

Etude du système de communication cellulaire NprR-NprX au sein du groupe Bacillus cereus

Thomas Dubois

▶ **To cite this version:**

Thomas Dubois. Etude du système de communication cellulaire NprR-NprX au sein du groupe Bacillus cereus. Sciences agricoles. AgroParisTech, 2012. Français. NNT : 2012AGPT0010 . pastel-00770265

HAL Id: pastel-00770265
https://pastel.hal.science/pastel-00770265

Submitted on 7 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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

Thomas DUBOIS

Etude du système de communication cellulaire NprR-NprX au sein du groupe *Bacillus cereus*

Directeur de thèse : **Didier LERECLUS**

Jury :

Mme Isabelle MARTIN-VERSTRAETE, Pr, Bactéries Anaérobies et Toxines, Institut Pasteur, Paris 7	Présidente
M. Alain GIVAUDAN, DR, EMIP, INRA-UM 2, Montpellier	Rapporteur
Mme Pascale SERROR, CR, Institut MICALIS, INRA, Jouy en Josas	Rapporteur
M. Patrick STRAGIER, DR, IBPC, CNRS-Université Paris Diderot, Paris 7	Examinateur
M. Gilles VERGNAUD, Chercheur DGA/DEC/CEB, IGM, CNRS-Université Paris Sud 11 , Orsay	Examinateur
M. Didier LERECLUS, DR, Institut MICALIS, INRA, Jouy en Josas	Directeur de thèse

AgroParisTech
Institut MICALIS
Domaine de Vilvert – 78350 JOUY EN JOSAS

Remerciements

Ca y est. J'ai terminé. Il ne me reste plus qu'à rédiger la page des remerciements qui est connue pour avoir un très fort impact factor ! Je vais donc essayer de n'oublier personne.

Je tiens en premier lieu à remercier les membres du jury qui ont consenti à évaluer mon travail : Isabelle Martin-Verstraete qui a accepté de présider le jury, Pascale Serror et Alain Givaudan qui ont jugé ce travail en qualité de rapporteurs ainsi que Patrick Stragier et Gilles Vergnaud pour leur travail d'examinateurs.

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à Didier. Malgré ton emploi du temps de ministre, tu as suivi mon travail avec attention et tu as toujours été présent lorsque j'ai gratté à ta porte. Merci chef !

Un grand MERCI à Stéphane pour son aide inconditionnelle tout au long de mon séjour à la minière. Grâce à ta formation aux bonnes pratiques de la main bleue, je ne pouvais que réussir ! Je te remercie pour ta disponibilité, tes conseils…et tout le reste !

Je remercie chaleureusement tous mes autres collègues qui contribuent à l'ambiance chaleureuse de la bonne mine. Je n'oublierai pas Michel pour ses conseils avisés et pour tous les débats qui ont animé nos pauses cacahouètes. Grâce à toi, ma cave est pleine des meilleurs crus de Sauternes ! Je remercie également Nalini pour m'avoir appris comment négocier. L'exemple du meuble bleu restera dans ma mémoire comme un modèle en la matière ! Merci à Nath, Chanchan (et ses conseils de maman), Elisabeth (pour ses bons gâteaux), Agnès, Christina, Alain, Vincent, Eugénie, Leyla, Isabelle, Christophe (pour la bière du vendredi), Câlinette, Ludo (et ses blagues…mauvaises au point qu'elles en deviennent brillantes). Un grand merci à Catherine pour avoir trouvé le financement qui m'a permis de terminer cette thèse sereinement. J'ai également une pensée pour Mymy de Pasteur qui m'a gentiment initié aux joies de la radioactivité. Merci aux stagiaires, doctorants et post-doc qui ont animé le laboratoire de leurs pas pressés, rires et cris en tout genre : Laurent et Nadine, Céline, Seav-ly (la guerrière au grand cœur), Thomas sénior, Elise, Rita, Abass, Imène, Diego, Emilie, Maud, Ali, Camille. Un petit clin d'œil à ma stagiaire, Véronique, qui a dû subir mon encadrement tyrannique pendant trois mois.

Je remercie l'ensemble de mes proches, amis et famille, pour m'avoir soutenu pendant toute la durée de mes études. Merci à ma maman pour son soutient logistique et à mon papa pour la relecture du manuscrit.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour ma collègue la plus proche… Je ne pourrais pas établir une liste de tous ce que tu as fait pour améliorer mon quotidien ces derniers mois. Merci pour tout ma chérie. Cette fin de thèse n'aurait pas été la même sans toi.

Merci à tous

Sommaire

Introduction bibliographique **1**

Chapitre I – Le groupe *Bacillus cereus* **2**

1. Généralités **2**

1.1. Biologie 2

1.2. Phylogénie 3

2. Ecologie de *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis* **4**

2.1. Réservoir 4

2.2. Cycles infectieux et transmission de l'infection. 5

2.2.1. Bacillus anthracis 5

2.2.2. Bacillus thuringiensis 6

2.2.3. Bacillus cereus 7

2.2.4. Cycle endosymbiotique 7

3. Les facteurs de virulence **8**

3.1. Les facteurs spécifiques 8

3.1.1. pXO1 et pXO2 8

3.1.2. Les toxines insecticides 9

3.1.3. Le céréulide 11

3.2. Les facteurs chromosomiques 11

3.2.1. Les toxines formant des pores 12

3.2.2. Les phospholipases 13

3.2.3. Les protéases 13

3.3. Régulation de l'expression des facteurs de virulence 15

4. Les régulateurs clés de l'adaptation et de la virulence **15**

4.1. Spo0A 16

4.2. AbrB 17

4.3. SinR 19

4.4. Sigma-H 20

4.5. CodY 21

5. La sporulation **22**

5.1. Les différentes étapes de la sporulation 22

5.2. Régulation de la sporulation 22

Chapitre II - Communication cellulaire chez les bactéries à Gram positif..... 24

1. La famille RNPP..... 24

1.1. Rap..... 25

1.2. PlcR..... 26

1.3. PrgX..... 28

1.4. NprR..... 29

2. Vers un élargissement de la famille RNPP ?..... 30

3. Réimport des peptides de signalisation..... 31

4. La communication cellulaire chez les bactéries : est-il seulement question de quorum?. 32

4.1. Facteurs abiotiques..... 32

4.1.1. Hétérogénéité spatiale..... 32

4.1.2. Transfert de masse..... 32

4.1.3. Diffusion Sensing..... 33

4.2. Facteurs biotiques..... 34

4.2.1. Cross talk..... 34

4.2.2. Interférences..... 34

4.3. Vers le concept d'efficiency sensing..... 35

Résultats..... 36

Chapitre I - Caractérisation du système NprR-NprX..... 37

1. La transcription de *nprA* est régulée par un système de communication cellulaire. 37

2. Réimport du peptide de signalisation 39

2.1. Rôle de l'oligopeptide perméase Opp dans le réimport de NprX..... 39

2.2. NprX est réimporté par un second système d'oligopeptide perméase. 40

2.3. Identification des protéines liant les peptides qui réimportent NprX. 40

2.4. Régulation de la transcription des locus *opp* et *npp*. 41

Article 1 42

Chapitre II - Rôle physiologique de NprR 43

Article 2 45

Chapitre III - Régulation de l'expression des gènes *nprR* et *nprX* 46

Article 3 49

Discussion et perspectives 50

1. Caractérisation du système NprR-NprX 51

1.1. Export du peptide de signalisation NprX 51

1.2. Maturation de NprX 51

1.3. Réimport de NprX dans la cellule bactérienne 52

1.4. Caractérisation structurale et fonctionnelle du régulateur NprR 54

1.5. Modèle de régulation du système NprR-NprX 55

2. Rôle physiologique de NprR. 56

2.1. Caractérisation du transcriptome de NprR 56

2.2. La kurstakine : une molécule de signalisation qui permet aux cellules bactériennes de se différencier ? 57

2.3. Modèle de régulation du cycle infectieux chez *B. thuringiensis* 60

3. Régulation de l'expression des gènes *nprR* et *nprX* 61

Références bibliographiques 63

Table des figures

Figure 1 Bacilles du groupe *B. cereus*. 2

Figure 2 Arbre phylogénétique du groupe *B. cereus*. 3

Figure 3 Cycles de vie des bactéries du groupe *B. cereus*. 4

Figure 4 Localisation de *B. thuringiensis* dans l'environnement. 6

Figure 5 Transmission horizontale de *B. thuringiensis*. 7

Figure 6 Structures tridimensionnelles des toxines insecticides produites par *B. thuringiensis*. 10

Figure 7 Mode d'action des toxines Cry et Cyt. 10

Figure 8 Le phosphorelais chez *B. subtilis*. 16

Figure 9 Spo0A régule l'expression des répresseurs AbrB et SinR. 17

Figure 10 Le régulon AbrB chez *B. subtilis*. 17

Figure 11 Schéma simplifié de l'opéron *sin* et de sa régulation. 19

Figure 12 Régulation de la mobilité et de la synthèse de la matrice des biofilms chez *B. subtilis*. 20

Figure 13 Régulation de la sporulation chez *B. subtilis*. 22

Figure 14 Structure des régulateurs de la famille RNPP. 24

Figure 15 Modèle d'évolution des régulateurs de la famille RNPP. 24

Figure 16 Modèle de régulation des systèmes Rap-Phr. 25

Figure 17 Structure de RapH chez *B. subtilis*. 26

Figure 18 Le régulon PlcR. 27

Figure 19 Modèle de régulation du système PlcR-PapR. 27

Figure 20 Organisation du locus *prg*. 28

Figure 21 Modèle de régulation du transfert conjugatif du plasmide pCF10. 28

Figure 22 Modèle de régulation de l'opéron *prgQRSTAB* par PrgX. 29

Figure 23 Modèle de régulation du système Rgg/Shp. 30

Figure 24 Schéma de la structure d'un système d'oligopeptide perméase. 31

Figure 25 Modèle du mécanisme de translocation des substrats par les ABC transporteurs dépendants d'une protéine liant les substrats. 31

Figure 26 Importance de la répartition spatiale des bactéries pour l'activation des systèmes de communication cellulaire. 32

Figure 27 Schéma résumant la théorie de diffusion sensing. 33

Figure 28 Modèle de régulation des gènes *luxCDABE* impliqués dans l'émission de lumière chez *V. harveyi*. 34

Figure 29 Organisation génétique des locus *opp* et *npp*. 39

Figure 30 Mesure de l'expression de la fusion transcriptionnelle chromosomique *nprA'Z*. 39

Figure 31 Mesure de l'expression de la fusion transcriptionnelle chromosomique *nprA'Z*. 40

Figure 32 Identification des régions promotrices du locus *npp*. 41

Figure 33 Effet de la délétion du gène *codY* sur la transcription des gènes *oppA* et *nppD* chez *B. subtilis*. 41

Figure 34 Séquence du pré-propeptide NprX. 52

Figure 35 Réimport de NprX dans la cellule bactérienne. 52

Figure 36 Structure du complexe NprR-NprX. 54

Figure 37 Structures soumises à une analyse par SAXS. 54

Figure 38 Modèle de régulation du système NprR-NprX. 55

Figure 39 Schéma de la voie de signalisation qui conduit à la production de la surfactine et de la matrice des biofilms chez *B. subtilis*. 58

Figure 40 Modèle du processus de différentiation de *B. thuringiensis* en phase stationnaire sous l'influence de NprX et de la kurstakine. 58

Figure 41 Expression séquentielle des régulateurs PlcR, NprR et Spo0A pendant le cycle infectieux de *B. thuringiensis*. 60

Figure 42 Modèle de régulation des gènes *nprR-nprX*. 61

Introduction bibliographique

Chapitre I – Le groupe *Bacillus cereus*

1. Généralités

1.1. Biologie

Le groupe *Bacillus cereus* est constitué de six espèces bactériennes : *Bacillus weihenstephanensis, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides, Bacillus thuringiensis, Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus.* Les bactéries du groupe *B. cereus* sont des bacilles de 1 à 3 µM de large et de 3 à 10 µM de long avec une paroi de type Gram positif (cf **Figure 1**). Ce sont des micro-organismes chimioorganohétérotrophes, aérobies stricts ou anaérobies facultatifs qui ont une température optimale de croissance située entre 25°C et 37°C (Drobniewski, 1993). Leur ADN présente un faible pourcentage en guanine et cytosine (environ 35%) (Ivanova *et al.*, 2003). Enfin, les membres du *groupe B. cereus* sont ubiquitaires dans l'environnement et sont isolés à partir des sols, de l'eau, de végétaux, d'animaux et d'aliments. Cette propriété est liée à la capacité de ces bactéries à former des spores dans des conditions environnementales défavorables. Les spores des bactéries du groupe *B. cereus* sont non déformantes et se situent en position centrale à subterminale. Cette forme « dormante » de la bactérie confère une résistance accrue à de nombreux stress tels que la chaleur, la dessiccation, le pH et les UV. Historiquement, les espèces du groupe *B. cereus* ont été classées à partir d'un nombre restreint de caractères (caractères macroscopiques et microscopiques, propriétés pathogènes, etc…). Les souches de *B. anthracis* forment une capsule et sont responsables de la maladie du charbon chez les mammifères (WHO, 2008). Les souches de *B. thuringiensis* produisent un cristal protéique parasporal composé de toxines actives sur une grande variété d'insectes et sur certains nématodes (Schnepf *et al.*, 1998). *B. cereus* est associé à des toxi-infections alimentaires et à des infections locales ou systémiques. *B. weihenstephanensis* regroupe des bactéries psychrotrophes capables de se développer à des températures inférieures à 7°C (Lechner *et al.*, 1998; Stenfors & Granum, 2001). *B. mycoïdes* et *B. pseudomycoïdes* se caractérisent par des colonies rhizoïdes sur milieu nutritif solide (Nakamura, 1998).

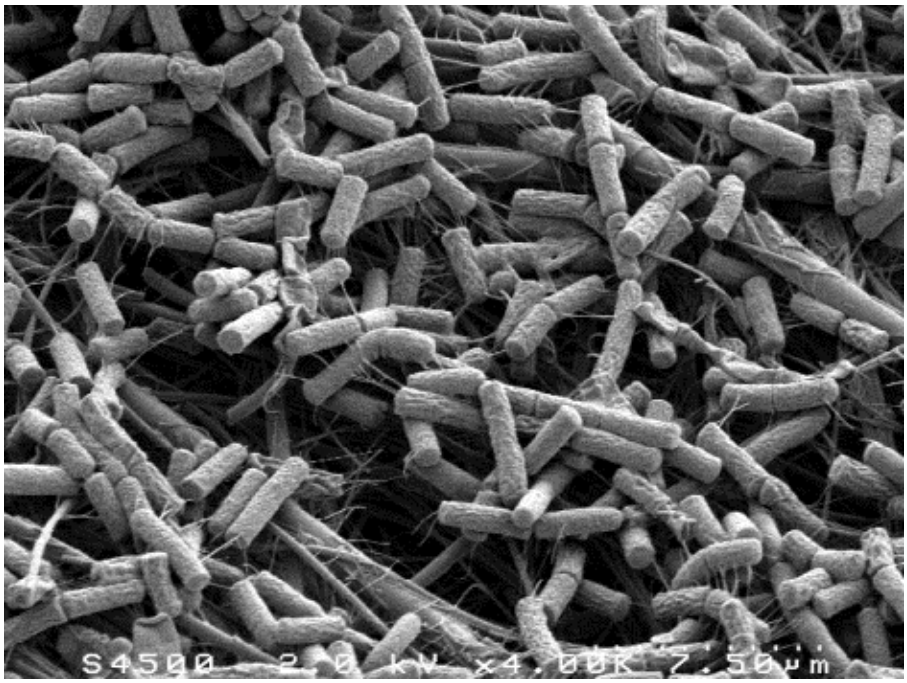


Figure 1 : Bacilles du groupe *B. cereus*.
(Photo : Houry, 2007)

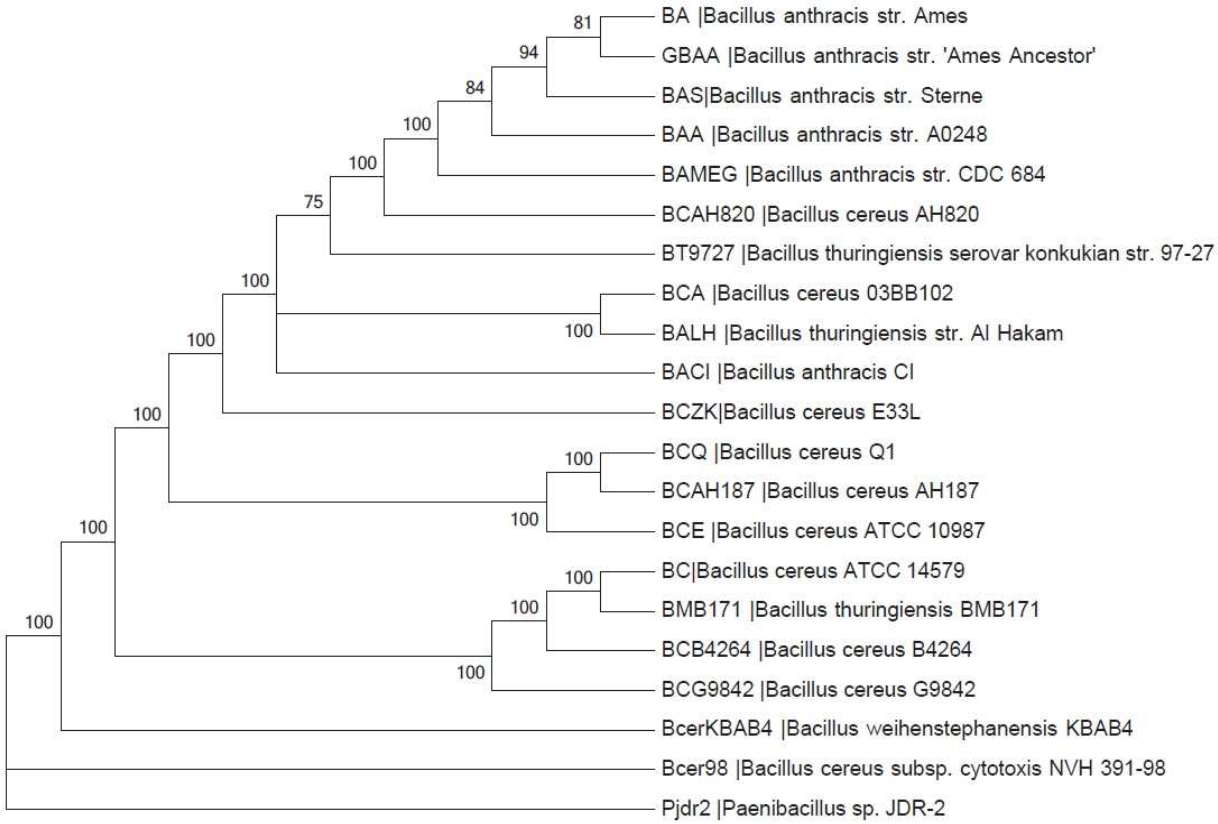


Figure 2 : Arbre phylogénétique du groupe *B. cereus*.
L'arbre a été construit en comparant 157 gènes présents en simple copie au sein du groupe *Bacillus cereus* et en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance.
(Schmidt et al., 2011)

1.2. énie g

Avec l'avénement de la biologie moléculaire, l'approche phénotypique de la classification des microorganismes a laissé place à une classification génotypique fondée sur l'étude des modifications des acides nucléiques des génomes. Cette dernière a complètement remis en question le concept d'espèce en microbiologie et la taxonomie bactérienne établie. Actuellement, la plupart des stratégies utilisées pour établir une relation phylogénétique entre des souches repose sur la comparaison des séquences d'ADN ribosomiaux (ADNr). Par exemple, Xu et coll ont identifié 10 groupes au sein des *Bacillaceae* sur la base des séquences ITS (**i**nternal **t**ranscribed **s**pacer) des ADNr 16S et 23S (Xu & Cote, 2003). Sept de ces groupes incluent des membres du genre *Bacillus*. La base de donnée RDB (**r**ibosomal **d**ata**b**ase project) (Cole *et al.*, 2009), qui regroupe les séquences d'ADNr disponibles, compte près de 14000 séquences d'ADNr pour les *Bacillaceae*. Si l'ADNr est un bon marqueur moléculaire pour distinguer des genres bactériens, il n'est pas assez résolutif pour différencier les espèces (Konstantinidis & Tiedje, 2007). Les méthodes de typage basées sur l'ADNr ne sont donc pas adaptées pour établir des liens d'espèces au sein du groupe *B. cereus*. De nombreuses études décrivent des méthodes moléculaires alternatives utilisées pour établir une relation phylogénétique entre les souches du groupe *B. cereus*. Des analyses à grande échelle ont notamment été conduites en utilisant la MLEE (MultiLocus Enzyme Electrophoresis) (Helgason *et al.*, 1998; Helgason *et al.*, 2000a; Helgason *et al.*, 2000b; Vilas-Boas *et al.*, 2002), la AFLP (Amplified Fragment LengthPolymorphism) (Guinebretiere *et al.*, 2008; Hill *et al.*, 2004; Ticknor *et al.*, 2001), la MLST (MultiLocus Sequence Typing) (Cardazzo *et al.*, 2008; Didelot *et al.*, 2009; Helgason *et al.*, 2004; Hoffmaster *et al.*, 2008; Ko *et al.*, 2004; Priest *et al.*, 2004; Sorokin *et al.*, 2006; Tourasse *et al.*, 2006) et plus récemment une combinaison de ces méthodes (Tourasse *et al.*, 2011). Ces différentes études révèlent que le groupe *B. cereus* forme un groupe phylogénétique dans lequel les membres de chaque espèce sont fréquemment mélangés (Guinebretiere *et al.*, 2008; Helgason *et al.*, 2000b; Helgason *et al.*, 2004; Hill *et al.*, 2004; Priest *et al.*, 2004; Sorokin *et al.*, 2006). Néanmoins, *B. anthracis, B. cereus* subsp. *cytotoxis* et *B. pseudomycoides* constituent des exceptions. Les souches de *B. anthracis* forment un groupe monophylétique et les souches de *B. cereus* subsp. *cytotoxis* et *B. pseudomycoïdes* forment un groupe divergent (Auger *et al.*, 2008; Fagerlund *et al.*, 2007; Lapidus *et al.*, 2008; Nakamura, 1998). Très récemment, une analyse phylogénétique utilisant les souches séquencées du groupe *B. cereus* a comparé 157 gènes conservés dans la famille des *Bacillaceae*. Cette étude a permis d'établir l'arbre phylogénétique présenté dans la **Figure**

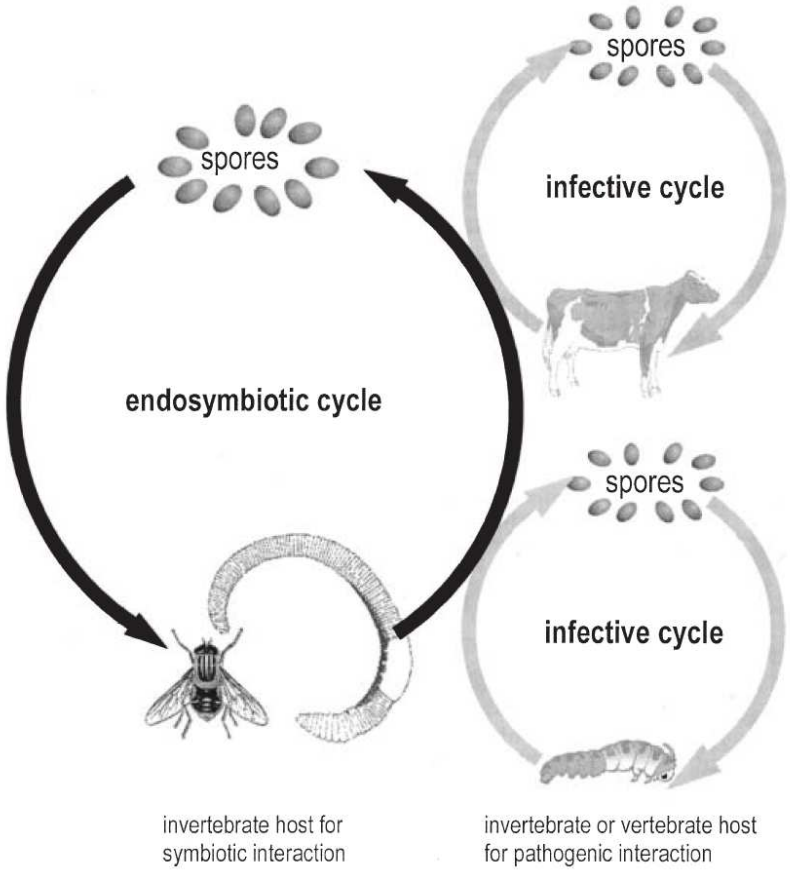


Figure 3 : Cycles de vie des bactéries du groupe *B. cereus*.
La figure est décrite dans le texte.
(Jensen et al., 2003)

2. En accord avec les conclusions précédentes, les résultats obtenus n'apportent pas d'arguments favorables à la distinction d'espèces (Ivanova *et al.*, 2003; Rasko *et al.*, 2004; Rasko *et al.*, 2005). L'ensemble de ces données suggère que les souches de *B. thuringiensis, B. anthracis* et *B.cereus* présentent suffisamment de similarité génétique pour qu'elles soient membres d'une seule espèce. Cependant, pour le moment, ces espèces restent classées de façon distincte en raison de la pertinence de la classification phénétique et de divers enjeux socio-économiques, comme l'utilisation de biopesticides qui deviendrait problématique si elles devaient avoir le même nom que celui de bactéries utilisées comme arme de bio-terrorisme.

2. Eoid *B. anthracis*, *B. cereus* t *B. thuringiensis*

2.1. éservoir

Le réservoir est le lieu ou l'environnement naturel dans lequel un pathogène est normalement retrouvé et à partir duquel l'infection de l'hôte peut se produire (Microbiologie, Prescott). Le réservoir primaire des bactéries du groupe *B. cereus* est le sol. Plusieurs études suggèrent que les spores de ces bactéries ne peuvent pas germer et se multiplier dans cet environnement (Glare & O'Callaghan, 2000; Vilas-Boas *et al.*, 2000). Cette hypothèse est confortée par l'analyse des génomes des bactéries du groupe *B. cereus* qui indique que leur métabolisme est principalement azoté (Ivanova *et al.*, 2003). Cependant, dans certaines niches écologiques où la disponibilité en nutriments est supérieure, notamment dans la rhizosphère ou la phyllosphère des plantes, un développement est possible (Bizzarri & Bishop, 2008; Hendriksen & Hansen, 2002; Saile & Koehler, 2006; Saleh *et al.*, 1970). Les bactéries de l'environnement pénètrent dans leur hôte suite à l'ingestion, l'inhalation ou le contact avec des spores ou des bactéries végétatives. Jensen et coll suggèrent qu'une fois dans leur hôte, les bactéries du groupe *B. cereus* sont capables de se développer selon deux modes de vie distincts : un mode de vie où les bactéries vivent dans une relation symbiotique avec leur hôte et un mode de vie pathogène où les bactéries se multiplient rapidement aux dépens de leur hôte (cf **Figure 3**) (Jensen *et al.*, 2003).

2.2. C□□si□□□t□□si□ d□ i□□a

2.2.1. Bacillus anthracis

B. anthracis est l'agent étiologique de la maladie du charbon ou anthrax. L'anthrax touche essentiellement les ruminants ovins, bovins et caprins. Les carnivores et les porcins sont généralement considérés comme assez résistants à l'infection et les oiseaux ne sont pas affectés par cette maladie. L'homme est un hôte accidentel, il peut être contaminé par contact direct avec des animaux infectés ou des produits dérivés (viandes, peaux, laines). Il existe trois voies d'entrée des spores dans l'hôte: digestive, cutanée et pulmonaire (WHO, 2008). En général, l'infection débute par l'entrée des spores au niveau de lésions de la peau, des muqueuses intestinale et pharyngée. Quelle que soit la voie d'entrée, les spores sont ensuite transportées par les cellules phagocytaires jusqu'aux ganglions lymphatiques (WHO, 2008). Après la germination des spores, les bactéries prolifèrent dans les glandes lymphoïdes, produisent des exotoxines et se disséminent dans le sang provoquant la mort de l'animal (Hudson *et al.*, 2008; Mock & Fouet, 2001). Après la mort de l'hôte, le sang contenant une grande quantité de bacilles s'écoule des orifices naturels. Les bactéries se répandent dans le sol et sporulent au contact de l'air. La maladie du charbon est principalement transmise par les animaux et notamment les charognards. Cependant, elle est considérée comme peu contagieuse car la transmission directe d'animal à animal se produit de façon peu fréquente (Beyer & Turnbull, 2009). Dans certaines régions, les mouches à viande et les mouches hématophages sont soupçonnées d'être également impliquées dans la transmission de la maladie (Braack & De Vos, 1990; De Vos & B., 1996; Morris, 1918; Morris, 1919; Morris, 1920; Sen & Minett, 1944; Sterne, 1959). La capacité de la mouche piquante *Stomoxys calcitrans*, de la mouche domestique *Musca domestica* et des *Calliphoridae* (mouches à viande, mouches vertes et bleues) à transmettre l'anthrax a été démontré expérimentalement par plusieurs équipes au début des années 1900 (Sen & Minett, 1944). D'autres études indiquent que le moustique est également un vecteur de la maladie (Turell & Knudson, 1987). Le taux de transmission de la maladie par les vecteurs insectes est assez faible en raison du faible nombre de spores injectées par l'insecte lors de la piqure et par l'absence de multiplication de *B. anthracis* dans l'intestin des insectes vecteurs (De Vos & Turnbull, 2004; Kraneveld F.C. & Mansjoer., 1939).

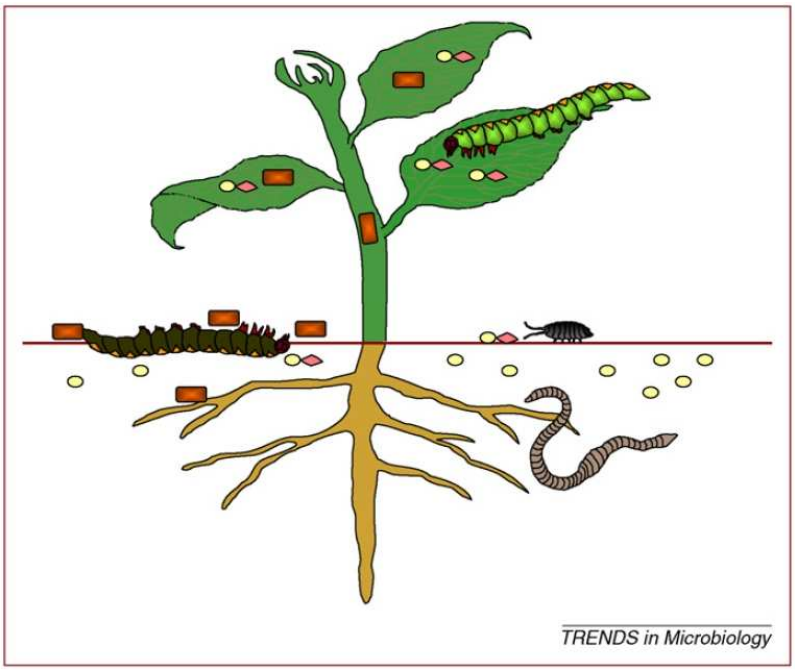


Figure 4 : Localisation de *B. thuringiensis* dans l'environnement.

Ce schéma fait la synthèse de plusieurs études concernant la localisation de *B. thuringiensis* dans l'environnement. Les formes végétatives de *B. thuringiensis* sont représentées par des rectangles rouges, les spores sont représentées par des ronds jaunes et les toxines Cry sont représentées par des losanges roses.

(Raymond et al., 2010)

2.2.2. Bacillus thuringiensis

Le cycle infectieux communément proposé pour *B. thuringiensis* est le suivant : lors de l'ingestion par les insectes sensibles du mélange de spores et de cristaux (endotoxines insecticides), ces derniers sont solubilisés par le pH alcalin de l'intestin (Hofmann *et al.*, 1988). Les protoxines sont ensuite clivées par des protéases intestinales (Lecadet & Martouret, 1967; Tojo & Aizawa, 1983) en toxines actives qui vont se fixer spécifiquement sur des récepteurs de l'épithélium intestinal, provoquant la paralysie du tube digestif et la lyse des cellules épithéliales (Bravo *et al.*, 2007; de Maagd *et al.*, 2003a). La baisse consécutive du pH intestinal peut contribuer à créer des conditions favorables à la germination des spores (Heimpel, 1959). Les bactéries se multiplient et traversent la paroi digestive pour envahir l'hemocoele de l'insecte, provoquant une septicémie qui s'ajoute à la toxémie (Raymond *et al.*, 2010). Lorsqu'elles ont épuisé les nutriments à leur disposition, les bactéries s'engagent dans le processus de sporulation et synthétisent les protéines Cry qui vont former une inclusion cristalline localisée dans la cellule mère. Des travaux suggèrent que *B. thuringiensis* n'est pas (ou peu) transmis de l'hôte à sa descendance (transmission verticale) (Raymond *et al.*, 2008). En revanche, il existe deux voies de transmission horizontale (transmission entre des hôtes de la même génération). La première voie est indirecte : les spores sont libérées du cadavre de l'hôte, se retrouvent dans le sol et elles sont alors disséminées par différents facteurs biotiques (insectes, animaux), abiotiques (vent, pluie), ou en co-migrant avec les plantes en cours de croissance (Bizzarri & Bishop, 2008; Melnick, 2008). Dans certaines niches écologiques, et notamment au contact des plantes, les spores germent (Bizzarri & Bishop, 2008; Hendriksen & Hansen, 2002) (cf **Fig 4**). Pendant leur dissémination, les cristaux associés aux spores de *B. thuringiensis* sont dégradés ou perdus dans le sol (Raymond *et al.*, 2010). Après avoir germé, les bactéries doivent donc se multiplier pour produire un cristal et commencer un nouveau cycle infectieux. La seconde voie de transmission horizontale est directe : les insectes contaminés par *B. thuringiensis* meurent et libèrent des spores et des cristaux qui sont ingérés par d'autres insectes situés à proximité. Une étude mesurant la transmission horizontale directe de la souche de *B. thuringiensis* HD1 (isolée du biopesticide DiPel® ; il s'agit du biopesticide à base de *Bt,* le plus utilisé depuis plus de 40 ans) indique que cette souche n'est pas transmise d'un cadavre d'insecte infecté à une population d'insectes sains (Knell *et al.*, 1996). Une étude menée par Raymond et coll (2010) contredit ce résultat et montre que la présence de cadavres d'insectes tués par une souche de *B.thuringiensis* HD1 (d'origine environnementale) à la surface d'une feuille entraîne la mort

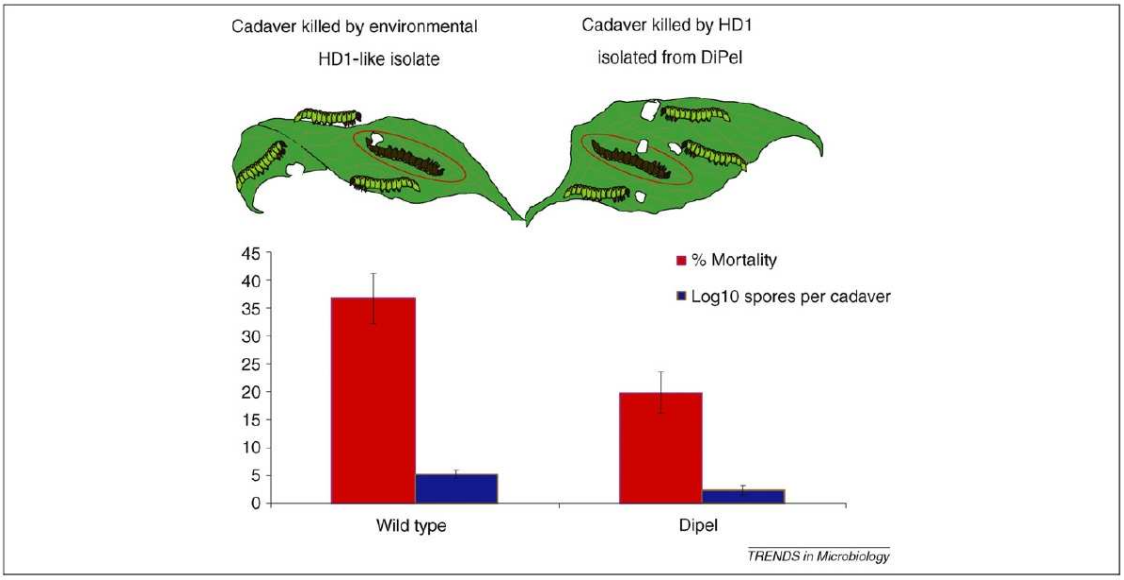


Figure 5 : Transmission horizontale de *B. thuringiensis*.
Des cadavres d'insectes infectés par deux souches de *B. thuringiensis* HD1 ont été placés sur des feuilles. Des larves saines ont ensuite été ajoutées. Après 7 jours, la proportion de larves mortes a été mesurée et le nombre de spores par cadavre a été déterminé.
(Raymond et al., 2010)

d'environ un tiers des insectes sains placés sur cette feuille (Raymond *et al.*, 2010) (cf **Fig 5** gauche). Les auteurs montrent également que la souche *B. thuringiensis* HD1 isolée du biopesticide DiPel® tue moins d'insectes et produit moins de spores dans les cadavres que la souche *B. thuringiensis* HD1 isolée de l'environnement (cf **Fig 5** droite). Les résultats obtenus par Knell et coll suggèrent que la virulence de la souche isolée du DiPel® est atténuée.

2.2.3. Bacillus cereus

B. cereus est un pathogène opportuniste qui est responsable d'infections systémiques (endocardites et pericardites), de pneumonies et d'infections locales (parodontites et endophtalmies) (Callegan *et al.*, 2005; Drobniewski, 1993; Kotiranta *et al.*, 2000). *B. cereus* est également impliqué dans des intoxications alimentaires émétiques et/ou diarrhéiques. Le cycle infectieux de *B. cereus* reste méconnu. La transmission a généralement lieu par l'intermédiaire d'aliments contaminés et plus particulièrement par les aliments amylacés, les viandes, les œufs et les produits laitiers (Ankolekar & Labbe, 2009; Reyes *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2004).

2.2.4. Cycle endosymbiotique

En 1849, Joseph Leidy identifia dans les intestins de nombreux arthropodes une forme filamenteuse contenant des inclusions réfringentes qu'il nomma *Arthromitus* (Leidy, 1849). Plus récemment, Margulis et coll. ont observé, cultivé et caractérisé cette forme filamenteuse. La forme *Arthromitus* correspond à des bactéries du groupe *B. cereus* qui s'accrochent aux substrats du tube digestif des arthropodes, se multiplient en formant des filaments et sporulent au contact de l'oxygène dans les fèces. D'après ces résultats, le tractus digestif des arthropodes semble réunir les conditions nécessaires à la germination et la multiplication des bactéries du groupe *B. cereus* (Margulis *et al.*, 1998). Une étude portant sur la recherche de souches de *B. thuringiensis* dans l'environnement montre que 40% des insectes portent des spores de cette bactérie (Chauffaux J, 1997). Par ailleurs, une étude récente indique que *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus mycoides / pseudomycoides* sont capables de se maintenir dans le tractus intestinal du cloporte (Swiecicka & Mahillon, 2006). Enfin, Schuch et coll ont montré que les bactéries du groupe *B. cereus* sont des habitants naturels du tractus intestinal de *Eisenia fetida* (Schuch *et al.*, 2010). L'ensemble de ces données suggère fortement que les insectes constituent une niche écologique privilégiée pour *B. thuringiensis*.

Cependant, il est difficile de déterminer la véritable nature de la relation établie entre les bactéries du groupe *B. cereus* et les arthropodes : s'agit-il d'une relation commensale ou mutualiste ? De nombreuses études indiquent que les bactéries du groupe *B. cereus* synthétisent des enzymes extracellulaires impliquées dans le catabolisme de matières organiques telles que les feuilles mortes, le bois et les matières végétales (Kim *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2005; Priest, 1977) qui constituent l'alimentation de base des isopodes (Zimmer & Topp, 1997; Zimmer *et al.*, 2002). De plus, *B. cereus* et *B. thuringiensis* produisent d'autres substances telles que les acyl-homoserine lactonases, connues pour inhiber le quorum sensing chez les bactéries à Gram négatif, ainsi que des bactériocines et des molécules antibiotiques (Barboza-Corona *et al.*, 2007; Gebhardt *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2006; Zenewicz *et al.*, 2005; Zuber *et al.*, 1993) qui pourraient empêcher l'implantation et/ou la prolifération de microorganismes pathogènes dans le tractus intestinal des arthropodes. Ces éléments suggèrent que les bactéries du groupe *B. cereus* vivent une relation mutualiste avec leurs hôtes arthropodes.

3. [illegible]

Les génomes des bactéries du groupe *B. cereus* sont similaires et plusieurs études suggèrent que les bactéries de ce groupe forment une seule espèce (cf Chapitre I § 1.2). Pourtant, les spectres d'hôtes de *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis* sont très différents (cf Chapitre I § 2.2). La plupart des facteurs de virulence qui confèrent une spécificité d'hôte à ces pathogènes sont codés par des gènes hébergés par de grands plasmides.

3.1. [illegible]

3.1.1. pXO1 et pXO2

La virulence de *B. anthracis* repose essentiellement sur la présence de deux plasmides : pXO1 et pXO2. Le plasmide pXO1, d'une taille de 181 kb, présente un îlot de pathogénicité de 44 kb, flanqué de séquences d'insertion, qui contient notamment les gènes *pagA*, *cya*, *lef, bslA et gerX*. Les gènes *pagA*, *cya* et *lef* codent respectivement pour les composants PA (antigène protecteur), EF (facteur oedematogène) et LF (facteur léthal) de la toxine tripartite (Mourez, 2004). Leur combinaison binaire forme la toxine oedematogène (PA-EF) et la toxine léthale (PA-LF). Le gène *bslA* code pour une adhésine (*Bacillus anthracis* S-layer protein A) ancrée à la paroi et qui est nécessaire et suffisante pour l'adhésion de la forme non capsulée de *B. anthracis* à différents types de cellules (cellules

épithéliales de poumon et de colon, cellules endothélilales de cerveau et fibroblastes). De plus, la pathogénicité du mutant *bslA* est fortement réduite par rapport à la souche parentale (Ebrahimi *et al.*, 2009; Kern *et al.*, 2010; Kern & Schneewind, 2008). Enfin, le produit du gène *gerX* est impliqué dans la germination des spores de *B. anthracis* dans les cellules phagocytaires (Guidi-Rontani *et al.*, 1999). Le plamide pXO2, d'une taille de 94 kb, présente un îlot de pathogénicité de 37 kb qui contient l'opéron *capBCADE* impliqué dans la biosynthèse de la capsule (Candela & Fouet, 2005; Candela *et al.*, 2005; Van der Auwera *et al.*, 2005) ainsi que les gènes de régulation de cet opéron, *acpA* et *acpB* (Drysdale *et al.*, 2004; Vietri *et al.*, 1995).

L'expression de la plupart des gènes de virulence portés par les plasmides pXO1 et pXO2 est sous le contrôle des régulateurs transcriptionnels AtxA (Anthrax ToXinActivator) et PagR (Protective AntiGenRepressor), tous deux codés par des gènes localisés sur le plasmide pXO1. AtxA active directement l'expression des gènes *pagA*, *cya* et *lef* et indirectement l'expression de l'opéron *cap* par l'intermédiaire des gènes *acpA* et *acpB*. Le gène *pagR* est co-transcrit avec *pagA* à partir d'un promoteur dépendant d'AtxA. PagR contrôle négativement l'expression de *pagA* et des gènes chromosomiques codant pour les constituants de la couche S (Fouet & Mock, 2006).

3.1.2. Les toxines insecticides

Les souches de *B. thuringiensis* produisent des inclusions cristallines parasporales pendant la phase de sporulation (Angus, 1954). Ces cristaux sont principalement constitués d'une ou plusieurs protéines de crystal (toxines Cry) et de cytotoxines (toxines Cyt), aussi appelées ∂-endotoxines (Bravo *et al.*, 2007). Les gènes codant pour les toxines Cry et Cyt sont localisés sur des plasmides conjugatifs et sont généralement flanqués d'éléments transposables (Gonzalez *et al.*, 1982; Kronstad & Whiteley, 1984; Lereclus *et al.*, 1984; Schnepf *et al.*, 1998). Les toxines Cry sont spécifiquement actives contre les insectes des ordres Lepidoptères, Coléoptères, Hyménoptères et Diptères ainsi que contre certains nématodes. Les toxines Cyt, quant à elles, sont principalement retrouvées dans des souches de *B. thuringiensis* actives contre les Diptères (Bravo *et al.*, 2007). Les toxines Cry et les cytotoxines appartiennent à la famille des toxines formant des pores (Pore-Forming Toxins ou PFT). Il existe deux sous-familles de PFT : les α-helical toxins (toxines à hélices α) et les β-barrel toxins (toxines en tonneaux β) (Parker & Feil, 2005). Les toxines Cry appartiennent majoritairement à la famille des α-helical toxins alors que les toxines Cyt appartiennent à la famille des β-barrel toxins (cf **Fig 6**). Le mode d'action des toxines Cry a été

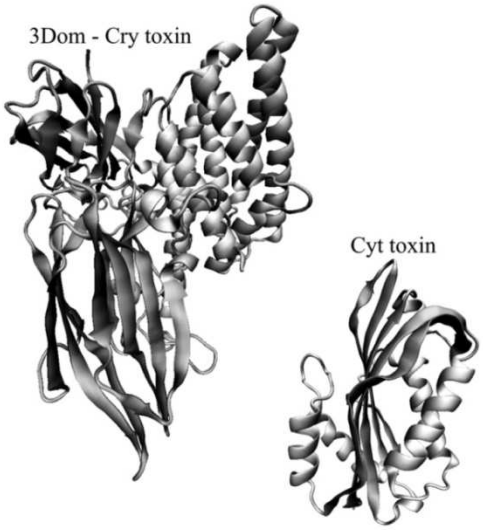


Figure 6 : Structures tridimensionnelles des toxines insecticides produites par *B. thuringiensis*.
La figure de droite représente la structure de la toxine Cry8Ea et la figure de gauche représente la structure de la toxine Cyt2Ba.
(Bravo et al., 2011)

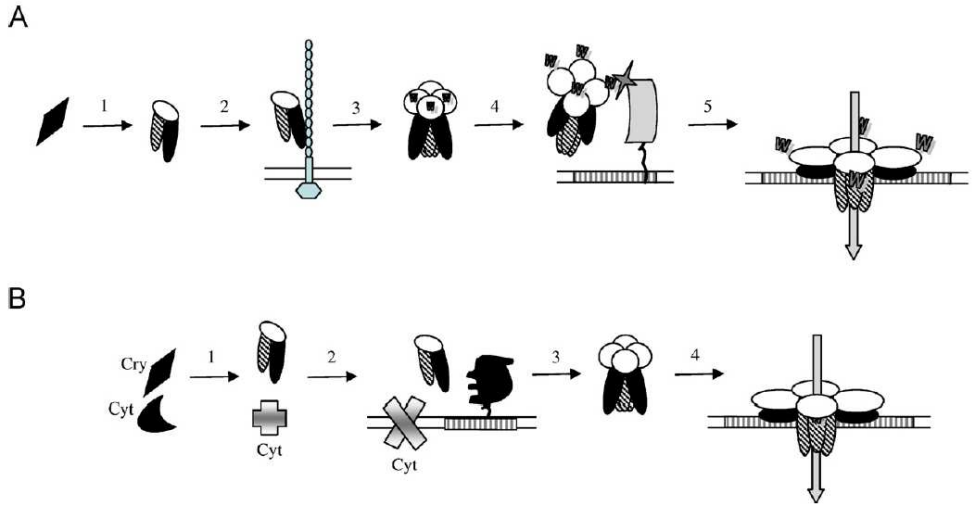


Figure 7 : Mode d□action des toxines Cr□et Cyt.
(A) Mode d'action des toxines Cry. (1) Les toxines sont solubilisées et activées. (2) La toxine Cry, sous forme monomérique, se lie à un premier récepteur (CADRou GCR). Cette interaction induit un changement de conformation de la toxine. (3) La toxine s'oligomérise (4) puis se fixe à un second récepteur (GPI-APN ou GPI-ALP). Un changement de conformation se produit et les toxines adoptent une conformation globulaire. (5) La toxine s'insère dans un raft lipidique et forme un pore. **(B)** Mode d'action synergique des toxines Cry et Cyt. (1) Les toxines Cry et Cyt sont solubilisées et activées. (2) La toxine Cyt s'insère dans la membrane et la toxine Cry utilise cette toxine comme récepteur. (3) La toxine Cry s'oligomérise. (4) L'oligomère s'insère dans la membrane et forme un pore.
(Bravo et al., 2007)

principalement caractérisé chez les Lépidoptères (de Maagd *et al.*, 2003b; Soberon *et al.*, 2007) (cf **Fig 7**). Les monomères de toxines activés se fixent à un premier récepteur et subissent une modification de conformation. Les toxines forment alors un oligomère qui se fixe à un second récepteur qui induit une nouvelle modification de conformation de la toxine. L'oligomère est alors en mesure de s'insérer au niveau d'un raft lipidique de la membrane épithéliale pour former un pore. Les toxines Cyt forment aussi des pores, mais ne requièrent pas la présence de récepteurs spécifiques pour s'insérer dans les membranes (Gill *et al.*, 1987; Li *et al.*, 1996; Promdonkoy & Ellar, 2003; Thomas & Ellar, 1983). Par ailleurs, les protéines Cyt ont une action synergique avec les protéines Cry en constituant le récepteur primaire de ces toxines (Perez *et al.*, 2005) (cf **Fig 7**).

Le rôle de ces toxines est donc de former des pores au niveau du pôle apical des cellules intestinales des insectes sensibles. La présence requise de protéases intestinales et de récepteurs spécifiques explique le spectre d'action restreint de chaque δ-endotoxine. Cette spécificité et l'innocuité de ces toxines vis-à-vis des végétaux, des animaux et de la faune entomologique non cible (abeilles, coccinelles) justifient, depuis de nombreuses années, l'utilisation de *B. thuringiensis* comme biopesticide dans la protection des cultures contre certains insectes ravageurs (ex : la pyrale du maïs) (Vilas-Boas *et al.*, 2007). Les gènes *cry* sont également utilisés pour la construction de plantes transgéniques comme les cotonniers et le maïs (Roh *et al.*, 2007). Enfin, *B. thuringiensis* est utilisé dans le contrôle d'insectes vecteurs de maladies humaines comme l'onchocercose et le paludisme (Das & Amalraj, 1997; Drobniewski, 1994; Guillet, 1990).

Certaines souches de *B.thuringiensis* produisent également des toxines dont la structure et le mode d'action sont différents de ceux des δ-endotoxines. Il s'agit notamment de la β-exotoxine I et des protéines VIP (Vegetative Insecticidal Proteins). En raison de la toxicité de la β-exotoxine I vis-à-vis des vertébrés, son utilisation comme bio-pesticide est interdite dans de nombreux pays (Meretoja *et al.*, 1977). En revanche, les proteines VIP, qui sont aussi des PFT présentant un spectre d'activité limité à certains insetces (Yu *et al.*, 1997), pourraient être utilisées prochainement comme bio-insecticides pour faire face à la résistance grandissante de certains insectes ravageurs vis-à-vis des toxines Cry.

3.1.3. Le céréulide

Le céréulide est la toxine responsable du syndrome émétique provoqué par *B. cereus*. La toxémie est caractérisée par des vomissements sanglants et des nausées qui apparaissent 1 à 5 heures après l'ingestion d'aliments contaminés (J.M. & R.J., 1989; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Le céréulide est un peptide cyclique de 12 acides aminés, liés par des liaisons peptidiques ou esters (dodécapepsipeptide). La structure de ce peptide est proche de celle de la valinomycine, un macrolide qui agit comme un ionophore de potassium (pour revue voir (Ehling-Schulz *et al.*, 2004)). Ce peptide, de nature hydrophobe, est stable à de fortes températures et à différents pH, et résiste à l'action de nombreuses protéases (Rajkovic *et al.*, 2008; Shinagawa *et al.*, 1996). Ces caractéristiques confèrent à la toxine une résistance à la cuisson et à la dégradation par le tractus digestif. Le céreulide est produit par un complexe enzymatique de synthèse de peptides non ribosomaux (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Ce complexe est codé par un locus de 24 kb, nommé *cesHPTABCD* qui est porté par un grand plasmide (>200 kb), nommé pBCE, qui présente des similarités avec pXO1 (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Les gènes *cesPTABCD* sont co-transcrits à partir d'un promoteur situé en amont du gène *cesP*, et le gène *cesH* est transcrit indépendamment (Dommel *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que le régulateur AbrB se fixe sur la région promotrice du gène *cesP* et réprime la transcription de l'opéron (Lucking *et al.*, 2009). Seules quelques souches de *B. cereus* mésophiles, proches d'un point de vue phylogénétique, portent le plasmide pBCE et produisent le céréulide (Altayar & Sutherland, 2006; Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Toutefois, deux souches de *B. weihenstephanensis* produisant le cereulide ont été identifiées (Thorsen *et al.*, 2006).

3.2. [illegible]

Les facteurs de virulence spécifiques déterminent la spécificité d'hôte des bactéries pathogènes du groupe *B. cereus*. Cependant, ces facteurs ne sont pas les seuls à contribuer au pouvoir pathogène. En effet, de nombreux gènes chromosomiques codent pour des toxines sécrétées et leur implication dans le pouvoir pathogène des bactéries du groupe *B. cereus* a été démontrée (Salamitou *et al.*, 2000). La prévalence de ces gènes au sein du groupe *B. cereus* est très variable. Par exemple, les gènes codant pour les phospholipases PI-PLC, PC-PLC et SM-PLC sont présents dans une grande majorité des souches du groupe *B. cereus* alors que

les gènes codant pour les cytolysines HlyII et CytK ne sont présents que dans un nombre restreint de souches (Cadot *et al.*, 2010; Fagerlund *et al.*, 2004; Kim & Batt, 2008; Martinez-Blanch *et al.*, 2009).

3.2.1. Les toxines formant des pores

Cette classe de toxine, comme son nom l'indique, forme des pores dans les membranes des cellules de l'hôte. En général, la formation de ces pores provoque un choc osmotique qui conduit à la mort de la cellule ciblée. L'hémolysine BL (Hbl) est la toxine la mieux caractérisée chez *B. cereus*. Elle est constituée de trois sous unités : la sous-unité B qui permet la fixation du complexe aux cellules ciblées et deux sous-unités, L_1 et L_2, qui présentent une activité lytique (Beecher & Macmillan, 1991). Hbl induit une perméabilité vasculaire, une infiltration sur anse ligaturée de lapin, un effet dermonécrotique et une hémolyse des érythrocytes (Beecher & Wong, 1994; Beecher *et al.*, 1995; Beecher & Wong, 2000; Lund & Granum, 1997). Le mécanisme détaillé de la formation du pore membranaire reste mal connu. La toxine Nhe (Non-Hemolytic Enterotoxin) a été découverte lors d'une épidémie de gastroentérite en Norvège en 1995 (Lund & Granum, 1996). Il s'agit d'une toxine tripartite (NheA, NheB et NheC) qui présente des similarités avec Hbl. Nhe induit un effet toxique sur les cellules épithéliales HeLa et CaCo2 en formant des pores transmembranaires à hélice α (Lindback *et al.*, 2004). Tout d'abord décrite comme non-hémolytique, Nhe semblerait plutôt présenter une activité hémolytique spécifique certaines espèces (Fagerlund *et al.*, 2008). Les toxines Nhe et Hbl sont souvent associées aux infections gastro-intestinales (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Les bactéries du groupe *B. cereus* produisent une toxine de la famille des cytolysines dépendante du cholestérol. Elle est nommée céréolysine O chez *B.cereus*, thunringiolysine O chez *B. thuringiensis* et anthrolysine O chez *B. anthracis*. Ces toxines ont la propriété de se fixer au cholestérol des membranes et de former de larges pores (d'environ 30 nm de diamètre) qui permettent le passage de macromolécules à travers la membrane des cellules (Palmer, 2001; Shany *et al.*, 1974). L'implication de l'anthrolysine O dans la virulence de *B. anthracis* a été démontrée. Cette protéine est toxique pour les érythrocytes, les neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes (Mosser & Rest, 2006; Shannon *et al.*, 2003). De plus, l'anthrolysine O altère l'intégrité de l'épithélium intestinal humain en dégradant les jonctions serrées (Bourdeau *et al.*, 2009).

Certaines bactéries du groupe *B. cereus* produisent également deux toxines formant des pores de la famille des « β-barrel » : l'hémolysine II (HlyII) et la cytotoxine K (CytK). Ces deux

toxines forment des pores transmembranaires de petite taille (7Å pour CytK et de 1 à 4 nm pour HlyII) et sont cytotoxiques et hémolytiques sur les erythrocytes de différents animaux (Andreeva *et al.*, 2006; Andreeva *et al.*, 2007; Fagerlund *et al.*, 2004; Hardy *et al.*, 2001). Une étude récente a montré que la formation de pores par HlyII dans la membrane de cellules phagocytaires entraîne leur apoptose (Tran *et al.*, 2011).

3.2.2. Les phospholipases

Les phospholipases C jouent un rôle important dans la virulence des bactéries pathogènes (Titball, 1998). Elles sont généralement impliquées dans la dégradation des tissus et dans l'altération de la signalisation cellulaire (Drobniewski, 1993; Kuppe *et al.*, 1989; Wazny *et al.*, 1990). Au sein du groupe *B. cereus* trois phospholipases ont été caractérisées : PI-PLC qui est spécifique du phosphatidylinositol ; PC-PLC qui est active contre la phosphatidylcholine; et SM-PLC qui est spécifique de la sphyngomyéline. PC-PLC induit la nécrose de la rétine chez le lapin et pourrait contribuer à la virulence de *B. cereus* dans les endophtalmites (Beecher *et al.*, 2000). Cependant, les résultats de Callegan et al. (2002) vont à l'encontre de ces données (Callegan *et al.*, 2002). En effet, cette étude montre que l'interruption des gènes codant pour PI-PLC et PC-PLC n'a pas d'effet sur la capacité de *B. cereus* à provoquer des endophtalmites. PI-PLC et PC-PLC jouent également un rôle dans la résistance au système immunitaire de leurs hôtes en pertubant certaines voies de signalisation des cellules eucaryotes (Walev *et al.*, 1996; Zenewicz *et al.*, 2005). Enfin, SM-PLC et PC-PLC peuvent s'associer et former un complexe, nommé céréolysine AB, qui présente une activité hémolytique sur le sang humain (Gilmore *et al.*, 1989).

3.2.3. Les protéases

Les protéases sont des facteurs importants dans la pathogénicité des bactéries. Elles peuvent notamment intervenir dans l'activation de toxines, la lyse de protéines de structure, la protection contre le système immunitaire de l'hôte et l'interférence avec la signalisation cellulaire (Miyoshi & Shinoda, 2000). Le génome de *B. cereus* compte environ 50 gènes codant pour des protéases (Ivanova *et al.*, 2003). Seules quelques protéases ont été caractérisées à ce jour, parmi lesquelles figurent les protéases InhA (Immune Inhibitor A) et la protéase NprA (Neutral Protease A). Les InhA sont des métalloprotéases de la famille des thermolysines qui présentent un domaine conservé de liaison au zinc (domaine HEXXH) (Miyoshi & Shinoda, 2000). Elles ont été identifiées pour la première fois par Dalhammar et

coll en 1984 comme des protéases impliquées dans l'hydrolyse de peptides antimicrobiens (cécropine et attacine) produits par les insectes (Dalhammar & Steiner, 1984). Des analyses *in silico* indiquent qu'il existe un à trois gènes codant pour des InhA sur les génomes des bactéries du groupe *B. cereus.* Ces gènes, nommés *inhA1*, *inhA2* et *inhA3*, coexistent et partagent plus de 66% d'identité de séquence nucléotidique (Fedhila *et al.*, 2002). Les gènes *inhA1* et *inhA2* sont très bien conservés au sein du groupe *B. cereus* alors que le gène *inhA3* n'est présent que dans un nombre restreint de souches (Guillemet *et al.*, 2010). Une étude récente indique que la pathogénicité d'un triple mutant Δ*inhA1* Δ*inhA2* Δ*inhA3* vis-à-vis des insectes *Galleria mellonella* et *Bombyx mori* est fortement réduite. Les simples et doubles mutants sont moins affectés que le triple mutant ce qui suggère que les trois protéases sont impliquées dans la virulence et interviennent de façon concomitante (Fedhila *et al.*, 2002; Guillemet *et al.*, 2010).

Les protéases InhA1, InhA2 et InhA3 sont sécrétées et sont associées aux membranes des bactéries (Guillemet *et al.*, 2010). Cependant, des résultats suggèrent que le mode d'action de ces protéases est différent. Les gènes *inhA1*, *inhA2* et *inhA3* s'expriment en phase stationnaire de croissance. Néanmoins, les cinétiques d'expression et la régulation de ces gènes sont différentes (Fedhila *et al.*, 2002; Grandvalet *et al.*, 2001; Guillemet *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que InhA1 permet de contourner le système immunitaire en permettant aux spores de *B. cereus* de s'échapper des macrophages, alors que les protéases InhA2 et InhA3 ne sont pas impliquées dans ce mécanisme (Guillemet *et al.*, 2010; Ramarao & Lereclus, 2005).

La protease neutre NprA est une thermolysine de la famille des peptidases M4. Cette protéine a été caractérisée pour la première fois par Donovan et coll comme une protéase qui confère une forte activité protéolytique à *B. thuringiensis* pendant la sporulation (Donovan *et al.*, 1997). Plus récemment, il a été montré que dans des conditions favorables à la sporulation, NprA est le composant majoritaire du sécrétome des bactéries du groupe *B. cereus* (Chitlaru *et al.*, 2006; Perchat *et al.*, 2011). Des résultats suggèrent que NprA pourrait être un facteur de virulence. Chung et coll. ont notamment montré que NprA est capable de cliver divers composants tissulaires tel que la fibronectine, la laminine ou le collagène (Chung *et al.*, 2006). De plus, des résultats indiquent que NprA, à l'instar d'InhA1, est impliquée dans l'échappement des spores de *B. cereus* des macrophages. Des résultats récents indiquent que InhA1 clive NprA (Pflughoeft, communication orale au congrès International sur les micro-organismes à Gram positif (2011) ; Ramarao, communication personnelle). Ces données suggèrent, d'une part, que la métalloprotease NprA est maturée par InhA1 et, d'autre part, que NprA est la protéine effectrice de l'échappement des spores de *B. cereus* des macrophages.

Toutefois, le rôle de NprA dans la pathogénicité des bactéries du groupe *B. cereus* n'a pas été démontré dans un modèle animal.

3.3. égulation de l'expression des facteurs de virulence

PlcR (PhosphoLipase C Regulator) est un régulateur pléiotrope qui contrôle l'expression de gènes spécifiant des protéines sécrétées potentiellement impliquées dans la virulence, le métabolisme ou la sporulation (Agaisse *et al.*, 1999; Lereclus *et al.*, 1996). L'expression des facteurs de virulence Nhe, Hbl, CytK, InhA2 et des phospholipases (PI-PLC, PC-PLC, SM-PLC) est dépendante de PlcR. En début de phase stationnaire, et dans un milieu riche, les produits des gènes régulés par PlcR représentent environ 80% du protéome extracellulaire de *B. cereus* (Gohar *et al.*, 2002). Agaisse et coll. ont montré que le gène *plcR* chez *B. anthracis* est interrompu par un codon non-sens qui rend le régulateur non fonctionnel (Agaisse *et al.*, 1999). L'expression de certains gènes du régulon PlcR de *B. anthracis* peut être restaurée par une complémentation. Ainsi certains caractères spécifiques de *B. anthracis*, notamment l'absence d'activité hémolytique et lécithinase, est due à l'absence d'une copie fonctionnelle du gène *plcR* (Mignot *et al.*, 2001; Slamti *et al.*, 2004). L'importance du régulon PlcR dans la pathogénicité de *B. thuringiensis* et de *B. cereus* a été évaluée en utilisant différents modèles. La délétion du gène *plcR* conduit à une forte diminution de la pathogénicité de *B. cereus* et *B. thuringiensis* par ingestion forcée chez l'insecte *Galleria mellonella* (Salamitou *et al.*, 2000), par instillation nasale chez la souris et par injection intraocculaire chez le lapin (Callegan *et al.*, 2003; Salamitou *et al.*, 2000). Par ailleurs, le surnageant de culture d'un mutant *plcR* perd ses propriétés cytotoxiques sur les hémocytes de *Galleria mellonella* ainsi que sur les cellules HeLa (Ramarao & Lereclus, 2006; Salamitou *et al.*, 2000).

4. Les régulateurs clés de l'adaptation et de la virulence

Un aspect remarquable des micro-organismes est leur capacité à s'adapter efficacement aux changements de leur environnement. Pour cela, les cellules bactériennes évaluent continuellement les paramètres extérieurs et ajustent en conséquence leur physiologie. Les signaux environnementaux sont, en général, captés par des senseurs (kinases, molécules de signalisation) qui transmettent l'information à des régulateurs pléiotropes qui régulent l'expression de gènes en réponse à ce signal. Ces régulateurs sont eux même interconnectés, ce qui permet aux bactéries d'intégrer un grand nombre de paramètres et ainsi de fournir une

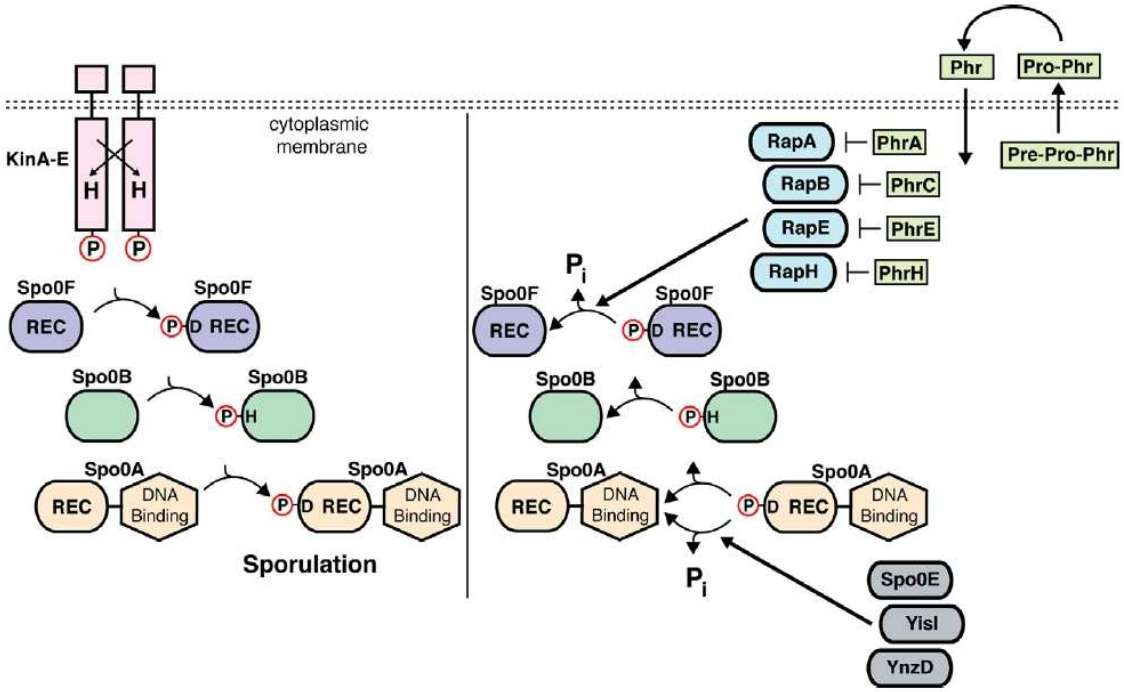


Figure 8 : Le phosphorelais chez *B. subtilis*.
La figure de gauche représente le phosphorelais. Pour simplifier le schéma, les kinases sont représentées comme étant membranaires (KinA et KinE sont en réalité des protéines cytoplasmiques). La cascade de phosphorylation est détaillée dans le texte. La figure de droite présente les régulateurs qui modulent le taux de phosphorylation de Spo0A. Le mécanisme d'action de ces régulateurs est présenté dans le texte. REC : Receiver Domain ou domaine recevant le phosphate, P : groupement phosphate, Pi : phosphate inorganique.
(Parashar et al., 2011)

réponse adaptée aux modifications de leur environnement. L'étude des régulateurs impliqués dans l'adaptation des bactéries à Gram positif a principalement été réalisée avec la bactérie modèle *B. subtilis*. Cependant, les régulateurs caractérisés chez *B. subtilis* présentent des orthologues dont les fonctions sont conservées chez les bactéries du groupe *B. cereus*.

4.1. Spo0A

Chez *B. subtilis*, Spo0A régule de nombreux processus tels que la sporulation, la formation des biofilms et la compétence génétique. Dès la fin de la phase exponentielle de croissance, la protéine Spo0A, sous sa forme active phosphorylée (Spo0A~P), s'accumule de façon progressive dans la cellule bactérienne (Fujita & Losick, 2005). Certains gènes sous le contrôle de Spo0A~P, tels que ceux impliqués dans la formation des biofilms, ont des promoteurs avec une forte affinité pour ce régulateur. Ils s'expriment donc avec un faible taux de Spo0A~P. A l'inverse, d'autres gènes, tels que ceux impliqués dans la sporulation, ont des promoteurs avec une faible affinité pour Spo0A~P et ne sont activés que lorsque Spo0A~P atteint un taux élevé (Fujita *et al.*, 2005; Fujita & Losick, 2005). Les gènes avec un promoteur à « haute affinité » s'expriment de façon hétérogène au sein d'une population clonale. Cette hétérogénéité peut s'expliquer par le fait que Spo0A~P ne s'accumule pas avec la même cinétique dans chacune des bactéries de cette population (Chastanet *et al.*, 2010; de Jong *et al.*, 2010). Ce phénomène permet aux bactéries d'une population clonale de se différencier et d'avoir des programmes de développement différents. Cette différenciation pourrait jouer un rôle biologique important, notamment en permettant aux bactéries de mieux s'adapter à des environnements complexes et de survivre à des modifications brutales de leur environnement (Lopez & Kolter, 2010).

Le taux de Spo0A~P dans les cellules bactériennes dépend principalement du niveau de transcription du gène *spo0A* et du niveau de phosphorylation de la protéine Spo0A. Spo0A est phosphorylé par une cascade de protéines liant le phosphate, nommé phosphorelais (cf **Figure 8**). La protéine de relais Spo0F est phosphorylée par des kinases transmembranaires (KinB, KinC et KinD) et cytoplasmiques (KinA et KinE). Spo0F~P transfère son phosphate à Spo0B qui le transfère à son tour à Spo0A (Burbulys *et al.*, 1991; Phillips & Strauch, 2002). Le taux de phosphorylation de Spo0A *via* le phosphorelais dépend de trois acteurs majeurs. (i) Les kinases qui perçoivent des signaux environnementaux (nutritionnels, métaboliques, de densité cellulaire etc) et phosphorylent Spo0F en réponse à ces signaux. (ii) Les Rap (Response regulator Aspartyl-Phosphate) qui participent à la déphosphorylation de Spo0F~P dans des conditions de faible densité bactérienne (cf chapitre II). (iii) Les membres de la famille

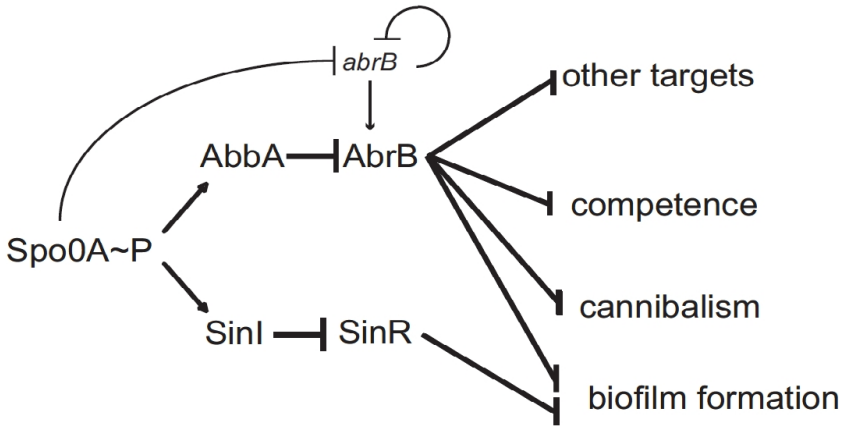
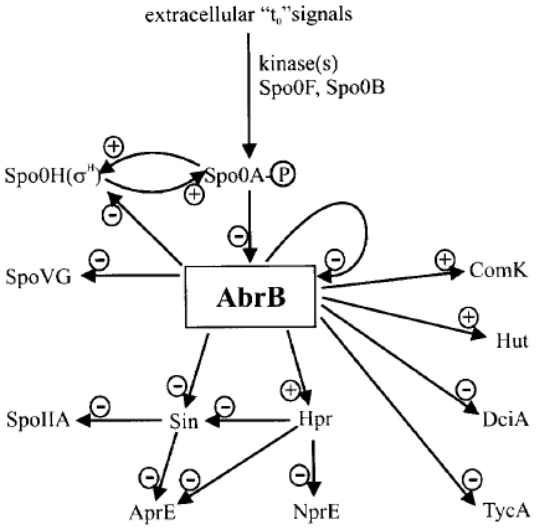


Figure 9 : Spo0A régule l'expression des répresseurs AbrB et SinR.
Les régulateurs AbrB et SinR sont soumis à la répression des régulateurs AbbA et SinI, respectivement. La synthèse de AbbA et SinI est induite par Spo0A~P. La transcription du gène *abrB* est réprimé par Spo0A~P.
(Banse et al, 2008)



protein:	cellular function:	response:
AbrB	major transition state regulator	growth state sensing
AprE	subtilisin protease	alternative resources
ComK	transcription of competence genes	competence development
DciA	ABC transporter for dipeptides	alternative resources
Hpr	transition state regulator	growth state sensing
Hut	histidase (histidine utilization)	alternative resources
NprE	neutral protease	alternative resources
Spo0A	major response regulator for sporulation	sporulation
Spo0H	alternative σ^H for sporulation	sporulation
SpoIIA	regulation of alternative σ^F	sporulation
SpoVG	maturation of spore cortex	sporulation
TycA	tyrocidine biosynthesis	secondary metabolite formation

Figure 10 : Le régulon AbrB chez *B. subtilis*.
+ : régulation positive, - : régulation négative, t0 : entrée en phase stationnaire.
(Klein &Marahiel, 2002)

Spo0E, appelés Spo0E, YisI et YnzD qui déphosphorylent Spo0A~P en phase végétative de croissance (Ohlsen *et al.*, 1994; Perego & Brannigan, 2001). En plus de cette régulation post-transcriptionnelle, la transcription du gène *spo0A* est soumise à une régulation complexe. Pendant la phase exponentielle de croissance, *spo0A* est transcrit à partir du promoteur P_v, qui est dépendant du facteur sigma de phase végétative Sigma-A. Lors de l'entrée en phase stationnaire et dans un milieu de sporulation, la transcription à partir du promoteur P_v diminue. La transcription de *spo0A* se poursuit à partir du promoteur P_s, situé en aval de P_v, et qui est dépendant du facteur sigma de transition Sigma-H (Chibazakura *et al.*, 1991; Chibazakura *et al.*, 1995; Siranosian & Grossman, 1994). Les circuits de régulation impliqués dans ce changement de promoteur sont partiellement caractérisés. Pendant la phase exponentielle de croissance, la transcription de *sigH* est contrôlée négativement par AbrB, qui est lui-même réprimé par Spo0A~P. Ce rétrocontrôle positif indirect est activé lorsque les bactéries entrent en phase stationnaire et pourrait être dépendant de la régulation post-transcriptionnelle de SigH (Healy *et al.*, 1991; Ohashi *et al.*, 1999). Une grande majorité des travaux relatifs à la régulation de l'entrée en sporulation a été réalisée chez *B. subtilis*. Cependant des données obtenues chez *B. anthracis* suggèrent que le phosphorelais décrit chez *B. subtilis* est similaire chez les bactéries du groupe *B. cereus* (Bongiorni *et al.*, 2006; Bongiorni *et al.*, 2007; Brunsing *et al.*, 2005; Stephenson & Hoch, 2002).

Spo0A~P contrôle l'expression de deux régulateurs majeurs chez *B. subtilis* et les bactéries du groupe *B. cereus* : AbrB et SinR (cf **Fig 9**). Le répresseur SinR est principalement impliqué dans la formation des biofilms et AbrB contrôle des gènes notamment impliqués dans la formation des biofilms et la compétence génétique.

4.2. AB

AbrB est un régulateur clé de la phase de transition chez *B. subtilis* et les bactéries du groupe *B. cereus*. La fonction principale de ce régulateur est d'empêcher l'expression inappropriée de gènes de phase stationnaire pendant la phase exponentielle de croissance. Chez *B. subtilis*, AbrB régule plus de 100 gènes impliqués dans la formation des biofilms, la production d'antibiotiques, la mobilité, la compétence, la synthèse d'enzymes extracellulaires et la sporulation (cf **Fig 10**) (Chumsakul *et al.*, 2011; Phillips & Strauch, 2002; Strauch, 1993). AbrB agit principalement comme un répresseur. Cependant, certains gènes sont activés par ce régulateur (Fisher *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2003; Strauch, 1995). L'expression d'*abrB* est dépendante de la phase de croissance : elle est élevée en phase exponentielle et diminue lors de l'entrée en phase stationnaire. Cette diminution d'expression est principalement due à

Spo0A~P qui se fixe sur la région promotrice du gène *abrB* et réprime sa transcription. Par ailleurs, il a été montré qu'AbrB se fixe à la région promotrice de son propre gène et s'autorégule négativement (Strauch *et al.*, 1989). Les sites de fixation d'AbrB et de Spo0A~P sur la région promotrice du gène *abrB* sont distincts (Strauch *et al.*, 1990).

AbrB est une petite protéine de 10,4 kDa qui se fixe sur l'ADN sous la forme d'un homotétramère. Cette protéine est constituée de deux domaines : le domaine N-terminal qui participe à la fixation du complexe sur l'ADN et le domaine C-terminal qui intervient dans la formation du tétramère (Benson *et al.*, 2002; Bobay *et al.*, 2005; Xu & Strauch, 2001; Yao & Strauch, 2005). Le rôle et la structure d'AbrB sont donc relativement bien caractérisés. En revanche, la séquence ou la structure d'ADN reconnue spécifiquement par cette protéine reste indéterminée. En effet, la recherche *in vitro* d'un site de liaison d'AbrB à l'ADN a permis d'identifier le motif TGGNA (Xu & Strauch, 1996). Cependant, ce motif ne ressemble pas à la séquence consensus WAWWTTTWCAAAAAAW qui a été établie précédemment en réalisant des empreintes à la DNase I sur les régions promotrices de quatre gènes (*spo0H*, *kinB*, *ftsAZ* et *pbpE*) controlés par AbrB (Strauch, 1995). Plus récemment, l'analyse de 40 sites de fixation d'AbrB sur l'ADN n'a pas permis d'identifier une séquence consensus de fixation de l'homotétramère. Il a été suggéré que ce complexe reconnait une structure tridimentionnelle de l'ADN (Bobay *et al.*, 2004; Bobay *et al.*, 2006). Chez *B. subtilis,* il existe deux régulateurs homologues à AbrB: SpoVT et Abh. Malgré la forte identité de séquence de leur extrémité N-terminale, les régulateurs AbrB, SpoVT et Abh ont une spécificité et une affinité différentes pour l'ADN. Ces caractéristiques peuvent s'expliquer par des différences structurales (Bobay *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2008). SpoVT est un régulateur spécifique de la préspore qui s'exprime pendant les phases tardives de la sporulation (Bagyan *et al.*, 1996). Abh joue un rôle clé dans la formation des biofilms (Murray *et al.*, 2009) et dans la production de nombreuses molécules antimicrobiennes (Strauch *et al.*, 2007).

Une étude récente montre que AbrB peut former un hétérotétramère avec Abh et que ce complexe a une affinité et une spécificité pour l'ADN différentes de celles des homomères d'Abh et d'AbrB (Chumsakul *et al.*, 2011). Les auteurs suggèrent qu'en fonction de la concentration intracellulaire d'AbrB et d'Abh, il se forme dans les cellules bactériennes soit des homotétramères d'AbrB, soit des homotétramères d'Abh, soit des hétérotétramères AbrB/Abh. La régulation des niveaux de production intracellulaire d'AbrB et d'Abh pourrait donc être une stratégie pour moduler l'expression de gènes en fonction du stade de développement des bactéries. Par exemple, la faible production d'Abh pendant la phase exponentielle de croissance pourrait favoriser la formation d'homotétramères d'AbrB pour

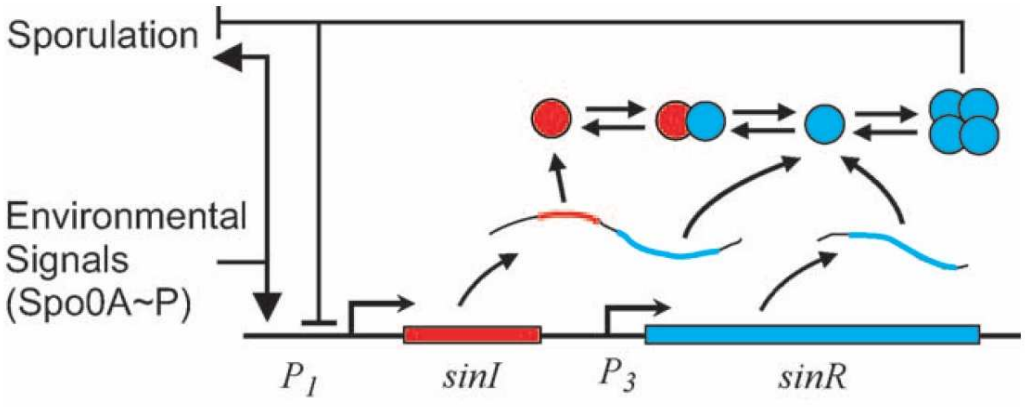


Figure 11: Schéma simplifié de l'opéron *sin* et de sa régulation.
Cette figure est décrite dans le texte.
(Voigt et al., 2005)

réprimer des gènes de phase stationnaire. Pendant la phase de transition, des hétérotétramères AbrB/Abh pourraient avoir une activité transcriptionnelle hybride spécifique de cette phase de croissance. Enfin, en phase stationnaire, des homotétramères d'Abh pourraient se former suite à la diminution de la concentration intracellulaire d'AbrB et ainsi favoriser la transcription de gènes impliqués dans la formation des biofilms.

4.3. □R

Chez *B. subtilis*, SinR est un régulateur pléiotrope qui contrôle l'expression de gènes impliqués dans la sporulation, la mobilité, la compétence, la protéolyse et la formation des biofilms (Chu *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 1996; Mandic-Mulec *et al.*, 1992; Mandic-Mulec *et al.*, 1995). La protéine SinR forme un tétramère qui se fixe sur l'ADN en amont du démarrage de transcription de ses gènes cibles. La protéine SinI est un antagoniste de SinR. Elle déstabilise le tétramère de SinR pour former un hétérodimère (SinI-SinR) qui est incapable de fixer l'ADN (Bai *et al.*, 1993).

Les gènes *sinI* et *sinR*, sont organisés en opéron (cf □ig **11**). Ils sont transcrits à partir de trois promoteurs : P1, P2 et P3. Les promoteurs P1 et P2, situés en amont de *sinI,* permettent de transcrire les gènes *sinI* et *sinR* et d'obtenir des ARNm bicistroniques. Le promoteur P3, localisé en aval de *sinI*, permet de transcrire *sinR* indépendamment de *sinI*. Les promoteurs P1 et P3 sont dépendants de Sigma-A. La transcription à partir du promoteur P3 débute dès la phase exponentielle de croissance et se termine quelques heures après l'entrée en phase stationnaire. En revanche, la transcription à partir du promoteur P1 ne débute qu'après l'entrée en phase stationnaire. La transcription à partir de P1 est retardée par rapport à P3 en raison du contrôle négatif qu'exercent AbrB et Hpr sur ce promoteur. De plus, il a été montré que Spo0A~P active la transcription de l'opéron *sin* à partir de ce promoteur dès l'entrée en phase stationnaire. Enfin, la transcription à partir du promoteur P2 débute 2 heures après l'entrée en phase stationnaire et pourrait être dépendante de Sigma-E (Gaur *et al.*, 1988; Shafikhani *et al.*, 2002). Par conséquent, SinR s'exprime de façon constitutive tout au long de la croissance alors que SinI ne s'exprime qu'en phase stationnaire. Le contrôle de SinR sur ses gènes cibles est donc levé lorsque les bactéries entrent en phase stationnaire.

Le régulon SinR a récemment été décrit chez *B. anthracis* (Pflughoeft *et al.*, 2011). Ce régulon inclut de nombreux gènes précédemment identifiés dans le regulon SinR de *B. subtilis*. Par exemple, le gène *sipW* et les gènes de sporulation *spoIIE* et *spoIIG* sont contrôlés par SinR chez *B. anthracis* comme chez *B. subtilis.* En outre, SinR régule des gènes qui semblent être spécifiques du groupe *B. cereus* tels que *calY* et *inhA1* (Grandvalet *et al.*,

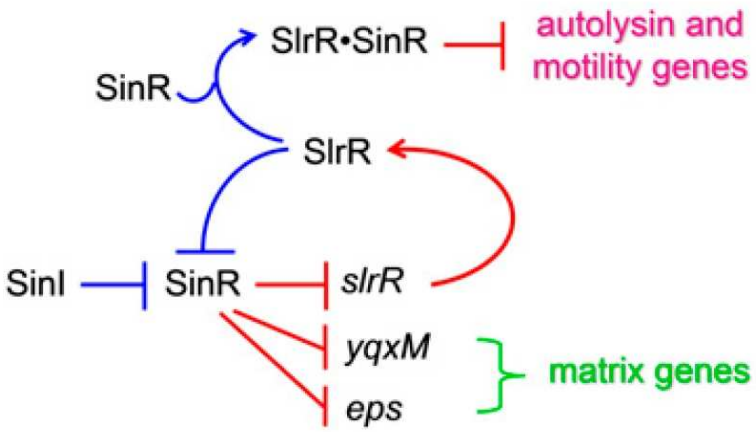


Figure 12 : Régulation de la mobilité et de la synthèse de la matrice des biofilms chez *B. subtilis*.

SinI inhibe le répresseur SinR. La répression de SinR sur les opérons impliqués dans la synthèse de la matrice (*yqxM*et *eps*) et sur le gène codant pour SlrR est levée. La synthèse de SlrR dans la cellule bactérienne a deux conséquences. Elle conduit à la formation de l'hétérocomplexe SlrR-SinR, qui réprime des gènes codant pour des autolysines et des gènes de motilité. La synthèse de SlrR entraîne également une inhibition de SinR (par titration de SinR), ce qui a pour conséquence d'augmenter encore la transcription de *slrR* et des opérons *yqxM* et *eps.*

(Chai et al, 2010)

2001; Pflughoeft *et al.*, 2011). A l'inverse, certains gènes contrôlés par SinR chez *B. subtilis* sont absents chez *B. anthracis*. Il s'agit notamment de gènes impliqués dans la mobilité, la compétence et la formation des biofilms (Pflughoeft *et al.*, 2011).

Nous avons récemment montré que chez *B.cereus,* SinR est impliqué dans la formation des biofilms et une analyse transcriptomique a permis d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans ce processus (*sipW-tasA, krsEABC*) (Dubois et coll, données non publiées). SinR régule également des gènes codant pour des entérotoxines et pourrait donc permettre de coupler la formation des biofilms à la synthèse de facteurs de virulence chez *B. cereus*. Nos résultats suggèrent également qu'un autre régulateur stimule la formation des biofilms chez *B. cereus*. Chez *B. subtilis*, un régulateur homologue de SinR, nommé SlrR, est impliqué dans la formation des biofilms (cf **Fig 12**). Dans le cytoplasme des bactéries qui forment un biofilm, le taux de Spo0A~P est élevé. Dans cette condition, le gène *slr* est exprimé et la protéine SlrR forme avec SinR un hétéromère qui se fixe sur l'ADN. Ce complexe réprime des gènes impliqués dans la division cellulaire et la mobilité des bactéries favorisant ainsi la formation de biofilms (Chai *et al.*, 2010).

Les régulateurs AbrB et SinR sont capables de former des hétéromères avec des protéines homologues. Ces hétéromères ont une affinité et une spécificité pour l'ADN qui sont différentes de celles des homomères. De plus, la stœchiométrie des protéines qui constituent ces hétéro-complexes semble moduler leur activité. Ces découvertes récentes mettent en lumière un nouveau niveau de complexité dans la régulation de l'expression des gènes au sein du groupe *B. cereus*.

4.4. □ig H

Chez *B. subtilis*, Sigma-H contrôle des gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques associés à la phase de transition tels que la sporulation, la compétence, la biosynthèse des cytochromes, l'accès aux nutriments, le transport et le métabolisme de la paroi (Britton *et al.*, 2002). Le gène codant pour Sigma-H, nommé *spo0H*, s'exprime principalement pendant la phase de transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire de croissance. La transcription de *spo0H* est réprimée par AbrB, qui se fixe à la région promotrice de ce gène, pendant la phase exponentielle de croissance. Cette répression est levée par l'augmentation du taux de Spo0A~P en fin de phase exponentielle. L'activité de Sigma H est également régulée au niveau post-transcriptionnel par de nombreux facteurs tels que le pH, la disponibilité en substrats carbonés et probablement la réponse stringente (Cosby & Zuber, 1997; Dixon *et al.*, 2001; Eymann *et al.*, 2001; Frisby & Zuber, 1994). Les protéines

de la famille Clp jouent un rôle important dans cette régulation post-transcriptionnelle. ClpX stimule la transcription dépendante de Sigma-H par une interaction directe avec l'ARN polymérase ADN dépendante et ClpC pourrait être responsable de la dégradation de Sigma-H en phase stationnaire de croissance (Liu & Zuber, 2000; Nakano *et al.*, 2000; Nanamiya *et al.*, 1998).

4.5. CodY

CodY est un régulateur transcriptionnel dont le rôle physiologique majeur consiste à établir une hiérarchie dans l'utilisation des substrats azotés et carbonés disponibles dans des conditions de croissance où les nutriments sont en excès. Chez *B. subtilis*, CodY régule de façon directe plus d'une centaine d'unités transcriptionnelles dont environ 70 opérons. Il contrôle notamment des gènes impliqués dans le métabolisme du carbone et de l'azote pendant la phase exponentielle de croissance et des gènes qui sont induits lors de l'entrée en phase stationnaire (Guedon *et al.*, 2001; Molle *et al.*, 2003; Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001; Serror & Sonenshein, 1996). Des protéines homologues à CodY sont présentes chez la plupart des bactéries à Gram positif et notamment chez les bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus, Clostridium difficile, Streptococcus pyogenes* et au sein du groupe *B. cereus*. Plusieurs études récentes suggèrent que CodY contribue à la virulence de ces pathogènes en coordonnant l'expression de fonctions associées à la virulence avec l'expression des gènes du métabolisme (Chateau *et al.*, 2011; Dineen *et al.*, 2010; Kreth *et al.*, 2011; Majerczyk *et al.*, 2010).

Chez *B. subtilis* et *B. cereus sensu lato*, le gène *codY* appartient à un opéron de 4 gènes (*codVWXY*). Cet opéron présente un seul promoteur en amont de *codV* qui pourrait être dépendant de Sigma-A. L'opéron *codVWXY* est fortement exprimé dès le début de la croissance jusqu'au début de la phase stationnaire (Slack *et al.*, 1995). Cependant, la concentration intracellulaire de CodY semble être similaire quel que soit le milieu de culture et la phase de croissance des bactéries (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001).

La séquence d'ADN consensus reconnue par CodY chez *Lactococcus lactis* est un palindrome de 15 pb de séquence AATTTTCWGAAAATT. La séquence consensus de CodY est similaire chez plusieurs bactéries à Gram positif, notamment chez *B. subtilis* et *B. anthracis* (Belitsky & Sonenshein, 2008; Dineen *et al.*, 2010; Guedon *et al.*, 2005; Majerczyk *et al.*, 2010; van Schaik *et al.*, 2009). L'affinité de CodY pour cette séquence d'ADN dépend de deux co-effecteurs : les acides aminés branchés (isoleucine, leucine et valine) et le GTP (Brinsmade & Sonenshein, 2011; Shivers & Sonenshein, 2004). Plus la concentration

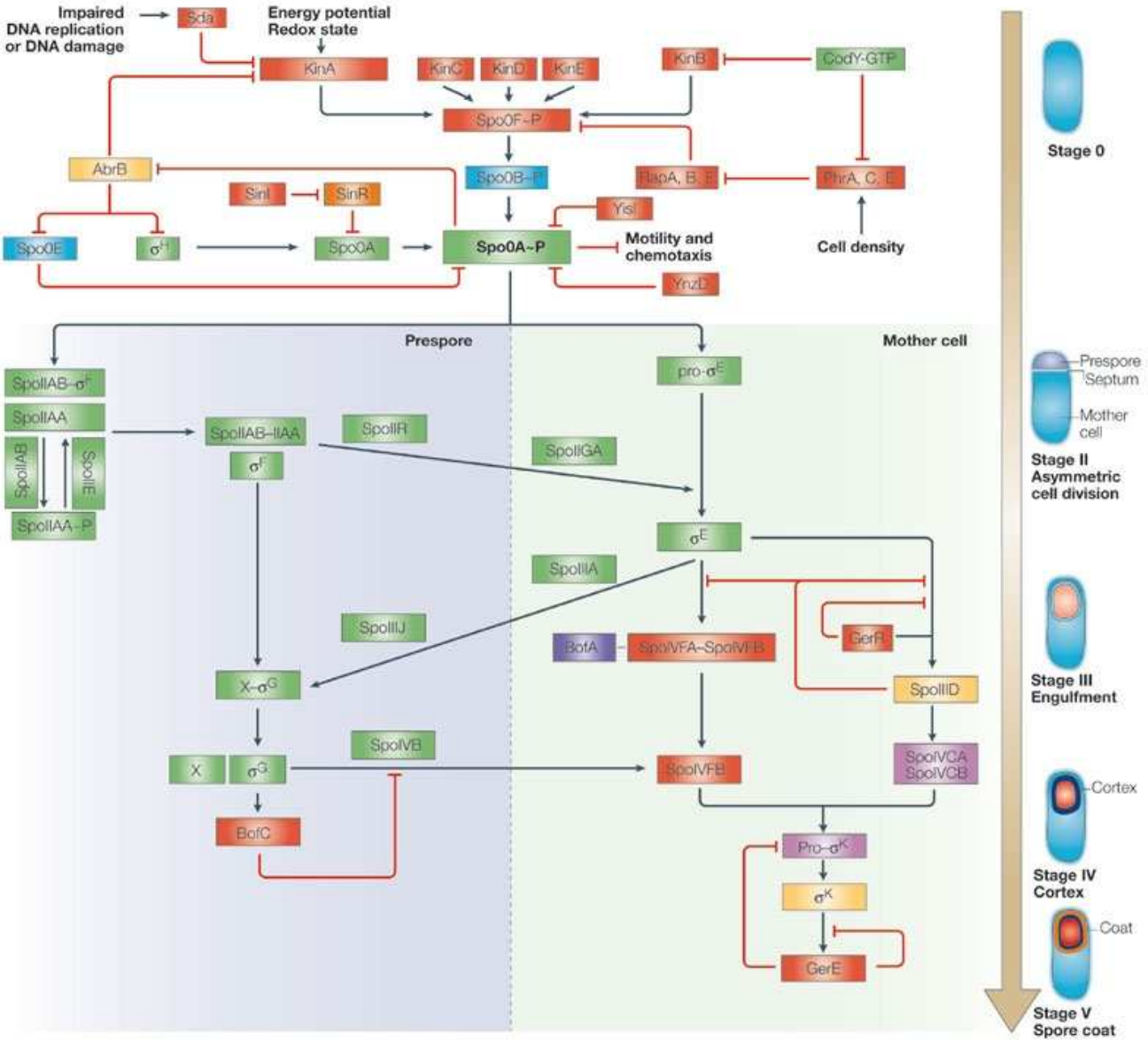


Figure 13 : Régulation de la sporulation chez *B. subtilis*.
Le mécanisme est détaillé dans le texte.
(Paredes et al., 2005)

intracellulaire de ces co-effecteurs est élevée plus l'affinité de CodY pour l'ADN est importante. Le GTP et les acides aminés branchés permettent donc de moduler l'expression des gènes régulés par CodY en fonction de la disponibilité en nutriments du milieu de culture. Dans un milieu riche en nutriments, le taux intracellulaire de GTP et d'acides aminés branchés est élevé. Dans ces conditions, CodY active des gènes impliqués dans le métabolisme carboné et azoté et réprime des gènes de phase stationnaire. En revanche, au début de la phase stationnaire, le taux intracellulaire des deux co-effecteurs diminue, CodY a moins d'affinité pour l'ADN et la répression sur les gènes de phase stationnaire est levée.

5. □ a

5.1. □ entes étapes de la sporulation

La sporulation est un phénomène complexe qui dure de 6 à 8 h et qui se décompose en une série de 7 étapes de développement coordonnées (Stragier & Losick, 1996). Ces étapes ont été déterminées chez *B. subtilis* et sont sensiblement les mêmes au sein du groupe *B. cereus* (cf **Figure 13**). La bactérie végétative correspond au stade 0. La phase I correspond à la réplication de l'ADN en deux chromosomes et à leur ségrégation polaire. Une division asymétrique s'engage en phase II : la membrane plasmique s'invagine et sépare la bactérie en deux compartiments de tailles inégales qui possèdent leur propre matériel génétique. Une étape d'invagination se produit ensuite autour du plus petit compartiment, qui est nommé préspore. Cette étape aboutit à la séparation de la préspore et de la cellule mère par deux membranes de polarité inversée (phase III). Le peptidoglycane de la paroi primordiale et du cortex se forme autour de la préspore, entre les deux membranes (phase IV). La maturation de la spore se termine par l'ajout, autour de la préspore, de protéines synthétisées dans la cellule mère et constituant le manteau (phase V). La spore, qui présente une forme ovoïde mesurant de 0,75 à 1µm, est alors libérée suite à la lyse de la cellule mère (phase VI-VII).

5.2. Régulation de la sporulation

Les différentes étapes de la sporulation sont contrôlées par une cascade de facteurs sigma qui permettent à l'ARN polymérase de transcrire des gènes spécifiques de chaque étape du développement dans les deux compartiments de la cellule bactérienne. Un schéma global de la régulation de la sporulation est présenté dans la **Figure 13**. La protéine Spo0A est phosphorylée *via* le phosphorelais (cf Chapitre I § 4.1). Lorsque le taux de Spo0A~P atteint une concentration suffisante, la protéine active de façon directe la transcription du gène

spoIIE et des opérons *spoIIGA-sigE* et *spoIIAA-spoIIAB-spoIIAC*. Spo0A~P exerce également un contrôle positif indirect sur ces gènes *via* AbrB (Molle *et al.*, 2003; Phillips & Strauch, 2002). Les gènes *spoIIAC* et *sigE* codent pour les facteurs de transcription, respectivement Sigma-F et Sigma-E. Ces deux facteurs sigma sont présents dans les deux compartiments de la cellule bactérienne mais sous une forme inactive. Dans la préspore, Sigma-F est inactivé par la formation du complexe SpoIIAB-Sigma-F et devient actif grâce à SpoIIAA qui déplace la protéine SpoIIAB de ce complexe. Il se forme alors le complexe SpoIIAB-SpoIIAA qui permet la libération du facteur Sigma-F actif (Duncan & Losick, 1993; Garsin *et al.*, 1998a; Garsin *et al.*, 1998b). Sigma-F active alors la transcription des gènes *spoIIIG* et *spoIIR*. Le gène *spoIIIG* code pour le précurseur inactif de Sigma-G (pro-Sigma-G). La protéine SpoIIR active la protéase SpoIIGA localisée dans le septum qui clive le précurseur pro-Sigma-E en la forme active de Sigma-E dans la cellule mère (Hofmeister *et al.*, 1995). Sigma-E active la transcription du gène *spoIIID* et des opérons *spoIVFA-spoIVFB* et *spoIIIA* (Eichenberger *et al.*, 2004; Steil *et al.*, 2005). La protéine SpoIIID active la transcription du gène *spoIVCA* qui code pour la recombinase SpoIVCA. Cette recombinase excise un fragment de 48 kb, nommé élément *skin*, et fusionne les gènes *spoIIIC* et *spoIVCB* pour donner une copie fonctionnelle du gène *sigK* (Errington *et al.*, 1988; Kunkel *et al.*, 1988; Kunkel *et al.*, 1990; Takemaru *et al.*, 1995). Le gène s'exprime alors dans la cellule mère pour donner la protéine pro-sigma-K. Les gènes *spoIVFA* et *spoIVFB* codent pour les protéases SpoIVFA et SpoIVFB, respectivement. SpoIVFB est une protéase localisée dans la membrane de la cellule mère qui est maintenue inactive par les protéines SpoIVFA et BofA (Cutting *et al.*, 1991; Ricca *et al.*, 1992). Les protéines SpoIVB et CtpB clivent la protéine régulatrice SpoIVFA qui à son tour active SpoIVFB (Campo & Rudner, 2007). La protéase SpoIVFB activée clive alors la protéine pro-Sigma-K en Sigma-K. L'opéron *spoIIIA* code pour huit protéines (SpoIIIAA à SpoIIIAH) qui forment un pore dans la membrane de la préspore. La protéine SpoIIIJ, située dans la préspore, interagit avec SpoIIIAE et intervient dans l'activation de Sigma-G (Camp & Losick, 2008; Serrano *et al.*, 2008). Le mécanisme précis de l'activation de Sigma-G reste méconnu. Une fois activé dans leurs compartiments respectifs Sigma-K et Sigma-G participent à la transcription de gènes de sporulation tardifs impliqués dans les étapes finales de l'assemblage, de la maturation et de la libération des spores.

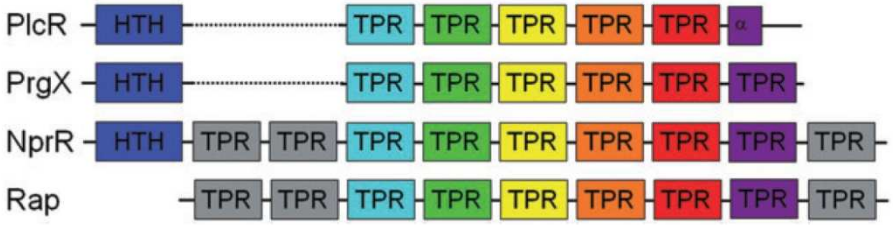


Figure 14 : Structure des régulateurs de la famille RNPP.
Les régulateurs PlcR, PrgX et NprR possèdent un domaine HTH de liaison à l'ADN. Ce domaine est situé en position N-terminale (en Bleue). Les six domaines TPR communs aux régulateurs de la famille RNPP sont de couleur cyan, vert, jaune, orange, rouge et violet, respectivement. Les trois motifs TPR spécifiques de NprR et des Rap sont représentés en gris.
(Perchat et al., 2011)

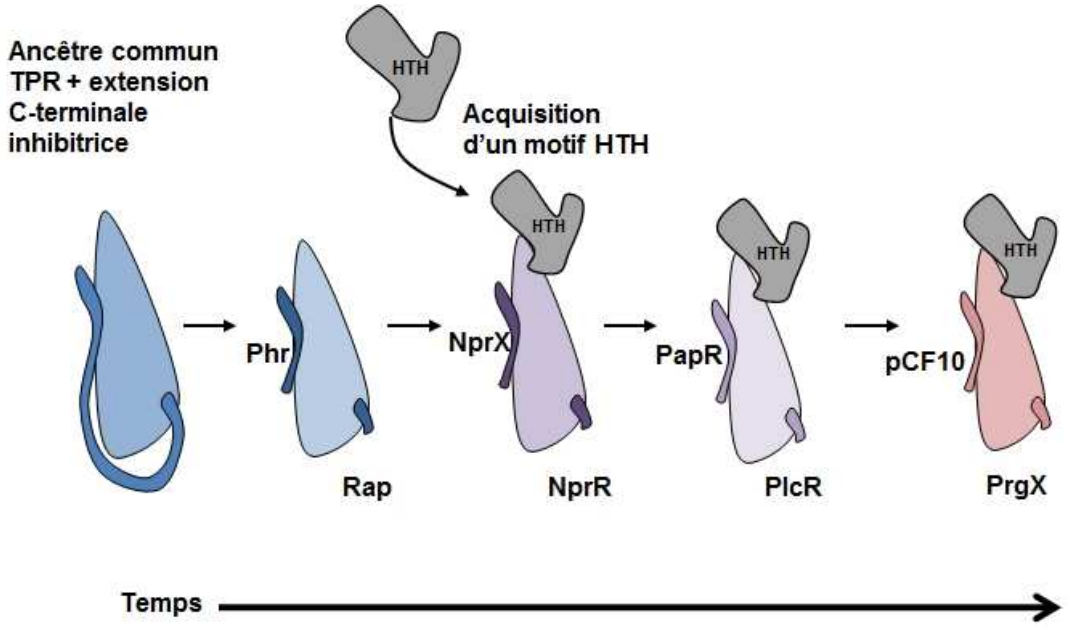


Figure 15: Modèle d'évolution des régulateurs de la famille RNPP.
Les régulateurs de la famille RNPP pourraient descendre d'un ancêtre commun possédant des motifs TPR et une extension C-terminale inhibitrice. Les Rap pourraient être apparus suite à la perte de l'extension C-terminale de cet ancêtre commun. Les régulateurs NprR, PlcR et PrgX pourraient être apparus suite à l'acquisition par les Rap d'un domaine HTH.
(Adapté à partir de la thèse de L. Bouillaut, 2007)

Chapitre - Cellules à Gram positif

Les bactéries communiquent entre elles et avec leurs hôtes par différents mécanismes. Le quorum-sensing est l'un des mécanismes par lequel les bactéries synchronisent leur(s) activité(s) au sein d'un groupe en fonction de la densité de la population. Pour évaluer leur nombre, les cellules bactériennes sécrètent et détectent de petites molécules chimiques appelées phéromones ou auto-inducteurs. Lorsque le quorum bactérien, défini comme « unité minimale d'action » est atteint, les bactéries déclenchent de manière coordonnée un changement comportemental de la population. Chez les bactéries à Gram négatif, le quorum-sensing dépend de la synthèse et la détection de petites molécules: les N-acyl-homosérine lactones (AHLs) (Ruby, 1996). La communication des bactéries à Gram positif diffère de celle des bactéries à Gram négatif principalement par la nature du signal. Les bactéries à Gram positif communiquent principalement par l'intermédiaire de petits peptides sécrétés. Chez les bactéries à Gram positif, plusieurs systèmes de quorum-sensing ont été étudiés et deux modèles de communication ont été définis. Le premier modèle fait intervenir un système à deux composants qui détecte le signal à l'extérieur de la bactérie et déclenche une cascade de phosphorylation permettant l'activation de la protéine régulatrice. Ce système est décrit, par exemple, chez *Staphylococcus* (le système Agr) ou chez *Streptococcus pneumoniae* (le système Com). Le second modèle implique un système d'import des peptides signaux et une protéine à la fois senseur du signal et régulatrice (Miller & Bassler, 2001). La plupart des systèmes de ce type appartiennent à la famille RNPP (Rap/NprR/PlcR/PrgX).

1. La famille RNPP

La famille RNPP regroupe des régulateurs qui répondent à trois critères établis par Declerk et coll (Declerck *et al.*, 2007): (i) Les homologues de ces régulateurs ne sont présents que chez les bactéries à Gram positif du phylum des Firmicutes. (ii) Ils interagissent de façon directe avec un peptide de signalisation dans la cellule bactérienne. (iii) Leur peptide de signalisation est codé par un gène situé en aval du gène codant pour la protéine régulatrice. Ce peptide est synthétisé sous la forme d'un précurseur qui est clivé pour devenir actif.

En outre, les régulateurs de la famille RNPP sont constitués d'une répétition de domaines TPR (TétratricoPeptide Repeats) (cf **Figure 14**) (Declerck *et al.*, 2007; Perego & Brannigan, 2001). Les domaines TPR sont impliqués dans des interactions protéine-protéine entre deux protéines à motifs TPR (interaction TPR-TPR) ou entre une protéine

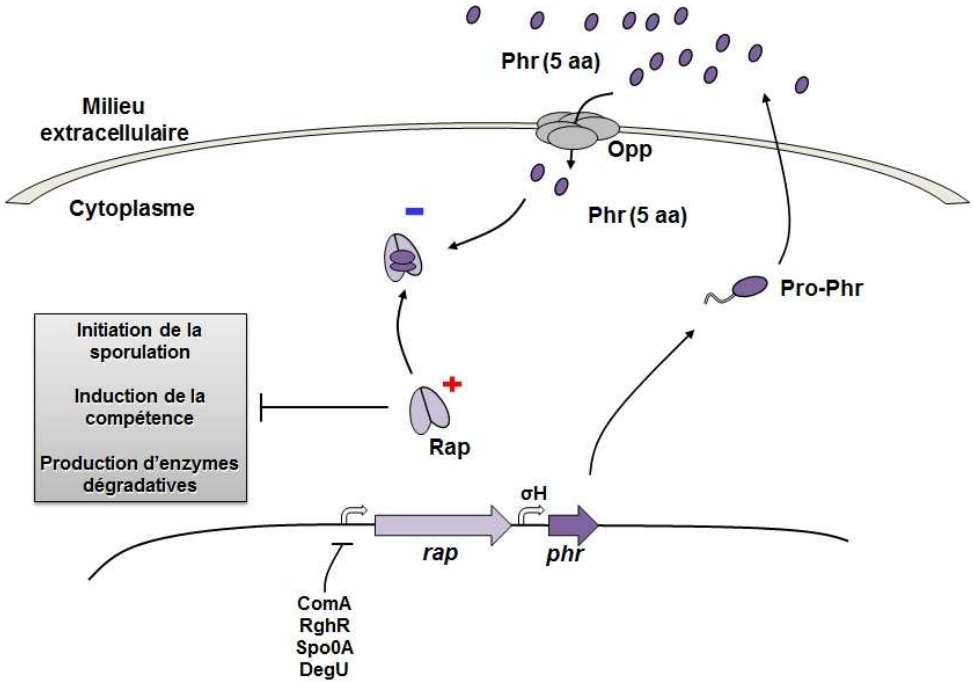


Figure 16: Modèle de régulation des systèmes Rap-Phr.
Le mécanisme est détaillé dans le texte.

Protéine Rap	Peptide Phr	Cible(s) de Rap	Mécanisme	Réponses regulées par le(s) protéine(s) cible(s)
RapA	PhrA	Spo0F~P	Stimule la déphosphorylation	Active la sporulation indirectement *via* Spo0A
RapB	PhrC	Spo0F~P	Stimule la déphosphorylation	Active la sporulation indirectement *via* Spo0A
RapC	PhrC	ComA	Inhibe la fixation de ComA à l'ADN	Active l'expression de gènes impliqués dans la production d'enzymes degradatives, d'antibiotiques, et dans la compétence
RapD		Inconnue	Inconnu	
RapE	PhrE	Spo0F~P	Stimule la déphosphorylation	Active la sporulation indirectement *via* Spo0A
RapF	PhrF	ComA	Inhibe la fixation de ComA à l'ADN	Active l'expression de gènes impliqués dans la production d'enzymes degradatives, d'antibiotiques, et dans la compétence
RapG	PhrG	DegU, ComA[a]	Inhibe la fixation de DegU à l'ADN, inconnu	Active l'expression de gènes impliqués dans la production d'enzymes degradatives, d'antibiotiques, et dans la compétence
RapH	PhrH	ComA[a], DegU[a]	Inconnu	Active l'expression de gènes impliqués dans la production d'enzymes degradatives, d'antibiotiques, et dans la compétence
RapI	PhrI	Inconnue	Inconnu	stimule l'expression de gènes, l'excision, et le transfert de ICE*Bs1*
RapJ		Inconnue	Inconnu	
RapK	PhrK	ComA[a]	Inconnu	Active l'expression de gènes impliqués dans la production d'enzymes degradatives, d'antibiotiques, et dans la compétence

[a] *Cibles potentielles.*

Tableau I : Processus régulés par les protéines Rap et les peptides Phr chez *B. subtilis*.
(Thèse de L. Bouillaut, 2007)

à motif TPR et une protéine sans motif TPR (interaction TPR-non-TPR) (Lamb *et al.*, 1995). Chaque motif TPR est constitué d'une séquence dégénérée de 34 acides aminés arrangés en deux hélices α antiparallèles formant un motif hélice-tour-hélice. En plus de ces motifs TPR, les régulateurs NprR, PlcR et PrgX présentent un motif HTH de liaison à l'ADN à leur extrémité N-terminale. Declerck et coll, suggèrent que les régulateurs de la famille RNPP descendent d'un ancêtre commun (Declerck *et al.*, 2007). Un modèle d'évolution de ces régulateurs est présenté dans la **g15** .

1.1. □p

Chez *B. subtilis* les membres de la famille des Response regulator aspartyl-phosphate (Rap) contrôlent de nombreux processus physiologiques tel que l'initiation de la sporulation, la compétence et la production d'enzymes dégradatives (Auchtung *et al.*, 2006; Ogura *et al.*, 2003; Perego *et al.*, 1996). L'activité des Rap est modulée par des peptides de signalisation nommés Phr (Phosphatases regulator) (Perego & Hoch, 1996). Un modèle de fonctionnement des systèmes de quorum-sensing Rap-Phr est présenté dans la **g16** . Le Pro-Phr est synthétisé puis exporté dans le milieu extracellulaire. Après avoir été maturé, il est réimporté dans la cellule bactérienne par le système Opp (Perego & Hoch, 1996). A faible densité cellulaire, les Rap se fixent à leurs cibles et les inactivent. A forte densité cellulaire, le Phr mature se fixe sur la protéine Rap et empêche l'interaction de cette protéine avec sa cible. Le nombre de gènes codant pour les Rap et les Phr dans les génomes de *B. subtilis* et des bactéries du groupe *B. cereus* sont différents. Dans le génome de *B. subtilis* 11 gènes codent pour des Rap et 8 gènes codent pour des Phr (Hayashi *et al.*, 2006; Kunst *et al.*, 1997). Dans le génome de *B. thuringiensis* serovar *israelensis,* il existe 8 gènes codant pour des Rap et 4 gènes codant pour des Phr ; chez *B. anthracis* A2012, on trouve 6 Rap et 5 Phr ; et chez *B. cereus* ATCC 14579 on compte 5 Rap et 4 Phr (Anderson *et al.*, 2005). Il a été montré que certains Phr modulent l'activité de plusieurs Rap. Par exemple, chez *B. subtilis*, PhrC (ou CSF) régule l'activité de RapB et RapC. Le **ta** □ndique les différents processus physiologiques contrôlés par les Rap chez *B. subtilis*, leurs cibles et les Phr correspondants. Les Rap interagissent avec leur cible *via* leurs domaines TPR. Lorsqu'ils sont en concentration suffisante les Phr inhibent l'activité des Rap en entrant en compétition avec leur cible au niveau des domaines TPR (Perego & Brannigan, 2001).

Les Rap ont un rôle majeur dans la régulation de l'entrée en sporulation. Chez *B. subtilis*, RapA, RapB, RapE et RapH retardent l'entrée en sporulation des bactéries en diminuant le niveau de phosphorylation de Spo0F, l'accepteur primaire du phosphorelais (cf

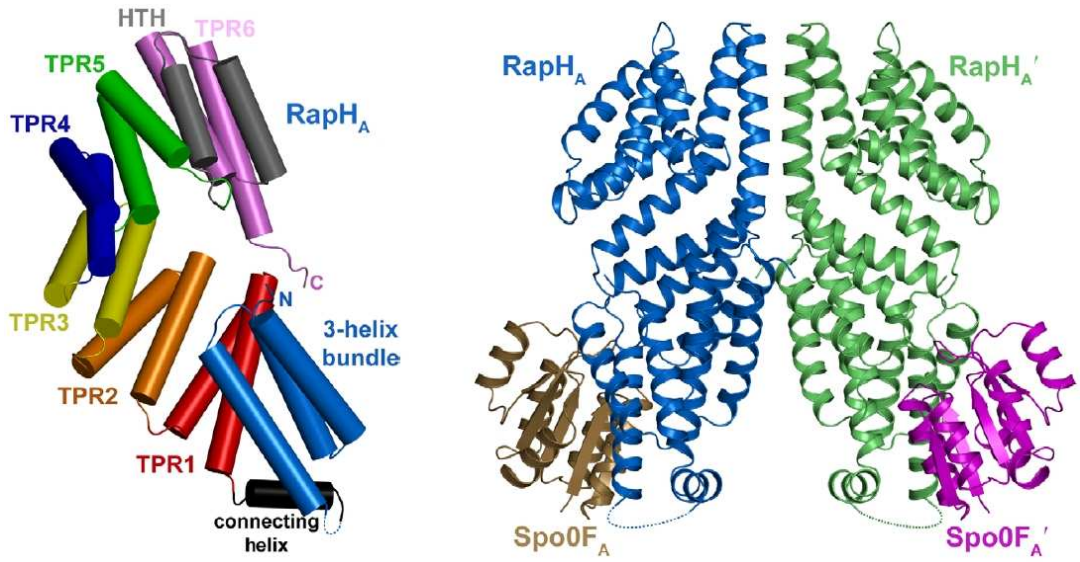


Figure 17: Structure de RapH chez *B. subtilis*.
Figure de gauche : La protéine RapH est constituée de six motifs TPR (annotés TPR1 à TPR6) et d'un domaine à trois hélices α (en bleue). **Figure de droite :** La protéine RapH forme un dimère. Les monomères de cette protéine sont annotés $RapH_A$ (en bleu) et $RapH_A$' (en vert). Le dimère de RapH interagit avec deux molécules de Spo0F au niveau de ces domaines à trois hélices α. Les protéines Spo0F sont annotées $Spo0F_A$ (en marron) et $Spo0F_A$' (en violet).
(Parashar et al, 2011)

Chapitre I § .4.1). La structure de RapH a été récemment caractérisée par cristallographie aux rayons X (Parashar *et al.*, 2011). La structure indique que cette protéine est constituée de 6 motifs TPR et d'un motif à trois hélices alpha (3-helix bundle) (cf [illegible]). Les résultats de la co-cristalisation de RapH avec Spo0F indiquent que RapH interagit avec Spo0F au niveau du domaine à trois hélices alpha. Les motifs TPR sont néanmoins indispensables à l'interaction RapH-Spo0F. RapH agit comme une phosphatase qui déphosphoryle Spo0F. En outre, les auteurs indiquent, qu'en plus de son activité de phosphatase, la protéine RapH empêche le transfert de phosphate à partir de Spo0F et vers Spo0F.

Les gènes *rap* et *phr* sont généralement co-transcrits à partir d'un promoteur situé en amont du gène *rap* (Perego & Brannigan, 2001). La transcription à partir de ce promoteur est contrôlée par différents régulateurs. Chez *B. subtilis*, la transcription des gènes *rapA*, *rapC* et *rapE* est négativement controlée par ComA (Jiang *et al.*, 2000; Lazazzera *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 1992) et les gènes *rapG*, *rapH* et *rapD* sont régulés négativement par RghR (Hayashi *et al.*, 2006; Ogura & Fujita, 2007). Par ailleurs, l'expression de *rapA* est régulée négativement par Spo0A et DegU (Molle *et al.*, 2003; Ogura *et al.*, 2001) alors que l'expression des gènes *rapC*, *rapE*, *rapF* et *rapI* est indirectement activée par Spo0A (Fawcett *et al.*, 2000; Molle *et al.*, 2003). La plupart des gènes *phr* sont également transcrits à partir d'un autre promoteur situé en aval du gène *rap* (McQuade *et al.*, 2001; Pottathil & Lazazzera, 2003). Ce promoteur est, en général, dépendant de Sigma-H. Il pourrait permettre de maintenir un niveau d'expression suffisant des Phr pendant la phase de transition et en début de phase stationnaire de croissance pour éviter que les Rap ne retardent l'initiation de la sporulation (McQuade *et al.*, 2001).

1.2. [illegible]

PIcR contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans la virulence de *B. cereus* et *B. thuringiensis* (cf Chapitre I § 3.3). L'analyse des régions promotrices des gènes régulés par PlcR a permis de déterminer une séquence consensus de fixation de ce régulateur à l'ADN. Cette séquence de 16 pb (TATGNAN$_4$TNCATA), appelée boîte PlcR, peut être située jusqu'à 200 pb en amont du site de démarrage de transcription d'un gène régulé (Agaisse *et al.*, 1999). Une analyse transcriptomique indique que PlcR contrôle la transcription d'au moins 45 gènes codant principalement pour des protéines sécrétées. Ces protéines interviennent notamment dans la nutrition, la protection des cellules et

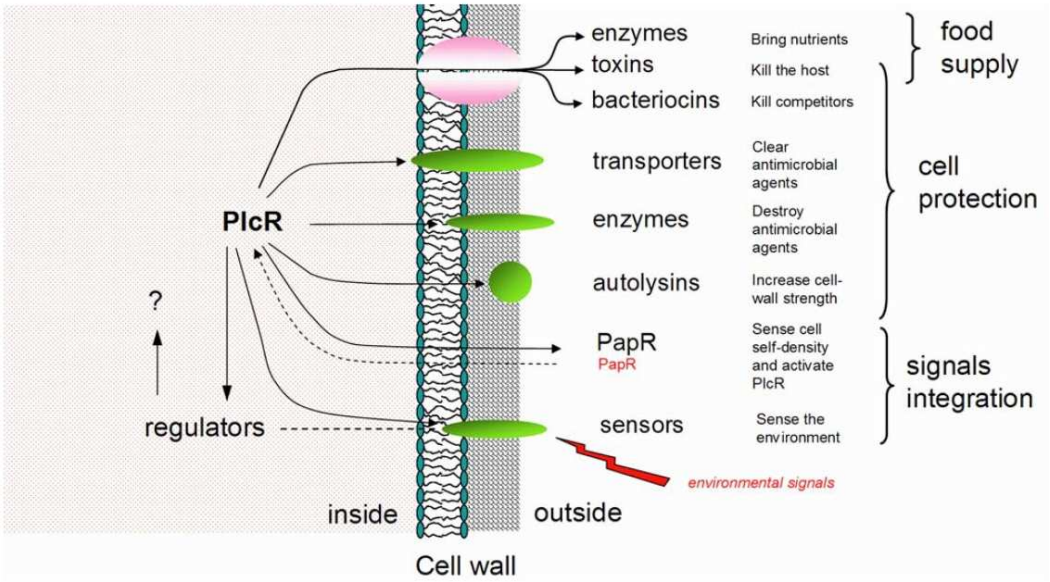


Figure 18: Le régulon PlcR.

PlcR régule positivement l'expression de gènes impliqués dans la nutrition, la protection des cellules bactériennes et l'intégration des signaux environnementaux. Les protéines membranaires et les protéines associées à la paroi sont représentées en vert. Les protéines sécrétées sont exportées à l'extérieur de la cellule bactérienne par le système Sec (représenté en rose). PlcR régule l'expression de protéines senseurs qui intègrent des signaux environnementaux (flèche rouge) et transmettent le signal à des régulateurs encore non identifiés (pointillés). L'activité de PlcR est dépendante du peptide de signalisation PapR (en rouge).

(Gohar et al, 2008)

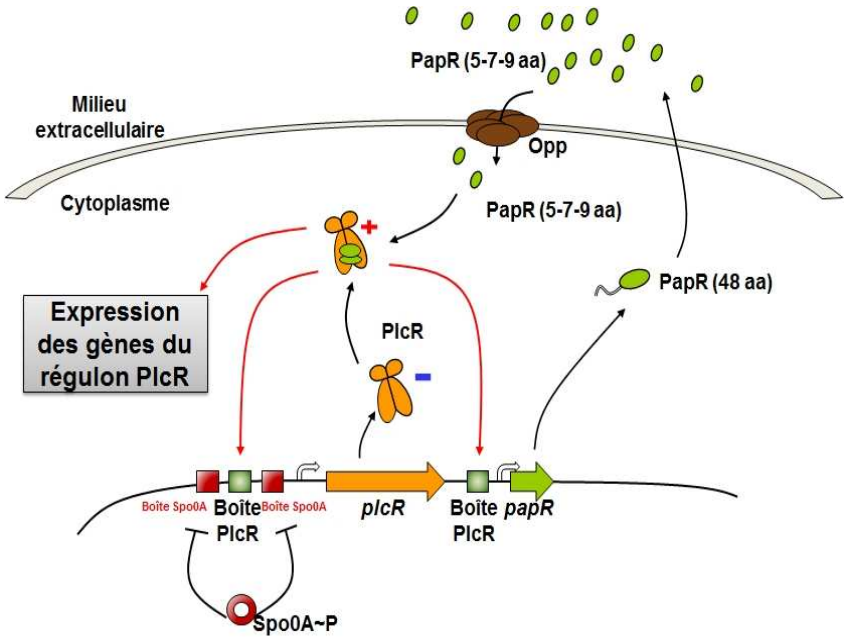


Figure 19: Modèle de régulation du système PlcR-PapR.

Le mécanisme est détaillé dans le texte.

(Thèse de L. Bouillaut, 2007)

l'intégration de signaux environnementaux (Gohar *et al.*, 2008) (cf **Figure 18**). La présence d'une boîte PlcR en amont d'un gène est une condition requise mais non suffisante à l'activation par PlcR. La région -10 des promoteurs régulés par PlcR est proche de la région -10 (TATAAT) des promoteurs reconnus par Sigma-A. En revanche, les boîtes -35 diffèrent de la séquence consensus reconnue par ce facteur sigma.

L'activité de PlcR est dépendante d'un petit peptide nommé PapR (**P**lcR **A**ctivating **P**eptide) (Agaisse *et al.*, 1999). Le gène *papR,* situé à 70 pb en aval du gène *plcR,* appartient au régulon PlcR et code pour un peptide de 48 acides aminés. La délétion du gène *papR* abolit l'expression du régulon PlcR et la virulence du mutant est réduite par rapport à la souche parentale. Le peptide PapR est sécrété puis maturé sous la forme d'un heptapeptide qui correspond à l'extrémité C-terminale du précurseur de 48 acides aminés (Bouillaut *et al.*, 2008; Slamti & Lereclus, 2002). La forme active de PapR est ensuite importée dans la cellule bacterienne *via* le système Opp (Gominet *et al.*, 2001). Une fois dans la cellule, PapR forme un complexe avec PlcR (Declerck *et al.*, 2007). Ce complexe se fixe à l'ADN sur des boites PlcR et active la transcription des gènes du régulon PlcR (Gohar *et al.*, 2008; Slamti & Lereclus, 2002). Un modèle basé sur ces résultats est présenté dans la **Figure 19**. L'analyse de la séquence protéique de PlcR indique que ce régulateur de 34 kDa présente un motif HTH (Hélice-Tour-Hélice) à son extrémité N-terminale et est composé de motifs TPR (Core & Perego, 2003; Declerck *et al.*, 2007). Une analyse structurale suggère que l'interaction entre PlcR et PapR induit une modification de conformation de PlcR qui permet au complexe PlcR-PaprR de se fixer sur l'ADN (Declerck *et al.*, 2007). L'activation du système PlcR-PapR est souche-spécifique (Slamti & Lereclus, 2002; Slamti & Lereclus, 2005). Une analyse phylogénétique couplée à des tests de complémentation indique qu'il existe quatre groupes de PlcR (I, II, III, IV) qui sont associés à quatre groupes de PapR (I, II, III, IV) correspondant (Slamti & Lereclus, 2005). Ainsi, un régulateur du groupe IV n'est actif qu'avec un peptide de signalisation du même groupe. Cependant, des activations croisées existent (Bouillaut *et al.*, 2008). Des analyses génétiques et fonctionnelles indiquent que la spécificité du complexe PlcR-PapR dépend des trois résidus N-terminaux de PapR et de l'extrémité C-terminale de PlcR (qui correspond au domaine régulateur) (Bouillaut *et al.*, 2008; Slamti & Lereclus, 2002).

La régulation de l'expression des gènes *plcR* et *papR* n'est pas complètement caractérisée. Pendant la phase exponentielle de croissance, ces deux gènes pourraient être co-transcrits à partir d'un promoteur situé en amont du gène *plcR*. Cette expression basale pourrait permettre l'accumulation de PapR dans le milieu extracellulaire. Lorsque le quorum est atteint, la transcription de ces gènes est activée par le complexe PlcR-

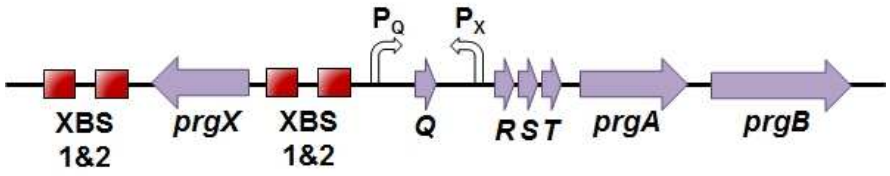


Figure 20: Organisation du locus *prg*.
La transcription [illegible] X [illegible] *prgQRSTAB* à partir du promoteur P_Q est dépendante de PrgX.

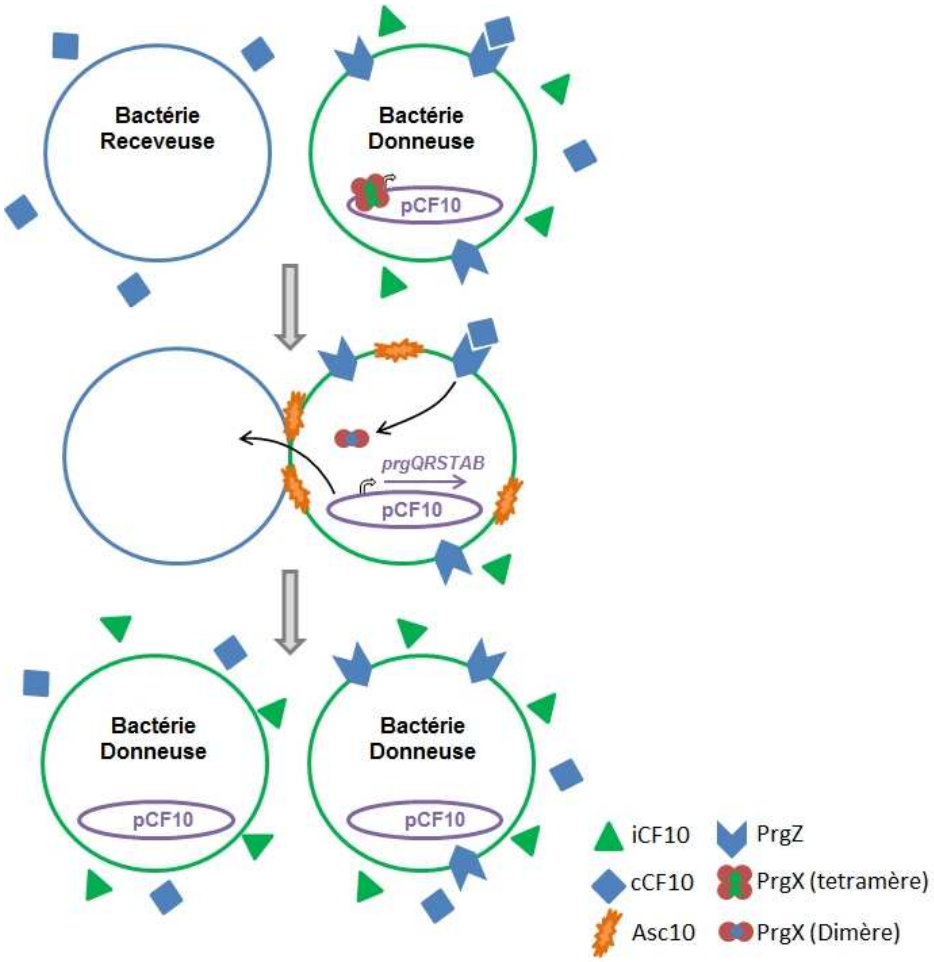


Figure 21: Modèle de régulation du transfert conjugatif du plasmide pCF10.
La cellule receveuse (à gauche) produit suffisamment de peptide de signalisation cCF10 pour entrer en compétition avec l'inhibiteur iCF10 au niveau de la cellule donneuse. L'augmentation du rapport cCF10/iCF10 entraine l'internalisation de cCF10 par PrgZ, l'expression de Asc10, l'agrégation des cellules et le transfert du plasmide pCF10. Le mécanisme est détaillé dans le texte.
(Schéma adapté à partir de Shi et al, 2005)

PapR grâce à la présence d'une boîte PlcR devant les gènes *p*□ et *p*□ (Agaisse *et al*., 1999). Il a été montré qu'en phase stationnaire l'expression de *p*□ est réprimée par la fixation de Spo0A~P sur deux boîtes Spo0A qui encadrent la boîte PlcR située en amont du gène *p*□ (Lereclus *et al*., 2000).

1.3. P

Le récepteur de phéromones sexuelles d'*E. al*. (PrgX) est codé par le gène *p*□ porté par le plasmide pCF10. PrgX participe à la régulation de l'expression de l'opéron *pIB S* (situé sur le plasmide pCF10) à partir du promoteur P_Q (cf **Fig 20**). Cet opéron est impliqué dans le transfert conjugatif de plasmides. Le gène *p*□ code pour le peptide de signalisation iCF10, le gène *prgA* code pour une protéine de surface qui inhibe le transfert de plasmides entre bactéries donneuses (Sec10), le gène *pB* code pour une protéine d'agrégation (Asc10) et les gènes *p*□ et *pS* codent pour des protéines impliquées dans la régulation de l'expression de *pB* (Christie *et al*., 1988; Dunny *et al*., 1985; Kao *et al*., 1991; Kozlowicz *et al*., 2006; Olmsted *et al*., 1991).

Le système PrgX se différencie des autres systèmes de quorum-sensing de la famille RNPP car la communication cellulaire se produit entre deux sous populations distinctes : une sous population de bactéries receveuses qui ne porte pas le plasmide pCF10 et une sous population de bactéries donneuses qui porte le plasmide (cf **Fig 21**). La sous population de bactéries receveuses exprime un gène chromosomique qui code pour le peptide de signalisation cCF10. Ce peptide favorise la transcription des gènes de conjugaison dans la sous population de bactéries donneuses en activant PrgX dans sa fonction d'activateur transciptionnel. La sous population de bactéries donneuses exprime le gène *p*□ codant pour un autre peptide de signalisation, nommé iCF10, qui réprime l'expression des gènes de conjugaison en interagissant avec PrgX. Les gènes *p*□ et *p*□ sont transcrits de façon constitutive à partir du promoteur P_X (cf **Fig 20**). Le peptide de signalisation cCF10 s'exprime également dans les bactéries donneuses. Cependant, dans cette sous population, la protéine membranaire PrgY (codée par un gène porté par pCF10) interagit avec ce peptide dans le milieu et le dégrade réduisant ainsi la concentration extracellulaire en cCF10.

Dans les cellules donneuses, l'expression des gènes régulés par PrgX dépend du rapport cCF10/iCF10 (Buttaro *et al*., 2000; Dunny, 2007). Lorsque la population de bactéries receveuses est suffisante la concentration extracellulaire en cCF10 augmente. Dans la sous population de bactéries donneuses, la concentration en cCF10 devient supérieure à la concentration en iCF10. Le peptide cCF10 déplace iCF10 de PrgX et le complexe PrgX-

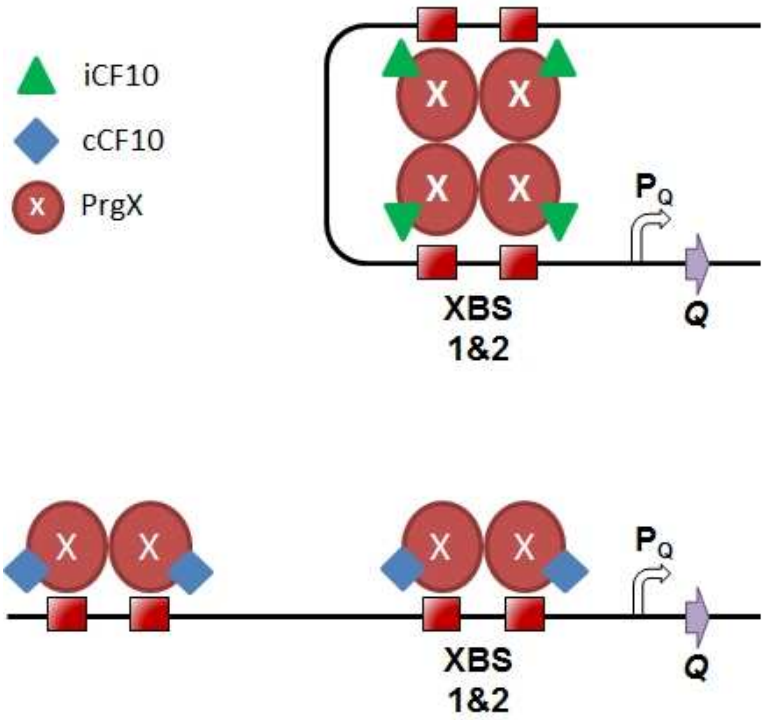


Figure 22: Modèle de régulation de l'opéron *prgQRSTAB* par PrgX.
Le mécanisme est détaillé dans le texte.
(Schéma adapté à partir de Chatterjee et al, 2011)

cCF10 active alors la transcription de l'opéron *p□ AB□□* pour permettre le transfert de plasmides entre la sous population de bactéries donneuses et la sous population de bactéries receveuses (Shi *et al* , 2005).

Les structures de PrgX et du complexe PrgX/cCF10 ont été déterminées par cristallographie aux rayons X (Shi *et al* , 2005). La protéine PrgX est constituée de trois domaines : un domaine N-terminal de liaison à l'ADN, un domaine central impliqué dans la dimérisation de la protéine et la liaison des peptides signaux, et un domaine régulateur en position C-terminale. Des résultats indiquent que PrgX forme un dimère lorsqu'il interagit avec cCF10 alors qu'il forme un tétramère lorsqu'il interagit avec iCF10. Par ailleurs, il a été montré que PrgX se fixe à deux séquences nommées XBS1 et XBS2 (PrgX Binding Sites), espacées de 70 pb, et situées en amont de l'opéron *□AB□□* (Dunny *et al* , 1978; Shi *et al* , 2005). A partir de ces données, un modèle de régulation de la transcription de l'opéron *□AB□□* a été proposé (Chatterjee *et al* , 2011) (cf **Figure 22**). Dans ce modèle, le tétramère formé par PrgX/iCF10 se fixe aux séquences XBS1 et XBS2 et provoque la formation d'une boucle d'ADN qui empêche l'accès de l'ARN polymerase au promoteur P_Q. La fixation de cCF10 sur PrgX induit une modification de conformation du domaine C-terminal de PrgX. Le complexe PrgX/cCF10 ne peut plus former de tétramère et reste sous la forme d'un dimère. La forme dimérique déplace la forme tétramèrique des sites XBS1 et XBS2 et induit la linéarisation de la région située en amont de l'opéron *□AB□□* . L'ARN polymerase peut alors interagir avec le promoteur P_Q et transcrire l'opéron *□AB□□* .

1.4. NprR

Le régulateur NprR est le membre de la famille RNPP qui a été le moins étudié jusqu'à présent. L'anlyse *□□□* de l'environnement génétique du gène *□p* indique que ce gène se situe à proximité du gène *nprA* qui code pour la protéase NprA (cf Chapitre I § 3.2.3). Ces deux gènes sont séparés par un petit gène de 129 pb appelé *□p* . L'organisation génétique de ce locus est conservée au sein du groupe *B. □e□* à l'exception de la souche *B. □e□* ATCC 14579 où le gène *□p* est interrompu par un transposon (Ivanova *et al* , 2003). Une analyse du protéome extracellulaire de plusieurs souches du groupe *B. □e□* indique que la protéase NprA est absente du surnageant de culture de la souche *B. □e□* ATCC14579 (Gohar *et al* , 2005). Ces deux résultats suggèrent une implication du régulateur NprR dans la régulation de l'expression de *nprA*.

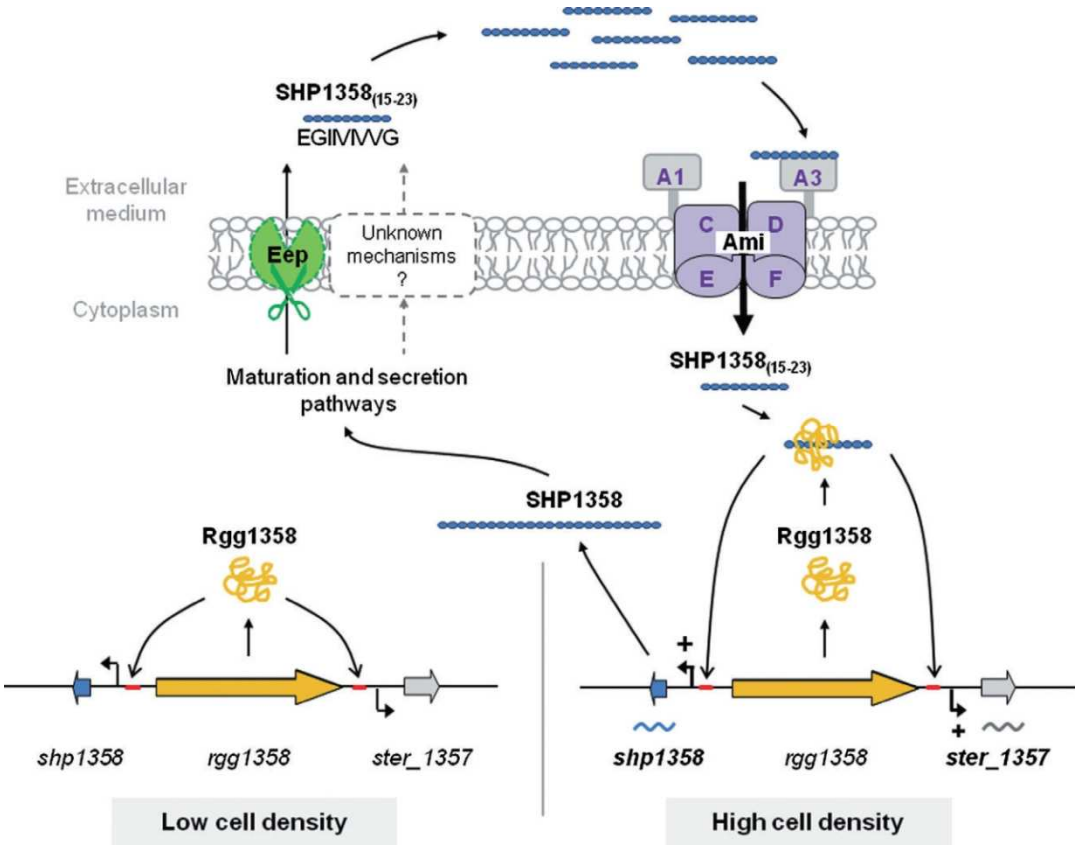


Figure 23 : Modèle de régulation du système Rgg/Shp.
Le peptide de signalisation est codé par le gène *shp1358*. Il est sécrété puis maturé par l'endopeptidase membranaire Eep (en vert). La forme mature de la phéromone est un nonapeptide de séquence EGIIVIVVG. A forte densité cellulaire, le peptide mature se fixe à la protéine liant les peptides AmiA3 et il est réimporté dans la cellule bactérienne par l'oligopeptide permease AmiACDEF (en violet). Dans la cellule bactérienne le peptide interagit avec le régulateur Rgg (en jaune). Le complexe Rgg/Shp se fixe alors sur les régions promotrices des gènes *shp1358* et *ster_1357* et active leur transcription.
(Fleuchot et al, 2011)

2. Élargissement de la famille RNPP ?

En réalisant une analyse par PSI-BLAST (Position Specific Iteration - Basic Local Alignement Search Tool), Declerk et coll ont montré que plusieurs protéines régulatrices présentent une forte identité de séquence avec PlcR et PrgX (Declerck *et al.*, 2007): TraA chez *E. faecalis* ainsi que RggD et MutR chez *Streptococcus*. Cependant, en raison de l'absence de données expérimentales concernant ces régulateurs, il n'avait pas été possible de vérifier leur appartenance à la famille RNPP.

Récemment, plusieurs études ont mis en évidence des régulateurs Rgg dont l'activité est dépendante de petits peptides hydrophobes. Ces études ont conduit à établir que ces couples Rgg-peptide constituent des systèmes de quorum sensing où Rgg est le régulateur transcriptionnel et où le peptide est la molécule de signalisation. Des systèmes de ce type ont notamment été décrit chez *S. thermophilus* (Rgg1358-Shp1358 (Fleuchot *et al.*, 2011; Ibrahim *et al.*, 2007) et ComR-ComS (Fontaine *et al.*, 2010)), *S. mutans* (ComR-ComS (Mashburn-Warren *et al.*, 2010), et *S. pneumoniae* (Rgg2/Rgg3-Shp (Chang *et al.*, 2011)). Le système Rgg1358-Shp1358 est présenté, à titre d'exemple, dans la **Figure 23**. Les résultats de ces études apportent des éléments qui suggèrent que les Rgg appartiennent à la famille RNPP : (i) Comme PlcR et PrgX, la protéine Rgg possède un motif HTH. De plus, il a été montré que le complexe Rgg-peptide se fixe à l'ADN (Chang *et al.*, 2011; Fleuchot *et al.*, 2011). (ii) Comme les peptides de signalisation Ccf10 et PapR, les peptides de signalisation qui interragissent avec les Rgg sont maturés dans le milieu extracellulaire et ils sont réimportés dans la cellule bactérienne par un système d'oligopeptide perméase (Chang *et al.*, 2011; Fleuchot *et al.*, 2011; Fontaine *et al.*, 2010; Mashburn-Warren *et al.*, 2010). En revanche, une analyse bio-informatique avec le logiciel TPRpred ne détecte pas la présence de motif TPR, caractéristiques des régulateurs de la famille des RNPP, dans la structure de Rgg (Karpenahalli *et al.*, 2007). Cependant, il est interessant de noter que les domaines TPR du répresseur PrgX n'ont été mis en évidence qu'après une analyse structurale (Shi *et al.*, 2005). Une analyse structurale est donc nécessaire pour conclure quant à la présence de motif TPR dans la structure de la protéine Rgg. Cette analyse permettra de déterminer si les régulateurs Rgg appartiennent à la famille RNPP.

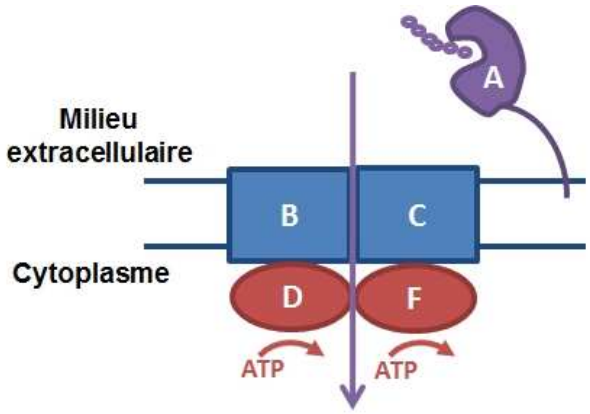


Figure 24: Schéma de la structure d'un système d'oligopeptide perméase.
La protéine liant les peptides est représentée en violet (OppA), les protéines de pore sont représentées en bleu (OppB et OppC) et les ATPases sont représentées en rouge (OppD et OppF).

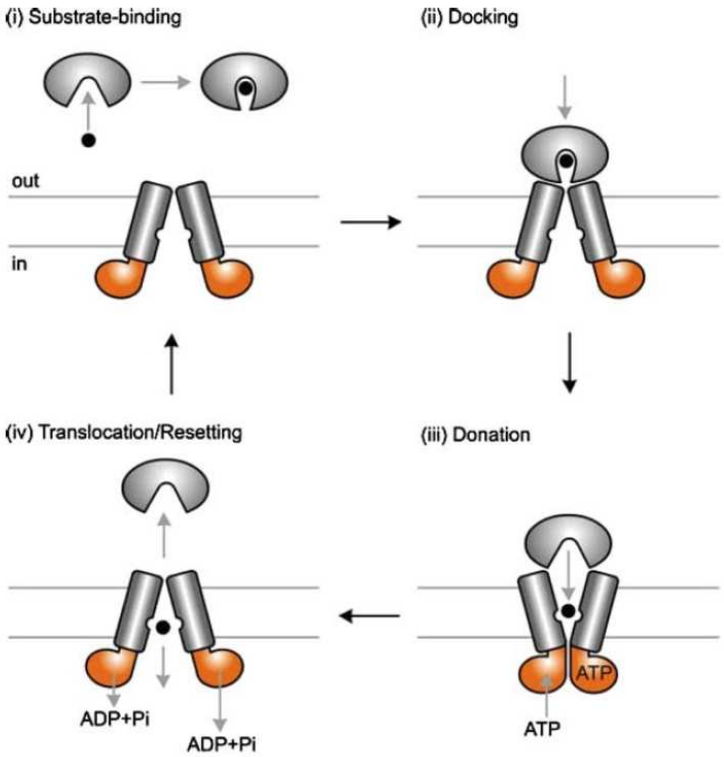


Figure 25: Modèle du mécanisme de translocation des substrats par les ABC transporteurs dépendants d'une protéine liant les substrats.
Le mécanisme est détaillé dans le texte.
(Biemans-Oldehinkel et al, 2005)

3. Réimport des peptides de signalisation

Les peptides de signalisation qui modulent l'activité des régulateurs de la famille RNPP sont réimportés dans les cellules bactériennes par un système de transport d'oligopeptides nommé OppABCDF. Ce système est un ABC (ATP-Binding Cassette) transporteur constitué de cinq sous-unités protéiques (cf **Figure 24**). OppB et OppC sont des protéines transmembranaires qui forment un pore dans la membrane bactérienne. OppD et OppF sont des protéines qui possèdent un domaine de fixation aux nucléotides. Leur principale fonction est de lier et d'hydrolyser l'ATP afin de libérer l'énergie nécessaire à la translocation des peptides dans la cellule bactérienne. OppA est une protéine extracellulaire qui est ancrée à la membrane bactérienne par l'intermédiaire d'une cystéine située en position N-terminale (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006). Cette protéine lie les peptides et les présente devant le pore pour qu'ils soient transloqués (Tynkkynen *et al.*, 1993). Les protéines liant les peptides déterminent la spécificité des systèmes Opp (Doeven *et al.*, 2004). Les structures de plusieurs de ces protéines ont été résolues par cristallographie aux rayons X (Berntsson *et al.*, 2009; Levdikov *et al.*, 2005; Nickitenko *et al.*, 1995; Tame *et al.*, 1994; Tanabe *et al.*, 2007). Les données de structure indiquent que les OppA forment une poche, relativement hydrophyle, qui accepte les peptides en fonction de leur composition en acides aminés. La spécificité de la poche pour le peptide dépend des liaisons hydrogènes qui se forment entre les deux partenaires. Un même peptide peut donc pénétrer dans la poche soit par son extrémité N-terminale soit par son extrémité C-terminale.

Un modèle de fonctionnement des ABC transporteurs possédant une protéine liant les substrats a été proposée (Biemans-Oldehinkel *et al.*, 2006) (cf **Figure 25**). (i) Le substrat se lie à la protéine liant les substrats (Substrates Binding Protein ou SBP) et induit une modification de conformation de cette protéine. (ii) Le complexe formé se fixe sur les protéines formant le domaine transmembranaire (Trans-Membrane Domain ou TMD) et signale aux protéines liant les nucléotides (Nucléotides Binding Domains ou NBD) de fixer l'ATP. (iii) La fixation de l'ATP provoque une modification de conformation des TMD et de la SBP qui induit le transfert du substrat dans le site de fixation des TMD. (iv) L'hydrolyse de l'ATP a pour conséquence de dissocier le dimère formé par les NBD, ce qui conduit à une réorientation du site de fixation du substrat des TMB de l'extérieur vers l'intérieur de la

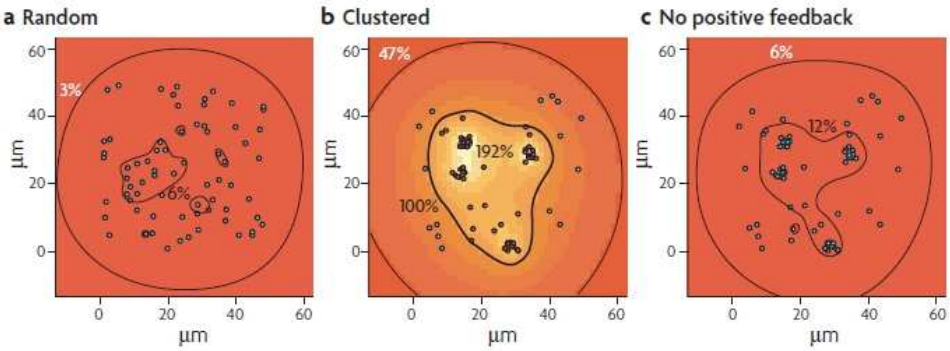


Figure 26: Importance de la répartition spatiale des bactéries pour l'activation des systèmes de communication cellulaire.

Ce modèle utilise un nombre de bactéries et un volume fixes. Le modèle fait varier la répartition des cellules ainsi que la présence ou l'absence d'une boucle d'auto-activation dans la production de la molécule de signalisation. **(a)** Système de communication cellulaire auto-activé avec une répartition aléatoire des bactéries. **(b)** Système de communication cellulaire auto-activé avec une répartition des bactéries en micro-colonies. **(c)** Système de communication cellulaire non auto-activé avec une répartition des bactéries en micro-colonies. Les bactéries qui ne sont pas induites sont représentées en cyan et celles qui sont induites sont représentées en rouge. La concentration en auto-inducteur est représentée sous la forme de pourcentages du seuil de concentration nécessaire à l'induction. Des lignes de contour représentent les concentrations en molécule de signalisation. Les couleurs de ces lignes de contours vont du rouge (<16% du seuil) au blanc (> 200% du seuil).

(Hense et al, 2007)

cellule bactérienne. Le substrat arrive alors dans le cytoplasme et la SBP se dissocie des TMD.

4. La [illegible] : est-il seulement question de quorum?

Le concept de quorum-sensing a été développé à partir d'études réalisées sur des populations clonales cultivées en milieu liquide. Cependant, ces conditions de culture ne reflètent par les conditions rencontrées par les bactéries dans leur environnement naturel. En effet, la concentration en molécules de signalisation, qui sert à estimer la densité cellulaire, est affectée par de nombreux facteurs biotiques et abiotiques.

4.1. Facteurs abiotiques

4.1.1. Hétérogénéité spatiale

Dans des environnements complexes, tels que la rhizosphère, la distribution spatiale des bactéries n'est pas homogène. Les cellules peuvent notamment former des "clusters" ou micro-colonies. Ces micro-colonies sont des groupes de bactéries clonales qui sont souvent liées aux surfaces (Costerton *et al.*, 1995; Keller & Surette, 2006; Klausen *et al.*, 2003; Klausen *et al.*, 2006).

Un modèle mathématique a étudié l'importance de la répartition spatiale des bactéries dans l'activation des systèmes de quorum-sensing. Ce modèle utilise un nombre de bactéries fixe dans un volume donné et fait varier la répartition des cellules ainsi que la présence ou l'absence d'une boucle d'auto-activation dans la production du peptide de signalisation (Hense *et al.*, 2007) (cf **Figure 26**). Les résultats indiquent que dans le cas d'un système de quorum-sensing où la synthèse de la molécule de signalisation est soumise à une boucle d'auto-activation, la répartition des cellules à plus d'importance que la densité cellulaire. En effet, dans cette condition, malgré la faible densité de cellules, le système de quorum-sensing est activé au sein des micro-colonies. Cette étude suggère que la communication cellulaire n'est pas seulement dépendante de la densité cellulaire ; elle dépend également de la répartition spatiale des bactéries (Hense *et al.*, 2007).

4.1.2. Transfert de masse

Dans l'environnement, le transfert de masse est le mouvement d'une masse (généralement un fluide) d'un point à un autre. La diffusion et l'advection sont les deux

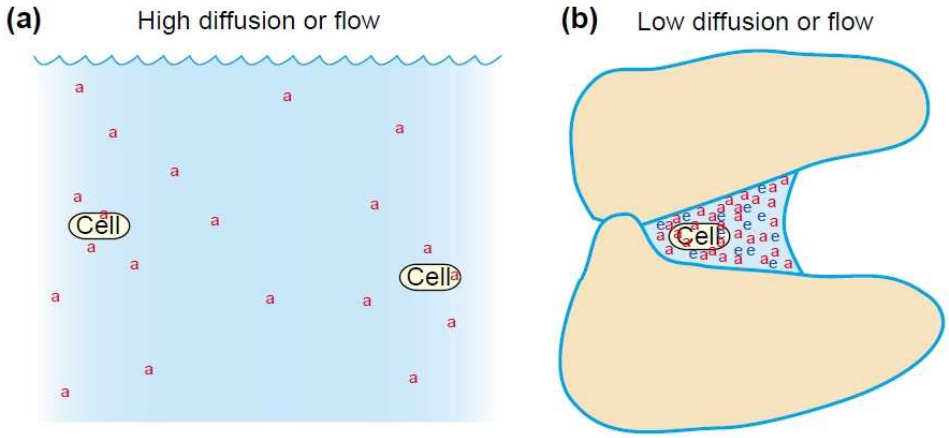


Figure 27 : Schéma résumant la théorie de diffusion sensing.
(a) Lorsque le taux de diffusion est élevé, l'auto-inducteur est rapidement dilué et les bactéries ne sécrètent pas d'effecteurs. **(b)** Lorsque la diffusion est faible, l'auto-inducteur s'accumule et induit la sécrétion d'effecteurs.
a : auto-inducteur, e : effecteur.
(Redfield, 2002)

principaux phénomènes de transfert de masse qui influencent l'accumulation des molécules de signalisation.

Le nombre de cellules bactériennes nécessaires pour atteindre le seuil nécessaire à l'activation d'un système de quorum-sensing peut varier considérablement en fonction du taux de diffusion de la molécule de signalisation. La diffusion des molécules de signalisation dépend de leurs propriétés physico-chimiques mais également des propriétés de leur environnement. Chez *Pseudomonas aeruginosa* il a par exemple été suggéré que la présence d'exo-polysaccharides hydrophobes dans la matrice des biofilms limite la diffusion des AHL (Charlton *et al.*, 2000).

Les molécules de signalisation peuvent également être transportées par des fluides circulants. Ce phénomène, appelé advection, peut conduire au lavage et à la dilution des molécules de signalisation mais aussi à leur accumulation dans certaines structures formées par les bactéries (Horswill *et al.*, 2007). Par exemple, chez *P. aeruginosa,* la vitesse des fluides circulant affecte de façon significative la maturation des biofilms (Purevdorj *et al.*, 2002). Il a été montré que la structure des biofilms chez *P. aeruginosa* dépend de fonctions liées au quorum-sensing. La circulation des fluides pourrait conduire à l'accumulation des AHL à l'intérieur du biofilm et induire des fonctions régulées par le quorum-sensing (De Kievit *et al.*, 2001).

4.1.3. Diffusion Sensing

La synthèse de facteurs extracellulaires (tels que des enzymes, des sidérophores et des molécules antibiotiques) est souvent régulée par des systèmes de communication cellulaire auto-induits. Ces facteurs extracellulaires sont indispensables à la survie des bactéries dans l'environnement. Toutefois, ils sont « couteux » à produire pour les bactéries (en termes d'énergie et de substrats carbonés et azotés). Dans des conditions où la diffusion et l'advection sont importantes, l'accumulation des facteurs extracellulaires n'est pas suffisante pour que les bactéries en tirent un bénéfice. Redfield et coll suggèrent que les bactéries utilisent les auto-inducteurs pour évaluer le transfert de masse dans leur environnement proche (cf **Fig 27**). Les auteurs ont nommé cette théorie « Diffusion sensing ». Dans ce modèle, les bactéries ne produisent des effecteurs que lorsque le transfert de masse est faible. Lorsque le transfert de masse est élevé les auto-inducteurs sont dilués et les bactéries ne produisent plus d'effecteurs (Redfield, 2002).

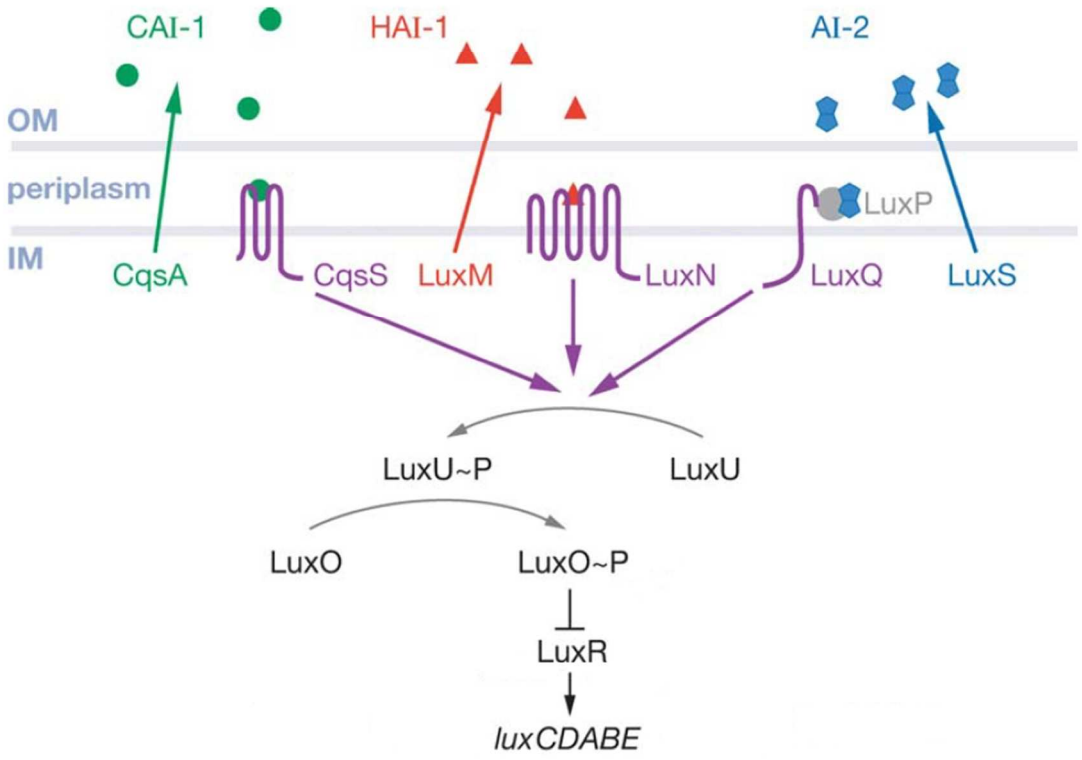


Figure 28 : Modèle de régulation des gènes *luxCDABE* impliqués dans l'émission de lumière chez *V. harveyi*.

Dans ce syst□ [illegible] s(-1, HAI-1 et AI-2) interagissent avec trois récepteurs membranaires (CqsS, LuxN et LuxQ, respectivement). Ces trois systèmes fonctionnent en parallèle pour acheminer le signal vers une voie de régulation commune. En l'absence d'une quantité suffisante des autoinducteurs, les trois protéines senseurs LuxN, LuxQ et CsqQ agissent comme des kinases et phosphorylent LuxU. LuxU~P transfère son phosphate au régulateur LuxO. LuxO~P réprime l'expression de *lR□* qui est requis pour l'activation de la transcription de l'opéron luciférase *lCDABE* . Les bactéries ne produisent donc pas de bioluminescence. En présence d'une quantité suffisante des trois autoinducteurs, les trois récepteurs membranaires passent d'une activité kinase à une activité de phosphatase et déphosphorylent LuxO *ia* LuxU. LuxO non-phosphorylé ne réprime plus l'expression de *lR□* . L'opéron *lCDABE* est alors transcrit et les bactéries produisent de la bioluminescence. Cette voie de régulation contrôle, en plus des gènes *l□*, au moins dix autres gènes (Bassler *et al.*, 1993; Bassler *et al.*, 1994; Mok *et al.*, 2003; Schauder & Bassler, 2001; Xavier & Bassler, 2003).

(Adapté à partir de Waters & Bassler, 2005)

4.2. Fa[illegible]

4.2.1. Cross talk

Dans l'environnement, la présence de nombreuses espèces microbiennes facilite de multiples interactions par l'intermédiaire de molécules de signalisation. Ces interactions sont appelées « Cross talk ». Une étude menée sur [illegible] a permis d'identifier une molécule de signalisation nommée auto-inducteur 2 (AI-2) (Surette *et al.*, 1999). Dans cette souche, AI-2 et deux autres auto-inducteurs régulent l'émission de fluorescence (cf **Figure 28**).

AI-2 est synthétisé à partir de la S-AdénosylHomocystéine (SAH). La SAH est transformée en homocysteine, en adénine puis en 4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD) par l'action séquentielle des enzymes Pfs et LuxS (Schauder & Bassler, 2001; Schauder *et al.*, 2001). Le sous-produit du DPD se cyclise et/ou interagit avec le borate pour former des molécules d'AI-2 (Chen *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2004). Le gène *luxS*, impliqué dans la biosynthèse d'AI-2, est présent chez plus de 40 % des souches bactériennes dont le génome a été séquencé (Xavier & Bassler, 2003). De plus, il a été montré que de nombreuses bactéries, à Gram positif comme à Gram négatif, produisent cette molécule. La production d'AI-2 a notamment été mise en évidence chez *B. anthracis* et chez *B. cereus* (Auger *et al.*, 2006; Jones & Blaser, 2003). AI-2 est donc une molécule qui pourrait permettre une communication inter-espèces. Les auto-inducteurs de la famille des AI-2 contrôlent de nombreux gènes impliqués dans des processus physiologiques très variés tels que la virulence, la formation de biofilm ou encore la mobilité (Xavier & Bassler, 2003). Chez *E. coli* une analyse transcriptomique a permis d'identifier 242 gènes dont la transcription est contrôlée par AI-2 (DeLisa *et al.*, 2001). Ce signal peut être interprété de différentes manières selon les espèces. Par exemple, il a été montré que l'addition de l'AI-2 de [illegible] dans le milieu de culture d'un biofilm de *B. cereus* réduit la croissance du biofilm (Auger *et al.*, 2006). En revanche, AI2 stimule la formation du biofilm de [illegible] (Petersen *et al.*, 2006).

4.2.2. Interférences

Certaines espèces ont adopté une stratégie qui consiste à perturber la perception des molécules de signalisation produites par des compétiteurs. Plusieurs stratégies d'interférences ont été décrites dans la littérature. Elles consistent principalement à : (i) dégrader ou inactiver

Concept	Hypothesis		
	QS	DS	ES
How cells sense	Individual cells emit small diffusible autoinducer molecules that are sensed by themselves and others, leading to regulation of gene expression. We refer to the mechanism of sensing as autoinducer sensing if we do not want to imply what and why cells sense and who benefits from this.		
What cells sense	Cell density (or, less accurately, the cell number). An ensemble property on the population scale, not only defined at the positions of individual cells.	Mass-transfer properties of the environment surrounding a focal cell. Independent of cell density and spatial distribution.	A combination of cell density, mass-transfer properties and spatial cell distribution as the cell cannot determine density, mass transfer or clustering alone.
Why cells sense	To detect situations in which cell density is sufficient to make a coordinated response of a group of cooperating cells worthwhile.	To detect situations in which mass transfer is sufficiently limited for single cells to respond by producing extracellular diffusible effectors.	To estimate the efficiency of producing extracellular diffusible effectors and to respond only when this is efficient*.
Benefit	Hypothesis suggests QS evolved because of group fitness benefits.	Hypothesis suggests DS evolved because of individual fitness benefits, making DS a simpler hypothesis than QS.	Hypothesis suggests ES evolved because of both individual and group fitness benefits. Both work in the same direction, yielding broader conditions under which ES would be selected for.

* In efficiency sensing, the ecologically relevant information is the combination of all factors that affect autoinducer and effector concentrations in the same way. Cooperative sensing and effector production unavoidably emerge if more than one cell with the same autoinducer system is present. DS, diffusion sensing; ES, efficiency sensing; QS, quorum sensing.

Tableau II : Tableau récapitulatif des théories « quorum sensing », « diffusion sensing » et « efficiency sensing ».
(Hense et al, 2007)

les molécules de signalisation (ce phénomène est nommé « quorum quenching ») (Dong *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2008), (ii) imiter les molécules de signalisation (Degrassi *et al.*, 2002; Holden *et al.*, 1999; Teasdale *et al.*, 2009), (iii) intercepter les molécules de signalisation (Van Houdt *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2006) et (iv) produire des molécules de signalisation toxiques pour d'autres espèces (Sturme *et al.*, 2002). Ces stratégies d'interférence pourraient être avantageuses au sein de communautés qui présentent une forte hétérogénéité d'espèces. En revanche, dans des conditions où la population est peu hétérogène, cette stratégie peut être contre-productive car elle est couteuse d'un point de vue métabolique (Hense *et al.*, 2007).

4.3. [illegible]

La théorie du quorum-sensing suggère que les bactéries utilisent les auto-inducteurs pour mesurer leur densité alors que la théorie du "diffusion sensing" propose que les auto-inducteurs servent à évaluer le niveau de transfert de masse des facteurs extracellulaires produits par les bactéries. Ces théories ne prennent pas en considération l'ensemble des facteurs biotiques et abiotiques qui influencent la concentration extracellulaire en auto-inducteurs (cf Chapitre II § 4.1 et § 4.2). Par ailleurs, aucun résultat expérimental ne suggère que les bactéries peuvent distinguer l'influence de chacun de ces facteurs sur la concentration en auto-inducteurs. Les cellules bactériennes ne feraient donc qu'estimer la concentration extracellulaire en auto-inducteurs qui dépend de l'ensemble de ces facteurs environnementaux. Par conséquent, Hense et coll ont proposé une nouvelle théorie : "l'efficiency sensing" (Hense *et al.*, 2007). Cette théorie suggère que les bactéries, par l'intermédiaire des auto-inducteurs, évaluent de façon globale un ensemble de paramètres (densité cellulaire, répartition spatiale, transfert de masse, etc…) qui leur permet d'estimer quel sera le rendement de leurs facteurs extracellulaires (enzymes dégradatives, antibiotiques, sidérophores). Ce nouveau concept fait donc la synthèse des théories précédentes et intègre de nouveaux paramètres qui n'avaient pas encore été pris en compte. Un tableau récapitulatif des trois théories est présenté dans le [illegible] (Hense *et al.*, 2007).

□ésultats

Ch□ - Cé□risation du système NprR-NprX

Dans des conditions favorables à la sporulation, la métalloprotéase NprA est un des composants majoritaires du protéome extracellulaire des bactéries du groupe *Bacl*□ □e□ . Le gène *nprA* est situé à proximité immédiate des gènes □p□ et □p□ . De plus, il a récemment été montré que la production de protéases chez *B. ca*□*hi*□ est dépendante de NprR (cf Chapitre II § 1.4 ; (Yang *et al*, 2011)). Les résultats présentés dans cette première partie démontrent que NprR est un régulateur transcriptionnel qui contrôle la transcription du gène *nprA* et que son activité est dépendante du peptide de signalisation NprX. Ce peptide est sécrété, probablement maturé et réimporté dans la cellule bactérienne par deux ABC transporteurs de la famille des oligopeptides perméases.

1. La transcription de *nprA* est régulée par un système de communication cellulaire.

Article 1: "A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group"

Dans le cadre de cette étude, nous avons construit une fusion transcriptionnelle chromosomique entre la région promotrice du gène *nprA* et le gène *l*□ dans la souche *Bt* 407. Dans cette souche, nommée 407 *nprA'*□, l'expression du gène *l*□ reflète l'activité du promoteur de *nprA*. Nous avons montré que la transcription du gène *nprA* débute 2 heures après l'entrée en phase stationnaire en milieu riche (LB) comme dans un milieu qui favorise l'entrée en sporulation (HCT) (**Figure 2A**). Cependant, l'expression de *nprA* mesurée en milieu HCT est supérieure à celle mesurée en milieu LB. Ce résultat est en accord avec les données de protéomique qui suggèrent que NprA est produit dans des conditions de sporulation (Chitlaru *et al*, 2006). Pour déterminer le rôle des gènes □p□ et □p□ sur la transcription de *nprA* nous avons interrompu ces gènes dans la souche 407 *nprA'*□ (**Figure 3A**). Dans la souche 407 ΔRX *nprA'*□ la transcription de *nprA* est abolie et la complémentation par un plasmide portant les gènes □p□ et □p□ (pHT304-RX) restaure la transcription de *nprA*. En revanche, la complémentation par un plasmide portant le gène □p□ seul (pHT304-R) n'a pas d'effet sur la transcription de *nprA*. Ces résultats montrent que la transcription de *nprA* est dépendante du régulateur transcriptionnel NprR et du cofacteur NprX.

Au sein de la famille RNPP, le gène codant pour le peptide de signalisation est situé en aval du gène codant pour la protéine régulatrice. L'organisation génétique du locus □*p*□ -□*p*□ -*nprA* suggère donc que □*p*□ code pour le peptide de signalisation. Par ailleurs, l'analyse □□*l*□□ de la séquence protéique de NprX indique que ce peptide possède un signal d'export et un motif caractéristique des Phr (SKPDI) (Pottathil & Lazazzera, 2003). Pour vérifier cette hypothèse, nous avons complémenté le milieu de culture d'une souche rapportrice déficiente pour NprX (407 *nprA'*□ ΔRX pHT304-R) avec du milieu conditionné et avec différents peptides synthétiques (**Fig4B** et **4C**). Le milieu conditionné de la souche sauvage restaure la transcription de *nprA* dans la souche indicatrice. De plus, les complémentations avec les peptides synthétiques indiquent que la forme minimale active de NprX dans le milieu extracellulaire est un heptapeptide de séquence SKPDIVG (qui correspond à la partie centrale du pro-peptide). Enfin, l'expression intracellulaire de cet heptapeptide restaure la transcription de *nprA* (**Fig5A**). L'ensemble de ces résultats indiquent que NprX est sécrété, probablement maturé, et réimporté dans la cellule bactérienne. Afin de déterminer si NprX interagit directement avec NprR, nous avons réalisé des expériences d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) (**Fig5B**). L'ITC est une technique qui mesure la chaleur générée ou absorbée lors de la liaison de deux molécules et qui fournit, en une seule expérience, les paramètres thermodynamiques permettant le calcul d'une constante de dissociation (Kd) (Wiseman *et al*., 1989). Cette technique montre que NprR et l'heptapeptide SKPDIVG interagissent avec un Kd de 50 nM. Ces données suggèrent que, une fois dans la cellule bactérienne, le peptide mature forme un complexe avec NprR.

Une expérience d'extension d'amorce sur la région promotrice de *nprA* a permis d'identifier un démarrage de transcription situé en position -71 par rapport au codon d'initiation de la traduction (**Fig6A** et **6B**). Ce promoteur putatif présente des séquences -10 et -35 similaires aux séquences consensus reconnues par sigma-A. La région promotrice de *nprA* a été délimitée en utilisant des fusions transcriptionnelles avec le gène rapporteur *lu*□ dans le plasmide pHT304-18'Z (**Fig6C** et **6D**). Les résultats montrent que le promoteur situé en position -71 est fonctionnel et suggèrent qu'une séquence de 8 pb en amont de la boite -35 est nécessaire pour que *Δp* s'exprime. Pour déterminer plus précisément le site de fixation du complexe NprR-NprX sur la région promotrice de *nprA*, nous avons réalisé des expériences d'ITC en utilisant différentes sondes ADN (**Fig7**). Les résultats indiquent que le complexe NprR-NprX se fixe sur la région de la boite -35 et que la séquence de 8 pb, en amont de la boite -35, est importante pour la fixation du complexe sur l'ADN.

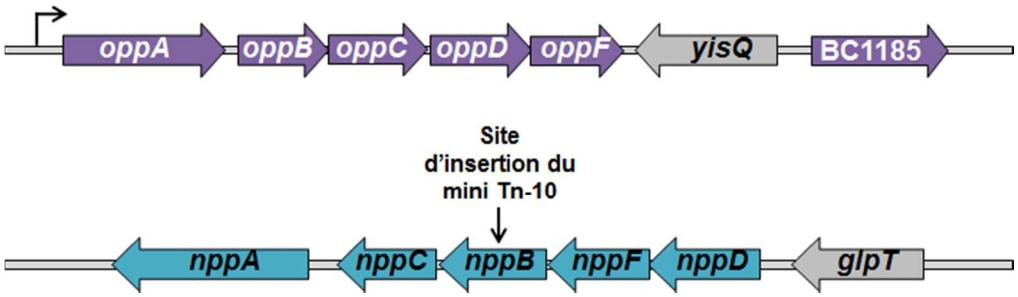


Figure 29: Organisation génétique des locus *opp* et *npp*.
Le gène BC1185, situé à proximité du locus *opp*, code pour une protéine liant les peptides. La flèche désigne le site d'insertion du transposon mini Tn-10 dans le locus *npp*.

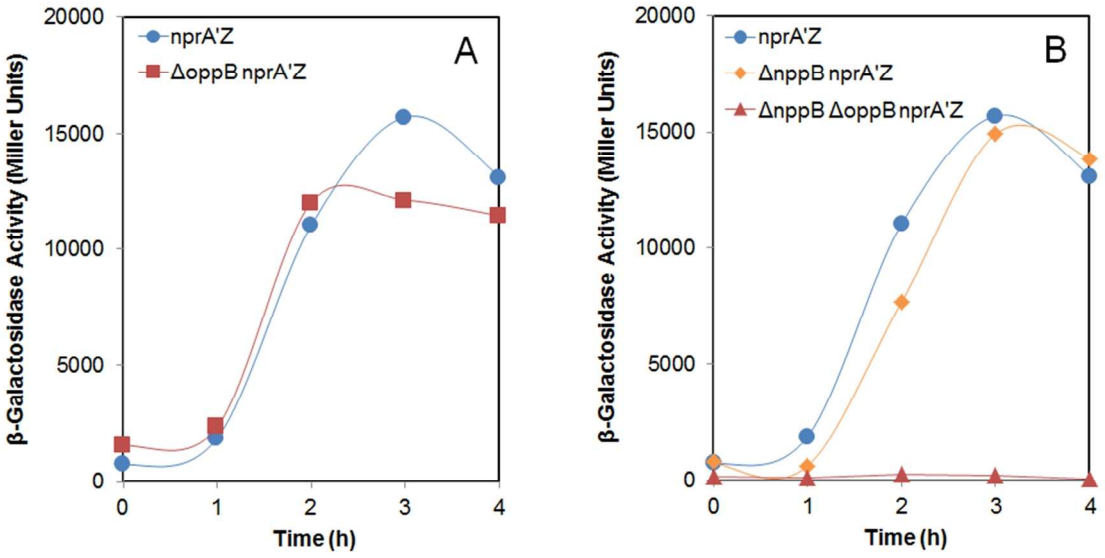


Figure 30: Mesure de l'expression de la fusion transcriptionnelle chromosomique *nprA'Z*.
(A) Dans la souche 407 et dans la souche 407 Δ*oppB*. **(B)** Dans la souche 407 et dans les souches 407 Δ*nppB* et 407 Δ*nppB* Δ*oppB*.

Enfin, nous avons étudié le polymorphisme et la spécificité du système NprR-NprX sein du groupe *B. cereus*. L'alignement des séquences peptidiques de NprR de 31 souches du groupe *B. cereus* a permis d'établir un arbre phylogénétique qui a conduit à identifier 7 groupes qui ne présentent aucune congruence avec les souches ou les espèces du groupe *B. cereus* (**Fig 8A**). Par exemple, le groupe I comprend des souches de *B. thuringiensis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis*. L'arbre phylogénétique réalisé avec les séquences peptidiques de NprX est similaire à celui obtenu avec les séquences de NprR. Par ailleurs, la séquence de l'heptapeptide est relativement bien conservée au sein du groupe. L'association de chaque groupe de NprR avec leurs heptapeptides respectifs a permis de déterminer 7 phérotypes au sein du groupe *B. cereus*. Les groupes de NprR I, II, II, IV, V, VI et VII sont respectivement associés aux heptapeptides SKPDIVG, SKPDTYG, SNPDIYG, SRPDVLT, WTSDIYG, WKPD[N/T/V][Y/L]G et WRPDMSI. Pour étudier la spécificité du système NprR-NprX, nous avons réalisé des tests de complémentation de la souche 407 *nprA'* ΔRX pHT304-R (groupe I) avec des peptides synthétiques de 5 phérotypes (**Fig 8C**). Les peptides des groupes III, IV, et VI n'activent pas le NprR de groupe I. Ces résultats montrent que le système NprR-NprX est « groupe spécifique ». Cependant, des communications croisées existent car le NprX du groupe II (SKPDTYG) active la protéine NprR du groupe I.

2. Réimport du peptide de signalisation

Résultats non publiés

Nous avons montré que NprX est un peptide de signalisation qui est réimporté dans la cellule bactérienne. Cependant, la voie par laquelle le peptide est réimporté n'a pas été caractérisée. L'objectif du travail présenté dans cette partie est de caractériser cette voie de réimport.

2.1. Rôle de l'oligopeptide perméase Opp dans le réimport de NprX

Les peptides de signalisation de la famille RNPP sont réimportés par des systèmes d'oligopeptide perméase (Gominet *et al.*, 2001; Leonard *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 1995). Chez *B. cereus*, le peptide PapR est réimporté par le système Opp (Gominet *et al.*, 2001). Par analogie, nous avons cherché à savoir si le réimport de NprX est dépendant de l'oligopeptide perméase Opp. Nous avons construit un mutant du gène *oppB* dans la souche 407 *nprA*. L'organisation de l'opéron *opp* est présentée dans la **Figure 29**. Le gène *oppB* code pour l'une des deux protéines qui constituent le pore du transporteur et une mutation dans ce gène

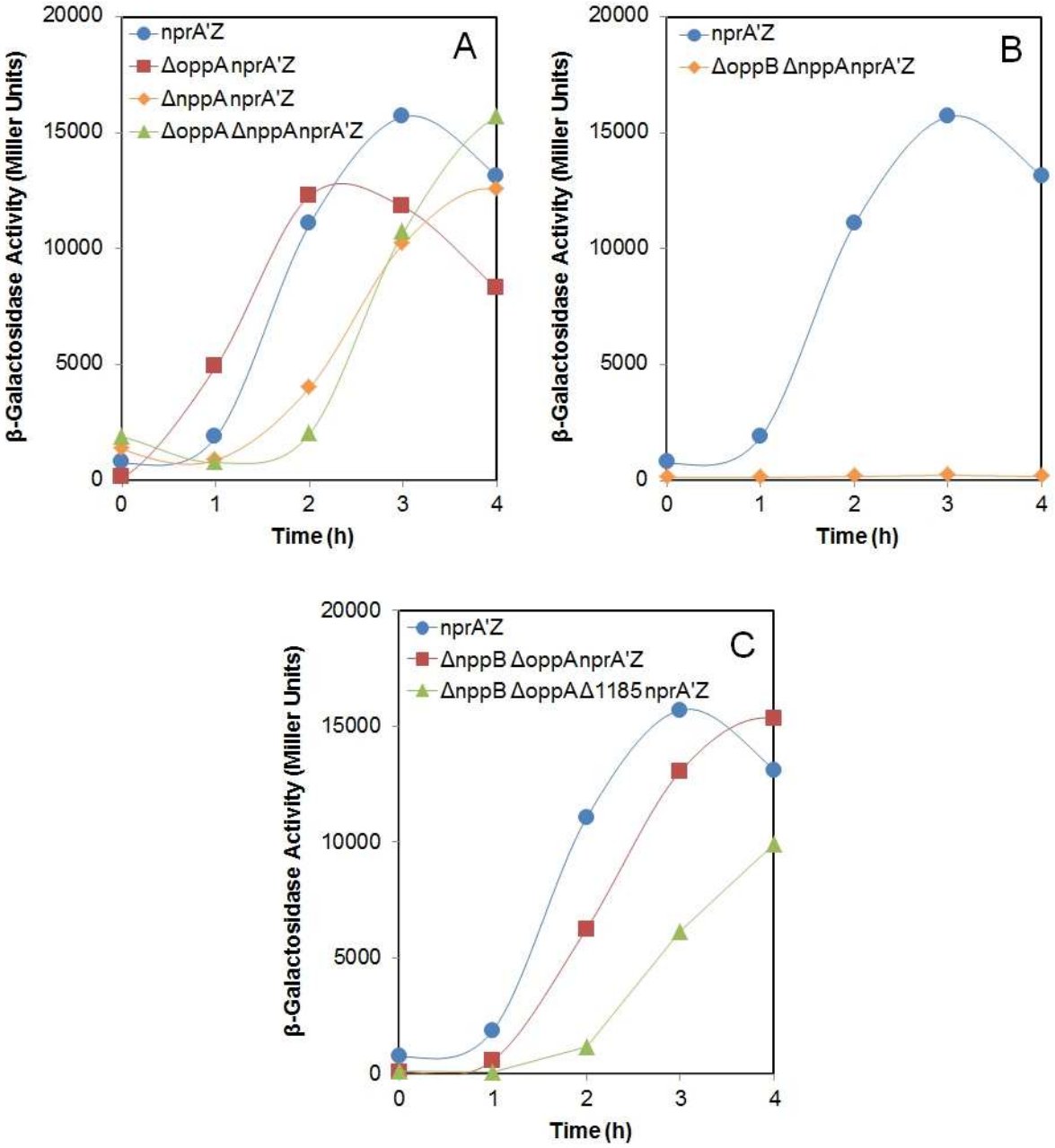


Figure 31 : Mesure de l'expression de la fusion transcriptionnelle chromosomique *nprA'Z*.

(A) Dans la souche 407 et dans les souches 407 Δ*oppA*, 407 Δ*nppA* et 407 Δ*oppA* Δ*nppA*. **(B)** Dans la souche 407 et dans la souche 407 Δ*oppB* Δ*nppA*. **(C)** Dans la souche 407 et dans les souches 407 Δ*nppB* Δ*oppA* et 407 Δ*nppB* Δ*oppA* Δ1185.

inactive le système d'import. Dans la souche 407 Δ*oppB nprA'*□, la transcription du gène *nprA* est réduite par rapport à la souche parentale (**Figure 30 A**). Ce résultat suggère que NprX est partiellement réimporté par le système Opp et qu'un autre système intervient dans le réimport.

2.2. NprX est réimporté par un second système d'oligopeptide perméase.

Afin d'identifier ce système, nous avons réalisé des expériences de mutagénèse aléatoire avec le mini-Tn*10* dans la souche 407 Δ*oppB nprA'*□. Les mutants par transposition de phénotype Lac⁻ ont été sélectionnés en utilisant un crible blanc/bleu sur boites LB + Xgal. Les sites de transposition ont été déterminés chez les bactéries mutées en séquençant les régions du chromosome situées de part et d'autre du mini-Tn*10*. Le transposon de l'un des clones mutés est situé dans un gène codant pour une protéine de pore. Ce gène est situé dans un locus de cinq gènes dont l'organisation génétique est similaire à celle de l'opéron □*p* (cf **Figure 29**). Ces données suggèrent qu'il s'agit d'un second système d'oligopeptide perméase que nous avons nommé Npp (**N**prX **p**eptide **p**ermease). Dans la souche 407 Δ*nppB nprA'*□, la transcription du gène *nprA* est similaire à celle de la souche parentale (cf **Figure 30B**). En revanche, la transcription de *nprA* est abolie dans un double mutant Δ*oppB* Δ*nppB*. Ces résultats montrent que NprX est réimporté dans la cellule bactérienne par deux systèmes d'oligopeptide perméase : les systèmes Opp et Npp.

2.3. Identification des protéines liant les peptides qui réimportent NprX.

La spécificité des systèmes d'oligopeptide perméase dépend des protéines liant les peptides (cf Chapitre II § 3). Afin d'identifier les protéines liant les peptides impliqués dans le réimport de NprX, nous avons construit les souches 407 Δ*oppA nprA'*□, 407 Δ*nppA nprA'*□ et 407 Δ*oppA* Δ*nppA* □*p A'*□ (**Figure 31A**). La délétion de ces gènes n'a pas d'effet drastique sur la transcription de □*prA*. Néanmoins, l'expression du gène *nprA* est retardée de 1 à 2 heures dans les mutants Δ*nppA* et Δ*oppA* Δ□*pA* par rapport à la souche parentale. Ces résultats suggèrent que plusieurs protéines liant les peptides réimportent NprX et que la protéine NppA est impliquée dans ce réimport. Pour vérifier ces résultats, nous avons construit les souches 407 Δ*oppB* Δ*nppA nprA'*□ et 407 Δ*nppB* Δ*oppA nprA'*□. Dans le double mutant Δ*oppB* Δ*nppA,* la transcription du gène *nprA* est abolie (**Figure 31B**). Ce résultat indique que NppA est la seule protéine liant les peptides à réimporter NprX par le pore Npp. Dans le double mutant Δ*nppB* Δ*oppA,* la transcription de *nprA* est réduite de 10% par rapport

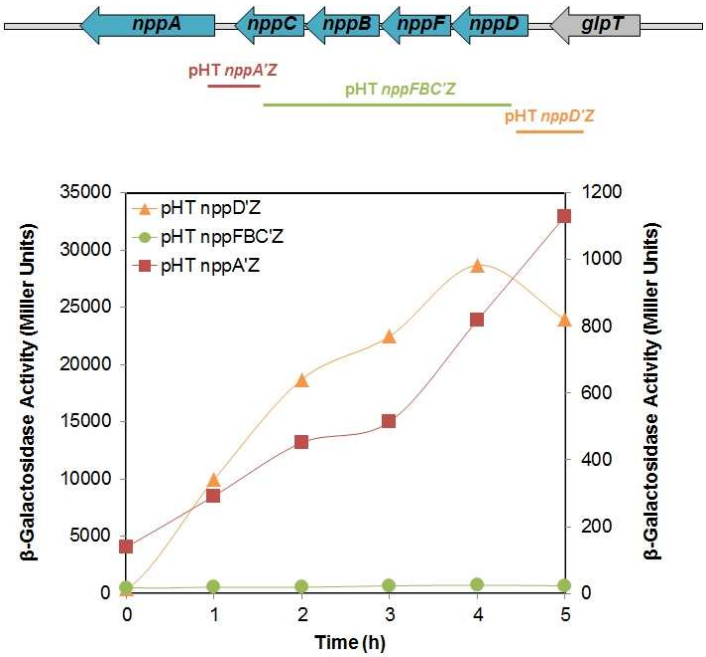


Figure 32 : Identification des régions promotrices du locus *npp*.
(A) Représentation schématique du locus *npp*. Les fragments de couleur orange, vert et rouge représentent les fragments d'ADN fusionnés avec le gène *lacZ* dans le pHT304-18'Z pour obtenir les plasmides pHT*nppD'Z*, pHT*nppFBC'Z* et pHT*nppA'Z*, respectivement. **(B)** Mesure de l'activité β-galactosidase dans la souche 407 avec les plasmides pHT*nppD'Z*, pHT*nppFBC'Z* et pHT*nppA'Z*. Les points qui correspondent à la fusion pHT*nppD'Z* (triangles oranges) se rapportent à l'axe des ordonnés situé à gauche du graphique. Les points qui correspondent aux fusions pHT*nppA'Z* (carrés rouges) et pHT*nppFBC'Z* (points verts) se rapportent à l'axe des ordonnés situé à droite du graphique.

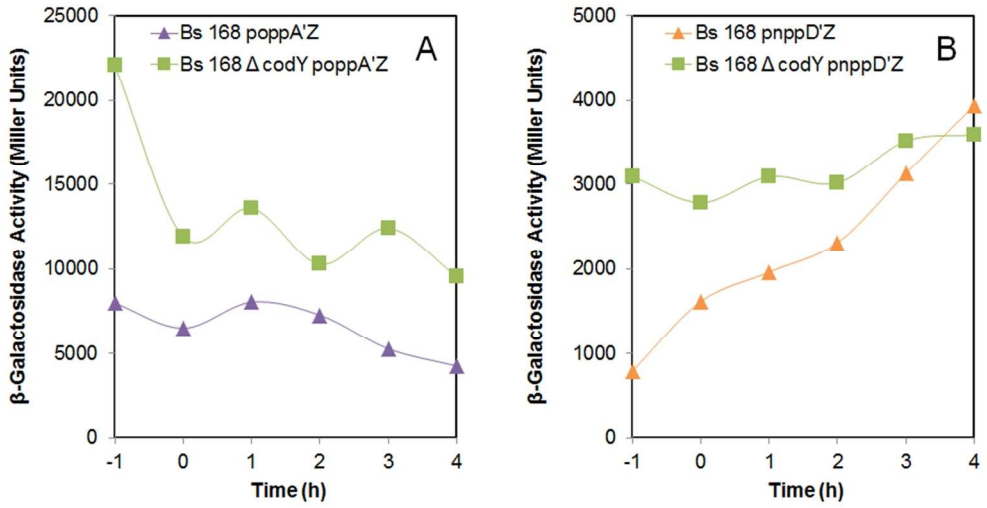


Figure 33 : Effet de la délétion du gène *codY* sur la transcription des gènes *oppA* et *nppD* chez *B. subtilis*.
(A) Mesure de l'activité transcriptionnelle de la région promotrice de *oppA* dans la souche 168 et dans la souche 168 Δ*codY*. **(B)** Mesure de l'activité transcriptionnelle de la région promotrice de *nppD* dans la souche 168 et dans la souche 168 Δ*codY*.

à la souche parentale (**Figure 31C**). De plus, dans cette souche, la délétion du gène BC1185, situé à proximité du locus *opp* et codant pour une autre protéine liant les peptides, réduit de moitié l'expression de *prfA*. Ces résultats indiquent que : (i) le réimport de NprX par le pore Opp fait intervenir plusieurs protéines liant les peptides, (ii) la protéine codée par le gène BC1185 pourrait jouer un rôle dans le réimport de NprX et (iii) une ou plusieurs autres protéines liant les peptides participent au réimport de NprX via Opp (Il existe plus de 10 gènes codant pour des protéines liant les peptides sur le génome de la souche *Bacillus* 407).

2.4. Régulation de la transcription des locus *opp* et *npp*.

Les travaux de Gominet et coll suggèrent que les gènes *oppABCDF* forment un opéron qui est transcrit à partir d'un promoteur situé en amont du gène *oppA* (Gominet *et al*, 2001). Afin de localiser les promoteurs sur le locus *opp*, nous avons fusionné différentes régions du locus avec le gène *lacZ* dans le plasmide pHT304-18'Z, pour obtenir les plasmides pHT*nppD*, pHT*nppFBC* et pHT*nppA'* (**Figure 32A**). L'activité β-galactosidase mesurée dans la souche 407 portant le plasmide pHT*nppD* augmente de t0 à t4 pour atteindre environ 30000 unités Miller (**Figure 32B**). Dans la souche portant le plasmide pHT-*nppA'*, la production de β-galactosidase est faible au début de la croissance et augmente jusqu'à t5 pour atteindre 1150 unités Miller. Enfin, aucune activité n'a été mesurée dans la souche portant le plasmide pHT*nppFBC*. Ces résultats suggèrent l'existence d'un ou plusieurs promoteurs en amont des gènes *nppD* et *nppA*.

Les systèmes d'oligopeptide perméase interviennent dans le réimport des peptides de signalisation mais ils jouent également un rôle majeur dans la nutrition. Ils permettent la translocation d'une grande variété de peptides indispensables à l'anabolisme. Chez plusieurs micro-organismes, il a été montré que CodY régule la transcription des gènes codant pour les systèmes d'oligopeptide perméase (Slack *et al*, 1995; Sonenshein, 2005). Sur la base de ces résultats, nous avons voulu déterminer si CodY régule la transcription des locus *opp* et *npp*. Malgré de multiples essais nous n'avons pas réussi à construire un mutant du gène *codY* dans la souche *Bt* 407. L'inactivation de ce gène pourrait être létale pour cette souche. Pour contourner ce problème nous avons utilisé *B. subtilis* comme hôte hétérologue et transformé les fusions pHT*oppA'* et pHT*nppD* dans les souches 168 et 168 Δ*codY* (**Figure 33A et 33B**). En début de croissance, l'activité β-galactosidase mesurée avec les deux fusions dans la souche 168 Δ*codY* est augmentée d'un facteur trois par rapport à la souche sauvage. Ce résultat suggère que CodY réprime la transcription des gènes des locus *opp* et *npp* en phase exponentielle de croissance.

Al

A l **in** ***Bacillus cereus***

Molecular Microbiology (2011) 82(3), 619–633 ■
doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07839.x
First published online 30 September 2011

A cell–cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group

Stéphane Perchat,[1] Thomas Dubois,[1] Samira Zouhir,[2] Myriam Gominet,[3] Sandrine Poncet,[4] Christelle Lemy,[1] Magali Aumont-Nicaise,[5] Josef Deutscher,[4] Michel Gohar,[1,4] Sylvie Nessler[2] and Didier Lereclus[1]*

[1]*INRA, UMR 1319 – Micalis, La Minière, 78280 Guyancourt, France.*
[2]*CNRS, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Centre de recherche de Gif, 91198 Gif-sur-Yvette, France.*
[3]*Institut Pasteur, CNRS URA 2172, Unité de Biologie des Bactéries Pathogènes à Gram positif, 75015 Paris, France.*
[4]*INRA, UMR 1319 – Micalis, 78850 Thiverval Grignon, France.*
[5]*Université de Paris-Sud 11, UMR 8619, Institut de Biochimie et Biophysique Moléculaire et Cellulaire, 91400 Orsay, France.*

Summary

In sporulating *Bacillus*, major processes like virulence gene expression and sporulation are regulated by communication systems involving signalling peptides and regulators of the RNPP family. We investigated the role of one such regulator, NprR, in bacteria of the *Bacillus cereus* group. We show that NprR is a transcriptional regulator whose activity depends on the NprX signalling peptide. In association with NprX, NprR activates the transcription of an extracellular protease gene (*nprA*) during the first stage of the sporulation process. The transcription start site of the *nprA* gene has been identified and the minimal region necessary for full activation has been characterized by promoter mutagenesis. We demonstrate that the NprX peptide is secreted, processed and then reimported within the bacterial cell. Once inside the cell, the mature form of NprX, presumably the SKPDIVG heptapeptide, directly binds to NprR allowing *nprA* transcription. Alignment of available NprR sequences from different species of the *B. cereus* group defines seven NprR clusters associated with seven NprX heptapeptide classes. This cell–cell communication system was found to be strain-specific with a possible cross-talk between some pherotypes. The phylogenic relationship between NprR and NprX suggests a coevolution of the regulatory protein and its signalling peptide.

Accepted 5 September, 2011. *For correspondence. E-mail didier.lereclus@jouy.inra.fr; Tel. (+33) 1 30 83 36 35; Fax (+33) 1 30 43 80 97.

© 2011 Blackwell Publishing Ltd

Introduction

Major bacterial processes, such as biofilm formation, sporulation and expression of virulence factors, are controlled by quorum-sensing systems. By regulating gene expression according to population densities, quorum-sensing allows the bacteria to co-ordinate their behaviour as a whole community and might have been one of the early steps in the development of multicellularity (Waters and Bassler, 2005). Regulation mechanisms like quorum-sensing and two-component systems contribute to maintaining this tight co-ordination by tuning gene expression and protein activation in response to a large variety of environmental stimuli including nutrient limitation and population density (Lazazzera and Grossman, 1998; Hoch, 2000). Quorum-sensing is a mode of cell–cell communication involving the secretion of diffusible biomolecules which are recognized by the cognate bacteria. Gram-positive bacteria generally use systems based on secretion and recognition of oligopeptides. These peptides elicit a response either directly, by binding to the effector protein in the responder bacterial cells, or indirectly, by triggering a two-component phosphorelay. Examples of direct interactions between a signalling peptide and an effector protein include the Rap proteins in *Bacillus subtilis* (Perego and Hoch, 1996; Solomon *et al.*, 1996), the PlcR transcriptional activator in *Bacillus cereus* (Agaisse *et al.*, 1999; Slamti and Lereclus, 2002) and the PrgX transcriptional repressor in *Enterococcus faecalis* (Bae *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2005). These effectors and the NprR protein of *B. cereus* are members of the so-called RNPP family (named after these members: Rap/NprR/PlcR/PrgX) of quorum-sensing proteins (Declerck *et al.*, 2007; Rocha-Estrada *et al.*, 2010). This family thus

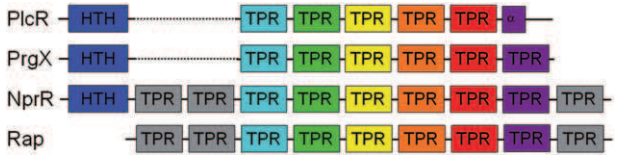


Fig. 1. Schematic representation of the structure of RNPP proteins. The N-terminal HTH DNA binding domain is in blue, the six conserved TPRs repeats are in cyan, green, yellow, orange, red and purple respectively. The three additional TPR motifs specific of NprR and Rap proteins are shown in gray. The absence of this region in PlcR and PrgX is represented by a dashed line.

comprises Gram-positive regulators which bind directly to their signalling peptide in the receiver cell. The binding of Rap and PrgX to their cognate signalling peptides (Phr and cCF10 respectively) results in the inactivation of the regulator functions of Rap and PrgX. In contrast to this negative effect, the binding of the signalling peptide PapR activates the PlcR transcriptional activator.

RNPP proteins contain repeated motifs related to tetratricopeptide repeats (TPRs) (Perego and Brannigan, 2001; Perego and Hoch, 2002; Declerck *et al*., 2007). TPRs are involved in protein–protein interactions through TPR–TPR or TPR–non-TPR interactions (Lamb *et al*., 1995). Crystallographic analysis showed that the C-terminal domain of PlcR contains five TPR motifs with an additional C-terminal α-helix that is part of a sixth TPR in the PrgX structure (Shi *et al*., 2005; Declerck *et al*., 2007). Detailed sequence analysis suggests that NprR and Rap contain three additional TPR-like helical motifs, one at the C-terminal extremity and two mapping between the N-terminal HTH motif and the first TPR domain of PlcR and PrgX (Fig. 1).

The *B. cereus* group comprises a number of closely related pathogenic species, which include *B. thuringiensis*, an insect pathogen, *B. anthracis*, the etiological agent of anthrax, and *B. cereus sensu stricto* which is generally regarded as a pathogen causing food-borne gastroenteritis (Stenfors Arnesen *et al*., 2008; Kolstø *et al*., 2009; Raymond *et al*., 2010). In the early stationary phase, *B. thuringiensis* and *B. cereus* produce several extracellular compounds (degradative enzymes, cytotoxic proteins and cell surface proteins) that might contribute to virulence (Gohar *et al*., 2005). The transcription of the genes encoding these extracellular factors is activated by the pleiotropic regulator PlcR when the bacteria are grown in a rich medium (Slamti and Lereclus, 2002; Gohar *et al*., 2008). Two hours after the onset of stationary phase in such growth conditions, the PlcR-dependent proteins may account for about 80% of the *B. cereus* secretome (Gohar *et al*., 2002). In sharp contrast, *plcR* expression is abolished when the bacteria are grown in a sporulation-specific medium (Lereclus *et al*., 2000). In *B. anthracis*, PlcR is disrupted and not functional, and the PlcR regulon is not expressed (Agaisse *et al*., 1999; Mignot *et al*., 2001): the secretome is mainly composed of two metalloproteases named InhA1 and NprB when the bacteria are grown in minimal aerobic medium (Chitlaru *et al*., 2006). InhA1 is a virulence factor in *B. thuringiensis* and *B. cereus* (Lövgren *et al*., 1990; Ramarao and Lereclus, 2005). The metalloprotease NprB, also known as Npr599, has been described as a potential virulence factor because of its degradative properties against human tissue proteins (Chung *et al*., 2006). This protein was initially called NprA in *B. thuringiensis* and was characterized for its important degradative properties during sporulation (Donovan *et al*., 1997).

In silico analysis of sequenced genomes of *B. anthracis*, *B. thuringiensis* and *B. cereus* reveals that *nprA* maps close to *nprR*, a gene encoding the presumed transcriptional regulator of the RNPP family. This genetic organization is found in all strains of the *B. cereus* group except in the *B. cereus* strain ATCC14579 in which *nprR* is disrupted by a transposon (Ivanova *et al*., 2003). Interestingly, NprA was not found in the supernatant from *B. cereus* ATCC14579 cultures (Gohar *et al*., 2005), suggesting that transcription of the *nprA* gene could be regulated by NprR. Moreover, it has been recently shown that NprR was linked to protease production in *B. anthracis* (Yang *et al*., 2011).

The affiliation of NprR to the RNPP regulator family and the presence of a DNA binding domain led us to test whether NprR has a transcriptional regulator activity. The data presented here describe the functioning of the NprR–NprX cell–cell communication system. We demonstrate that NprR is a transcriptional regulator and that the signalling peptide NprX allows the activation of NprR and then the regulation of *nprA* expression.

Results

nprA *expression*

A comparative proteomic analysis of supernatant from stationary phase cultures of the *Bacillus* strain 407, used as a model strain for the *B. cereus* group, showed that in a rich and complex medium, such as Luria–Bertani (LB) medium, NprA is less well represented than the PlcR-regulated proteins in the secretome (Gohar *et al*., 2005). However, in a sporulation-specific medium (HCT), in which the PlcR regulon is switched off, NprA is the major component of the secretome (Fig. S1). To study regulation of *nprA* gene expression, a chromosomal transcriptional fusion was constructed by inserting a promoterless *lacZ* gene into the *nprA* coding sequence and this strain was designated as *Bacillus nprA'Z* strain. The kinetics of *nprA* expression were determined in rich medium (LB) and in sporulation medium (HCT). The *nprA'Z* cells displayed β-galactosidase activity 2 h after the beginning of the sta-

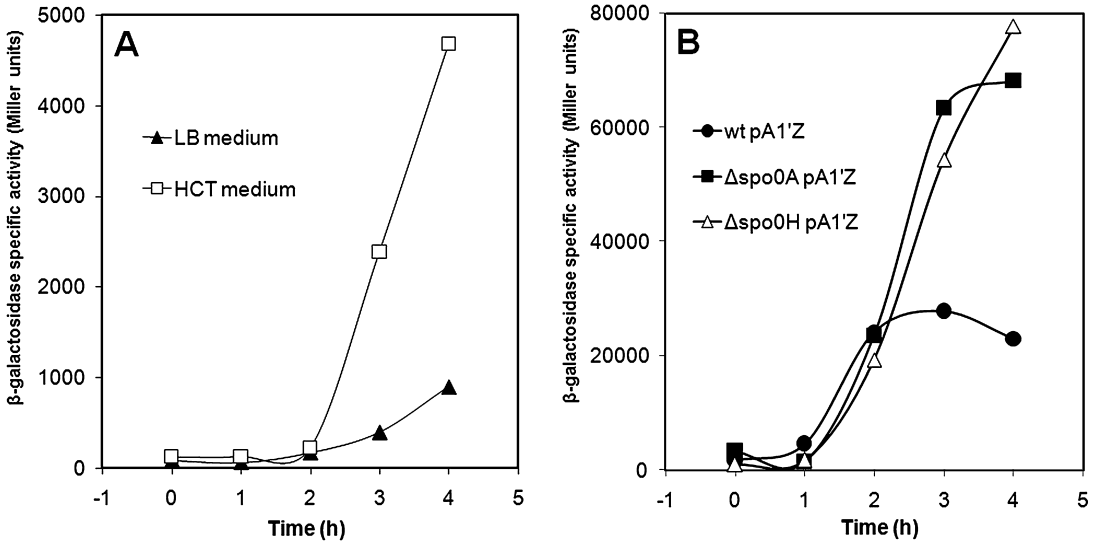


Fig. 2. Kinetics of *nprA* expression.
A. β-Galactosidase activity of the *Bacillus nprA′Z* strain, carrying a chromosomal transcriptional fusion between the *nprA* promoter and the *lacZ* gene, grown at 37°C in LB medium or in HCT medium.
B. β-Galactosidase activity of the 407 wild-type strain, 407 Δ*spo0A* and 407 Δ*spo0H* mutant strains carrying pHT304-*nprA′lacZ* (pA1′*Z*). The cells were grown at 37°C in HCT medium.
Time zero was defined as the onset of the stationary phase.

tionary phase (Fig. 2A). In agreement with the proteomic analysis, *nprA* expression was five times higher in sporulation medium than in rich medium. The *nprA′–lacZ* expression in *spo0A*- and *spo0H*-deficient strains was similar to that in the wild-type strain until t2 (Fig. 2B). Because of the key role of Spo0A and σ^H (the *spo0H* gene product) in the initiation of sporulation (Hilbert and Piggot, 2004), these results indicate that *nprA* expression is not directed by sporulation-specific factors. However, after t2, the β-galactosidase activity is higher in the *spo0A*- and *spo0H*-deficient strains than in the wild-type strain, thus suggesting that Spo0A and σ^H have, directly or indirectly, an inhibitory effect on *nprA* expression during sporulation.

The use of plasmid transcriptional fusions (Fig. 2B) instead of chromosomal transcriptional fusions (Fig. 2A) resulted in higher levels of β-galactosidase production. Moreover, the plasmid copy number (four copies per chromosome) may dose NprR or the sigma factor involved in *nprA* transcription, thus resulting in an earlier stop of *nprA′–lacZ* expression in the wild-type strain (Fig. 2B compared with Fig. 2A).

The NprR–NprX complex activates the nprA *transcription*

Genome analysis indicated that genes encoding a putative RNPP regulator (NprR) and a putative signalling peptide (designated as NprX) are found upstream from *nprA* in the bacteria of the *B. cereus* group (Fig. S2). To investigate the possible involvement of the *nprR–nprX* genes in expression of the *nprA* gene, the *nprR* and *nprX* genes in the *nprA′Z* strain were disrupted. Unlike the parental *nprA′Z* strain, the Δ*nprR–nprX* mutant strain (ΔRX mutant strain) did not produce detectable β-galactosidase activity in liquid HCT medium (Fig. 3A). These results suggested that the *nprR–nprX* genes were required for *nprA* expression. Genetic complementation of the *nprA′Z* ΔRX mutant strain with pHT304-RX restored *lacZ* gene expression, whereas the introduction of pHT304-R did not (Fig. 3A). Similarly, no *lacZ* gene expression was observed in the *nprA′Z* ΔR mutant strain (Fig. 3B). Genetic complementation of the *nprA′Z* ΔR mutant strain with pHT304-R restored *lacZ* gene expression (Fig. 3B), indicating that NprX was produced in this strain. This result demonstrates that NprX alone is not sufficient to transcribe *nprA′–lacZ in vivo*. The higher expression of *nprA′–lacZ* in the strain *nprA′Z* ΔRX [pHT304-RX] than in the strain *nprA′Z* ΔR [pHT304-R] (Fig. 3A vs. B) is likely due to the plasmid localization of the *nprX* gene in the first recombinant strain. Therefore, both NprR and NprX are required for *nprA* expression: NprR is the transcriptional regulator and NprX is an essential cofactor for NprR activity.

An extracellular heptapeptide encoded by nprX *restores* nprA *expression in* nprX *mutant strain*

We investigated whether the *nprX* gene product was a cell–cell signalling peptide by co-growing *nprX*-deficient bacteria (*nprA′Z* ΔRX [pHT304-R] strain) with either the

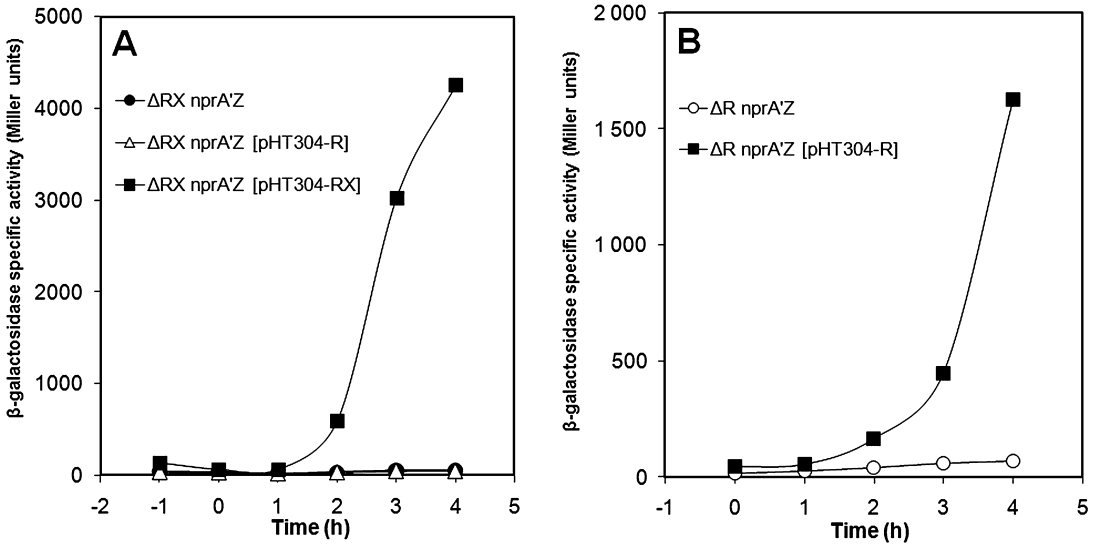


Fig. 3. NprR and NprX are required for activation of *nprA* transcription.
A. β-Galactosidase activity of the *Bacillus* ΔRX *nprA'Z* mutant strain, carrying or not pHT304-R or pHT304-RX, grown at 37°C in HCT medium.
B. β-Galactosidase activity of the *Bacillus* ΔR *nprA'Z* mutant strain, carrying or not pHT304-R, grown at 37°C in HCT medium.
Time zero was defined as the onset of the stationary phase.

wild-type strain or the ΔRX strain. The strains were separately grown in HCT medium at 37°C until OD_{600} 0.8, then mixed with a ratio 1:1 and *lacZ* expression was assayed during growth. β-Galactosidase was only produced in the *nprX*-deficient bacteria co-cultured with the wild-type strain (Fig. 4A), indicating that wild-type cells produce a factor able to rescue *nprA'–lacZ* expression in the ΔRX [pHT304-R] cells. To determine whether this signalling factor is secreted, we performed a complementation experiment with conditioned medium (filtered supernatant from a culture grown in HCT medium until 2 h after the onset of the stationary phase). The *nprA'Z* ΔRX [pHT304-R] strain was grown in HCT medium, harvested at t1, resuspended in conditioned medium and then assayed for *lacZ* expression. β-Galactosidase was produced in the *nprX*-deficient bacteria after their resuspension in the conditioned medium from the wild-type strain but not from the ΔRX mutant strain (Fig. 4C). These results demonstrate that *nprA* expression in the *nprX*-deficient strain was activated by a cell–cell signalling factor produced by the wild-type cells and secreted in the extracellular medium.

To determine whether this secreted factor was the product of the *nprX* gene, we used synthetic peptides corresponding to the C-terminus of the NprX polypeptide, the part of the peptide presumed to be exported (Fig. 4B). Thus, X23 and X10, corresponding to NprX lacking the presumed signal peptide and to the 10 amino acids of the C-terminal part respectively, were added to a *Bacillus nprA'Z* ΔRX [pHT304-R] culture 1 h after the onset of the stationary phase. Expression of *lacZ* from the *nprA* promoter was restored to *nprX*-deficient cells grown in the presence of X23, but not those grown with X10 (Fig. 4C). Alternatively, it has been suggested that the SKPDI motif, present in the central part of the NprX amino acid sequence, belongs to the Phr peptide family (Pottathil and Lazazzera, 2003). To determine the active form of NprX, we used the synthetic peptides X5, X6a, X6b and X7 consisting of the sequences SKPDI, SKPDIV, KPDIVG and SKPDIVG respectively (Fig. 4A). The *lacZ* expression from the *nprA* promoter was only restored when the cells were cultured in the presence of X7 (Fig. 4C). Thus, the secreted cell–cell signalling factor allowing the activation of *nprA* expression corresponds to the central part of NprX, and is at least seven amino acids long including the sequence SKPDIVG.

The NprX heptapeptide is functional within the cell

To demonstrate that the heptapeptide is functional within the cell, we introduced pHT1618-*X7i* into the strain *nprA'Z* ΔRX [pHT304-R]. The strain *nprA'Z* ΔRX [pHT304-R] harbouring the pHT1618-*X5i* was used as negative control. In these constructs, the *X5i* and *X7i* genes are transcribed from the xylose-inducible promoter P_{xylA}, and encode MSKPDI and MSKPDIVG respectively. These peptides correspond to X5 and X7 preceded by an initiator methionine. The plasmids pHT304 and pHT1618 are compatible and can be maintained in the same bacteria (Lereclus and Arantes, 1992). The transformant strains *nprA'Z* ΔRX [pHT304-R, pHT1618-*X5i*] and *nprA'Z* ΔRX [pHT304-R, pHT1618-*X7i*] were grown in HCT medium,

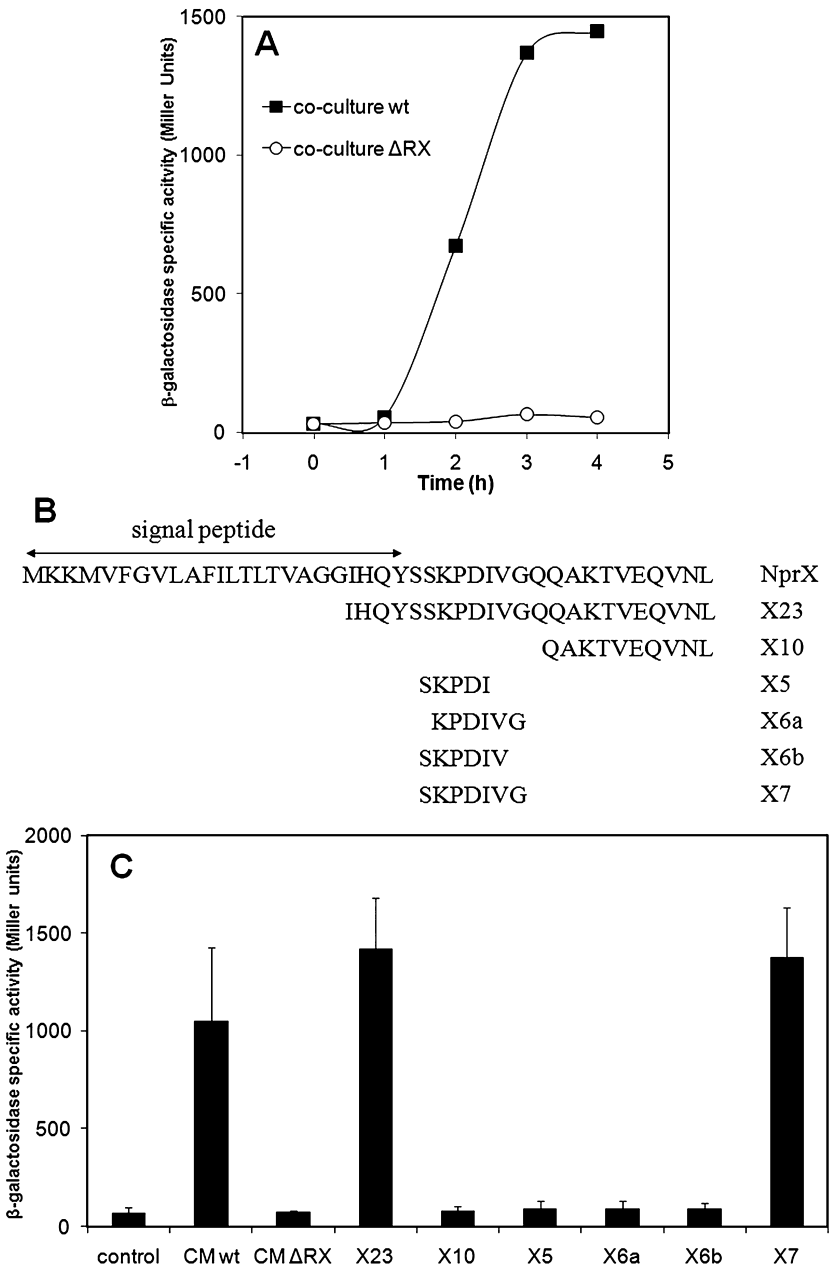


Fig. 4. Characterization of the signalling peptide NprX.
A. The wild-type strain produces a cell–cell signalling factor allowing the activation of *nprA* transcription in the *nprX*-deficient strain. β-Galactosidase activity of the ΔRX *nprA'Z* [pHT304-R] mutant strain co-cultured with the wild-type strain or the ΔRX mutant strain (ratio 1:1) at 37°C in HCT medium. Time zero was defined as the onset of the stationary phase.
B. Amino acid sequence of the NprX peptide and of the synthetic peptides used for complementation experiments. The double arrow indicates the N-terminal signal peptide sequence. The potential cleavage site was predicted with the SignalP 3.0 program (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP).
C. Complementation of the ΔRX *nprA'Z* [pHT304-R] mutant strain with synthetic peptides. The bacteria were grown at 37°C in HCT medium and each peptide (X23, X10, X5, X6a, X6b and X7) was added independently 1 h after the onset of the stationary phase. β-Galactosidase activity of the ΔRX *nprA'Z* [pHT304-R] mutant strain was measured 3 h later. The control corresponds to the β-galactosidase activity of the ΔRX *nprA'Z* [pHT304-R] mutant strain without added peptide. CM wt and CM ΔRX are conditioned medium (filtered supernatant) from 407 wild-type strain and 407 ΔRX mutant strain respectively, grown in HCT medium until 2 h after the onset of the stationary phase. Vertical bars: SEM.

and β-galactosidase activity was assayed during growth (Fig. 5A). Expression of *lacZ* from the *nprA* promoter was only restored in the presence of xylose, inducing *X7i* expression, but not in the absence of xylose (data not shown). To verify that *nprA* expression is not activated extracellularly, due to the release of X7i into the culture medium from lysed cells, we tested supernatants from *nprA'Z* ΔRX [pHT304-R, pHT1618-*X7i*] cultures on the *nprX*-deficient strain (the *nprA'Z* ΔRX strain harbouring pHT304-R). No *lacZ* expression was detected indicating that NprX was not present in the supernatant (data not shown). Thus, the X7 heptapeptide is able to function within the cell to activate *nprA* expression, suggesting a direct interaction with NprR.

The X7 heptapeptide forms a tight complex with NprR

We used isothermal titration calorimetry (ITC) to quantitatively characterize the interaction of X7 with NprR. ITC measures heat generated or absorbed upon binding (Wiseman *et al.*, 1989), and provides in a single experiment the thermodynamics parameters allowing the calculation of the dissociation constant (Kd). Calorimetric titrations were performed in which fixed amounts of

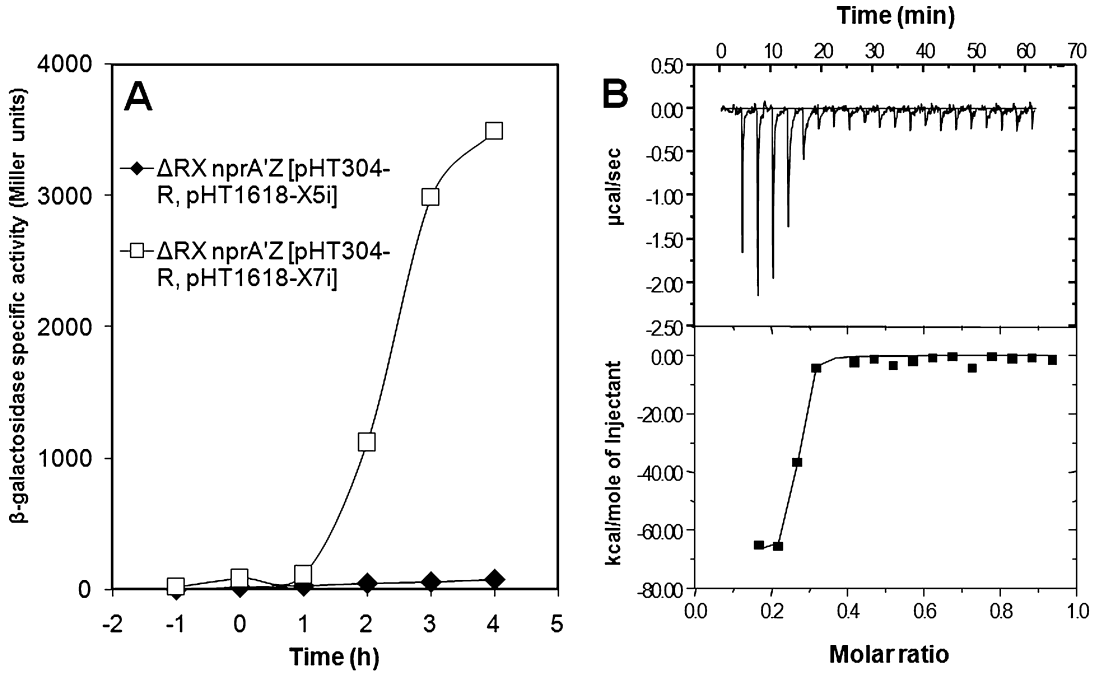


Fig. 5. NprX heptapeptide is functional within the cell and forms a complex with NprR.
A. Effect of intracellular production of X5 and X7 in the ΔRX *nprA'Z* [pHT304-R] mutant strain. β-Galactosidase activity of the ΔRX *nprA'Z* [pHT304-R] mutant strain carrying pHT1618-*X5i* or pHT1618-*X7i* in the presence of 20 mM xylose added at t0. The cells were grown at 37°C in HCT medium. Time zero was defined as the onset of the stationary phase.
B. Isothermal titration curve of the binding of NprX7 to NprR. The raw data presented in the upper panel have been integrated in order to obtain the saturation curve presented in the lower panel.

peptide in the syringe were sequentially injected into the sample cell containing high-grade purified NprR. The raw data, in which the power output in microcalories per second is measured as a function of time in minutes (Fig. 5B, upper panel), indicate a strong enthalpically favourable exothermic interaction, based on the negative values observed for the peaks. With each injection of peptide, less and less heat release was observed until constant values were obtained, reflecting a saturable process. The data were integrated to generate curves in which the molar ratio of peptide to protein is plotted against the heat release (Fig. 5B, lower panel). The analysis of the integrated titration curve showed that the NprR–X7 interaction was characterized by a Kd of about 50 nM with an apparent stoichiometry of about 0.3 (corresponding to the inflection point of the isotherm). This low value is probably due to an overestimation of the protein concentration. At the working sample concentrations, NprR tends indeed to precipitate upon addition of the peptide. This of course also affects the precision of the calculated Kd value.

Determination of the nprA *promoter*

To identify the *nprA* transcriptional start site, we performed primer extension analysis using oligonucleotide NprAS2 and RNA extracted from *Bacillus* strain 407 cells grown in HCT medium (Fig. 6A). A single mRNA 5′-end was identified at nucleotide position –71 upstream from the *nprA* translational start codon (Fig. 6B). The putative –35 and –10 boxes related to this start site match the consensus promoter sequences (TTGACA and TATAAT respectively) recognized by RNA polymerase/σ^A holoenzyme (Moran, 1993). However, the distance between the potential –10 box and the transcription start site was quite short. The *nprA* promoter region was mapped by using transcriptional fusion to the *lacZ* reporter gene in pHT304-18′Z. Various PCR-amplified DNA fragments containing sequences upstream from *nprA* were used to give pHTA1′Z, pHTA2′Z, pHTA3′Z, pHTA4′Z and pHTA5′Z (Fig. 6C). These plasmids were introduced into *Bacillus* strain 407 and β-galactosidase was assayed during growth in HCT medium (Fig. 6D). Similar β-galactosidase production was obtained in bacteria harbouring pHTA1′Z, pHTA2′Z and pHTA3′Z. This production might reflect the full expression of *nprA*. The β-galactosidase activity was very weak (as in the ΔRX mutant strain) in strains harbouring pHTA4′Z or pHTA5′Z. These results indicate that the DNA fragment A3, starting 8 bp upstream from the –35 TTGAGA box, is sufficient for full activation of *nprA* transcription, suggesting that the 8 bp might be required for NprR–NprX binding.

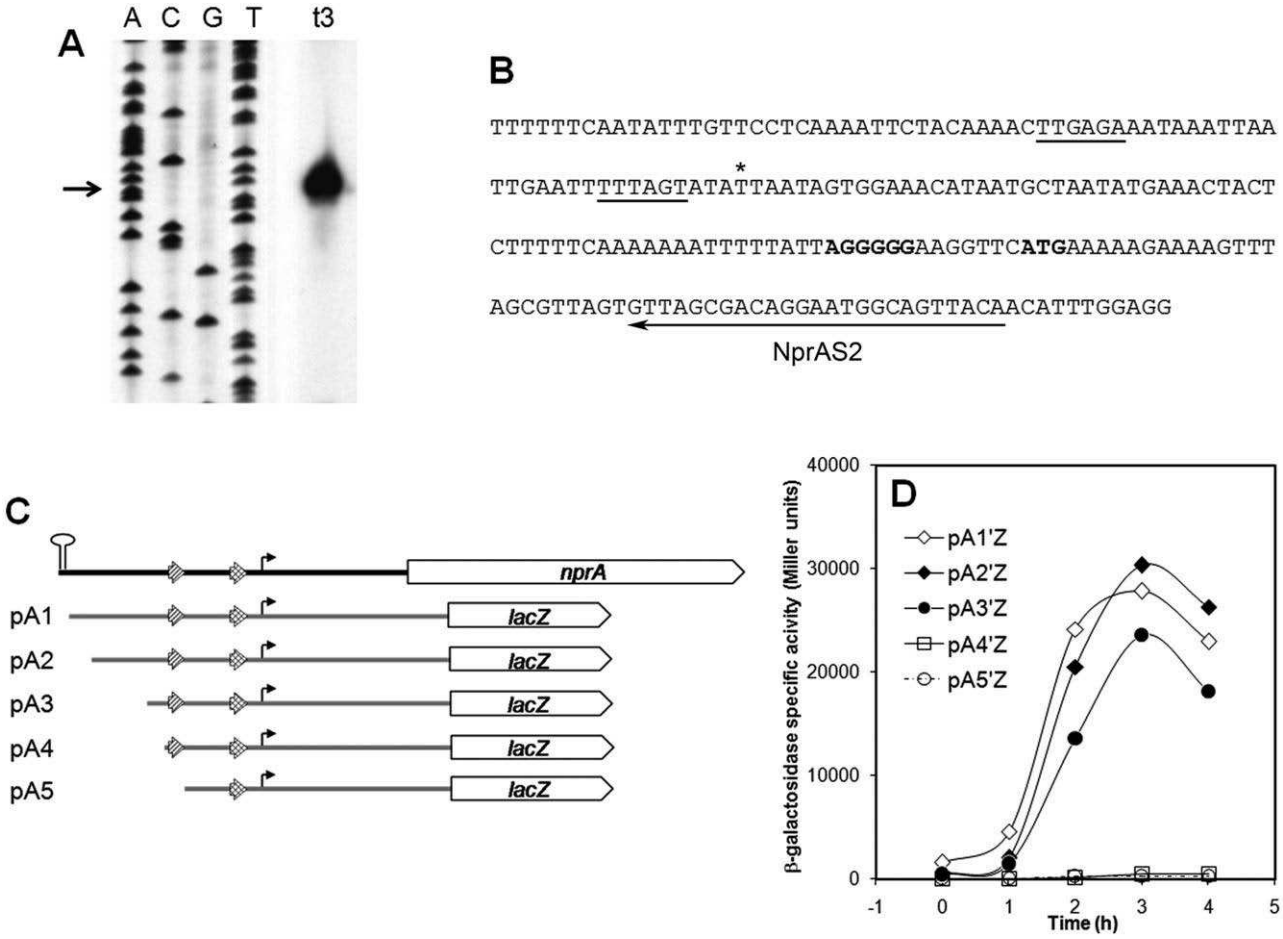


Fig. 6. Characterization of the *nprA* promoter.
A. Determination of the *nprA* transcriptional start site by primer extension. Total RNA was extracted from *Bacillus* strain 407 cells 3 h (t3) after the onset of the stationary phase in HCT medium. RNA was subject to primer extension with the oligonucleotide NprAS2, and the same oligonucleotide was used as a primer for the dideoxy sequencing reactions (lanes A, C, G and T).
B. Nucleotide sequence of the *nprA* promoter region. The asterisk indicates the mRNA 5′-end detected by primer extension. The putative –10 and –35 boxes of the *nprA* promoter are underlined. The potential ribosome binding site and the start codon are shown in bold. The sequence of the NprAS2 primer is underlined with an arrow.
C. Mapping of the *nprA* promoter region. Bent arrows point to the transcriptional start site. The putative –10 and –35 boxes are indicated by large arrowheads. Potential stem–loop structure upstream of the *nprA* promoter is indicated. The segments represent the DNA fragments used to construct the *lacZ* transcriptional fusions.
D. β-Galactosidase activity of the *Bacillus* 407 strain carrying pA1′*Z*, pA2′*Z*, pA3′*Z*, pA4′*Z* and pA5′*Z*. The cells were grown at 37°C in HCT medium. Time zero was defined as the onset of the stationary phase.

The NprR–NprX complex specifically binds to –35 box of the nprA *promoter*

We used ITC experiments to further characterize the DNA binding site of the NprR–NprX complex. Calorimetric titrations were performed in which fixed amounts of NprR–NprX7 complex were sequentially injected into the sample cell containing different DNA probes. We used oligonucleotides ranging from 36 to 22 bp. These probes corresponded to two regions of the *nprA* promoter, including the possible DNA binding sequence identified in mapping experiments (Fig. 7A). The five probes centred on the putative –35 box bound to the NprR–NprX7 complex with very similar Kd values of about 3 μM (Fig. 7B). Apparent stoichiometry values of about 1.0 were observed in these measurements, instead of the expected value of 0.5 reflecting the dimerization of the proteins interacting with symmetric DNA sequences of about 20 bp. However, as already mentioned in the ITC peptide-binding experiments, precipitation problems led to an overestimation of the NprR concentration. More interestingly, the interaction was lost when the DNA probe was not centred on the –35 box, but on the upstream region of the *nprA* promoter, confirming the sequence-specific nature of the interaction

A

5'-...TTTTTCAATATTTGTTCCTCAAAATTCTACAAAAC**TTGAGA**AAAAAATTATTTGAATTTTTAGTATATTAATAGTGG...-3'

B

Probe	DNA sequence	Kd (μM)
A36	5'-AATATTTGTTCCTCAAAATTCTACAAAAC**TTGAGA**A-3'	-
A29	5'-AATATTTGTTCCTCAAAATTCTACAAAAC-3'	-
B34	5'-TACAAAAC**TTGAGA**AAAAAATTATTTGAATTTTT-3'	5.3 ± 1.8
B30	5'-TACAAAAC**TTGAGA**AAAAAATTATTTGAAT-3'	3.1 ± 1.0
B26a	5'-ATTCTACAAAAC**TTGAGA**AAAAAATT-3'	2.3 ± 0.7
B26b	5'-TACAAAAC**TTGAGA**AAAAAATTATTT-3'	2.7 ± 1.2
B22	5'-TACAAAAC**TTGAGA**AAAAAATT-3'	2.7 ± 0.5

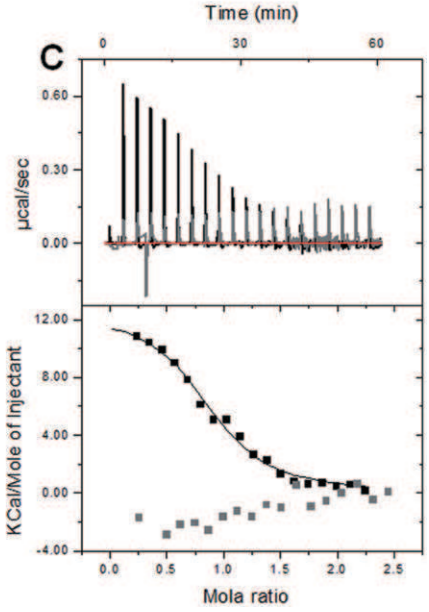


Fig. 7. Identification of the DNA sequence specifically recognized by NprR–NprX7.
A. Part of the *nprA* promoters containing the two regions (A and B framed in green and orange respectively) tested for interaction with NprR–NprX7 complex. The putative –35 box is highlighted in bold.
B. Results of the ITC affinity measurements performed with two oligonucleotides from the region A and five oligonucleotides from region B, as defined in A.
C. Superimposition of the isothermal titration curves obtained for the binding of the DNA probes B22 (in black) and A36 (in gray) on NprR/NprX7 complex.

(Fig. 7C). These results thus demonstrate that the NprR–NprX complex specifically binds to the –35 box region of the *nprA* promoter.

The NprR–NprX system is strain-specific

To characterize the polymorphism and the specificity of the NprR–NprX system within the *B. cereus* group, we performed a BLAST analysis with the amino acid sequence of NprR from the *Bacillus* 407 strain. NprR was found in all the species of the *B. cereus* group and 31 different NprR polypeptide sequences were identified (see Table S3 for the origins of NprR). We used ClustalX and Treeview to construct a phylogenetic tree based on the NprR amino acid sequences (Fig. 8A). The NprR sequences are clustered in seven groups which are not species-specific: for example, group I contains NprR from *B. anthracis*, *B. cereus* and *B. thuringiensis*, and group VI contains NprR from *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* and *B. pseudomycoides*. Alignment of the NprX amino acids sequences shows a partial conservation of the internal heptapeptide in the 31 strains of the *B. cereus* group (Table S4). Interestingly, the association of the NprR groups with their cognate NprX heptapeptide allows to define seven distinct pherotypes within the *B. cereus* group (Fig. 8A). Thus, the NprR groups I, II, III, IV, V, VI and VII can be associated with NprX heptapeptide SKPDIVG, SKPDTYG, SNPDIYG, SRPDVLT, WTSDIYG, WKPD[N/T/V][Y/L]G and WRPDMSI respectively.

To verify that the internal heptapeptide is the minimal active form of NprX in all the strains of the *B. cereus* group, we tested the activity of the NprR from group VI with its potential corresponding NprX heptapeptide (WKPDTLG). The 407 ΔRX *nprA'Z* strain was used as an heterologous host and transformed with the pHT304-R_{VI}, carrying the *nprR* gene of the *B. weihenstephanensis* KBAB4 strain. Significant β-galactosidase activities were obtained after addition of the WKPDTLG synthetic peptide or by co-growing this recombinant strain with the KBAB4 strain (Fig. 8B). In contrast, no *lacZ* expression was detected after addition of the synthetic peptide SKPDIVG from group I. This indicates that $NprR_{VI}$ is specifically activated by $NprX_{VI}$ and that the $NprR_{VI}$–$NprX_{VI}$ complex is able to activate the transcription of the *nprA* gene in the *Bacillus* 407 strain. However, the β-galactosidase activity obtained with this complex is fourfold lower than that

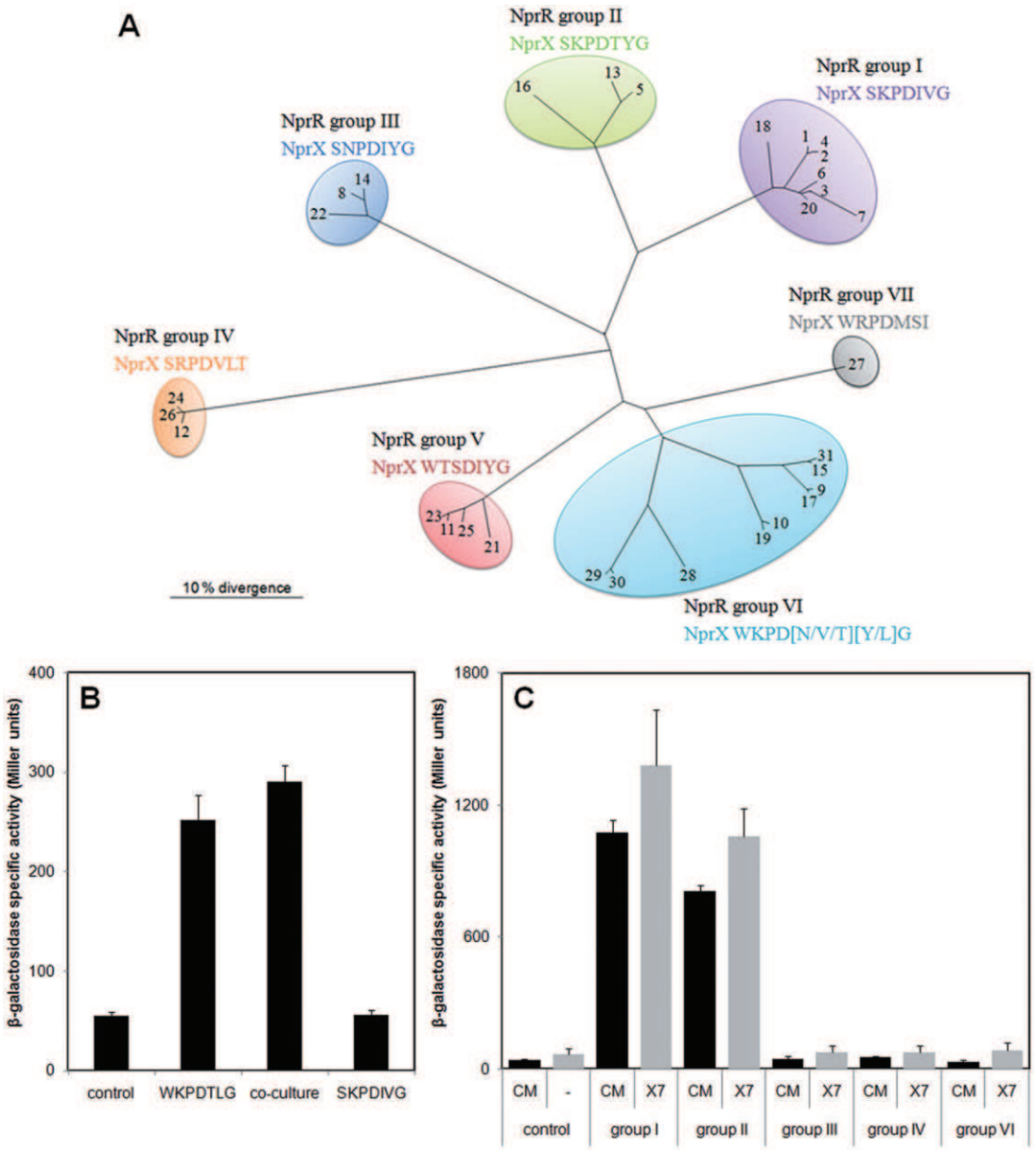


Fig. 8. The NprR–NprX system is strain-specific.
A. NprR peptide sequences can be divided into seven clusters to which seven NprX classes correspond. This phylogenic tree was built on the basis of NprR peptide sequences from strains belonging to the *B. cereus* group, using the ClustalX and Treeview programs. The sequences were identified by BLAST analysis. Numbers 1 and 2 refer to *B. anthracis* strains, numbers 3–12 refer to *B. thuringiensis* strains, numbers 13–28 refer to *B. cereus* strains, number 29 refers to *B. mycoides* strains, number 30 refers to *B. pseudomycoides* strain and number 31 refers to *B. weihenstephanensis* strain (Table S3 recapitulates the strains used for this study). The colours designate individual NprR clusters with which a NprX class is associated: purple indicates NprX SKPDIVG, green indicates NprX SKPDTYG, blue indicates NprX SNPDIYG, orange indicates NprX SRPDVLT, red indicates NprX WTSDIYG, turquoise indicates NprX WKPD[N/V/T][Y/L]G and gray indicates NprX WRPDMSI.
B. Complementation of the ΔRX *nprA'Z* [pHT304-R_{VI}] mutant strain with the WKPDTLG and the SKPDIVG synthetic peptides and by co-growing with the KBAB4 strain. The synthetic peptides were added 1 h after the onset of the stationary phase. The co-culture was carried out by mixing the two strains at OD_{600} 0.8 with a ratio 1:1. β-Galactosidase activity was measured 4 h after the onset of the stationary phase. The control corresponds to the β-galactosidase activity without added peptide. Vertical bars: SEM.
C. Complementation of the ΔRX *nprA'Z* [pHT304-R] mutant strain with conditioned medium (CM) from strains belonging to groups I, II, III, IV and VI, and with the corresponding NprX synthetic heptapeptides (X7). The CM from groups I, II, III, IV and VI were produced from *B. thuringiensis* serovar *israelensis*, *B. cereus* ATCC 10987, *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, *B. thuringiensis* serovar *konkukian* and *B. weihenstephanensis* KBAB4 respectively, grown in HCT medium until 2 h after the onset of the stationary phase. The X7 from classes I, II, III, IV and VI (SKPDIVG, SKPDTYG, SNPDIYG, SRPDVLT and WKPDTLG respectively) were added independently 1 h after the onset of the stationary phase. The control corresponds to the β-galactosidase activity of the ΔRX *nprA'Z* [pHT304-R] mutant strain without added peptide or CM. β-Galactosidase activity of the ΔRX *nprA'Z* [pHT304-R] mutant strain was measured 3 h after the addition of heptapeptides. Vertical bars: SEM.

obtained with the NprR–NprX complex from the 407 strain, suggesting that the $NprR_{VI}$–$NprX_{VI}$ complex is less efficient, at least in this host strain. Altogether, these results strengthen the hypothesis that the heptapeptide corresponding to the central part of NprX is the minimal active form in all strains of the *B. cereus* group.

To study the strain specificity of NprR–NprX we investigated whether different NprX were able to activate NprR from the *Bacillus* 407 strain which belongs to group I. We performed a complementation experiment with conditioned medium from representative strains in groups I, II, III, IV and VI, and with NprX synthetic heptapeptides belonging to the same group (the *B. weihenstephanensis* KBAB4 strain and the WKPDTLG peptide have been chosen as representative for the groups V, VI and VII). The *nprA'Z* ΔRX [pHT304-R] strain was grown in HCT medium and then assayed for *lacZ* expression after resuspension in conditioned medium or addition of each synthetic peptide. Expression of *lacZ* from the *nprA* promoter was restored to *nprX*-deficient cells grown in the presence of conditioned medium from strains belonging to groups I and II as well as with the corresponding SKPDIVG and SKPDTYG peptides. In sharp contrast, no *lacZ* expression was detected with the conditioned medium and the NprX synthetic peptide from groups III, IV and VI (Fig. 8C). These results indicate that the NprR–NprX quorum-sensing system is strain-specific but not species-specific. However, we show that cross-talk may be observed in some cases. For example, the NprX from class II (SKPDTYG) is able to activate the NprR from *Bacillus* 407 strain (group I).

Discussion

The neutral protease NprA is the major extracellular protein produced during sporulation of bacteria of the *B. cereus* group (Fig. S1) (Donovan *et al*., 1997; Chitlaru *et al*., 2006; Chung *et al*., 2006). Here we show that *nprA* gene expression depends on a cell–cell communication system consisting of the regulatory protein NprR and the signalling peptide NprX. In a wild-type strain, *nprA* transcription is activated during sporulation and requires both NprR and NprX. The role of NprR as a transcriptional activator is in agreement with the presence of a HTH domain for DNA binding.

Complementation experiments carried out in the *nprX*-deficient mutant strain showed that *nprA* expression was restored in co-cultures with the wild-type strain, in conditioned medium from the wild-type strain, and thus by a secreted cell–cell signalling factor. The use of synthetic peptides demonstrated that the minimal active size of the secreted factor is the heptapeptide SKPDIVG corresponding to an internal region of the carboxy-terminal part of NprX. This is dissimilar to findings for PapR, the signalling peptide pairing with the PlcR regulator, whose mature form corresponds to the C-terminal end (Bouillaut *et al*., 2008). Interestingly, *in silico* analysis of the *B. anthracis* genome previously identified the pentapeptide SKPDI as a putative Phr peptide (Pottathil and Lazazzera, 2003). The signalling peptides from Rap–Phr or PlcR–PapR quorum-sensing systems have been purified from *B. subtilis* and *B. cereus* respectively. Molecular analysis revealed that the signalling molecules from Phr family are pentapeptides (Solomon *et al*., 1996) whereas the mature PapR is a heptapeptide (Bouillaut *et al*., 2008). Note that the two characterized signalling molecules (PapR and possibly NprX) from the *B. cereus* group are heptapeptides whereas those from *B. subtilis* are pentapeptides. It would be interesting to determine whether this size difference is also relevant to the other *B. cereus* RNPP regulators, like the Rap proteins. It would mean that the length of the Phr peptide is species-characteristic. The mature signalling molecules generally correspond to the carboxy-terminal end of the peptides except for the PhrE pentapeptide, which is generated from the central part of the C-terminal end (Jiang *et al*., 2000; Pottathil and Lazazzera, 2003). The presence of an alanine residue before the N-terminus of the active Phr peptides is necessary for the maturation process (Stephenson *et al*., 2003) and the cleavage requires several peptidases such as subtilisin, Epr and Vpr excepted for PhrE (Lanigan-Gerdes *et al*., 2007). No alanine residue was found upstream of the NprX heptapeptide suggesting that NprX is processed in a different way.

By expressing SKPDIVG heptapeptide intracellularly, we showed that NprX is active within the cell. This implies that the bacteria are able to import this peptide from the extracellular medium. The signalling peptides from the RNPP family have been found to be uptake inside the bacteria by the oligopeptide permease Opp system (Leonard *et al*., 1996; Perego and Hoch, 1996; Gominet *et al*., 2001). In *B. cereus*, several oligopeptide permease systems were found, but Opp is the only one involved for the uptake of PapR (Gominet *et al*., 2001). Interestingly, *nprA* expression was only slightly reduced in a Δ*oppB* mutant strain (data not shown), suggesting that another oligopeptide permease system is involved for the uptake of NprX.

The NprR regulatory domain is composed of TPR motifs and interactions between PlcR and PapR and between RapC and PhrC are mediated by the TPRs (Core and Perego, 2003; Declerck *et al*., 2007). We have shown that NprR forms a tight complex with the heptapeptide NprX. Thus, it is likely that NprX binds to NprR via TPR-mediated interactions and this may induce a conformational change controlling the activity of the regulatory protein. The ITC experiments showed that the NprR–NprX

complex binds to its DNA target sequence. The low binding affinity (Kd in the micromolar range) may indicate that the *in vitro* experimental conditions are not the most efficient. Additional studies will be needed to decipher the exact role of NprX in the activation of NprR. Furthermore, other cellular factors could stabilize the NprR–DNA interaction in the bacterial cells. Together with the mapping of the *nprA* promoter region, these interaction experiments indicate that the NprR–NprX DNA binding site encompasses the potential −35 box of the promoter. The ITC data indicated an endothermic interaction with unfavourable positive enthalpy values characteristic of entropically driven conformational changes. This most probably reflects the stabilization of the flexible HTH domains of the protein upon DNA binding. The proposed NprR binding site is conserved among all the species of the *B. cereus* group. However, further identification of other genes regulated by NprR–NprX will be necessary to determine a consensus DNA target sequence recognized by NprR. The binding to a DNA sequence overlapping the −35 box suggests a direct contact with the RNA polymerase holoenzyme (Rhodius and Busby, 1998). The sequences of the −35 (TTGAGA) and −10 (TTTAGT) regions of the *nprA* promoter also strongly suggest that the sigma factor involved in transcription is σ^A, the *Bacillus* vegetative sigma factor. This hypothesis is strengthened by the fact that *nprA* expression is not dependent on Spo0A and σ^H sporulation factors. Moreover, *nprA* expression is increased and prolonged in mutant strains unable to initiate sporulation. This suggests that a sporulation-specific event turns off *nprA* expression. However, it is notable that *nprA* transcription is activated after 1–2 h after the end of exponential growth in a sporulation-specific medium. This is in agreement with available data regarding NprA production during sporulation of *B. thuringiensis* and *B. anthracis* (Donovan *et al*., 1997; Chitlaru *et al*., 2006). Moreover, it is notable that NprR is functioning during the sporulation process in sharp contrast with PlcR expression which is repressed during sporulation (Lereclus *et al*., 2000).

The study of the NprR–NprX polymorphism within the *B. cereus* group revealed seven NprR clusters. NprR was found in all the species of the *B. cereus* group and there is a phylogenic relationship between NprR and its cognate peptide NprX. We demonstrated that NprR from *B. weihenstephanensis* KBAB4 is specifically activated by its cognate WKPDTLG heptapeptide suggesting that NprX is similarly processed in all strains of the *B. cereus* group. Genetic complementation experiments showed that the various NprX heptapeptides do not activate NprR of the *Bacillus* 407 strain to the same extent. As PlcR–PapR, the NprR–NprX system is strain-specific with a possible cross-talk between some phylogenetic groups. However, these data do not allow the identification of the NprX residues involved in the binding specificity. The phylogenic relationship between NprR and NprX reflects a coevolution of the two partners. Interestingly, the NprR–NprX groups are different from the PlcR–PapR groups (Slamti and Lereclus, 2005), suggesting that the two systems have evolved independently. Moreover, an absence of phylogenic relationship was previously shown between the PlcR–PapR groups and the housekeeping genes. This lack of congruence is also observed with NprR thus showing that the three genetic elements, PlcR–PapR, NprR–NprX and housekeeping genes, have evolved independently (Helgason *et al*., 2004; Hill *et al*., 2004; Ko *et al*., 2004). These remarkable divergences might be due to highly and efficient specific horizontal transfer of the quorum-sensing genes.

This study describes the functioning of the NprR–NprX cell–cell communication system from the RNPP family. To summarize, the regulatory protein NprR and its signalling peptide NprX are produced in the cytoplasm during the first stage of the sporulation. NprX is cleaved at a signal peptidase cleavage site and secreted as a 19-amino acid peptide. Then, NprX is extracellularly processed, presumably as a heptapeptide (SKPDIVG), before being reimported within the bacterial cell. The intracellular concentration of the mature NprX increases, the peptide binds to NprR and the NprR–NprX complex activates *nprA* transcription. The massive production of protease during sporulation might provide nutrients allowing a part of the bacterial population to delay the commitment to form spores. However, the determination of the complete NprR regulon will be necessary to investigate the biological significance of this quorum sensor in the opportunistic life cycle of *B. cereus* bacteria.

Experimental procedures

Bacterial strains and growth conditions

The *B. thuringiensis* strain 407 Cry$^-$ (hereafter referred to as *Bacillus* strain 407) is an acrystalliferous strain cured of its *cry* plasmid (Lereclus *et al*., 1989). This strain shows high phylogenic similarity with *B. cereus* (Kolstø *et al*., 2009) and was used throughout this study as a model for the *B. cereus* group. The *B. weihenstepahnensis* KBAB4 strain was from the INRA-Versailles Collection (Lapidus *et al*., 2007). *Escherichia coli* K-12 strains TG1 was used as host for the construction of plasmids and cloning experiments. Plasmid DNA for *Bacillus* electroporation was prepared from the Dam$^-$ Dcm$^-$ *E. coli* strain ET12567 (Stratagene, La Jolla, CA, USA). *E. coli* strains M15 containing the pREP4 plasmid (Amrein *et al*., 1995) was used for protein overproduction. *E. coli* and *B. thuringiensis* cells were transformed by electroporation as described previously (Dower *et al*., 1988; Lereclus *et al*., 1989). *E. coli* strains were grown at 37°C (except for NprR overproduction) in LB. *Bacillus* strains were grown at 30 or 37°C in LB or in HCT, a sporulation-specific medium (Lecadet *et al*., 1980).

The following concentrations of antibiotic were used for bacterial selection: ampicillin 100 μg ml^{-1}, and kanamycin 25 μg ml^{-1} for *E. coli*; kanamycin 200 μg ml^{-1}, tetracycline 10 μg ml^{-1}, spectinomycin 250 μg ml^{-1} and erythromycin 10 μg ml^{-1} for *Bacillus*. Bacteria with the Lac$^+$ phenotype were identified on LB plates containing 100 μg ml^{-1} Xgal. The *xylA* promoter in *Bacillus* was induced by adding xylose (20 mM final concentration) to the culture medium.

DNA manipulations

Chromosomal DNA was extracted from *Bacillus* cells using the Puregene DNA Purification Kit (Gentra Systems, USA). Plasmid DNA was extracted from *E. coli* by a standard alkaline lysis procedure using QIAprep spin columns (QIAgen, France). Restriction enzymes and T4 DNA ligase (New England Biolabs, USA) were used in accordance with the manufacturer's recommendations. Oligonucleotide primers (Table S1) were synthesized by Sigma-Proligo (Paris, France). PCRs were performed in an Applied Biosystem 2720 Thermak cycler (Applied Biosystem, USA). Amplified fragments were purified using the QIAquick PCR purification Kit (QIAgen). Digested DNA fragments were separated on 1% agarose gels and extracted from gels using the QIAquick gel extraction Kit (QIAgen). Nucleotide sequences were determined by Beckman Coulter Genomics (Takeley, UK).

Plasmid constructions

To construct pHT1618K, the tetracycline resistance gene between the *Xho*I and *Nhe*I sites of pHT1618 (Lereclus and Arantes, 1992) was replaced with the kanamycin resistance gene (*aphA3*) amplified by PCR with primers KanaF and KanaR from pDG783 (Guérout-Fleury *et al*., 1995). Primers RevpHT1618 and FwdpHT1618 were used to amplify pHT1618. The 1.5 kb fragment containing the *xylR* repressor gene and the promoter of the *xylA* gene from pHT304-18ΩP*xyl* (Slamti and Lereclus, 2002) was inserted between the *Sph*I and *Xba*I sites of pHT1618K to give pHT1618KΩP*xyl*.

The plasmid pRN5101 (Villafane *et al*., 1987) was used for homologous recombination. The low-copy-number plasmid pHT304 (Arantes and Lereclus, 1991) was used for complementation experiment with wild-type *nprR* and *nprR–nprX* genes with their own promoters. Transcriptional fusions for mapping the *nprA* promoter region were constructed in pHT304-18′*lacZ* (Agaisse and Lereclus, 1994). The vector pQE60 (QIAgen, France) was used to overproduce C-terminal His-NprR under the control of a T5 promoter. All the constructed plasmids used in this study are described in Table S2.

Construction of the Bacillus *407 recombinant strains*

The *nprA* gene encoding the neutral protease A of *Bacillus* strain 407 was disrupted by inserting a promoterless *lacZ* gene into the coding sequence. The thermosensitive plasmid pRN5101Ω*nprA*::*lacZ* was used to disrupt the chromosomal wild-type copy of *nprA* by homologous recombination as described previously (Lereclus *et al*., 1992). In the resulting *Bacillus* recombinant strain, the *lacZ* gene was transcribed from the *nprA* promoter; it was designated *Bacillus nprA*′*Z*, and was Lac$^+$ and sensitive to erythromycin.

The major part (1386 bp) of the *nprR–nprX* genes was deleted and replaced by a tetracycline resistance gene. The thermosensitive plasmid pRN5101Ω*nprRX*::*tet* was used to disrupt the chromosomal wild-type copy of *nprR–nprX* in the *Bacillus nprA*′*Z* strain by homologous recombination. The recombinant strain, designated *Bacillus nprA*′*Z* ΔRX, was resistant to tetracycline, sensitive to erythromycin and had a Lac$^-$ phenotype on LB plates containing Xgal.

An internal DNA fragment (500 bp) of the *nprR* gene was deleted and replaced by a tetracycline resistance gene. The thermosensitive plasmid pRN5101Ω*nprR*::*tet* was used to disrupt the chromosomal wild-type copy of *nprR* in the *Bacillus nprA*′*Z* strain by homologous recombination. The recombinant strain, designated *Bacillus nprA*′*Z* ΔR, was resistant to tetracycline, sensitive to erythromycin and had a Lac$^-$ phenotype on LB plates containing Xgal.

Bacillus 407 *spo0A*::*kan* mutant strain was previously described (Lereclus *et al*., 1995) and *Bacillus* 407 *sigH*::*spc* mutant strain was constructed by homologous recombination (T. Dubois, unpubl. data).

Use of synthetic peptides

Several NprX peptides were synthesized, purified by HPLC and identified by mass spectrophotometry by Covalab (France) with a degree of purity superior to 99% and their effect on *nprA* expression was tested. For this purpose, cells were cultured at 37°C in HCT medium until t1 (tn indicates the number of hours after the onset of stationary phase). The culture was then divided into several aliquots and each synthetic peptide was added to one aliquot at a final concentration of 5 μM. Incubation was resumed and β-galactosidase activity assayed for each aliquot at t4.

β-Galactosidase assays

For the determination of β-galactosidase activity, cells from 2 ml of growing culture were harvested and resuspended in 0.5 ml of Z buffer (0.06 M Na_2HPO_4, 0.04 M NaH_2PO_4, 0.01 M KCl, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM dithiothreitol). The cells were disrupted with glass beads (212 to 300 μm; Sigma) in a FastPrep 24 (MP Biomedical), and cell extract was obtained after centrifugation. Subsequently, 0.7 ml of Z buffer and 200 μl of 4 mg ml^{-1} 2-nitrophenyl-β-D-galactoside (Sigma) were added to 100 μl of this cell extract. The mixture was incubated at room temperature and the reaction was stopped by the addition of 0.5 ml of 1 M Na_2CO_3. The optical density of the reaction mixture was then measured at 420 nm. The protein content was determined using the Bio-Rad protein assay with bovine serum albumin as the standard. Specific activities are expressed in units of β-galactosidase per milligram of protein (Miller units). Each assay was independently repeated at least three times and a representative graph was shown for each experiment.

Overproduction and purification of NprR

His_6-tagged recombinant protein NprR was produced from *E. coli* strains M15 [pREP4, pQE60Ω*nprR*] grown in LB

medium containing 100 μg ml^{-1} ampicilin at 30°C. At mid-exponential growth phase (OD_{600} 0.6), IPTG was added (1 mM) and incubation continued at 30°C for 4 h. The cells were then harvested by centrifugation at 5000 r.p.m., for 20 min at 4°C. The cell pellet was resuspended in lysis buffer (25 mM Tris-HCl pH 8, 300 mM NaCl and 20 mM imidazol). A commercial mixture of protease inhibitors (Sigma) was added to the suspension, which was then sonicated, and the cell lysate was centrifuged at 15000 *g* for 30 min at 4°C. The supernatant was filtered (0.2 μm) and loaded onto a Ni^{2+}-NTA column equilibrated with lysis buffer. After extensive washing with lysis buffer, the His_6-tagged protein was eluted with 300 mM imidazol in lysis buffer. The eluat was filtered (0.2 μm) and injected onto a size exclusion column (Superdex S200 26–60) equilibrated in 20 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM NaCl. The purification was performed at 8°C on an HPLC ÄKTA Purifier (GE Pharmacia). The purified His_6-tagged protein was concentrated by ultrafiltration (Vivaspin 30 kDa) and stored at –20°C.

Microcalorimetry

Isothermal titration calorimetry experiments were performed at 20°C with an ITC200 isothermal titration calorimeter (Microcal®). To test for the interaction between NprR and NprX, the X7 synthetic peptide was resuspended at 10 mM in the protein storage buffer. The protein concentration in the microcalorimeter cell was set at 50 μM. A total of 37 injections of 1 μl of X7 at 500 μM were made at intervals of 180 s while stirring at 1000 r.p.m. To test for the interaction between DNA and NprR–NprX, various DNA probes were prepared. Oligonucleotides (MWG) were resuspended at 200 μM in the protein storage buffer. The two complementary strands were mixed at equimolar concentrations and hybridized by heating at 90°C for 10 min and slow cooling at room temperature for 1 h. The DNA concentration in the microcalorimeter cell was set at 30 μM. A total of 20 additions of 2 μl of NprR–NprX solutions at 330 μM were made by injection at intervals of 180 s while stirring at 1000 r.p.m.

The data were integrated to generate curves in which the areas under the injection peaks were plotted against the ration of injected sample to cell content. Analysis of the data was performed using MicroCal Origin provided by the manufacturer according to the one-binding-site model. Changes in the free energy and entropy upon binding were calculated from determined equilibrium parameters using the equation:

$$-RT\ln(Ka) = \Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

where R is the universal gas constant (1.9872 cal mol^{-1} K^{-1}), T is the temperature in Kelvin degrees, Ka is the association constant, ΔG is the change in Gibbs free energy, ΔH is the change in enthalpy and ΔS is the change in entropy.

The binding constant of each interaction is expressed as 1/Ka = Kd (in mol l^{-1}) for more clarity.

RNA extraction and primer extension

Bacillus strain 407 wild type was grown with shaking in HCT at 37°C until t3. RNA extraction and primer extension were performed as described previously (Agaisse and Lereclus, 1996). To detect the transcription start site of the *nprA* gene, primer extension was performed using the oligonucleotide NprAS2 (Table S1) complementary to the 5′ end of the *nprA* gene.

Acknowledgements

The authors thank Patrick Stragier, Arnaud Chastanet, Leyla Slamti and Emilie Verplaetse for the critical reading of the manuscript and for helpful discussions. We also thank Laurent Bouillaut and Michel Desmadril for helpful discussions and Nathalie Gilois for the proteomic experiment in HCT medium presented in Fig. S1. The authors thank the reviewers for their valuable comments. We are grateful to Gilles Vergnaud and the Délégation Générale de l'Armement for providing a PhD grant to T. Dubois. This work was supported by the french Agence Nationale de la Recherche (Cell. com project; N°ANR-09-Blan-0253).

References

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

Agaisse, H., and Lereclus, D. (1996) STAB-SD: a Shine-Dalgarno sequence in the 5′ untranslated region is a determinant of mRNA stability. *Mol Microbiol* **20:** 633–643.

Agaisse, H., Gominet, M., Økstad, O.A., Kolstø, A.B., and Lereclus, D. (1999) PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* **32:** 1043–1053.

Amrein, K.E., Takacs, B., Stieger, M., Molnos, J., Flint, N.A., and Burn, P. (1995) Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL. *Proc Natl Acad Sci USA* **92:** 1048–1052.

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

Bae, T., Kozlowicz, B.K., and Dunny, G.M. (2004) Characterization of cis-acting prgQ mutants: evidence for two distinct repression mechanisms by Qa RNA and PrgX protein in pheromone-inducible enterococcal plasmid pCF10. *Mol Microbiol* **51:** 271–281.

Bouillaut, L., Perchat, S., Arold, S.T., Zorrilla, S., Slamti, L., Henry, C., *et al*. (2008) Molecular basis for group-specific activation of the virulence regulator PlcR by PapR heptapeptides. *Nucleic Acids Res* **36:** 3791–3801.

Chitlaru, T., Gat, O., Gozlan, Y., Ariel, N., and Shafferman, A. (2006) Differential proteomic analysis of the *Bacillus anthracis* secretome: distinct plasmid and chromosome CO2-dependent cross talk mechanisms modulate extracellular proteolytic activities. *J Bacteriol* **188:** 3551–3571.

Chung, M.C., Popova, T.G., Millis, B.A., Mukherjee, D.V., Zhou, W., Liotta, L.A., *et al*. (2006) Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. *J Biol Chem* **281:** 31408–31418.

Core, L., and Perego, M. (2003) TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding

for competence development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49:** 1509–1522.
Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F., *et al*. (2007) Structure of PlcR: insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram(+) bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **104:** 18490–18495.
Donovan, W.P., Tan, Y., and Slaney, A.C. (1997) Cloning of the *nprA* gene for neutral protease A of Bacillus thuringiensis and effect of in vivo deletion of *nprA* on insecticidal crystal protein. *Appl Environ Microbiol* **63:** 2311–2317.
Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16:** 6127–6145.
Gohar, M., Økstad, O.A., Gilois, N., Sanchis, V., Kolstø, A.-B., and Lereclus, D. (2002) Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* **2:** 784–791.
Gohar, M., Gilois, N., Graveline, R., Garreau, C., Sanchis, V., and Lereclus, D. (2005) A comparative study of *Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics* **5:** 3696–3711.
Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Økstad, O.A., Gominet, M., *et al*. (2008) The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* **3:** e2793.
Gominet, M., Slamti, L., Gilois, N., Rose, M., and Lereclus, D. (2001) Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* PlcR regulon and for virulence. *Mol Microbiol* **40:** 963–975.
Guérout-Fleury, A.M., Shazand, K., Frandsen, N., and Stragier, P. (1995) Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167:** 335–336.
Helgason, E., Tourasse, N.J., Meisal, R., Caugant, D.A., and Kolstø, A.B. (2004) Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl Environ Microbiol* **70:** 191–201.
Hilbert, D.W., and Piggot, P.J. (2004) Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol Mol Biol Rev* **68:** 234–262.
Hill, K.K., Ticknor, L.O., Okinaka, R.T., Asay, M., Blair, H., Bliss, K.A., *et al*. (2004) Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis, Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl Environ Microbiol* **70:** 1068–1080.
Hoch, J.A. (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3:** 165–170.
Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., *et al*. (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423:** 87–91.
Jiang, M., Grau, R., and Perego, M. (2000) Differential processing of propeptide inhibitors of Rap phosphatases in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182:** 303–310.
Ko, K.S., Kim, J.W., Kim, J.M., Kim, W., Chung, S.I., Kim, I.J., *et al*. (2004) Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene. *Infect Immun* **72:** 5253–5261.
Kolstø, A.B., Tourasse, N.J., and Økstad, O.A. (2009) What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? *Annu Rev Microbiol* **63:** 451–476.
Lamb, J.R., Tugendreich, S., and Hieter, P. (1995) Tetratrico peptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends Biochem Sci* **20:** 257–259.
Lanigan-Gerdes, S., Dooley, A.N., Faull, K.F., and Lazazzera, B.A. (2007) Identification of subtilisin, Epr and Vpr as enzymes that produce CSF, an extracellular signalling peptide of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **65:** 1321–1333.
Lapidus, A., Goltsman, E., Auger, S., Galleron, N., Segurens, B., Dossat, C., *et al*. (2007) Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chem Biol Interact* **171:** 236–249.
Lazazzera, B.A., and Grossman, A.D. (1998) The ins and outs of peptide signaling. *Trends Microbiol* **6:** 288–294.
Lecadet, M.M., Blondel, M.O., and Ribier, J. (1980) Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715, using bacteriophage CP54 Ber. *J Gen Microbiol* **121:** 203–212.
Leonard, B.A., Podbielski, A., Hedberg, P.J., and Dunny, G.M. (1996) *Enterococcus faecalis* pheromone binding protein, PrgZ, recruits a chromosomal oligopeptide permease system to import sex pheromone cCF10 for induction of conjugation. *Proc Natl Acad Sci USA* **93:** 260–264.
Lereclus, D., and Arantes, O. (1992) *spbA* locus ensures the segregational stability of pHT1030, a novel type of Gram-positive replicon. *Mol Microbiol* **7:** 35–46.
Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J., and Lecadet, M.-M. (1989) Transformation and expression of a cloned ∂-endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol Lett* **60:** 211–218.
Lereclus, D., Vallade, M., Chaufaux, J., Arantes, O., and Rambaud, S. (1992) Expansion of insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by in vivo genetic recombination. *Biotechnology (N Y)* **10:** 418–421.
Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., and Chaufaux, J. (1995) Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis spo0A* mutant. *Biotechnology (N Y)* **13:** 67–71.
Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamitou, S., and Gominet, M. (2000) Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int J Med Microbiol* **290:** 295–299.
Lövgren, A., Zhang, M., Engström, A., Dalhammar, G., and Landén, R. (1990) Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. *Mol Microbiol* **4:** 2137–2146.
Mignot, T., Mock, M., Robichon, D., Landier, A., Lereclus, D., and Fouet, A. (2001) The incompatibility between the PlcR- and AtxA-controlled regulons may have selected a nonsense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* **42:** 1189–1198.
Moran, C.P. (1993) RNA polymerase and transcription factors. In Bacillus subtilis *and Other Gram-Positive Bacteria*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R. (eds). Washington D.C.: American Society for Microbiology, pp. 653–667.
Perego, M., and Brannigan, J.A. (2001) Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides* **22:** 1541–1547.

Perego, M., and Hoch, J.A. (1996) Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93:** 1549–1553.

Perego, M., and Hoch, J.A. (2002) Two component systems, phosphorelays, and regulation of their activities by phosphatases. In Bacillus subtilis *and Its Closest Relatives*. Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R. (eds). Washington, DC: ASM Press, pp. 473–481.

Pottathil, M., and Lazazzera, B.A. (2003) The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front Biosci* **8:** 32–45.

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

Raymond, B., Johnston, P.R., Nielsen-LeRoux, C., Lereclus, D., and Crickmore, N. (2010) *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol* **18:** 189–194.

Rhodius, V.A., and Busby, S.J. (1998) Positive activation of gene expression. *Curr Opin Microbiol* **1:** 152–159.

Rocha-Estrada, J., Aceves-Diez, A.E., Guarneros, G., and de la Torre, M. (2010) The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **87:** 913–923.

Shi, K., Brown, C.K., Gu, Z.Y., Kozlowicz, B.K., Dunny, G.M., Ohlendorf, D.H., *et al*. (2005) Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgX/pheromone complexes and regulation of conjugation in *Enterococcus faecalis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **102:** 18596–18601.

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

Slamti, L., and Lereclus, D. (2005) Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol* **187:** 1182–1187.

Solomon, J.M., Lazazzera, B.A., and Grossman, A.D. (1996) Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **10:** 2014–2024.

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

Stephenson, S., Mueller, C., Jiang, M., and Perego, M. (2003) Molecular analysis of Phr peptide processing in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185:** 4861–4871.

Villafane, R., Bechhofer, D.H., Narayanan, C.S., and Dubnau, D. (1987) Replication control genes of plasmid pE194. *J Bacteriol* **169:** 4822–4829.

Waters, C.M., and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21:** 319–346.

Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J., and Lin, L. (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* **179:** 131–137.

Yang, H., Sikavi, C., Tran, K., McGillivray, S.M., Nizet, V., Yung, M., *et al*. (2011) Papillation in *Bacillus anthracis* colonies: a tool for finding new mutators. *Mol Microbiol* **79:** 1276–1293.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Chapitre II - Régulation par NprR

Article 2: "NprR is a master regulator of the life cycle in *Bacillus thuringiensis*"

Le rôle physiologique des régulateurs Rap, PlcR et PrgX est relativement bien décrit : les protéines Rap régulent l'entrée en sporulation chez *B. subtilis* et les bactéries du groupe *B. cereus* (cf Chapitre II § 1.1), PlcR régule la transcription des gènes de virulence chez *B. cereus* et *B. thuringiensis* (cf Chapitre II § 1.2) et PrgX régule la transcription de gènes impliqués dans le transfert conjugatif de plasmides chez *E. faecalis* (cf Chapitre II § 1.3). Au sein de la famille RNPP, NprR est donc le seul régulateur dont le rôle physiologique reste inconnu. Dans cette étude, nous avons cherché à déterminer la fonction de ce régulateur au cours de l'infection chez l'insecte.

Afin de déterminer si NprR est impliqué dans la virulence de *B. thuringiensis*, nous avons réalisé des expériences de DL50 avec la souche sauvage et la souche ΔRX dans l'insecte modèle *Galleria mellonella* (**Table S1**). Les DL50 obtenues sont similaires indiquant que NprR, et par conséquent NprA, ne sont pas impliqués dans la virulence de *Bt*. Nous avons ensuite suivi l'expression du gène *nprA* in vivo. Pour cela, nous avons injecté la souche 407 portant le plasmide pHT*nprA'*-*lacZ* (fusion entre le promoteur de *nprA* et le gène *lacZ*) dans des larves de *G. mellonella*. Nous avons ensuite suivi la croissance de cette souche et mesuré l'expression de la β-galactosidase pendant 96 h (**Fig1** et **FigS1**). L'expression de *nprA* est maximale à 48 h puis diminue progressivement jusqu'à 96 h post-infection. De plus, cette expression intervient après la mort de l'hôte. Ce résultat suggère que NprR a un rôle tardif dans le processus infectieux. Pour mieux comprendre le rôle de NprR pendant cette phase de l'infection, nous avons injecté les souches 407 et 407 ΔRX dans des larves d'insectes et nous avons suivi le développement de ces souches pendant 96 h (**Fig2 A**). La population des deux souches augmente pendant les 24 premières heures de l'infection pour atteindre environ 10^8 UFC/ml. En revanche, de 24 h à 96 h, la population de la souche sauvage reste stable alors que celle du mutant diminue de façon drastique pour atteindre environ 10^2 UFC/ml à 96 h. La complémentation du mutant ΔRX par un plasmide portant une copie fonctionnelle des gènes *nprR* et *nprA* restaure un phénotype sauvage. Ces résultats montrent que NprR est nécessaire à la survie des bactéries dans l'insecte mort.

Le gène *nprA* étant alors le seul gène connu sous le contrôle de NprR, nous avons cherché à savoir si ce gène est nécessaire à la survie des bactéries. Comme la souche sauvage, le mutant du gène *nprA* est capable de survivre après la mort de l'insecte (**Fig 2A**). Ce résultat indique, d'une part, que NprA n'est pas nécessaire à la survie des bactéries après la mort de l'hôte et, d'autre part, que NprR régule un ou plusieurs autres gènes qui interviennent dans le processus de survie. Une analyse transcriptomique nous a permis d'établir une liste de 41 gènes contrôlés, directement ou indirectement, par NprR (**Table S1**). Ces gènes candidats ont été validés par qRT-PCR et en utilisant des fusions *lacZ* (**Table S1** et **Fig S1**). Ces gènes codent pour des protéines qui se répartissent en quatre groupes fonctionnels : des enzymes dégradatives, un système d'oligopeptide perméase, des protéines de résistance au stress et un système de synthèse de peptide non ribosomal (Non-Ribosomal Peptide Synthesis ou NRPS). Nous avons montré que, *in vitro*, les enzymes dégradatives dépendantes de NprR ont un rôle majeur dans la dégradation de substrats tels que la caséine, la chitine et le Tween 80 (**Fig 3A**) et qu'elles sont produites spécifiquement après la mort de l'hôte (**Fig 3B**). L'ensemble de ces données suggèrent que NprR permet à *Bt* d'adopter un mode de vie nécrotrophe dans les cadavres d'insectes.

Afin d'identifier un facteur de survie dépendant de NprR nous avons réalisé des expériences de co-infections avec les souches 407 et 407 ΔRX (**Fig 4A** et **Fig 4B**). Les résultats de ces expériences suggèrent que le facteur de survie est sécrété. Le peptide synthétisé par le système NRPS est un facteur sécrété dont la synthèse est dépendante de NprR. Un mutant des gènes codant pour ce système (Δ*srfABC*) ne survit pas dans le cadavre d'insecte et l'expression constitutive des gènes *srfABC* dans la souche 407 ΔRX restaure la survie des bactéries (**Fig 5**). Ces résultats indiquent que le peptide synthétisé de manière non ribosomale est essentiel à la survie de *Bt* lorsqu'il adopte un mode de vie nécrotrophe. Des analyses par MALDI-Tof ont permis d'identifier cette molécule comme étant un lipopeptide nommé kurstakine (**Fig S3**). Nous avons montré que la kurstakine est impliquée dans le swarming et la formation des biofilms et des résultats suggèrent que cette molécule participe à ces processus en formant des pores dans les membranes de *Bt* (**Fig 6**).