpA est conservée chez les bactéries à Gram positif et pourrait ainsi être impliquée dans cette modification métabolique. Une souche mutée du gene *ccpA* devient sensible à la présence d'hème. Sa presence conduit à l'arrêt de la croissance et à la mort cellulaire. Les metabolisms du fer, du carbone et la respiration semblent donc être sous le contrôle du régulateur CcpA (Gaudu *et al.*, 2003). La présence d'hème dans le milieu de culture de *L. lactis* permet à la bactérie de passer d'un métabolisme fermentaire à un métabolisme respiratoire. Ceci conduit à une augmentation de la biomasse, une nette amélioration de la survie en phase stationaire et à une réduction des stress oxydant (Rezaiki *et al.*, 2004).

Une étude globale de l'effet de l'hème et de la respiration chez *L. lactis* a révélé peu de modifications au niveau transcriptionnel (Pedersen *et al.*, 2008). Cette étude révèle notamment que les gènes codant pour des fonctions liées à la respiration, telles les cytochromes bd, l'acquisition de l'hème ou la synthèse de ménaquinones, sont exprimés indéfféremment de la condition de culture. Ceci indique que les cellules sont préparées à vivre en milieu aéré en présence d'hème. Cette étude relate qu'un groupe de gènes est fortement induit par la présence d'hème, *ygfCBA* (Pedersen *et al.*, 2008). Les auteurs montrent que cet opéron code pour un système d'export proche de celui décrit chez *S. aureus*, HrtAB (Stauff *et al.*, 2008). Cette approche globale montre que *L. lactis* est prêt à utiliser l'hème mais qu'il lui est aussi nécessaire de détoxifier cette molécule hautement réactive.

Figure 13 : Représentation schématique de la chaîne de transport minimale d'électrons chez les bactéries lactiques. Les gènes présents chez *L. lactis* sont indiqués en rouge en dessous. De nombreuses bactéries lactiques utilisent les sources d'hème et de ménaquinones de l'environnement mais sont incapables de les synthétiser (Lechardeur *et al.*, 2011).



2.4.1 Le cas de *Lactobacillus sakei*

L. sakei est la bactérie emblématique de la viande. Elle est connue pour posséder une catalase hème-dépendante. Nous savons que *L. sakei* requiert l'hème pour l'activité de sa catalase (Knauf *et al.*, 1992, Hertel *et al.*, 1998) et que cette espèce est dépourvue de

machinerie de synthèse de l'hème (Chaillou *et al.*, 2005). Dans l'étude de Brooijmans, elle apparait comme une des seules bactéries lactiques qui n'augmente pas sa biomasse en conditions permettant la respiration (Brooijmans *et al.*, 2009). Alors qu'elle colonise un écosystème riche en fer et en hème, peu de choses sont connues de son rapport avec le fer et l'hème.

L'unité FLEC (équipe FLEC, UMR Micalis depuis janvier 2010) a déterminé la séquence du génome de la souche 23K, qui est apparue comme remarquablement bien adaptée à la viande. En effet, la séquence révèle entre autres une propriété qui pourrait être importante pour la compétitivité de l'espèce dans son habitat car *L. sakei* possède des gènes codant pour des fonctions liées au métabolisme de l'hème et du fer (Chaillou *et al.*, 2005).

La souche *L. sakei* 23K est dépourvue de cytochromes respiratoires (gènes *cydABCD*) (Chaillou *et al.*, 2005, Brooijmans *et al.*, 2009). En revanche, elle possède un cytochrome P450, muté dans la souche 23K mais intact chez d'autres et un homologue de cytochrome B5 à groupement prosthétique hème (Chaillou *et al.*, 2005, Brooijmans *et al.*, 2009, Chaillou *et al.*, 2009). L'analyse du génome a mis en lumière l'existence de plusieurs systèmes de transport potentiels pour le fer : deux transporteurs de large spécificité pour le fer ou le manganèse et un système de type ABC qui présente des homologies avec le système Fhu. Ce système pourrait représenter un moyen pour *L. sakei* de se procurer du fer complexé à un sidérophore, voire de l'hème. *L. sakei* ne possède pas de système de transport de type Feo pour le fer FeII. *L. sakei* possède également trois régulateurs de transcription de la famille Fur. Cet ensemble de gènes codant pour des fonctions liées au métabolisme du fer et de l'hème, paraît suffisamment complet pour permettre l'utilisation des ressources de l'environnement en fer. Cette panoplie n'est pas sans évoquer celle de bactéries pathogènes et particulièrement celles qui peuvent résider dans la viande comme *L. monocytogenes* ou *E. coli* (Brown & Holden, 2002). *L. sakei* fait donc figure d'exception parmi les bactéries lactiques colonisant un milieu riche en fer et en hème mais ne respirant pas alors qu'elle utilise l'hème pour sa catalase.

3 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Nous savons que *L. sakei* est une bactérie particulièrement adaptée à la vie dans un environnement riche en fer et qu'elle possède un équipement génétique complet dédié à l'utilisation de ce métal. Cette aptitude pourrait constituer un facteur de compétitivité de l'espèce dans l'écosystème carné. Le but de ce travail de thèse est donc de mieux comprendre le métabolisme du fer chez *L. sakei*.

Pour ce faire, nous avons souhaité répondre à trois questions principales :

1) Est-ce que *L. sakei* est capable d'utiliser certaines sources de fer ?

Pour répondre à cette question, nous avons mis en place une méthodologie d'analyse du fer intracellulaire qui ne nécessite pas l'utilisation d'élément radioactif. Nous avons testé l'effet de sources de fer disponibles dans l'environnement naturel de *L. sakei*, sur sa croissance, sa survie et sa capacité à accumuler ce fer dans son cytoplasme.

Cet aspect du travail est traité dans le chapitre 1 et a été valorisé par une publication (Duhutrel *et al.*, 2010).

2) A quoi servent le fer et l'hème chez *L. sakei* ?

Nous avons souhaité répondre à cette question en deux temps. Tout d'abord, sachant que *L. sakei* possède des régulateurs de transcription de la famille Fur, nous avons mené une étude fonctionnelle afin de bien définir chacun de ces paralogues et de leur attribuer un rôle physiologique. Cet aspect est traité dans le chapitre 2 et l'article qui en découle sera prochainement soumis. Ensuite, comme le fer est pour la plupart des bactéries un élément essentiel nécessaire à de nombreux processus cellulaires, nous avons mené une analyse globale et évalué par transcriptomique et protéomique la réponse de *L. sakei* à la présence de fer ou d'hème. Cette partie est traitée dans le chapitre 3 et fera également l'objet d'un manuscrit.

3) Comment les différentes sources de fer utiles à *L. sakei* sont-elles transportées dans le cytoplasme ?

Une analyse fonctionnelle des transporteurs a été réalisée afin de préciser leur spécificité et d'évaluer leur implication dans la physiologie de la bactérie. Cet aspect est traité dans le 4ème chapitre.

4 RÉSULTATS

4.1 Chapitre 1 : les sources de fer utilisées par *L. sakei*

4.1.1 Contexte et objectifs

Notre premier objectif de travail était de déterminer si *L. sakei* était effectivement capable d'utiliser des sources de fer présentes dans son environnement carné telles que l'hème, la myoglobine et l'hémoglobine mais aussi la transferrine.

La démonstration de l'accumulation du fer chez les bactéries nécessite généralement l'utilisation de fer radioactif. L'usage de composés radioactifs ne permet pas de tester aisément de nombreuses sources, notamment le fer héminique.

Nous avons mis au point une méthode d'analyse nous permettant de tester ces différentes sources de fer, non radioactives. Nous avons développé une méthode originale jusqu'à présent jamais utilisée pour les bactéries en collaboration avec une autre unité de l'INRA (NuRéLiCe) et une unité de l'Institut Curie (Microscopie Ionique). Les résultats de cette étude ont constitué un point de référence pour la suite de notre travail.

4.1.2 Méthodologie

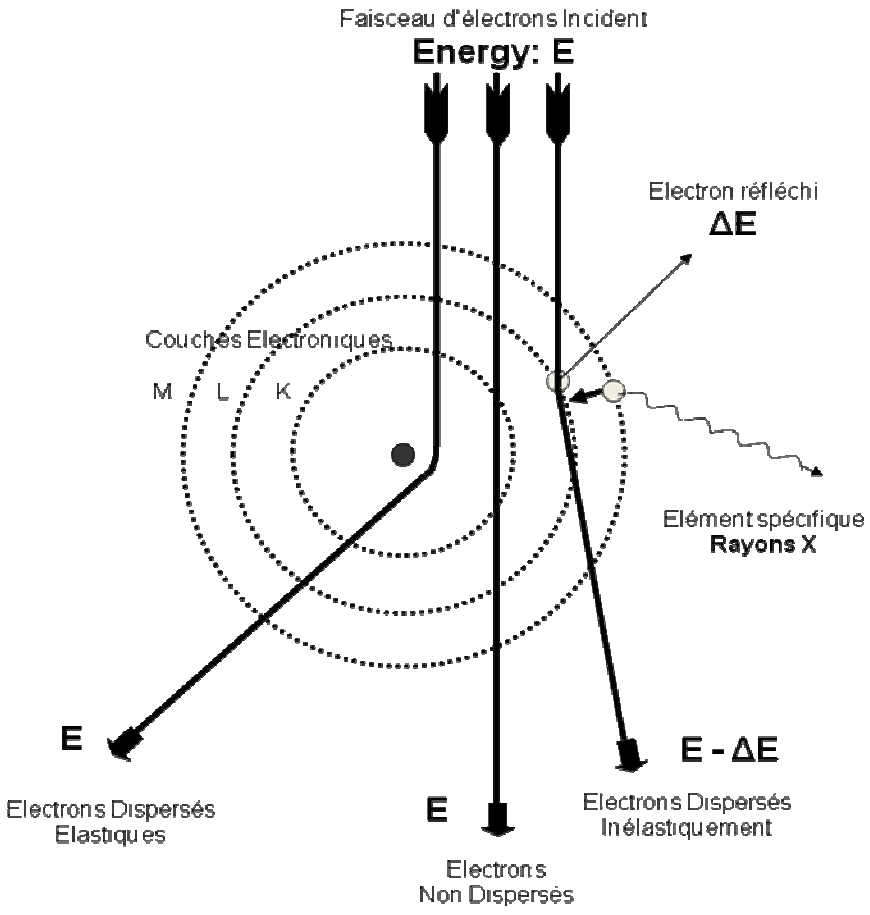
La souche de *L. sakei* utilisée dans cette étude est la souche 23K dont le génome a été séquencé (Chaillou *et al.*, 2005). Ceci nous a permis les approches de génétique, transcriptomique et protéomique pour la suite de nos travaux.

Le milieu utilisé est un milieu chimiquement défini MCD (Lauret *et al.*, 1996). Initialement, ce milieu n'est constitué d'aucune source de fer si ce ne sont des traces que l'on peut retrouver dans l'eau ou les ingrédients nécessaires à sa constitution.

La détermination de l'utilisation de sources de fer a été réalisée par analyse physiologique et par détection du fer dans le cytoplasme. Nous avons réalisé des suivis de croissance et de survie en présence de différentes sources de fer. Pour détecter le fer cytoplasmique, nous avons développé, avec la collaboration de C. Bordat (NuRéLiCe, INRA, Jouy en Josas), une approche par microscopie électronique nous permettant de nous affranchir de l'utilisation de sources de fer radioactives.

Cette approche est dite en perte d'énergie. Elle allie microscopie et spectroscopie ce qui permet d'obtenir une cartographie fine du fer intracellulaire. Le principe est le suivant : le faisceau d'électrons, d'énergie initiale E, en passant au travers de l'échantillon deshydraté et inclus dans une résine (épaisseur 40 nm) perd une énergie ΔE qui est directement proportionnelle à l'élément rencontré. On obtient ainsi une image morphologique par microscopie à 250 eV et une carte de distribution du fer à 718 eV.

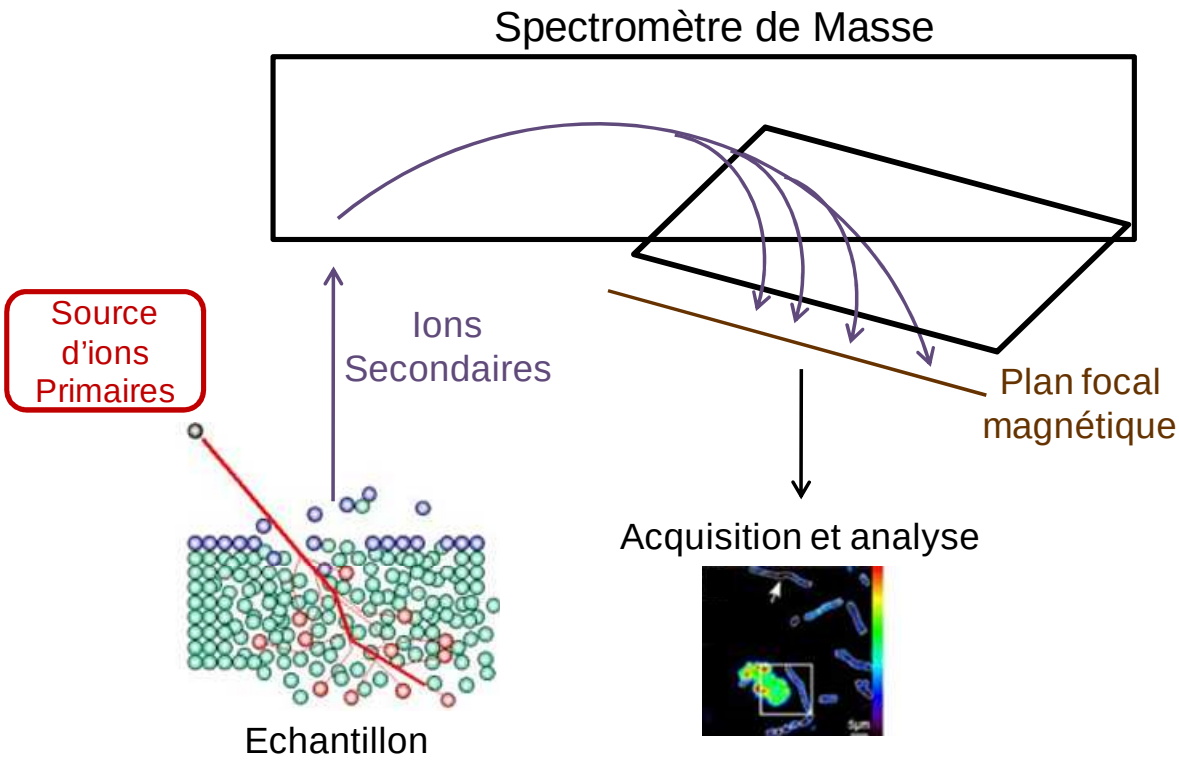
Figure 14 : Principe de la microscopie électronique en perte d'énergie (EELS).



Cette approche ne permet cependant que d'analyser un champ réduit à quelques cellules. Afin d'obtenir un champ plus large de l'ensemble de la population bactérienne, nous avons utilisé l'approche nanoSIMS (Secondary Ion Mass Spectrometry) en collaboration avec J.-L. Guerquin-Kern du laboratoire de Microscopie Ionique de l'Institut Curie d'Orsay. Le nanoSIMS est un procédé d'analyse qui permet également de déterminer la compostion chimique d'un échantillon. La technique consiste à bombarder la surface de l'échantillon avec un faisceau d'ions dits primaires (Cs^+ ou O^-) et à identifier les ions secondaires ainsi créés par

spectromètrie de masse (Figure 15). Cette analyse est réalisée sur une coupe adjacente aux coupes utilisées pour l'approche de microscopie électronique.

Figure 15 : Principe de la spectrométrie de masse à ionisation secondaire (nanoSIMS)



Les approches EELS et nanoSIMS sont apparues très complémentaires et constituent un outil efficace pour l'analyse du contenu cellulaire en fer des bactéries.

4.1.3 Résultats principaux

4.1.3.1 Effet physiologique des sources de fer sur *L. sakei*

Dans un milieu chimiquement défini supplémenté ou non avec différentes sources de fer, nous n'avons pas observé de différences de croissance, que ce soit au niveau de la DO_{600} ou de la biomasse finale.

Nous avons observé que les sources de fer libre ($FeCl_3$, $FeSO_4$) ou complexé (Citrate de fer, ferrichrome, ferrioxamine) ne modifiaient pas la survie en phase stationnaire de *L. sakei*. Nous avons également cherché à mettre en évidence la production de sidérophores mais n'en avons pas détecté. En revanche, les sources de fer héminiques et la transferrine bovine

permettent d'augmenter très significativement la survie de *L. sakei* en phase stationnaire. Alors qu'en MCD, *L. sakei* survit au maximum 48h, l'ajout de transferrine dans le milieu permet aux bactéries de survivre jusqu'à 96h et l'ajout de sources de fer héminiques conduit à une survie de 168h.

4.1.3.2 Analyse du fer intracellulaire

Dans un premier temps, nous avons adapté la méthode EELS à l'étude des bactéries. En effet, la préparation d'échantillons pour la microscopie électronique et le SIMS nécessite la deshydratation de l'échantillon, processus pouvant entraîner la perte des éléments du cytoplasme. Nous avons contourné cette contrainte en réalisant la déshydratation des échantillons bactériens à l'acétone à basse température (-88°C) dans un appareil de cryosubstitution AFS (Leica), après cryofixation par plongée sur miroir (Leica, MM80E). La deshydratation est réalisée en remplaçant l'eau par l'acétone puis l'acétone par la résine Spurr (Wallis & Griffin, 1973) en remontant progressivement la température de -88°C à +20°C.

Nous avons montré que le fer est internalisé préférentiellement à partir de sources de fer héminique et dans une moindre mesure à partir de la transferrine, ce qui est cohérent avec les phénotypes de survie observés. Le Nano-SIMS a confirmé ces observations à l'échelle de la population.

4.1.4 Publication 1 : Iron Sources Used by the Nonpathogenic Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei* as Revealed by Electron Energy Loss Spectroscopy and Secondary-Ion Mass Spectrometry

APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Jan. 2010, p. 560–565 Vol. 76, No. 2
0099-2240/10/$12.00 doi:10.1128/AEM.02205-09
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Iron Sources Used by the Nonpathogenic Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei* as Revealed by Electron Energy Loss Spectroscopy and Secondary-Ion Mass Spectrometry▽†

Philippe Duhutrel,[1] Christian Bordat,[2] Ting-Di Wu,[3,4] Monique Zagorec,[1] Jean-Luc Guerquin-Kern,[3,4] and Marie-Christine Champomier-Vergès[1]*

Unité Flore Lactique et Environnement Carné, UR309, INRA, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy en Josas, France[1]*; Unité Nurélice, UR909, INRA, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy en Josas, France*[2]*; U 759 INSERM, F-91405 Orsay, France*[3]*; and Institut Curie, Laboratoire de Microscopie Ionique, F-91405 Orsay, France*[4]

Received 11 September 2009/Accepted 9 November 2009

Lactobacillus sakei **is a lactic acid bacterium naturally found on meat. Although it is generally acknowledged that lactic acid bacteria are rare species in the microbial world which do not have iron requirements, the genome sequence of *L. sakei* 23K has revealed quite complete genetic equipment dedicated to transport and use of this metal. Here, we aimed to investigate which iron sources could be used by this species as well as their role in the bacterium's physiology. Therefore, we developed a microscopy approach based on electron energy loss spectroscopy (EELS) analysis and nano-scale secondary-ion mass spectrometry (SIMS) in order to analyze the iron content of *L. sakei* cells. This revealed that *L. sakei* can use iron sources found in its natural ecosystem, myoglobin, hemoglobin, hematin, and transferrin, to ensure long-term survival during stationary phase. This study reveals that analytical image methods (EELS and SIMS) are powerful complementary tools for investigation of metal utilization by bacteria.**

Most living organisms have requirements for iron, an element which is indispensable for many cellular processes. Its role in infection and virulence processes in pathogenic bacteria has also been evidenced (reference 11 and references therein). In the environment, iron cannot be used readily by bacteria because of its insolubility. In response to iron deprivation, microorganisms have thus developed sophisticated strategies in order to capture and sequestrate iron. Gram-negative and Gram-positive species generally synthesize extracellular siderophores, low-molecular compounds with very high affinity for ferric iron, and specific membrane receptors able to internalize iron-siderophore complexes (40). Some bacteria with absolute iron requirements, such as *Pseudomonas fragi*, a meat-borne species which does not produce siderophores, or the pathogenic species *Staphylococcus aureus*, which produces only three different siderophores, are able to use iron-siderophore complexes produced by other bacterial species sharing their environment (10, 36). In animals, heme constitutes the major iron source and is found in hemoproteins, such as hemoglobin and myoglobin. Bacteria can also gain free heme from proteolysis or oxidation of free hemoglobin issued from red blood cells. Other mammalian iron sources can be found in nonheminic iron storage and transport proteins, such as transferrin or lactoferrin.

Until recently, lactic acid bacteria were generally considered to be a rare bacterial group having no iron requirement (7, 41). No growth differences were noticed when different lactic acid bacterium species were tested in either iron-depleted or iron-supplemented media, and attempts to characterize siderophore production by these species were unsuccessful (22, 34). Recently, nonribosomal peptide synthesis pathways have been detected with the genomes of two *Lactococcus lactis* vegetal isolates (37). The authors of that study suggest that this could account for siderophore production as it exists in other bacteria (11), but this remains to be experimentally proven. One species, *Lactobacillus johnsonii*, exhibits iron requirements when inosine and uracil are supplied as the sole nucleotide sources in a chemically defined medium (15). Heme acquisition in *Lactococcus lactis* has been reported and is associated with the ability of the species to undergo respiration (13). But iron per se is still considered to be dispensable for these species, and heme is considered a heme source rather than an iron source. Genome sequences of several lactic acid bacteria have revealed that some species harbor genetic equipment involved in iron transport (31). This is the case in *Lactobacillus sakei*, a lactic acid bacterium particularly well adapted to meat, in which it becomes the predominant flora. Its genome has revealed some specific features that could account for its high adaptation to meat, including several putative iron transport systems and three iron-dependent transcriptional regulators belonging to the Fur family (8). *L. sakei* lacks classical respiratory cytochromes and is devoid of heme biosynthesis machinery, but a heme-dependent catalase has previously been reported (20, 26). The genome sequence of strain 23K showed the presence of putative cytochrome b_5 (8) and a mutated cytochrome P450 gene, this latter gene being intact in some other *L. sakei* strains (9). This equipment may indicate that iron and/or heme is transported into *L. sakei* cells.

* Corresponding author. Mailing address: Unité Flore Lactique et Environnement Carné, UR309, INRA, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy en Josas, France. Phone: 33 (0) 134 65 22 92. Fax: 33 (0) 1 34 65 21 05. E-mail: marie-christine.champomier-verges@jouy.inra.fr.

† Supplemental material for this article may be found at http://aem.asm.org/.

▽ Published ahead of print on 20 November 2009.

Downloaded from aem.asm.org at INRA on March 9, 2010

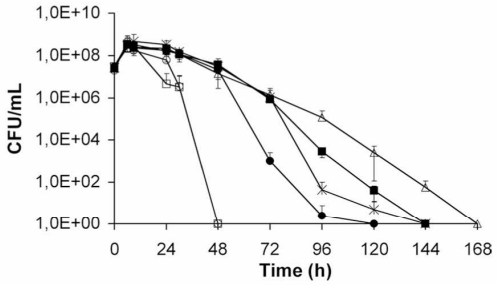


FIG. 1. Growth and survival of *L. sakei* 23K in MCD medium supplemented with various iron sources. Open squares, control; open circles, $FeCl_3$, 40 μM; open triangles, hematin, 40 μM; crosses, hemoglobin, 10 μM; full squares, myoglobin, 40 μM; full circles, h-transferrin, 5 μM. Iron source concentrations were calculated to ensure the same final Fe concentration. h-Transferrin concentrations ranging from 1 to 20 μM were tested, but no difference was observed between 5 and 20 μM, so the 5 μM concentration was selected.

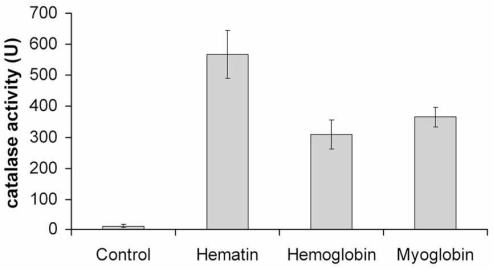


FIG. 2. Histogram representing catalase activity of *L. sakei* cells grown in MCD medium supplemented with heminic compounds (control, hematin, 40 μM; hemoglobin, 10 μM; myoglobin, 40 μM). Catalase activity is expressed as micromoles H_2O_2 consumed per minute and per mg protein.

Numerous methods have been used to study metal-microorganism interactions. An extensive review of methodological approaches was done in 1997 (1). Recently, mapping of organic polymers and the redox iron status of bacterial extracellular matrixes have been studied by scanning transmission X-ray microscopy (21, 32). Electron energy loss spectroscopy (EELS) and/or electron spectroscopic imaging (ESI) techniques have successfully been used in eukaryotic tissue investigation in order to visualize ultrastructural localization of elements such as calcium, phosphorous, oxygen, nitrogen, zinc, copper, other light elements, and also iron (3, 5, 6, 17, 23–25, 39). EELS also allowed identification of phosphorus and thus DNA in an extracellular matrix produced by a Gram-negative bacterial isolate involved in biofilm formation (2). The nitrogen distribution map created through EELS image analysis allowed the localization of cyanophin, a cyanobacterial protein known for functioning as temporary nitrogen, carbon, and energy stock (27). Information on the cellular status of metals in bacteria is difficult to obtain, since conventional preparations used for electron-microscopic observations can alter structures, relocate, and/or remove metal ions and probably other labile cytoplasmic constituents when processing at room temperature (16). Secondary-ion mass spectrometry (SIMS) has been used for a couple of years to investigate the isotopic composition of microorganisms (33) and recently to identify uncultured microorganisms in complex ecosystems by using species-specific oligonucleotide probes (29). Here, we developed an analytical correlative imaging approach based on a combination of EELS and SIMS, which revealed that growth of *L. sakei* in the presence of heminic compounds or transferrin leads to iron accumulation in cells, which is correlated with a longer survival during stationary phase.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain and growth conditions. *L. sakei* 23K (8) was propagated on MRS medium (12) at 30°C. For physiological studies the chemically defined medium MCD (28) supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose was used. MCD medium contains no iron sources but contains possible traces of iron coming from various components or distilled water. Incubation was performed at 30°C with stirring at 70 rpm. Cell growth and viability were followed by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600}) on a visible spectrophotometer (Secomah) and by the determination of the number of CFU ml^{-1} after plating serial dilutions of samples on MRS agar. Plates were incubated under aerobiosis at 30°C for 30 h. All the measurements were performed in at least three independent assays. When needed, media were supplemented with freshly prepared filtered solutions to obtain final concentrations of either 40 μM $FeCl_3$ (Merck), 40 μM $FeSO_4$ (Merck), 40 μM hematin (Sigma), 10 μM hemoglobin (Sigma), 40 μM myoglobin (Sigma), 5 μM bovine holo-transferrin (h-transferrin; Sigma), 2.5 μM ferrichrome (Sigma), 1 μM lactoferrin (Sigma), 40 μM desferrioxamin (Desferal; Sigma) iron saturated with $FeCl_3$, or 50 μM ferri tri-sodium citrate (Merck). Iron depletion was obtained by addition of *O*-phenanthroline (Sigma) or 2,2 dipyridyl (Sigma) at 200 μM or at 2 to 4 mM in liquid medium or agar medium, respectively.

Catalase activity determination (adapted from the method of Sinha [38]). Cells cultivated for 8 h in MCD medium supplemented with hematin, hemoglobin, or myoglobin were collected by centrifugation (3,300 x *g*) for 10 min at 4°C, rinsed twice in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0), and resuspended in the same buffer at an OD_{600} of up to 25. Cell suspensions (700 μl) were added to 500-mg glass beads (0.1-mm diameter; BioSpec Products) and disrupted on a FastPrep apparatus (FP120; Bio101 Savant) by shaking twice for 20 s at speed 5, with a cooling step between of 2 min on ice. After centrifugation for 10 min at 15,000 × *g*, the protein concentration was measured in the supernatant using the Bradford method according to the manufacturer's instructions (Coomassie protein assay reagent; Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Catalase activity was determined with cell extract aliquots containing 100-μg proteins incubated in the presence of 5 ml sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.0) and 4 ml H_2O_2 (0.2 M). At 1, 3, 5, 8, and 10 min, 1-ml aliquots were removed and mixed to 2 ml (potassium dichromate [50 g $liter^{-1}$]-acetic acid [1:2, vol/vol]), then boiled for 10 min before the OD_{570} was measured. Results are expressed as micromoles H_2O_2 consumed per minute and per mg of proteins. Three independent assays were performed, and results are expressed as mean ± standard deviation.

Sample preparation for EFTEM and SIMS analysis. Cells grown for 8 h and 30 min (OD_{600} of ~1.4) in MCD medium supplemented with various iron sources were harvested by gentle centrifugation at room temperature. A small amount of bacterial pellet was quickly pushed in a spacer ring fixed with a double-side rubber onto the specimen holder of a cryofixation device (Metal-Mirror cryofixation system MM80 E; Leica, Vienna, Austria) and impacted onto a liquid nitrogen-cooled gold-coated copper block. The freeze substitution process in pure dry acetone at −89°C for 3 days in a freeze substitution device (AFS, Leica, Vienna, Austria), progressive infiltration in Spurr resin, a polymerization step, and sectioning (Ultracut S microtome; Leica, Vienna, Austria) were performed as previously described (4). Thin sections (50 nm thick) collected on unfilmed grids were examined unstained on an energy-filtered transmission electron microscope (EFTEM), a CEM 902 Carl Zeiss (Oberkochen, Germany) equipped with a charge-coupled-device camera, Mega View III FW (Olympus Soft Imaging Solutions, Münster, Germany), located at the Platform MIMA2 (INRA, Jouy en Josas, France). Acquisition, recording, and treatment of data were obtained with graphical interface iTEM (Soft Imaging Company, Münster, Germany).

EELS analysis procedure. In an electron microscope, electrons which have been scattered in the specimen lose element-specific energies. These electrons can be detected as a function of the energy lost through the specimen by the means of an energy filter that permits recording element distribution images (ESI) and spectra (EELS). Element-specific signals (elemental edges) are su-

Downloaded from aem.asm.org at INRA on March 9, 2010

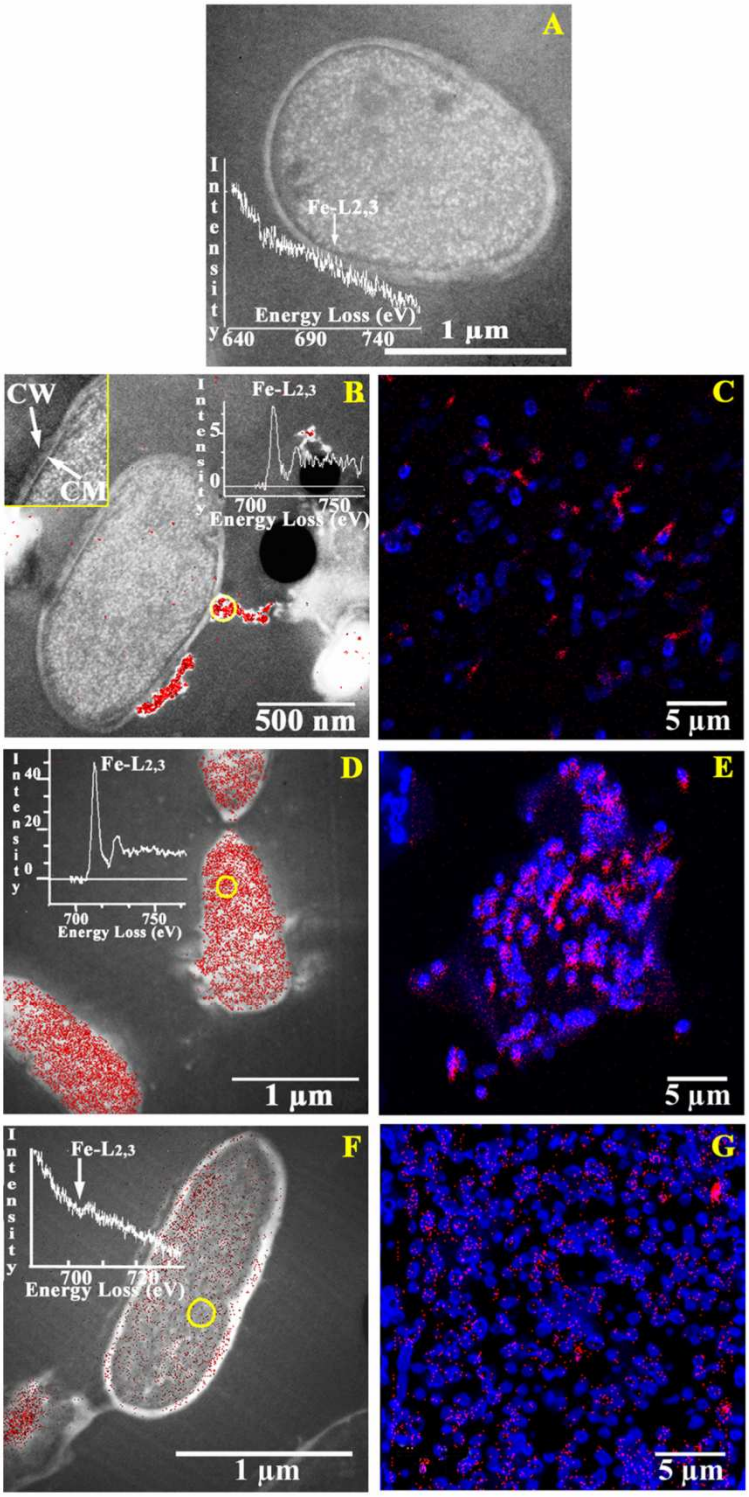


FIG. 3. Iron mapping of *L. sakei* cells cultivated in MCD medium supplemented with various iron sources: no iron (A); ferrioxamin, 40 μM (B and C); myoglobin, 40 μM (D and E); and h-transferrin, 5 μM (F and G). ESI images obtained using EFTEM (cell scale) (panels A, B, D, and

Downloaded from aem.asm.org at INRA on March 9, 2010

perimposed on a falling background. In this study we used parallel EELS (PEELS) as an alternative to the EELS technique to identify iron; in this technique an image of the spectrum is recorded by the camera and the resulting spectrum represents the distribution of image pixel intensity as a function of energy loss. iTEM software allowed us to remotely control the microscope and camera for data acquisitions and to analyze energy-filtered images and spectra. The ESI technique produces highly resolved element mapping of preparations over relatively large areas, and the PEELS technique, suitable for a fast screening of spectra, allows chemical analysis with good spatial resolution. Comparison of ESI maps and PEELS spectra recorded on the same analyzed region avoids false image distribution due to possible local changes in section thickness and allows identification of weak edges. In this study, iron was identified by the Fe-$L_{2,3}$ edge at 708 eV (35). Images (516 by 516 by 8, binning [x/y] of 2x) were recorded by the camera using iTEM software facilities. An iron map was obtained by subtracting a modeled background using the three-window power law method (14). Detailed descriptions of the method are given elsewhere (35). An additional image at an energy loss (ΔE) of 250 eV (structure-sensitive image) below the C-K edge, which allows examination of very thin unstained sections, was obtained at the same time. At this value, the contrast image is inverted, carbon contribution is eliminated, and cellular details are clearly visible. The calculated element map, arbitrarily colored, was superimposed onto the corresponding structure-sensitive image. For PEELS acquisition, the image of the EELS spectrum was recorded by the camera, with an energy range of 140 eV centered at the energy loss of the Fe-$L_{2,3}$ edge (708 eV). Background subtraction was performed using the iTEM software facilities, and the calculated background according to the power law of Egerton (14) was subtracted from experimental spectra. If EFTEM analysis allows iron detection at a nano-scale range, this analytical technique is restricted to a limited field of view (about 3 μm by 3 μm), therefore studying numerous bacteria to get information on a large cell population would be time consuming.

SIMS imaging. SIMS allows direct identification of chemical elements with high sensitivity and specificity (18) and can be applied to visualizing the elemental distribution (chemical mapping) of a large area (raster of up to 100 μm) to get an overview of a few tens of cells in addition to highly resolved EFTEM maps. Dynamic SIMS imaging was performed using a NanoSIMS-50 ion microprobe (CAMECA, France) operating in scanning mode. The primary ion beam was generated from either a cesium source (Cs^+) or an oxygen source (O^-) for, respectively, negative or positive secondary-ion analysis. The instrument is equipped with a magnetic spectrometer using a parallel detection system with the capacity to acquire simultaneously up to five species, which ensures a perfect colocalization between recorded images. In this study, images for CN^-, P^-, and S^- were acquired simultaneously using the Cs^+ primary beam to characterize the cell distribution. Concerning the detection of iron, Fe^- emission using the Cs^+ beam (electronic affinity, EA of 0.16 eV) provides extremely low sensitivity. As an alternative, several tests have been carried out by detecting FeO^- (EA of 1.5 eV). However, the sensitivity is still quite low, and only aggregated iron could be analyzed in this way. The magnetic field was set to detect the heaviest mass (in the present study, $^{56}Fe^{16}O^-$ with the Cs source) on one of the largest radius detectors. The other movable detectors were positioned to detect $^{12}C^{14}N^-$ and $^{31}P^-$. For typical experiments, the primary ion intensity was up to 6 pA. The probe was stepped over the sample in a 256-by-256-pixel raster of 100 to 30 μm to generate secondary-ion images. The typical dwell time was 20 ms per pixel. As Fe can be more favorably detected as Fe^+, imaging was also carried out using the O^- beam on samples showing a low and more homogeneous iron distribution. Sections were first examined using the O^- beam to record $^{40}Ca^+$ and $^{56}Fe^+$ maps ($^{40}Ca^+$ is used to characterize the cell distribution). The typical acquisition duration was then extended to about 50 ms per pixel for the detection of positive secondary-ion species $^{40}Ca^+$ and $^{56}Fe^+$ at a much lower intensity (3 pA). Recording was then performed using multiframe mode (accumulation of 10 frames with 5 ms per pixel for each) in order to prevent structure deformation because of the erosion of primary ions. The same regions of interest were then analyzed using the Cs^+ beam to acquire $^{12}C^{14}N^-$, $^{31}P^-$ and $^{32}S^-$ images in a separate run. As the two sets of images were recorded sequentially, care has been taken to minimize the shift between the two sets of images during image acquisition. Furthermore, image processing using ImageJ software (W. S. Rasband, 1997–2000, National Institutes of Health, Bethesda, MD [http://rsb.info. nih.gov/ij/]), with a homemade plug-in, was performed to obtain proper colocalization of the observed structures on the processed maps for all of the ion species.

RESULTS AND DISCUSSION

***L. sakei* showed enhanced survival during stationary phase when grown in the presence of heminic compounds or transferrin.** We first aimed at analyzing *L. sakei* behavior in the presence of iron. As previously claimed for several lactic acid bacteria, neither iron deprivation nor iron supplementation modified growth of *L. sakei* 23K (data not shown). Iron deprivation was obtained by adding common iron chelators: *O*-phenanthroline (200 μM to 4 mM), 2,2 dipyridyl (200 μM to 4 mM), or Desferal (200 μM). No effect of Desferal or 2,2 dipyridyl was observed on growth in either solid or liquid media. A total growth inhibition was observed when *O*-phenanthroline was added, but this inhibition was not suppressed by subsequent iron supplementation, indicating an intrinsic toxicity of *O*-phenanthroline, independent from an iron privation effect, as previously reported for lactic acid bacteria (30). None of the iron source supplementations tested (free-iron forms $FeSO_4$ or $FeCl_3$; siderophore-complexed iron ferrichrome, ferrioxamin, and ferri-citrate; and iron forms present in the meat environment, such as hematin, hemoglobin, myoglobin, h-transferrin, and lactoferrin) resulted in any significant effect on growth (data not shown). This indicates that this metal is dispensable for *L. sakei* growth. In contrast, survival was highly enhanced during stationary phase when cells were grown in the presence of heminic compounds (hematin, myoglobin, and hemoglobin), with cells being able to survive up to 144 to 168 h (Fig. 1). The most pronounced effect was observed in the presence of hematin. An intermediate phenotype was observed when h-transferrin was added to the medium. In fact, this compound led to a better survival than the one observed with the control, even though it was less than that with heminic compounds. These results confirm that iron is dispensable for *L. sakei* growth, as mentioned in the literature (34), but they clearly indicate that iron sources present in the meat environment highly benefit *L. sakei* by sustaining long-term survival.

Catalase activity is correlated with enhanced survival in the presence of heme. As *L. sakei* is known for possessing a heme-dependent catalase (20, 26), even though it is deficient in a heme biosynthesis pathway, we measured this activity in cells grown in the presence of different heme sources. As shown in Fig. 2, growth in the presence of hematin, hemoglobin, or myoglobin resulted in measurable catalase activity in *L. sakei* cells, indicating that this species is able to get heme from the

F). A filtered image at 250 eV (inverted contrast) allows the morphology to be observed. Bacterium ultrastructure is clearly visible; ribosomes nonhomogeneously distributed are recognizable (panels A and B especially). Magnified insert in panel B shows a small portion of membranes with cytoplasmic membrane (CM) and cell wall (CW) well conserved. The iron map, in red, is superimposed on the 250-eV image. White inserts show experimental PEELS spectra (panels A and F) or background-corrected Fe-$L_{2,3}$ edges (panels B and D). Yellow circles represent the area for PEELS acquisitions. Unstained sections. SIMS images (population scale) (panels C, E, and G). SIMS has the capacity to analyze a larger field (here 30 μm) and then complementing and generalizing the ESI information obtained for single cells. Images were obtained by superimposing two sets of images: the iron ($^{56}Fe^{16}O^-$ for panel C and $^{56}Fe^+$ for panels E and G) distribution in red and the $^{12}C\ ^{14}N^-$ distribution in blue, which gives information on cell distribution.

Downloaded from aem.asm.org at INRA on March 9, 2010

hemoproteins hemoglobin and myoglobin. Significantly higher catalase activity was observed with cells grown in the presence of hematin and is correlated with longer survival during stationary phase. The survival in the presence of heminic compounds cannot be attributed to respiration, as described for *L. lactis* (13), since *L. sakei* lacks respiratory cytochromes (8), but could be attributed to the dismutation of hydrogen peroxide by the catalase. The survival in the presence of h-transferrin relies on the effect of iron per se and not on heme. Such an effect of iron and the ability to get it from h-transferrin was unexpected and had not yet been observed with lactic acid bacteria. Additionally, we could not detect any catalase activity in cells grown in the presence of h-transferrin. Taking all these results into consideration, we cannot rule out that heme per se is also used as an iron source.

Heminic iron sources and transferrin are transported into *L. sakei* cells. Our strategy to evaluate the intracellular iron content of *L. sakei* cells grown in the presence of various iron sources was to develop an electron microscopy-based method. From the same cell preparation we performed both EELS to get an iron map at nanometer range for single cells and NanoSIMS in order to visualize iron within the whole-cell population. As no precise quantification could be performed in any of the techniques, the combination of both approaches revealed to be efficient in evaluating the iron content of cellular populations, and the two techniques clearly appear complementary. Conventional procedures for sample preparation for EFTEM analysis usually include, prior to resin embedding, chemical fixations and dehydrations in solutions with increasing organic solvent content that produce extractions or displacements of loosely bound elements (19). To avoid these artifacts, we used physical fixation (cryofixation) and cryosubstitution prior to the necessary embedding in a resistant resin. Cell structure conservation of such preparations was checked by TEM observations. We detected the presence of iron inside cellular structures, confirming that cell integrity had been kept, which ensured intracellular conservation of elements. EFTEM analyses at the subcellular level were confirmed by NanoSIMS analysis in corresponding areas but in larger zones. Several observations were made with the whole-cell preparation, and we present here representative images for EFTEM and SIMS analysis (Fig. 3). Clear differences were observed for the iron content of cells grown on various iron sources. Cells grown in the absence of exogenous iron sources did not show any iron signal in their cytoplasm (Fig. 3A). Cells grown in the presence of $FeCl_3$ or ferrioxamin revealed a weak iron signal (iron content near the limit of detection) in the cytoplasm, whereas extracellular clusters exhibited a strong signal, indicating that iron does not enter the cells as shown for ferrioxamin grown cells (Fig. 3B and C). We detected the presence of iron in *L. sakei* cells grown in the presence of myoglobin, hematin, and hemoglobin, characterized by a strong signal from cytoplasm (Fig. 3D and E; see also Fig. S1 in the supplemental material). Likewise, we observed an iron signal in the cytoplasm of cells grown in the presence of h-transferrin (Fig. 3F and G), though it was less strong than the one observed with heminic compounds. It seems that iron accumulation in *L. sakei* cells varies according to iron source supply, with heminic compounds, such as heme, hemoglobin, or myoglobin, being preferential iron sources for *L. sakei*. These differences in iron cellular contents are correlated with bacterial survival. Indeed, a lower iron content was observed with transferrin, a growth condition for which survival during stationary phase was less improved than with the heminic iron sources. In all cases, the use of SIMS confirmed the presence of iron at the population level, strengthening information obtained for single cells. This was characterized by the colocalization of ^{+56}Fe and ^{-}CN (cell structure) secondary-ion images. We also observed a nonhomogeneous signal within cells, which could be due to differences in the physiological statuses of cells within the population.

In conclusion, this study provides the first evidence for both heme and iron utilization by *L. sakei* for its survival. This utilization seems restricted to iron sources present in the meat environment, such as myoglobin, hemoglobin, and transferrin, confirming the tight adaptation of this species to meat. This enlightens us about the functions critical for its adaptation and that ensure the competitiveness of this meat-borne lactic acid bacterium. In addition, we have developed a novel complementary use of EELS and SIMS, which represents a promising experimental approach offering the possibility of detecting intracellular iron in bacteria. This should be of interest in particular to studies of pathogens known for having higher iron requirements and should open new fields for element investigation of bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Platform MIMA2, INRA, Jouy en Josas, France.

P. Duhutrel is recipient of a grant from the French Ministère de la Recherche.

REFERENCES

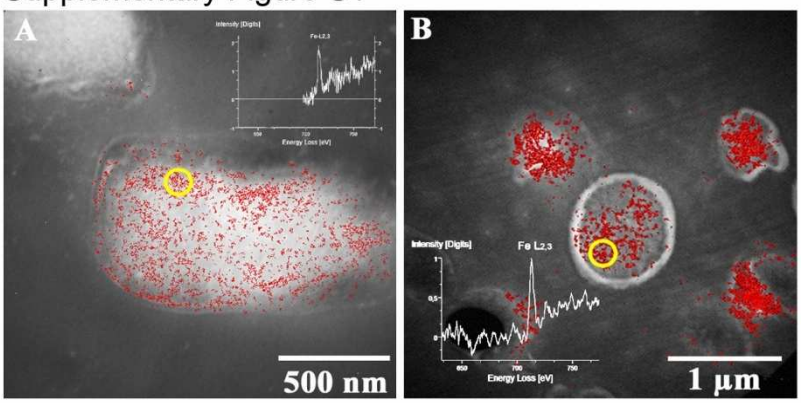
1. **Beveridge, T. J., M. N. Hughes, H. Lee, K. T. Leung, R. K. Poole, I. Savvaidis, S. Silver, and J. T. Trevors.** 1997. Metal-microbe interactions: contemporary approaches. Adv. Microb. Physiol. **38:**177–243.
2. **Bockelmann, U., H. Lunsdorf, and U. Szewzyk.** 2007. Ultrastructural and electron energy-loss spectroscopic analysis of an extracellular filamentous matrix of an environmental bacterial isolate. Environ. Microbiol. **9:**2137–2144.
3. **Bordat, C., A. Constans, O. Bouet, I. Blanc, C. L. Trubert, R. Girot, and G. Cournot.** 1993. Iron distribution in thalassemic bone by energy-loss spectroscopy and electron spectroscopic imaging. Calcif. Tissue Int. **53:**29–37.
4. **Bordat, C., and J. L. Guerquin-Kern.** 2008. Cryo-preparation procedures for elemental imaging by SIMS and EFTEM, p. 499–536. *In* A. Cavalier, D. Spehner, and B. Humbel (ed.), Handbook of cryo-preparation methods for electron microscopy, vol. 7. CRC Press, Boca Raton, FL.
5. **Bordat, C., J. L. Guerquin-Kern, M. Lieberherr, and G. Cournot.** 2004. Direct visualization of intracellular calcium in rat osteoblasts by energy-filtering transmission electron microscopy. Histochem. Cell Biol. **121:**31–38.
6. **Bordat, C., M. Sich, F. Rety, O. Bouet, G. Cournot, C. A. Cuenod, and O. Clément.** 2000. Distribution of iron oxide nanoparticles in rat lymph nodes studied using electron energy loss spectroscopy (EELS) and electron spectroscopic imaging (ESI). J. Magn. Reson. Imaging **12:**505–509.
7. **Bruyneel, B., M. Vandewoestyne, and W. Verstraete.** 1989. Lactic acid bacteria: microorganisms able to grow in the absence of available iron and copper. Biotechnol. Lett. **11:**401–406.
8. **Chaillou, S., M. C. Champomier-Vergès, M. Cornet, A. M. Crutz-Le Coq, A. M. Dudez, V. Martin, S. Beaufils, E. Darbon-Rongère, R. Bossy, V. Loux, and M. Zagorec.** 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. Nat. Biotechnol. **23:**1527–1533.
9. **Chaillou, S., M. Daty, F. Baraige, A. M. Dudez, P. Anglade, R. Jones, C. A. Alpert, M. C. Champomier-Vergès, and M. Zagorec.** 2009. Intraspecies genomic diversity and natural population structure of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei*. Appl. Environ. Microbiol. **75:**970–980.
10. **Champomier-Vergès, M. C., A. Stintzi, and J. M. Meyer.** 1996. Acquisition of iron by the non-siderophore-producing *Pseudomonas fragi*. Microbiology **142:**1191–1199.
11. **Crosa, J. H., and C. T. Walsh.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66:**223–249.

Downloaded from aem.asm.org at INRA on March 9, 2010

12. **De Man, J. C., M. Rogosa, and M. E. Sharpe.** 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. **23:**130–135.
13. **Duwat, P., S. Sourice, B. Cesselin, G. Lamberet, K. Vido, P. Gaudu, Y. Le Loir, F. Violet, P. Loubière, and A. Gruss.** 2001. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. J. Bacteriol. **183:**4509–4516.
14. **Egerton, R. F.** 1989. Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope. Plenum Press, New York, NY.
15. **Elli, M., R. Zink, A. Rytz, R. Reniero, and L. Morelli.** 2000. Iron requirement of *Lactobacillus* spp. in completely chemically defined growth media. J. Appl. Microbiol. **88:**695–703.
16. **Eltsov, M., and B. Zuber.** 2006. Transmission electron microscopy of the bacterial nucleoid. J. Struct. Biol. **156:**246–254.
17. **Grohovaz, F., M. Bossi, R. Pezzati, J. Meldolesi, and F. T. Tarelli.** 1996. High resolution ultrastructural mapping of total calcium: electron spectroscopic imaging electron energy loss spectroscopy analysis of a physically/chemically processed nerve-muscle preparation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **93:**4799–4803.
18. **Guerquin-Kern, J.-L., T.-D. Wu, C. Quintana, and A. Croisy.** 2005. Progress in analytical imaging of the cell by dynamic secondary ion mass spectrometry (SIMS microscopy). Biochim. Biophys. Acta **1724:**228–238.
19. **Hayat, M.** 2000. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications, 4th ed, p. 377–406. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
20. **Hertel, C., G. Schmidt, M. Fischer, K. Oellers, and W. P. Hammes.** 1998. Oxygen-dependent regulation of the expression of the catalase gene *katA* of *Lactobacillus sakei* LTH677. Appl. Environ. Microbiol. **64:**1359–1365.
21. **Hunter, R. C., A. P. Hitchcock, J. J. Dynes, M. Obst, and T. J. Beveridge.** 2008. Mapping the speciation of iron in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using scanning transmission X-ray microscopy. Environ. Sci. Technol. **42:**8766–8772.
22. **Imbert, M., and R. Blondeau.** 1998. On the iron requirement of lactobacilli grown in chemically defined medium. Curr. Microbiol. **37:**64–66.
23. **Jeanguillaume, C.** 1987. Electron-energy loss spectroscopy and biology. Scanning Microsc. **1:**437–450.
24. **Jeanguillaume, C., M. Tence, P. Trebbia, and C. Colliex.** 1983. Electron-energy loss chemical mapping of low Z elements in biological sections. Scan. Electron Microsc. 745–756.
25. **Jonas, L., G. Fulda, T. Salameh, W. Schmidt, G. E. Kroning, U. T. Hopt, and H. Nizze.** 2001. Electron microscopic detection of copper in the liver of two patients with morbus Wilson by EELS and EDX. Ultrastruct. Pathol. **25:**111–118.
26. **Knauf, H. J., R. F. Vogel, and W. P. Hammes.** 1992. Cloning, sequence, and phenotypic expression of *katA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sakei* LTH677. Appl. Environ. Microbiol. **58:**832–839.
27. **Koop, A., I. Voss, A. Thesing, H. Kohl, R. Reichelt, and A. Steinbuchel.** 2007. Identification and localization of cyanophycin in bacteria cells via imaging of the nitrogen distribution using energy-filtering transmission electron microscopy. Biomacromolecules **8:**2675–2683.
28. **Lauret, R., F. Morel-Deville, F. Berthier, M. C. Champomier-Vergès, P. Postma, S. D. Ehrlich, and M. Zagorec.** 1996. Carbohydrate utilization in *Lactobacillus sakei*. Appl. Environ. Microbiol. **62:**1922–1927.
29. **Li, T., T. D. Wu, L. Mazeas, L. Toffin, J. L. Guerquin-Kern, G. Leblon, and T. Bouchez.** 2008. Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. Environ. Microbiol. **10:**580–588.
30. **MacLeod, R. A.** 1952. The toxicity of *o*-phenanthroline for lactic acid bacteria. J. Biol. Chem. **197:**751–761.
31. **Makarova, K., A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D. M. Goodstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J. H. Lee, I. Diaz-Muniz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, and D. Mills.** 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **103:**15611–15616.
32. **Miot, J., K. Benzerara, M. Obst, A. Kappler, F. Hegler, S. Schadler, C. Bouchez, F. Guyot, and G. Morin.** 2009. Extracellular iron biomineralization by photoautotrophic iron-oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **75:**5586–5591.
33. **Orphan, V. J., C. H. House, K. U. Hinrichs, K. D. McKeegan, and E. F. DeLong.** 2001. Methane-consuming archaea revealed by directly coupled isotopic and phylogenetic analysis. Science **293:**484–487.
34. **Pandey, A., F. Bringel, and J. M. Meyer.** 1994. Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. **40:**735–739.
35. **Reimer, L., U. Zepke, J. Moesch, S. T. Schulze-Hillert, M. Ross-Messemer, W. Probst, and E. Weimer.** 1992. EELS spectroscopy: a reference handbook of standard data for identification and interpretation of electron energy loss spectra and for generation of electron spectroscopic images. Carl Zeiss, Electron Optics Division, Oberkochen, Germany.
36. **Sebulsky, M. T., D. Hohnstein, M. D. Hunter, and D. E. Heinrichs.** 2000. Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. **182:**4394–4400.
37. **Siezen, R. J., M. J. C. Starrenburg, J. Boekhorst, B. Renckens, D. Molenaar, and J. Vlieg.** 2008. Genome-scale genotype-phenotype matching of two *Lactococcus lactis* isolates from plants identifies mechanisms of adaptation to the plant niche. Appl. Environ. Microbiol. **74:**424–436.
38. **Sinha, A. K.** 1972. Colorimetric assay of catalase. Anal. Biochem. **47:**389–394.
39. **Vannier-Santos, M. A., A. Martiny, U. Lins, J. A. Urbina, V. M. Borges, and W. de Souza.** 1999. Impairment of sterol biosynthesis leads to phosphorus and calcium accumulation in *Leishmania acidocalcisomes*. Microbiology **145:**3213–3220.
40. **Wandersman, C., and P. Delepelaire.** 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. Annu. Rev. Microbiol. **58:**611–647.
41. **Weinberg, E. D.** 1997. The *Lactobacillus* anomaly: total iron abstinence. Perspect. Biol. Med. **40:**578–583.

Downloaded from aem.asm.org at INRA on March 9, 2010

Supplementary Figure S1



4.2 Chapitre 2 : Régulation du fer intracellulaire chez *L. sakei* 23K

4.2.1 Contexte et objectifs

Nous avons montré que *L. sakei* est capable d'utiliser le fer héminique et le fer de la transferrine (Duhutrel *et al.*, 2010). Le fer est un élément vital mais toxique qu'il est important de réguler. Cette régulation est chez de nombreuses bactéries l'apanage des régulateurs de transcription fer-dépendants de la famille Fur. La présence dans le génome de la souche 23K de 3 gènes codant pour des régulateurs de transcription de la famille Fur est un cas unique au sein du genre *Lactobacillus*. L'objectif de cette étude était donc de définir l'implication des régulateurs Fur-like dans le métabolisme du fer chez cette bactérie afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la survie à long terme en présence d'hème et de transferrine chez une bactérie lactique incapable de respirer.

4.2.2 Stratégie

Nous avons procédé en trois étapes : *i*) affiliation des différents paralogues de Fur (LSA0109, LSA0466 et LSA1029) à différentes sous familles Fur, *ii*) recherche de boîtes de fixation de ces régulateurs et prédiction de régulons, en utilisant le modèle *B. subtilis* (Fuangthong & Helmann, 2003) et *iii*) construction de mutants dans chacun des paralogues afin de valider nos prédictions *in silico* et de déterminer le rôle physiologique de ces régulateurs en lien avec la fonction des gènes cibles identifiés.

4.2.3 Résultats principaux

Les trois régulateurs de *L. sakei* appartiennent à trois sous familles comme nous le montrons en figure 16.

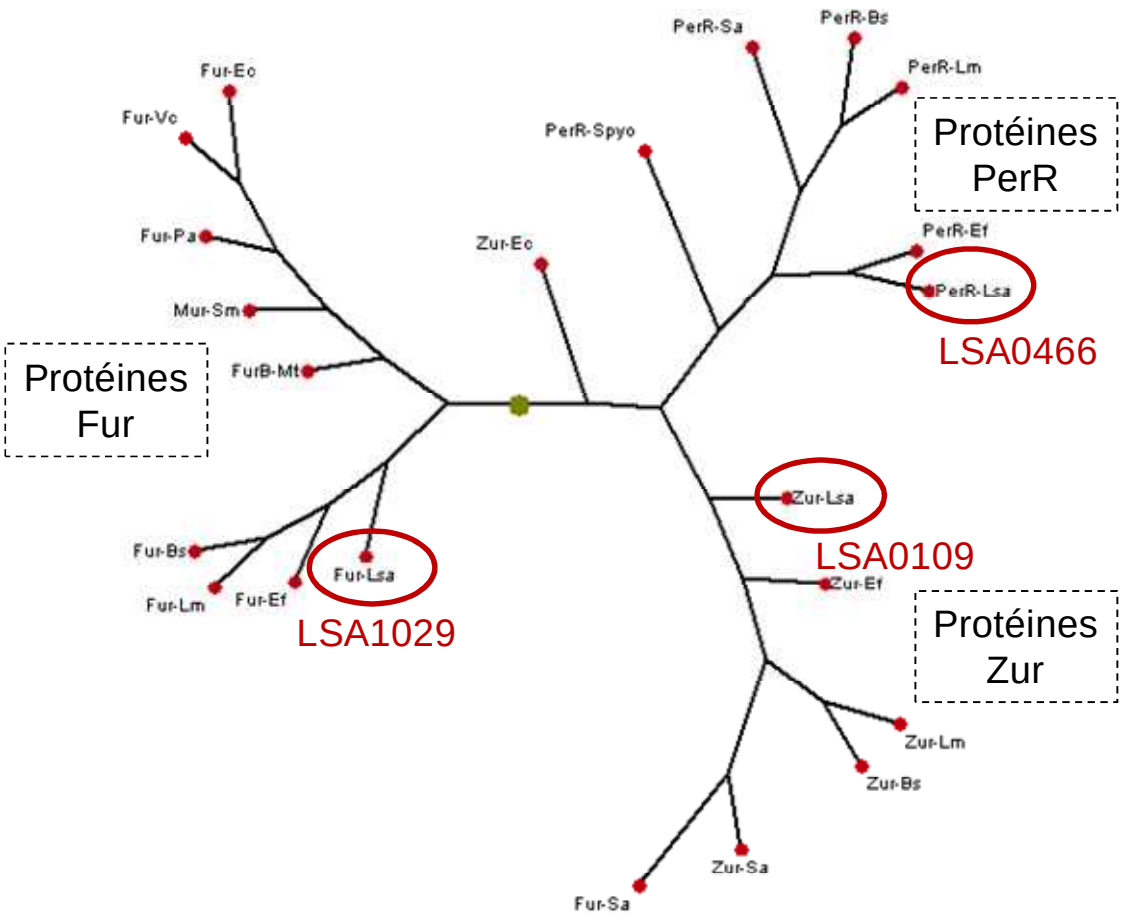
La protéine LSA0109 présente de fortes homologies avec les protéines Fur-like qui répondent à d'autres métaux que le fer tels que le zinc ou le manganèse (Zur de *B. subtilis* et *L. monocytogenes*). Chez *L. sakei*, la protéine LSA0109 régule un opéron unique codant pour un système de transporteur ABC (*mtsABC*) dédié au manganèse. Cette protéine LSA0109 semble impliquée dans la régulation de l'homéostasie du manganèse cellulaire.

La protéine LSA0466 correspond à une protéine PerR. Les protéines PerR répondent à un signal différent, le péroxyde d'hydrogène, mais la réponse est catalysée par réaction avec

le fer (Metal Catalyzed Oxidation). La protéine LSA0466 contrôle un régulon de 4 gènes : une NADH péroxydase, une protéine membranaire, une P-type ATPase Cd/Zn/Co et une Dye-type péroxydase, dont les fonctions sont cohérentes avec la réponse à un stress oxydant.

La protéine LSA1029 correspond à la véritable protéine Fur qui répond au fer et le régule. La protéine LSA1029 contrôle également un petit régulon de 3 gènes (*fhuD, fhuC* et *xerC1*). Il est impliqué dans des phénomènes de contrôle de la division cellulaire et de séquestration du fer intracellulaire.

Figure 16 : Arbre phylogénétique de protéines Fur-like. Alignement multiple des séquences peptidiques sélectionnées parmi les protéines démontrées expérimentalement avec ClustalW. Réalisation du dendrogramme avec le logiciel PhyloDraw (Choi *et al.*, 2000). Ec ; *E. coli*, Spyo ; *S. pyogenes*, Sa ; *S. aureus*, Bs ; *B. subtilis*, Lm ; *L. monocytogenes*, Ef ; *E. faecalis*, Lsa ; *L. sakei*, Mt ; *M. tuberculosis*, Sm ; *S. meliloti*, Pa ; *P. aeruginosa*, Vc ; *V. cholerae*.



4.2.4 **Publication 2 : Characterization of three Fur paralogs in the Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei* 23K**

Characterization of the three Fur paralogs

in the Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei* 23K

Philippe Duhutrel[(1,2)], Fabienne Baraige[(1,2)], Stéphane Chaillou[(1,2)], Monique Zagorec[(1,2)], and Marie-Christine Champomier Vergès[(1,2)*].

(1) INRA,UMR 1319 MICALIS, Equipe Flore Lactique et Ecosystème Carné, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy en Josas, France.

(2) AgroParisTech, UMR MICALIS, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy en Josas, France

*Corresponding author marie-christine.champomier-verges@jouy.inra.fr

Abstract

Lactobacillus sakei belongs to the natural meat ecosystem where it becomes the dominant flora when meat is stored under vacuum. We previously showed that it is able to use iron sources of the meat environment to improve its survival. The genome sequence of *L. sakei* strain 23K has revealed the presence of three Fur-like regulatory proteins, metalloproteins known to control iron homeostasis in bacteria. In this study, we determined the genetic and physiological effects of these proteins in *L. sakei*. We first defined their regulon by *in silico* analysis. We then performed functional analysis of mutant in each of the genes. We show that each regulator belongs to different structural and functional Fur families, *ie* Fur, Mur and PerR and that each controls distinct and small regulons. The Fur homolog (LSA1029) appears to be implicated in cell shape, iron storage and division. The Mur homolog (LSA0109) is implicated in the manganese homeostasis and the PerR homolog (LSA0466) represses the transcription of genes potentially implicated in the peroxide stress response.

Introduction

Iron is an essential element for almost all living organisms. It has a main role in bacterial metabolism as a co-factor for numerous proteins and is involved in various cellular processes (Escolar *et al.*, 1999, Andrews *et al.*, 2003, Lee & Helmann, 2007, Carpenter *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2009, Maret, 2010). Iron can also be very toxic and leads to oxidative damages (Touati, 2000). Iron homeostasis is thus a critical challenge for many bacteria. This homeostasis is mainly under the control of transcriptional regulators of the Fur (Ferric Uptake Regulator) family (Carpenter *et al.*, 2009). This is a widespread family of metallo-regulatory proteins with nowadays more than ~3400 homologs (PF01475: 3416 matches and IPR002481: 5131 matches) according to the PFAM and InterPro databases (Lee & Helmann, 2007). Fur was initially described for its involvement in sensing and transport of iron in *Escherichia coli* (de Lorenzo *et al.*, 1987). It has been shown later that other Fur family members could sense metals such as zinc, manganese or nickel, leading respectively to the description of functional sub-families termed as Zur, Mur and Nur [for a review see (Lee & Helmann, 2007)]. Besides these metal sensors, others Fur like members are represented by PerR (peroxide regulon repressor) which senses hydrogen peroxide.

Fur is described as a positive repressor, which in the presence of iron as a co-repressor, binds to a DNA sequence, named Fur box, located in the promoter regions of target genes. The Fur-box can be viewed as a 19 bp palindrome formed by two 9 bp inverted repeats, separated by one base, GATAATGATAATCATTATC, first described in *E. coli* (de Lorenzo *et al.*, 1987, Hantke, 2001). Nonetheless, in some cases multiple boxes, with possible overlapping, can be detected in iron-regulated promoters, which is not compatible with the palindrome model. Taking this into account, the Fur-box can be viewed as a head-to-head-to-tail repeat of the hexamer NATWAT (Escolar *et al.*, 1999). In *Bacillus subtilis*, a reinterpretation of the

consensus Fur box has resulted in the proposition of two overlapping heptamers inverted repeats [(7-1-7)2] tGATAATGATAATCATTATCa which defines a 21-bp sequence (Baichoo & Helmann, 2002).

Bacterial species can harbor one or two member(s) of the Fur family, rarely three, as it is described in *B. subtilis* (Bsat *et al.*, 1998, Fuangthong & Helmann, 2003), *Staphylococcus aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001) or *Listeria monocytogenes* (Dalet *et al.*, 1999, Rea *et al.*, 2004, Rea *et al.*, 2005). Specific DNA binding-boxes have been described for each of the Fur homologs but are slightly different. When several paralogs are present in a given species it appears thus difficult to predict regulons controled by each of them. In *B. subtilis* small changes in the DNA-binding sequences of the three Fur paralogs allow the control of non overlapping regulons *in vivo* in response to different metals or signals (Fuangthong & Helmann, 2003). In *B. subtilis*, the minimal PerR box only differs from the Fur box by one base substitution per half site TT**T**ATAATNATTATA**A**A (Fuangthong & Helmann, 2003). The Zur homolog recognizes an imperfect inverted repeat with three bases (three A or three T) extension on each side aaaTCGTAATNATTACGAttt (Fuangthong & Helmann, 2003). Fur-boxes are usually encountered in the promoter region of regulated genes at position -150 to +50 from ATG. A functional Fur-box has also been found for *yfkM* gene at position -323 in *B. subtilis* (Baichoo *et al.*, 2002, Fuangthong & Helmann, 2003). In the symbiotic *Rhizobium leguminosarum*, Mur binds specifically to a unique, non consensus Fur-box, named Mur responsive sequence (Diaz-Mireles *et al.*, 2005). As Fur paralogs and their respective DNA recognition boxes are very close, regulon overlap may occur. In *B. subtilis*, it was shown *in vitro* that synthetic PerR and Fur boxes could be recognized by the two regulators (Fuangthong & Helmann, 2003). However, dual regulation does not occur naturally *in vivo* in *B. subtilis* (Fuangthong & Helmann, 2003). Under iron abundant conditions Fur acts as a direct repressor. An indirect activation mechanism has also been described in *E. coli* (Massé & Gottesman, 2002, Dubrac & Touati, 2002). It is due to the repression by Fur of an

intermediary factor, the antisense RNA named RyhB (Massé & Gottesman, 2002, Dubrac & Touati, 2002). In *E. coli*, Fur has been described for its role in the transcriptional control of genes encoding iron acquisition such as *fecABCDE, fhuACDB* or *fepA* and iron storage such *ftnA* or *bfr* (Hantke, 1981, de Lorenzo *et al.*, 1987, Abdul-Tehrani *et al.*, 1999, Massé & Gottesman, 2002). Later, it was also shown to be implicated in the regulation of genes coding for some pathogenicity factors, acid shock response, chemotaxis, and oxidative stress defense (Touati, 2000, Hantke, 2001, Lee & Helmann, 2007). Fur_{Ec} is known to repress more than 30 genes (McHugh *et al.*, 2003). In *B. subtilis* Fur regulates 39 genes (Baichoo *et al.*, 2002), at least 32 in *S. aureus* (Torres *et al.*, 2010) and 14 genes in *L. monocytogenes* (Ledala *et al.*, 2010). In the pathogenic species *S. aureus* or *L. monocytogenes*, Fur is involved in the control of virulence factors such as *hla* or *svpA-srtB* respectively (Newton *et al.*, 2005, Ledala *et al.*, 2010, Torres *et al.*, 2010). Other members of the Fur family generally regulate smaller regulons than the Fur does. PerR regulator is known to regulate genes involved in peroxide stress response. In *L. monocytogenes*, PerR regulates directly at least 5 genes (Padilla *et al.*, 2005) and 12 in *B. subtilis*, most of them being involved in oxidative stress response (Herbig & Helmann, 2001, Fuangthong & Helmann, 2003). In *B. subtilis*, Zur only regulates 4 genes or operons implicated in zinc uptake such as *yciABC* (Gaballa *et al.*, 2002, Fuangthong & Helmann, 2003).

The lactic acid bacterium, *L. sakei* is considered as the main emblematic flora of meat products. We previously showed that *L. sakei* is able to use most of the iron sources of the meat environment such as heme, myoglobin, hemoglobin and transferrin, which provide enhanced survival (Duhutrel *et al.*, 2010). Unlike other LAB species, *L. sakei* is devoided of cytochromes and unable to perform respiration (Brooijmans *et al.*, 2009). This species also harbors three iron dependent regulator members of the Fur family (Chaillou *et al.*, 2005). This situation appears unique among the genus *Lactobacillus*.

Here, we show that the three *L. sakei* Fur paralogs (LSA0109, LSA0466 and

LSA1029) belong to three structural and functional Fur sub-families. We define non overlapping regulons for each of them. We show in *L. sakei* that *i*) LSA0109 is implicated in manganese homeostasis and could be a Mur paralog, *ii*) LSA0466 is a PerR paralog which regulates genes with potential effects on peroxide stress response and *iii*) LSA1029 appears to be the consensus Fur paralog and could be implicated in the cell division, iron storage or cell shape.

Material and Methods

Bacterial strains and growth conditions (Table 1): *E. coli* strains were grown at 37°C under aerobiosis in Luria Bertani broth (LB). *L. sakei* 23K (Chaillou *et al.*, 2005) was propagated on MRS medium at 30°C (De Man *et al.*, 1960). For physiological studies the chemically defined medium CDM (Lauret *et al.*, 1996) supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose was used. CDM medium contains no iron sources but possible traces of iron coming from various components or distilled water. Incubation was performed at 30°C with stirring at 70 rpm. *L. sakei* cells growth and viability were followed by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600}) on a visible spectrophotometer (Secoman) and by the determination of the number of $cfu.ml^{-1}$ after plating serial dilutions of samples on MRS agar. Plates were incubated under aerobiosis at 30°C for 30 h. All the measurements were performed in at least three independent assays. When needed, media were supplemented with freshly prepared filtered solutions to obtain final concentrations of either 40 µM hematin (Sigma-Aldrich), 5 µM human or bovine holo-transferrin (h-transferrin, Sigma-Aldrich). Ampicillin (100 $\mu g\ ml^{-1}$) was used for the selection of *E. coli* strains. Erythromycin (5 $\mu g\ .\ ml^{-1}$) was used for the selection of *L. sakei* strains. Serial dilutions were done in Dilution Medium (Bacto Beef extract (5 $g.l^{-1}$, BD) and Universal Peptone M66 (15 $g.l^{-1}$, Merck).

Construction of *lsa*0109 (*zur*), *lsa*1029 (*fur*) and *lsa*0466 (*per*R) mutants: *lsa1029* and *lsa0109* mutants were obtained by double cross-over recombination, using the non replicating vector pRV300 (Leloup *et al.*, 1997) and oligonucleotides listed in table 2. To obtain a 414 bp deletion in *lsa1029*, two fragments flanking the target region were amplified by PCR. Upstream fragment was obtained using primers couple PHDU-fur1 and PHDU-fur2 (726 bp) whereas downstream fragment was obtained using PHDU-fur3 and PHDU-fur4 (652 bp). Fragments' joining was realized by PCR reaction using primers PHDU-fur1 and PHDU-fur4 leading to a 1359 bp amplicon encompassing a sequence complementarity of about 19 bp between upstream and downstream fragments. This *lsa1029* exchange cassette was then cloned into the plasmid pRV300 (Leloup *et al.*, 1997) at KpnI and EcoRI sites leading to plasmid pRV443. This plasmid was introduced into the *L. sakei* 23K strain by electroporation as described previously (Berthier *et al.*, 1996). Primary integrant transformed bacteria were immediately selected by plating on MRS Agar medium with 5 µM erythromycin and incubated for 48 h at 30 °C. Integrative erythromycin resistants bacteria were PCR screened using plasmid specific primers RP and PU in order to select single plasmid insertion. Bacteria were then used for processing the second cross-over. After one hundred generations, erythromycin sensitive candidates were screened using primers PHDU-fur1 and PHDU-fur4 to detect *lsa1029* deletion. The *lsa1029* deletion led to a 1359 bp PCR fragment compared to 1773 bp. In phase deletion were then confirmed by sequencing this last amplicon (Eurofins-MWG). Strain deleted for *lsa1029* gene was named RV4059.

lsa0109 was inactivated by a 189 bp deletion using double cross-over strategy as described above. The upstream and downstream fragments were obtained using primers couples PHDU-zur1 and PHDU-zur2 (629 bp) and PHDU-zur3 and PHDU-zur4 (619 bp) respectively. Their PCR joining using primers PHDU-zur1 and PHDU-zur4 led to a 1227 bp fragment which was cloned into plasmid pRV300 at KpnI and PstI sites to form plasmid pRV442. Second cross-

over erythromycin sensitive candidates were screened using primers PHDU-zur1 and PHDU-zur4 to detect *lsa0109* deletion which led to a 1227 bp fragment compare to 1396 bp for WT allele. Deletion was then confirmed by sequencing the concerned region and the *lsa0109* mutant strain was named RV4055.

lsa0399-0403 genes were inactivated by a 4666 bp deletion using double cross-over strategy as described above. The upstream and downstream fragments were obtained using primers couples PHDU-fhu1 and PHDU-fhu2 (835 bp) and PHDU-fhu5 and PHDU-fhu6 (720 bp) respectively. Their PCR joining using primers PHDU-fhu1 and PHDU-fhu6 led to a 1534 bp fragment which was cloned into plasmid pRV300 at KpnI and PstI sites to form plasmid pRV436. Second cross-over erythromycin sensitive candidates were screened using primers PHDU-fhu1 and PHDU-fhu6 to detect *lsa0399-0403* deletion which led to a 1534 bp fragment compare to 6200 bp for WT allele. Deletion was then confirmed by sequencing the concerned region and the *lsa0399-0403* mutant strain was named RV4054.

lsa0466 was disrupted by single cross-over plasmid integration. In order to construct the integrative plasmid pRV444, a 325 bp internal fragment of *lsa0466* was amplified using primers PHDU-per8 and PHDU-per5. This fragment was treated with DNA polymerase I Klenow fragment (Fermentas France, Saint-Rémy-lès-Chevreuse) to create blunt-ends. This fragment was then cloned at blunt-end EcoRV site into pRV300. Orientation and sequence were controlled by PCR reaction with plasmid primers RP and PU (552 bp) the resulting amplicon was controlled by sequencing (data not shown). Plasmid pRV444 was then transformed into *L. sakei* 23K. Transformants were immediately selected by plating on MRS agar medium with 5 µM erythromycin and incubated 48h at 30°C. Correct insertions were screened using plasmid and DNA specifics primers: PHDU-per1 and RP (943 bp), PHDU-per4 and PU (708 bp), PHDU-per1 and PHDU-per4 (4981 bp typically no amplification in our PCR settings) or 702F and 310R (426 bp). This plasmid insertion led to the suppression of the dimerization domain of this PerR-like protein.

DNA motif analysis and bioinformatics tools: Sequence alignments were generated from selected and representative proteins of each sub-family and by using ClustalW2 program (Larkin *et al.*, 2007). Sequence alignments were drawn with online ESPript program (Gouet *et al.*, 1999) using the web interface at http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php. Secondary structure data were collected from the Protein Data Bank at http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do.

Putative binding-sites were searched using the PATTERN DISCOVERY program of Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT) (Thomas-Chollier *et al.*, 2008, van Helden, 2003) at http://gin.univ-mrs.fr/~jvanheld/rsa-tools/. The consensus algorithm was carried out on the promoter regions (-300 to +50 around the start codon of coding sequences) to search for inverted repeats of about 15 to 21 nucleotides-long and preferentially located around –35 box of putative promoters. These parameters being typical of previously experimentally identified Fur, PerR or Zur regulators binding sites. Only binding sites that scored above a cut-off value of 10 designed for strong binding sites were considered. These binding sites were then further analyzed for their position in the corresponding promoter regions and the putative function of the downstream genes. Next, using weight matrices obtained by the binding sites alignments and GENOME-SCALE PATSER algorithm of PATTERN MATCHING program of RSAT, the intergenic regions of *L. sakei* 23K genome and other LAB were then analyzed for additional binding sites.

Based on a test analysis for Fur, Zur and PerR regulon on the *B. subtilis* genome, putative strong Fur boxes were considered positive above a cut-off value of 13. Genome-scale search were confirmed using the GENOME-SCALE DNA PATTERN STRING program of RSAT allowing up to 2 mismatches in the putative consensus sequence.

RNA purification and quantification: All solutions used for this procedure were stored at

4°C, and centrifugation steps were performed at 4°C to limit RNAse activity. 3 ml culture of cells grown in CDM medium supplemented with 40 µM heme, 8h at 30°C were centrifugated 1 min at 10000 g. Cell pellets were suspended in 400 µL Tris-HCl buffer 10 mM (pH7) with EDTA 0.5 M (pH8) and transferred into 1.5 ml microtubes containing 0.6 g of glass beads (0.1 mm diameter, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO) and Phenol acid (pH 4.5) (Sigma Aldrich). Cells were then disrupted two times using a Fast Prep FP120 system (Bio101; Savant) at speed 6.5 for 45 s, with chilling on ice for 2 min between pulses. After centrifugation (4°C, 15 000 g, 10 min), the aqueous phase was recovered, 1.3 ml Trizol reagent added (Invitrogen, Carlsbad, CA), carefully homogenized and incubated at room temperature for 5 min. Chloroform (350 µl) was then added and the reaction was mixed vigorously and incubated at room temperature for 3 min. After centrifugation (4°C, 15000 g, 15 min), aqueous phase was recovered and RNA were precipitated with 4/5 volume isopropanol. After centrifugation (4°C, 15000 g, 10 min), total RNA was rinsed with ethanol 70% and resuspended in ultrapure water. Extracts were adjusted to about 0.2 $\mu g.\mu l^{-1}$ to perform rigorous DNAse treatments using a Turbo DNA-free kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration, purity (represented by the A260 nm/ A230 nm and A260 nm/A280 nm ratios) and integrity (RNA integrity number [RIN]) were assessed using a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology, Palo Alto, CA) at ICE Platform, INRA, Jouy en Josas.

Reverse transcription and real-time qPCR: Oligonucleotides for real-time qPCR (Suppl Table 1) were designed using Primer3 Web software, version 0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000). Secondary structures were controlled with Oligo Calc (Kibbe, 2007), and a BLAST analysis on *L. sakei* 23K genome was performed to check primer specificity.

Annealing of 1 µg of total RNA extracted from *L. sakei* pure culture with random hexamers (Takara Bio Europe, Saint Germain en Laye, France) was performed (10 min, 30°C) after denaturation of RNA secondary structures (5 min, 65°C). cDNA was synthesized by reverse transcription (60min, 42°C) using 200 U PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio Europe, Saint Germain en Laye, France), RNAse Inhibitor and Ultra Pure dNTP (Ozyme France, Saint Quentin en Yvelines), followed by enzyme inactivation (15 min, 70°C). The cDNA levels were then analyzed by quantitative PCR using an Eppendorf RealPlex2 (Eppendorf, LePecq, France).

Each sample was tested in triplicate in 96-well plate (Eppendorf, France). The reaction mixture (final volume 20 µl) consisted of 10 µl of MESA Green (MesaGreen qPCR MasterMix, Eurogentec), 0.4 µl of each primer (200 nM final), 4.2 µl of ultrapure H_2O, and 5 µl of a 1/100 dilution of cDNA (from *L. sakei* pure culture). The absence of genomic DNA in RNA samples was checked by classic 30 cycles PCR before cDNA synthesis (minus RT control).

A blank (no-template control or NTC) was incorporated in each assay. The thermocycling program consisted of one hold at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Melting curve data were then collected to check PCR specificity, contamination, and the absence of primer dimers. The PCR efficiency (E) of each primer pair was determined by the dilution series method using cDNA as a template. To minimize interrun variations, a calibrator sample was used to determine and fix the fluorescence threshold. The threshold cycle (Ct) values calculated by the RealPlex software were exported to Excel for the relative quantification analysis.

The Ct values of each sample were transformed as described in the freely distributed geNorm user manual into relative quantities (Q) with a reference (ref) sample and using the gene-specific PCR efficiency, calculated as follows: $Q = E^{(refCt - sampleCt)}$. Normalization was applied by dividing the relative quantities (Q) of genes of interest by the geometric mean of the

relative quantities of selected reference genes. The normalization factor (NF) was calculated from genes *lsa0604*, *lsa1606* and *lsa1775* as they were the only stable genes among the 6 we tested. Standard deviation of the normalized expression was calculated as described in the geNorm user manual. The stability of mRNA expression of the potential reference genes was evaluated by using the geNorm VBA applet for Microsoft Excel (Vandesompele *et al.*, 2002). Gene expression stability measure (M) is calculated by the program for potential reference genes as the average pairwise variation for that gene with all other tested genes. Ideal reference genes are expected to have comparable expression ratio in all samples and experimental conditions. Candidate reference genes are ranked on the assumption that those with the lowest M value have the most stable expression. GeNorm's authors recommend the use of at least three stable internal control genes for calculation of the normalization factor (NF) and stepwise inclusion of more control genes until the $(n+1)^{th}$ gene has no significant contribution to the newly calculated normalization factor. Here, we tested potential reference genes but only three appear to be well adapted to our study condition.

Scanning electron microscopy: Samples for scanning electron microscopy were prepared as previously described (Guyard-Nicodeme *et al.*, 2008, Chiaramonte *et al.*, 2009) with slight modifications. Briefly, samples from CDM cultures were pelleted and resuspended in a 2% glyceraldehyde fixative solution and were deposited in 24 wells sterile cultures plates containing aluminium foil discs (Melitta, Chezy sur Marne, France) then stored 1 hour at room temperature and for 48 hours at 4°C. The fixative was removed and discs were rinsed three times in a sodium cacodylate solution (0.2 M, pH 7.4). The samples on discs underwent progressive dehydration by soaking in a graded series of ethanol (50 to 100%) before critical-point drying (CO_2). Samples were mounted on aluminum stubs with silver paint and sputter coated with gold-palladium (Polaron SC7640; Elexience, Verrières-le-buisson, France) for 140 s at 10 mA and 80 mTorr. Samples were visualized by field-emission gun scanning

electron microscope (FESEM), and analyzed as secondary electron images (2 kV) by a Hitachi S4500 equipment (Elexience). Scanning Electron Microscopy was performed on platform Mima 2, Massy, France.

β Galactosidase activity determination: Cells grown for 8 h in CDM medium, under various manganese concentrations (0, 5, 25, 50, 75 and 100 µM), were collected by centrifugation (3,500 g) for 10 min at 4°C, rinsed twice in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8), and resuspended in the same buffer at an OD_{600} up to 25. Cell suspensions (700 µl) were added to 500 mg zirconium beads (0.1 mm diameter; BioSpec Products) and disrupted on a FastPrep apparatus (FP120; Bio101 Savant) by shaking twice for 20 s at speed 6,5 with a cooling step between of 5 min on ice. After centrifugation for 10 min at 15,000 g, the protein concentration was measured in the supernatant using the Bradford method according to the manufacturer's instructions (Coomassie protein assay reagent; Pierce Biotechnology, Rockford, IL). β galactosidase activities were assayed as previously described (Nagy *et al.*, 2001, Hsu *et al.*, 2005) with a slight modification. Activity (50 µl sample) was tested on o-nitrophenyl β-D-galactopyranoside (200 µl at 5 mM, Sigma-Aldrich) in a final volume of 400 µl. After 15 minutes reaction at 37°C, 550 µl 0.1 M sodium carbonate (Merck) and 50 µL SDS 20% (Sigma-Aldrich) were added into the mixture to stop the reaction. Absorbance was then measured at 420 nm with a spectrophotometer (Genesys6, Spectronic, Thermo Electron Scientific Instruments LLC, Madison, WI USA). One β-galactosidase activity unit (GalU) was defined as micromole of nitrophenyl produced per minute and per milligram of total protein under assays conditions.

Survival challenge conditions: Exponentially grown cultures (50 ml, OD_{600} 0.5) in CDM supplemented with 40 µM heme were harvested by centrifugation (20°C, 3,000g, 10 min) and resuspended in 50 ml fresh CDM medium without heme nor glucose. These cultures were

incubated at 30°C, 70 rpm (Medline, SI600R), and at the desired time point, samples were taken and rapidly diluted in Dilution Medium. Cell count was determined by plating 100 µl of appropriate serial dilutions on MRS agar and CFU were determined after 30 h incubation at 30°C. Experiments were repeated 3 times.

Peroxide stress challenge conditions: Exponentially grown cultures (50 ml, OD_{600} 0.5) were harvested by centrifugation (20°C, 3,000g, 10 min) and resuspended in 50 ml fresh CDM medium containing 25 mM hydrogen peroxide. These cultures were incubated at 30°C, 70 rpm (Medline, SI600R), and at the desired time point, samples were taken and rapidly diluted in Dilution Medium. Cell count was determined by plating 100 µl of appropriate serial dilutions on MRS agar and CFU were determined after 30 h incubation at 30°C. Experiments were repeated 3 times.

Results

The three Fur-like regulators belong to three different Fur sub families

We performed alignments of the three *L. sakei* Fur-like regulators, with representative members of the different functional sub-families in different species (Figure 1). This indicates that the three regulators are clearly structurally different.

LSA0109 shares 47 to 60% identity with homologous proteins found in LAB such as *Lactobacillus brevis* ATCC367, *Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lactobacillus casei* ATCC334 or *Oenococcus oeni* PSU1. *lsa0109* belongs to *lsa0110-0115* operon encompassing genes encoding hypothetical proteins (Figure 2A). This organization appears unique among LAB or pathogenic bacteria (Figure 2A) whereas the *lsa*0109 gene is conserved among LAB species. The LSA0109 protein shows identity with Zur proteins of *L. monocytogenes* (40 %), *B. subtilis* (39 %), *M. tuberculosis* (26 %) and *S. aureus* (37 %). As shown in Figure 1, structurally, the key residues, His 81, His 83, Cys 76 and Asp 62, described in FurB, functionally a Zur, of *M. tuberculosis* could be related to *L. sakei* residues His 93, His 95 Cys

86 and Glu 72 respectively. This suggests that LSA0109 could be a Fur-like member able to regulate homeostasis of metals, such as zinc or manganese, and thus could be considered as a Zur or a Mur.

LSA0466 shares homologies with PerR proteins of *Enterococcus faecalis* (59%), *L. monocytogenes* (56%) or *B. subtilis* (55%). *lsa0466* is located downstream from *lsa0465* gene encoding a putative protein from the COG1368 of phosphoglycerol transferase, and upstream from a ribosomal operon. This genetic organization is conserved in *L. rhamnosus* Lc705 and partially in *L. casei* BL23 (Figure 2B). Position of this *fur*-like gene adjacent to a ribosomal operon is also observed in pathogenic bacteria such as *L. monocytogenes*, *B. subtilis* or *S. aureus* (Figure 2B). In *B subtilis*, the crystal structure of the $PerR_{Bs}$ allowed to identify five residues which led to the pentacoordination of iron or manganese with His37, Asp104, His91, His93 and Asp85 (Jacquamet *et al.*, 2009). In LSA0466, these five residues are perfectly aligned with the exact same location (Figure 1B). In $PerR_{Bs}$ these five residues are surrounded by six other polar residues (Ala36, Phe86, Ser89, Val103, Thr88 and Lys101). Such residues are found in *L. sakei* with the slight displacement of Thr88 to position 89 (Figure1B). Moreover, a highly conserved 12 amino-acid region specific to PerR proteins (Bsat *et al.*, 1998) is present in LSA0466 at position 51 to 63 (Figure 1B) but is not present in the two other LSA Fur-like proteins. These observations suggest that *lsa0466* encodes for a PerR protein.

LSA1029 does not possess any homologs in LAB species. It shares 53 % and 56 % identity with Fur proteins of *B. subtilis* and *L. monocytogenes* respectively and 28 % with *E. coli* Fur_{Ec}. *lsa1029* is located downstream from *lsa1030* encoding a putative nucleic acid binding protein (IPR014464, COG2996) and upstream *lsa1028*, *xerD*, coding for DNA recombinase. A slight overlapping between *lsa1029* and *lsa1028* indicates a putative operon. In other Gram positive bacteria such as *L. monocytogenes*, *S. aureus* or *B. subtilis*, a *xerD* gene is frequently present upstream from the *fur* homologs (Figure 2C). Interestingly, in most

LAB (*L. plantarum, L. rhamnosus, Lc. citreum, L. brevis,* and others as *L. salivarius* or *Pediococcus pentosaceus*), COG2996 and *xerD* genes are adjacent (Figure 2C). In *L. sakei* 23K, it seems thus that *lsa1029* position could result from an insertion event. We performed a codon bias usage analysis on the whole *L. sakei* 23K genome but it did not reveal any bias for *lsa1029* gene (data not shown). *lsa1029* appears unique among the LAB group and could be an important element for adaptation of *L. sakei* to its natural environment. As shown in Figure 1C, residues of a predicted regulatory iron-site II, described as the tetra-coordinated site by His32 or 33, Glu80 or 81, His89 or 90 and Glu100 or His88 in respect with *P. aeruginosa* Fur_{Pa} or *V. cholerae* Fur_{Vc} (Pohl *et al.*, 2003, Sheikh & Taylor, 2009), is conserved in LSA1029 and is perfectly aligned as His39, Glu83, His101 and His99 or Glu108. A potential Zn structural site I described in Fur_{Pa} *P. aeruginosa* as His86, 2x Asp88, Glu107, His124 (Pohl *et al.*, 2003), appears imperfect in *L. sakei* as His97, His100, Val119 and His136. Such an imperfect site is also observed in Fur_{Vc} *V. cholera* (Sheikh & Taylor, 2009). Figure 1C shows that LSA1029 possess the well conserved cysteine repeats Cys105 xx Cys108 described in Fur_{Ec} as Cys-92 xx Cys-95 (Pecqueur *et al.*, 2006) and in Fur_{Vc} as Cys-133 xxx Cys-139 (Sheikh & Taylor, 2009). LSA1029 appears thus to be the canonical Fur member of the family.

The three regulators have distinct predicted regulons:

Regarding this allocation of the different *L. sakei* Fur-like proteins to distinguish Fur sub-families, we considered that each regulator could recognize a different DNA binding site as previously reported for the different Fur members. In order to define possible regulon for each of them, we thus performed an *in silico* analysis considering a Zur box for LSA0109, a PerR box for LSA0466 and a Fur box for LSA1029.

Based on the Zur recognized sequences of *B. subtilis* promoters, we created a matrix using RSAT tool (van Helden, 2003, Thomas-Chollier *et al.*, 2008). We then tested this

matrix in *B. subtilis* genome, which allowed us to identify the genes previously shown to be part of the Zur regulon in this species (Fuangthong & Helmann, 2003). Among genes regulated by Zur in *B. subtilis*, we looked for homologs in LAB species to check for potential Zur-box in their promoter region in order to modify our weight matrix and get one extended matrix for LAB (Figure 3C). This LAB extended matrix allowed us to identify, in *B. subtilis*, genes regulated by Zur with score above 8 thus validating this matrix. Clearly, our LAB-Zur box consensus sequence is the exact box described for *B. subtilis* but weight assigned to each base is different. Using combination of matrices from *B. subtilis* (15 bp as 7-1-7), LAB-extended, degenerated consensus and gene function, we defined one relevant Zur box in *L. sakei* genome as detailed in Table 3. This box is located at position -71 in the promoter region of *lsa0282-0284* operon encoding a putative ABC transporter homolog to MtsABC family of transporters. In *Streptococcus pyogenes*, this system is involved in transport of divalent ions such as Mn^{2+} or Zn^{2+} (Janulczyk *et al.*, 2003, Hanks *et al.*, 2006). The *L. sakei* LSA0282-0284 system shows close to 28% homology with the *S. pyogenes* system MtsABC. In *B. subtilis*, four Zur boxes have been demonstrated to regulate genes or operons, including *yciC* and *ycdHI-yceA*, encoding zinc transporters (Gaballa *et al.*, 2002, Fuangthong & Helmann, 2003). Such similarities stick on the potential implication of LSA0109 in the control of zinc or manganese transport systems.

In order to detect PerR and Fur boxes for proteins LSA0466 and LSA1029 respectively in *L. sakei* 23K genome, we used a similar approach based on *B. subtilis* boxes.

For LSA0466, four PerR boxes could be found in the promoter regions of *i*) *lsa*0575 coding for a putative NADH peroxidase, *ii*) divergent genes, *lsa1193* and *lsa1194* encoding respectively a putative oxidoreductase and an unknown membrane protein, *iii*) *lsa*0969 encoding a putative P-type ATPase Cd/Zn/Co and *iv*) *lsa*1831 encoding a Dyp-type peroxidase. Boxes are located at position between -80 and -102 and at -183 for *lsa1193* (Table 3). Genes of this potential regulon point on a role in peroxide detoxification. These

observations confirm the assignation of LSA0466 as the peroxide sensing regulator, PerR, in *L. sakei*.

For LSA1029, our LAB-Fur box matrix (Figure 3A) is the near exact box described for other species but we have extended it to 21 bp, with 16 bp matching with de Lorenzo *E. coli* Fur-box. Based on matrices from *B. subtilis* (15 bp as 7-1-7), LAB-extended and degenerated consensus, we defined 3 relevant Fur boxes in *L. sakei* genome as detailed in Table 3. The first one is located in the divergent promoter region of *lsa0399* and *lsa0400-0403* coding respectively for a putative complexed-iron binding protein and membrane subunits of an ABC-type transporter, homologous to the Fhu-type HupCBG. LSA0399 shows 44% identity with HupC system described in *L. monocytogenes* for iron transport (Jin *et al.*, 2006). The second box is located in the promoter region of *lsa0967* coding for a XerC-type site specific tyrosine recombinase (resolvase). Acting with XerD, XerC is implicated in the resolution of circular dimers in bacterial chromosome (Blakely *et al.*, 2000). The potential regulation of *xerC* by Fur has not yet been described. It could indicate an implication of LSA1029 protein in cell division in *L. sakei*. A third box was found upstream *lsa0466* coding for PerR paralog.

In order to validate our *in silico* predictions and to check for involvement of these regulators in *L. sakei* physiology, we inactivated genes *lsa0109, lsa0466* and *lsa1029* separately. Genes *lsa0109* and *lsa1029* were disrupted by allelic exchange leading respectively to strains RV4055 and RV4059 (Table 1). Using this strategy, we could not obtain a mutant in *lsa0466*. We thus constructed a gene inactivation by plasmid (pRV444) insertion leading to strain RV4062.

We first checked effect of heme on the *fur*-like gene transcription. Genes *lsa0109* (Q= +1.87 ± 0.57) and *lsa0466* (Q= +2.12 ± 0.83) are overexpressed in the presence of heme. Gene *lsa1029* is slightly underexpressed in the presence of heme (Q= 0.65 ± 0.15).

We then checked in mutants the relative transcriptional level of *in silico* selected target genes,

compared to wild type strain grown in the presence of heme. According to our predictions, we also measured transcription of genes predicted to be regulated by another Fur paralog to check for possible cross-regulation. The results are reported in Table 4.

Regarding regulon LSA0109, in the WT strain when heme is provided, *lsa0109* is overexpressed and *lsa0282* is underexpressed (Table 4). This observation is coherent with the function of the protein LSA0109 as a repressor. Moreover, when *lsa0109* is inactivated, *lsa0282* is overexpressed compared to the WT strain. Transcription of *lsa0282* is not affected by heme when *lsa0109* is mutated. These observations confirm the role of LSA0109 as the repressor of *lsa0282*. No cross regulation was observed with Fur or PerR regulon as respectively *lsa0399* (Q = 0.92 ± 0.38) and *lsa1831* (Q = 1.06 ± 1.21) are not affected by the *lsa0109* mutation.

Regarding LSA0466 regulon, in the WT strain when heme is provided *lsa0466* is induced. Surprisingly, all target genes of this regulon are induced in the presence of heme (Table 4). When *lsa0466* is inactivated, genes *lsa0575, lsa0969, lsa1194* and *lsa1831* are clearly overexpressed with elevated values confirming thus our prediction (Table 4). As *lsa1193* transcription is not affected by *lsa0466* inactivation, it appears clearly that this gene is not under the LSA0466 protein control and clearly LSA0466 regulates *lsa1194*. Due to the inactivation method we used (SCO), we were able to control *lsa0466* expression as the primer couple amplified a 124 bp long amplicon located in the 5' part of the gene. LSA0466 inactivation leads to a clear overexpression of the inactivated *lsa0466* (Q = 7.65 ± 2.04) suggesting an autoregulation rather than a regulation by Fur LSA1029 as it could have been predicted by box detection. These observations confirm our *in silico* predictions. No cross regulation was observed with the LSA1029 (Fur) or LSA0109 (Mur) as *lsa1831* transcription is neither affected by the *fur* mutation (Q= 1.02 ± 0.63) nor by the *mur* mutation (Q= 1.06 ± 1.21). Neither the *lsa0109* (Q=1.03 ± 0.12) nor the *lsa1029* (Q=1.07 ± 0.25) genes were affected by the *perR* mutation.

Regarding LSA1029 regulon, in the WT strain, *lsa1029* is slightly under-expressed when heme is provided (Table 4). Among the predicted target genes, genes *lsa0399* and *lsa0400* are slightly repressed whereas *lsa0466* and *lsa0967* are induced when heme is provided (Table 4). When *lsa1029* is deleted, we note a low value overexpression of the four predicted target genes, *lsa0399, lsa0400, lsa466* and *lsa967* (Table 4). This overexpression is coherent with the repressive activity of the LSA1029 (Fur) regulator. No cross regulation between LSA1029 (Fur) and the other Fur-like regulators was observed. In fact, in Δ*lsa1029* (Δ*fur*) relative transcription of *lsa0575* (PerR regulon) is not affected (Q = 0.92 ±0.08) and in Δ*lsa0109* (Δ*mur*) relative transcription of *lsa0399* (Fur regulon) is also not affected (Q= 0.92± 0.38).

We then performed phenotypical analysis of strains RV4055 (Δ*mur*), RV4062 (*perR* inactivated) and RV4059 (Δ*fur*) in order to evaluate physiological role of each of the Fur-like transcriptional regulators, taking into account predicted functions of the identified target genes.

LSA0109 is involved in manganese homeostasis

As LSA0109 regulator, belonging to Zur or Mur family, controls transcription of an *mts*ABC-type transporter possibly involved in Zn or Mn, we looked for a manganese dependent intracellular activity. It has been reported in *L. reuteri*, that growth in the presence of extracellular manganese affects the β and α galactosidase activities (Ibrahim *et al.*, 2010). As *L. sakei* possesses *lacL-lacM* genes encoding the β galactosidase, we measured this activity in cells grown under various Mn concentrations, both in the wild type strain and in the mutant. We observed that in the WT β galactosidase activity is affected by manganese concentration in growth medium, this activity being maximal with 25 µM Mn^{2+} (Figure 4A). In RV4055 strain (Δ*lsa0109*), a significant reduction of β galactosidase activity is observed (Figure 4A). This suggests that in this strain, Mn homeostasis is affected. We cannot exclude a direct effect

of LSA0109 on regulation of β-galactosidase transcription. However, LSA0109 clearly regulates the transcription of the *mtsABC* (*lsa0282-0284*) genes encoding a transport system, the most likely is thus that regulation of Mn transport is affected. Together, these results suggest that the LSA0109 is implicated in the manganese homeostasis in *L. sakei* and could be the Mur paralog rather than a Zur.

In *L. reuteri,* β galactosidase activity is also affected by iron concentration (Ibrahim *et al.*, 2010). In *L. sakei*, increasing heme concentration (5, 20, 40 µM) led to a decrease in β galactosidase activity in the wild type strain at 25 µM Mn^{2+}. In RV4055, β galactosidase activity is lower than in the WT whatever heme concentration (Figure 4B). These data indicate that Δ*lsa0109* does not respond anymore to heme or iron.

Δ*lsa1029* (*fur*) has a modified cell morphology, and is affected in its iron storage and survival

As we previously reported that both heme and transferrin led to enhanced survival of *L. sakei,* we checked the growth and survival under these conditions. We did not notice any modification of behavior between wild type and the mutant strain (data not shown). As LSA1029 regulates the transcription of a gene coding for the binding subunit of a Fhu-like system, a potential iron transporter, we constructed a *fhu* (*lsa0399-403*) mutant strain, named RV4054. We checked survival and catalase activity in standard conditions, with either 5 or 40 µM heme, but we did not notice any differences in this mutant (data not shown). We also checked for iron accumulation in Δ*fur* strain compared to the WT by EELS approach with heme 5 µM but we did not notice any difference (data not shown).

As LSA1029 regulates expression of *xerC1* gene, we hypothesized that the mutant strain could be impaired in cell division caused by mis-resolution of DNA. We thus observed WT and Δ*fur* (RV4059) morphology grown with or without iron sources, heme and bovine or human transferrin. As shown in Figure 5 A and Figure 5 B, WT cells specifically bind bovine

but not human transferrin. In the WT, cells present an identical morphology whatever they have been grown in the presence of heme or not (data not shown). In RV4059 (Δ*lsa1029*), whatever the growth condition, longer cells were observed in the population, a phenotype not observed for WT cells (Figure 5 C and D). These observations suggest that cell division or cell-wall integrity could be affected in Δ*lsa1029* strain. LSA1029 appears thus to be involved in the cell cycle control.

In order to evaluate intracellular iron storage capacity, we grew cells in the presence of heme and then checked their survival in medium depleted of glucose and heme. Under these conditions, we observed that Δ*fur* (Δ*lsa1029*) strain is significantly affected in its persistence capacity compared to the WT strain (Figure 6). We also checked for possible sensitivity to hydrogen peroxide stress. As shown in Figure 7, Δ*lsa1029* strain appears to be more sensitive than the WT strain to hydrogen peroxide stress.

Discussion

The Fur-like protein family encompasses metal dependent transcriptional regulators. The genome of the lactic acid bacterium *L. sakei* encodes three Fur paralogs. We show here that they can be allocated to three different structural and functional Fur sub-families: Fur (LSA1029), Mur (LSA0109) and PerR (LSA0466). Whereas we can note an increasing number of whole genome sequences in databases and detailed studies on Fur-like proteins, this situation remains rarely found in bacteria although it exists in *B. subtilis* (Fuangthong & Helmann, 2003), *L. monocytogenes* (Dalet *et al.*, 1999, Rea *et al.*, 2004, Rea *et al.*, 2005), *S. aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001) or in *E. faecalis*. Up to now it is still unique in the genus *Lactobacillus*.

Each of the *L. sakei* Fur paralogs shares important homologies with canonical Fur homologs and possesses the demonstrated residues, critical for a right functionality. However, such predictions are not sufficient in order to prove their *in vivo* functionality. In *B. subtilis*,

numerous *in vitro* and *in vivo* studies led to identify distinct and well documented regulons (Fuangthong & Helmann, 2003). No overlapping regulation has been observed *in vivo*. The promoter region of *zosA* contains both Fur and PerR boxes, but *in vivo* studies conclude that this gene is only under the PerR control (Fuangthong & Helmann, 2003). In *L. monocytogenes*, PerR boxes search was performed using the consensus *B. subtilis* PerR box (Padilla *et al.*, 2005). In this species, the perfect consensus PerR box led to the identification of only one box in the promoter region of the *fur* gene and a search using consensus sequence allowing two mismatches led to the identification of fourteen genes, which were then selected on box position and gene function regarding the *B. subtilis* regulon (Padilla *et al.*, 2005). A similar approach had previously been done in *S. aureus* on Fur regulon using the consensus *E. coli* Fur box (Xiong *et al.*, 2000). In *L. sakei*, we have determined non overlapping small regulons for the three Fur paralogs and shown their roles in cell physiology. Some were expected and some were not.

LSA0109 was formerly annotated as a putative transcriptional regulator of the Fur family sharing identity with Zur paralogs. Our present analysis reveals that it rather should be considered as a Mur and regulates an *mtsABC* operon. Such a situation where a unique box is defined for LSA0109 regulon is similar to the one described in *B. subtilis*. In this species, Zur only binds to four Zur-boxes, controlling transcription of genes coding for Zn transport system (*yciC, ycdHI-yceA*) and putative metal uptake system (*yciA* and *yciB*) (Gaballa *et al.*, 2002, Fuangthong & Helmann, 2003). We show that LSA0109 represses the transcription of genes encoding a potential manganese or iron transporter as *mtsABC* (*lsa0282-0284*) is over-expressed in the Δ*lsa0109* background. Using Mn dependant β galactosidase activity, we could show that Mn homeostasis is deregulated in Δ*lsa0109*. Manganese is also an important transition metal for bacteria. It has been shown to have a key role against oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae* (Jakubovics & Valentine, 2009). In WT *L. sakei* cells, the putative Mn ABC-transporter encoding genes (*mtsABC*) are underexpressed when heme is provided

suggesting that less Mn is transported. We have also shown in the WT strain that Mn dependent β galactosidase activity decreased when cells are grown with increasing heme concentrations. Interestingly, in Δ*lsa0109*, heme concentration does not affect any more the β galactosidase activity, suggesting inability of cells to respond to heme. This confirms that LSA0109 responds to heme. Although we cannot define a direct or undirect role, LSA0109 seems to be involved in Mn homeostasis in *L. sakei*.

LSA0466 was formerly annotated as a putative transcriptional regulator of Fur family. We have shown that LSA0466 could be allocated to PerR subfamily. We predicted that this PerR paralog could bind to 4 PerR boxes, leading to the control of genes belonging to a regulon including proteins functionally related to peroxidative stress response, NADH peroxidase, P-type ATPase as described in *L. monocytogenes* (Padilla *et al.*, 2005), in *E. faecalis* (Verneuil *et al.*, 2005) or in *B. subtilis* (Fuangthong *et al.*, 2002). Interestingly, this regulon also includes a Dyp-type peroxidase (LSA1831). Such a protein has been shown in *E. coli* to be involved in iron recovering from heme (Létoffé *et al.*, 2009). In *L. sakei*, *lsa1831* is induced by heme as it was observed for the heme oxygenase encoding gene *hmuO* in *Corynebacterium diphteriae* (Bibb *et al.*, 2005, Bibb *et al.*, 2007), unlike *S. aureus* where heme oxygenase encoding genes, *isdG* and *isdI*, are repressed by heme (Skaar *et al.*, 2004). Whereas PerR regulates *kat*A gene in *L. monocytogenes* (Padilla *et al.*, 2005) and *S. aureus* (Cosgrove *et al.*, 2007), we found no PerR-boxes in the promoter region of this gene in *L. sakei*. We first predicted a Fur-box in the promoter region of *lsa0466*. In the Δ*lsa1029* strain, *lsa*0466 gene was slightly derepressed. But we also observed that *lsa0466* inactivation led to a seven-fold derepression of its own product. This situation could be compared with *zosA* promoter region in *B. subtilis* where two Fur like boxes are present but where only PerR controls *zosA* transcription *in vivo* (Fuangthong & Helmann, 2003). LSA0466 negatively regulates genes encompassing its regulon as their relative transcription in higher in the LSA0466 inactivated strain compared to the WT. On the other hand, the same genes are over-

expressed when heme is provided suggesting a dual regulation. As we discussed above, *C. diphteriae hmuO* gene is induced by heme (Bibb *et al.*, 2005, Bibb *et al.*, 2007) but it is also repressed in high iron condition through a DtxR mediated regulation (Schmitt, 1997). In our study, we have shown that PerR represses transcription of target genes, these latter being induced by heme. This suggests that an activation mechanism also exists.

Physiologically, Δ*perR* could be affected in hydrogen peroxide stress resistance as reported in other species as *E. faecalis* (Verneuil *et al.*, 2005) or *L. monocytogenes* (Padilla *et al.*, 2005). In *E. faecalis*, Δ*perR* is more resistant to H_2O_2 challenge but is less lethal in a mouse peritonitis model (Verneuil *et al.*, 2005). In *L. monocytogenes*, authors also described a small colony phenotype for Δ*perR* (Padilla *et al.*, 2005). In *L. monocytogenes* (Padilla *et al.*, 2005) in *E. faecalis* (Verneuil *et al.*, 2005), or in *S. aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001) PerR inactivation led to a reduced virulence. We cannot check for such a phenotype in the non pathogenic *L. sakei*. We can however hypothesize that meat colonization could represent a harsh environment in which a functional PerR would be important for *L. sakei* survival. In our study, it appears that PerR shows the most clearly established regulon with high variations in gene transcription. Surprisingly, we cannot find any clear physiological effect due to *perR* mutation. We cannot exclude that this regulator could be essential to escape stress in meat environment.

LSA1029 has been clearly allocated to Fur proteins. Deletion of *lsa1029* (*fur*) only slightly derepresses target genes. We predicted that this protein should regulate transcription of genes encoding a Fhu type iron-complexed transport system, and a DNA resolvase protein (XerC type). The derepression of Fhu subunit could lead to an increased iron accumulation phenotype in *L. sakei*. We thus controlled the intracellular iron content of Δ*lsa1029* using *i*) analytical EELS and *ii*) physiological survival challenge methods. The first approach did not reveal any significant modification in iron content (data not shown). Evaluation of iron storage capacity followed by survival challenge without heme revealed that Δ*fur* strain is

more affected than the WT strain. This could be attributed to an impaired iron storage capacity in the mutant strain. This phenotype is also linked with a slight sensitivity to hydrogen peroxide stress. This involvement of Fur in the cell physiology points on a possible important role for persistance in the meat environment.

LSA1029 also represses transcription of *lsa*0967 encoding a XerC protein. *lsa1029* inactivation results in overexpression of *lsa0967* and an abnormal cell phenotype as revealed by scanning electron microscopy. *L. sakei* possesses two XerC paralogs, encoded by *lsa0967* and *lsa0986*, but only one *xerD* gene (*lsa1028*), adjacent to *fur* (*lsa1029*). XerC is a site-specific tyrosine recombinase, which acts by catalyzing the cutting and rejoining of the recombining DNA molecules. This protein is essential to the conversion of bacterial chromosome dimers into monomers, in order to permit their segregation at cell division. These systems have been shown in *E. coli* to be involved in chromosome segregation and cell partionning (Hendricks *et al.*, 2000, Kennedy *et al.*, 2008). The lack of such a functional system in *lsa1029* (*fur*) mutant could explain the abnormal long cells phenotype. To our knowledge, this is the first evidence of iron involvment in cell division in a LAB.

Acknowledgments

We thank Thierry Meylheuc from Platform MIMA2, AgroParisTech/INRA, Massy, France. P. Duhutrel is recipient of a grant from the French Ministère de la Recherche.

Table 1: Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain/Plasmid	**Characteristics**	**Reference**
Strains		
E. coli DH5α		(Hanahan, 1983)
L. sakei 23K	Sequenced strain	(Chaillou *et al.*, 2005)
L. sakei 23Ki	23K derivative, erythromycin resistant	
RV4054	23K derivative, Δ*fhu* (*lsa0399-0403*)	This study
RV4055	23K derivative, Δ*mur* (*lsa0109*)	This study
RV4059	23K derivative, Δ*fur* (*lsa1029*)	This study
RV4062	23K derivative, *per*R (*lsa0466*::pRV444), erythromycin resistant	This study
Plasmids		
pRV300	Non replicative cloning vector, EryR, AmpR	(Leloup *et al.*, 1997)
pRV436	pRV300 derivative, exchange cassette for *fhu*	This study
pRV442	pRV300 derivative, exchange cassette for *mur*	This study
pRV443	pRV300 derivative, exchange cassette for *fur*	This study
pRV444	pRV300 derivative for disruption of *per*R	This study

Table 2: Oligonucleotides used in this study for gene inactivation. Restriction sites are underlined and complementarity regions appear in italic.

Oligonucleotide	**Sequence (5'-3')**
702F	AATTGCCTTCTTCCGTGTA
310R	AGTTGCGCACAATTATTTTC
RP	GGAAACAGCTATGACCA
PU	GTAAAACGACGGCCAGT
PHDU-zur1	CTGAGGTACCGATTAGTGCTTAAGCAAGTTG
PHDU-zur2	*TAGATCTGACTAGTCAGTTCG* ATGTAATGATTTTCGTACTGC
PHDU-zur3	*GAACTGACTAGTCAGATCTA* GAAGATGTGTCCACTGGAT
PHDU-zur4	ATCGCTGCAGACCGCTAGTGACCTTGG
PHDU-per1	ATGCGGTACCTACTTACTACGATACCAAGAC
PHDU-per4	ACTGCTGCAGTCATCTTTCATAGTGAACTGTC
PHDU-per5	TCTGGGCAACTATTTCAACATCT
PHDU-per8	ATTATCTCGATCTAGAACAATGTACGAATTACACCG
PHDU-fur1	ATGCGGTACCTGTCTTGTTAACCCGTTTCC
PHDU-fur2	*TGGAGACTAGTTAGCAATC*CCAAGTAAGCAAGTGGATATTA
PHDU-fur3	*GATTGCTAACTAGTCTCCA*CCCGCTTCTTGCAATTGTT
PHDU-fur4	ACTGGAATTCGGCCAATTAGCCGACGA
PHDU-fhu1	ATGC GGTACC GCTTGAAAGTTTTACCAGATG
PHDU-fhu2	CTAATCACTAGTTCGCAGTCGCCAATCGCATATGAAGAAATG
PHDU-fhu5	CGACTGCGAACTAGTGATTAGCGGTAACTGAGATTGTTGC
PHDU-fhu6	ATCGCTGCAGCTGGTAAGCAATTAGCCAC

Table 3: *In silico* prediction of putative regulons for the three Fur-like regulators in *L. sakei*

Locus tag	Target Genes	Function	Position of Box to ATG	Mismatches to consensus (7-1-7)
LSA0109 regulon				
*lsa*0282-0284	*mtsABC*	Mn/Fe transport system	-71	0
LSA0466 regulon				
*lsa*0575	*npr*	NADH peroxidase	-98	1
*lsa*1193		Putative oxidoreductase	-183	1
*lsa*1194		Membrane protein	-80	1
*lsa*0969		P-type ATPase Cd/Zn/Co	-102	1
*lsa*1831		Dye-type peroxidase	-93	0
LSA1029 regulon				
*lsa*0399	*fhuD*	Iron-complexed uptake	-74	3
*lsa*0400	*fhuC*	Iron-complexed uptake	-187	3
*lsa*0466	*perR*	Transcription regulator	-75	0
*lsa*0967	*xerC1*	DNA recombinase	-332	1

Table 4: Relative transcription of predicted target genes analyzed by RT qPCR in *L. sakei* WT, Δ*lsa0109*, Δ*lsa0466* and Δ*lsa1029*.

Regulon	**Target Gene**	**Relative Expression expressed as Norm**			
		Q_{wt} (Hm/Ctrl)		Q_{Hm} (Δ*/wt)	
		median	sd	median	sd
LSA0109	*lsa0282*	**0.69**	0.28	**2.32**	0.43
	lsa0109	**1.87**	0.57	-	-
LSA0466	*lsa0575*	**1.56**	0.27	**3.01**	1.31
	lsa0969	**3.23**	2.84	**20.62**	15.52
	lsa1193	**1.46**	0.33	**1.26**	0.17
	lsa1194	**5.38**	2.36	**22.81**	16.04
	lsa1831	**2.70**	0.46	**7.39**	1.26
	lsa0466	**2.12**	0.83	**7.65**	2.04
LSA1029	*lsa0399*	**0.84**	0.17	**1.54**	0.42
	lsa0400	**0.58**	0.12	**1.43**	0.41
	lsa0466	**2.12**	0.83	**1.42**	0.44
	lsa0967	**1.25**	0.36	**1.57**	1.36
	lsa1029	**0.65**	0.15	-	-

* deleted strains corresponding to LSA0109, LSA0466 and LSA1029 are respectively RV4055 (Δ*lsa0109*), RV4062 (*perR* inactivated) and RV4059 (Δ*lsa1029*).

Legend to figures

Figure 1: Multiple alignments of Fur-family proteins including LSA0109 (Zur_{Lsa}), LSA0466 ($PerR_{Lsa}$) and LSA1029 (Fur_{Lsa}). Secondary structures from Protein Data Bank of Fur_{Vc} (*V. cholerae*), Zur_{Mt} (formerly FurB of *M. tuberculosis*) and $PerR_{Bs}$ (*B. subtilis*) are represented above alignments. Alignments were generated using CLUSTALW2 program (Larkin *et al.*, 2007) and drawn with online ESPript program (Gouet *et al.*, 1999). Alignments of representative proteins sequences of the A) Zur family, B) PerR family and C) Fur family are represented. Identical residues are boxed in red. Residues of the same group are in red, not boxed. When global similarity is > 0.7, residues are framed in blue and if < 0.7, residues are in black.

Figure 2: Genetic organization of A) *lsa0109*, B) *lsa0466* and C) *lsa1029* in *L. sakei*, and comparison with other LAB and Gram positive species.

Figure 3: *L. sakei* Fur-boxes. DNA sequence logo of the *L. sakei* Fur DNA binding sites. A) set of 6 DNA sequences (3 sites together with their reverse complements) containing Fur box sites were aligned with CLUSTALW, and then a window of 31 bases around the *B. subtilis* 7-1-7 motif was used to generate a sequence logo. Height of each letter corresponds to its relative abundance. Letters under the logo show the resulting consensus *L. sakei* Fur-box. B) Sequence logo of the *L. sakei* PerR box. A total of 4 PerR boxes (8 with their reverse complements) were used for alignment. C) Sequence of the unique Zur-binding sites of *L. sakei* detected.

Figure 4: Specific β-galactosidase activities of *L. sakei* WT and Δ*lsa0109*: A) in cells grown in various Mn^{2+} concentrations and B) in cells grown at 25 µM Mn^{2+} and various heme concentrations.

Figure 5: Transmission electron micrographs of *L. sakei* cells. A) wild type cells B) Δ*lsa1029* C) wild type cells cultured with bovine transferrin and D) wild type cells cultured with human transferrin.

Figure 6: Survival challenge of *L. sakei* cells as described in material and methods. Squares: wild type, triangles: Δ*lsa*1029

Figure 7: Response of *L. sakei* cells to peroxide stress challenge (25 mM H_2O_2). Squares: wild type; open triangles: Δ*lsa*1029.

Figure 1:

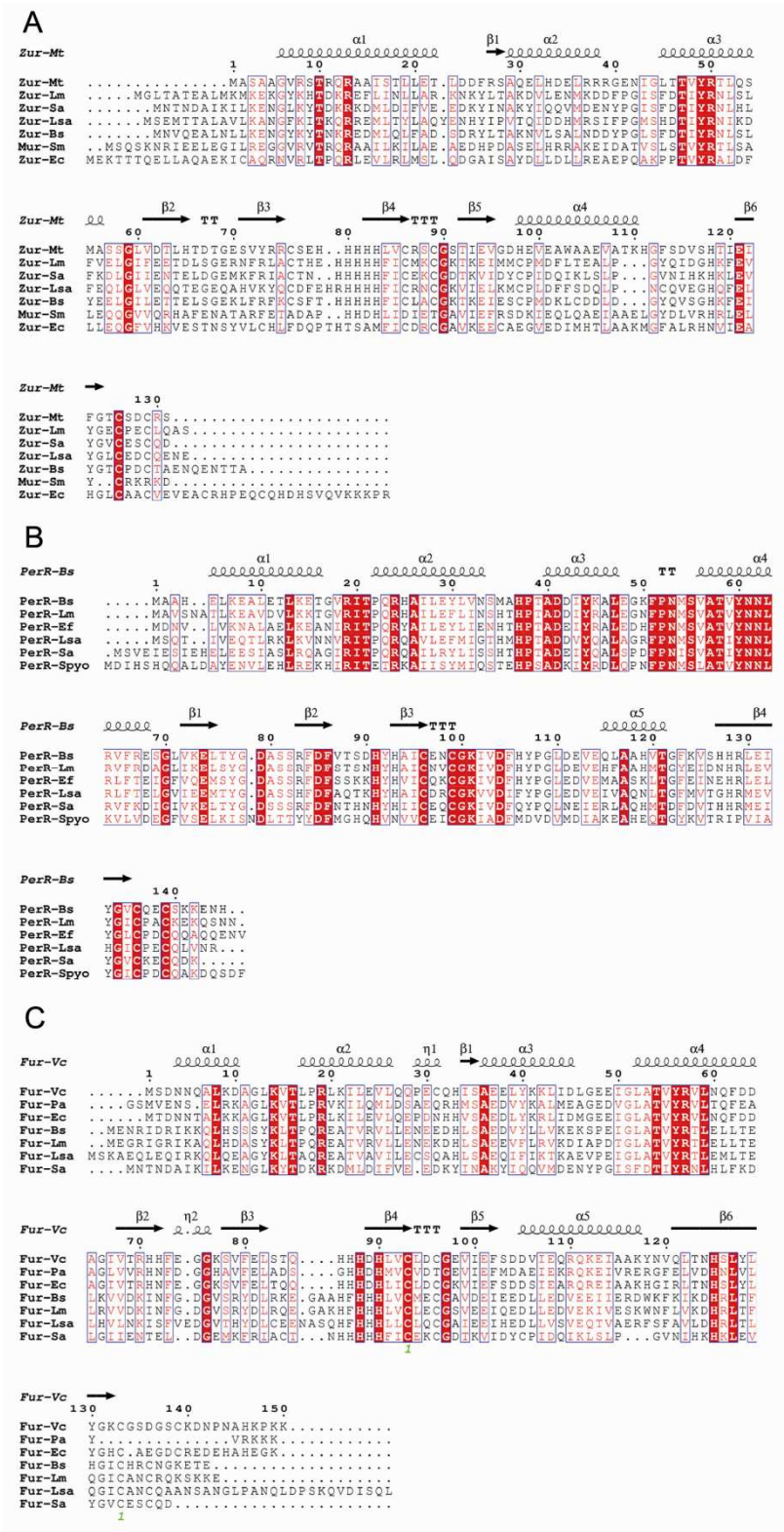

A
Zur-Mt
Zur-Lm
Zur-Sa
Zur-Lsa
Zur-Bs
Mur-Sm
Zur-Ec
B
PerR-Bs
PerR-Lm
PerR-Ef
PerR-Lsa
PerR-Sa
PerR-Spyo
C
Fur-Vc
Fur-Pa
Fur-Ec
Fur-Bs
Fur-Lm
Fur-Lsa
Fur-Sa

Figure 2:

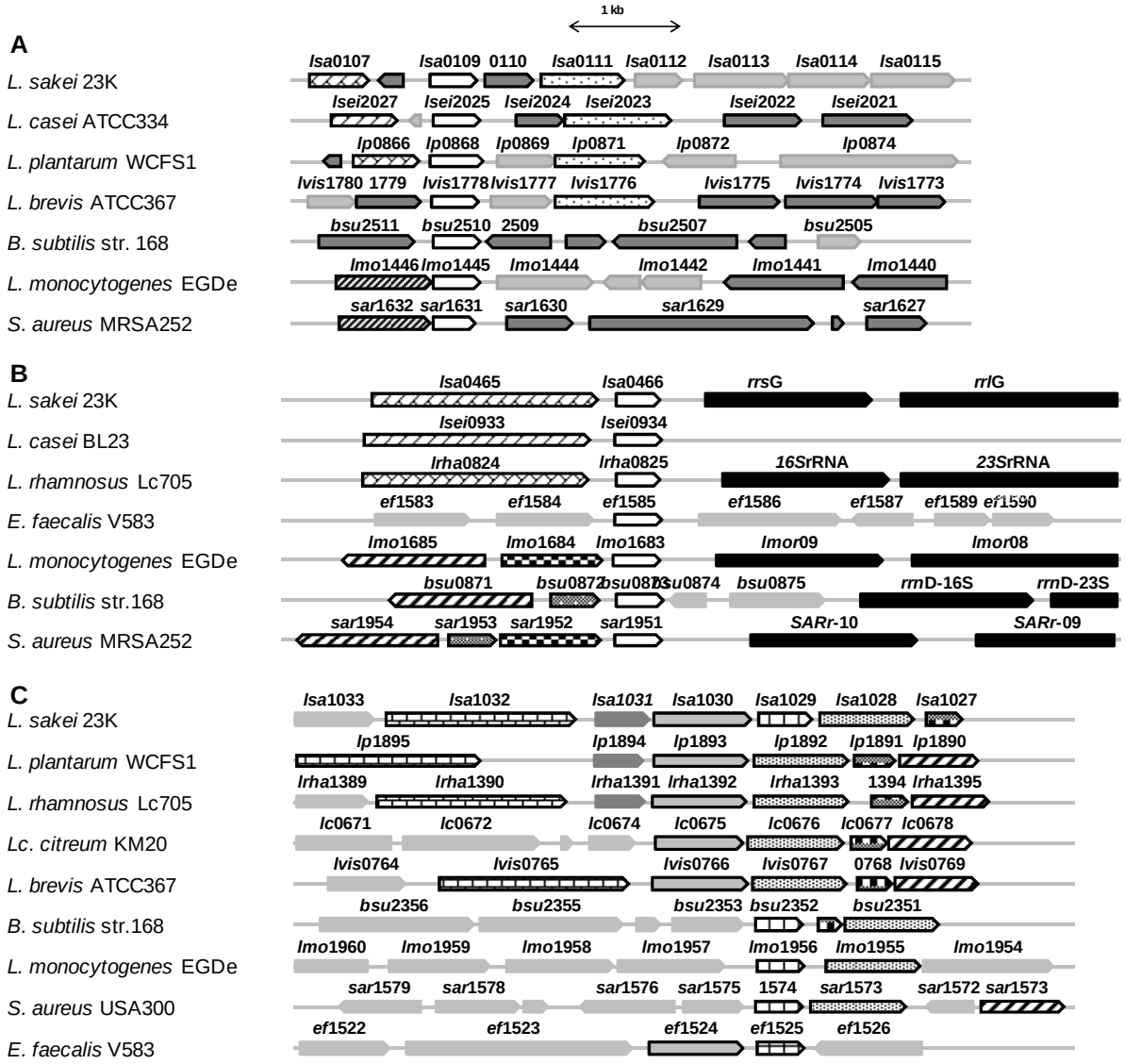

A
1 kb
L. sakei 23K
lsa0107 lsa0109 0110 lsa0111 lsa0112 lsa0113 lsa0114 lsa0115
L. casei ATCC334
lsei2027 lsei2025 lsei2024 lsei2023 lsei2022 lsei2021
L. plantarum WCFS1
lp0866 lp0868 lp0869 lp0871 lp0872 lp0874
L. brevis ATCC367
lvis1780 1779 lvis1778 lvis1777 lvis1776 lvis1775 lvis1774 lvis1773
B. subtilis str. 168
bsu2511 bsu2510 2509 bsu2507 bsu2505
L. monocytogenes EGDe
lmo1446 lmo1445 lmo1444 lmo1442 lmo1441 lmo1440
S. aureus MRSA252
sar1632 sar1631 sar1630 sar1629 sar1627
B
L. sakei 23K
lsa0465 lsa0466 rrsG rrlG
L. casei BL23
lsei0933 lsei0934
L. rhamnosus Lc705
lrha0824 lrha0825 16SrRNA 23SrRNA
E. faecalis V583
ef1583 ef1584 ef1585 ef1586 ef1587 ef1589 ef1590
L. monocytogenes EGDe
lmo1685 lmo1684 lmo1683 lmor09 lmor08
B. subtilis str.168
bsu0871 bsu0872 bsu0873 bsu0874 bsu0875 rrnD-16S rrnD-23S
S. aureus MRSA252
sar1954 sar1953 sar1952 sar1951 SARr-10 SARr-09
C
L. sakei 23K
lsa1033 lsa1032 lsa1031 lsa1030 lsa1029 lsa1028 lsa1027
L. plantarum WCFS1
lp1895 lp1894 lp1893 lp1892 lp1891 lp1890
L. rhamnosus Lc705
lrha1389 lrha1390 lrha1391 lrha1392 lrha1393 1394 lrha1395
Lc. citreum KM20
lc0671 lc0672 lc0674 lc0675 lc0676 lc0677 lc0678
L. brevis ATCC367
lvis0764 lvis0765 lvis0766 lvis0767 0768 lvis0769
B. subtilis str.168
bsu2356 bsu2355 bsu2353 bsu2352 bsu2351
L. monocytogenes EGDe
lmo1960 lmo1959 lmo1958 lmo1957 lmo1956 lmo1955 lmo1954
S. aureus USA300
sar1579 sar1578 sar1576 sar1575 1574 sar1573 sar1572 sar1573
E. faecalis V583
ef1522 ef1523 ef1524 ef1525 ef1526

Figure 3:

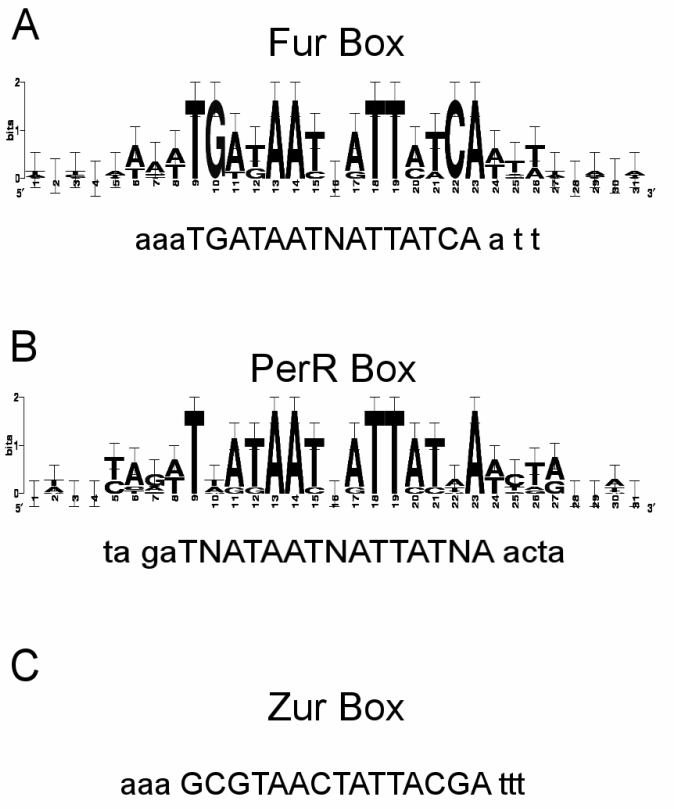
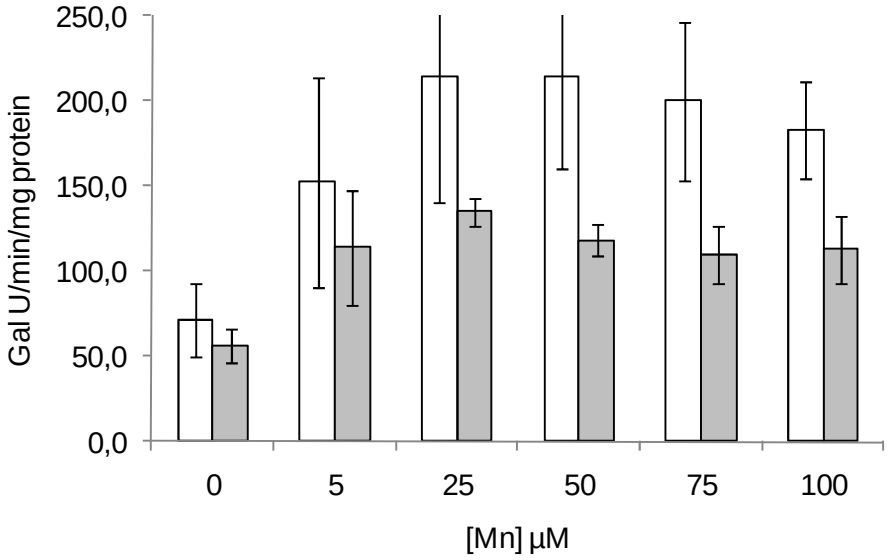

A
Fur Box
aaaTGATAATNATTATCA a t t
B
PerR Box
ta gaTNATAATNATTATNA acta
C
Zur Box
aaa GCGTAACTATTACGA ttt

Figure 4:

A)


250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
Gal U/min/mg protein
0
5
25
50
75
100
[Mn] µM

B)

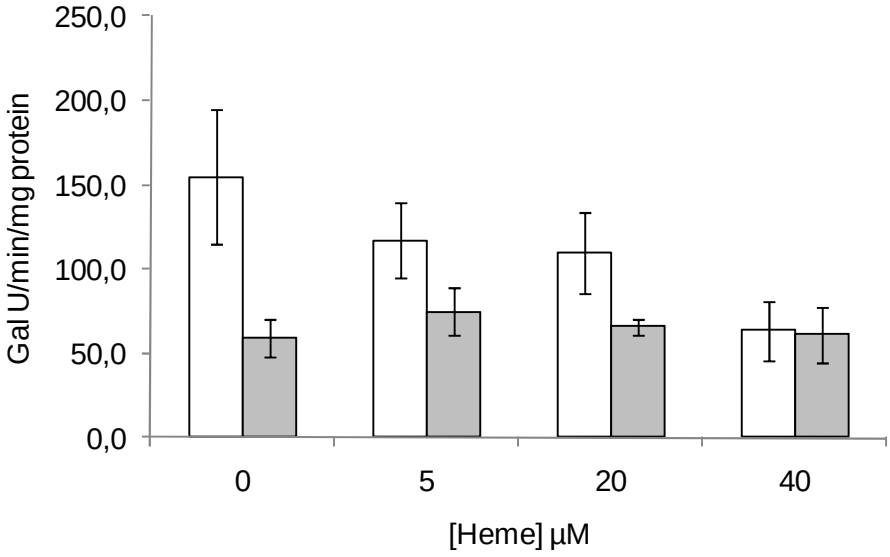

250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
Gal U/min/mg protein
0
5
20
40
[Heme] µM

Figure 5:

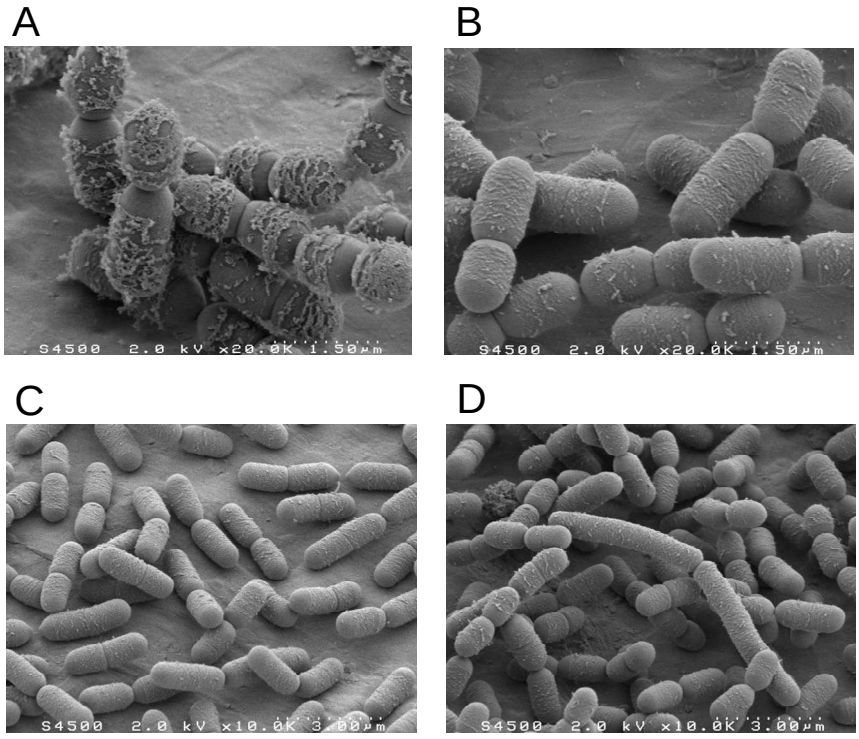

A
S4500 2.0 kV x20.0K 1.50µm
B
S4500 2.0 kV x20.0K 1.50µm
C
S4500 2.0 kV x10.0K 3.00µm
D
S4500 2.0 kV x10.0K 3.00µm

Figure 6:

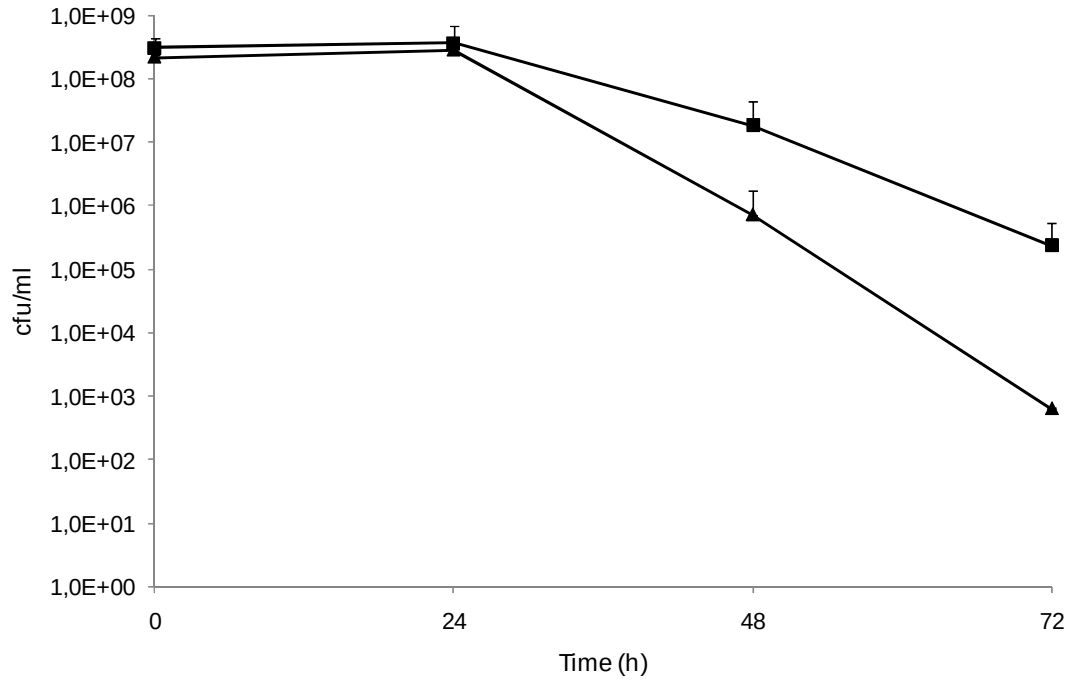
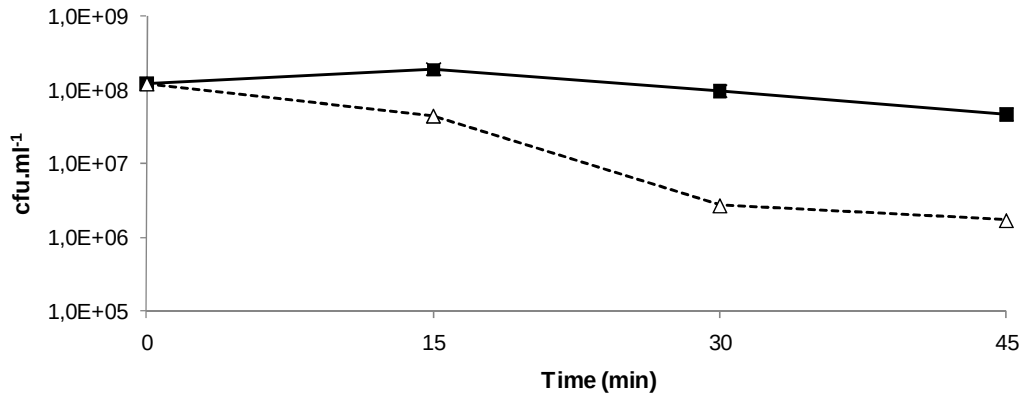


Figure 7:



Supplementary Table 1: Oligonucleotides used for qRT-PCR experiments

Target gene	Oligonucleotides	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)
*lsa*0282	qPCRDU005F	GCGGTCAGTGAACCAGTCTT	102
	qPCRDU005R	TGATGGATCCGTACCGTCTT	
*lsa*0399	qPCRDU001F	GCGCTTTTGTTTGGATTGTT	138
	qPCRDU001R	ATGGCGCTAAAGTCAAATGG	
*lsa*0400	qPCRDU002F	TGAAGACCGCACCATTATCA	102
	qPCRDU002R	CCACTGGCCTGTAATTGACC	
*lsa*0466	qPCRDU004F	ACGCTGCGAAAGTTGAAAGT	124
	qPCRDU004R	GGCCTGCTAACGCTTGATAA	
*lsa*0575	qPCRDU011F	AAGGTCGCTACGCTGCTAAA	114
	qPCRDU011R	CTTTAATCCCCGTTGAAGCA	
*lsa*0967	qPCRDU003F	TACGTTCAAATTCGGCAACA	142
	qPCRDU003R	GAACGCCAAAAGCTTCAGAG	
*lsa*0969	qPCRDU013F	GCTCTCAAAAGACCCTGTGC	108
	qPCRDU013R	CTGGCACGACTCATACCTGA	
*lsa*1193	qPCRDU012F	AGGGACGATCATTTCACGAC	100
	qPCRDU012R	AGGCTGATTAATCCCCCAAC	
*lsa*1194	qPCRDU022F	AAGCCACCCAAGAAATGATG	103
	qPCRDU022R	ATCGCAGCTGCATAAGGATT	
*lsa*1831	qPCRDU010F	AATGGTTCATACGCCTTTGC	134
	qPCRDU010R	GGTTTTTCGGCATCGTCTAA	
ldh	qPCRE004F	GCCAGGTGAAACACGTTTAGA	121
	qPCRE004R	ATCAACTGGGTTAGCAGCAACT	
gap	qFLEC003F	CAAGCAGTGACGTTTTGGAA	103
	qFLEC003R	TGATCGAATTGACCATGAGC	
*rpo*B	qFLEC004F	GCCTTGATGGGTGCTAACAT	132
	qFLEC004R	TCCGGCATGTTGTGCTAATA	

References

Abdul-Tehrani, H., A. J. Hudson, Y. S. Chang, A. R. Timms, C. Hawkins, J. M. Williams, P. M. Harrison, J. R. Guest & S. C. Andrews, (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* **181**: 1415-1428.

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

Baichoo, N. & J. D. Helmann, (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* **184**: 5826-5832.

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

Berthier, F., M. Zagorec, M. C. Champomier Vergès, S. D. Ehrlich & F. MorelDeville, (1996) Efficient transformation of *Lactobacillus sakei* by electroporation. *Microbiology* **142**: 1273-1279.

Bibb, L. A., N. D. King, C. A. Kunkle & M. P. Schmitt, (2005) Analysis of a heme-dependent signal transduction system in *Corynebactetium diphtheriae*: Deletion of the *chrA/S* genes results in heme sensitivity and diminished heme-dependent activation of the *hmuO* promoter. *Infect. Immun.* **73**: 7406-7412.

Bibb, L. A., C. A. Kunkle & M. P. Schmitt, (2007) The ChrA-ChrS and HrrA-HrrS signal transduction systems are required for activation of the *hmuO* promoter and repression of the *hemA* promoter in *Corynebacterium diphtheriae*. *Infect. Immun.* **75**: 2421-2431.

Blakely, G. W., A. O. Davidson & D. J. Sherratt, (2000) Sequential strand exchange by XerC and XerD during site-specific recombination at dif. *J. Biol. Chem.* **275**: 9930-9936.

Brooijmans, R., B. Smit, F. Santos, J. van Riel, W. M. de Vos & J. Hugenholtz, (2009) Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* **8**.

Bsat, N., A. Herbig, L. Casillas-Martinez, P. Setlow & J. D. Helmann, (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol. Microbiol.* **29**: 189-198.

Carpenter, B. M., J. M. Whitmire & D. S. Merrell, (2009) This is not your mother's repressor: the complex role of Fur in pathogenesis. *Infect. Immun.* **77**: 2590-2601.

Chaillou, S., M. C. Champomier Vergès, M. Cornet, A. M. Crutz-Le Coq, A. M. Dudez, V. Martin, S. Beaufils, E. Darbon-Rongère, R. Bossy, V. Loux & M. Zagorec, (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1527-1533.

Chiaramonte, F., S. Blugeon, S. Chaillou, P. Langella & M. Zagorec, (2009) Behavior of the meat-borne bacterium *Lactobacillus sakei* during its transit through the gastrointestinal tracts of axenic and conventional mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4498-4505.

Cosgrove, K., G. Coutts, I. M. Jonsson, A. Tarkowski, J. F. Kokai-Kun, J. J. Mond & S. J. Foster, (2007) Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**: 1025-1035.

Dalet, K., E. Gouin, Y. Cenatiempo, P. Cossart & Y. Hechard, (1999) Characterisation of a new operon encoding a Zur-like protein and an associated ABC zinc permease in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**: 111-116.

de Lorenzo, V., S. Wee, M. Herrero & J. B. Neilands, (1987) Operator sequences of the Aerobactin operon of plasmid COLV-K30 binding the Ferric Uptake Regulation (Fur) repressor. *J. Bacteriol.* **169**: 2624-2630.

De Man, J. C., M. Rogosa & M. E. Sharpe, (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.

Diaz-Mireles, E., M. Wexler, J. D. Todd, D. Bellini, A. W. B. Johnston & R. G. Sawers, (2005) The manganese-responsive repressor Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a member of the Fur-superfamily that recognizes an unusual operator sequence. *Microbiology-Sgm* **151**: 4071-4078.

Dubrac, S. & D. Touati, (2002) Fur-mediated transcriptional and post-transcriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology-Sgm* **148**: 147-156.

Duhutrel, P., C. Bordat, T. D. Wu, M. Zagorec, J. L. Guerquin-Kern & M. C. Champomier Vergès, (2010) Iron sources used by the nonpathogenic lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* as revealed by electron energy loss spectroscopy and secondary-ion mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 560-565.

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

Fuangthong, M. & J. D. Helmann, (2003) Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**: 6348-6357.

Fuangthong, M., A. F. Herbig, N. Bsat & J. D. Helmann, (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis fur* and *perR* genes by PerR: Not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J. Bacteriol.* **184**: 3276-3286.

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

Gouet, P., E. Courcelle, D. I. Stuart & F. Metoz, (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305-308.

Guyard-Nicodeme, M., A. Bazire, G. Hemery, T. Meylheuc, D. Molle, N. Orange, L. Fito-Boncompte, M. Feuilloley, D. Haras, A. Dufour & S. Chevalier, (2008) Outer membrane modifications of *Pseudomonas fluorescens* MF37 in response to hyperosmolarity. *J. Proteome Res.* **7**: 1218-1225.

Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Hanks, T. S., M. Y. Liu, M. J. McClure, M. Fukumura, A. Duffy & B. F. Lei, (2006) Differential regulation of iron- and manganese-specific MtsABC and heme-specific HtsABC transporters by the metalloregulator MtsR of group A *Streptococcus*. *Infect. Immun.* **74**: 5132-5139.

Hantke, K., (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12 - isolation of a constitutive mutant. *Molecular & General Genetics* **182**: 288-292.

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

Hendricks, E. C., H. Szerlong, T. Hill & P. Kuempel, (2000) Cell division, guillotining of dimer chromosomes and SOS induction in resolution mutants (*dif, xerC and xerD*) of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **36**: 973-981.

Herbig, A. F. & J. D. Helmann, (2001) Roles of metal ions and hydrogen peroxide in modulating the interaction of the *Bacillus subtilis* PerR peroxide regulon repressor with operator DNA. *Mol. Microbiol.* **41**: 849-859.

Horsburgh, M. J., E. Ingham & S. J. Foster, (2001) In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J. Bacteriol.* **183**: 468-475.

Hsu, C. A., R. C. Yu & C. C. Chou, (2005) Production of beta-galactosidase by bifidobacteria as influenced by various culture conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **104**: 197-206.

Ibrahim, S. A., A. Y. Alazzeh, S. S. Awaisheh, D. F. Song, A. Shahbazi & A. A. AbuGhazaleh, (2010) Enhancement of alpha- and beta-galactosidase activity in *Lactobacillus reuteri* by different metal ions. *Biol. Trace Elem. Res.* **136**: 106-116.

Jacquamet, L., D. A. K. Traore, J. L. Ferrer, O. Proux, D. Testemale, J. L. Hazemann, E. Nazarenko, A. El Ghazouani, C. Caux-Thang, V. Duarte & J. M. Latour, (2009) Structural characterization of the active form of PerR: insights into the metal-induced activation of PerR and Fur proteins for DNA binding. *Mol. Microbiol.* **73**: 20-31.

Jakubovics, N. S. & R. A. Valentine, (2009) A new direction for manganese homeostasis in bacteria: identification of a novel efflux system in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **72**: 1-4.

Janulczyk, R., S. Ricci & L. Bjorck, (2003) MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **71**: 2656-2664.

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

Jittawuttipoka, T., R. Sallabhan, P. Vattanaviboon, M. Fuangthong & S. Mongkolsuk, (2010) Mutations of ferric uptake regulator (*fur*) impair iron homeostasis, growth, oxidative stress survival, and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Arch. Microbiol.* **192**: 331-339.

Kennedy, S. P., F. Chevalier & F. X. Barre, (2008) Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **68**: 1018-1028.

Kibbe, W. A., (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**: W43-W46.

Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson & D. G. Higgins, (2007) Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

Lauret, R., F. Morel-Deville, F. Berthier, M. C. Champomier Vergès, P. Postma, S. D. Ehrlich & M. Zagorec, (1996) Carbohydrate utilization in *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1922-1927.

Ledala, N., M. Sengupta, A. Muthaiyan, B. J. Wilkinson & R. K. Jayaswal, (2010) Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* to iron limitation and *fur* mutation. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 406-416.

Lee, J. W. & J. D. Helmann, (2007) Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**: 485-499.

Leloup, L., S. D. Ehrlich, M. Zagorec & F. MorelDeville, (1997) Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2117-2123.

Létoffé, S., G. Heuck, P. Delepelaire, N. Lange & C. Wandersman, (2009) Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 11719-11724.

Ma, Z., F. E. Jacobsen & D. P. Giedroc, (2009) Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem. Rev.* **109**: 4644-4681.

Maret, W., (2010) Metalloproteomics, metalloproteomes, and the annotation of metalloproteins. *Metallomics* **2**: 117-125.

Massé, E. & S. Gottesman, (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 4620-4625.

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

Nagy, Z., T. Kiss, A. Szentirmai & S. Biro, (2001) beta-galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, purification, and characterization of the enzyme. *Protein Expr. Purif.* **21**: 24-29.

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

Padilla, D., F. Real, V. Gomez, E. Sierra, B. Acosta, S. Deniz & F. Acosta, (2005) Virulence factors and pathogenicity of *Hafnia alvei* for gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Dis.* **28**: 411-417.

Pecqueur, L., B. D'Autreaux, J. Dupuy, Y. Nicolet, L. Jacquamet, B. Brutscher, I. Michaud-Soret & B. Bersch, (2006) Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and x-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **281**: 21286-21295.

Pohl, E., J. C. Haller, A. Mijovilovich, W. Meyer-Klaucke, E. Garman & M. L. Vasil, (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* **47**: 903-915.

Rea, R., C. Hill & C. G. M. Gahan, (2005) *Listeria monocytogenes* PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8314-8322.

Rea, R. B., C. G. M. Gahan & C. Hill, (2004) Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. *Infect. Immun.* **72**: 717-727.

Rozen, S. & H. Skaletsky, (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **132**: 365-386.

Schmitt, M. P., (1997) Transcription of the *Corynebacterium diphtheriae hmuO* gene is regulated by iron and heme. *Infect. Immun.* **65**: 4634-4641.

Sheikh, M. A. & G. L. Taylor, (2009) Crystal structure of the *Vibrio cholerae* ferric uptake regulator (Fur) reveals insights into metal co-ordination. *Mol. Microbiol.* **72**: 1208-1220.

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

Thomas-Chollier, M., O. Sand, J. V. Turatsinze, R. Janky, M. Defrance, E. Vervisch, S. Brohee & J. van Helden, (2008) RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **36**: W119-W127.

Torres, V. J., A. S. Attia, W. J. Mason, M. I. Hood, B. D. Corbin, F. C. Beasley, K. L. Anderson, D. L. Stauff, W. H. McDonald, L. J. Zimmerman, D. B. Friedman, D. E. Heinrichs, P. M. Dunman & E. P. Skaar, (2010) *Staphylococcus aureus* Fur regulates the expression of virulence factors that contribute to the pathogenesis of pneumonia. *Infect. Immun.* **78**: 1618-1628.

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

van Helden, J., (2003) Regulatory Sequence Analysis Tools. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3593-3596.

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe & F. Speleman, (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**.

Verneuil, N., A. Rince, M. Sanguinetti, B. Posteraro, G. Fadda, Y. Auffray, A. Hartke & J. C. Giard, (2005) Contribution of a PerR-like regulator to the oxidative-stress response and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Microbiology-Sgm* **151**: 3997-4004.

Xiong, A. M., V. K. Singh, G. Cabrera & R. K. Jayaswal, (2000) Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, Fur, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology-Sgm* **146**: 659-668.

4.3 Chapitre 3 : L'hème et le fer induisent des réponses différentes

4.3.1 Contexte et objectifs

L. sakei est une bactérie lactique naturellement présente dans la viande et capable d'utiliser les sources de fer présentes dans son environnement. Nous avons montré que l'utilisation de composés héminiques et de la transferrine mène à une augmentation de la survie en phase stationnaire. Nous savons aussi que *L. sakei* possède une catalase hème dépendante. Il était cohérent de penser que cette activité était responsable de la survie en présence d'hème. Toutefois la survie en présence de transferrine s'explique plus difficilement. L'objectif de cette étude est d'obtenir une vue globale des modifications qu'entrainent la présence des différentes sources de fer sur le transcriptome et le protéome de *L. sakei* et ainsi de définir les acteurs de ce phénotype de survie.

4.3.2 Méthodologie

L'effet global de l'hème et de la transferrine a été évalué grâce à une approche transcriptomique en microarray. Des lames représentant l'ensemble du génome de la souche 23K ont été utilisées et ont été hybridées avec des ADNc issus d'ARN totaux extraits de cellules cultivées en MCD avec ou sans addition d'hème ou de transferrine. Une approche protéomique a également été réalisée par électrophorèse à 2 dimensions (2DE) pour obtenir le profil des protéines exprimées en présence ou absence d'hème.

Le gène *katA* a été délété conduisant à la souche RV4053 et nous avons comparé avec la souche sauvage, sa capacité à accumuler le fer, à résister au péroxyde d'hydrogène et à survivre en présence d'hème.

4.3.3 Résultats principaux

Alors que *L. sakei* détoxyfie le péroxyde d'hydrogène grace à une catalase hème-dépendante, un utilisateur important d'hème, cette enzyme n'est en fait pas le facteur majeur de la survie en présence d'hème. Nous montrons ici que l'activité catalase dans la souche sauvage est déjà maximale à 5 µM d'hème alors que la survie atteint son maximum à 40 µM et au-delà. L'inactivation de la catalase entraine bien une sensibilité accrue au péroxyde d'hydrogène mais n'altère pas la survie de la bactérie en présence d'hème.

La présence d’hème dans le milieu de culture ne modifie que très peu la transcription des gènes par rapport à un milieu sans fer ajouté. Nous avons cependant noté que ce sont principalement des gènes codant pour des protéines de stress qui sont réprimés en présence d’hème ce qui semble indiquer que l’hème a un effet protecteur.

L’additionde transferrine dans le milieu entraine plus de modifications d’expression de gènes que l’addition d’hème. En présence de transferrine, on note ainsi l’induction de gènes de stress par rapport à une condition sans apport de fer. Ceci indique que le fer représente une condition plus stressante que l’hème.

4.3.4 **Publication 3 :** Heme and iron trigger different response in *Lactobacillus sakei*

Heme and transferrin trigger different responses in the non pathogenic Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei*

Philippe Duhutrel[(1,2)] Fabienne Baraige [(1,2)], Christian Bordat [(3)], Stéphane Chaillou [(1,2)], Monique Zagorec [(1 2)], and Marie-Christine Champomier Vergès [(1 2)*].

1) INRA, UMR 1319 MICALIS, Equipe Flore Lactique et Ecosystème Carné, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy en Josas, France.

2) AgroParisTech, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy en Josas, France.

3) Unité Nurélice, UR909 INRA, Domaine de Vilvert, F-78350 Jouy en Josas, France.

*Corresponding author: marie-christine.champomier-verges@jouy.inra.fr

Abstract

Lactobacillus sakei is a meat borne lactic acid bacterium for which iron utilization has recently been evidenced. It has been shown that addition, in the culture medium, of iron sources naturally occurring in meat such as heme, myoglobin, hemoglobin or transferrin, led to intra cellular iron accumulation and sustained an enhanced survival of bacterial cells. *L. sakei* is devoided of any respiratory machinery, is unable to synthesize the porphyrin ring and possesses a heme-dependent catalase, encoded by the *katA* gene. We thus aimed at understanding the mechanisms underlying its exemplary survival in the presence of iron and heme sources. Here, we show that catalase activity is already maximal for cells grown with 5 µM heme, whereas survival becomes maximal with 40 µM. A Δ*katA* strain is not affected in its survival, indicating that the catalase activity is not responsible for the survival in the presence of heme. Global transcriptomic and proteomic approaches revealed that transferrin and heme trigger different responses in *L. sakei* cells and do not lead to major cellular modifications. Heme appears to protect cells whereas transferrin is more stressful. Our data suggest that it could exist both an iron and a heme effect and that heme could serve as an iron source for *L. sakei* cells.

INTRODUCTION

Lactic acid bacteria are ancient bacteria known as fermentative organisms which are widely used in food processes due to their fermentation capacities. Up to recently, these organisms were also known as an exception in the living world as they were considered to be one of the rare bacterial groups devoided of iron requirements (Bruyneel *et al.*, 1989, Weinberg, 1997). The last decade has modified our knowledge on this bacterial group through physiological experiments and whole genome sequence data. First, the *Lactococcus lactis* species revealed to be able to undergo respiration in the presence of heme. Under respiration conditions, a significant biomass gain and an enhanced resistance to oxidative and acid stresses were observed (Duwat *et al.*, 2001, Gaudu *et al.*, 2002, Rezaiki *et al.*, 2004). In *Lactobacillus plantarum* WCFS1, activation of the aerobic electron transport chain leads to a significant increase in biomass formation under low-oxygen conditions, in non-pH-controlled batch cultures (Brooijmans *et al.*, 2009b) which appears similar to the observations made in *L. lactis* (Pedersen *et al.*, 2008, Brooijmans *et al.*, 2009a). These species harbor genes encoding respiratory cytochromes (*cydAB*). Such genes have later been found in several LAB genomes (Brooijmans *et al.*, 2009a). Recently, it was shown that respiration, stimulated by heme and menaquinones, could be considered as a normal trait for several species and genera of lactic acid bacteria including *L. plantarum, Lactobacillus rhamnosus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus paralimentarius, Streptococcus entericus, L. lactis* and *Lactococcus garviae* (Brooijmans *et al.*, 2009a, Lechardeur *et al.*, 2011). In *L. lactis*, growth in the presence of heme results in the modification of expression of 21 proteins mainly involved in carbon and nitrogen metabolism, illustrating a deep modification in cell metabolism (Vido *et al.*, 2004). In the same species, only 11 genes showed a significant different expression during respiration compared to aerobiosis (Pedersen *et al.*, 2008). Strikingly, genes encoding respiratory cytochromes (*cydAB*) did not show any difference in expression whatever cells were grown under respiratory or fermentative conditions. This indicates that cells are ready to

undergo respiratory process once heme is provided. In this species, comparison between static and aerobic conditions has revealed that heme, but not respiration, leads to induction of *ygfCBA* operon encoding a heme exporter (Pedersen *et al.*, 2008, Lechardeur *et al.*, 2011). Deletion of this operon results to an enhanced heme sensitivity in *L. lactis* (Pedersen *et al.*, 2008). This illustrates a real heme toxicity and necessity for the bacteria to regulate availability of this molecule. In *Streptococcus agalactiae*, a *cydA* mutant is unable to undergo respiration, is impaired in blood survival and is less virulent (Yamamoto *et al.*, 2005). Besides this evidenced and well documented role of heme in LAB, iron *per se* is still considered to be dispensable for these species and heme is considered as a porphyrin source rather than an iron source. A transcriptomic analysis in *Streptococcus thermophilus,* when co-cultivated with *Lactobacillus delbrueckii,* revealed modified expression of genes potentially involved in iron metabolism such as *dpr, feo* or *fatABC* (Herve-Jimenez *et al.*, 2009). Authors hypothesize that *S. thermophilus* modifies its iron homeostasis to limit oxidative stress caused by H_2O_2 produced by *L. delbrueckii* (Herve-Jimenez *et al.*, 2009). This modification of iron metabolism in *S. thermophilus,* in the presence of *L. delbrueckii*, has been later confirmed (Sieuwerts *et al.*, 2010). This suggests that under defined conditions, iron metabolism could be an important adaptation factor for LAB species too.

Lactobacillus sakei is one of the most important inhabitants of meat and fermented meat-products. These habitats represent a selective ecosystem for resident bacteria. Meat contains few peptides and amino acids directly assimilable by bacteria and is poor in glucose. Meat products are also iron and lactate rich and have an acidic pH close to 5.4. *L. sakei* lacks classical respiratory cytochromes and is devoided of heme biosynthesis machinery (Chaillou *et al.*, 2005) but a heme-dependent catalase had previously been reported (Knauf *et al.*, 1992, Hertel *et al.*, 1998). The *L. sakei* strain 23K genome shows the presence of a putative b5 and a mutated P450 cytochrome gene (Chaillou *et al.*, 2005), this latter gene being intact in some other *L. sakei* strains (Chaillou *et al.*, 2009). Attempts to provide a respiration status in this

species by supplementation of heme and menaquinones were unsuccessful and the species stands for an exception in the LAB group with *L. delbrueckii* (Brooijmans *et al.*, 2009a) or *S. thermophilus*. The genome sequence of the *L. sakei* 23K strain has also revealed some specific features that could account for its adaptation to meat. This includes several putative iron transport systems and three iron-dependent transcriptional regulators belonging to the Fur family (Chaillou *et al.*, 2005). This equipment indicates that iron and/or heme are important elements for *L. sakei* adaptation to meat. We have recently shown that *L. sakei* is able to accumulate iron into its cytoplasm when grown in the presence of heme, myoglobin, hemoglobin or transferrin. This iron accumulation is associated with a longer cell survival during stationary phase (Duhutrel *et al.*, 2010). A positive effect of a non heminic iron source supplementation on survival of a LAB species is up to date unique. Here, we aimed thus at analyzing the responses triggered by heminic or non-heminic iron on *L. sakei* cells and at investigating the status of heme as porphyrin or iron supplier in this fermentative species.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterial strains and growth conditions: *L. sakei* 23K (Chaillou *et al.*, 2005) was propagated on MRS medium at 30°C (De Man *et al.*, 1960). For physiological studies the chemically defined medium CDM (Lauret *et al.*, 1996) supplemented with 0.5% (wt/vol) glucose was used. CDM medium contains no iron sources but contains possible traces of iron coming from various components or distilled water. Incubation was performed at 30°C with stirring at 70 rpm. *E. coli* strains were grown at 37°C under aerobiosis in Luria Bertani broth (LB). *L. sakei* cell growth and viability were followed by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600}) on a visible spectrophotometer (Secoman) and by the determination of the number of colonies ($cfu.ml^{-1}$) after plating serial dilutions of samples on MRS agar. Plates were incubated under aerobiosis at 30°C for 30 h. All the measurements were performed in at

least three independent assays. When needed, media were supplemented with freshly prepared filtered solutions to obtain final concentrations of 1, 5, 20, 40, 80 or 120 µM hematin (Sigma-Aldrich), 5 µM bovine or human holo-transferrin (Sigma-Aldrich). Ampicillin (100 $\mu g.ml^{-1}$) was used for the selection of *E. coli* strains. Erythromycin (5 $\mu g.ml^{-1}$) was used for the selection of *L. sakei* strains. Serial dilutions were done in Dilution Medium [Bacto Beef extract (5 $g.l^{-1}$, BD) and Universal Peptone M66 (15 $g.l^{-1}$, Merck)].

Construction of *lsa*0171 (*kat*A) and *lsa1194-1195* deletion mutants: To inactivate the *kat*A gene in *L. sakei* 23K by double cross-over recombination, we used the non replicating vector pRV300 (Leloup *et al.*, 1997). To delete 1308 bp in the gene *kat*A (*lsa*0171), two fragments flanking the target region were amplified by PCR. Upstream fragment was obtained using primers couple PHDU-kat1 and PHDU-kat2 (775 bp) whereas downstream fragment was obtained using PHDU-kat3 and PHDU-kat4 (775 bp). Fragments' joining was realized by PCR reaction using primers PHDU-kat1 and PHDU-kat4 leading to a 1537 bp amplicon encompassing a sequence complementarity of about 21 bp between upstream and downstream fragments. This *katA* exchange cassette was then cloned into the plasmid pRV300 (Leloup *et al.*, 1997) at KpnI and PstI sites to form plasmid pRV435 using *E. coli* DH5α for its multiplication. This plasmid was introduced into the *L. sakei* 23K strain by electroporation as described previously (Berthier *et al.*, 1996). Selection was done on erythromycin sensitivity and erythromycin sensitive candidates were screened using primers PHDU-kat1 and PHDU-kat4 to detect *kat*A deletion. The *kat*A deletion led to a 150 bp fragment compare to 1437 bp. In phase deletion were then confirmed by this last amplicon sequences (Eurofins-MWG). Strain deleted for *kat*A gene was named RV4053.

lsa1194-1195 genes were inactivated by a 1344 bp deletion using double cross-over strategy described above. Upstream and downstream fragments were obtained using primers couples PHDU-lsa1194F and PHDU-lsa1194R (939 bp) and PHDU-lsa1195F and PHDU-lsa1195R

(891 bp) respectively. They were joigned using primers PHDU-lsa1194F and PHDU-lsa1195R leading to a 1830 bp fragment which was cloned into plasmid pRV300 at KpnI and PstI sites to form plasmid pRV446. Second cross-over erythromycin sensitive candidates were screened using primers PHDU-lsa1194F and PHDU-lsa1195R to detect *lsa1194-1195* deletion which led to a 1809 bp fragment compare to 3152 bp for WT allele. Deletion was then confirmed by sequencing the concerned region and the *lsa1194-1195* mutant strain was named RV4069.

Catalase activity: It was determined as previously described (Duhutrel *et al.,* 2010). Results are expressed as micromoles H_2O_2 consumed per minute and per mg of proteins. Three independent assays were performed, and results are expressed as median ± standard deviation.

Peroxide stress challenge: Exponentially grown cultures (50 ml, $OD_{600} \approx 0.5$) were harvested by centrifugation combien and resuspended in 50 ml of fresh CDM medium containing hydrogen peroxide combien. These cultures were placed in a 30°C agitating incubator, and at the desired time point, samples were taken and rapidly diluted in Dilution Medium. Cell count was determined by plating 100 µl of appropriate serial dilutions on MRS agar and cells concentration were determined after 30 h incubation at 30°C.

Intra cellular iron mapping: It was determined by EELS analysis on cells grown 8h in CDM medium (Lauret *et al.,* 1996) suplemented with heme(5 or 40 µM) or not, as previously described (Duhutrel *et al.,* 2010).

Two-dimensional electrophoresis (2DE) conditions and mass spectrometry analysis: Experiments were realized as previously described (Sanchez *et al.,* 2005, Chiaramonte *et al.,* 2010). Briefly, 250 ml cultures grown to mid-exponential phase were centrifuged at 2,800 g at

4ºC and washed twice in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 for 15 min. Bacterial pellets were resuspended in 5 ml 1 M Tris-HCl buffer, pH 7.5 and broken by a unique pass through a Cell Disrupter (Basic Z, Constants Systems Ltd., Daventry, UK) at 2.5 kbar. Unbroken cells and cell debris were removed by a centrifugation step at 4,500 g for 15 min at 4ºC. Membrane vesicles were discarded from the solution by ultracentrifugation at 50,000 g for 30 min at 4ºC. The protein concentration was estimated using the Bradford method according to the manufacturer's instructions (Coomassie Protein Assay Reagent, Pierce Biotechnology, Rockford, IL). Two-dimensional electrophoresis was performed according to previously published method (Sanchez *et al.*, 2005). Briefly, 350 µg of proteins were focalized in 17 cm pH 4-7 IPG strips (BioRad, Hercules, CA, USA) and the Iso Electro Focalization (IEF) was performed at 300 V 1 h (exponential), 1500 V 1 h (exp), 10000 V 6 h (lineal) and 10000 V 2.5 h (exponential). The second dimension was performed in 12.5% polyacrylamide gels (20 x 20 x 0.1 cm) run overnight at 26 mA per plate at 4ºC. The gels were stained with BioSafe colloidal Coomassie blue (BioRad, Hercules, CA, USA) and scanned with ImageScanner (GE Healthcare). Image analysis was performed using Progenesis/SameSpots software (Nonlinear Dynamics). Comparative analyses were performed by analyzing gels from three independent experiments and, from each, at least 3 gels were performed. Normalized volumes of spots were established and only spots showing difference in intensity validated by statistical analysis (ANOVA) measured by statistical tools of the Samespots software were selected for identification by peptide mass fingerprinting.

Peptide mass fingerprinting and protein identification: Spots were analyzed as described by Sanchez et al (Sanchez *et al.*, 2005). The target spots were excised and in-gel digested overnight with 250 ng of trypsin (Promega, Madison, WI, USA). The mass of the peptides was determined by MALDI-TOF MS on a Voyager DE STR instrument (Applied Biosystems, Framingham, CA, USA) at the PAPSSO platform (INRA, Jouy en Josas, France). Internal

calibration was automatically performed with the autolytical fragments of trypsin. Proteins were identified using Mascot and MS-Fit by searching against the *L. sakei* 23K database (http://migale.jouy.inra.fr/sakei). Sequence coverage, scores of the search and agreement between theoretical and experimental molecular weight and isoelectric point were taken into account for considering identifications as positive.

Oligonucleotide probes design for microarrays: The appropriate design of oligonucleotide probes is essential to ensure successful transcriptional analyses. Probes were designed using Operon design platform (www.operon.com). The *L. sakei* Array Ready Oligo Set™ (AROS) was designed based on the genome annotations of *L. sakei* strain 23K and contains 2000 oligonucleotide probes (1850 specifics of *L. sakei* and 150 as controls). Oligonucleotide sequences were searched with no stable secondary structure and several optimal thermodynamic properties as defined by Operon proprietary platform with principal criteria were as follow: length of 70 bases, melting temperature of 73 ± 5°C. Probes specificity was checked against the database of *L. sakei* str. 23K genome, and also against the genome of four *Escherichia coli* strains (CFT073, K12, O157:H7, O157:H7_EDL933).

Microarray slides: The DNA chips were manufactured at the Biochips platform of Toulouse-Genopole (http://biopuce.insa-toulouse.fr/Maquette/en/). The spotting was performed on UltraGaps coated slides (Corning® Life Sciences) with the QArray mini (Genetix) apparatus. Each oligonucleotide was spotted in triplicate side by side. The pattern spotting slide is recorded in a specific folder .gal, according to Axon terminology. Each slide is orientated and identified by an individual barcode. After spotting, slides are cross-linked (UV Radiation dose 600 mJ/cm² of UV radiation on a CL-1000 Ultraviolet Crosslinker from UVP) and treated according to manufacturer's recommendations. As a quality control, hybridization of the Panomer™ 9 random oligodeoxynucleotide (Invitrogen) was performed, in order to check the

presence, the global intensity and the shape of the spots, as well as the background intensity. Spotting is considered as good with less than 5% of missing spots.

cDNA synthesis and labeling: Total RNA from pure cultures were reverse transcribed and labeled with either Cy5 dCTP or Cy3 dCTP (Amersham Biosciences) using the ChipShot™ Direct Labeling System (Promega, France) according to the manufacturer's instructions. Fluorescent-labeled cDNAs were synthetized from 5 µg of total RNA. Labeled cDNAs were purified using the ChipShot™ Clean-Up System (Promega, France) according to the manufacturer's instructions. Dye incorporation was quantified by optical density measurement on the nanodrop spectrophotometer (Labtech, France). 50 pmol of each dye from labeled cDNAs were dried in a speed-vacuum concentrator then resuspended in 20 µl of DNAse free water.

Hybridizations: Before hybridization step, microarray slides were pre-soaked and pre-hybridized according to the manufacturer's instructions (Promega, France). Hybridization was carried out automatically at the Biochips platform of Toulouse-Genopole. It was performed in an automatic hybridization chamber (Discovery, Ventana Medical system) where microarray slides were prehybridized with a solution of 2X SSC, 0.2% SDS, 1% BSA at 42°C for 30 min. Two hundred microliters of the hybridization solution, containing 20 µL of labeled cDNA (50 pmol of Cy3 and 50 pmol of Cy5) and 180 µL of hybridization buffer (Chyp Hyb buffer from Ventana Medical System) was added on the printed side of the slide. After 8 h of hybridization at 42°C, slides were washed following the manufacturer's recommendations (Corning).

Slide scanning and image analysis: After hybridization, microarray slides were scanned with a 2 laser scanner (GenePix 4000A Scanner-Axon Instruments) to detect the hybridization

signal emitted by each cDNA labelled dye, Cy3 and Cy5. The Photo-Multiplier Tubes (PMT) were adjusted, ranging from 580 to 600 for 532 nm wavelength and from 650 to 690 for 635 nm wavelength, depending on the slides, in order to overlay intensity curves of both wavelengths (red and green), and to avoid saturation. Obtained images were analyzed, spots delimitated and hybridization signals were quantified and transformed into numerical values by GenePixPro (Axon) software (version 3.01) according to developer's recommendations. Genes with less than three data points were considered unreliable and were excluded from further analysis.

Data Analysis: Numerical values were analyzed using the Biopuces platform analysis program Bioplot (http://biopuce.insa-toulouse.fr/). Data normalization was performed on median intensities by use of the quantile algorithm in membrane mode. No background subtraction was done as it was already treated during image analysis. Spots were selected with more than 50% pixels superior to the background. We chose to exclude normally expressed genes and conserved only statistical variation (expression threshold >1.5 and <0.66, p-value 0.1 based on ratio and Student's test).

Several controls were employed to minimize the technical and biological variations. To ensure the quality of the data, the following steps were performed: each ORF was present as 3 replicate on each array and slides were prepared in triplicate for each experiment as gene expression was represented by 9 data points.

Reverse transcription and real-time qPCR: Oligonucleotides for real-time qPCR (Suppl Tab. 1) were designed using Primer3 Web, version 0.4.0 (Rozen & Skaletsky, 2000). Secondary structures were controlled with Oligo Calc (Kibbe, 2007), and a BLAST analysis on *L. sakei* 23K genome was performed to check primer specificity.

Annealing of 1 µg of total RNA extracted from *L. sakei* pure culture with random hexamers

(Takara Bio Europe, Saint Germain en Laye, France) was performed at 10 min at 30°C after denaturation of RNA secondary structures (5 min 65°C). cDNA was synthesized by a 1-h reverse transcription at 42°C using 200 U PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio Europe, Saint Germain en Laye, France), RNAse Inhibitor and Ultra Pure dNTP (Ozyme France, Saint Quentin en Yvelines), followed by enzyme inactivation (15 min 70°C). The cDNA levels were then analyzed by quantitative PCR using an Eppendorf RealPlex2 (Eppendorf, LePecq, France).

Each sample was tested in triplicate in 96-well plate (Eppendorf, France). The reaction mixture (final volume 20 µl) consisted of 10 µl of MESA Green (MesaGreen qPCR MasterMix, Eurogentec), 0.4 µl of each primer (200 nM final), 4.2 µl of ultrapure H_2O, and 5 µl of a 1/100 dilution of cDNA (from *L. sakei* pure culture). The absence of genomic DNA in RNA samples was checked by classic 30 cycles PCR before cDNA synthesis (minus RT control).

A blank (no-template control or NTC) was incorporated in each assay. The thermocycling program consisted of one hold at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Melting curve data were then collected to check PCR specificity, contamination, and the absence of primer dimers. The PCR efficiency (E) of each primer pair was determined by the dilution series method using cDNA as a template. To minimize interrun variations, a calibrator sample was used to determine and fix the fluorescence threshold. The threshold cycle (Ct) values calculated by the RealPlex software were exported to Excel for the relative quantification analysis.

The Ct values of each sample were transformed as described in the freely distributed geNorm user manual into relative quantities (Q) with a reference (ref) sample and using the gene-specific PCR efficiency, calculated as follows: $Q = E^{(refCt - sampleCt)}$. Normalization was applied by dividing the relative quantities (Q) of genes of interest by the geometric mean of the relative quantities of selected reference genes (normalization factor [NF] calculated from

genes *lsa0604*, *lsa1606* and *lsa1775*). Standard deviation of the normalized expression was calculated as described in the geNorm user manual. The stability of mRNA expression of the potential reference genes was evaluated by using the geNorm VBA applet for Microsoft Excel (Vandesompele *et al.*, 2002). Gene expression stability measure (M) is calculated by the program for potential reference genes as the average pairwise variation for that gene with all other tested genes. Ideal reference genes are expected to have comparable expression ratio in all samples and experimental conditions. Candidate reference genes are ranked on the assumption that those with the lowest M value have the most stable expression. GeNorm's authors recommend the use of at least three stable internal control genes for calculation of the normalization factor (NF) and stepwise inclusion of more control genes until the $(n+1)^{th}$ gene has no significant contribution to the newly calculated normalization factor. Here, we tested potential reference genes but only three appear to be well adapted to our study condition.

RESULTS

Catalase activity is not the major actor of survival in the presence of heme. In order to investigate the link between heme-dependent catalase activity and survival in *L. sakei*, we grew bacterial cells under various heme concentrations and determined: *i*) iron accumulation in cell cytoplasm, *ii*) cell survival and *iii*) catalase activity. We also constructed a Δ*katA* strain, RV4053. As shown in Figure 1, increasing heme concentration leads to an increased cell survival during the stationary growth phase. This is correlated with an increased iron accumulation into the wild type cells, as revealed by EELS analysis on cells grown in 5 µM and 40 µM heme (Figure 2). This analysis reveals that there is more intracellular iron accumulated when cells are grown with 40 µM heme compared to 5 µM. These differences in iron cellular contents are correlated with bacterial survival. Increasing heme concentration over 40 µM and up to 120 µM did not result in enhanced survival which becomes maximal for 40 µM heme (Figure 1). Nonetheless, these elevated heme concentrations did not appear

to be toxic for *L. sakei* cells since no more morbidity was observed between 40 and 120 µM heme (Figure 1).

As shown in Figure 3, cells grown in the presence of 5 or 40 µM heme have measurable catalase activity. This catalase activity is already maximal in cells grown in the presence of 5 µM heme whereas survival becomes maximal at 40 µM heme. The maximal catalase activity is thus not correlated with the maximal survival rate. In order to confirm the role of this catalase activity in the *L. sakei* survival, we constructed a mutant in the *katA* gene. We first checked behavior of the Δ*katA* strain (RV4053) under peroxide stress conditions. We observed that in absence of peroxide stress, neither Δ*katA* nor wild type cells were affected in their survival (data not shown). As shown in Figure 4, the wild-type strain, grown in the presence of heme does not show any sensitivity to 25 mM hydrogen peroxide. On the other hand, under the same conditions, Δ*katA* exhibits a marked hydrogen peroxide sensitivity. A similar behavior of WT and Δ*kat*A strains was observed whatever the challenge was performed in the presence of heme or not (data not shown). These experiments confirm the involvement of heme dependent catalase in hydrogen peroxide resistance of *L. sakei* cells. We then checked the behavior of WT and Δ*katA* strains during growth and survival in the presence of heme 40 µM. As shown in Figure 5, in absence of heme, both WT and Δ*katA* exhibit the same survival phenotype. Strikingly, in presence of heme, Δ*katA* still exhibits the same survival as the WT. This indicates that catalase activity, through hydrogen peroxide detoxification, is not the main factor involved in survival in the presence of heme. Moreover, we did not notice any intracellular iron concentration modification between wild type and Δ*katA* (data not shown). This could indicate that heme could be an iron rather than a porphyrin supplier.

In order to investigate the possible different effects of heminic or non heminic iron on *L sakei*, we designed a comparative whole genome profile microarray based analysis to compare the genome-wide transcription profiles of three different *L. sakei* cultures: no iron, 40 µM heme

or 5 µM bovine transferrin. We chose 8 h culture, a time where iron accumulation in cells has been proven (Duhutrel *et al.*, 2010) and where cell viability is identical under the three conditions. Microarray experiments were independently repeated three times, which represents three cultures from each condition leading to a set of nine slides. We chose to constitute a pool of all RNAs as the reference reverse transcribed and labeled with Cy5 dye (red). Pure and specific RNAs from each condition were reverse transcribed and simultaneously labeled with Cy3 dye (green). We performed three differential analyses *i*) heme *versus* no iron, *ii*) transferrin *versus* no iron and *iii*) heme *versus* transferrin. We retained only genes with at least a statistical 1.5-fold expression change and with a pvalue under 0.1. Validation of microarray analyses was conducted by qRT-PCR on genes being up-, down-, or unregulated. For all genes, microarrays and qRT-PCR gave the same result within more important variation with qRT-PCR. The qRT-PCR results validate the results of the array platform. The results of microarrays are presented in Table 2 with validation data in brackets and we present below the major results.

Heme does not lead to major cellular (transcriptional and proteomic) modifications: Regarding growth in CDM medium as a control, the addition of heme 40 µM leads to the transcriptional modification of only 8 genes, 6 genes being over expressed and 2 under expressed. Among genes over expressed, 3 of them *lsa0065*, *lsa0559* and *lsa1194* encode for membrane proteins. LSA0065 and LSA0559 are proteins of unknown function. LSA1194 is a membrane protein which shows specific hits with CCC1 and nodulin 21 protein family. The CCC1 family is related to yeast vacuole transmembrane proteins that can function as an iron or manganese transporter [Conserved Domain Database at NCBI (Marchler-Bauer *et al.*, 2009)]. We have previously shown that this *lsa1194* gene was regulated by PerR transcriptional regulator in *L. sakei* (Duhutrel, manuscript in preparation). *lsa0943* encodes a cardiolipin synthetase, an enzyme implicated in the biosynthesis of membrane lipids (de

Andrade Rosa *et al.*, 2008). Gene *lsa1511* encodes for a polysaccharide biosynthetase, an enzyme important for biosynthesis polysaccharides which represent a major component of bacterial cell surfaces (Woodward *et al.*, 2010). *lsa1679* encodes a putative a RNA methyltransferase, an enzyme implicated in RNA translation. Only two genes are under expressed in the presence of heme: *lsa1355* and *lsa0413*. *lsa1355* shows the most important transcription variation (x0.31) and encodes a glucosamine 6P synthetase, implicated in the synthesis of lipopolysaccharides, teichoic acids and peptidoglycan precursors (Milewski, 2002). *lsa0413* (x 0.5) encodes a 25 amino-acid hypothetical peptide of unknown function. Interestingly, we did not observe any modification in expression of the heme dependent catalase gene (*katA*).

Using two-dimensional electrophoresis (2DE), we also compared protein patterns of cells grown in absence or presence of heme 40 µM (Table 3). This reveals that only six proteins were differentially expressed when cells were grown in the presence of heme, all being under expressed (Table 3). LSA0148 is a putative DNA modification ATPase belonging to the DndD family (Zhou *et al.*, 2005). LSA0363 (MutL) is a DNA mismatch repair (MMR) protein conserved among bacteria (Busch & DiRuggiero, 2010). MutL is known to interact with MutS and MutH (Ban & Yang, 1998, Chen *et al.*, 2010). Defects in MMR can lead to genetic instabilty. Three tRNA synthetases, LSA0377 (queuine ribosyl transferase), LSA0387 (alanine tRNA), LSA0849 (valine tRNA synthetase) have also less expression in the presence of heme. LSA1670 is an adenine deaminase, an enzyme catalyzing the conversion of adenine to hypoxanthine and ammonia and which could be implicated in the synthesis of guanine nucleotides (Kamat *et al.*, 2011).

In conclusion, in the presence of heme, we observed few modifications at transcriptomic and proteomic level. Globally we observed diminution of transcription and expression of stress proteins, diminution of tRNA synthases and induction of putative transport systems. This indicates that heme represents a stressless environment and that the translation machinery is

affected. The gene encoding the known heme user, catalase KatA, is not differentially transcribed in response to the presence of heme. We could also identify on 2DE gel, a spot corresponding to KatA which did not show any variation of expression whatever the presence of heme (data not shown). All together, these results indicate that *L sakei* cells are adapted to the presence of heme. The presence of heme could thus be considered as the reference lifestyle for *L. sakei*. It should be rather considered that lack of heme represent a restriction for cells.

Transferrin induces stress response in *L. sakei*: As shown in Table 2, transferrin induces more differences in the global transcriptional profile than heme does. Fifteen genes are differentially expressed in the transferrin condition (pvalue < 0.1), 6 being overexpressed, and 9 being under expressed. We note an elevated transcription for 5 genes encoding stress proteins: *lsa0050* (encoding Hsp20), *lsa0207-lsa0208* (encoding ClpL and a hypothetical membrane protein), *lsa1236* (encoding DnaK) and *lsa1040* (encoding ClpB). We also observed overexpresion of the *lsa1194*, coding for a putative membrane protein transporter. As mentionned above, this gene is also overexpressed in the presence of heme. Among genes which are underexpressed in the presence of transferrin, we observed the repression of 4 genes *lsa0813, lsa0815, lsa0819, lsa0823* belonging to the *lsa 0813-0825* operon. This operon encompasses genes encoding fatty acid biosynthesis (*fab/acc* genes). The underexpressed gene *lsa0413* encodes a hypothetical peptide also shown to be underexpressed in the presence of heme. Genes *lsa1355* (encoding a glucosamine 6P synthase) and *lsa1497* (encoding a gln/glu ABC transporter membrane subunit) are also underexpressed. Gene *lsa1355* was also underexpressed by the presence of heme. Gene *lsa1678* encodes an unknown protein with predicted RNA binding domain.

In conclusion, transferrin leads to more transcriptional modifications than observed with heme (*ie* 15 versus 8). Strikingly, non heminic iron seems to represent a more stressful condition for

bacterial cells than heme as genes encoding stress proteins have elevated transcription after growth in the presence of iron. Whereas heme seems to protect cells, iron (transferrin) leads to overexpression of stress protein encoding genes. Nonetheless, this iron supplementation can enhance cell survival. It is thus likely that even part of heme incorporated into *L. sakei* cells could be used as iron source, most is used as porphyrin.

A comparison between transcriptional profiles obtained on heme or transferrin confirms that transferrin supplementation represents a stressful environment compared to heme supplementation. Indeed, as shown in Table 2, if heme is chosen as reference, *L. sakei* cells grown in the presence of transferrin exhibit even more differences than when compared to iron restricted conditions (CDM). We can observe the overexpression of *lsa0359* (encoding GroEL), *lsa1237* (encoding GrpE), *lsa1238* (encoding HrcA), *lsa1779* (encoding ClpC), all being stress proteins. These proteins did not appear to be differentially expressed when comparing transferrin conditions to CDM.

This comparison shows the duality between transferrin and heme supply in the culture medium. Whereas both lead to enhanced survival, only three genes appear to respond similarly to both conditions: *lsa1194*, *lsa0413* and *lsa1355*.

Gene *lsa1194* encoding a putative iron transporter is overexpressed by both heminic and non heminic iron.

As we observed a high induction of gene *lsa1194*, we hypothesized that the transport system encoded by *lsa1194-1195* could be involved in heme transport. We thus constructed a strain deleted in this operon, RV4069. We noticed a slight survival defect of this strain compared to the WT when grown with 40 µM heme (Figure 6). This strain showed the same growth than the WT but population decreased faster than the WT. We checked for a potential heme toxicity on this RV4069 strain but we did not notice any growth inhibition on agar plates using heme solution of 1 and 10 mM (data not shown).

Discussion

We have previously shown that heme or transferrin addition leads to an enhanced survival in *L. sakei* (Duhutrel *et al.*, 2010). *L. sakei* is a LAB which possesses a heme dependent catalase (KatA) but is unable to synthetise the porphyrin ring. This species is also devoid of respiratory cytochromes (*cydAB* genes) and thus unable to undergo respiration. Most LAB are devoided of heme dependent catalase (An *et al.*, 2010) but can use heme for respiration (Brooijmans *et al.*, 2009a). *L. plantarum* possesses a catalase and is also able to respire (Brooijmans *et al.*, 2009b). *L. sakei* appears thus to be singular by its ability to use heme and iron to enhance its survival. Here we show that survival of *L. sakei* in the presence of heminic iron is not linked with its heme dependent catalase activity. We observed that increasing the heme concentration from 5 to 40 µM is correlated with an increased intra cellular iron accumulation and an increased survival. However, catalase activity is already maximal at 5 µM heme and is not higher with 40 µM heme. On the other hand, survival is maximal with heme 40 µM and is not enhanced by increasing heme concentration up to 120 µM. Interestingly, such elevated heme concentrations did not appear to be toxic for *L. sakei* cells. We also looked for a possible toxicity using 10 mM heme solution on agar plates but we could not evidence any growth inhibition (data not shown). In *L. lactis*, the tolerance to heme was reported to be around 100 µM (Pedersen *et al.*, 2008) whereas it was around 10-15 µM for species as *S. aureus* (Stauff *et al.*, 2008) and *Corynebacterium diphteriae* (Bibb & Schmitt, 2010). This lack of heme toxicity in *L. sakei* shows that this meat borne species is highly adapted to the presence of elevated heme concentrations in its natural environment.

We show that the Δ*katA* strain is severely impaired in hydrogen peroxide stress resistance but still exhibits a prolounged survival in presence of heme. This clearly indicates that catalase, as a major heme user, is not the main factor of the survival in the presence of heme. However, the presence in *L. sakei* of other heme proteins cannot be excluded. In *S. agalactiae*, an

alkylhydroperoxide reductase (AhpC) has been shown to be able to bind heme with consequent involvement in its intra cellular fate (Fernandez *et al.*, 2010). The *ahpC* mutant revealed to be impaired in respiration. In *S. aureus katA* and *ahpC* have been shown to be regulated by the PerR transcriptional regulator and to have compensatory roles. In fact, an *ahpC* mutation led to increased resistance to H_2O_2 due to overexpression of *katA* (Cosgrove *et al.*, 2007). In *L. sakei*, we identified an AhpC homolog, sharing 39% identity with the *S. agalactiae* protein. We also showed that neither *ahpC*, nor *katA* were under the control of PerR (Duhutrel *et al*, manuscript in preparation). We show here that a *katA* strain is severely impaired in peroxide resistance. It seems thus that AhpC might not be deeply involved in peroxide stress resistance and even it could also be in *L. sakei* an enzyme implicated in heme storage. Regarding non heminic iron, we also tested different tranferrin concentrations, but maximal survival was obtained with 5 µM. Comparing intra cellular iron contents of cells grown in the presence of 5 µM transferrin or 5 µM heme led to similar iron mapping (data not shown). Impossibility to enhance survival by increasing transferrin concentration may results from less efficient transport systems for transferrin than for heme. It also could be attributed to different mechanisms between heme- and iron-promoted survivals.

Here we show by a global transcriptomic approach, this duality between heminic and non heminic iron sources. Our analysis reveals that only three genes have the same expression modification pattern under the two iron supplying conditions. Whatever the iron source tested, *L. sakei* cells modify only slightly their transcriptional profiles. It could be compared to the modifications generated in *L. lactis* by heme where cytochrome encoding genes are not differentially transcribed in response to this stimulus (Pedersen *et al.*, 2008). In *L. sakei*, the *katA* gene is not affected by heme and is constitutively expressed. These observations indicate that cells are ready to use heme.

Our results indicate that heme protects cells whereas transferrin represents a more stressful condition for *L. sakei* cells. Generally heme is considered as molecule with potential toxic

effects. Interestingly, in *L. lactis*, heme, but not aerobiosis strongly induces an operon encoding for a heme exporter protein, *ygfBA.* In *L. sakei*, both non heminic (transferrin) and heminic iron lead to overexpression of a membrane protein encoding gene (*lsa1194*) with similarity with iron and manganese transporter. The LSA1194 protein shows no or few similarities with the export system HrtAB described in *S. aureus* (Stauff *et al.*, 2008) or with the YgfBA in *L. lactis* (Pedersen *et al.*, 2008). However, this overexpression in presence of heminic and non heminic iron strongly suggests that this protein is implicated in heme and iron homeostasis in *L. sakei*. The Δ*lsa1194-1195* strain is affected in long term survival in the presence of heme, indicating the involvement of this transport system in the observed phenotype. In conclusion, this work clearly shows that heminic and non heminic iron are both involved in *L.sakei* survival although this gets through different mechanisms that remain to be elucidated.

Table 1: Strains, plasmids and oligonucleotides used in this study

Strain/Plasmid	**Characteristics**	**Reference**
Strains		
E. coli DH5α		(Hanahan, 1983)
L. sakei 23K	Sequenced strain	(Chaillou *et al.*, 2005)
RV4053	23K derivative, Δ*kat*A	This study
RV4069	23K derivative, Δ*lsa1194-1195*	This study
Plasmids		
pRV300	Non replicative cloning vector, Ery^R, Amp^R	(Leloup *et al.*, 1997)
pRV435	pRV300 derivative, exchange cassette for *katA*	This study
pRV446	pRV300 derivative, exchange cassette for *lsa1194-1195*	This study
Oligonucleotides	**Sequence (5'-3')**	
702F	AATTGCCTTCTTCCGTGTA	
310R	AGTTGCGCACAATTATTTTC	
RP	GGAAACAGCTATGACCA	
PU	GTAAAACGACGGCCAGT	
PHDU-kat1	GCATGGTACCCTGTCACCGAAGCTGTTG	
PHDU-kat2	GATTGACTAGTTGCAGCGTACGGATCCAGAATACGGTCGAC	
PHDU-kat3	CGTACGCTGCAACTAGTCAATCGCAGTTTGTGAATGTTGATTGT	
PHDU-kat4	ATGCCTGCAGCTAGTAACGCCAAACTGAAC	
PHDU-lsa1194F	CGATGGTACCGCAAATTCACCAATCTTATAATG	
PHDU-lsa1194R	GATTGACTAGTTGCAGCGTACGCGCATGACGTTAATTTTTTG	
PHDU-lsa1195F	CGTACGCTGCAACTAGTCAATCCACCATGGCTATTCACTAC	
PHDU-lsa1195R	ATGCCTGCAGGCCACCAGTCATTCTAAGT	

Table 2: Genes differentially expressed in different iron conditions.

Locus tag and Functional categor	Predicted function (protein)	Expression Ratio[a]		
		Tsf/Ctrl	Heme/Ctrl	Tsf/Heme
Adaptation to atypical conditions				
lsa0050	Small Hsp20	+1.82**	-	+2.58**
lsa0207	ClpL ATPase	+2.35**	-	+2.58**
lsa0208	Hypothetical membrane protein	+2.44**	-	+3.63**
lsa0359	GroEL chaperone	-	-	+1.88**
lsa1040	ClpB ATPase with chaperone activity	+1.68*	-	+1.73*
lsa1236	DnaK (Hsp70)	+1.64**	-	+2.11**
lsa1237	GrpE co chaperone	-	-	+1.61**
lsa1238	hrcA Transcriptional regulator of HSP	-	-	+1.61**
lsa1779	ClpC (ATPase)	-	-	+1.72**
Transport				
lsa0065	Hypothetical membrane protein	-	+1.5**	-
lsa0559	Hypothetical membrane protein	-	+1.7**	-
lsa0616	Glycine Betaine ABC transporter ATPase	-	-	+1.51**
lsa1194	Hypothetical membrane protein	+2.79**(7.6)	+2.86*(8.2)	-(1.27)
lsa1496	ATPase Gln/Glu ABC transporter	0.63*	-	-
lsa1497	Mb spanning Gln/Glu ABC transporter	0.63*(0.34)	-	0.65**
lsa1876	Hypothetical membrane protein	-	-	0.66*
Lipid biosynthesis				
lsa0150	Acetyl Esterase	-	-	+1.88**
lsa0813	FabH	0.66*	-	0.63**
lsa0814	Acyl Carrier protein	-	-	0.63**
lsa0815	FabD	0.63**(0.26)	-(0.83)	0.625**(0.34)
lsa0819	FabZ	0.64**	-	0.58**
lsa0823	FabI	0.57**(0.29)	-(0.79)	0.53**(0.37)
lsa0943	Cardiolipin synthetase	-	+ 1.56**	-

Transcription and translation				
lsa0769	Tyrosyl tRNA synthase	-	-	1.54**
lsa1066	Ribosomal protein S15 (RpsO)	-	-	0.64**
lsa1670	Adenine deaminase	-	-	0.61**
lsa1678	Unknown protein (RNA binding domain)	0.58*	-	-
lsa1679	Putative t- or rRNA methyltransferase	-	1.52**	0.64**
16S		1.82*	-	-
Membrane and cell wall biosynthesis				
lsa1355	Glucosamine 6P synthase	0.45**(0.32)	0.31**(0.23)	-(1.35)
lsa1511	Putative polysaccharide biosynthetase	-	1.66**	-
Lactate metabolism				
lsa0666	Lactate Oxidase (C fragment)	-	-	1.75**
lsa0785	Lactate racemase	-	-	0.66**
Unknown function				
lsa0413	Hypothetical protein	0.63**(0.81)	0.5**(0.64)	-(0.86)
lsa0790	Hypothetical protein ATPase	-	-	0.65**
lsa1301	Hypothetical protein	-	-	0.66**
lsa1466	Hypothetical protein	-	-	1.66**

a: numbers in the fold value column are ratios of expression in the *L. sakei* 23K strain. Control (Ctrl): no iron source, Heme 40 µM and Transferrin (Tsf) 5 µM. Data are statistically validated with a p value < 0,05 ** or <0.1 *, no false discovery rate. -, no change or no data available. Data in brackets are relative expression obtained for validation by qRT-PCR.

Table 3: Proteins differentially expressed in the presence of 40 µM heme.

Locus tag and functional category	**Function**	**Fold value[a]**
Adapataion to atypical conditions		
LSA0148	Putative DNA repair ATPase	0.3**
LSA0363	mutL (DNA mismatch repair protein)	0.4**
LSA1670	Adenine deaminase	0.6**
Transcription / translation		
LSA0377	tgt (Queuine tRNA-ribosyltransferase)	0.4**
LSA0387	alaS (Alanyl-tRNA synthetase)	0.6**
LSA0849	valS (Valyl-tRNA synthetase)	0.6**

a: ratio of protein expression. heme condition/ control. Data are statistically validated with a p value < 0.05 ** according to ANOVA analysis.

Legends to figures

Figure 1: Effects of heme concentration on long term survival of *L. sakei* cells. Heme concentrations: 1 µM (Full rhombus), 5 µM (Full squares), 40 µM (Open squares, dotted line), 80 µM (Full circles) and 120 µM (Open circles).

Figure 2: Iron mapping of *L. sakei* cells cultivated in CDM medium supplemented with heme A) 40 µM and B) 5 µM. ESI images obtained using EFTEM (cell scale). A filtered image at 250 eV (leading to inverted contrast) allows the morphology to be observed. The iron map, in red, is superimposed on the 250 eV image.

Figure 3: Catalase activity of *L. sakei* cells grown in CDM medium at various heme concentrations. Catalase activity is expressed as micromoles H_2O_2 consumed per minute and per mg protein.

Figure 4: Response of wild-type (squares and plain line), and *katA* mutant (circles and dotted line) to peroxide challenge as defined in material and methods. Control (open symbols), 25 mM H_2O_2 (full symbols).

Figure 5: Growth and survival of *L. sakei* cells, WT (squares) and Δ*katA* (circles, dotted line), grown without (open symbols) or with 40 µM heme (full symbols).

Figure 6: Growth and survival of *L. sakei* cells, WT (squares) and Δ*lsa1194-1195* (circles, dotted line) grown with 40 µM heme.

Figure 1:

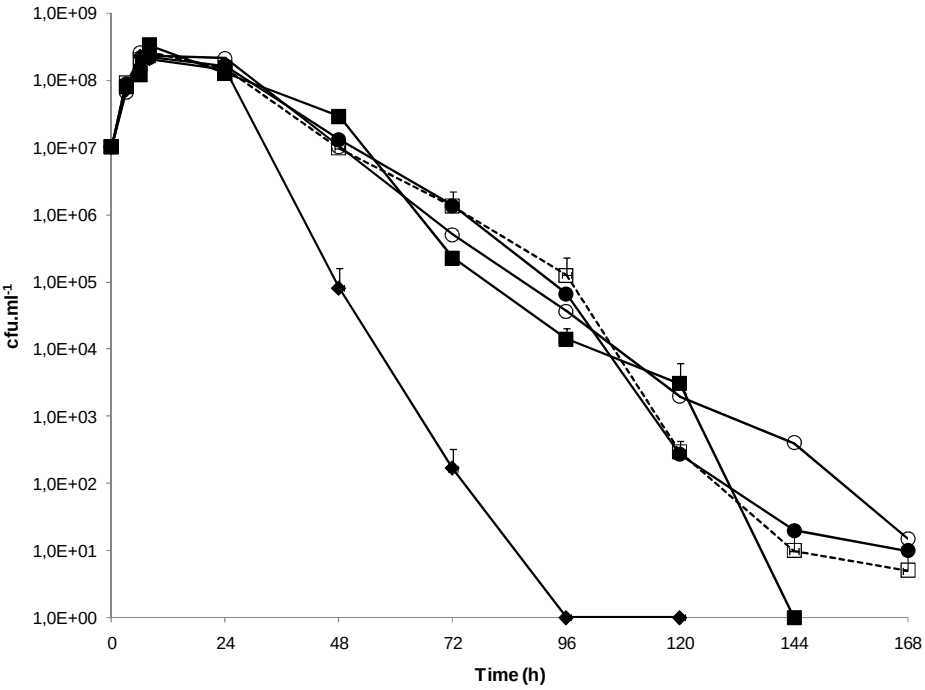


Figure 2:

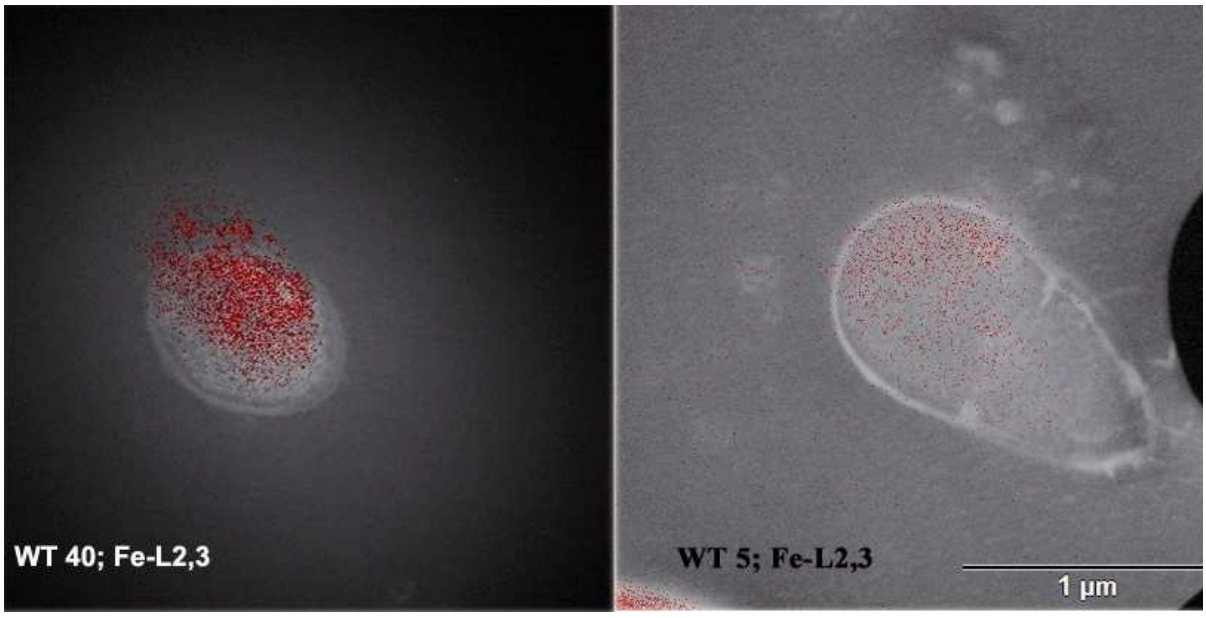


Figure 3:

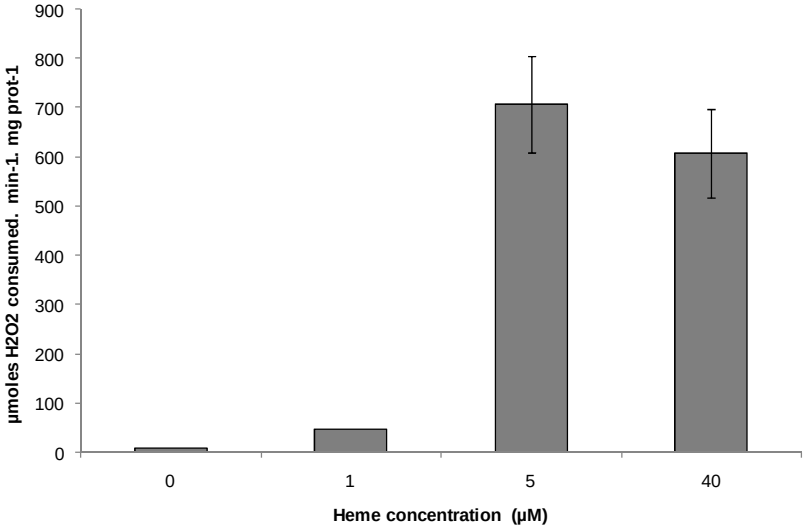


Figure 4:

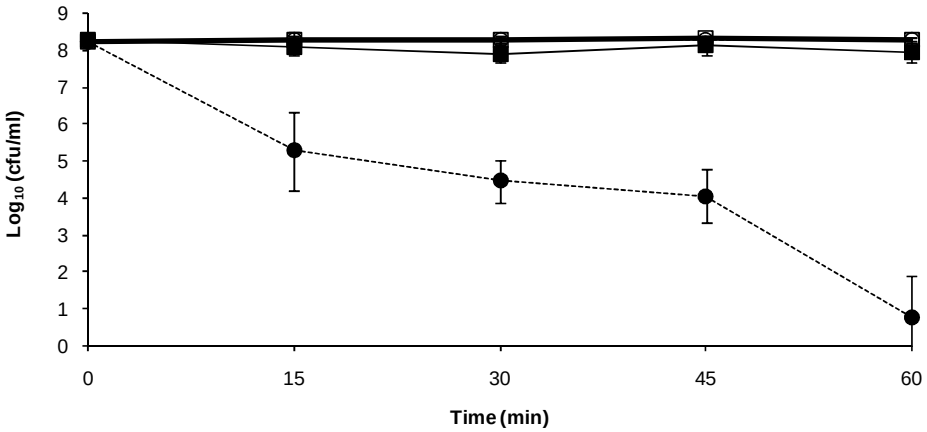


Figure 5:

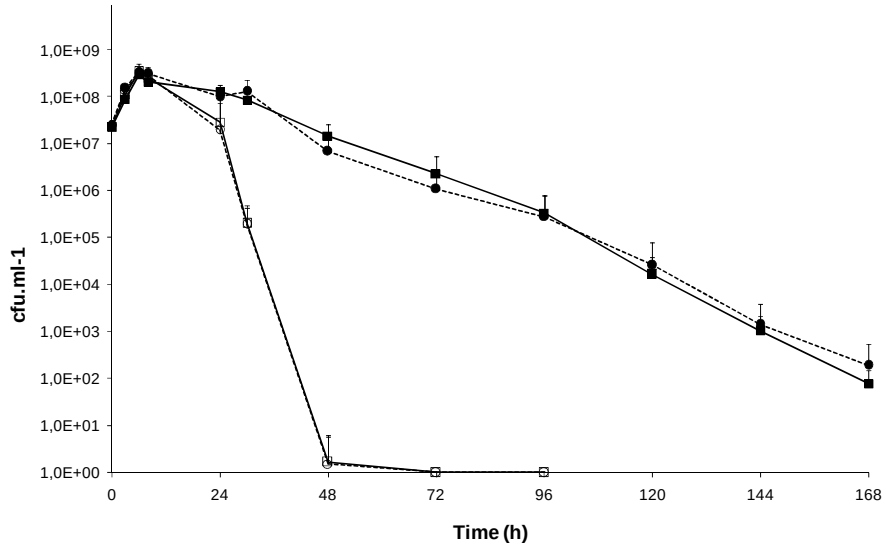
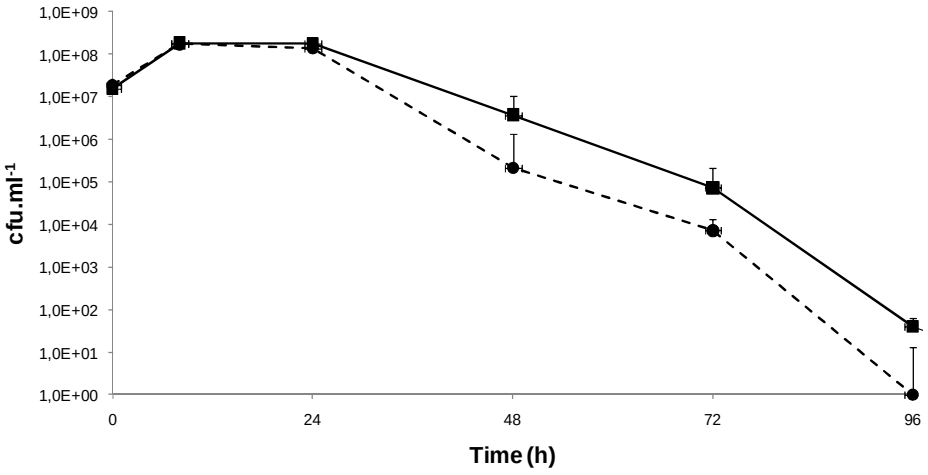


Figure 6:



REFERENCES

An, H., H. Zhou, Y. Huang, G. Wang, C. Luan, J. Mou, Y. Luo & Y. Hao, (2010) High-level expression of heme-dependent catalase gene *katA* from *Lactobacillus sakei* Protects *Lactobacillus rhamnosus* from oxidative stress. *Mol. Biotechnol.* **45**: 155-160.

Ban, C. & W. Yang, (1998) Crystal structure and ATPase activity of MutL: Implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* **95**: 541-552.

Berthier, F., M. Zagorec, M. C. Champomier Vergès, S. D. Ehrlich & F. MorelDeville, (1996) Efficient transformation of *Lactobacillus sakei* by electroporation. *Microbiology* **142**: 1273-1279.

Bibb, L. A. & M. P. Schmitt, (2010) The ABC transporter HrtAB confers resistance to hemin toxicity and is regulated in a hemin-dependent manner by the ChrAS two-component system in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **192**: 4606-4617.

Brooijmans, R., B. Smit, F. Santos, J. van Riel, W. M. de Vos & J. Hugenholtz, (2009a) Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* **8**.

Brooijmans, R. J. W., W. M. de Vos & J. Hugenholtz, (2009b) *Lactobacillus plantarum* WCFS1 electron transport chains. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 3580-3585.

Bruyneel, B., M. Vandewoestyne & W. Verstraete, (1989) Lactic Acid Bacteria - Microorganisms able to grow in the absence of available iron and copper. *Biotechnol. Lett.* **11**: 401-406.

Busch, C. R. & J. DiRuggiero, (2010) MutS and MutL are dispensable for maintenance of the genomic mutation rate in the halophilic archaeon *Halobacterium salinarum* NRC-1. *PLoS One* **5**.

Chaillou, S., M. C. Champomier Vergès, M. Cornet, A. M. Crutz-Le Coq, A. M. Dudez, V. Martin, S. Beaufils, E. Darbon-Rongère, R. Bossy, V. Loux & M. Zagorec, (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1527-1533.

Chaillou, S., M. Daty, F. Baraige, A. M. Dudez, P. Anglade, R. Jones, C. A. Alpert, M. C. Champomier Vergès & M. Zagorec, (2009) Intraspecies genomic diversity and natural population structure of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 970-980.

Chen, F., W. Q. Liu, Z. H. Liu, Q. H. Zou, Y. Wang, Y. G. Li, J. Zhou, A. Eisenstark, R. N. Johnston, G. R. Liu, B. F. Yang & S. L. Liu, (2010) *mutL* as a genetic switch of bacterial mutability: turned on or off through repeat copy number changes. *FEMS Microbiol. Lett.* **312**: 126-132.

Chiaramonte, F., P. Anglade, F. Baraige, J. J. Gratadoux, P. Langella, M. C. Champomier-Verges & M. Zagorec, (2010) Analysis of *Lactobacillus sakei* mutants selected after adaptation to the gastrointestinal tracts of axenic mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 2932-2939.

Cosgrove, K., G. Coutts, I. M. Jonsson, A. Tarkowski, J. F. Kokai-Kun, J. J. Mond & S. J. Foster, (2007) Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**: 1025-1035.

de Andrade Rosa, I., M. Einicker-Lamas, R. R. Bernardo & M. Benchimol, (2008) Cardiolipin, a lipid found in mitochondria, hydrogenosomes and bacteria was not detected in Giardia lamblia. *Exp. Parasitol.* **120**: 215-220.

De Man, J. C., M. Rogosa & M. E. Sharpe, (1960) A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* **23**: 130-135.

Duhutrel, P., Baraige, F. , C., Chaillou, S., Zagorec, M., Champomier Vergès, M.-C., (20XX) Characterization of the three Fur paralogs in the Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Manuscript in preparation*.

Duhutrel, P., C. Bordat, T. D. Wu, M. Zagorec, J. L. Guerquin-Kern & M. C. Champomier Vergès, (2010) Iron sources used by the nonpathogenic lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* as revealed by electron energy loss spectroscopy and secondary-ion mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 560-565.

Duwat, P., S. Sourice, B. Cesselin, G. Lamberet, K. Vido, P. Gaudu, Y. Le Loir, F. Violet, P. Loubière & A. Gruss, (2001) Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J. Bacteriol.* **183**: 4509-4516.

Fernandez, A., D. Lechardeur, A. Derre-Bobillot, E. Couve, P. Gaudu & A. Gruss, (2010) Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.* **6**.

Gaudu, P., K. Vido, W. Cesselin, S. Kulakauskas, J. Tremblay, L. Rezaiki, G. Lamberet, S. Sourice, P. Duwat & A. Gruss, (2002) Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **82**: 263-269.

Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Hertel, C., G. Schmidt, M. Fischer, K. Oellers & W. P. Hammes, (1998) Oxygen-dependent regulation of the expression of the catalase gene *katA* of *Lactobacillus sakei* LTH677. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1359-1365.

Herve-Jimenez, L., I. Guillouard, E. Guedon, S. Boudebbouze, P. Hols, V. Monnet, E. Maguin & F. Rul, (2009) Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus* cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 2062-2073.

Kamat, S. S., A. Bagaria, D. Kumaran, G. P. Holmes-Hampton, H. Fan, A. Sali, J. M. Sauder, S. K. Burley, P. A. Lindahl, S. Swaminathan & F. M. Raushel, (2011) Catalytic mechanism and three-dimensional structure of adenine deaminase. *Biochemistry*.

Kibbe, W. A., (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* **35**: W43-W46.

Knauf, H. J., R. F. Vogel & W. P. Hammes, (1992) Cloning, sequence, and phenotypic-expression of *katA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sakei* LTH677. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 832-839.

Lauret, R., F. Morel-Deville, F. Berthier, M. C. Champomier Vergès, P. Postma, S. D. Ehrlich & M. Zagorec, (1996) Carbohydrate utilization in *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1922-1927.

Lechardeur, D., B. Cesselin, A. Fernandez, G. Lamberet, C. Garrigues, M. Pedersen, P. Gaudu & A. Gruss, (2011) Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **In Press**.

Leloup, L., S. D. Ehrlich, M. Zagorec & F. MorelDeville, (1997) Single-crossover integration in the *Lactobacillus sake* chromosome and insertional inactivation of the *ptsI* and *lacL* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2117-2123.

Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, J. S. Song, A. Tasneem, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang & S. H. Bryant, (2009) CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res.* **37**: D205-D210.

Milewski, S., (2002) Glucosamine-6-phosphate synthase-the multi-facets enzyme. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1597**: 173-192.

Pedersen, M. B., C. Garrigues, K. Tuphile, C. Brun, K. Vido, M. Bennedsen, H. Mollgaard, P. Gaudu & A. Gruss, (2008) Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: Identification of a heme-responsive operon. *J. Bacteriol.* **190**: 4903-4911.

Rezaiki, L., B. Cesselin, Y. Yamamoto, K. Vido, E. van West, P. Gaudu & A. Gruss, (2004) Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long-term survival of *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **53**: 1331-1342.

Rozen, S. & H. Skaletsky, (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **132**: 365-386.

Sanchez, B., M. C. Champomier-Verges, P. Anglade, F. Baraige, C. G. D. Reyes-Gavilan, A. Margolles & M. Zagorec, (2005) Proteomic analysis of global changes in protein expression during bile salt exposure of *Bifidobacterium longum* NCIMB 8809. *J. Bacteriol.* **187**: 5799-5808.

Sieuwerts, S., D. Molenaar, S. van Hijum, M. Beerthuyzen, M. J. A. Stevens, P. W. M. Janssen, C. J. Ingham, F. A. M. de Bok, W. M. de Vos & J. Vlieg, (2010) Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 7775-7784.

Stauff, D. L., D. Bagaley, V. J. Torres, R. Joyce, K. L. Anderson, L. Kuechenmeister, P. M. Dunman & E. P. Skaar, (2008) *Staphylococcus aureus* HrtA is an ATPase required for protection against heme toxicity and prevention of a transcriptional heme stress response. *J. Bacteriol.* **190**: 3588-3596.

Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe & F. Speleman, (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**.

Vido, K., D. le Bars, M. Y. Mistou, P. Anglade, A. Gruss & P. Gaudu, (2004) Proteome analyses of heme-dependent respiration in *Lactococcus lactis*: involvement of the proteolytic system. *J. Bacteriol.* **186**: 1648-1657.

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

Woodward, R., W. Yi, L. Li, G. H. Zhao, H. Eguchi, P. R. Sridhar, H. J. Guo, J. K. Song, E. Motari, L. Cai, P. Kelleher, X. W. Liu, W. Q. Han, W. P. Zhang, Y. Ding, M. Li & P. G. Wang, (2010) *In vitro* bacterial polysaccharide biosynthesis: defining the functions of Wzy and Wzz. *Nat. Chem. Biol.* **6**: 418-423.

Yamamoto, Y., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Lamberet, A. Gruss & P. Gaudu, (2005) Respiration metabolism of Group B *Streptococcus* is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence. *Mol. Microbiol.* **56**: 525-534.

Zhou, X. F., X. Y. He, J. D. Liang, A. Y. Li, T. G. Xu, T. Kieser, J. D. Helmann & Z. X. Deng, (2005) A novel DNA modification by sulphur. *Mol. Microbiol.* **57**: 1428-1438.

4.4 Chapitre 4 : Transport du fer et de l'hème chez *L. sakei* 23K

4.4.1 Contexte et objectifs

Nous avons montré que *L. sakei* était capable d'internaliser le fer de sources présentes dans son environnement, transferrine, hème, myoglobine ou hémoglobine, ce qui conduisait à une augmentation de sa survie en phase stationnaire [(Duhutrel *et al.*, 2010), Résultats-chap 1]. Nous savons également que les transporteurs de fer et notamment de fer-complexé (par exemple à la transferrine) sont nombreux et pas toujours identifiables selon l'analyse structurale. Néanmoins, le génome de *L. sakei* 23K a révélé l'existence de plusieurs transporteurs potentiels. L'objectif de l'étude était donc de définir si ces transporteurs étaient impliqués dans le métabolisme du fer chez *L. sakei*.

4.4.2 Méthodologie

Les souches de *L. sakei* utilisées dans cette étude sont dérivées de la souche 23K (Chaillou *et al.*, 2005) et listées dans le tableau 1.

Tableau 1 : souches et plasmides utilisées dans cette étude

Souche/Plasmide	**Caractéristiques**	**Référence**
Strains		
E. coli DH5α		(Hanahan, 1983)
L. sakei 23K	Souche séquencée	(Chaillou *et al.*, 2005)
RV4054	Dérivée de 23K, Δ*fhu* (*lsa0399-0403*)	(Duhutrel, 20XX-b)
RV4056	Dérivée de 23K, Δ*lsa1836-1840*	Cette étude
RV4058	Dérivée de 23K, Δ*fhu*-Δ*lsa1836-1840*	Cette étude
RV4067	Dérivée de 23K, Δ*lsa1831*	Cette étude
RV4069	Dérivée de 23K, Δ*lsa1194-1195*	(Duhutrel, 20XX-a)

Le milieu utilisé est un milieu chimiquement défini MCD (Lauret *et al.*, 1996) dont nous pouvons contrôler la composition, notamment l'apport des sources de fer.

Nous avons construit des mutants dans les gènes codant pour les transporteurs potentiels que nous avions identifiés dans le génome. Nous avons ensuite chez ces mutants *i*) suivi la croissance et la survie en présence d'hème et de transferrine, *ii*) analysé par perte d'énergie le contenu en fer cellulaire et *iii*) dosé leur activité catalase.

4.4.3 Résultats

Identification des transporteurs

La recherche dans le génome de la souche *L. sakei* 23K de systèmes de transport du fer a conduit à l'identification de candidats potentiels (Tableau 2). Nous avons identifié 2 perméases à force proto motrice et 4 ABC transporteurs. Le système de type Fhu codé par les gènes *lsa0399-0402* présente ainsi une forte homologie avec le système HupCGD (*lmo2429-2431*) dont l'implication dans l'utilisation de l'hème a été démontrée chez *L. monocytogenes* Ce système présente des homologies avec le système Fhu qui lui permet l'import de la ferrioxamine chez cette espèce (Jin *et al.*, 2006). Chez *L. sakei*, les gènes *lsa0400-0402* semblent être en opéron avec le gène *lsa0403* codant pour une potentielle thioredoxine reductase. Ce système, décrit chez une espèce pouvant coloniser le même écosystème, serait un candidat de choix pour l'import de l'hème chez *L. sakei*.

Un autre système, codé par les gènes *lsa1836-1840*, a attiré notre attention car il présente de nombreuses similitudes avec les systèmes d'import de l'hème et du fer décrit chez les bactéries à Gram positif. La protéine LSA1840 est une protéine à motifs LPXTG, de faible homologie avec la protéine IsdA de *S. aureus* (< 25%). Le système Isd de *S. aureus* a été démontré comme étant impliqué dans le transport de l'hème (Skaar & Schneewind, 2004). Ainsi, LSA1840 pourrait être la protéine affine de surface pour l'hème, le fer ou la transferrine. La protéine LSA1837 est une ATPase qui pourrait fournir l'énergie au système. Quant aux protéines LSA1838, LSA1839 ce sont des protéines potentiellement impliquées dans le transport d'ions métalliques dont des homologues sont présents chez le pathogène *B. anthracis* (39 à 44% d'homologie). La protéine LSA1836 présente de 57 à 59% d'homologie avec des protéines potentielles de transport d'ions métalliques retrouvées chez *B. cereus* et *B. anthracis* et pourrait être la lipoprotéine affine du système.

Les deux autres ABC transporteurs appartiennent à la famille des MtsABC, systèmes impliqués dans le transport du manganèse. Ils sont codés par les gènes *lsa0180-0183* et *lsa0282-0284*.

Les perméases à force proto-motrice identifiées chez *L. sakei* appartiennent à la famille MntH, famille également impliquée dans l'utilisation du manganèse. Chez *L. lactis*,

une protéine MntH a été montrée impliquée dans l'accumulation de fer. Cette accumulation de fer chez *L. lactis* n'a pu être démontrée que par l'utilisation de fer marqué car physiologiquement, l'ajout ou la suppression de fer n'affecte pas la réponse cellulaire de cette espèce (Turner *et al.*, 2007).

Tableau 2 : Transporteurs de *L. sakei* affiliés au transport de fer ou d'hème

Système	Gènes	COG
Transporteurs à ATP Binding Cassette		
MtsABC (1)	*lsa0180*	COG1121, ATPase
	lsa0181	COG1108, sous unité membranaire
	lsa0182	COG0803, sous unité affine de transporteur ABC Zn^{2+}/Fe^{2+}
MtsABC (2)	*lsa0282*	COG0803, sous unité affine de transporteur ABC Zn^{2+}/Fe^{2+}
	lsa0283	COG1121, ATPase
	lsa0284	COG1108, sous unité membranaire
Fhu	*lsa0399*	COG0614, sous unité affine d'hydroxamates FeIII
	lsa0400	COG1120, ATPase de système de transport de sidérophores
	lsa0401	COG0609, perméase
	lsa0402	COG0609, perméase
LSA1836-1840	*lsa1836*	Sous unité membranaire, transport d'ions métalliques
	lsa1837	COG1123, ATPase
	lsa1838	COG619, perméase de système ABC
	lsa1839	Sous unité affine d'ABC transporteur
	lsa1840	Protéine de surface à motif LPQTG
Transporteurs à force protomotrice		
MntH1	*lsa0246*	COG1914, transporteur $Mn^{2+}/Zn^{2+}/Fe^{2+}$
MntH2	*lsa1699*	COG1914, transporteur $Mn^{2+}/Zn^{2+}/Fe^{2+}$

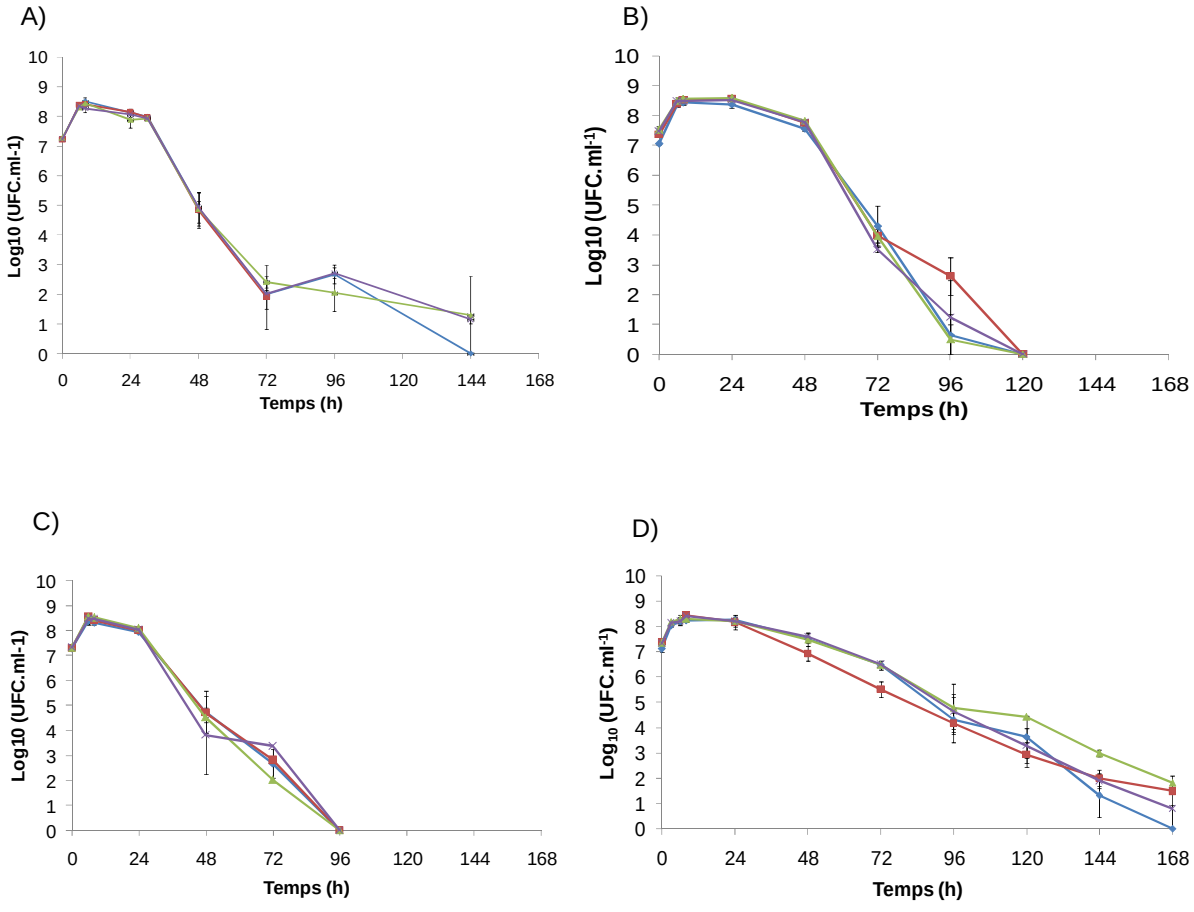
Nous avons choisi d'inactiver chez *L. sakei* les systèmes codés par les gènes *lsa0399-lsa0400-0402* ainsi que *lsa0403* conduisant à la souche RV4054 et les gènes *lsa1840-1836* conduisant à la souche RV4056. Un mutant double de ces systèmes a également été construit conduisant à la souche RV4058. Nous avons également choisi d'inactiver les protéines codées par les gènes *lsa1194-1195* pour obtenir la souche RV4069 comme nous l'avons décrit dans

le chapitre 3. Ces mutations ont été réalisées par recombinaison homologue telle qu'elle a été décrite dans le chapitre 2 des résultats de ce travail de thèse.

Analyse de la réponse physiologique des mutants de transporteurs

Nous avons démontré que l'accumulation de fer par *L. sakei*, à partir de la transferrine ou de sources héminiques, conduit chez cette espèce à une meilleure survie en phase stationnaire. Nous avons donc émis l'hypothèse que si l'un des systèmes inactivés était impliqué dans l'accumulation de fer chez *L. sakei*, la souche mutée dans ce système serait alors affectée dans sa survie. Nous avons donc vérifié la croissance et la survie de ces souches (RV4054, RV4056 et RV4058) en présence de 1, 5 ou 40 µM d'hème (Figure 17 A, C, D) ou de 5 µM de transferrine (Figure 17B).

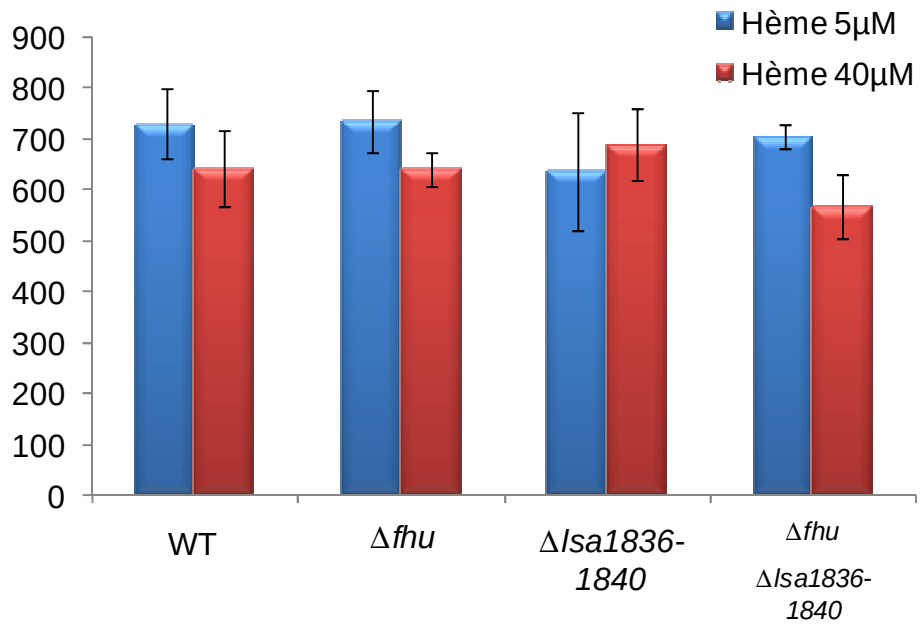
<u>Figure 17</u> : Effet de différentes sources A) Hème 5 µM, B) Transferrine 5 µM, C) Hème 1µM et D) Hème 40 µM, sur la croissance et la survie chez les différents mutants de transporteurs. Bleu (WT), Rouge (Δ*lsa0399-0403*), Vert (Δ*lsa1836-1840*) et Violet (Δ*lsa0399-0403*, Δ*lsa1836-1840*).



Ces observations montrent que quelle que soit la combinaison souche mutée / source de fer testée, aucune différence de survie significative n'est observée. Ceci montre donc que les deux systèmes inactivés, seuls ou simultanément, ne sont pas impliqués dans le phénotype de survie décrit chez *L. sakei* en présence d'hème ou de transferrine.

Nous savons que *L. sakei* possède une catalase dont l'activité est hème-dépendante. Nous avions émis l'hypothèse que si l'un des systèmes inactivés était impliqué dans l'import d'hème dans la cellule, une plus faible accumulation d'hème pourrait conduire à une plus faible activité catalase. Nous avons donc mesuré cette activité après culture à 5 ou 40 µM d'hème (Figure 18).

Figure 18 : Activité catalase des mutants de transporteurs



Aucune différence significative dans l'activité catalase n'est détectée à 5 ou 40 µM d'hème, que ce soit dans les simples ou dans le double mutant. Ceci nous montre que les systèmes ciblés ne sont pas impliqués dans l'import de l'hème dans nos conditions de laboratoire.

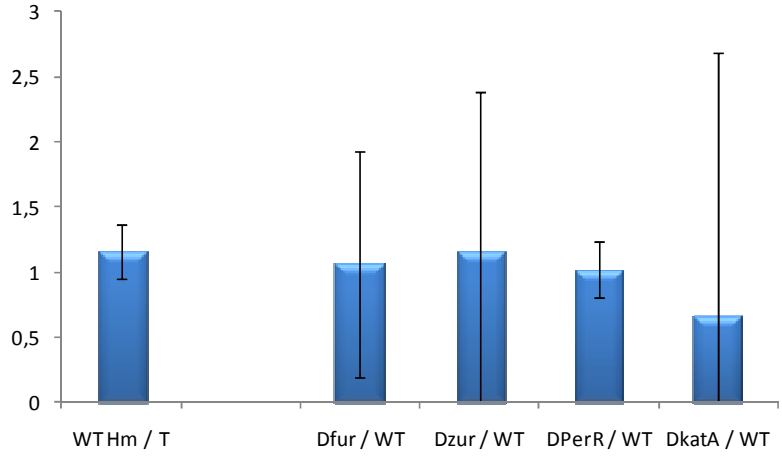
Recherche de systèmes d'export d'hème potentiels

L'hème étant une molécule toxique pour nombre de bactéries, son homéostasie doit être finement régulée. Pour assurer le maintien d'un taux satisfaisant, des bactéries comme *S. aureus* (Stauff *et al.*, 2008), *L. lactis* (Pedersen *et al.*, 2008) ou *S. agalactiae* (Fernandez *et*

al., 2010) possèdent des protéines impliquées dans l'export de l'excédent d'hème. Nous avons cherché dans le génome de *L. sakei* la présence de telles protéines. Les protéines LSA1366 et LSA1367 montrent respectivement des homologies avec les protéines YgfA (44% identité) et YgfB (26% identité) décrites chez *L. lactis* (Pedersen *et al.*, 2008). Ces protéines initialement décrites chez *S. aureus*, avec les protéines HrtA et HrtB (Stauff *et al.*, 2008), sont connues pour leur rôle dans l'efflux de l'hème, ce qui permet la détoxification de cette molécule. Chez *L. lactis*, les gènes *ygfA* et *ygfB*, homologues à *hrtAB*, sont fortement induits par la présence d'hème (Pedersen *et al.*, 2008).

Nous avons dans un premier temps contrôlé le niveau de transcription des gènes *lsa1366-1367* par qRT-PCR avec un couple d'amorces ciblant le gène *lsa1366*. Lorsque l'on compare la condition hème à la condition témoin, ce gène n'est ni induit ni réprimé dans la souche sauvage (Figure 19). Sa transcription n'est pas non plus modifiée par la délétion du gène *fur*, du gène *mur*, du gène *perR* ou du gène *katA* (Figure 19). Ce gène *lsa1366*, et par extrapolation l'opéron *lsa1366-1367*, n'est pas différentiellement transcrit en réponse à la présence d'hème et n'est pas non plus sous le contrôle d'un régulateur de transcription Fur-like.

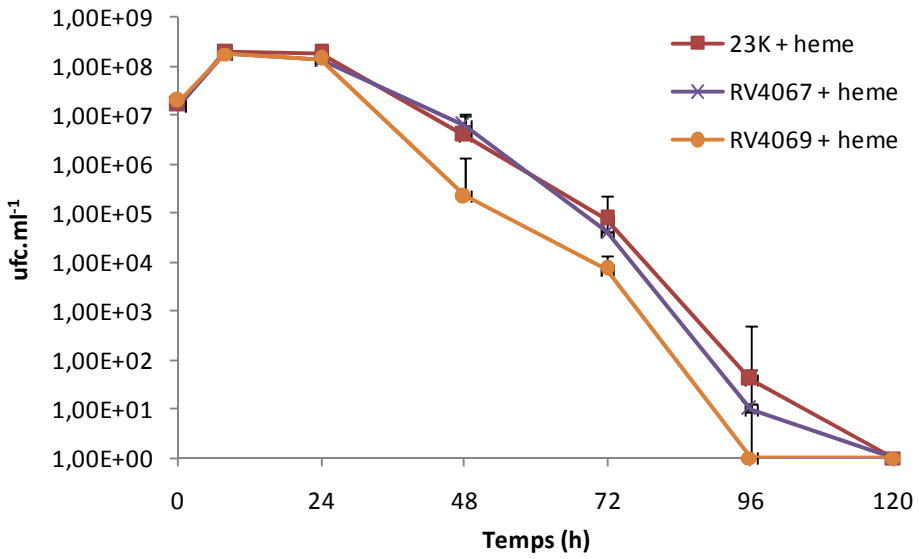
Figure 19 : Transcription relative de *lsa1366*



Chez *L. lactis* et *S. aureus*, des souches mutées dans les gènes *hrtAB* sont sensibles à la présence d'hème (Pedersen *et al.*, 2008, Stauff *et al.*, 2008). La mutation de leurs homologues chez *L. sakei*, gènes *lsa1366-1367*, pourrait entrainer une sensibilité à l'hème jusque là jamais observée dans cette espèce. Cependant, nous n'avons pu obtenir de mutant de ce gène chez *L. sakei*.

Chez *L. lactis*, ce système avait été détecté du fait de sa forte induction (>20 fois) par l'hème alors qu'un système pourtant homologue (YxeAB) n'y répondait pas (Pedersen *et al.*, 2008). De façon intéressante, notre approche globale de transcriptomique a révélé l'induction en présence d'hème et de transferrine du gène *lsa1194* appartenant à un opéron *lsa1194-1195* codant pour des protéines de membranaires peu définies. Le gène *lsa1194* a également été préalablement décrit sous le contrôle du régulateur PerR (Duhutrel, manuscript en préparation). Au vu de ces observations, ce système LSA1194-1195 semble impliqué dans le métabolisme du fer et de l'hème chez *L. sakei*. Nous avons réalisé la mutation de ce système dans la souche *L. sakei* 23K et obtenu la souche RV4069. Nous avons montré que cette souche survit moins bien que la souche sauvage (Figure 20). Ceci indique son implication dans le métabolisme de l'hème mais ce système et ses régulations doivent être caractérisés en profondeur pour préciser son rôle.

Figure 20 : Croissance et survie des mutants *lsa1831* (RV4067) et *lsa1194-1195* (RV4069)



Recherche d'une putative hème oxygénase

Chez *S. aureus* (Skaar *et al.*, 2004a), *E. coli* (Létoffé *et al.*, 2009) ou *C. diphteriae* (Schmitt, 1997), l'utilisation de l'hème comme seule source de fer nécessite la capacité par ces bactéries de récupérer le fer du noyau tétrapyrolle. Cette fonction est assurée par des enzymes de type hème oxygénases ou dyp-type péroxydases. Chez *L. sakei*, nous avons montré que l'utilisation de l'hème par la bactérie conduisait à une survie allongée. Nous avons également montré que la transferrine conduisait dans une moindre mesure à un

phénotype comparable. Ces observations suggèrent que l'hème pourrait être à la fois une source de porphyrine et une source de fer pour *L. sakei*.

Nous avons donc cherché dans le génome de la souche 23K, la présence d'une potentielle hème-oxygénase. Cette analyse a révélé que la protéine LSA1831, codant pour une Dyp-type peroxydase, possédait 33% d'identité avec la protéine YfeX décrite chez *E. coli* pour son activité d'extraction du fer de l'hème sans détruire le noyau tétrapyrolle (Létoffé *et al.*, 2009). Nous avions également montré que le gène *lsa1831* est sous le contrôle du régulateur PerR et se trouve induit en présence d'hème (Duhutrel, manuscript en péparation) ce qui est cohérent avec sa fonction supposée.

Nous avons construit un mutant de ce gène *lsa1831*, et obtenu la souche RV4067. L'inactivation des hème-oxygénases chez *S. aureus* (Skaar *et al.*, 2004a) et *C. diphteriae* (Schmitt, 1997) conduit à une moindre utilisation du fer de l'hème. Un tel défaut d'utilisation du fer de l'hème chez *L. sakei* pourrait conduire à une moindre survie en présence d'hème. Comme le montre la figure 20, la souche RV4067 n'est affectée ni dans sa croissance ni dans sa survie dans nos conditions de laboratoire.

4.4.4 Conclusions

Les systèmes que nous avions choisi de muter présentent de fortes similarités avec des systèmes décrits chez d'autres espèces où ils sont impliqués dans le transport du fer ou de l'hème. Dans la souche *L. sakei* 23K et dans nos conditions de laboratoire, ces systèmes ne semblent pas être impliqués dans le métabolisme du fer chez cette espèce.

.

5 DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Alors qu'elle colonise la viande, un milieu riche en fer, la bactérie lactique non pathogène *L. sakei* est considérée comme une bactérie n'ayant aucune exigence en fer (Weinberg, 1997, Pandey *et al.*, 1994). La séquence du génome de *L. sakei*, a cependant révélé de nombreux gènes en lien avec le métabolisme du fer (Chaillou *et al.*, 2005). Parmi les autres bactéries de l'écosystème carné, plusieurs sont connues pour leurs besoins en fer. C'est le cas de la bactérie d'altération *P. fragi* qui a un métabolisme du fer original puisqu'elle ne produit pas de sidérophores mais est capable d'utiliser ceux produits par les autres espèces de son environnement (Champomier Vergès *et al.*, 1996). Parmi les espèces pathogènes qui peuvent contaminer la viande, *L. monocytogenes* et *E. coli* sont elles aussi connues pour leurs exigences en fer, notamment lorsqu'elles infectent l'hôte. Le fait de limiter le développement de bactéries indésirables dans la viande en les privant de fer a été envisagé. Des travaux ont montré que l'addition de sidérophores dans la viande limite le développement de *P. fragi* (Champomier Vergès communication personnelle). Par ailleurs, aux Etats-Unis, la lactoferrine est utilisée pour décontaminer les carcasses afin de diminuer le taux de pathogènes comme *L. monocytogenes* ou *E. coli* O157 : H7 (Al-Nabulsi & Holley, 2007, del Olmo *et al.*, 2009).

Notre hypothèse est que l'utilisation du fer par *L. sakei* peut conduire à priver les autres bactéries de cette ressource et constitue un facteur de compétitivité de l'espèce dans l'écosystème. Le but de ce projet de thèse était donc de décrire ce métabolisme, jusque là non étudié chez cette espèce, afin de préciser la fonction de ses potentiels acteurs.

La méthodologie

Nous avons tout d'abord évalué la capacité de *L. sakei* à utiliser le fer de différente nature. Nous avons montré que *L. sakei* utilisait uniquement des sources de fer présentes dans son environnement carné et que cette ressource lui permettait d'allonger sa survie en phase stationnaire dans un milieu de laboratoire. Les sources de fer utilisées sont toujours sous forme complexée : transferrine, hème et hémoprotéines. Pour contrôler l'accumulation de fer dans les cellules de *L. sakei*, nous avons choisi de nous affranchir de l'utilisation de sources radioactives et avons développé une méthode d'analyse, jamais utilisée chez les bactéries jusque là, basée sur la mise en œuvre combinée de la microscopie électronique en perte d'énergie (EELS) et de la spectrométrie de masse à ionisation secondaire (Nano-SIMS). Cette

approche s'est avérée être un outil de choix. Elle nous a permis de montrer l'accumulation de fer dans les cellules, lorsqu'il est héminique ou issu de la transferrine.

Nous avons ensuite réalisé une approche fonctionnelle classique par mutagénèse. Disposant du génome de la souche *L. sakei* 23K (Chaillou *et al.*, 2005), il nous était possible de cibler nos travaux sur les acteurs les plus évidents du métabolisme du fer. Cette approche a été fructueuse pour une partie de notre travail, notamment la mutation de la catalase hème dépendante, des régulateurs de transcription de la famille Fur et nous a permis de préciser le rôle de ces acteurs. En revanche, la mutation des transporteurs cibles potentiels n'a pas permis de montrer leur implication dans le transport de l'hème.

Nous avons également mis en œuvre une approche globale complémentaire afin de définir d'autres cibles potentielles. Ceci a été réalisé par une approche de transcriptomique utilisant des lames de verre représentant le génome complet de la souche 23K. Nous avons ainsi analysé le profil d'expression des gènes en présence de deux sources différentes de fer : hème ou transferrine. Ceci nous a révélé un autre candidat possible pour le transport.

Une approche de mutagénèse aléatoire pourrait être une bonne option pour cribler des souches altérées dans le principal phénotype observé, à savoir, la survie en présence d'hème. Toutefois il n'y pas d'outils disponibles pour une telle approche chez *L. sakei*.

L. sakei accumule des sources de fer présentes dans son environnement

Afin d'évaluer le contenu en fer des cellules de *L. sakei* cultivées en présence de diverses sources de fer, nous avons développé une méthode d'analyse basée sur la microscopie électronique en perte d'énergie (EELS). A partir de la même préparation de cellules, nous avons couplé l'analyse par perte d'énergie, qui permet d'obtenir une cartographie fine du fer au niveau d'une cellule, à une analyse par nano-SIMS (spectrométrie de masse à ionisation secondaire) afin d'obtenir une vision au niveau de la population. Dans nos échantillons, à la différence de ce que l'on peut obtenir en utilisant une source radioactive, la quantification absolue n'est pas possible. Cependant, la combinaison des deux approches EELS et SIMS s'est révélée être un outil performant pour évaluer de façon relative le contenu en fer de populations cellulaires. Les procédures de préparation d'échantillons pour la microscopie électronique à transmission (TEM) passent habituellement, avant l'inclusion des échantillons dans une résine, par des étapes de fixation et de déshydratation en solutions de concentrations croissantes de solvants qui pourraient extraire les éléments solubles (Hayat, 2000). Nous avons donc choisi de fixer nos échantillons par une méthode physique, la cryofixation, pour ensuite déshydrater les échantillons par cryosubstitution avant l'inclusion dans la résine. La conservation des structures a été contrôlée par TEM non filtrée en énergie. Nous avons

ensuite détecté la présence de fer dans les cellules par TEM filtrée en énergie (EFTEM), confirmant l'intégrité cellulaire et la conservation des éléments. Les analyses par EFTEM ont été confirmées par Nano-SIMS dans les mêmes régions d'observation mais correspondant à de plus larges zones. De significatives différences ont été observées dans le contenu en fer de cellules cultivées en présence de diverses sources de fer. Les cellules cultivées en l'absence d'ajout de fer ne montrent aucun signal fer dans leur cytoplasme. Les cellules cultivées en présence de fer libre ou de sidérophores présentent un très faible signal, à la limite de la détection, dans leur cytoplasme alors que de larges amas extracellulaires, caractérisés par un fort signal peuvent parfois être détectés. En revanche, nous avons détecté un signal important dans le cytoplasme de cellules cultivées en présence de sources de fer héminique : myoglobine, hémoglobine et hème. Nous avons également observé un signal fer dans le cytoplasme de cellules cultivées en présence de transferrine bovine, mais ce signal est plus faible que celui observé avec les sources de fer héminique. Nos observations en EFTEM ont été vérifiées et validées en Nano-SIMS par la co-localisation des signaux Fe^{56} et CN (qui caractérise la structure cellulaire). Nous avons observé que le signal n'était pas homogène au sein de la population ce qui pourrait être du à différents statuts cellulaires. L'accumulation de fer dans le cytoplasme de *L. sakei* semble donc dépendre de la source de fer. L'utilisation de ce panel de sources de fer est bien en lien avec l'habitat de l'espèce. Si l'utilisation d'hème a été décrite chez des bactéries lactiques, pour assurer un métabolisme respiratoire (Pedersen *et al.*, 2008, Brooijmans *et al.*, 2009, Lechardeur *et al.*, 2011), celle de transferrine et donc du fer en soi n'avait pas été rapportée chez les lactobacilles.

L. sakei survit mieux en présence d'hème ou de transferrine

Nous avons tout d'abord confirmé que ni la suppression ni l'ajout de fer ne modifiait la croissance de *L. sakei* 23K comme cela avait été préalablement décrit pour de nombreuses bactéries lactiques (Weinberg, 1997). La seule inhibition de croissance observée était due à l'ajout du chélateur O-phénanthroline. Cependant cette inhibition ne pouvant être levée par l'ajout de fer, elle s'avérait due à une toxicité intrinsèque de la molécule qui avait été préalablement décrite (MacLeod, 1952). Ceci indique que ce métal n'est pas indispensable pour la croissance de *L. sakei* et qu'il ne favorise pas la formation de biomasse. Nous avons en revanche montré que l'apport de certaines sources de fer, héminique ou transferrine, est hautement favorable à la survie en phase stationnaire de *L. sakei*. En présence de 40 µM d'hème, l'espèce est capable de survivre jusqu'à 168 h et au delà. En présence de myoglobine ou d'hémoglobine, cet effet est moins prononcé, ce qui indique une plus faible accessibilité à l'hème à partir de ces composés. Ceci est à comparer avec la survie dans le milieu MCD où

les souches ne peuvent survivre plus de 48h. Nous avons montré que la survie est proportionnelle à la quantité d'hème présent dans le milieu entre 1 et 40 µM. Au-delà et jusqu'à 120 µM, nous n'observons plus d'effet positif mais pas non plus de toxicité. Ceci est un phénotype rare qu'il faut souligner car l'hème à forte concentration est généralement toxique et très délétère pour les cellules. Il apparaît donc que *L. sakei* est une espèce qui, de part son habitat, est habituée à la présence de fortes concentrations d'hème. Quand la transferrine bovine est ajoutée en tant que source de fer dans le milieu, un phénotype intermédiaire est observé. Cette source confère une survie supérieure à celle observée sans ajout de fer mais qui reste de moitié inférieure à celle en présence d'hème. Grâce à l'observation au microscope électronique à balayage, nous avons montré que seule la transferrine bovine et non la transferrine humaine se fixe aux cellules de *L. sakei*. Ceci est vrai aussi bien pour la forme apo que holo. Il semble donc que cette fixation de la transferrine ne soit pas liée à son chargement en fer mais soit par ailleurs hôte dépendante comme cela a été montré chez certaines bactéries comme *Neisseria* (Schryvers & Stojiljkovic, 1999, GrayOwen & Schryvers, 1996, Ling *et al.*, 2010). Il nous reste cependant à vérifier si en présence de transferrine humaine il n'y a pas d'accumulation de fer dans les cellules et donc si l'espèce n'a pas de survie améliorée.

Ceci montre clairement que les sources de fer présentes dans l'environnement naturel de *L. sakei* sont primordiales pour maintenir la bactérie dans son écosystème, auquel elle est remarquablement adaptée et ceci confirme la spécificité d'adaptation de *L. sakei* à l'environnement carné.

Activité catalase et survie en présence d'hème

L'augmentation de la survie en présence d'hème a été récemment décrite chez plusieurs espèces de bactéries lactiques. Elle est due à leur capacité à respirer lorsque de l'hème, en complément ou non de ménaquinones, est fourni aux cellules (Brooijmans *et al.*, 2009). La respiration relève principalement de l'activité de cytochromes codés par les gènes *cydABCD*. Chez *L. sakei*, la situation est différente puisqu'il n'y a pas de gènes de cytochromes et il a été impossible de promouvoir le phénomène de respiration par addition d'hème et de ménaquinones (Brooijmans *et al.*, 2009). Par ailleurs, l'augmentation de survie en présence de transferrine ne pouvait s'expliquer par un phénomène de respiration. *L. sakei* est connue pour posséder une catalase hème-dépendante (Knauf *et al.*, 1992, Hertel *et al.*, 1998), même si l'espèce ne synthétise pas l'hème. Il était donc tentant de penser que cette activité, par son rôle de protection vis à vis du stress peroxyde, pouvait être responsable de la

survie observée. Néanmoins, l'effet transferrine n'était là encore pas expliqué. Notre hypothèse était que l'hème pouvait également être une source de fer.

Nous avons mesuré l'activité catalase à différentes concentrations d'hème (1, 5 et 40 µM). Nous n'avons pas détecté pas d'activité à 1 µM et celle-ci est déjà maximale à 5 µM, alors que la survie ne devient maximale qu'à partir de 40 µM. Ceci montre que l'activité catalase hème-dépendante n'est pas le facteur principal dont résulte le phénotype de survie. De plus, la survie en présence de transferrine ne peut être due qu'à l'effet du fer et non à celui de l'hème et aucune activité catalase n'est détectée dans les cellules cultivées en présence de transferrine. Nous avons donc décidé d'inactiver la catalase par recombinaison homologue du gène *lsa0171*. La souche mutante présente une forte sensibilité au péroxyde d'hydrogène et aucune activité catalase n'est détectable lorsqu'elle est cultivée en présence d'hème, ce qui confirme l'inactivation de la protéine. Comme l'apport d'hème dans le milieu de culture confère une meilleure survie à la souche sauvage, nous avons donc contrôlé ce phénotype dans la souche Δ*katA*. A notre grande surprise, cette souche présentait une survie comparable à la souche sauvage en présence d'hème. Ceci confirme donc bien que la catalase n'est pas l'acteur majeur de la survie en présence d'hème. Toutefois, d'autres protéines à hème pourraient être impliquées dans ce phénotype. Il a été montré récemment chez *S. agalactiae*, qui ne possède pas de catalase, qu'une alkyl hydro-peroxyde réductase codée par le gène *ahpC* avait la capacité de fixer l'hème et pouvait contrôler la disponibilité de l'hème intracellulaire chez cette espèce (Lechardeur *et al.*, 2010). Un mutant *ahpC* de *S. agalactiae* est affecté dans sa respiration. Ce type de protéines est relativement répandu chez les bactéries. Dans le génome de *L. sakei* un équivalent pourrait être la protéine LSA0104. Il serait envisageable de construire un mutant *ahpC* ainsi qu'un double *ahpC-katA* et d'analyser leur phénotype en présence d'hème. Toutefois le mutant *katA* est très sensible au péroxyde d'hydrogène ce qui ne l'empêche pas de survivre en présence d'hème, la résistance au stress peroxyde ne semble donc pas un facteur important pour la survie. La question reste donc posée de l'utilisation de l'hème comme source de fer ou d'hème.

La réponse cellulaire est différente en présence de fer et d'hème

Notre approche globale de la réponse de *L. sakei* à l'hème et à la transferrine nous a permis de montrer que cette espèce présentait peu de modifications de l'expression génétique en réponse à ces composés, alors que la réponse physiologique est clairement modifiée. Nous avons montré que 8 gènes en présence d'hème et 15 en présence de transferrine avaient leur transcription modifiée par rapport à la condition de référence sans addition de source de fer. Ce nombre limité de modifications n'est pas sans rappeler la situation décrite chez *L. lactis*,

espèce chez laquelle 11 gènes seulement sont montrés comme ayant une transcription modifiée par l'addition d'hème en aérobiose, ce qui conduit à la respiration (Pedersen *et al.*, 2008).

Chez *L. sakei*, notre analyse protéomique, bien que permettant une vision moins large, a également confirmé que la présence d'hème affecte peu l'expression des protéines. Celles qui sont affectées voient leur expression diminuée et sont des protéines impliquées dans la réponse au stress. L'hème apparaît donc comme protecteur pour les cellules. Chez *L. lactis*, l'addition d'hème qui permet la respiration, mène à la répression de gènes codant pour des protéines de réponse au stress oxydant (Pedersen *et al.*, 2008). Nous n'avons par ailleurs pas mis en évidence de toxicité de l'hème, même à doses élevées et généralement toxiques pour d'autres espèces. Si l'on s'intéresse à l'habitat naturel de l'espèce *L. sakei*, on peut considérer la présence d'hème comme une condition normale pour *L. sakei* d'où une diminution des stress en sa présence. Il faut donc plutôt considérer que c'est la carence en hème qui induit un stress.

La transferrine quant à elle induit plus de modifications transcriptionnelles et au contraire induit l'expression de gènes de stress. Le fer en soi semble donc plus toxique que l'hème pour la cellule. Et si l'on admet qu'une partie de l'hème peut être utilisé comme source de fer, l'effet de ce dernier est sans doute compensé par l'effet protecteur de l'hème.

Chez *L. sakei*, la réponse physiologique à la transferrine ou à l'hème est caractérisée par un phénomène similaire de survie, mais les mécanismes de régulation génétique mis en jeu sont différents. Cependant, nous observons un point commun entre la présence d'hème et de transferrine, qui est l'induction du gène *lsa1194*. Cette induction, d'un gène codant pour un système de transport potentiel, suggère une implication directe dans le métabolisme du fer et de l'hème chez *L. sakei*. Nous avons montré que le mutant de ce système est sensiblement affecté dans sa survie en présence d'hème. Toutefois ce système doit être mieux caractérisé afin de préciser son rôle dans le métab olime du fer et de l'hème. Il faudrait notamment tester la survie du mutant dans d'autres conditions comme la présence de transferrine ou de plus faibles concentrations hème, mais aussi doser l'activité catalase hème-dépendante dans ce mutant.

Nous savions que *L. sakei* possédait trois régulateurs de transcription de la famille Fur. Ces régulateurs n'ont pas montré de différence d'expression par l'approche transcriptomique globale.

Le rôle des régulateurs Fur-like chez *L. sakei*

Nous montrons par notre travail que ces régulateurs appartiennent à trois familles fonctionnelles distinctes : Fur, Mur et PerR. Alors que de plus en plus de génomes complets de bactéries sont disponibles, la présence de trois paralogues dans une même espèce reste rarement décrite, si ce n'est par exemple chez *S. aureus, L. monocytogenes* et *B. subtilis* ou *E. faecalis*. Cette situation apparait encore plus rare au sein du groupe des bactéries lactiques décrites jusqu'alors comme physiologiquement indépendantes du fer.

Les séquences opératrices présentes sur l'ADN appelées Fur-box sont conservées entre les espèces. Chez *L. monocytogenes*, la recherche de gènes possédant des séquences régulatrices de type PerR a été réalisée en utilisant la séquence définie chez *B. subtilis* (Rea *et al.*, 2005). Une approche similaire avait été utilisée chez *S. aureus* en utilisant la boîte définie chez *E. coli* (Xiong *et al.*, 2000). Les paralogues présents chez *L. sakei* sont proches de ceux décrits chez *L. monocytogenes* et *B. subtilis*. Nous nous sommes donc basés sur les boîtes définies chez *B. subtilis* pour analyser le génome de *L. sakei*. L'analyse préalable de la séquence peptidique de chacun des paralogues présents chez *L. sakei* nous a permis de diriger nos recherches *in silico* en ciblant des boîtes de type Fur pour LSA1029, de type PerR pour LSA0466 et de type Zur pour LSA0109. Nous avons pu ainsi définir des régulons pour chacun d'eux. La construction de mutants nous a permis de valider nos prédictions et de définir le rôle physiologique de chacun de ces régulateurs.

L'inactivation de la protéine LSA1029 (Fur) conduit à une faible augmentation de transcription des gènes cibles détectés. Une faible induction de ce type a déjà été observée chez *B. subtilis* où la transcription du gène *fur* est contrôlée par le régulateur PerR mais induit seulement 2 à 3 fois dans le mutant PerR (Fuangthong *et al.*, 2002). Nous avons observé une surexpression du gène *lsa*0967 qui code pour une protéine XerC. Cette protéine fonctionne de pair avec la protéine XerD, et est impliquée dans la ségrégation du chromosome chez *E. coli* (Hendricks *et al.*, 2000, Kennedy *et al.*, 2008). Le mutant *fur* présente dans sa population des cellules plus longues, phénotype qui pourrait résulter de cette modification de la protéine XerC1. Comme *L. sakei* possède 2 paralogues de la protéine XerC, cette duplication pourrait expliquer que cette observation n'est observée que pour une fraction de la population cellulaire. Ceci est la première évidence d'un effet du fer via le régulateur Fur sur la division cellulaire. *L. sakei* apparaît comme une exception au sein du groupe des bactéries lactiques. En effet, le gène *lsa1029* n'a pas d'équivalent chez les bactéries lactiques. Par ailleurs, ce gène *lsa1029* est inséré entre un gène codant pour une protéine XerD et un gène codant pour

une protéine appartenant au COG2996. Ces gènes sont normalement adjacents chez de nombreuses bactéries lactiques. Un évènement d'insertion pourrait donc être à l'origine de cette organisation génétique chez *L. sakei*. Une organisation similaire est observée chez des espèces pathogènes comme *L. monocytogenes* et *S. aureus* où le gène *fur* est présent en amont du gène *xerD*. Le mutant *fur* de *L. sakei* présente également une difficulté à faire face à un challenge de survie sans hème. Ceci confirme l'importance pour *L. sakei* de la présence d'hème dans son environnement. Cette condition devrait être considérée comme la référence pour sa survie. Un des autres gènes potentiellement régulé par Fur est le transporteur de type Fhu que nous pensions un bon candidat pour le transport de l'hème. Son inactivation a montré qu'il n'est pas impliqué dans le phénotype de survie et que son contenu en fer ne varie pas significativement.

Un autre des régulateurs (LSA0109) est un Mur qui pourrait réguler l'homéostasie du Mn. Chez *L. sakei,* l'activité β galactosidase est dépendante de la concentration de manganèse ajoutée dans le milieu de culture. Cette activité est 2 fois plus faible dans le mutant *lsa0109*. Ces données suggèrent que la protéine LSA0109 est impliquée dans l'homéostasie du manganèse chez *L. sakei*. Nous n'avons pas mis en évidence de différence de sensibilité aux métaux chez le mutant et nos essais pour évaluer la concentration intra cellulaire de Mn chez ce mutant par une approche EELS se sont pour l'instant avérés infructueux. La démonstration du rôle de Mur reste donc indirecte. Pour confirmer que le régulateur Fur-like LSA0109 est une protéine de type Mur, il serait utile d'inactiver le système de transport potentiel de manganèse MtsABC (LSA0282-0284) et d'étudier le transport du manganèse mais également du zinc.

Nous avions prédit que le troisième homologue (LSA0466), PerR, régulait des gènes grâce à quatre boîtes en amont de gènes cibles. Ce régulon contient des protéines fonctionnellement liées à la réponse au stress péroxyde telles que la NADH peroxydase, comme cela a été décrit chez *L. monocytogenes* (Padilla *et al.*, 2005), *E. faecalis* (Verneuil *et al.*, 2005) et *B. subtilis* (Fuangthong *et al.*, 2002). Ce régulon contient aussi une Dye type peroxydase. Il a été montré chez *E. coli* que ce type de protéine peut posséder une activité hème-oxygénase. L'originalité de cette protéine est de récupérer le fer de l'hème tout en conservant intacte le noyau tétrapyrolle (Létoffé *et al.*, 2009). Alors que la protéine PerR régule le gène *katA* chez *L. monocytogenes* (Padilla *et al.*, 2005) et *S. aureus* (Cosgrove *et al.*, 2007), nous n'avons détecté aucune boîte PerR dans la région promotrice de ce gène chez *L. sakei*. Nous avons mis en évidence également que PerR (LSA0466) régulait fortement

l’expression du gène *lsa1194* codant pour une protéine de transport. Ce même gène s’est révélé également fortement induit par la présence d’hème ou de transferrine, lors de nos expériences de transcriptomique globale.

L'inactivation de la protéine PerR par insertion d'un plasmide dans le gène *lsa0466* nous a permis de vérifier sa propre transcription. Nous avions mis en évidence *in silico* la présence d’une potentielle boîte Fur en amont de *perR* (*lsa0466*). Expérimentalement, nous avons montré que l’inactivation de PerR conduit à une augmentation de la transcription de son propre gène *lsa0466* d’un facteur 7. Nous en concluons que la boîte présente en amont de *lsa0466* est une boîte PerR plutôt qu’une boîte Fur. Cependant, l’inactivation de LSA1029 (Fur) conduit à une faible dérépression de *lsa0466* suggérant que Fur pourrait également reconnaître cette boîte. Pour vérifier cette observation, il peut être envisagé de surexprimer la protéine Fur (LSA1029) dans la souche sauvage et dans la souche inactivée de PerR et de contrôler la transcription de *lsa0466*. Une approche *in vitro* dans laquelle la purification de chacun des régulateurs permettrait de réaliser des tests de mobilité sur gels à partir de différentes régions opératrices pourrait permettre de répondre à la question d’une possible régulation croisée entre ces deux régulateurs.

Physiologiquement, la souche Δ*per*R pourrait être affectée dans sa réponse au stress péroxyde comme cela est le cas chez *E. faecalis* (Verneuil *et al.*, 2005) ou *L. monocytogenes* (Padilla *et al.*, 2005). Chez *L. monocytogenes*, l’inactivation de la protéine PerR conduit également à la modification de l’aspect des colonies (Padilla *et al.*, 2005). Ces phénomènes n’ont pas été observés chez *L. sakei*. Chez *L. monocytogenes* (Padilla *et al.*, 2005) ou chez *E. faecalis* (Verneuil *et al.*, 2005) l'inactivation de la protéine PerR conduit à une virulence diminuée, un phénotype qu’il ne nous était pas possible de rechercher chez *L. sakei*. Malgré un régulon bien défini et caractérisé par des valeurs élevées de régulation, nous n’avons pu définir de rôle physiologique pour PerR. Nous ne pouvons donc exclure que nos conditions de laboratoire ne sont pas optimales pour observer un phénotype lié à l’inactivation de PerR chez *L. sakei*. Ce régulateur pourrait être un facteur important pour répondre au stress oxydant fréquemment recontré dans l’environnement carné, notamment à cause des effets combinés de l'oxygène et du fer. Des essais de croissance et de survie de ce mutant dans la viande sont donc à envisager. Par ailleurs, notre étude a principalement porté sur l’effet des sources de fer sur les régulateurs. Cependant, PerR est un régulateur important dans la réponse au stress péroxyde et il serait nécessaire de mesurer la transcription du gène *lsa0466* et du régulon en réponse au péroxyde d’hydrogène.

Nous avons montré que ces 3 régulateurs étaient plus exprimés en présence d'hème. Toutefois cette induction n'était pas apparue lors de nos expériences de transcriptomique globale. Seul le gène *lsa1194*, régulé par PerR était apparu fortement exprimé en réponse à l'hème et à la transferrine. L'étude de l'expression de ce gène nous montre les limites de l'approche globale chez *L. sakei*. Dans l'approche de transcriptomique, l'induction de ce gène est de +3.22 alors qu'elle est de +8 dans l'approche de RT-qPCR. Cette observation nous montre que l'approche de trancriptomique a tendance à écraser nos données (facteur ≈ 2.5). Dans ces conditions, il apparait normal de ne pouvoir mettre en relief une modification d'expression faible telle qu'elle peut exister au sein des régulons des protéines Fur-like

La prédiction des régulons Fur-like est un exercice délicat, surtout lorsque trois paralogues sont présents dans une même souche. Chez *E. coli*, alors que nombre de gènes ont été démontrés expérimentalement contrôlés par Fur, une analyse transcriptomique a permi d'en identifier six supplémentaires (McHugh *et al.*, 2003). Ainsi, pour définir plus exhaustivement le régulon de chacun des paralogues Fur de *L. sakei*, il serait nécessaire d'envisager une approche globale en transcriptomique ou protéomique de chacun des mutants. Des expériences de retard sur gel (EMSA) permettraient de contrôler le mode de régulation direct ou indirect de certains gènes ou opérons. Nous pourrions aussi envisager de complémenter une mutation Fur, PerR ou Zur chez *L. monocytogenes*, *B. subtilis* ou même *E. coli*, par l'apport du régulateur homologue de *L. sakei* afin de préciser la spécificité fonctionnelle de ces régulateurs.

Les transporteurs ciblés ne semblent pas impliqués dans l'import de l'hème chez *L. sakei*

Nous avions détecté dans le génome de *L. sakei* plusieurs transporteurs d'hème et de fer potentiels. Les systèmes LSA0399-0402 (Fhu-like) et LSA1836-1840 apparaissaient comme des cibles privilégiées du fait de leurs homologies avec des systèmes dont l'implication dans le transport du fer ou de l'hème a été démontrée. L'inactivation de ces deux systèmes individuellement ou simultanément dans la souche *L. sakei* 23K n'a pas permis de montrer leur implication dans le transport du fer héminique ou de la transferrine. Quelle que soit la condition testée, hème ou transferrine à faible ou forte concentration, aucune des souches mutées n'est affectée dans le phénotype de survie en phase stationnaire. De même, l'activité catalase hème-dépendante n'est pas affectée par ces mutations. Ceci montre que, malgré les homologies, ces systèmes n'apparaissent pas impliqués dans le métabolisme du fer dans nos conditions de laboratoire. Cependant, nous ne pouvons exclure que ces systèmes participent à

ce métabolisme dans l'environnement naturel de *L. sakei*. Il serait alors intéressant de suivre la colonisation et la survie de ces différentes souches dans la viande.

Par ailleurs, nous savons que *L. sakei* possède d'autres systèmes de transport potentiels de fer ou d'hème tels les perméases MntH (LSA0246 et LSA1699), impliquées chez *L. lactis* dans l'accumulation de fer (Turner *et al.*, 2007), ou les transporteurs ABC de type MtsABC (LSA0180-0182 et LSA0282-0284), impliqués dans le transport d'ions divalents (Janulczyk *et al.*, 2003, Hanks *et al.*, 2006). Il serait envisageable d'inactiver ces systèmes et en particulier le système LSA0282-0284 dont nous avons montré la régulation par LSA0109, appartenant à la famille Mur.

L'approche globale de transcriptomique a révélé l'induction du gène *lsa1194*, codant pour un système de transport, en réponse à la présence de transferrine ou d'hème. Nos résultats préliminaires indiquent qu'il est impliqué dans le phénomène de survie en présence d'hème mais sa caractérisation doit être poursuivie.

De nombreuses bactéries possèdent des systèmes d'export d'héme, comme le système HrtAB, décrit chez *S. aureus*, *B. anthracis*, *S. agalactiae* ou *L. lactis* [pour revue (Anzaldi & Skaar, 2010, Lechardeur *et al.*, 2011)]. Chez *L. sakei*, les protéines LSA1366-1367 sont homologues aux protéines de ce système (Anzaldi & Skaar, 2010). Malheureusement, nous n'avons pu obtenir de souche mutante dans ce système. L'obtention d'une telle mutation serait importante pour la compréhension du métabolisme du fer et de l'hème chez *L. sakei*. Nous savons cependant que les gènes *lsa1366-1367* ne sont pas différentiellement transcrits en présence d'hème et qu'aucun régulateur Fur-like n'en régule la transcription. Nous avons montré que *L. sakei* ne modifiait que très peu son métabolisme en présence d'hème. Ainsi, le fait de ne pas détecter de modification de transcription des gènes *lsa1366-1367* serait cohérent avec l'ensemble de nos observations. Cependant, seule l'inactivation du système pourra permettre de répondre avec plus de précision sur son rôle physiologique.

Conclusions

Pour conclure, nous avons atteint une partie de nos objectifs et ouvert la voie pour d'autres explorations du métabolisme du fer chez *L. sakei*.

Nous avons fourni la première évidence de l'utilisation de l'hème et du fer par *L. sakei* pour améliorer sa survie. Cette utilisation semble spécifique des sources de fer présentes dans l'environnement carné. Notamment sa capacité à fixer spécifiquement la transferrine bovine mais pas la transferrine humaine, confirme l'adaptation de cette espèce à la viande. La démonstration de cette utilisation du fer et de l'hème nous a amenés à développer une

méthode de micro-analyse du fer intracellulaire basée sur la microscopie électronique. Le développement de cette approche pour les bactéries permet d'évaluer le contenu en fer des cellules sans utiliser de sources radioactives.

Nous avons également identifié certains des acteurs du métabolisme du fer chez *L. sakei*. C'est le cas des régulateurs de transcription de la famille Fur dont trois paralogues sont présents. Nous avons montré que le régulateur LSA0109 appartient très probablement à la famille fonctionnelle Mur impliquée dans la régulation de l'homéostasie du manganèse. Nous avons montré que le régulateur LSA0466 appartient à la famille fonctionnelle PerR, acteur central de la réponse au stress peroxyde chez de nombreuses bactéries. Chez *L. sakei*, PerR régule un ensemble de gènes dont la fonction est cohérente avec la réponse au stress peroxyde. Enfin, la protéine LSA1029 correspond au régulateur Fur consensus. Nous avons montré que ce régulateur était impliqué dans le métabolisme du fer chez *L. sakei*, notamment dans des phénomènes de séquestration du fer et de résistance au stress H_2O_2 et de manière inattendue dans des processus de division cellulaire probablement liés à la recombinaison de l'ADN.

Enfin, l'ensemble de nos observations nous conduit à reconsidérer la condition témoin d'étude de *L. sakei*. En effet, cette espèce, jusque là supposée sans exigence en fer, était cultivée dans un milieu sans source de fer. Ce travail de thèse montre l'importance de ces sources pour la survie de la bactérie et l'adaptation de celle-ci à leur présence. Ceci nous amène à penser que la présence d'hème devrait être la condition de référence pour cette espèce, car elle est plus proche des conditions de son environnement naturel, la viande.

Ce travail montre que ce métabolisme du fer et de l'hème chez *L. sakei* est original par rapport à d'autres modèles, y compris à ce qui est montré chez d'autres bactéries lactiques. Il illustre bien que ce métabolisme doit être analysé en regard de l'écosystème carné.

6 RÉFÉRENCES

Abdul-Tehrani, H., A. J. Hudson, Y. S. Chang, A. R. Timms, C. Hawkins, J. M. Williams, P. M. Harrison, J. R. Guest & S. C. Andrews, (1999) Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* **181**: 1415-1428.

Adiguzel, G. & M. Atasever, (2009) Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. *Romanian Biotechnological Letters* **14**: 4130-4138.

Ahmad, R., B. O. Brandsdal, I. Michaud-Soret & N. P. Willassen, (2009) Ferric uptake regulator protein: Binding free energy calculations and per-residue free energy decomposition. *Proteins-Structure Function and Bioinformatics* **75**: 373-386.

Aisen, P., A. Leibman & J. Zweier, (1978) Stoichiometric and site characteristics of binding of iron to human transferrin. *J. Biol. Chem.* **253**: 1930-1937.

Al-Nabulsi, A. A. & R. A. Holley, (2007) Effects on *Escherichia coli* O157 : H7 and meat starter cultures of bovine lactoferrin in broth and microencapsulated lactoferrin in dry sausage batters. *Int. J. Food Microbiol.* **113**: 84-91.

Ammor, S., E. Dufour, M. Zagorec, S. Chaillou & I. Chevallier, (2005a) Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. *Food Microbiology* **22**: 529-538.

Ammor, S., C. Rachman, S. Chaillou, H. Pervost, X. Dousset, M. Zagorec, E. Dufour & I. Chevallier, (2005b) Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. *Food Microbiology* **22**: 373-382.

An, Y. J., B. E. Ahn, A. R. Han, H. M. Kim, K. M. Chung, J. H. Shin, Y. B. Cho, J. H. Roe & S. S. Cha, (2009) Structural basis for the specialization of Nur, a nickel-specific Fur homolog, in metal sensing and DNA recognition. *Nucleic Acids Res.* **37**: 3442-3451.

Anderson, J. E., P. F. Sparling & C. N. Cornelissen, (1994) Gonococcal Transferrin-binding Protein-2 facilitates but is not essential for Transferrin utilization. *J. Bacteriol.* **176**: 3162-3170.

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

Andrews, S. C., N. E. Lebrun, V. Barynin, A. J. Thomson, G. R. Moore, J. R. Guest & P. M. Harrison, (1995) Site-directed replacement of the coaxial heme ligands of bacterioferritin generates heme-free variants. *J. Biol. Chem.* **270**: 23268-23274.

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

Anzaldi, L. L. & E. P. Skaar, (2010) Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect. Immun.* **78**: 4977-4989.

Aranda, J., P. Cortes, M. E. Garrido, N. Fittipaldi, M. Llagostera, M. Gottschalk & J. Barbe, (2009) Contribution of the FeoB transporter to *Streptococcus suis* virulence. *Int. Microbiol.* **12**: 137-143.

Arceneaux, J. E. L. & B. R. Byers, (1977) Inhibition of iron uptake and deoxyribonucleic-acid synthesis by Desferal in a mutant strain of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **129**: 1639-1641.

Archibald, F., (1983) *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiol. Lett.* **19**: 29-32.

Baichoo, N. & J. D. Helmann, (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.* **184**: 5826-5832.

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

Balcazar, J. L., I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Vendrell, O. Girones & J. L. Muzquiz, (2007) Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **30**: 111-118.

Barchini, E. & R. E. Cowart, (1996) Extracellular iron reductase activity produced by *Listeria monocytogenes*. *Arch. Microbiol.* **166**: 51-57.

Barry, S. M. & G. L. Challis, (2009) Recent advances in siderophore biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**: 205-215.

Bates, C. S., G. E. Montanez, C. R. Woods, R. M. Vincent & Z. Eichenbaum, (2003) Identification and characterization of a *Streptococcus pyogenes* operon involved in binding of hemoproteins and acquisition of iron. *Infect. Immun.* **71**: 1042-1055.

Beasley, F. C. & D. E. Heinrichs, (2010) Siderophore-mediated iron acquisition in the staphylococci. *J. Inorg. Biochem.* **104**: 282-288.

Benevides-Matos, N. & F. Biville, (2010) The Hem and Has haem uptake systems in *Serratia marcescens*. *Microbiology-Sgm* **156**: 1749-1757.

Benevides-Matos, N., C. Wandersman & F. Biville, (2008) HasB, the *Serratia marcescens* TonB paralog, is specific to HasR. *J. Bacteriol.* **190**: 21-27.

Benjamin, J. A. M., G. Desnoyers, A. Morissette, H. Salvail & E. Masse, (2010) Dealing with oxidative stress and iron starvation in microorganisms: an overview. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**: 264-272.

Berthier, F. & S. D. Ehrlich, (1999) Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 997-1007.

Bibb, L. A. & M. P. Schmitt, (2010) The ABC transporter HrtAB confers resistance to hemin toxicity and is regulated in a hemin-dependent manner by the ChrAS two-component system in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* **192**: 4606-4617.

Blokesch, M., M. Rohrmoser, S. Rode & A. Bock, (2004) HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation. *J. Bacteriol.* **186**: 2603-2611.

Boughammoura, A., B. F. Matzanke, L. Bottger, S. Reverchon, E. Lesuisse, D. Expert & T. Franza, (2008) Differential role of ferritins in iron metabolism and virulence of the plant-pathogenic bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. *J. Bacteriol.* **190**: 1518-1530.

Bracken, C. S., M. T. Baer, A. Abdur-Rashid, W. Helms & I. Stojiljkovic, (1999) Use of heme-protein complexes by the *Yersinia enterocolitica* HemR receptor: histidine residues are essential for receptor function. *J. Bacteriol.* **181**: 6063-6072.

Braun, M., H. Killmann & V. Braun, (1999) The beta-barrel domain of FhuA Delta 5-160 is sufficient for TonB-dependent FhuA activities of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**: 1037-1049.

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

Braun, V., (2003) Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front. Biosci.* **8**: S1409-S1421.

Bredholt, S., T. Nesbakken & A. Holck, (1999) Protective cultures inhibit growth of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 : H7 in cooked, sliced, vacuum- and gas-packaged meat. *Int. J. Food Microbiol.* **53**: 43-52.

Brenot, A., K. Y. King & M. G. Caparon, (2005) The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* **55**: 221-234.

Broda, D. M., J. A. Boerema & G. Brightwell, (2009) Sources of psychrophilic and psychrotolerant clostridia causing spoilage of vacuum-packed chilled meats, as determined by PCR amplification procedure. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 178-186.

Brooijmans, R., B. Smit, F. Santos, J. van Riel, W. M. de Vos & J. Hugenholtz, (2009) Heme and menaquinone induced electron transport in lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* **8**.

Brown, J. S. & D. W. Holden, (2002) Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect.* **4**: 1149-1156.

Bruyneel, B., M. Vandewoestyne & W. Verstraete, (1989) Lactic Acid Bacteria - Microorganisms able to grow in the absence of available iron and copper. *Biotechnol. Lett.* **11**: 401-406.

Bsat, N., A. Herbig, L. Casillas-Martinez, P. Setlow & J. D. Helmann, (1998) *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol. Microbiol.* **29**: 189-198.

Buchanan, S. K., B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm & J. Deisenhofer, (1999) Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**: 56-63.

Bullen, J. J., E. Griffiths & C. E. Edmiston, (1999) Iron and Infection: Molecular, Physiological and Clinical Aspects, 2nd Edition. *Shock* **12**: 410.

Burkhard, K. A. & A. Wilks, (2007) Characterization of the outer membrane receptor ShuA from the heme uptake system of *Shigella dysenteriae* - Substrate specificity and identification of the heme protein ligands. *J. Biol. Chem.* **282**: 15126-15136.

Burkhard, K. A. & A. Wilks, (2008) Functional characterization of the *Shigella dysenteriae* heme ABC transporter. *Biochemistry* **47**: 7977-7979.

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

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

Cartron, M. L., S. Maddocks, P. Gillingham, C. J. Craven & S. C. Andrews, (2006) Feo - Transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **19**: 143-157.

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

Chaillou, S., M. C. Champomier Vergès, M. Cornet, A. M. Crutz-Le Coq, A. M. Dudez, V. Martin, S. Beaufils, E. Darbon-Rongère, R. Bossy, V. Loux & M. Zagorec, (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nat. Biotechnol.* **23**: 1527-1533.

Chaillou, S., M. Daty, F. Baraige, A. M. Dudez, P. Anglade, R. Jones, C. A. Alpert, M. C. Champomier Vergès & M. Zagorec, (2009) Intraspecies genomic diversity and natural population structure of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 970-980.

Challis, G. L., (2005) A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **6**: 601-611.

Champomier, M. C., M. C. Montel, F. Grimont & P. A. D. Grimont, (1987) Genomic identification of meat lactobacilli as *Lactobacillus sake*. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie* **138**: 751-758.

Champomier Vergès, M., J. Anba, S. Chaillou & M. Zagorec, (2010) Sécurité microbiologique de la viande bovine. In: Muscle et viande ruminant. D. Bauchart & B. Picard (eds). pp. 221-231.

Champomier Vergès, M. C., S. Chaillou, M. Cornet & M. Zagorec, (2002) *Lactobacillus sakei*: recent developments and future prospects (vol 152, pg 839, 2001). *Res. Microbiol.* **153**: 115-123.

Champomier Vergès, M. C., A. Stintzi & J. M. Meyer, (1996) Acquisition of iron by the non-siderophore-producing *Pseudomonas fragi*. *Microbiology* **142**: 1191-1199.

Champomier Vergès, M. C. C., M. Zuniga, F. Morel-Deville, G. Perez-Martinez, M. Zagorec & S. D. Ehrlich, (1999) Relationships between arginine degradation, pH and survival in *Lactobacillus sakei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **180**: 297-304.

Chasteen, N. D. & P. M. Harrison, (1999) Mineralization in ferritin: An efficient means of iron storage. *J. Struct. Biol.* **126**: 182-194.

Chiaramonte, F., S. Blugeon, S. Chaillou, P. Langella & M. Zagorec, (2009) Behavior of the meat-borne bacterium *Lactobacillus sakei* during its transit through the gastrointestinal tracts of axenic and conventional mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 4498-4505.

Choi, J.-H., H.-Y. Jung, H.-S. Kim & H.-G. Cho, (2000) PhyloDraw: a phylogenetic tree drawing system. *Bioinformatics* **16**: 1056-1058.

Cocconcelli, P. S., (2007) Starter cultures : bacteria. In: Handbook of fermented meat and poultry. F. Toldrà (ed). Blackwell publishing, pp. 137-145.

Condon, S., (1987) Responses of Lactic Acid Bacteria to oxygen. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**: 269-280.

Conter, M., T. Muscariello, E. Zanardi, S. Ghidini, A. Vergara, G. Campanini & A. Ianieri, (2005) Characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from an Italian dry fermented sausage. *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma* **XXV**: 167-174.

Cornelis, P., (2010) Iron uptake and metabolism in pseudomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 1637-1645.

Cornelissen, C. N. & P. F. Sparling, (1994) Iron piracy - acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* **14**: 843-850.

Cosgrove, K., G. Coutts, I. M. Jonsson, A. Tarkowski, J. F. Kokai-Kun, J. J. Mond & S. J. Foster, (2007) Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **189**: 1025-1035.

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

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

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

Crowley, K. M., D. M. Prendergast, J. J. Sheridan & D. A. McDowell, (2010) The influence of storing beef aerobically or in vacuum packs on the shelf life of mince. *J. Appl. Microbiol.* **109**: 1319-1328.

Dal Bello, F., J. Walter, W. P. Hammes & C. Hertel, (2003) Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. *Microb. Ecol.* **45**: 455-463.

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

Dale, S. E., M. T. Sebulsky & D. E. Heinrichs, (2004b) Involvement of SirABC in iron-siderophore import in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **186**: 8356-8362.

Daou, N., C. Buisson, M. Gohar, J. Vidic, H. Bierne, M. Kallassy, D. Lereclus & C. Nielsen-LeRoux, (2009) IlsA, a unique surface protein of *Bacillus cereus* required for iron acquisition from heme, hemoglobin and ferritin. *PLoS Pathog.* **5**.

de Lorenzo, V., S. Wee, M. Herrero & J. B. Neilands, (1987) Operator sequences of the Aerobactin operon of plasmid COLV-K30 binding the Ferric Uptake Regulation (Fur) repressor. *J. Bacteriol.* **169**: 2624-2630.

del Olmo, A., P. Morales & M. Nunez, (2009) Bactericidal activity of lactoferrin and its amidated and pepsin-digested derivatives against *Pseudomonas fluorescens* in ground beef and meat fractions. *J. Food Prot.* **72**: 760-765.

Delany, I., A. B. F. Pacheco, G. Spohn, R. Rappuoli & V. Scarlato, (2001a) Iron-dependent transcription of the *frpB* gene of *Helicobacter pylori* is controlled by the Fur repressor protein. *J. Bacteriol.* **183**: 4932-4937.

Delany, I., G. Spohn, R. Rappuoli & V. Scarlato, (2001b) The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* **42**: 1297-1309.

Diaz-Mireles, E., M. Wexler, J. D. Todd, D. Bellini, A. W. B. Johnston & R. G. Sawers, (2005) The manganese-responsive repressor Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a member of the Fur-superfamily that recognizes an unusual operator sequence. *Microbiology-Sgm* **151**: 4071-4078.

Doherty, A., J. J. Sheridan, P. Allen, D. A. McDowell, I. S. Blair & D. Harrington, (1995) Growth of *Yersinia enterocolitica* O-3 on modified atmosphere packaged Lamb. *Food Microbiology* **12**: 251-257.

Dortu, C., M. Huch, W. H. Holzapfel, C. Franz & P. Thonart, (2008) Anti-listerial activity of bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 and *Lactobacillus sakei* CWBI-B1365 on raw beef and poultry meat. *Lett. Appl. Microbiol.* **47**: 581-586.

Drazek, E. S., C. A. Hammack & M. P. Schmitt, (2000) *Corynebacterium diphtheriae* genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters. *Mol. Microbiol.* **36**: 68-84.

Dubrac, S. & D. Touati, (2000) Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: Functional analysis of the *sodB* promoter. *J. Bacteriol.* **182**: 3802-3808.

Duhutrel, P., Baraige, F. , Bordat, C., Chaillou, S., Zagorec, M., Champomier Vergès, M.-C., (20XX-a) Heme and transferrin trigger different response in the non pathogenic Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus sakei*. *Manuscript in preparation*.

Duhutrel, P., Baraige, F. , C., Chaillou, S., Zagorec, M., Champomier Vergès, M.-C., (20XX-b) Characterization of the three Fur paralogs in the Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Manuscript in preparation*.

Duhutrel, P., C. Bordat, T. D. Wu, M. Zagorec, J. L. Guerquin-Kern & M. C. Champomier Vergès, (2010) Iron sources used by the nonpathogenic lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* as revealed by electron energy loss spectroscopy and secondary-ion mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 560-565.

Dussurget, O., E. Dumas, C. Archambaud, I. Chafsey, C. Chambon, M. Hebraud & P. Cossart, (2005) *Listeria monocytogenes* ferritin protects against multiple stresses and is required for virulence. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**: 253-261.

Duwat, P., S. Sourice, B. Cesselin, G. Lamberet, K. Vido, P. Gaudu, Y. Le Loir, F. Violet, P. Loubière & A. Gruss, (2001) Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *J. Bacteriol.* **183**: 4509-4516.

Eakanunkul, S., G. S. Lukat-Rodgers, S. Sumithran, A. Ghosh, K. R. Rodgers, J. H. Dawson & A. Wilks, (2005) Characterization of the periplasmic heme-binding protein ShuT from the heme uptake system of *Shigella dysenteriae Biochemistry* **44**: 13179-13191.

Ercolini, D., F. Russo, E. Torrieri, P. Masi & F. Villani, (2006) Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 4663-4671.

Ernst, F. D., G. Homuth, J. Stoof, U. Mader, B. Waidner, E. J. Kuipers, M. Kist, J. G. Kusters, S. Bereswill & A. H. M. van Vliet, (2005) Iron-responsive regulation of the *Helicobacter pylori* iron-cofactored superoxide dismutase SodB is mediated by Fur. *J. Bacteriol.* **187**: 3687-3692.

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

Fabian, M., E. Solomaha, J. S. Olson & A. W. Maresso, (2009) Heme transfer to the bacterial cell envelope occurs via a secreted hemophore in the Gram-positive pathogen *Bacillus anthracis*. *J. Biol. Chem.* **284**: 32138-32146.

Ferguson, A. D., E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs & W. Welte, (1998) Siderophore-mediated iron transport: Crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**: 2215-2220.

Fernandez, A., D. Lechardeur, A. Derre-Bobillot, E. Couve, P. Gaudu & A. Gruss, (2010) Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog.* **6**.

Fischer, K. & C. Augustini, (1977) Stages of postmortem glycolysis at various pH-values in pig meat. *Fleischwirtschaft* **57**: 1191-1194.

Fletcher, J. & E. R. Huehns, (1968) Function of transferrin. *Nature* **218**: 1211-1214.

Fournier, C., A. Smith & P. Delepelaire, (2011) Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity. *Mol. Microbiol.*: no-no.

Frankenberg-Dinkel, N., (2004) Bacterial heme oxygenases. *Antioxid. Redox Signal.* **6**: 825-834.

Frankenberg, L., M. Brugna & L. Hederstedt, (2002) *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase. *J. Bacteriol.* **184**: 6351-6356.

Friedman, D. B., D. L. Stauff, G. Pishchany, C. W. Whitwell, V. J. Torres & E. P. Skaar, (2006) *Staphylococcus aureus* redirects central metabolism to increase iron availability. *PLoS Pathog.* **2**: 777-789.

Fuangthong, M. & J. D. Helmann, (2003) Recognition of DNA by three ferric uptake regulator (Fur) homologs in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**: 6348-6357.

Fuangthong, M., A. F. Herbig, N. Bsat & J. D. Helmann, (2002) Regulation of the *Bacillus subtilis fur* and *perR* genes by PerR: Not all members of the PerR regulon are peroxide inducible. *J. Bacteriol.* **184**: 3276-3286.

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

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

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

Gaudu, P., G. Lamberet, S. Poncet & A. Gruss, (2003) CcpA regulation of aerobic and respiration growth in *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **50**: 183-192.

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

Ghigo, J. M., S. Letoffe & C. Wandersman, (1997) A new type of hemophore-dependent heme acquisition system of *Serratia marcescens* reconstituted in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**: 3572-3579.

Giedroc, D. P., (2009) Hydrogen peroxide sensing in *Bacillus subtilis*: it is all about the (metallo)regulator. *Mol. Microbiol.* **73**: 1-4.

Giel, J. L., D. Rodionov, M. Z. Liu, F. R. Blattner & P. J. Kiley, (2006) IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O_2-regulated genes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **60**: 1058-1075.

Gonzalez-Chavez, S. A., S. Arevalo-Gallegos & Q. Rascon-Cruz, (2009) Lactoferrin: structure, function and applications. *Int. J. Antimicrob. Agents* **33**.

Graentzdoerffer, A., D. Rauh, A. Pich & J. R. Andreesen, (2003) Molecular and biochemical characterization of two tungsten- and selenium-containing formate dehydrogenases from *Eubacterium acidaminophilum* that are associated with components of an iron-only hydrogenase. *Arch. Microbiol.* **179**: 116-130.

GrayOwen, S. D. & A. B. Schryvers, (1996) Bacterial transferrin and lactoferrin receptors. *Trends Microbiol.* **4**: 185-191.

Green, J., A. S. Irvine, W. Meng & J. R. Guest, (1996) FNR DNA interactions at natural and semi-synthetic promoters. *Mol. Microbiol.* **19**: 125-137.

Griffiths, E. & P. Williams, (1999) The iron-uptake systems of pathogenic bacteria, fungi and protozoa. In: Iron and Infection - Molecular, Physiological and Clinical Aspects. J. Bullen & E. Griffiths (eds). Chichester, England: John Wiley and Sons, pp. 87–212.

Grigg, J. C., J. D. Cooper, J. Cheung, D. E. Heinrichs & M. E. P. Murphy, (2010) The *Staphylococcus aureus* siderophore receptor HtsA undergoes localized conformational changes to enclose staphyloferrin A in an arginine-rich binding pocket. *J. Biol. Chem.* **285**: 11162-11171.

Grigg, J. C., C. L. Vermeiren, D. E. Heinrichs & M. E. P. Murphy, (2007) Heme coordination by *Staphylococcus aureus* IsdE. *J. Biol. Chem.* **282**: 28815-28822.

Hall, H. K. & J. W. Foster, (1996) The role of Fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J. Bacteriol.* **178**: 5683-5691.

Halliwell, B. & J. M. Gutteridge, (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**: 1-14.

Hanahan, D., (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.

Hanks, T. S., M. Y. Liu, M. J. McClure, M. Fukumura, A. Duffy & B. F. Lei, (2006) Differential regulation of iron- and manganese-specific MtsABC and heme-specific HtsABC transporters by the metalloregulator MtsR of group A *Streptococcus*. *Infect. Immun.* **74**: 5132-5139.

Hantke, K., (1981) Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12 - isolation of a constitutive mutant. *Molecular & General Genetics* **182**: 288-292.

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

Hayat, M., (2000) Principles and techniques of electron microscopy. In: Biological Applications 4th edition. Cambridge University Press, pp. 377-406.

Heilig, H., E. G. Zoetendal, E. E. Vaughan, P. Marteau, A. D. L. Akkermans & W. M. de Vos, (2002) Molecular diversity of *Lactobacillus spp*. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 114-123.

Hendricks, E. C., H. Szerlong, T. Hill & P. Kuempel, (2000) Cell division, guillotining of dimer chromosomes and SOS induction in resolution mutants (*dif, xerC and xerD*) of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **36**: 973-981.

Hequet, A., V. Laffitte, L. Simon, D. De Sousa-Caetano, C. Thomas, C. Fremaux & J. M. Berjeaud, (2007) Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *Int. J. Food Microbiol.* **113**: 67-74.

Hertel, C., W. Ludwig, M. Obst, R. F. Vogel, W. P. Hammes & K. H. Schleifer, (1991) 23S Ribosomal RNA targeted oligonucleotide probes for the rapid identification of meat *Lactobacilli*. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**: 173-177.

Hertel, C., G. Schmidt, M. Fischer, K. Oellers & W. P. Hammes, (1998) Oxygen-dependent regulation of the expression of the catalase gene *katA* of *Lactobacillus sakei* LTH677. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1359-1365.

Herve-Jimenez, L., I. Guillouard, E. Guedon, S. Boudebbouze, P. Hols, V. Monnet, E. Maguin & F. Rul, (2009) Postgenomic analysis of *Streptococcus thermophilus*

cocultivated in milk with *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*: involvement of nitrogen, purine, and iron metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 2062-2073.

Hillmann, F., C. Doring, O. Riebe, A. Ehrenreich, R. J. Fischer & H. Bahl, (2009) The Role of PerR in O_2-Affected Gene Expression of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **191**: 6082-6093.

Ho, W. W., H. Y. Li, S. Eakanunkul, Y. Tong, A. Wilks, M. L. Guo & T. L. Poulos, (2007) Holo-and apo-bound structures of bacterial periplasmic heme-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **282**: 35796-35802.

Homuth, M., P. Valentin-Weigand, M. Rohde & G. F. Gerlach, (1998) Identification and characterization of a novel extracellular ferric reductase from *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect. Immun.* **66**: 710-716.

Hornung, J. M., H. A. Jones & R. D. Perry, (1996) The *hmu* locus of *Yersinia pestis* is essential for utilization of free haemin and haem-protein complexes as iron sources. *Mol. Microbiol.* **20**: 725-739.

Horsburgh, M. J., M. O. Clements, H. Crossley, E. Ingham & S. J. Foster, (2001a) PerR controls oxidative stress resistance and iron storage proteins and is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **69**: 3744-3754.

Horsburgh, M. J., E. Ingham & S. J. Foster, (2001b) In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J. Bacteriol.* **183**: 468-475.

Hugas, M., M. Garriga, M. T. Aymerich & J. M. Monfort, (1995) Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 322-330.

Imbert, M. & R. Blondeau, (1998) On the iron requirement of *Lactobacilli* grown in chemically defined medium. *Curr. Microbiol.* **37**: 64-66.

Jacquamet, L., D. A. K. Traore, J. L. Ferrer, O. Proux, D. Testemale, J. L. Hazemann, E. Nazarenko, A. El Ghazouani, C. Caux-Thang, V. Duarte & J. M. Latour, (2009) Structural characterization of the active form of PerR: insights into the metal-induced activation of PerR and Fur proteins for DNA binding. *Mol. Microbiol.* **73**: 20-31.

Jacques, M., (2004) Surface polysaccharides and iron-uptake systems of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire* **68**: 81-85.

Janulczyk, R., S. Ricci & L. Bjorck, (2003) MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **71**: 2656-2664.

Jeffrey, P. D., M. C. Bewley, R. T. A. MacGillivray, A. B. Mason, R. C. Woodworth & E. N. Baker, (1998) Ligand-induced conformational change in transferrins: Crystal structure of the open form of the N-terminal half-molecule of human transferrin. *Biochemistry* **37**: 13978-13986.

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

Jittawuttipoka, T., R. Sallabhan, P. Vattanaviboon, M. Fuangthong & S. Mongkolsuk, (2010) Mutations of ferric uptake regulator (*fur*) impair iron homeostasis, growth, oxidative stress survival, and virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Arch. Microbiol.* **192**: 331-339.

Jones, R. J., H. M. Hussein, M. Zagorec, G. Brightwell & J. R. Tagg, (2008) Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiology* **25**: 228-234.

Kagermeier-Callaway, A. S. & E. Lauer, (1995) *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara and Fukami 1934 is the senior synonym for *Lactobacillus bavaricus* Stetter and Stetter 1980. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 398-399.

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

Katagiri, H., K. Kitahara & K. Fukami, (1934) The characteristics of the lactic acid bacteria isolated from moto, yeast mashes for sake manufacture. IV Classification of the lactic acid bacteria. *Bull. Agr. Chem. Soc. Jpn* **10**: 156-157.

Katla, T., T. Moretro, I. M. Aasen, A. Holck, L. Axelsson & K. Naterstad, (2001) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology* **18**: 431-439.

Kennedy, S. P., F. Chevalier & F. X. Barre, (2008) Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **68**: 1018-1028.

Khan, A. G., S. R. Shouldice, S. D. Kirby, R. H. Yu, L. W. Tari & A. B. Schryvers, (2007) High-affinity binding by the periplasmic iron-binding protein from *Haemophilus influenzae* is required for acquiring iron from transferrin. *Biochem. J.* **404**: 217-225.

Kiley, P. J. & H. Beinert, (2003) The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 181-185.

Klein, G., L. M. T. Dicks, A. Pack, B. Hack, K. Zimmermann, F. Dellaglio & G. Reuter, (1996a) Emended descriptions of *Lactobacillus sake* (Katagiri, Kitahara, and Fukami) and *Lactobacillus curvatus* (Abo-Elnaga and Kandler): Numerical classification revealed by protein fingerprinting and identification based on biochemical patterns and DNA-DNA hybridizations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 367-376.

Klein, J. R., C. Ulrich, U. Wegmann, E. MeyerBarton, R. Plapp & B. Henrich, (1996b) Molecular tools for the genetic modification of dairy *lactobacilli*. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 493-503.

Knauf, H. J., R. F. Vogel & W. P. Hammes, (1992) Cloning, sequence, and phenotypic-expression of *katA*, which encodes the catalase of *Lactobacillus sakei* LTH677. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 832-839.

Koo, M. S., J. H. Lee, S. Y. Rah, W. S. Yeo, J. W. Lee, K. L. Lee, Y. S. Koh, S. O. Kang & J. H. Roe, (2003) A reducing system of the superoxide sensor SoxR in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **22**: 2614-2622.

Korkeala, H., T. Suortti & P. Makela, (1988) Ropy slime formation in vacuum-packed cooked meat-products caused by homofermentative *Lactobacilli* and *Leuconostoc* species. *Int. J. Food Microbiol.* **7**: 339-347.

Kot, E., S. Furmanov & A. Bezkorovainy, (1995) Accumulation of iron in Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *J. Food Sci.* **60**: 547-550.

Krewulak, K. D. & H. J. Vogel, (2008) Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1778**: 1781-1804.

Labadie, J., (1999) Consequences of packaging on bacterial growth. Meat is an ecological niche. *Meat Sci.* **52**: 299-305.

Lansky, I. B., G. S. Lukat-Rodgers, D. Block, K. R. Rodgers, M. Ratliff & A. Wilks, (2006) The cytoplasmic heme-binding protein (PhuS) from the heme uptake system of *Pseudomonas aeruginosa* is an intracellular heme-trafficking protein to the delta-regioselective heme oxygenase. *J. Biol. Chem.* **281**: 13652-13662.

Lasa, I. & J. R. Penades, (2006) Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res. Microbiol.* **157**: 99-107.

Lauret, R., F. Morel-Deville, F. Berthier, M. C. Champomier Vergès, P. Postma, S. D. Ehrlich & M. Zagorec, (1996) Carbohydrate utilization in *Lactobacillus sakei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1922-1927.

Lechardeur, D., B. Cesselin, A. Fernandez, G. Lamberet, C. Garrigues, M. Pedersen, P. Gaudu & A. Gruss, (2011) Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* **In Press**.

Lechardeur, D., A. Fernandez, B. Robert, P. Gaudu, P. Trieu-Cuot, G. Lamberet & A. Gruss, (2010) The 2-Cys Peroxiredoxin Alkyl Hydroperoxide Reductase C Binds Heme and Participates in Its Intracellular Availability in *Streptococcus agalactiae*. *J. Biol. Chem.* **285**: 16032-16041.

Lee, J. W. & J. D. Helmann, (2006) The PerR transcription factor senses H_2O_2 by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature* **440**: 363-367.

Lee, J. W. & J. D. Helmann, (2007) Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**: 485-499.

Legrain, M., V. Mazarin, S. W. Irwin, B. Bouchon, M. J. Quentinmillet, E. Jacobs & A. B. Schryvers, (1993) Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferrin-binding proteins Tbp1 and Tbp2. *Gene* **130**: 73-80.

Lei, B. F., M. Y. Liu, C. I. Prater, S. V. Kala, F. R. DeLeo & J. M. Musser, (2003) Identification and characterization of HtsA, a second heme-binding protein made by *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* **71**: 5962-5969.

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

Leistner, L., (1992) Food preservation by combined methods. *Food Res. Int.* **25**: 151-158.

Leroi, F., (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology* **27**: 698-709.

Letain, T. E. & K. Postle, (1997) TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **24**: 271-283.

Létoffé, S., P. Delepelaire & C. Wandersman, (2006) The housekeeping dipeptide permease is the *Escherichia coli* heme transporter and functions with two optional peptide binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 12891-12896.

Létoffé, S., P. Delepelaire & C. Wandersman, (2008) Functional differences between heme permeases: *Serratia marcescens* HemTUV permease exhibits a narrower substrate specificity (restricted to heme) than the *Escherichia coli* DppABCDF peptide-heme permease. *J. Bacteriol.* **190**: 1866-1870.

Létoffé, S., G. Heuck, P. Delepelaire, N. Lange & C. Wandersman, (2009) Bacteria capture iron from heme by keeping tetrapyrrol skeleton intact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 11719-11724.

Lewis, L. A. & D. W. Dyer, (1995) Identification of an iron-regulated outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis* involved in the utilization of hemoglobin complexed to haptoglobin. *J. Bacteriol.* **177**: 1299-1306.

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

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

Light, W. R. & J. S. Olson, (1990) Transmembrane movement of heme. *J. Biol. Chem.* **265**: 15623-15631.

Ling, J. M. L., C. H. Shima, D. C. Schriemer & A. B. Schryvers, (2010) Delineating the regions of human transferrin involved in interactions with transferrin binding protein B from *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **77**: 1301-1314.

Liu, M., W. N. Tanaka, H. Zhu, G. Xie, D. M. Dooley & B. Lei, (2008) Direct hemin transfer from IsdA to IsdC in the iron-regulated surface determinant (Isd) heme acquisition system of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **283**: 6668-6676.

Liu, M. Y. & B. F. Lei, (2005) Heme transfer from streptococcal cell surface protein Shp to HtsA of transporter HtsABC. *Infect. Immun.* **73**: 5086-5092.

Loomis, L. D. & K. N. Raymond, (1991) Solution equilibria of enterobactin and metal enterobactin complexes. *Inorg. Chem.* **30**: 906-911.

López-Gomollón, S., E. Sevilla, M. T. Bes, M. L. Peleato & M. F. Fillat, (2009) New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. *Biochem. J.* **418**: 201-207.

Lucarelli, D., S. Russo, E. Garman, A. Milano, W. Meyer-Klaucke & E. Pohl, (2007) Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **282**: 9914-9922.

Lucke, F. K., (2000) Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* **56**: 105-115.

Ma, J. F., U. A. Ochsner, M. G. Klotz, V. K. Nanayakkara, M. L. Howell, Z. Johnson, J. E. Posey, M. L. Vasil, J. J. Monaco & D. J. Hassett, (1999) Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**: 3730-3742.

Ma, Z., F. E. Jacobsen & D. P. Giedroc, (2009) Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. *Chem. Rev.* **109**: 4644-4681.

MacLeod, R. A., (1952) The toxicity of o-phenanthroline for Lactic Acid Bacteria. *J. Biol. Chem.* **197**: 751-761.

Maleret, C., R. Lauret, S. D. Ehrlich, F. Morel-Deville & M. Zagorec, (1998) Disruption of the sole *IdhL* gene in *Lactobacillus sakei* prevents the production of both L- and D-Iactate. *Microbiology* **144**: 3327-3333.

Marceau, A., M. Zagorec, S. Chaillou, T. Mera & M. C. Champomier Vergès, (2004) Evidence for involvement of at least six proteins in adaptation of *Lactobacillus sakei* to cold temperatures and addition of NaCl. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 7260-7268.

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

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

Mashburn, L. M., A. M. Jett, D. R. Akins & M. Whiteley, (2005) *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *J. Bacteriol.* **187**: 554-566.

Masmoudi, S., M. Denis & S. Maalej, (2011) Inactivation of the gene *kat*A or *sod*A affects the transient entry into the viable but non-culturable response of *Staphylococcus aureus* in natural seawater at low temperature. *Mar. Pollut. Bull.* **60**: 2209-2214.

Massé, E. & S. Gottesman, (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 4620-4625.

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

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

McBride, N. T. M., S. A. Hogan & J. P. Kerry, (2007) Comparative addition of rosemary extract and additives on sensory and antioxidant properties of retail packaged beef. *Int. J. Food Sci. Technol.* **42**: 1201-1207.

McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper & S. C. Andrews, (2003) Global iron-dependent gene regulation in

Escherichia coli - A new mechanism for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**: 29478-29486.

McLeod, A., O. L. Nyquist, L. Snipen, K. Naterstad & L. Axelsson, (2008) Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst. Appl. Microbiol.* **31**: 393-403.

Miethke, M. & M. A. Marahiel, (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **71**: 413-+.

Mirleau, P., S. Delorme, L. Philippot, J. M. Meyer, S. Mazurier & P. Lemanceau, (2000) Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**: 35-44.

Modun, B., R. W. Evans, C. L. Joannou & P. Williams, (1998) Receptor-mediated recognition and uptake of iron from human transferrin by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* **66**: 3591-3596.

Modun, B., D. Kendall & P. Williams, (1994) *Staphylococci* express a receptor for human transferrin - Identification of a 42-kiloDalton cell-wall transferrin-binding protein. *Infect. Immun.* **62**: 3850-3858.

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

Moeck, G. S. & J. W. Coulton, (1998) TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Mol. Microbiol.* **28**: 675-681.

Mongkolsuk, S. & J. D. Helmann, (2002) Regulation of inducible peroxide stress responses. *Mol. Microbiol.* **45**: 9-15.

Montel, M. C., (1985) Argine break down for *Lactobacilli* of meat origin. *Sci. Aliments* **5**: 39-44.

Moore, C. M. & J. D. Helmann, (2005) Metal ion homeostasis in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**: 188-195.

Moore, C. M., M. M. Nakano, T. Wang, R. W. Ye & J. D. Helmann, (2004) Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside. *J. Bacteriol.* **186**: 4655-4664.

Moos, T. & E. H. Morgan, (2000) Transferrin and transferrin receptor function in brain barrier systems. *Cell. Mol. Neurobiol.* **20**: 77-95.

Morgan, J. W. & E. Anders, (1980) Chemical composition of Earth, Venus, and Mercury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**: 6973-6977.

Morrissey, J. A., A. Cockayne, J. Hammacott, K. Bishop, A. Denman-Johnson, P. J. Hill & P. Williams, (2002) Conservation, surface exposure, and *in vivo* expression of the Frp family of iron-regulated cell wall proteins in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **70**: 2399-2407.

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

Morrissey, P. A., P. J. A. Sheehy, K. Galvin, J. P. Kerry & D. J. Buckley, (1998) Lipid stability in meat and meat products. *Meat Sci.* **49**: S73-S86.

Morton, D. J., T. W. Seale, L. O. Bakaletz, J. A. Jurcisek, A. Smith, T. M. VanWagoner, P. W. Whitby & T. L. Stull, (2009) The heme-binding protein (HbpA) of *Haemophilus influenzae* as a virulence determinant. *Int. J. Med. Microbiol.* **299**: 479-488.

Moschonas, G., D. J. Bolton, J. J. Sheridan & D. A. McDowell, (2009) Isolation and sources of 'blown pack' spoilage clostridia in beef abattoirs. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 616-624.

Myers, C. R. & J. M. Myers, (2004) The outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1 are lipoproteins. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**: 466-470.

Nachin, L., M. El Hassouni, L. Loiseau, D. Expert & F. Barras, (2001) SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol. Microbiol.* **39**: 960-972.

Najjari, A., H. Ouzari, A. Boudabous & M. Zagorec, (2008) Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *Int. J. Food Microbiol.* **121**: 342-351.

Nastasijevic, I., R. Mitrovic & S. Buncich, (2009) The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on faeces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Sci.* **82**: 101-105.

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

Nesbit, A. D., J. L. Giel, J. C. Rose & P. J. Kiley, (2009) Sequence-specific binding to a subset of IscR-regulated promoters does not require IscR Fe-S cluster ligation. *J. Mol. Biol.* **387**: 28-41.

Ochoa, T. J. & T. G. Cleary, (2009) Effect of lactoferrin on enteric pathogens. *Biochimie* **91**: 30-34.

Outten, C. E. & T. V. O'Halloran, (2001) Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**: 2488-2492.

Outten, C. E., D. A. Tobin, J. E. Penner-Hahn & T. V. O'Halloran, (2001) Characterization of the metal receptor sites in *Escherichia coli* Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein. *Biochemistry* **40**: 10417-10423.

Outten, F. W., O. Djaman & G. Storz, (2004) A *suf* operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **52**: 861-872.

Padilla, D., F. Real, V. Gomez, E. Sierra, B. Acosta, S. Deniz & F. Acosta, (2005) Virulence factors and pathogenicity of *Hafnia alvei* for gilthead seabream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Dis.* **28**: 411-417.

Pandey, A., F. Bringel & J. M. Meyer, (1994) Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 735-739.

Park, R. Y., H. Y. Sun, M. H. Choi, Y. H. Bai & S. H. Shin, (2005) *Staphylococcus aureus* siderophore-mediated iron-acquisition system plays a dominant and essential role in the utilization of transferrin-bound iron. *Journal of Microbiology* **43**: 183-190.

Park, S. J., J. H. Chang, S. K. Cha & G. S. Moon, (2008) Microbiological analysis of dongchimi, Korean watery radish kimchi, at the early and mid-phase fermentation. *Food Science and Biotechnology* **17**: 892-894.

Patzer, S. I. & V. Braun, (2010) Gene cluster involved in the biosynthesis of Griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces sp* ATCC 700974. *J. Bacteriol.* **192**: 426-435.

Patzer, S. I. & K. Hantke, (1998) The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **28**: 1199-1210.

Patzer, S. I. & K. Hantke, (1999) SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**: 3307-3309.

Patzer, S. I. & K. Hantke, (2000) The zinc-responsive regulator Zur and its control of the *znu* gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 24321-24332.

Pecqueur, L., B. D'Autreaux, J. Dupuy, Y. Nicolet, L. Jacquamet, B. Brutscher, I. Michaud-Soret & B. Bersch, (2006) Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and x-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **281**: 21286-21295.

Pedersen, M. B., C. Garrigues, K. Tuphile, C. Brun, K. Vido, M. Bennedsen, H. Mollgaard, P. Gaudu & A. Gruss, (2008) Impact of aeration and heme-activated respiration on

Lactococcus lactis gene expression: Identification of a heme-responsive operon. *J. Bacteriol.* **190**: 4903-4911.

Perkins-Balding, D., M. Ratliff-Griffin & I. Stojiljkovic, (2004) Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**: 154-+.

Perry, R. D. & R. R. Brubaker, (1979) Accumulation of iron by *Yersiniae*. *J. Bacteriol.* **137**: 1290-1298.

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

Pilpa, R. M., S. A. Robson, V. A. Villareal, M. L. Wong, M. Phillips & R. T. Clubb, (2009) Functionally distinct NEAT (NEAr Transporter) domains within the *Staphylococcus aureus* IsdH/HarA protein extract heme from methemoglobin. *J. Biol. Chem.* **284**: 1166-1176.

Pishchany, G., S. E. Dickey & E. P. Skaar, (2009) Subcellular localization of the *Staphylococcus aureus* heme iron transport components IsdA and IsdB. *Infect. Immun.* **77**: 2624-2634.

Platero, R., V. de Lorenzo, B. Garat & E. Fabiano, (2007) *Sinorhizobium meliloti* Fur-like (Mur) protein binds a fur box-like sequence present in the *mntA* promoter in a manganese-responsive manner. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4832-4838.

Pohl, E., J. C. Haller, A. Mijovilovich, W. Meyer-Klaucke, E. Garman & M. L. Vasil, (2003) Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* **47**: 903-915.

Postle, K., (1993) TonB protein and energy transduction between membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**: 591-601.

Pulliainen, A. T., A. Kauko, S. Haataja, A. C. Papageorgiou & J. Finne, (2005) Dps/Dpr ferritin-like protein: insights into the mechanism of iron incorporation and evidence for a central role in cellular iron homeostasis in *Streptococcus suis*. *Mol. Microbiol.* **57**: 1086-1100.

Qin, J. J., R. Q. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. H. Li, J. M. Xu, S. C. Li, D. F. Li, J. J. Cao, B. Wang, H. Q. Liang, H. S. Zheng, Y. L. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J. M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. M. Zhu, C. Yu, S. T. Li, M. Jian, Y. Zhou, Y. R. Li, X. Q. Zhang, S. G. Li, N. Qin, H. M. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Dore, F. Guarner, K. Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, P. Bork & S. D. Ehrlich, (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**: 59-U70.

Ralph, E. T., C. Scott, P. A. Jordan, A. J. Thomson, J. R. Guest & J. Green, (2001) Anaerobic acquisition of [4Fe 4S] clusters by the inactive FNR(C20S) variant and restoration of activity by second-site amino acid substitutions. *Mol. Microbiol.* **39**: 1199-1211.

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

Rea, R., C. Hill & C. G. M. Gahan, (2005) *Listeria monocytogenes* PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8314-8322.

Retzer, M. D., R. H. Yu & A. B. Schryvers, (1999) Identification of sequences in human transferrin that bind to the bacterial receptor protein, transferrin-binding protein B. *Mol. Microbiol.* **32**: 111-121.

Rezaiki, L., B. Cesselin, Y. Yamamoto, K. Vido, E. van West, P. Gaudu & A. Gruss, (2004) Respiration metabolism reduces oxidative and acid stress to improve long-term survival of *Lactococcus lactis*. *Mol. Microbiol.* **53**: 1331-1342.

Rouf, M. A., (1964) Spectrochemical analysis of Inorganic elements in Bacteria. *J. Bacteriol.* **88**: 1545-1549.

Rubio, L. M. & P. W. Ludden, (2008) Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**: 93-111.

Samelis, J., F. Maurogenakis & J. Metaxopoulos, (1994) Characterization of Lactic Acid Bacteria isolated from naturally fermented greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 179-196.

Schillinger, U., B. Boehringer, S. Wallbaum, L. Caroline, A. Gonfa, M. Huch, W. H. Holzapfel & C. Franz, (2008) A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. *FEMS Microbiol. Lett.* **286**: 222-226.

Schmitt, M. P., (1997) Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: Identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *J. Bacteriol.* **179**: 838-845.

Schmitt, M. P. & E. S. Drazek, (2001) Construction and consequences of directed mutations affecting the hemin receptor in pathogenic *Corynebacterium species*. *J. Bacteriol.* **183**: 1476-1481.

Schröder, I., E. Johnson & S. de Vries, (2003) Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**: 427-447.

Schryvers, A. B. & L. J. Morris, (1988) Identification and characterization of the transferrin receptor from *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* **2**: 281-288.

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

Schwartz, C. J., J. L. Giel, T. Patschkowski, C. Luther, F. J. Ruzicka, H. Beinert & P. J. Kiley, (2001) IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 14895-14900.

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

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

Senkovich, O., S. Ceaser, D. J. McGee & T. L. Testerman, (2010) Unique host iron utilization mechanisms of *Helicobacter pylori* revealed with iron-deficient chemically defined media. *Infect. Immun.* **78**: 1841-1849.

Sharp, K. H., S. Schneider, A. Cockayne & M. Paoli, (2007) Crystal structure of the heme-IsdC complex, the central conduit of the Isd iron/heme uptake system in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **282**: 10625-10631.

Sheikh, M. A. & G. L. Taylor, (2009) Crystal structure of the *Vibrio cholerae* ferric uptake regulator (Fur) reveals insights into metal co-ordination. *Mol. Microbiol.* **72**: 1208-1220.

Siburt, C. J. P., P. L. Roulhac, K. D. Weaver, J. M. Noto, T. A. Mietzner, C. N. Cornelissen, M. C. Fitzgerald & A. L. Crumbliss, (2009) Hijacking transferrin bound iron: protein-receptor interactions involved in iron transport in *Neisseria gonorrhoeae*. *Metallomics* **1**: 249-255.

Simon, L., C. Fremaux, Y. Cenatiempo & J. M. Berjeaud, (2002) Sakacin G, a new type of antilisterial bacteriocin. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 6416-6420.

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

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

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

Skaar, E. P. & O. Schneewind, (2004) Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes Infect.* **6**: 390-397.

Small, A., C. James, S. James, R. Davies, E. Liebana, M. Howell, M. Hutchison & S. Buncic, (2006) Presence of *Salmonella* in the red meat abattoir lairage after routine cleansing and disinfection and on carcasses. *J. Food Prot.* **69**: 2342-2351.

Smith, A., N. I. Hooper, N. Shipulina & W. T. Morgan, (1996) Heme binding by a bacterial repressor protein, the gene product of the ferric uptake regulation (*fur*) gene of *Escherichia coli*. *J. Protein Chem.* **15**: 575-583.

Smith, J. L., (2004) The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**: 173-185.

Sobrino, O. J., J. M. Rodriguez, W. L. Moreira, L. M. Cintas, M. F. Fernandez, B. Sanz & P. E. Hernandez, (1992) Sakacin M, a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sake* 148. *Int. J. Food Microbiol.* **16**: 215-225.

Sook, B. R., D. R. Block, S. Sumithran, G. E. Montanez, K. R. Rodgers, J. H. Dawson, Z. Eichenbaum & D. W. Dixon, (2008) Characterization of SiaA, a streptococcal heme-binding protein associated with a heme ABC transport system. *Biochemistry* **47**: 2678-2688.

Stauff, D. L., D. Bagaley, V. J. Torres, R. Joyce, K. L. Anderson, L. Kuechenmeister, P. M. Dunman & E. P. Skaar, (2008) *Staphylococcus aureus* HrtA is an ATPase required for protection against heme toxicity and prevention of a transcriptional heme stress response. *J. Bacteriol.* **190**: 3588-3596.

Stauff, D. L. & E. P. Skaar, (2009) *Bacillus anthracis* HssRS signalling to HrtAB regulates haem resistance during infection. *Mol. Microbiol.* **72**: 763-778.

Stauff, D. L., V. J. Torres & E. P. Skaar, (2007) Signaling and DNA-binding activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS two-component system required for heme sensing. *J. Biol. Chem.* **282**: 26111-26121.

Stiles, M. E., (1996) Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **70**: 331-345.

Stiles, M. E. & W. H. Holzapfel, (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**: 1-29.

Stojiljkovic, I. & K. Hantke, (1992) Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica* - Similarities with other TonB-dependent systems in Gram negative bacteria. *EMBO J.* **11**: 4359-4367.

Stojiljkovic, I., V. Kumar & N. Srinivasan, (1999) Non-iron metalloporphyrins: potent antibacterial compounds that exploit haem/Hb uptake systems of pathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **31**: 429-442.

Strange, H. R., T. A. Zola & C. N. Cornelissen, (2011) The *fbpABC* operon is required for Ton-independent utilization of xenosiderophores by *Neisseria gonorrhoeae* strain FA19. *Infect. Immun.* **79**: 267-278.

Stull, T. L., (1987) Protein sources of heme for *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **55**: 148-153.

Talon, R., S. Leroy, I. Lebert, P. Giammarinaro, J. P. Chacornac, M. Latorre-Moratalla, C. Vidal-Carou, E. Zanardi, M. Conter & A. Lebecque, (2008) Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 227-234.

Tarlovsky, Y., M. Fabian, E. Solomaha, E. Honsa, J. S. Olson & A. W. Maresso, (2010) A *Bacillus anthracis* S-layer homology protein that binds heme and mediates heme delivery to IsdC. *J. Bacteriol.* **192**: 3503-3511.

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

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

Tichaczek, P. S., R. F. Vogel & W. P. Hammes, (1994) Cloning and Sequencing of *sakP* encoding Sakacin P, the bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* LTH673. *Microbiology-Uk* **140**: 361-367.

Tolosano, E. & F. Altruda, (2002) Hemopexin: Structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol.* **21**: 297-306.

Ton-That, H., L. A. Marraffini & O. Schneewind, (2004) Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* **1694**: 269-278.

Tong, Y. & M. Guo, (2009) Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Arch. Biochem. Biophys.* **481**: 1-15.

Tong, Y. & M. L. Guo, (2007) Cloning and characterization of a novel periplasmic heme-transport protein from the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **12**: 735-750.

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

Torres, V. J., D. L. Stauff, G. Pishchany, J. S. Bezbradica, L. E. Gordy, J. Iturregui, K. L. Anderson, P. M. Dunman, S. Joyce & E. P. Skaar, (2007) A *Staphylococcus aureus* regulatory system that responds to host heme and modulates virulence. *Cell Host Microbe* **1**: 109-119.

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

Traore, D. A. K., A. El Ghazouani, S. Ilango, J. Dupuy, L. Jacquamet, J. L. Ferrer, C. Caux-Thang, V. Duarte & J. M. Latour, (2006) Crystal structure of the apo-PerR-Zn protein from *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **61**: 1211-1219.

Truper, H. G. & L. DeClari, (1997) Taxonomic note: Necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 908-909.

Turner, M. S., Y. P. Tan & P. M. Giffard, (2007) Inactivation of an iron transporter in *Lactococcus lactis* results in resistance to tellurite and oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6144-6149.

van Vliet, A. H. M., J. M. Ketley, S. F. Park & C. W. Penn, (2002) The role of iron in *Campylobacter* gene regulation, metabolism and oxidative stress defense. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**: 173-186.

Vanderpool, C. K. & S. K. Armstrong, (2001) The *Bordetella bhu* locus is required for heme iron utilization. *J. Bacteriol.* **183**: 4278-4287.

Vartivarian, S. E. & R. E. Cowart, (1999) Extracellular iron reductases: Identification of a new class of enzymes by siderophore-producing microorganisms. *Arch. Biochem. Biophys.* **364**: 75-82.

Vaughan, A., J. O. Mahony, V. G. H. Eijsink, M. O'Connell-Motherway & D. van Sinderen, (2004) Transcriptional analysis of bacteriocin production by malt isolate *Lactobacillus sakei* 5. *FEMS Microbiol. Lett.* **235**: 377-384.

Vermeiren, C. L., M. Pluym, J. Mack, D. E. Heinrichs & M. J. Stillman, (2006a) Characterization of the heme binding properties of *Staphylococcus aureus* IsdA. *Biochemistry* **45**: 12867-12875.

Vermeiren, L., F. Devlieghere, I. Vandekinderen & J. Debevere, (2006b) The interaction of the non-bacteriocinogenic *Lactobacillus sakei* 10A and lactocin S producing *Lactobacillus sakei* 148 towards *Listeria monocytogenes* on a model cooked ham. *Food Microbiology* **23**: 511-518.

Verneuil, N., A. Rince, M. Sanguinetti, B. Posteraro, G. Fadda, Y. Auffray, A. Hartke & J. C. Giard, (2005) Contribution of a PerR-like regulator to the oxidative-stress response and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Microbiology-Sgm* **151**: 3997-4004.

Vignolo, G., S. Fadda & P. Castellano, (2008) Bioprotective cultures. In: Meat Biotechnology. F. Toldrà (ed). USA: Springer, pp. 399-424.

Vihavainen, E. & J. Bjorkroth, (2009) *Leuconostoc gasicomitatum*, an ubiquitous spoilage lactic acid bacterium. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene* **60**: 52-55.

Vonder Haar, R. A., M. Legrain, H. V. J. Kolbe & E. Jacobs, (1994) Characterization of a highly structured domain in Tbp2 from *Neisseria meningitidis* involved in binding to human transferrin. *J. Bacteriol.* **176**: 6207-6213.

Wallis, M. A. & R. L. Griffin, (1973) A routine method for embedding animal tissues in Spurr resin for electron microscopy. *J. Clin. Pathol.* **26**: 77-78.

Walter, J., C. Hertel, G. W. Tannock, C. M. Lis, K. Munro & W. P. Hammes, (2001) Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2578-2585.

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

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

Weinberg, E. D., (1978) Iron and infection. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **42**: 45-66.

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

Williams, N. T., (2010) Probiotics. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* **67**: 449-458.

Woloszczuk, W., D. B. Sprinson & H. Ruis, (1980) The relation of heme to catalase apoprotein synthesis in yeast. *J. Biol. Chem.* **255**: 2624-2627.

Wrzesinski, M., J. Nieminuszczy, A. Sikora, D. Mielecki, A. Chojnacka, M. Kozlowski, J. Krwawicz & E. Grzesiuk, (2010) Contribution of transcription-coupled DNA repair to MMS-induced mutagenesis in *E. coli* strains deficient in functional AlkB protein. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **688**: 19-27.

Wu, R. Y., E. P. Skaar, R. G. Zhang, G. Joachimiak, P. Gornicki, O. Schneewind & A. Joachimiak, (2005) *Staphylococcus aureus* IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes with structural similarity to monooxygenases. *J. Biol. Chem.* **280**: 2840-2846.

Xiong, A. M., V. K. Singh, G. Cabrera & R. K. Jayaswal, (2000) Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, Fur, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology-Sgm* **146**: 659-668.

Yu, R. H. & A. B. Schryvers, (1993) The Interaction between human transferrin and transferrin binding protein-2 from *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* differs from that of other human pathogens. *Microb. Pathog.* **15**: 433-445.

Zhu, H., M. Y. Liu & B. F. Lei, (2008a) The surface protein Shr of *Streptococcus pyogenes* binds heme and transfers it to the streptococcal heme-binding protein Shp. *BMC Microbiol.* **8**.

Zhu, H., G. Xie, M. Y. Liu, J. S. Olson, M. Fabian, D. M. Dooley & B. F. Lei, (2008b) Pathway for heme uptake from human methemoglobin by the iron-regulated surface determinants system of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **283**: 18450-18460.

Zou, P.-j., I. Borovok, D. O. de Orue Lucana, D. Muller & H. Schrempf, (1999) The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS. *Microbiology* **145**: 549-559.

Zuniga, M., M. Champomier Vergès, M. Zagorec & G. Perez-Martinez, (1998) Structural and functional analysis of the gene cluster encoding the enzymes of the arginine deiminase pathway of *Lactobacillus sake*. *J. Bacteriol.* **180**: 4154-4159.

Métabolisme du fer et de l'hème chez *Lactobacillus sakei*

Lactobacillus sakei est une bactérie lactique qui fait partie de la flore dominante de la viande. Elle possède un équipement génétique inhabituel chez les bactéries lactiques, dédié à l'utilisation du fer : des transporteurs et 3 régulateurs de transcription fer-dépendants de la famille Fur. Nous avons *i*) évalué la capacité de *L. sakei* à utiliser les sources de fer de son environnement en développant une méthode de microanalyse du fer par microscopie (EELS) et spectrométrie de masse (Nano-SIMS), *ii*) réalisé une étude fonctionnelle des 3 régulateurs Fur-like et *iii*) réalisé une analyse transcriptomique globale en présence de transferrine ou d'hème. Ce travail a montré que le fer sous forme complexé, transferrine ou hème, était internalisé et améliorait la survie de *L. sakei*. Nous avons montré que la catalase hème-dépendante n'est pas l'acteur principal de cette survie car un mutant Δ*katA* survit comme la souche sauvage en présence d'hème. Nos travaux ont montré aussi que le fer et l'hème induisent des réponses globales différentes. L'hème a un effet protecteur alors que le fer induit plus de stress. Nous avons mis en évidence que les 3 régulateurs Fur-like sont fonctionnellement distincts. Le régulateur Mur est impliqué dans l'homéostasie du manganèse, le PerR régule des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydant et le Fur est impliqué dans la séquestration du fer, la morphologie des cellules et la résistance au stress. Cette étude montre que le fer et l'hème conduisent à des réponses cellulaires différentes chez *L. sakei* et indique que ce métabolisme pourrait être un facteur important pour la compétitivité dans l'écosystème carné.

Mots clés : bactéries lactiques, microscopie, fer, transcriptome.

Heme and iron metabolism in *Lactobacillus sakei*

Lactobacillus sakei is a meat-borne lactic acid bacteria. This species harbors a quite complete genetic equipment dedicated to iron utilization such putative iron transporters and 3 transcriptional iron-dependent regulators of the Fur family. We evaluate *L. sakei* ability to use iron sources encountered in its natural environment by *i*) developing an iron microanalysis method coupling microscopy (EELS) and mass spectrometry (Nano-SIMS), *ii*) functional study of the 3 Fur-like regulators and *iii*) global transcriptomic analysis in response to transferrin or heme. This work shows that iron in complexed forms (transferrin or heme) is internalized and leads to an enhanced survival in *L. sakei* cells. We show that the heme-dependant catalase is not the main factor implicated in this survival phenotype as the Δ*katA* strain is not affected in its survival when heme is provided. Our work has revealed that heme and iron lead to different global responses. It also indicates a protecting effect of heme whereas transferrin induces stress. We show that the 3 Fur-like regulators belong to three functional families. The Mur regulator is implicated in manganese homeostasis, the PerR regulates genes implicated in the oxidative stress response and the Fur is implicated in iron storage, cells morphology and stress resistance. This study proves that heme and iron lead to different cellular responses in *L. sakei* and indicates that this metabolism could be an important adaptative factor in meat ecosystem.

Key words : lactic acid bacteria, microscopy, iron, transcriptomic.