



HAL
open science

Mécanismes d'acquisition du fer de l'hôte chez *Bacillus cereus*: rôle du couple bacillibactine-FeuA et expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer in vivo durant l'infection intestinale chez l'insecte.

Laurent Consentino

► To cite this version:

Laurent Consentino. Mécanismes d'acquisition du fer de l'hôte chez *Bacillus cereus*: rôle du couple bacillibactine-FeuA et expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer in vivo durant l'infection intestinale chez l'insecte.. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT: 2019SACLA018 . tel-02305543

HAL Id: tel-02305543

<https://theses.hal.science/tel-02305543>

Submitted on 4 Oct 2019

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.

Mécanismes d'acquisition du fer de l'hôte chez *Bacillus cereus* : rôle du couple bacillibactine-FeuA et expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer *in vivo* durant l'infection intestinale chez l'insecte.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à AgroParisTech (Institut des sciences et
industries du vivant et de l'environnement)

École doctorale n°581
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le 28 juin 2019

Par Laurent Consentino

Composition du Jury :

Mme Claire Janoir-Jouveshomme Professeur, Université Paris-Sud (UMR EA 4043-MICALIS)	Présidente
M Gaël Nicolas CR1, INSERM (UMR 1149 Université Paris Diderot)	Rapporteur
M Benjamin Ezraty CRCN, CNRS (FR 3479 Université Aix Marseille)	Rapporteur
M Jean-Michel Camadro DR1, CNRS (UMR 7592 Université Paris Diderot)	Examineur
Mme Christina Nielsen-LeRoux DR2, INRA (UMR 1319 MICALIS-AgroParisTech)	Directrice de thèse

Remerciements

Débuter une thèse, c'est commencer un long voyage initiatique.

A travers la Science, celle de la vie. Nous débutons, pensant notre sujet vaste comme le monde. Puis nous l'achevons, observant qu'il ne s'agissait là que d'une comète dans l'immensité de l'univers scientifique. Il suffit pourtant de lever les yeux au ciel au bon moment pour l'apercevoir, et se convaincre qu'aussi fugace soit-elle dans l'espace-temps de la Science, elle existe. Oui, je tiens là ma poussière d'étoiles entre mes mains.

A travers le monde de la Science. Nous construisons, explorons, essayons, apprenons, écoutons, échouons, recommandons, adaptons, mangeons, réussissons, discutons, voyageons, débattons, échangeons, aidons, réfléchissons, buvons, mangeons de nouveau, rions, confrontons, nous réconcilions, mangeons plus encore, corrigeons, et au final, nous publions. Et tout cela n'est rendu possible que par le travail de toute une équipe, tout un laboratoire, mais également des personnes que nous côtoyons de près ou de loin, au gré des colloques, congrès, séminaires, sorties, pauses café ou simples errances dans les couloirs.

A travers soi. Je ne sais dire l'homme que j'étais en commençant. Le temps d'une thèse nous fait entrer dans une 4^{ème} dimension, courbe et tord les minutes en les transformant en heures, et où une année semble parfois tenir en 24h. J'y ai appris mon métier, ma passion, mais j'ai aussi pu apprendre ce que sont la patience et la résilience. Et par-dessus tout, connaître l'homme que je suis, au-delà du scientifique.

Je commence donc par remercier en tout premier lieu Christina. Je te remercie de m'avoir laissé ma chance, et de m'avoir permis d'en être là aujourd'hui. Tu auras été bien plus qu'une directrice de thèse, nous avons partagé bien des choses. Mais par ces quelques lignes, tu sais désormais que tu as ma reconnaissance éternelle et toute mon admiration pour tes qualités humaines et scientifiques.

Je dois ensuite dire un énorme merci à mon homeboy, Nicolas. De (très) longues journées passées à découper de la chenille dans 10 m², heureusement qu'on avait les casseurs flowters, OSS 117 (tu me dois une photo de René Coty...) et DJ Chelou pour nous évader un peu l'esprit. Mais lâche tes drones mec et vient prendre un peu l'air, il est temps de se boire un verre (au moins...) pour fêter ça...

Je poursuis en remerciant mes deux compères Sandrine et Stéphanie (les dames en premier, tu remarqueras de nouveau l'élégance Sandrine...). Merci pour

vosre aide, vos conseils et vos enseignements qui m'auront fait beaucoup progresser scientifiquement. Mais merci également pour votre soutien, votre gentillesse, nos pauses café, les matchs de rugby, les repas, et j'en passe... J'ai trouvé deux amis formidables.

Merci à toi Agnès, pour ton professionnalisme, pragmatique et apaisant. Echanger sur nos enfants respectifs aussi, tes qualités humaines sont indéniables. Et vive le plastique chez la chenille...

Merci à Claudia et Patrice. Aller sur la plateforme c'était comme travailler en famille, et votre gentillesse n'a d'égal que vos compétences scientifiques.

Merci à toute l'équipe GME pour son accueil. A Didier de m'avoir permis d'y travailler et de voyager. A Christophe pour son aide dans mon travail et nos échanges divers et variés. A Ludovic pour sa disponibilité et sa douceur, ton aide est précieuse tu peux être fier pour ton diplôme, tu le mérites. A Michel pour ses conseils et nos discussions animés sur des sujets tellement divers que j'en perds le compte. A Nathalie pour son côté premier degré tellement amusant à titiller... A Vincent, Samia, Emilie, Leyla, Isabelle, Eugénie et tous ceux qui en font ou ont fait partie de l'équipe GME.

Merci à Elise et Sébastien, qui m'ont accueilli et guidé. Mes premiers pas au laboratoire ont été grandement facilités par votre présence, et je vous espère heureux, toi au Canada Elise, et toi dans tes montagnes Sébastien.

Merci aux autres doctorants, Racha, Zaynoun, Nay (notre labo serait-il un refuge de libanais... ?) Fernanda, Priscilla (ou du Brésil... ?), Benjamin, Gérard, Laëtitia, Mounia, Vincent. C'est bon de pouvoir parfois s'épancher, rire et se serrer les coudes tous ensemble.

Merci aux membres de la Society for Invertebrate Pathology. J'ai pu grâce à vous échanger et présenter mes travaux, et même y être récompensé. J'ai pu voyager en Australie et découvrir la Gold Coast et le Queensland. Thank you Fuping, Shuyuan, Eustachio, Monique, Marianne, Neil, Mark, Juan and all the SIP members.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Jean-Michel Camadro, Shaynoor Dramsi, Thierry Franza et Thomas Lefebvre pour leur conseils avisés et leur soutien.

Merci aux membres de mon jury de thèse, Claire Janoir-Jouveshomme, Gaël Nicolas, Benjamin Ezraty et Jean-Michel Camadro d'avoir accepté d'évaluer mon travail et me donner l'opportunité de soutenir ma thèse.

Merci également à Alexandre, Irina, et toute l'équipe pédagogique de l'école doctorale ABIÉS, pour votre aide et votre accompagnement tout au long de mon parcours de thèse.

Merci à l'INRA et à l'institut MICALIS pour son accueil et la vie scientifique animée. Merci à Stéphane, Pascale, Francis, Françoise, Alexandra, Delphine, Elise, Nathalie.

Enfin, pour terminer, quelques mots pour les personnes que j'aime profondément et qui me le rendent bien, même bien plus que je ne peux l'imaginer.

Merci à vous deux, maman et papa, pour votre soutien indéfectible et votre amour sans limite. Peu importe les différends, le passé, merci de m'avoir aidé et me permettre d'en être où j'en suis actuellement. Je ne pourrai jamais vous exprimer à sa juste mesure la gratitude que j'éprouve envers vous. Mais s'il vous venait à douter, référez-vous à ces quelques lignes qui resteront. Je vous aime.

Merci à Florence de m'avoir permis d'en arriver là où j'en suis aujourd'hui, et de m'avoir offert le plus beau des cadeaux qui m'ait été fait. Et oui mon petit poussin, c'est bien de toi dont je parle... Quand j'écris ces quelques lignes, tu es chez la nounou à t'amuser avec tes copains. Tu ne garderas pas de souvenirs de ces moments où papa rédigeais sa thèse et la soutenais. Mais je veux que tu saches que tout ça je le fais pour toi et t'offrir un avenir meilleur. Que te voir me sourire lorsque je suis épuisé ou agacé constitue un remède miraculeux à n'importe lequel de mes maux. Que je suis fier, très fier du petit garçon que tu es. Ton côté observateur, aimant, calme, profondément gentil, sensible. Tu es beau comme un Apollon, mon petit Delio. J'ai découvert grâce à toi ce qu'est un amour inconditionnel, différent de tout ce que j'ai pu connaître auparavant. Je te souhaite le meilleur, et je serai toujours à tes côtés pour t'aider à avancer, pour te rassurer, et pour te donner confiance. Et si tu viens à en douter un jour, si jamais je faillis par moment, j'espère que tu pourras relire ces quelques lignes et que tu pourras y trouver du réconfort et tout mon amour. A tout à l'heure mon petit garçon, je pars te chercher...

*« Pour mon fils. »
Ton papa qui t'aime.*

PREAMBULE

Les travaux de cette thèse ont été effectués au sein de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), à l'institut MICALIS, équipe Génétique Microbienne et Environnement (GME) à Jouy-en-Josas. Une partie des travaux a également été réalisée sur la plateforme @BRIDGe à l'INRA de Jouy-en-Josas.

Mon projet doctoral a été financé par une bourse ministérielle de 3 ans délivrée par l'école doctorale Agriculture, alimentation, biologie, environnement, santé (ABIES, AgroParisTech, Université Paris-Saclay).

Table des matières

Liste des Figures	3
Liste des Abréviations	6
1. Introduction	9
Chapitre 1 : Le groupe <i>Bacillus cereus</i>	10
1/ Généralités.....	10
2/ Génétique et phylogénie du groupe <i>Bacillus cereus</i> : une classification débattue et en évolution (Figure 2).....	13
3/ Ecologie et environnement.....	16
4/ Les facteurs de virulence	18
4.1/ Pathogénicité spécifique chez <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> et <i>B. anthracis</i>	18
4.2/ Les facteurs de virulence communs du groupe <i>Bacillus cereus</i>	22
4.3/ Régulation de l'expression des facteurs de virulences	24
Chapitre 2 : Le fer	26
1/ Caractéristiques générales et rôle du fer chez les organismes	26
2/ Séquestration du fer : les différentes protéines de transport et stockage	27
2.1/ Hème et protéines à hème	27
2.2/ La ferritine	29
2.3/ La transferrine et la lactoferrine	32
3/ Le fer chez les insectes.....	32
3.1/ Comparaison des sources de fer entre les insectes et les Mammifères	33
3.2/ <i>Galleria mellonella</i> : un bon modèle d'étude d'infection	34
4/ Homéostasie du fer chez l'hôte	36
5/ Acquisition du fer chez les bactéries.....	38
5.1/ Mécanismes d'acquisitions du fer chez les bactéries Gram-négatives	38
5.2/ Mécanismes d'acquisitions du fer chez les bactéries Gram-positives	46
5.3/ Régulation de l'homéostasie du fer chez les bactéries	63
2. Objectifs de la thèse	66
1/ Synthèse de la problématique	66
2/ Projet de thèse :	67
3/ Approches expérimentales :	68
3.1/ Rôle de FeuA dans la croissance et la virulence de <i>B. cereus</i>	68
3.2/ Analyse de l'expression des gènes liés à l'homéostasie du fer chez <i>B. cereus</i> au cours de l'infection par voie orale chez l'insecte modèle <i>G. mellonella</i>	69
3. Résultats.....	74

Article 1 : Impacts of the siderophore bacillibactin and its siderophore binding protein FeuA on <i>Bacillus cereus</i> iron acquisition and virulence.....	75
Article 2: Laser capture microdissection is an efficient tool to study <i>Bacillus cereus</i> iron homeostasis gene expression during <i>in vivo</i> gut colonization	98
4. Résultats complémentaires	122
5. Discussion et Perspectives	134
6. Bibliographie	152

Liste des Figures

Figure 1: <i>Bacillus thuringiensis</i> et <i>Bacillus cereus</i>	12
Figure 2 : Relation phylogénétique entre 3193 isolats du groupe <i>Bacillus cereus</i> sensu lato basée sur les données de typage MLST et AFLP.....	15
Figure 3: Niche écologique présumée des souches de <i>B. cereus</i> émétiques..	17
Figure 4: A : Activité du promoteur céréulide synthétase (P1) en temps réel dans l'aliment.....	19
Figure 5 : Structure de l'hème et de l'hémoglobine.....	29
Figure 6: Structure des ferritines.....	31
Figure 7: Cycle de vie de l'insecte <i>Galleria melonella</i> (<i>Pyralidae</i> , <i>Lepidoptera</i>)..	35
Figure 8 : Comparaison du métabolisme du fer chez les mammifères (Mammals) et la drosophile (Fruit fly).....	37
Figure 9: Structure générale de la paroi cellulaire chez les bactéries Gram-négatives et Gram-positives.....	39
Figure 10: Systèmes d'acquisition du fer représentatifs chez les bactéries Gram-négatives.....	39
Figure 11: Structures des sidérophores..	45
Figure 12: Modèle représentant le système Isd (iron-regulated surface-determinant) chez <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Figure 13: Structure globale du domaine NEAT de IsdA de <i>Staphylococcus aureus</i>	49
Figure 14: Organisation des domaines protéiques NEAT de IsdH et IsdB chez <i>Staphylococcus aureus</i> et IsdX1 et IsdX2 chez <i>Bacillus anthracis</i>	50
Figure 15 : Interaction entre le domaine NEAT 1 d'IsdH de <i>Staphylococcus aureus</i> avec la chaîne alpha de l'hémoglobine humaine.....	51
Figure 16: Acquisition de l'hème chez <i>Bacillus anthracis</i> par les domaines NEAT des hémophores sécrétés IsdX1 et IsdX2 (respectivement 1 et 5 domaines NEAT), extrayant l'hème de l'hémoglobine, avec IsdX1 capable de transférer l'hème à IsdX2 et à la protéine IsdC ancrée au peptidoglycane.....	53
Figure 17: Représentation schématique de la protéine IIsA.....	54
Figure 18: Représentation schématique du locus <i>isd</i> chez <i>B. cereus</i>	55

Figure 19: Représentation schématique de l'interaction entre IIsA et IsdC pour l'acquisition du fer de l'hème chez <i>B. cereus</i>.	56
Figure 20: Comparaison de la sécrétion dans le milieu extérieur et de l'internalisation des sidérophores chez les bactéries Gram-positives (gauche) et Gram-négatives (droite).	57
Figure 21: Mécanisme d'internalisation possible des holo-sidérophores (Fe-sidérophore) chez les bactéries Gram-positives.	58
Figure 22: Modèle de l'acquisition du fer de la ferritine chez <i>Bacillus cereus</i>.	60
Figure 23: Voie de synthèse de la bacillibactine chez <i>Bacillus anthracis</i>.	60
Figure 24: Modèle proposé chez <i>Bacillus anthracis</i> pour l'import dans la cellule de la pétrobactine.	62
Figure 25: Voie de synthèse de la pétrobactine chez <i>Bacillus anthracis</i>.	62
Figure 26 : Schématisation de l'homéostasie du fer chez les bactéries.	65
Figure 27: Anatomie de la larve de <i>Galleria mellonella</i> et illustration des tests pratiqués par injection de <i>Bacillus cereus</i> intra-hémocœlique et par ingestion forcée.	69
Figure 28: Présentation de la technique de microdissection laser (LCM).	71
Figure 29: Tests de cytotoxicité de différentes souches de <i>B. cereus</i> sur hémocytes de <i>G. mellonella</i>.	123
Figure 30: Effet de la phosphorylation de CodY sur l'activité transcriptionnelle de <i>ilsA</i> chez <i>B. cereus</i> ATCC 14579.	126
Figure 31: Croissance de <i>B. cereus</i> ATCC 14579 en milieu chélaté en fer	127
Figure 32: Activité transcriptionnelle de <i>ilsA</i> chez <i>B. cereus</i> ATCC 14579 WT, $\Delta codY$ et Δfur.	128
Figure 33: Expression différentielle in vitro de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez <i>B. cereus</i> ATCC 14579.	130
Figure 34 : Expression différentielle de gènes impliqués dans la réponse de <i>G. mellonella</i> à une infection par <i>B. cereus</i> ATCC 14579.	131
Figure 35: Analyse par ddPCR de l'expression d'<i>ilsA</i> au cours de l'infection par <i>B. cereus</i> de l'intestin de <i>G. mellonella</i>.	133
Figure 36: Les différentes étapes critiques du processus de LCM.	144

Figure 37: Facteurs environnementaux influençant la composition et la biogéographie du microbiote..... 145

Figure 38 : Représentation schématique de *Bacillus cereus* ATCC 14579 dans l'intestin moyen de larve de *Galleria mellonella* après infection par voie orale.. 151

Liste des Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARN	Acide ribonucléique
ARN_m	ARN messenger
ARN_t	ARN total
ATP	Adenosine triphosphate
<i>B. cytotoxicus</i>	<i>Bacillus cytotoxicus</i>
<i>B. mycoides</i>	<i>Bacillus mycoides</i>
<i>B. pseudomycoides</i>	<i>Bacillus pseudomycoides</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>B. toyonensis</i>	<i>Bacillus toyonensis</i>
<i>B. weihenstephanensis</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>
BB	Bacillibactine
BFR	Bactéioferritine
BslK	<i>B. anthracis</i> S-layer protein K
<i>C. diphtheriae</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
ClyA	Cytolisine A
Cry	Crystal protein
Cyt	Cytolytic toxin
cyt K	Cytotoxine K
Dcytb	Cytochrome b duodéal
ddPCR	Digital PCR
DHBA	acide 2,3-dihydroxybenzoïque
DIP	2,2'-dipyridyl
DMT1	Divalent metal transporter-1
Dps	DNA-binding proteins from starved cells
DtxR	Diphtheria Toxin regulator
DxtR	Diphtheriae toxin repressor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EF	Œdema Factor
EfeUOB	elemental ferrous iron uptake system
Ent	Entérobactine
ER	Réticulum endoplasmique
Fe²⁺	Fer ferreux
Fe³⁺	Fer ferrique
FeSO₄	Sulfate de fer(II)
Fhu	Ferric hydroxamate uptake

FTN	Ferritine
Fur	Ferric uptake regulator
<i>G. mellonella</i>	<i>Galleria mellonella</i>
GAS	Streptocoques de groupe A
GFP	Green fluorescent protein
H₂O₂	Peroxyde d'oxygène
Hal	Heme-acquisition leucine-rich repeat protein
Hap	Haptoglobine
HasA	Heme Acquisition System
Hb	Hémoglobine
Hbl	Hémolysine BL
HCP1	Heme carrier protein-1
HlyII	Hémolysine II
Hrt	Heme-regulated transporter
HtsABC	Heme ABC type transporter
HxuA	Heme-hemopexine utilization protein
IlsA	Iron surface Iron regulated leucine- rich surface protein
IR	Infra-rouge
IRE	Iron-responsive element
IRP	Iron-regulatory protein
Isd	Iron surface determinant
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
IVET	<i>In Vivo</i> Expression Technology
kb	kilobases
kDa	kiloDalton
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LB	Luria-Bertani broth
LCM	Laser-Capture Microdissection
Lethal Factor	LF
Lf	Lactoferrine
LRR	Leucine-rich repeat
MCO	Multi-copper oxidase
MFS	Major facilitator superfamily
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MLST	Multilocus Sequence Typing
MtsR	Metal transporter of streptococci regulator
NEAT	Near Iron Transporter
Nhe	Non-Hemolytic Enterotoxin
NIS	NRPS-independent synthase
NRPS	Non-ribosomal peptide synthetases
Opp	Oligopeptide Permease
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PA	Protective Antigen
PB	Pétribactine
PC-PLC	Phosphatidylcholine phospholipase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
PI-PLC	Phosphatidylinositol phospholipase
PlcR	Phospholipase C Regulator
RT-qPCR	Reverse Transcriptase - quantitative Polymerase Chain Reaction
<i>S. agalactiae</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enterica</i>	<i>Salmonella enterica</i>
<i>S. pyogenes</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SBP	Siderophore binding protein
SLH	S-layer homology
SM-PLC	Sphingomyélinase
TBDT	TonB-dependent transporter
Tf	Transferrine
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
UV	Ultra-violet
Vip	Vegetative Insecticidal Proteins

1. Introduction

Chapitre 1 : Le groupe *Bacillus cereus*

1/ Généralités

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* (Règne : *Bacteria*, Embranchement : *Firmicutes*, Classe : *Bacilli*, Ordre *Bacillales*, Famille : *Bacillaceae*) est un des genres les plus diversifiés de la classe des *Bacilli*. Il est une sous-division du genre *Bacillus* qui comprend, à l'heure actuelle, huit espèces taxonomiquement très proches formellement reconnues : *B. cereus sensu stricto* (ou *B. cereus*), *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* et récemment *B. toyonensis* (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2016a ; Y. Liu *et al.*, 2015 ; Oren et Garrity, 2014).

Les espèces constituant ce groupe sont à coloration Gram-positive, formant des bâtonnets de 3 µm de long pour 1 µm de large environ, aérobies ou anaérobies facultatives. Elles présentent un génome avec un faible pourcentage en bases GC (environ 35 %), avec un génome de 5.3 à 5.9 Mb. Elles produisent des endospores et peuvent être mobiles grâce à une ciliature péritriche.

B. cereus, *B. thuringiensis* et *B. anthracis* revêtent un intérêt particulier sur le plan industriel et d'un point de vue de santé publique, certaines souches ayant été même caractérisées sur la station spatiale internationale ISS (Venkateswaran *et al.*, 2017), et sont par conséquent les 3 espèces étudiées en profondeur.

- *B. cereus* (Figure 1) est un pathogène opportuniste de l'homme et des animaux, actuellement considéré comme le second agent le plus fréquemment confirmé ou suspecté dans le cas de toxi-infections alimentaires collectives (« Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2016. » 2016), Il occasionne des symptômes de type émétique ou diarrhéique et peut entraîner chez des patients immunodéprimés ou vulnérables des affections plus sévères pouvant être mortelles (Bottone, 2010; Drobniowski, 1993).
- *B. thuringiensis* (Figure 1) est un entomopathogène bien connu. Il ne diffère de *B. cereus sensu stricto* que par sa faculté à former des inclusions parasporales (protéines Cry) qui sont toxiques pour certains invertébrés. Cette caractéristique a suscité un intérêt pour la production de biopesticides qui s'est accéléré depuis le premier clonage d'une protéine Cry en 1981 (Lambert et Peferoen, 1992 ; H. E. Schnepf et Whiteley, 1981), avec de nombreux industriels impliqués (Bravo *et al.*, 2011 ; Sanahuja *et al.*, 2011). En 2016, il était estimé qu'en France, l'utilisation de

biopesticides dérivés de *B. thuringiensis* s'élevait à 7.9 % du total des terres agricoles en Europe de l'ouest, et que ces biopesticides représentent 90 % de la production d'un segment de marché mondial pesant au total 92 milliards de dollars américain (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), 2016b), d'où un intérêt économique important autour de *B. thuringiensis*.

- *B. anthracis* est responsable de la maladie du charbon (anthrax), une zoonose capable d'infecter de nombreux hôtes, en particulier les mammifères et l'Homme. L'apparition de cas récents de fièvre charbonneuse sur plusieurs foyers animaux entraîne un regain d'attention pour ce pathogène de par sa dangerosité pour l'Homme (ANSES, 2017; Le Monde, 2018).
- *Bacillus weihenstephanensis* a été proposée en tant qu'espèce en 1998 (S. Lechner *et al.*, 1998). Certaines souches psychrotolérantes (capacité de croître à basse température) peuvent potentiellement induire des infections d'origines alimentaires, dues à leur capacité à produire la même toxine émétique produite par *Bacillus cereus sensu stricto* (Stenfors Arnesen *et al.*, 2011 ; Guérin *et al.*, 2017).
- *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides* sont deux espèces non pathogènes communément associées aux système racinaire des plantes (Bargabus *et al.*, 2002; Yi *et al.*, 2018). Elles ne se distinguent que par leur composition en acides gras (Oliwa-Stasiak, Kolaj-Robin, et Adley, 2011) et peuvent être utilisées comme agent de biocontrôle (A. Kumar, Prakash, et Johri, 2011).
- *Bacillus cytotoxicus* se caractérise par un chromosome de petite taille en comparaison des autres espèces (4,1 Mb) et possède un gène *cytK-1* codant pour une entérotoxine propre à cette espèce pouvant entraîner des toxi-infection alimentaires collectives (Guinebretiere *et al.*, 2013 ; Lapidus *et al.*, 2008; López *et al.*, 2015).
- *Bacillus toyonensis* représente la dernière espèce reconnue officiellement comme faisant partie du groupe *Bacillus cereus*, et utilisé comme probiotique pour certains animaux (Jiménez *et al.*, 2013).

Dans ce chapitre, nous aborderons l'analyse génétique, phylogénétique et écologique de l'ensemble du groupe *Bacillus cereus*, avant de nous focaliser sur les facteurs de virulence et leur régulation chez les trois principales espèces qui le représentent.

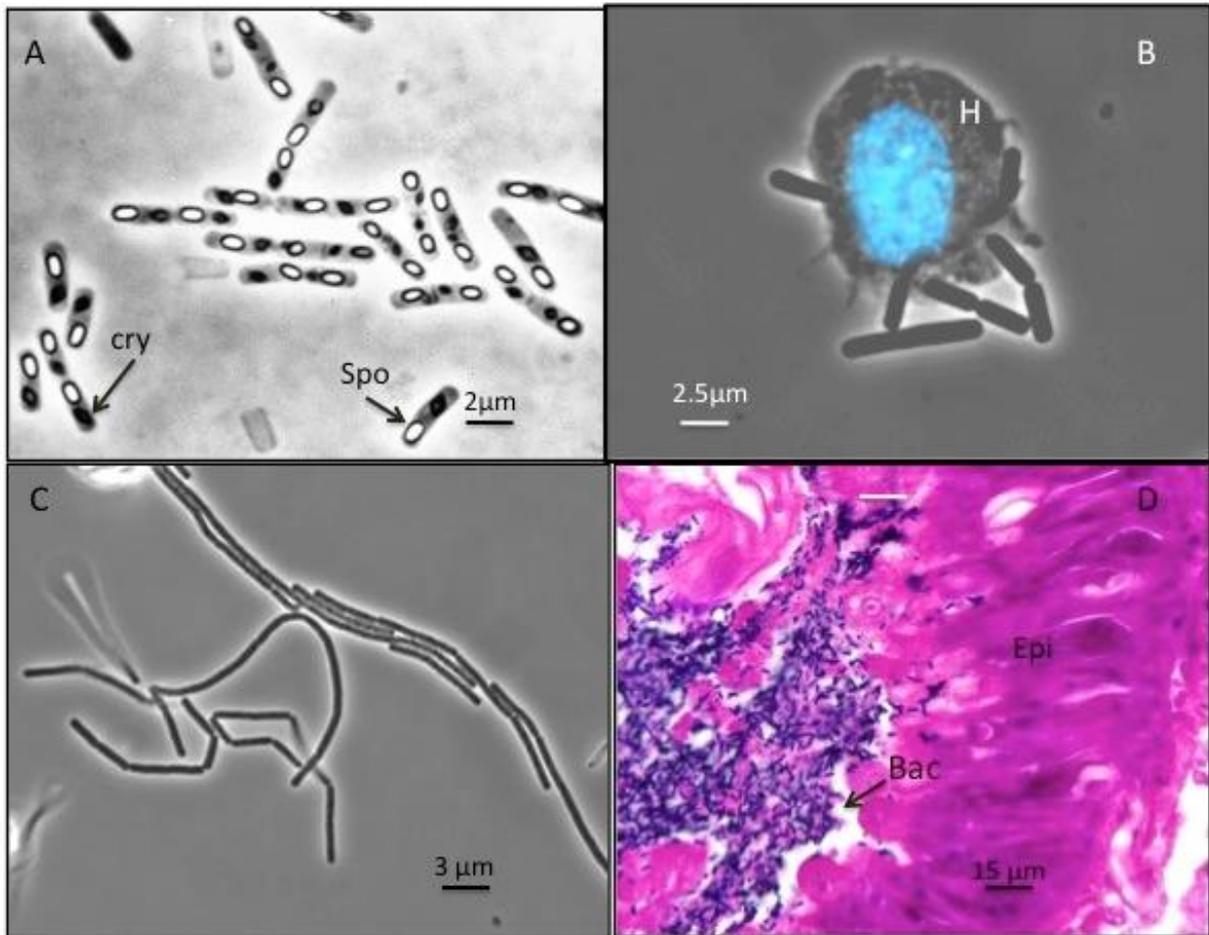


Figure 1: *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus cereus*. Images en microscope de contraste de phase objectifs 100 X (A, B, C) et 40X (D). **(A)** : *B. thuringiensis* phase sporulée avec présence de spores (spo) et cristaux de toxine Cry (cry) dans des cellules non lysées. **(B)** : *B. thuringiensis* en contact avec un hémocytes (H) de larve de l'insecte *Galleria mellonella* ; L'ADN est coloré au DAPI (bleu) sous lumière UV. **(C)** : *B. cereus* ATCC 14579 (souche de cette étude) en phase végétative formant des chainettes. **(D)** : *B. thuringiensis* (Bac) phase végétative en contact avec épithélium de l'intestin moyen du stade larvaire de l'insecte *G. mellonella* (Images, GME, INRA-Micalis (A, B, C) service Histopathologie Institut Pasteur).

2/ Génétique et phylogénie du groupe *Bacillus cereus* : une classification débattue et en évolution (Figure 2).

Les membres du groupe *Bacillus cereus* ont un génome complexe, et la plupart des souches le constituant présentant un nombre de plasmides variables (jusqu'à une dizaine par souche) et en taille (de quelques kb à une centaine de kb), qui peuvent être échangés entre les espèces et recombinaison pour donner un avantage compétitif aux espèces les possédant sur une large variété de niches écologiques (Patiño-Navarrete et Sanchis, 2017 ; Van der Auwera *et al.*, 2007; Siele Ceuppens, Boon, et Uyttendaele 2013). Les gènes responsables du pouvoir pathogène spécifique sont portés par les plasmides. Chez *Bacillus anthracis*, il repose sur la présence de deux plasmides pXO1 et pXO2, codant pour un complexe de trois protéines qui constituent les toxines de l'anthrax et de la capsule (Pena-Gonzalez *et al.*, 2018). *B. thuringiensis* produit des endotoxines liées à l'expression de gènes plasmidiques *cry* lui conférant son pouvoir entomopathogène (Pardo-López, Soberón, et Bravo, 2013). Enfin, les symptômes émétiques provoqués par certaines souches de *B. cereus sensu stricto* sont la conséquence d'une toxine émétique appelée céréulide (Ehling-Schulz, Frenzel, et Gohar, 2015).

Elles ont un unique chromosome avec de nombreuses séquences répétées (Okstad *et al.*, 2004 ; Paul Keim *et al.*, 2009 ; N.J. Tourasse *et al.*, 2006), et peuvent contenir des bactériophages intégrés au chromosome ou se répliquant indépendamment (Gillis et Mahillon, 2014 ; Sozhamannan *et al.*, 2006).

Les espèces composant le groupe *Bacillus cereus* dérivent probablement d'une lignée évolutive commune (Pilo et Frey, 2011 ; Ash et Collins, 1992). Avant de pouvoir différencier les différentes espèces par des techniques de biologie moléculaire, l'analyse reposait sur des critères de sélection tels que l'analyse phénotypique (forme, position de la spore, forme de la colonie), ou encore les caractéristiques biochimiques ou métaboliques (Priest, Goodfellow, et Todd, 1988). Bien qu'encore utilisée pour la détermination et la validation formelle de nouvelles espèces appartenant au groupe *Bacillus cereus*, cette approche phénotypique traditionnelle de classification se trouve supplantée par des techniques d'analyses moléculaires et génétiques modernes. Actuellement, il est admis que deux souches appartiennent à la même espèce si elles présentent 97% d'identité de séquences d'ARN ribosomiaux 16S et 23S et plus de 70% de réassociation lors d'une hybridation ADN/ADN (Vandamme *et al.*, 1996).

Bien que ces techniques mettent en lumière un lien étroit d'un point de vue génomique, d'autres ont été utilisées et parfois combinées afin de discriminer les différentes espèces du groupe *Bacillus cereus*. On note ainsi des études phylogénétiques utilisant : i) le séquençage du génome entier (Ivanova *et al.*, 2003) ; ii) le séquençage d'un certain nombre de gènes de ménage disséminés à travers l'ensemble du chromosome : MLST ou Multilocus Sequence Typing (Y. Liu, Lai, et Shao 2018 ; N.J. Tourasse *et al.*, 2006 ; E. Helgason *et al.*, 2004) ; iii) la mobilité électrophorétique de différentes enzymes métaboliques essentielles : MLEE ou Multilocus Enzyme Electrophoresis (Erlendur Helgason *et al.*, 2000 ; Vilas-Boas *et al.*, 2002) ; iv) la séparation de larges molécules d'ADN sur gel d'électrophorèse avec champ électrique variant périodiquement : Pulsed-field Gel Electrophoresis ou PFGE (X. Liu *et al.*, 2016) ; v) la détection simultanée de polymorphismes génétiques sur différents fragments d'ADN obtenus grâce à l'action d'enzymes de restrictions : Amplified Fragment Length Polymorphism ou AFLP (Ticknor *et al.*, 2001 ; P Keim *et al.*, 1997 ; Hill *et al.*, 2004) ; vi) l'analyse de séquences répétées dans le génome par rep-PCR fingerprinting (Cherif *et al.*, 2003). L'ensemble des résultats obtenus montrent que la proximité phylogénétique des espèces au sein même du groupe *Bacillus cereus* rend difficile la ségrégation entre celles-ci (Nicolas J. Tourasse *et al.*, 2011 ; Sorokin *et al.*, 2006 ; Priest *et al.*, 2004).

De plus, des intérêts sociaux-économiques importants, en particulier concernant les biopesticides, se basant sur la distinction de ces espèces entraînent un débat qui s'élève au-delà de l'intérêt scientifique de la question, lui-même déjà discuté (Rosselló-Mora, 2003). *Bacillus thuringiensis* apparaît suivant les données phylogénétiques comme très proche de *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus sensu stricto*, et ces trois espèces présentent une pathogénicité différente. C'est pourquoi, pour des raisons cliniques ou économiques entraînant de nombreuses discussions (B. Raymond et Federici, 2017) une classification en espèces distinctes a été maintenue. Cependant, d'autres critères reposant sur les niches écologiques propres de ces espèces et leur pouvoir pathogène doivent être pris en compte.

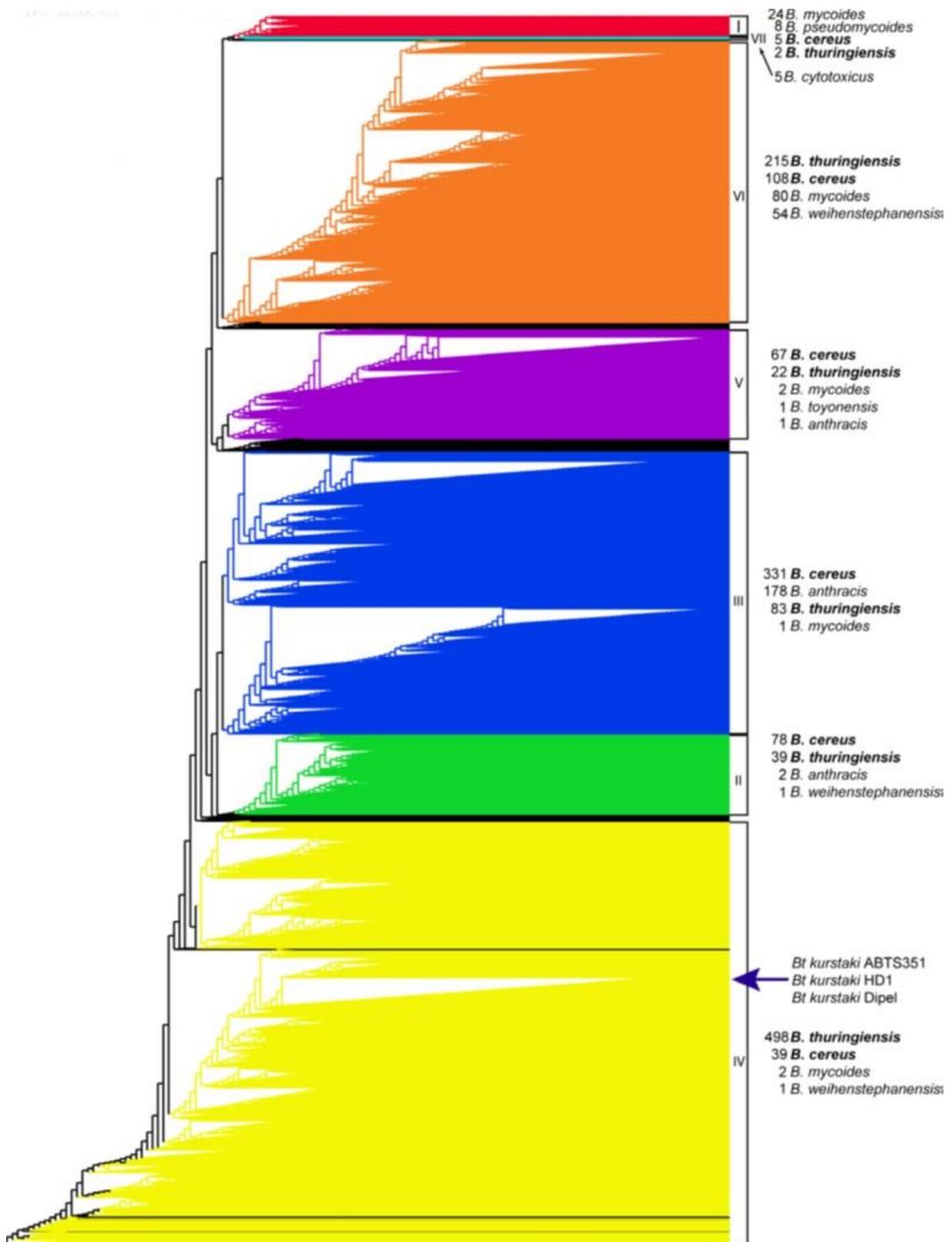


Figure 2 : Relation phylogénétique entre 3193 isolats du groupe *Bacillus cereus* sensu lato basée sur les données de typage MLST et AFLP. Adapté de (EFSA, 2016) La proximité génétique entre les espèces se traduit par la présence commune dans différents groupes de souches de *Bacillus cereus* sensu stricto et *Bacillus thuringiensis*.

3/ Ecologie et environnement

Les souches du groupe *B. cereus sensu lato* sont mésophiles, certaines sont adaptables et capables de croître à de basses températures (psychrotrophie) ou des températures élevées (thermophilie), représentant un challenge dans l'industrie agroalimentaire pour prévenir d'éventuelles contaminations alimentaires ou persistance dans l'environnement. Ces origines reflètent une adaptation écologique associée à des niches spécifiques (Figure 3), et peuvent ainsi former différents groupes. Toutefois, *Bacillus toyonensis* ne faisant pas parti à l'époque du groupe *Bacillus cereus* et étant ainsi exclu de ces analyses (Guinebretière *et al.*, 2008). Sept groupes phylogénétiques ont été déterminés en fonction de leurs températures de croissance, allant de 5°C à 55°C. *Bacillus cereus* et *Bacillus thuringiensis* sont disséminés à travers les groupes I à VI et présentent pour certaines souches des marqueurs de psychrophilie. Le groupe VII regroupe les souches de *Bacillus cytotoxicus*, une espèce thermotolérante ayant une croissance jusqu'à 55°C et pathogène des Mammifères (Guinebretière *et al.*, 2013). *Bacillus anthracis* forme un groupe monophylétique, le groupe III. *Bacillus mycoides* et *Bacillus weihenstephanensis* se regroupent dans le groupe VI et partagent des caractéristiques de psychrophilie avec *Bacillus cereus* (A. Kumar, Prakash, et Johri, 2011 ; Soufiane et Côté, 2013 ; Yi *et al.*, 2018 ; Bargabus *et al.*, 2002). Enfin, *Bacillus pseudomycoides* constitue le groupe I, groupe le plus divergent de *Bacillus cytotoxicus*.

D'autres caractéristiques phénotypiques sont associées aux espèces du groupe *Bacillus cereus*. Ainsi, certains paramètres tels que l'acidité du milieu ou la salinité reflètent les différences d'adaptation aux températures au sein de ces sept groupes phylogénétiques (Carlin *et al.*, 2013). Il apparaît que les espèces appartenant aux groupes III et VI sont les plus tolérantes à la chaleur et à une concentration élevée en NaCl (jusqu'à 8%), au contraire des espèces des groupes I et VI. Enfin les espèces du groupe II et VII ont la possibilité de croître en milieu acide (pH = 4.6).

Par conséquent, il apparaît que la niche écologique spécifique dans lequel se trouve les espèces du groupe *B. cereus* entraîne une réponse et une adaptation aux conditions environnementales, et par conséquent une modulation de sa physiologie afin de maximiser l'utilisation des ressources disponibles. L'environnement peut avoir ainsi une conséquence sur l'expression du pouvoir pathogène de celles-ci (Duport, Jobin, et Schmitt, 2016).

Cependant, malgré des différences phénotypiques, un pouvoir pathogène variable au sein des différentes espèces et des enjeux sociaux-économiques importants, la proximité génétique des espèces du groupe *Bacillus cereus* rendent difficiles la classification des espèces le constituant.

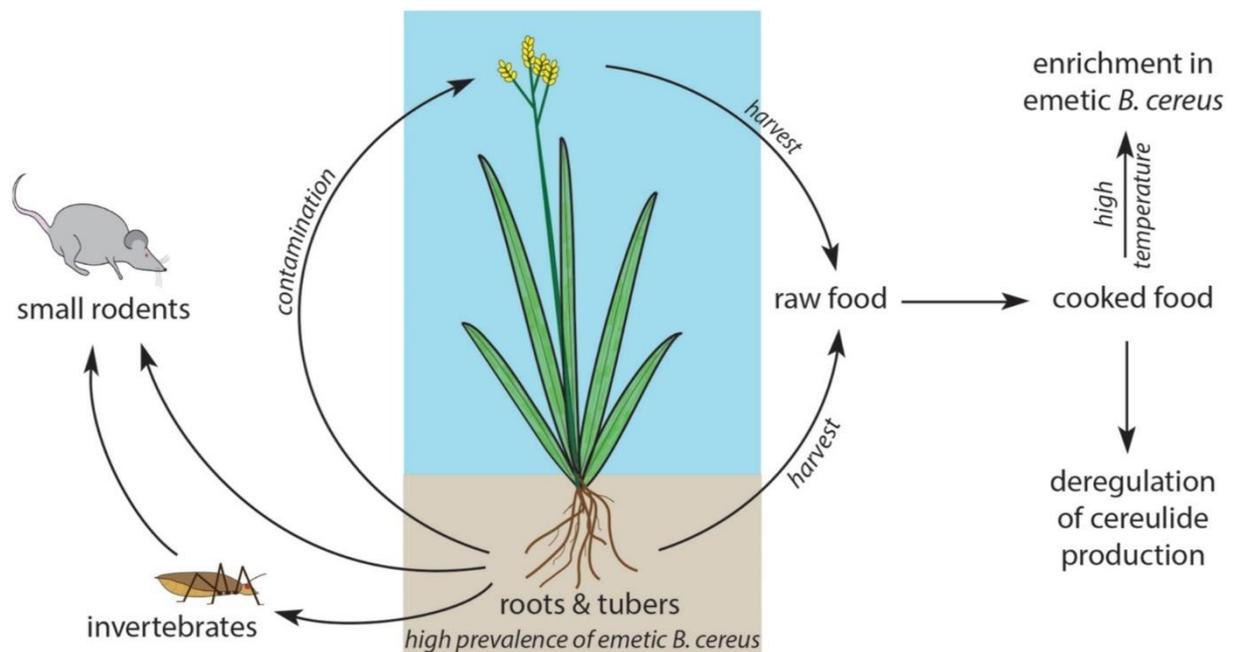


Figure 3: Niche écologique présumée des souches de *B. cereus* émétiques. *B. cereus* est probablement un microorganisme symbiotique des racines ou des tubercules de plantes, contaminant ensuite les parties aériennes *via* les insectes et rongeurs. Les bactéries sont ensuite transférées aux animaux d'élevage notamment les vaches (et par conséquent le lait ou la viande). Les spores de *B. cereus* émétiques, étant plus thermorésistantes que les spores d'autres souches de la même espèce, vont se retrouver en quantité plus importante dans l'aliment, et peuvent produire plus de toxine émétique (d'après Ehling-Schulz *et al.*, 2015).

4/ Les facteurs de virulence

4.1/ Pathogénicité spécifique chez *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis*

4.1.1/ *B. cereus sensu stricto*

B. cereus est un pathogène opportuniste et associé à des toxi-infections alimentaires collectives. Il provoque des symptômes émétiques liés à la production de toxines dans l'aliment contaminé (céréulide) 1 à 5 heures après ingestion, ou diarrhéiques par la production d'entérotoxines dans l'intestin 8 à 16 heures post-ingestion par les bactéries ou les spores. Cependant, *B. cereus* peut aussi provoquer des infections plus sévères voire mortelles chez des patients vulnérables ou immunodéprimés (Glasset *et al.*, 2018 ; Veysseyre *et al.*, 2015). Si les entérotoxines produites dans le cas de symptômes diarrhéiques se retrouvent chez les autres espèces du groupe *Bacillus cereus*, la production de la toxine céréulide est propre à certaines souches majoritairement mésophiles (15°C à 45°C) appartenant au groupe phylogénétique III (Carlin *et al.*, 2006 ; Guinebrière *et al.*, 2008). La toxine céréulide est un dodécapepsipeptide cyclique, de formule [D-O-Leu-D-Ala-O-Val-L-Val]₃, stable à haute température, synthétisé par un système NRPS (peptide-synthétases non ribosomales). La toxine est codée par le cluster de gènes *ces* présent sur le mégaplasme pCER270, présentant des similarités avec pXO1 de *B. anthracis*, et dont l'expression est contrôlée par des promoteurs sensibles au substrat alimentaire dans lequel la toxine est produite (Figure 4 ; Ehling-Schulz, Fricker, et Scherer, 2004 ; Dommel *et al.*, 2010 ; Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Si la toxine est produite par des souches majoritairement mésophiles, elle peut aussi être synthétisée par d'autres souches psychrotolérantes de *B. cereus* et *B. weihenstephanensis*, pouvant entraîner des risques de contaminations alimentaires pour les consommateurs (Hoton *et al.*, 2009 ; Guérin *et al.*, 2017).

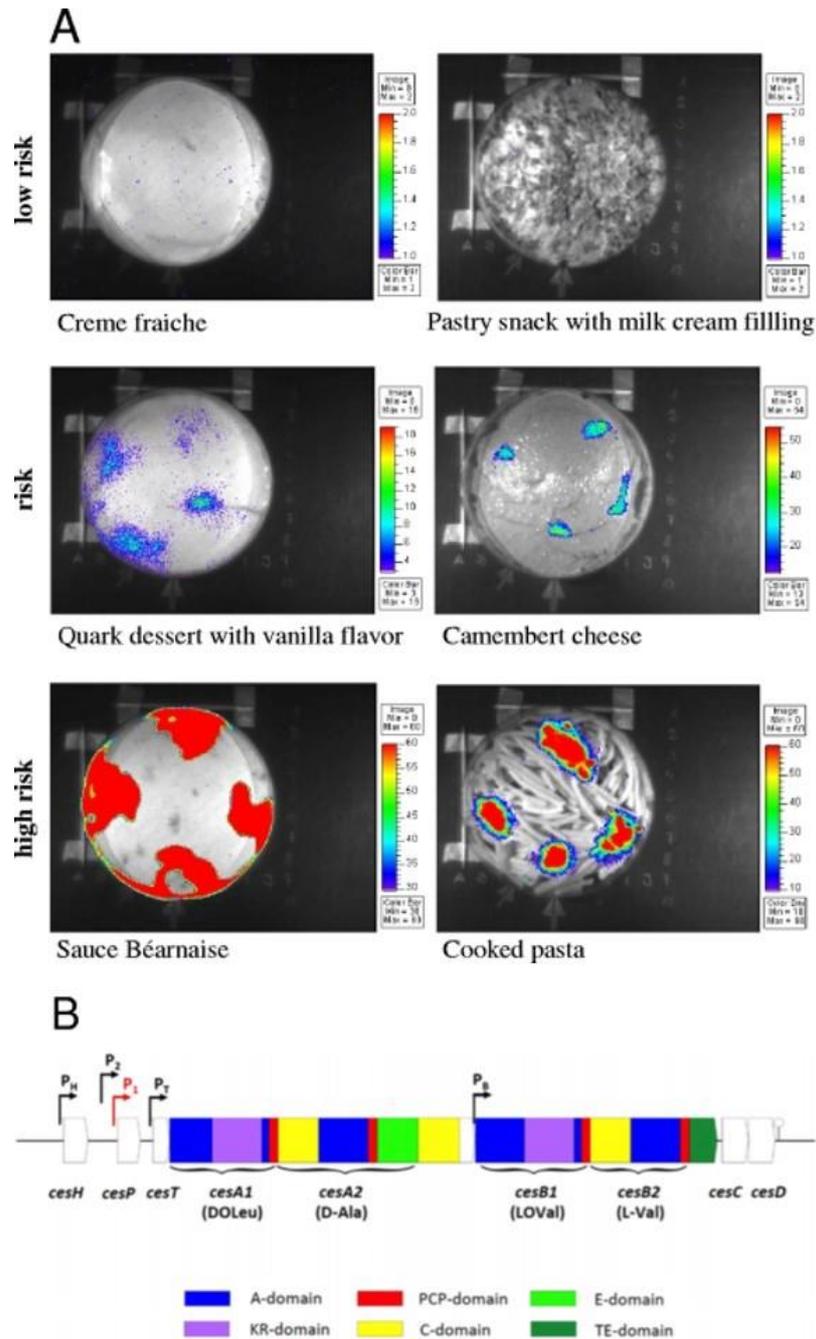


Figure 4: A : Activité du promoteur céréulide synthétase (P1) en temps réel dans l'aliment. La souche rapportrice bioluminescente *B. cereus* F4810/70(pMDX[P1/*luxABCDE*]) a été inoculée dans différents types d'aliments. L'expression de la luciférase, contrôlée par le promoteur principal de la céréulide synthétase P1, est évaluée après 24h d'incubation à 24°C, et permet la classification des aliments comme étant à risque faible (low-risk), à risque (risk) ou à haut risque (high-risk). Les résultats illustrent l'influence des paramètres environnementaux sur la réponse du promoteur, avec une intensité du signal de bioluminescence variable suivant l'aliment concerné. **B : Cluster de gènes de la céréulide synthétase.** Les flèches orientées indiquent les différents promoteurs, et le promoteur majeur P1 est surligné en rouge. Le terminateur de transcription est représenté par une structure en « épingle à cheveux ». Les différents domaines constituant la céréulide sont indiqués par des boîtes de couleurs différentes et indiquées sous la structure.

Adapté de Ehling-Schulz *et al.*, 2015 et Dommel *et al.*, 2010.

4.1.2/ *B. thuringiensis*

B. thuringiensis est un entomopathogène dont le pouvoir pathogène spécifique est lié à la production d'inclusions cristallines (δ -endotoxines) durant la sporulation, les toxines Cry, permettant de différencier en tant qu'espèce *B. cereus sensu stricto* de *B. thuringiensis*. Ces protéines sont codées par des gènes plasmidiques possédant la capacité de conjuguer et flanqués de séquences répétées inversées permettant la recombinaison avec d'autres plasmides ou plus rarement l'intégration au chromosome (Lereclus *et al.*, 1984 ; Kronstad et Whiteley, 1984). Actuellement, plusieurs centaines de gènes codants protéines Cry, constituant de nombreuses familles, sont référencés dans une banque de données (site internet : <http://www.btnomenclature.info/>). Cependant, pour une grande majorité de ces toxines, les cibles ne sont pas connues et ne peuvent être reliées à une structure et un ordre d'invertébré ou d'insecte particulier (Crickmore *et al.*, 1998). Le mode d'action de ces protéines ainsi que les insectes dont elles sont la cible sont surtout bien décrits chez les larves de Lépidoptères et de Diptères (Pigott et Ellar, 2007 ; Sanahuja *et al.*, 2011). Le processus implique plusieurs étapes, transformant la protoxine relativement inerte en une forme cytotoxique pour les cellules intestinales des insectes cibles. Après ingestion, les inclusions du cristal protéique de *B. thuringiensis* sont solubilisées, devenant la protoxine. Puis cette protoxine est clivée par des protéases de l'hôte (de type trypsine ou chymotrypsine) produisant la toxine active qui se fixe sur plusieurs récepteurs spécifiques de l'épithélium intestinal, formant des pores membranaires entraînant la lyse de la cellule (Knowles et Ellar, 1987 ; E. Schnepf *et al.*, 1998 ; Bravo *et al.*, 2011 ; Vachon, Laprade, et Schwartz, 2012). Cependant, des mécanismes de résistance aux actions des toxines Cry apparaissent dans différentes études, amenant à une réflexion sur le mode d'utilisation des biopesticides dérivés de *B. thuringiensis* (Gassmann *et al.*, 2014 ; Tabashnik, Brévault, et Carrière, 2013). Les insectes développent des stratégies diverses, comme par exemple i) en dupliquant des carboxylesterase capables de cliver la toxine ; ii) une insertion de transposon dans des gènes aidant à l'efficacité de la toxine ; iii) des mutations ponctuelles sur les séquences génomiques codants pour les récepteurs à la protéine, limitant sa fixation ; iv) une augmentation de l'activité des pompes à efflux permettant une évacuation plus importante de la toxine (Heckel, 2012 ; Tay *et al.*, 2015). *B. thuringiensis* produit aussi deux autres protéines portées par des plasmides et pouvant agir en synergie avec les toxines Cry : les protéines Vip (Vegetative Insecticidal Proteins) et Cyt (Cytolytic toxins). Les toxines Cyt ont une action décrite comme similaire aux

toxines Cry, et pouvant avoir une action synergique avec Cry (Bravo, Gill, et Soberón, 2007 ; Palma *et al.*, 2014). Les toxines Vip sont synthétisées durant la phase végétative de croissance de la bactérie, et sont classifiées en trois familles : Vip1, Vip2, Vip3 selon leur degré de similarité en acides-aminés. Elles forment des toxines binaires, celles appartenant aux familles Vip1 et Vip2 ont une activité contre les coléoptères, celles de la famille Vip3 sont toxiques contre les lépidoptères (Chakroun *et al.*, 2016). Les gènes codants pour les toxines Cry, Vip et Cyt utilisées en tant que biopesticides sont répertoriées (www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt).

4.1.3/ *B. anthracis*

B. anthracis est l'agent responsable de la maladie du charbon ou anthrax, une zoonose affectant les Mammifères (bovins et ovins), transmissible à l'Homme et potentiellement mortelle. Ces bactéries se trouvent principalement dans l'environnement sous forme de spores avant de se multiplier une fois ingérés par l'hôte, mais peuvent également germer et se diviser dans les sols au niveau des rhizosphères (Saile et Koehler, 2006). Les facteurs de virulence clefs de *B. anthracis* sont encodés dans deux plasmides, pXO1 (182 kb) et pXO2 (96 kb) (Hu *et al.*, 2009 ; Pilo et Frey, 2011). Le plasmide pXO1 présente deux gènes codant pour deux toxines binaires : une métalloprotéase à zinc (Lethal Factor – LF) et une adénylate cyclase calmoduline-dépendante (Oedema Factor – EF). Ces deux toxines partagent la même sous-unité d'adhésion, l'antigène protecteur (Protective Antigen – PA), lui aussi synthétisé par pXO1, formant une toxine létale LF-PA et une toxine oedémateuse EF-PA. Elles permettent l'adhésion des toxines aux récepteurs des cellules hôtes, et par la suite leur internalisation entraînant la lyse de ces cellules (Moayeri *et al.*, 2003). Le plasmide pXO2 porte l'opéron *capBCADE* permettant la synthèse des enzymes formant la capsule d'acide γ -poly-D-glutamique (PGDA). Cette capsule est essentielle, conférant à la bactérie la capacité à échapper au système immunitaire de l'hôte (opsonisation), ce qui constitue un élément clef dans la pathogénèse de *B. anthracis* qui serait incapable sinon de mener à bien l'infection (Missiakas et Schneewind, 2017 ; Pilo et Frey, 2011).

4.2/ Les facteurs de virulence communs du groupe *Bacillus cereus*

4.2.1/ Les entérotoxines

Les trois entérotoxines présentes chez les espèces du groupe *Bacillus cereus* sont reconnues comme étant à l'origine des symptômes diarrhéiques (Senesi et Ghelardi, 2010), et sont sécrétées dans le milieu extérieur par la bactérie *via* la voie générale de sécrétion Sec, un système de translocation protéique général (Fagerlund, Lindbäck, et Granum, 2010).

- L'hémolysine BL (Hbl) est constituée de trois sous-unités distinctes nommées L1, L2 et B, requises pour permettre son activité maximale (Douglas J Beecher, Schoeni, et Wong, 1995). Les sous-unité B permettent la liaison à la cellule cible (Sastalla *et al.*, 2013 ; Tausch *et al.*, 2017), bien qu'il ait été suggéré que les sous unités L1 et L2 soient elles aussi capables de se lier indépendamment dans le cas d'adhésion aux érythrocytes (Douglas J. Beecher et Wong, 1997). La toxine Hbl possède également une activité hémolytique, cytotoxique, dermonécrotique et augmente la perméabilité vasculaire, et peut être la cause de sévères endophtalmies (D. J. Beecher *et al.*, 2000 ; Callegan *et al.*, 2003).
- L'entérotoxine non-hémolytique Nhe (Non-Hemolytic Enterotoxin) a été isolée d'une souche de *B. cereus* Hbl-négative au cours d'une forte épidémie d'intoxication alimentaire en Norvège (Lund, De Buyser, et Granum, 2000). A l'instar de la toxine Hbl, elle est constituée de trois sous-unités : NheA, NheB et NheC. Cette toxine crée des pores dans la membrane des cellules cibles, et nécessite un ratio molaire équivalent à 10 : 10 : 1 pour respectivement ses trois composantes NheA, NheB et NheC (Lindback, 2004). NheC adhère tout d'abord à la membrane cellulaire, puis NheB et NheA sont respectivement recrutés (Sastalla *et al.*, 2013). Si Nhe est cytotoxique, elle ne présente pas d'activité hémolytique et possède une structure et une fonction comparable à Hbl et aux cytolisines A (ClyA) des bactéries entériques Gram-négatives (Fagerlund et Hardy, 2008).
- La cytotoxine K (CytK) est présente sous deux formes distinctes CytK-1 et CytK-2. Ces deux formes sont considérées comme orthologues de deux espèces bactériennes différentes, puisque la présence du gène *cytK-1* est caractéristique de *B. cytotoxicus* tandis que *cytK-2* est commun aux autres espèces du groupe *B. cereus* (Guinebretiere *et al.*, 2013 ; S. Ceuppens *et al.*, 2013). CytK a été isolée en 1998

suite à de graves entérites nécrotiques en France (Lund, De Buyser, et Granum, 2000). Elle forme des pores dans les membranes cellulaires, appartenant à la famille des toxines formant des tonneaux β (Hardy, Lund, et Granum, 2001).

4.2.2/ Les phospholipases

Les phospholipases du groupe *Bacillus cereus* sont au nombre de trois, la sphingomyélinase (SM-PLC) dégradant les sphingolipides, la phosphatidylcholine phospholipase (PC-PLC), et enfin la phosphatidylinositol phospholipase (PI-PLC) (Kupke *et al.*, 1989 ; M. Lechner *et al.*, 1989 ; A. P. Pomerantsev *et al.*, 2003). La combinaison de la SM-PLC et de la PC-PLC forment un déterminant biologique cytolitique nommé céréolysine AB (Gilmore *et al.*, 1989), hydrolysant spécifiquement la sphingomyéline de la membrane des érythrocytes, causant son hémolyse (Ramarao et Sanchis, 2013). Elles déclenchent la lyse cellulaire grâce à leur activité enzymatique, et présentent un intérêt biotechnologique potentiel dans le cadre de la production d'huiles végétales (Lyu *et al.*, 2016).

4.2.3/ Les hémolysines

Outre Hbl, CytK et la céréolysine AB mentionnées précédemment, d'autres hémolysines spécifiques sont produites au sein du groupe *Bacillus cereus*.

- L'hémolysine I a été décrite pour la première fois en 1967 et était alors appelée céréolysine O (CLO) chez *B. cereus*, thuringiolysine O (TLO) chez *B. thuringiensis* et anthrolysine O (ALO) chez *B. anthracis* (Shannon *et al.*, 2003). Ces hémolysines appartiennent à la famille des cytolysines cholestérol-dépendantes. Elles sont constituées d'un seul polypeptide contenant une séquence très conservée de onze résidus riches en tryptophane proche du domaine C-terminal, participant à la liaison avec les membranes riches en cholestérol (Jacobs *et al.*, 1999). L'hémolysine I a une activité cytolitique en formant des pores dans les membranes cytoplasmiques riches en cholestérol, perméabilisant ou lysant par conséquent les cellules.
- L'hémolysine II (HlyII) forme des pores dans la membrane cellulaire en constituant des oligomères heptamériques, et fait partie au même titre que CytK à la famille des toxines tonneau β (Andreeva *et al.*, 2006). HlyII est hémolytique pour de nombreux types d'érythrocytes et cytotoxique pour les cellules humaines, mais

ne cause pas de symptômes diarrhéiques (Andreeva *et al.*, 2007). Cette hémolysine est aussi impliquée dans la mortalité des macrophages du système immunitaire par apoptose (Tran, Guillemet, *et al.*, 2011 ; Tran, Puhar, *et al.* 2011).

4.2.4/ Les protéases

Les protéases sont des facteurs de virulence très nombreux chez *B. cereus*, puisque 50 gènes au moins codent pour des protéases (Ivanova *et al.*, 2003). Elles favorisent la colonisation de l'hôte par le pathogène, en dégradant ce qui compose le tissu de la matrice extracellulaire, tels que le collagène ou l'élastine, permettant la prolifération de la bactérie et d'échapper au système immunitaire de l'hôte. On trouve ainsi par exemple des collagénases (Abfalter *et al.*, 2016) ou des métalloprotéases à zinc telles que InhA1, InhA2 ou NprA. Il a été démontré qu'InhA1 est une protéase clef permettant aux spores de *B. cereus* d'échapper aux macrophages du système immunitaire de l'hôte (Ramarao et Lereclus, 2005 ; E. Guillemet *et al.*, 2010) en contrôlant la maturation post-traductionnelle de NprA (Haydar *et al.*, 2018). InhA2 est nécessaire quant à elle à la virulence par voie orale chez les insectes, mais n'est pas suffisante pour induire la virulence à elle seule (S. Fedhila *et al.*, 2003 ; S. Fedhila, Nel, et Lereclus, 2002).

4.3/ Régulation de l'expression des facteurs de virulences

L'expression de la majorité des gènes de virulence chez *Bacillus cereus* est régulée par un système de Quorum Sensing constitué par le régulateur transcriptionnel pléiotrope PlcR (Phospholipase C Regulator), qui s'exprime en début de phase stationnaire de croissance, et son peptide de médiation, PapR (Lereclus *et al.*, 1996 ; Agaisse *et al.*, 1999). L'absence de PlcR chez *B. cereus* et *B. thuringiensis* entraîne une diminution de la virulence chez l'insecte et la souris *in vivo* (Salamitou *et al.*, 2000). Le peptide PapR est produit, sécrété dans le milieu extracellulaire où il va être maturé en sept acides-aminés avant d'être réimporté dans la cellule par le système Opp (Oligopeptide Permease), pour interagir avec PlcR en se fixant sur sa séquence promotrice cible et permettre l'activation du régulon (Gominet *et al.*, 2001 ; L. Slamti, 2002 ; Bouillaut *et al.*, 2008 ; Andrei P. Pomerantsev *et al.*, 2009). CodY est un autre régulateur pléiotrope, agissant positivement et indirectement sur l'expression des gènes appartenant au régulon PlcR, contenant environ 45 gènes (Gohar *et al.*, 2008), en régulant l'expression du système d'import Opp (Frenzel

et al., 2012 ; Leyla Slamti *et al.*, 2016, 2014). Enfin, l'expression de PlcR est réprimée lors de l'entrée en sporulation par la fixation de Spo0A~P, un régulateur essentiel de la sporulation chez *B. cereus*, sur des séquences cibles (D. Lereclus *et al.*, 2000).

Cependant, si la virulence est atténuée en l'absence de PlcR, elle n'est pas abolie, ce qui suggère la présence d'autres régulateurs impliqués dans l'expression de gènes de virulence. Il est par exemple intéressant de noter que l'expression de l'hémolysine II est contrôlée à la fois par son propre régulateur HlyIIR et par Fur (Ferric uptake regulator), le principal régulateur de l'homéostasie du fer chez *B. cereus* (Sineva *et al.*, 2012 ; Elisabeth Guillemet *et al.*, 2013). Dans le prochain chapitre, nous aborderons l'homéostasie du fer chez *Bacillus cereus* et son importance dans les interactions hôte-pathogène, la virulence au cours de l'infection et la survie chez l'hôte.

Chapitre 2 : Le fer

1/ Caractéristiques générales et rôle du fer chez les organismes

Le fer est un élément essentiel pour la plupart des organismes vivants. Il est fondamental puisqu'il intervient dans de nombreuses fonctions biologiques chez l'ensemble des organismes, en transportant des électrons et étant également catalyseur électrophile de réactions biochimiques diverses. Il intervient dans la synthèse et la réparation de l'ADN, la stabilité génomique, la respiration, la photosynthèse, ou encore en tant que cofacteur pour de nombreuses réactions biochimiques (Miller et Auerbuch, 2015 ; Paul et Lill, 2015 ; Py et Barras, 2014 ; Zhang, 2014 ; Gnanndt *et al.*, 2016 ; Fu *et al.*, 2016). Pour illustrer ces propos, chez l'Homme, un déséquilibre en fer peut entraîner un grand nombre de maladies ou dysfonctionnements : anémies, hémochromatoses, insuffisances rénales, cardiomyopathies, ou encore des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la chorée de Huntington (Belaidi et Bush, 2016 ; Dev et Babitt, 2017), et l'homéostasie du fer est ainsi finement régulée par l'hépcidine (Nicolas *et al.*, 2002). Bien qu'il soit abondant sur Terre, le fer est néanmoins très peu biodisponible. Sa forme réduite Fe^{2+} réagit avec le peroxyde d'hydrogène *via* la réaction de Fenton, entraînant une réduction partielle des ions Fe^{2+} et conduisant à la production de radicaux hydroxyles toxiques, dégradant les macromolécules telles que l'ADN (Touati, 2000; Ezraty *et al.*, 2017). Par conséquent, les microorganismes sont confrontés à une limitation importante des ressources en fer dans leurs environnements : chez les organismes vivants, le fer peut être complexé à des hémoprotéines, l'hème, ou des protéines de stockages telles que la ferritine, la transferrine ou la lactoferrine. Les mécanismes d'acquisition du fer et son homéostasie chez les microorganismes constituent un sujet d'intérêt central et font état de nombreuses études dans des domaines variés incluant la microbiologie, la génomique, l'écologie microbienne, la biogéochimie et la génétique moléculaire (Merchant et Helmann, 2012).

2/ Séquestration du fer : les différentes protéines de transport et stockage

2.1/ Hème et protéines à hème

L'hème (Figure 5) est un cofacteur impliqué dans de très nombreuses réactions biologiques indispensables à la survie des organismes vivants, aussi bien procaryotes qu'eucaryotes. Elle se constitue d'un atome de fer ferreux (Fe^{2+}) lié au noyau tétrapyrrole de la protoporphyrine IX, et se nomme hémine lorsque l'atome lié à la protoporphyrine IX est un atome de fer ferrique (Fe^{3+}). Il est remarquable de noter qu'il existe de nombreuses protéines dont l'hème est le ligand, formant ainsi des hémoprotéines :

- L'hémoglobine et la myoglobine sont impliquées respectivement dans le transport et le stockage de l'oxygène chez l'Homme (Schuth *et al.*, 2017 ; Kepp, 2017).
 - L'hémoglobine (Figure 5) est un hétérotétramère composé de sous-unités globine α -like et β -like, chacune d'entre elle étant liée à un groupement prosthétique de l'hème, et se trouve intégrée aux érythrocytes, les globules rouges du sang produits au sein de la moelle osseuse chez l'Homme (Thom *et al.*, 2013 ; Kafina et Paw, 2017). L'hème libre est toxique pour les cellules de par la présence du fer, créant un stress oxydatif et des lésions tissulaires (Jeney, 2002 ; Vercellotti *et al.*, 1994). Ainsi, lorsque les érythrocytes sont lysés, d'autres molécules du sang vont intervenir pour séquestrer l'hème, maintenant une concentration en hème libre faible : l'hémopexine, une glycoprotéine présente dans le plasma et à très forte affinité pour l'hème ; l'haptoglobine, une autre glycoprotéine synthétisée dans le foie ; l'albumine sérique, qui est la molécule la plus abondante du plasma et elle aussi produite par le foie ; enfin, la α_1 -microglobuline ou protéine HC, faisant partie des lipocalines (Smith et McCulloh, 2015 ; Ascenzi *et al.*, 2005). L'hème sera ensuite acheminé vers le foie où elle sera recyclée ou dégradée. Il existe plus de 1000 variants de molécules d'hémoglobine suite à l'apparition de mutations dans le génome humain, altérant l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène, et parfois de façon plus ou moins importante sa fonction (Giardine *et al.*, 2011).
 - La myoglobine présente des similarités structurales avec l'hémoglobine. C'est une hémoprotéine cytoplasmique constituée d'une seule chaîne

polypeptidique de 154 acides-aminés, présentant huit hélices α pour lesquelles les lettres A à H sont attribuées (Ordway, 2004). Elle est mobile, transportant l'oxygène dans les muscles striés squelettiques (ou muscles rouges, couleur due à la présence de myoglobine dans des vacuoles) et les cellules cardiaques (Gros, Wittenberg, et Jue, 2010). Le transport d'oxygène se fait depuis les sarcolemmes (membrane déformable des muscles) en direction des mitochondries des cellules cardiaques.

- Les cytochromes sont impliqués dans de nombreux processus biologiques essentiels chez les eucaryotes ou les procaryotes, notamment la respiration en servant de relais le transfert d'électron au niveau de la chaîne respiratoire (H. J. Kim *et al.*, 2012 ; Asard *et al.*, 2013 ; Borisov *et al.*, 2011), la régulation du stress oxydatif en présence d'espèces oxygénées réactives, ou encore l'apoptose cellulaire (Hüttemann *et al.*, 2012 ; Shoji et Watanabe, 2014 ; Ow *et al.*, 2008). Parmi les hémoprotéines régulant le stress oxydatif, nous retrouvons également les catalases, des protéines tétramériques induisant la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène, et les peroxydases (Poulos, 2014 ; Díaz *et al.*, 2012). Enfin, il apparaît que certaines hémoprotéines ont un rôle dans la signalisation et la régulation du stress oxydatif lié au monoxyde de carbone (CO) et au monoxyde d'azote (NO) en plus du stress oxydatif lié au dioxygène et au peroxyde d'hydrogène (Spiro, Soldatova, et Balakrishnan, 2013). En se liant à l'hème, ces molécules vont servir de signal impliquant le changement de conformation des protéines cibles initiant une liaison à l'ADN ou diverses réactions enzymatiques, régulant par exemple la respiration mitochondriale (Shiva *et al.*, 2007), la croissance et le développement des plantes (Kumar *et al.*, 2016) ou encore la croissance chez différents microorganismes en conditions d'anaérobiose (Yukl *et al.*, 2008 ; Ebert *et al.*, 2017).

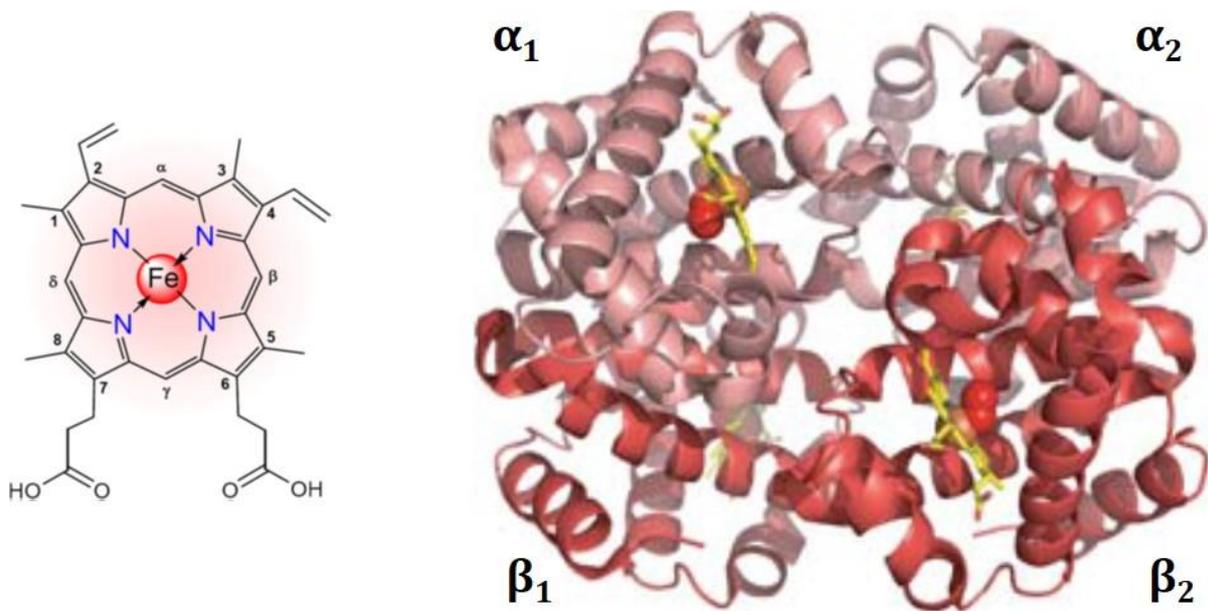


Figure 5 : Structure de l'hème et de l'hémoglobine. A gauche, la structure chimique de l'hème de type b, Fe-protoporphyrine IX ; A droite, la structure quaternaire de l'hémoglobine et ses sous-unités α (rose) et β (rouge). L'oxygène est représenté par les sphères rouges, l'hème par les structures jaunes contenant un atome de fer représenté en orange (d'après Lin, 2015 ; Thom *et al.*, 2013).

2.2/ La ferritine

La ferritine (Figure 6) a été découverte et cristallisée pour la première fois en 1937, et a été définie comme étant la principale protéine de stockage de fer grâce à sa faculté de pouvoir stocker dans une large cavité des milliers d'atomes de fer, protégeant ainsi l'organisme du stress oxydatif (Ford *et al.*, 1984 ; Arosio, Elia, et Poli, 2017). La ferritine procède à la capture des atomes des ions ferreux (Fe^{2+}) et à leur minéralisation dans la cavité grâce à son activité ferroxidase, et maintient ses atomes de fer en solution par le biais de son manteau protéique (Harrison et Arosio, 1996). Elles sont stables, supportant des températures élevées (jusqu'à 70°C), à pH allant de 3 à 10 (Martsev, Vlasov, et Arosio, 1998), et quasiment ubiquitaires à l'exception des levures et d'oomycètes nommés stramenopiles (Raven, 2013). Les ferritines sont localisées principalement dans le cytoplasme des cellules, mais peuvent aussi se retrouver dans le noyau, les mitochondries des animaux, les plastides des plantes, l'hémocœle des insectes ou encore circulantes dans le plasma, contrôlant la disponibilité en fer dans l'organisme jouant ainsi un rôle important dans l'homéostasie du fer (Arosio, Ingrassia, et Cavadini, 2009 ;

Arosio et Levi, 2010 ; Xiaofeng Liu et Theil, 2005). Les ferritines sont des protéines présentant des structures très conservées et se subdivisant en trois familles :

- Les ferritines (FTN) ont une structure très conservée de 24 sous-unités qui individuellement forment un amas de 4 chaînes α , et présentant chez les eucaryotes une forme sphérique d'environ 12 nm de diamètre pour environ 480 kDa (Ford et al. 1984). Chez les mammifères, deux types de sous-unités sont produites pour former la molécule finale de 24 sous-unités, nommées chaîne H (pour Heavy) et L (pour Light). Les sous-unités H possèdent l'activité ferroxidase permettant d'oxyder grâce au dioxygène (O_2) ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) les ions Fe^{2+} en ions Fe^{3+} , tandis que les chaînes L permettent la constitution du noyau de fer dans la cavité de la FTN (Levi *et al.*, 1992 ; Bou-Abdallah *et al.*, 2011). Les ions Fe^{2+} vont transiter entre le manteau protéique et la cavité interne de la ferritine par de canaux hydrophiles de type 3 (threefold) ou de type 4 (fourfold) situés à l'intersection des sous-unités (Takahashi et Kuyucak, 2003 ; Bou-Abdallah *et al.*, 2008). L'assemblage entre chaînes H et chaînes L peut donner dans le cytosol une large gamme de molécules de FTN suivant l'abondance de chaque monomère, suivant le tissu et les conditions environnementales, qui vont influencer l'expression des gènes codants pour ces deux sous-unités (Theil, 2007 ; Hintze et Theil, 2005). Ainsi, les tissus ayant une fonction principale de stockage du fer, tels que le foie ou la rate, possèdent des ferritines riches en chaînes L (jusqu'à 90%) plus stables et contenant plus de fer, tandis que les organes comme le cœur ou le cerveau présentent des FTN avec une activité anti-oxydante plus importante et donc plus riches en chaînes H (Finazzi et Arosio, 2014). Enfin, les FTN mitochondriales sont des monomères, constituées uniquement de chaînes H et donc une activité ferroxidase importante pour diminuer le stress oxydatif généré par le transfert d'électrons et l'excès de fer libre au niveau de la chaîne respiratoire (Drysdale *et al.*, 2002).

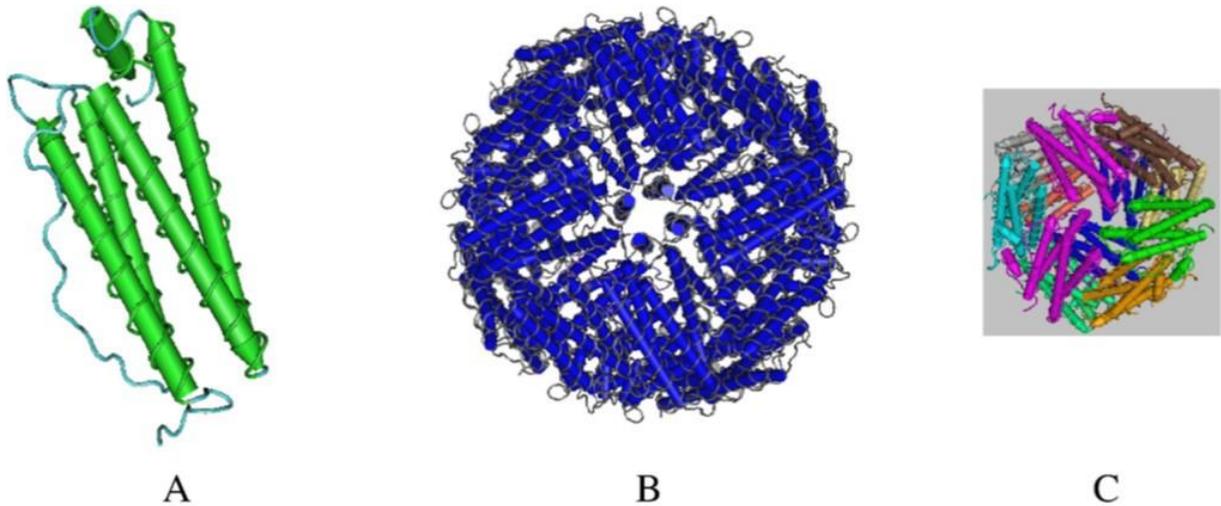


Figure 6: Structure des ferritines. **A** : aspect typique des sous-unités sous forme de 4 chaînes α ; **B** : ferritine humaine formée par l'assemblage de 24 sous-unités ; **C** : ferritine bactérienne Dps (DNA-binding protein from starved cells) constituée de 12 sous-unités (d'après Arosio *et al.*, 2009).

- Chez les bactéries, deux autres types de ferritines :
 - Les bactérioferritines (BFR) constituées elles aussi de 24 sous-unités H et 12 molécules d'hèmes et pouvant contenir plusieurs milliers d'atomes de fer (Andrews, Robinson, et Rodríguez-Quñones, 2003 ; Rivera, 2017). Les BFR n'interviennent pas nécessairement de façon prioritaire dans le stockage du fer, mais plutôt en tant qu'antioxydant ou dans la signalisation de stress (Bradley, Le Brun, et Moore, 2016 ; Theil, 2013).
 - Les mini-ferritines (environ 250 kDa) ou Dps (DNA-binding protein from starved cells) comprenant 12 sous-unités et pouvant contenir environ 500 atomes de fer (Andrews, Robinson, et Rodríguez-Quñones, 2003). Les protéines Dps préfèrent l'utilisation de l' H_2O_2 comme oxydant indiquant que sa fonction première demeure la protection de la dégradation de l'ADN contre les radicaux libres produits par la réaction entre les ions ferreux Fe^{2+} et l' H_2O_2 (Zhao *et al.*, 2002). Il a récemment été démontré chez *E. coli* que les Dps, exprimées en phase exponentielle de croissance et constituant la protéine majoritaire en phase stationnaire, interviennent dans la protection de nombreux stress (milieu appauvri, choc thermique, stress oxydatif et exposition au fer) grâce à une double action de liaison à l'ADN et d'activité ferroxidase (Nair et Finkel, 2004 ; Karas, Westerlaken, et Meyer, 2015).

2.3/ La transferrine et la lactoferrine

La transferrine (Tf) est une molécule essentielle dans la régulation de l'homéostasie du fer chez l'homme. La Tf est une glycoprotéine contenant 679 acides-aminés pour un poids moléculaire d'environ 79 kDa, stabilisée par 19 ponts disulfures et protégée par trois chaînes latérales d'oligosaccharides. Elle se divise en deux lobes homologues en N-terminal et C-terminal, chacun contenant un site de liaison au fer, permettant ainsi à la Tf de fixer jusqu'à deux atomes de fer (Parkkinen *et al.*, 2002 ; Gomme, McCann, et Bertolini, 2005). Elle est circulante dans le plasma sanguin, captant le fer notamment apporté par la nourriture et permet la protection contre le stress oxydatif et l'acheminement du fer vers l'ensemble des cellules (G. J. Anderson et Frazer, 2017). La Tf est une molécule importante dans le cadre de la lutte contre les bactéries, en les privant de fer disponible (Barber et Elde, 2014). Elle possède un effet bactériostatique et bactéricide chez *B. cereus sensu lato* dans le cas de l'ovotransferrine du blanc d'œuf (Baron *et al.*, 2014), et impacte la formation de biofilms chez *B. thuringiensis* (Garner *et al.*, 2016). A l'instar de la Tf, la lactoferrine (Lf) est une glycoprotéine ayant un rôle semblable, agissant plus spécifiquement au niveau des muqueuses et des sites inflammatoires grâce à son affinité plus importante pour le fer à pH faible (Legrand et Mazurier, 2010). Cependant, L'étude des interactions hôte-pathogène et l'acquisition par les bactéries du fer de la Tf et la Lf est encore mal connu (Morgenthau *et al.*, 2013).

3/ Le fer chez les insectes

Nous avons balayé précédemment les différentes sources de fer présentes chez l'hôte qui représentent pour les bactéries pathogènes et non pathogènes une source potentielle d'acquisition du fer. Ces sources de fer ont été décrites pour la plupart chez les Vertébrés, et plus précisément chez les mammifères et l'Homme. Durant mon projet de thèse, le modèle d'étude était le stade larvaire de l'insecte *Galleria mellonella*, un Lépidoptère de la famille des Pyralidae ravageur des ruches d'abeilles, plus communément nommé fausse teigne de la cire. Dans cette section l'objectif est d'apporter un focus sur les différences connues entre les sources de fer présentes chez les insectes (les analyses portent sur un faible nombre d'espèces) et leurs rôles dans la régulation de l'homéostasie du fer.

3.1/ Comparaison des sources de fer entre les insectes et les Mammifères

Comme chez les Vertébrés, les Invertébrés et les insectes en particulier possèdent des protéines de stockage du fer. Certaines d'entre elles sont communes aux protéines mentionnées précédemment, mais des différences sont à noter.

Les insectes ont un système respiratoire trachéal, permettant l'acheminement de l'oxygène directement aux organes ou tissus qui les constituent. Par conséquent, la présence d'hémoglobine chez les insectes a été longtemps négligée, se réduisant selon les études à quelques espèces vivants en condition d'hypoxie (Weber et Vinogradov, 2001). Il apparaît cependant qu'au cours de ces dernières années, de l'hémoglobine a été identifiée chez la drosophile (Hankeln *et al.*, 2002), l'abeille *Apis mellifera* (Hankeln *et al.*, 2006), les moustiques *Anopheles gambiae* et *Aedes aegypti* (Burmester, Klawitter, et Hankeln, 2007), et les lépidoptères *Bombyx mori* et *Samia cynthia* (Kawaoka *et al.*, 2009). Elle pourrait ainsi être présente chez les Diptères, les Hyménoptères, les Hémiptères, les Coléoptères et les Lépidoptères (Hankeln *et al.*, 2006). L'hémoglobine est synthétisée par le corps gras (équivalent du foie chez les Vertébrés), qui occupe souvent une grande partie de la cavité générale (ou hémocèle) de l'insecte, et sécrétée ensuite dans l'hémolymphe (équivalent du sang et système lymphatique des Vertébrés). Son rôle serait important chez la drosophile dans la régulation de l'homéostasie de l'oxygène et la résistance au stress oxydatif (Gleixner *et al.*, 2016). Les insectes ne produisent en revanche pas de myoglobine. L'hème se trouve également incorporé dans les cytochromes et les catalases. Chez les insectes, les ferritines et les transferrines jouent un rôle clef dans le transport de l'oxygène, mais aussi dans la défense contre les pathogènes en limitant l'accès au fer lors de l'infection (D. Wang *et al.*, 2009 ; B. Y. Kim *et al.*, 2009 ; Otho *et al.*, 2016). La structure des ferritines d'insectes sont comparables à celles des Vertébrés, se composant de deux types de sous-unités synthétisées avec un peptide signal, et présentant de fortes similarités en séquences d'acides-aminés pour les sous-unités H possédant le centre ferroxidase. Cependant, elles sont plus lourdes que les ferritines de Vertébrés (400 à 600 kDa), sont souvent glycosylées dans le réticulum endoplasmique (ER) des cellules ainsi que dans l'hémolymphe. Les ferritines sont synthétisées dans le corps gras en réponse à une augmentation de la concentration en fer, et apparaissent essentiellement dans le système vacuolaire sécrétoire (ER, complexes de Golgi, vésicules de sécrétion) et dans l'hémolymphe, à la différence des ferritines de Vertébrés majoritairement cytosoliques

(Pham et Winzerling, 2010 ; Locke et Nichol, 1992 ; Tang et Zhou, 2013). Elles peuvent également être produites par les cellules de l'épithélium intestinal, en particulier chez *Galleria mellonella* (B. S. Kim *et al.*, 2002)

3.2/ *Galleria mellonella* : un bon modèle d'étude d'infection

Galleria mellonella (ou fausse teigne de la cire) est un lépidoptère dont le stade larvaire est un ravageur de ruches d'abeilles, en se nourrissant de la cire présente. Cet insecte se développe depuis l'œuf jusqu'à l'adulte final en environ 35 jours à 37°C : le dernier stade larvaire constitue notre modèle d'infection (Figure 7). Chez cet insecte, la ferritine a été identifiée et se trouve composée de différentes sous-unités de 26, 30 et 32 kDa, composant la ferritine hémocœlique de 630 kDa. A l'instar des mammifères, elle mesure 11 nm de diamètre (B. S. Kim *et al.*, 2001, 2002). La transferrine est également produite par *G. mellonella* et joue un rôle dans la lutte contre l'infection à *B. thuringiensis* (Dubovskiy *et al.*, 2016). *G. mellonella* comporte de nombreux intérêts, en particulier un coût moindre comparativement à l'utilisation d'un modèle tel que la souris, et leur cycle de vie court représente un avantage pour effectuer des études impliquant un grand nombre d'individus (Ramarao, Nielsen-Leroux, et Lereclus, 2012). De plus, il présente un système immunitaire inné relativement complexe et proche de celui des mammifères (Mikonranta *et al.*, 2017 ; Wojda, 2017). Ainsi, la larve de *G. mellonella* a été utilisée dans le cadre d'analyses de pathogénie chez des bactéries Gram-négatives (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) ou Gram-positives (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*), permettant l'identification de facteurs de virulence à l'origine de maladie chez les mammifères ou encore l'essai de nouveaux antibiotiques après injection intra-hémocœlique (Senior *et al.*, 2011 ; Tsai, Loh, et Proft, 2016). De façon plus spécifiques aux études menées sur le groupe *B. cereus*, *G. mellonella* a permis l'identification de nouveaux facteurs de virulence par la bactérie lors d'une infection par voie orale (Salamitou *et al.*, 2000 ; S. Fedhila *et al.*, 2010 ; Bouillaut *et al.*, 2005), et en particulier en lien avec l'acquisition du fer *in vivo*. En effet, la technique IVET (*in vivo* expression technology), qui permet la détermination des gènes activés spécifiquement dans une condition précise, par exemple durant l'infection, a mis en lumière une protéine de surface unique impliquée dans l'acquisition du fer ainsi que l'expression d'autres

facteurs régulés par le fer (S. Fedhila *et al.*, 2006 ; Daou *et al.*, 2009 ; Segond *et al.*, 2014 ; Abi-Khalil *et al.*, 2015).

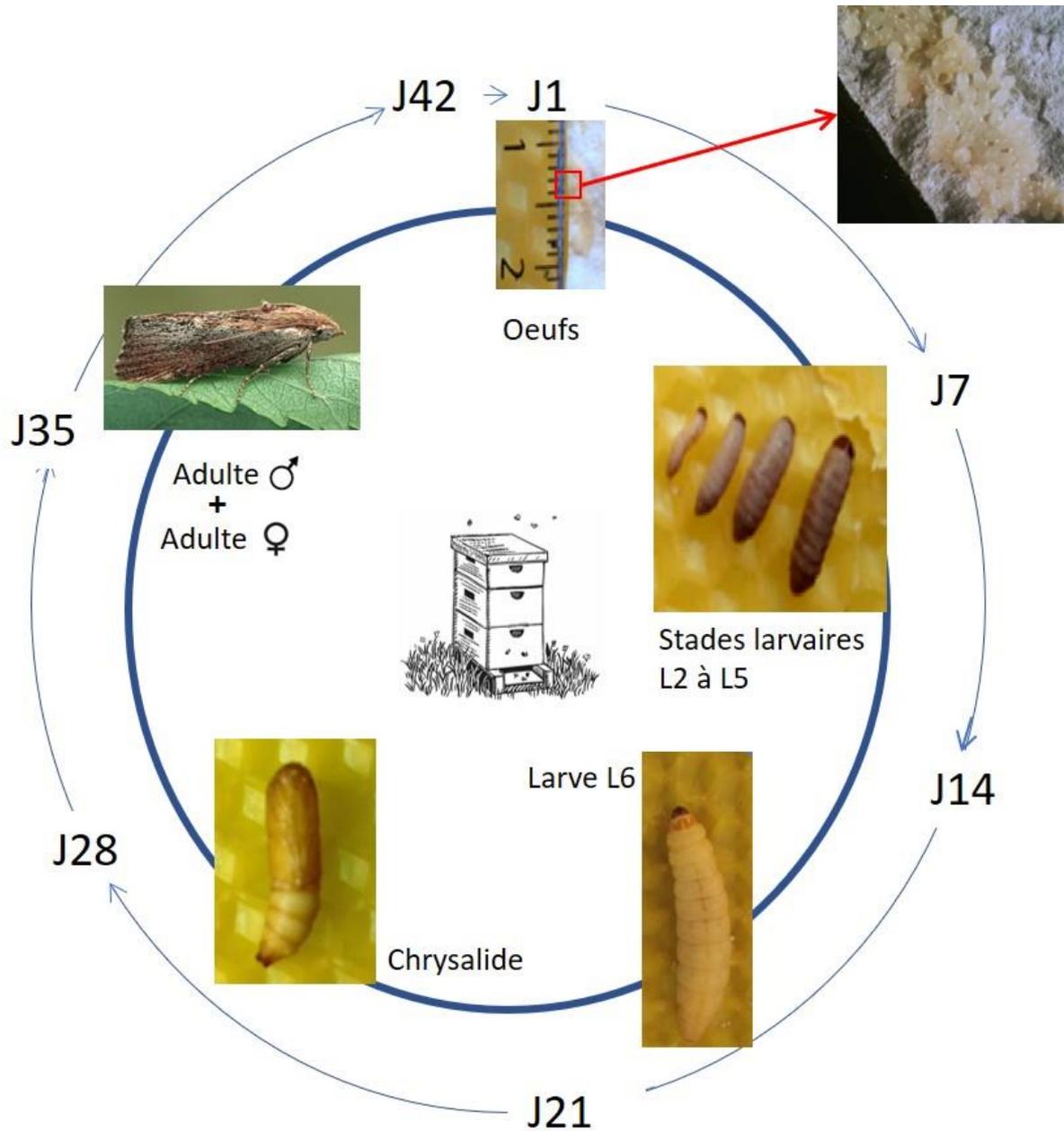


Figure 7: Cycle de vie de l'insecte *Galleria mellonella* (Pyralidae, Lepidoptera) à 37°C. Le schéma illustre le temps nécessaire (42 jours à 37 °C) pour obtenir une nouvelle génération de *G. mellonella*. J: Jour. Copyright : Agnès Réjasse, Christophe Buisson, Micalis-INRA.

4/ Homéostasie du fer chez l'hôte

Nous avons effectué une revue des diverses sources de stockages du fer chez l'hôte et décrit de façon globale les différences existantes entre mammifères et Insectes. Ici l'objectif est d'introduire quelques notions sur le mode d'absorption du fer chez l'hôte et sa régulation (Figure 8). Chez les mammifères, l'absorption du fer contenu dans les aliments se fait au niveau des cellules intestinales (plus précisément du duodénum) à travers un système extrêmement contrôlé. Il est initié par l'absorption au niveau de la lumière intestinale à travers la membrane apicale et se conclut par le transfert du fer jusqu'au système circulatoire et la prise en charge par la transferrine, permettant ensuite la distribution du fer aux différents organes et tissus (G. J. Anderson et Frazer, 2017). L'acquisition des ions ferreux Fe^{2+} par l'entérocyte se fait grâce à un récepteur membranaire DMT1 (pour Divalent metal transporter-1) et à l'action du cytochrome b duodénal (Dcytb), réduisant les ions ferriques Fe^{3+} présent en majorité dans le duodénum (environnement oxydatif) en ions ferreux Fe^{2+} , et permettant l'import de sources de fer non-hème (Gunshin *et al.*, 1997 ; McKie, 2001). L'hème est quant à lui internalisé par les entérocytes grâce à une protéine de transport HCP1 (heme carrier protein-1) avant d'être dégradé. Le fer peut être stocké dans les ferritines des entérocytes ou exporté dans la circulation sanguine par la transferrine. Ce système d'efflux du fer à travers de la membrane basolatérale de la cellule requiert deux partenaires : la ferroportine, considérée comme la seule molécule connue permettant l'export du fer de la cellule, et une MCO (multi-copper oxidase) l'héphaestine (homologue de la céruléoplasmine, exprimée dans le duodénum) afin de permettre la liaison de Fe^{2+} à la transferrine (Drakesmith, Nemeth, et Ganz, 2015). La régulation systémique de l'ensemble du système se fait grâce à une hormone produite par le foie, l'hépcidine, qui se fixe à la ferroportine et provoque sa dégradation, régulant ainsi la quantité de fer absorbé par l'alimentation et délivrée dans l'organisme (Nicolas *et al.*, 2002 ; Hentze *et al.*, 2010). Au niveau cellulaire, le contrôle du métabolisme du fer se fait à l'aide de protéines de régulations du fer (iron-regulatory protein, IRP1 et IRP2) qui se fixent sur des séquences spécifiques des ARN_m (iron-responsive element, IRE). Ce système de régulation post-transcriptionnel est essentiel pour le maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de l'intestin (Muckenthaler, Galy, et Hentze, 2008). Enfin dans les mitochondries, l'homéostasie du fer se trouve régulée par une petite molécule, la frataxine : cette molécule intervient comme

protéine chaperonne dans la formation de l'hème et des clusters Fer-Soufre, le stockage du fer en cas d'excès dans l'environnement, et la lutte contre le stress oxydatif. Elle est retrouvée de façon ubiquitaire chez les procaryotes et les eucaryotes (Bencze *et al.*, 2006). Chez les insectes, la régulation de l'homéostasie du fer reste encore mal connue et semble surtout assurée par la ferritine et la transferrine. L'absorption du fer contenu dans l'alimentation se fait chez *Drosophila melanogaster* à l'aide de la protéine Malvolio, orthologue de la protéine DMT1 des Mammifères. S'il n'existe pas d'équivalent de l'hepcidine ou de la ferroportine chez l'insecte, le système IRP/IRE est conservé, avec des protéines de différentes espèces d'insectes présentant de grandes similarités avec la protéine IRP1 de l'Homme (Tang et Zhou, 2013).

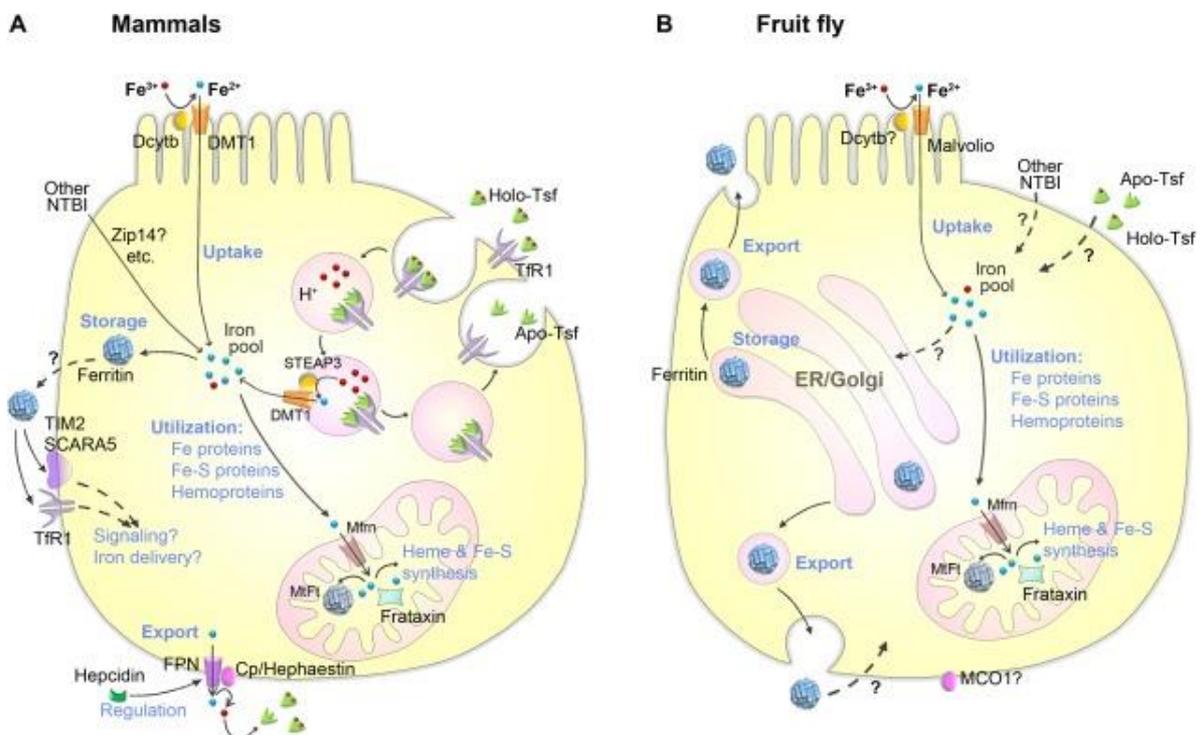


Figure 8 : Comparaison du métabolisme du fer chez les mammifères (Mammals) et la drosophile (Fruit fly). Les principales voies d'acquisition du fer, de stockage et d'export sont comparées selon un modèle cellulaire générique. La synthèse et le transport de l'hème, ainsi que les clusters Fe-S ne sont pas illustrés. Les différences entre les deux métabolismes sont principalement liées à une localisation sub-cellulaire différente de la ferritine et à l'absence de récepteurs à la transferrine et à la ferroportine chez les insectes. Cp: Céruloplasmine; Dcytb: cytochrome b duodéal; DMT1: transporteur 1 métal-ion divalent; FPN: Ferroportine; MCO1: Oxydase multi-cuivre; Mfrn: Mitoferrine; MfFt: Ferritine mitochondriale; NTBI: fer non lié à la transferrine; SCARA5: Récepteur "scavenger" membre 5; STEAP3: Antigène épithélial transmembrane-6 de la prostate 3; TIM2: Immunoglobuline cellule T et protéine domaine mucine 2; Tsf: Transferrine; TFR1: Récepteur 1 de la transferrine (d'après Tang et Zhou, 2013).

5/ Acquisition du fer chez les bactéries

Le fer chez les organismes hôtes est comme décrit précédemment en quantité biodisponible très limitée (Andrews, Robinson, et Rodríguez-Quiñones, 2003). Par conséquent, au cours de l'infection, les pathogènes utilisent diverses stratégies afin d'accéder aux ressources en fer. Une croissance bactérienne optimale (*in vitro*) nécessite une concentration comprise entre 10^{-7} et 10^{-5} M de fer, alors que chez l'hôte la concentration en fer biodisponible est d'environ 10^{-24} M. Les méthodes d'acquisition du fer sont liées étroitement avec la virulence de la bactérie, et peuvent être directes ou indirectes. L'acquisition directe du fer se fait par l'intermédiaire d'un contact entre les protéines situées à la surface de la bactérie et les sources de fer de l'hôte (résumées précédemment) ciblées par le pathogène. L'acquisition indirecte nécessite la synthèse et la sécrétion dans le milieu extracellulaire de molécules présentant une forte affinité pour le fer : les sidérophores (affinité forte pour le fer ferreux Fe^{3+}) et les hémophores (ciblent spécifiquement l'hème, libre ou complexé).

5.1/ Mécanismes d'acquisitions du fer chez les bactéries Gram-négatives

Chez les bactéries Gram-négatives, le fer doit passer à travers les différentes barrières séparant le milieu extérieur jusqu'au cytoplasme de la bactérie : la membrane externe, le peptidoglycane, l'espace périplasmique et la membrane interne (Figure 9). Pour se faire, la quasi-majorité des mécanismes impliquant l'import du fer dans la cellule nécessite la présence du système TonB-ExbBD, constitué des protéines TonB, ExbB et ExbD, s'assemblant en une ou deux copies de la protéines TonB additionnées à une multitude de copies de ExbB et ExbD. Ce complexe protéique forme un large oligomère et permet le transport d'énergie à travers le périplasme jusqu'à la membrane externe, obtenu grâce au gradient électrochimique de la membrane interne. Cette énergie est nécessaire à la liaison de la source de fer et son internalisation par son récepteur spécifique sur la membrane externe, et au transport du fer jusqu'au cytoplasme (Braun, Günter, et Hantke 1991; Jordan *et al.* 2013). TonB reconnaît des séquences d'acides-aminés spécifiques situés au niveau N-terminal des protéines cibles qu'il régule, et nommés boîtes TonB. L'ensemble des protéines de surface dépendantes du complexe TonB-ExbBD permettant l'acquisition directe des sources de fer, ou indirectement *via* les sidérophores ou les hémophores, se regroupent sous le terme de transporteurs TonB-dépendent (Noinaj et al. 2010). A

l'exception du système Feo, l'ensemble des systèmes d'acquisition du fer que nous présenterons ici sont TonB-dépendants, et sont résumés dans la Figure 10.

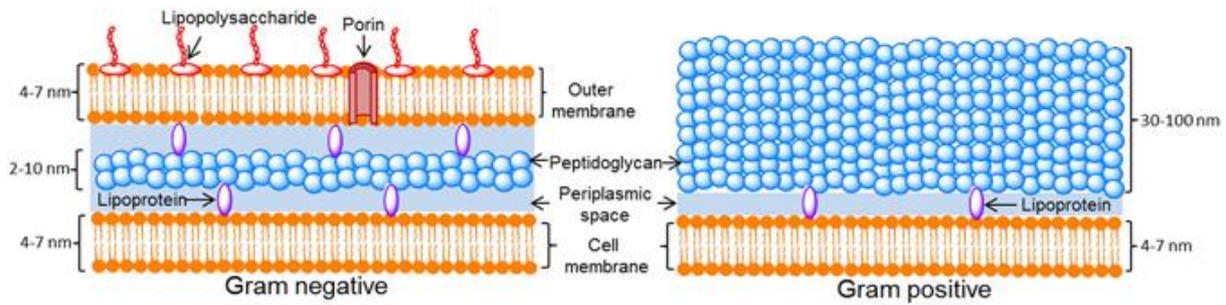


Figure 9: Structure générale de la paroi cellulaire chez les bactéries Gram-négatives et Gram-positives (Berezin *et al.*, 2017).

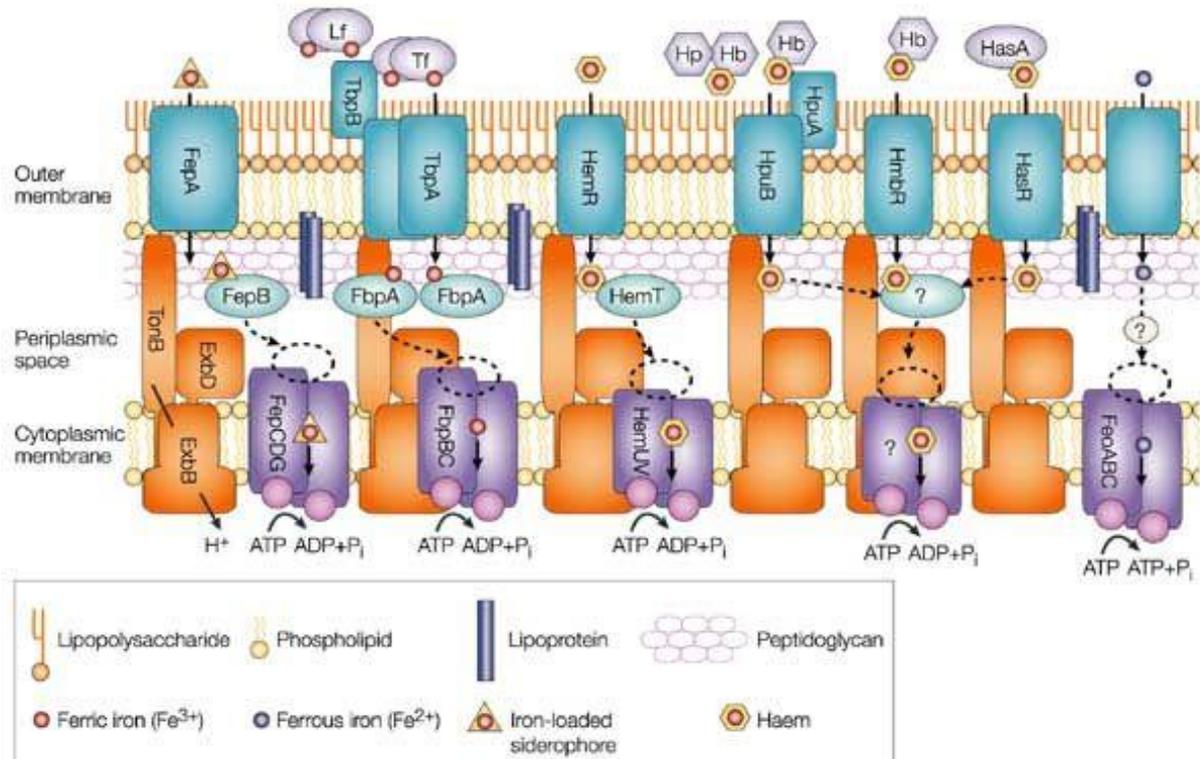


Figure 10: Systèmes d'acquisition du fer représentatifs chez les bactéries Gram-négatives. En conditions d'aérobiose, les bactéries utilisent des récepteurs de surface à haute affinité (bleu) liant les protéines contenant le Fe^{3+} (violet clair) telles que les couples sidérophores- Fe^{3+} ou l'hème, facilitant par conséquent la translocation dans l'espace périplasmique. Ce processus est activé par le système TonB-ExbBD. Les protéines assurant la liaison dans le périplasm (bleu clair) et les transporteurs ATP-dépendants (violet) enchassés dans la membrane cytoplasmique sont utilisés pour assurer la suite du transport dans la cellule (la même chose se retrouve chez les bactéries Gram-positives, à la différence près que ces protéines se trouvent insérées dans la membrane). Quelques exemples sont ici illustrés et sont développés dans l'introduction de ma thèse. En condition d'anaérobiose, le Fe^{2+} soluble peut diffuser à travers les porines de la membrane

externe, et par conséquent par des systèmes énergie-dépendants tels que FeoABC (d'après Faraldo-Gómez et Sansom, 2003).

5.1.1/ Voie d'acquisition directe

L'acquisition directe du fer se fait par l'intermédiaire d'un contact entre les protéines situées à la surface de la bactérie et les sources de fer de l'hôte (résumées précédemment) ciblées par le pathogène.

Lorsque la source de fer est la molécule de fer libre, sous forme de fer ferreux Fe^{2+} , le passage à travers la membrane externe jusque dans le périplasme se fait par l'intermédiaire des porines qui parsèment cette membrane. Ensuite, l'atome de fer va être pris en charge par le système Feo, commun aux bactéries Gram-négatives et Gram-positives (Lau, Krewulak, et Vogel, 2016). Chez *Salmonella enterica*, il a été démontré que FeoB permet la fixation et le passage du fer depuis le périplasme vers le cytosol de la bactérie grâce à une protéine G à activité GTPasique, tandis que l'interaction entre FeoA et FeoB semble indispensable à la liaison entre FeoB et la molécule de fer (Hyunkeun Kim, Lee, et Shin, 2012). Le système Feo est indépendant du complexe TonB-ExhBD chez les bactéries Gram-négatives.

Chez les bactéries Gram-négatives, il existe un système d'acquisition du fer de la transferrine composé de deux protéines, TbpA et TbpB, localisées au niveau de la membrane externe de la bactérie (Cornelissen, 2003). Ce système a été pour la première fois isolé chez *Neisseria meningitidis*. De la même façon, la lactoferrine est elle aussi reconnue par le couple de récepteur LbpA et LbpB (Brooks, Arutyunova, et Lemieux, 2014 ; Pettersson *et al.*, 1998) fonctionnant sur le même principe que TbpA et TbpB. TbpA et LbpA transfèrent le fer au niveau du périplasme à la protéine FbpA, qui ensuite transfère cette molécule de fer au cytosol de la bactérie par sa perméase associée FbpBC (D. S. Anderson *et al.*, 2004).

D'autres systèmes d'acquisition directs ciblant les hémoprotéines sont connus chez les bactéries Gram-négatives. Le système de transporteur de type ABC impliqué dans la captation de l'hème a été identifié chez *Yersinia enterocolitica* et est codé par l'opéron *hemRSTUV* (Stojiljkovic et Hantke, 1992). Le récepteur membranaire HemR est capable de lier et extraire à la surface de la bactérie l'hème des hémoprotéines de l'hôte, ainsi que de HemS, une protéine cytosolique séquestrant l'hème libre lors du transport dans le cytosol (Sheldon, Laakso, et Heinrichs, 2016). Il est également composé de HemT, une

protéine de transport périplasmique spécifique de l'hème, une protéine transmembranaire HemU, et une protéine de fixation de l'ATP HemV. Des systèmes homologues HemTUV ont été retrouvés chez d'autres pathogènes Gram-négatifs tels que ShuTUV chez *Shigella dysenteriae* (Wyckoff *et al.*, 1998), HutBCD chez *Vibrio cholerae* (Occhino *et al.*, 1998) ou encore PhuTUV chez *Pseudomonas aeruginosa* (Johnson, Ochsner, et Vasil, 2000), tous importants pour un transport efficace de l'hème jusque dans le cytosol de la cellule.

On peut enfin citer le système HpuAB qui permet de fixer l'hémoglobine et le complexe haptoglobine-hémoglobine chez le pathogène *Neisseria meningitidis* (Lewis, 1998 ; Rohde et Dyer, 2004), ainsi que le récepteur HmbR permettant la fixation de l'hémoglobine (Lewis *et al.*, 1999 ; Richardson et Stojiljkovic, 1999).

5.1.2/ Voie d'acquisition indirecte

5.1.2.1/ Hémophores

Les hémophores sont des protéines sécrétées dans le milieu extérieur et capables de chélater l'hème de diverses hémoprotéines. Longtemps les hémophores ont été considérés comme n'étant produits que par les bactéries Gram-négatives, cependant les bactéries Gram-positives en produisent également. Chez les bactéries Gram-négatives nous mentionnerons deux hémophores en particulier :

- HasA (Heme Acquisition System) est un hémophore qui a été identifié pour la première fois chez *Serratia marescens* et qui ensuite a été retrouvé chez d'autres bactéries Gram-négatives telles que *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* ou encore *Y. pestis* (Létoffé, Ghigo, et Wandersman, 1994 ; Kumar *et al.*, 2013). Les protéines de la famille HasA présentent une grande homologie structurale entre elles. Elles sont capables de fixer l'hème de l'hémoglobine, l'hémopexine et la myoglobine (Wandersman et Delepelaire, 2012). Une fois la source de fer captée, HasA transfère l'hème à son récepteur spécifique situé au niveau de la membrane externe HasR, faisant partie de la famille des transporteurs TonB-dépendants, est ensuite internalisé par la bactérie (Izadi-Pruneyre *et al.*, 2006). Seul l'hème est internalisé tandis que l'apo-hémophore reste dans le milieu extérieur.
- HxuA (heme-hemopexine utilization protein) a été caractérisé uniquement chez *Haemophilus influenzae* type b et acquiert uniquement l'hème de l'hémopexine (Cope *et al.*, 1998). A la différence de HasA, HxuA ne se lie pas directement à l'hème

de l'hémopexine. L'interaction entre les deux molécules libère l'hème qui est ensuite transféré à HxuC, une protéine faisant elle aussi parti des transporteurs TonB-dépendants (Fournier, Smith, et Delepelaire, 2011). Le mécanisme reste néanmoins toujours soumis à de nombreuses questions.

5.1.2.2/ Sidérophores

- Généralités

Pour capter le fer libre, les microorganismes, et en particulier les bactéries, produisent et sécrètent dans le milieu extérieur de petites molécules nommées sidérophores, terme d'origine grecque signifiant littéralement transporteur de fer (Neilands, 1995). Ces molécules possèdent une forte affinité pour le fer ferrique (Fe^{3+}) et sont de faible poids moléculaire (inférieur à 10 kDa). A l'heure actuelle environ 500 sidérophores ont été identifiés et 270 ont été caractérisés structurellement (Schalk, Mislin, et Brillet, 2012), se regroupant en différentes catégories en fonction de la famille de molécules chimiques auxquels ils appartiennent. Ils peuvent aussi être constitués d'un mélange de ces différents groupes chimiques caractéristiques (Figure 11) que sont :

- Les carboxylates, pour lesquels on retrouve à titre d'exemple la staphyloferrine A produite par *Staphylococcus aureus* (Nakaminami *et al.*, 2017).
- Les hydroxamates tels que la ferrioxamine B / desferrioxamine B (Neilands, 1984).
- Les catécholates : l'entérobactine produite par de nombreux microorganismes notamment par *E. coli*, la pétrobactine et la bacillibactine chez *B. anthracis* et *B. cereus* (Jung Yeop Lee *et al.*, 2011).
- Enfin, les phénolates tels que la pyocheline chez *P. aeruginosa* (Reimann, 2012).

- Synthèse et sécrétion des sidérophores

Les sidérophores sont synthétisés par le biais de peptides non-ribosomiques (non-ribosomal peptides synthetase, NRPS) dans le cytoplasme des cellules bactériennes (Wandersman et Delepelaire, 2004). Une fois produits, ils vont être excrétés dans le milieu extérieur par des systèmes de type transporteurs MFS (major facilitator superfamily) tels que par exemple la protéine EntS pour l'entérobactine (Furrer *et al.*, 2002) ou encore YmfD pour la bacillibactine (Hotta *et al.*, 2010).

- Système de transport des complexes sidérophore-Fe³⁺

Les complexes sidérophore-Fe³⁺ sont internalisés grâce à la présence de protéines liant les sidérophores (Siderophore Binding Protein) situés à la surface des bactéries et produites en parallèle des sidérophores. Chez les bactéries Gram-positives, il s'agit de protéines de type transporteurs ABC possédant une cassette ATP et situés au niveau de la membrane cytoplasmique (Braun et Hantke, 2011). Nous détaillerons ces systèmes plus tard dans le cadre de l'acquisition du fer chez les bactéries Gram-positives et en particulier chez *B. cereus*. Chez les bactéries Gram-négatives, elles sont localisées au niveau de la membrane externe, sont dépendantes du système TonB et sont ainsi nommées transporteurs TonB-dépendants ou TBDT (Schalk, Mislin, et Brillet, 2012 ; Noinaj *et al.*, 2010). Une fois dans le périplasme, le devenir des complexes sidérophore-Fe³⁺ dépend à la fois du sidérophore et de la bactérie elle-même. Le fer peut être relargué directement dans le périplasme comme dans le cas de la pyoverdine chez *P. aeruginosa* (Yeterian *et al.*, 2009) ou transporté à travers la membrane interne jusque dans le cytoplasme par des transporteurs de type ABC ou des perméases comme dans le cas du ferrichrome chez *E. coli* (Hannauer *et al.*, 2010). Parmi les systèmes les mieux décrits, nous pouvons citer deux exemples de TBDT qui ont été particulièrement étudiés :

- FepA est le TBDT du complexe enterobactine-Fe³⁺ chez *E. coli*. L'analyse du cristal révèle une structure de 700 résidus présentant au niveau carboxy-terminal de la protéine 22 feuillets formant un tonneau β et un domaine en N-terminal ancré fortement à la protéine et situé au sein de ce tonneau β (Buchanan *et al.*, 1999). La liaison puis le passage du complexe enterobactine-Fe³⁺ dans la protéine nécessite un changement de conformation de ce domaine N-terminal (K. N. Raymond, Dertz, et Kim, 2003). Une fois la membrane externe franchie, ce complexe va être amené par FepB, une protéine de liaison périplasmique, jusqu'à un transporteur possédant une cassette ATP (composé de FepC, FepD et FepG) permettant sa translocation dans le cytoplasme de la cellule.
- FhuA permet l'import du complexe ferrichrome-Fe³⁺ dans la bactérie. Il partage des caractéristiques structurales proches de FepA et fait parti de la famille des protéines à tonneaux β (Ferguson *et al.*, 1998 ; Locher *et al.*, 1998). La fixation du ligand ferrichrome-Fe³⁺ sur FhuA induit un changement de conformation et l'ouverture du canal dont les dimensions sont adaptées à la taille de ce complexe (Hickman *et al.*, 2017).

- Importance dans l'environnement de la bactérie

Les sidérophores sont un enjeu crucial dans la bataille pour l'acquisition du fer dans un environnement. Les différents sidérophores connus peuvent présenter des homologies structurales importantes, ce qui permet aux bactéries d'utiliser d'autres sidérophores produits par d'autres bactéries (xénosidérophores), C'est par exemple le cas de *P. aeruginosa* : cette bactérie produit la pyoverdine et la pyocheline, mais est aussi capable d'utiliser au moins cinq sidérophores hétérologues tels que la cépabactine, le ferrichrome, l'entérobactine, la ferrioxamine et le citrate (Hannauer *et al.*, 2010 ; Mislin *et al.*, 2006).

De plus, pour augmenter leurs chances d'en capter une quantité plus importante, les bactéries synthétisent aussi des protéines liant les sidérophores produits par d'autres organisme. C'est par exemple le cas chez *B. cereus* qui synthétise YxeB, une protéine liant les complexes constitués par les sidérophores ferrioxamine B / desferrioxamine B (hydroxamates) et Fe^{3+} (Fukushima *et al.*, 2013b), ou encore *Pseudomonas fluorescens* capable d'acquérir la ferrioxamine et la ferricoelicheline produites par *Streptomyces ambofaciens* (Galet *et al.*, 2015). Cette compétition est d'autant plus importante lors de la colonisation de bactéries pathogènes avec les bactéries résidentes de l'hôte, en particulier du microbiote intestinal (Ellermann et Arthur, 2017).

En réponse à la production de sidérophores, de nombreuses espèces animales ou végétales synthétisent les sidérocaldines, un sous-groupe des lipocalines, qui sont capables de lier spécifiquement les sidérophores (Sia, Allred, et Raymond, 2013 ; Ganz, 2009). Ces molécules permettent à l'hôte de piéger un grand nombre de sidérophores et d'assurer ainsi une protection contre des pathogènes en les privant de l'accès au fer. Les sidérophores ou leurs systèmes de réimportation spécifiques dans la cellule peuvent jouer un rôle aussi dans la régulation en cascade d'autres gènes. C'est le cas par exemple de la ferrioxamine B / desferrioxamine B chez *P. aeruginosa* (Llamas *et al.*, 2006).

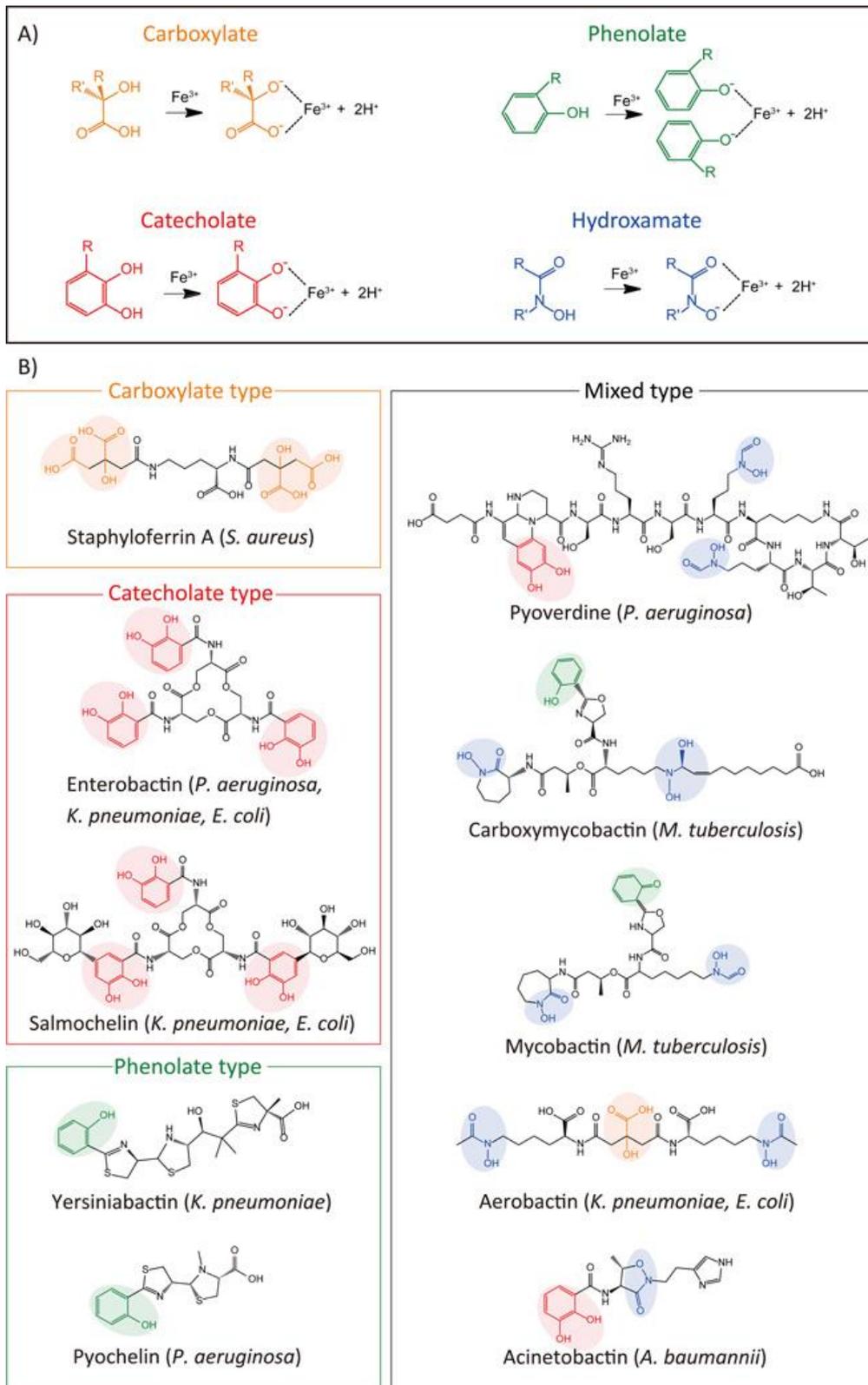


Figure 11: Structures des sidérophores. A : 4 types de résidus chimiques confèrent aux sidérophores leur haute affinité au fer : les carboxylates (orange), les catécholates (rouge), les phénolates (vert) et les hydroxamates (bleu). B : Quelques exemples de sidérophores produits par des bactéries pathogènes. Certains sidérophores sont composés de plusieurs types de résidus (Mixed type). D'après B. R. Wilson *et al.*, 2016.

5.2/ Mécanismes d'acquisitions du fer chez les bactéries Gram-positives

Les bactéries Gram-positives n'ont pas de membrane externe, ni de périplasme. Elles possèdent un peptidoglycane épais constituant 90% de la paroi bactérienne et protégeant la bactérie contre la lyse mécanique et osmotique, ainsi qu'à l'ancrage des protéines qui sont en contact direct avec le milieu extracellulaire (Koster, 2005). Le fer, qu'il soit libre ou faisant partie d'une hémoprotéine ou une protéine de stockage, doit franchir le peptidoglycane, et sont prises en charge par des protéines de surface qui leur sont associées. Au cours de l'évolution, les bactéries Gram-positives ont développé plusieurs stratégies d'exposition des protéines à leur surface. Le mécanisme le plus caractérisé est celui de la liaison covalente au peptidoglycane, à l'aide de protéines contenant un motif d'ancrage (ex : LPXTG ou NPQTN) du côté carboxy-terminal qui vont être attachées à la muréine du peptidoglycane (Koster, 2005). L'ancrage de ces protéines se fait à l'aide d'enzymes appelées sortases qui jouent le rôle de transpeptidases. Elles clivent la protéine au niveau de son motif d'ancrage et la transfèrent sur le peptidoglycane en créant des ponts amides entre la protéine et les ponts pentaglycine (Schneewind et Missiakas, 2014). En effet, certaines protéines de surfaces à motif d'ancrage au peptidoglycane jouent le rôle de récepteurs pour l'hème, l'hémoglobine, la transferrine et la lactoferrine, entraînant la formation d'un système de transport à travers la paroi (Mazmanian, 2003 ; Mazmanian *et al.*, 2002). La plupart de ces protéines de surface présentent un à plusieurs domaines conservés appelés NEAT (NEAr iron Transporter), essentiels pour l'interaction avec les sources de fer dont principalement l'hème et les hémoprotéines (Pilpa *et al.*, 2009). Une fois le peptidoglycane franchi, le transport du fer ou de l'hème à travers la membrane cytoplasmique se fait grâce aux systèmes de type ABC transporteurs similaires à ceux utilisés par les sidérophores.

5.2.1/ Voie d'acquisition directe

Chez les bactéries Gram-positives, l'acquisition du fer lié à l'hème et aux hémoprotéines représente une cible de choix. L'hème représente approximativement 75% de la quantité totale de fer chez les mammifères, et se trouve notamment lié comme expliqué précédemment à l'hémoglobine dans la circulation sanguine *via* les érythrocytes (Stojiljkovic et Perkins-Balding, 2002). Pour capter cette source de fer, de nombreuses espèces incluant *S. aureus* ou *B. cereus* vont produire des hémolysines de façon à lyser les

érythrocytes et ainsi libérer l'hémoglobine qu'ils contiennent (Malachowa et DeLeo, 2011 ; Vandenesch, Lina, et Henry, 2012 ; Sineva *et al.*, 2012 ; Tran *et al.*, 2013). Le système Isd (iron-regulated surface-determinant) est celui le mieux décrit dans le cadre de cette acquisition des sources de fer liées à l'hème, et a fait l'objet de nombreuses études en particulier chez *Staphylococcus aureus*. Le système Isd ou l'équivalent de ce système est également présent chez bien d'autres espèces, en particulier *B. cereus*, *B. anthracis*, *L. monocytogenes* ou encore *Streptococcus agalactiae*. L'objectif de cette partie de l'introduction est de décrire dans un premier temps ce système chez *S. aureus* avant de se focaliser sur les différences existantes chez *B. cereus*, puis de détailler les autres mécanismes permettant l'acquisition du fer de façon directe chez *B. cereus*.

5.2.1.1/ Le système Isd chez *S. aureus*

Isd (Figure 12) a été identifié pour la première fois chez *S. aureus* au début des années 2000 et se trouve constitué de neuf protéines exprimées en cas de carence en fer dans la cellule ainsi que d'une sortase permettant l'ancrage des facteurs IsdB, IsdH/HarA et IsdA, permettant la capture de l'hème par l'intermédiaire de leur domaine NEAT ou near iron transporter (Mazmanian *et al.*, 2002 ; Mazmanian, 2003 ; Marraffini *et al.*, 2004). Le processus d'acquisition apparaît comme étant le suivant, sachant que sur l'ensemble de ces protéines, celui d'IsdD reste encore méconnu :

- L'hème est lié puis extrait de l'hémoprotéine par l'intermédiaire des facteurs IsdB et IsdH à la surface de la cellule.
- L'hème est ensuite relayé à travers le peptidoglycane par le domaine NEAT de la protéine IsdA puis de IsdC, servant de conduit principal jusqu'à la lipoprotéine IsdE au niveau de la membrane cellulaire. IsdE est associée à une perméase membranaire IsdF, IsdE et IsdF formant ainsi les deux composants d'un transporteur de type ABC (Tiedemann, Heinrichs, et Stillman 2012; Grigg et al. 2007).
- Une fois internalisé, l'hème est dégradé par l'intermédiaire d'une ou deux monooxygénases que sont IsdG et IsdI (Eric P. Skaar, Gaspar, et Schneewind 2004).

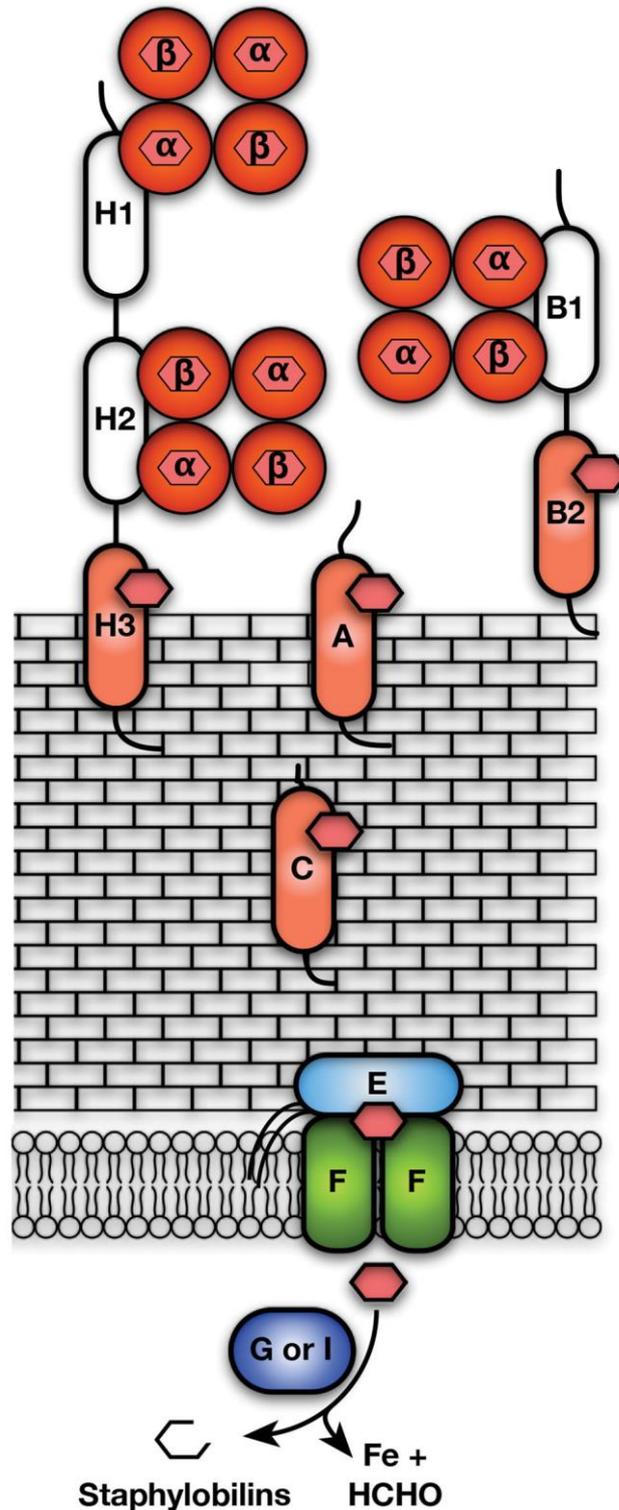


Figure 12: Modèle représentant le système Isd (iron-regulated surface-determinant) chez *Staphylococcus aureus* (d'après Sheldon *et al.*, 2015).

L'hémoglobine (hétérotétramère) est fixée par les domaines NEAT (NEAr iron Transporter) d'IsdH1, IsdH2 et le domaine NEAT d'IsdB1. L'hème est ensuite extrait de l'hémoglobine et se lie aux domaines NEAT d'IsdH3 et NEAT d'IsdB2, avant d'être transféré tour à tour à IsdA, IsdC puis IsdE au niveau de la membrane bactérienne. Après la translocation à travers la membrane IsdF-dépendante, l'hème cytosolique est probablement dégradé par les monooxygénases IsdG et IsdI.

Les protéines IsdB, IsdH, IsdA et enfin IsdC présentent une à trois copies du domaine NEAT, constitué par environ 120 résidus, qui bien qu'étant variables en termes de séquence primaire en acide-aminés, possèdent des structures secondaires très conservées (Erin S. Honsa, Maresso, et Highlander, 2014). Ces domaines NEAT, qui n'existent que chez les bactéries Gram-positives, permettent la fixation des hémoprotéines, l'extraction de l'hème qu'elles contiennent puis son passage à travers le peptidoglycane et la membrane cellulaire. La structure standard des domaines NEAT forme des repliements de type immunoglobuline, composés de 8 feuillets β antiparallèles et une séquence conservée SXXXXY formant une hélice α communément référencée comme la région labiale du domaine ou « lip » region (Gaudin et al. 2011; Pilpa et al. 2006; Erin S. Honsa, Maresso, et Highlander 2014). La fixation de l'hème se fait entre :

- Un des 8 feuillets β possédant un motif YXXXXY essentiel à la fixation de l'hème.
- La région labiale sur laquelle la première tyrosine du motif de liaison à l'hème (exemple : Y166 pour IsdA, Figure 13) fixe de façon non-covalente l'atome de fer central de l'hème, pendant que la seconde tyrosine (exemple : Y170 pour IsdA) permet la stabilisation de la première tyrosine par le biais de liaisons hydrogènes (Watanabe et al. 2008; Villareal et al. 2008).

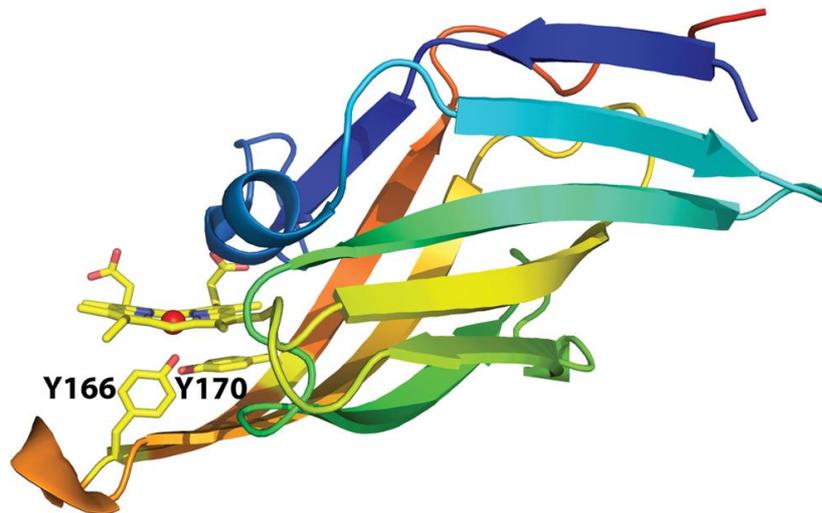


Figure 13: Structure globale du domaine NEAT de IsdA de *Staphylococcus aureus* (Adapté de Sheldon *et al.*, 2015).

Le diagramme en ruban illustre les structures N-terminales (bleu) et C-terminales (rouge) d'IsdA. L'hème (représentée par une sphere rouge) se lie sur ces domaines ainsi que les deux résidus tyrosine clefs (Y166 et Y170) permettant la fixation du fer et la stabilisation du complexe.

La variabilité de la séquence en acide-aminés des domaines NEAT de chaque protéine induit une fonctionnalité différente selon qu'il s'agisse de la fixation des hémoprotéines, d'extraire l'hème ou de transférer la molécule d'hème à un autre domaine NEAT de la même protéine ou d'une protéine différente. Chez *S. aureus*, IsdB et IsdH possèdent respectivement 2 et 3 domaines NEAT (Figure 14), tandis que IsdA et IsdC n'en possèdent qu'un seul. La reconnaissance et la fixation de l'hémoglobine ou du complexe hémoglobine-haptoglobine se fait de façon spécifique avec les domaines NEAT N-terminaux de IsdB et IsdH (Dryla *et al.*, 2007 ; Visai *et al.*, 2009 ; Dickson *et al.*, 2014). IsdB-N1 et IsdH-N2 sont capables de lier les sous-unités α et β de l'hémoglobine (α Hb et β Hb) tandis que IsdH-N1 ne peut fixer que les sous-unités α Hb (Figure 15, Pilpa *et al.*, 2006 ; Bowden *et al.*, 2014 ; Kumar *et al.*, 2011).

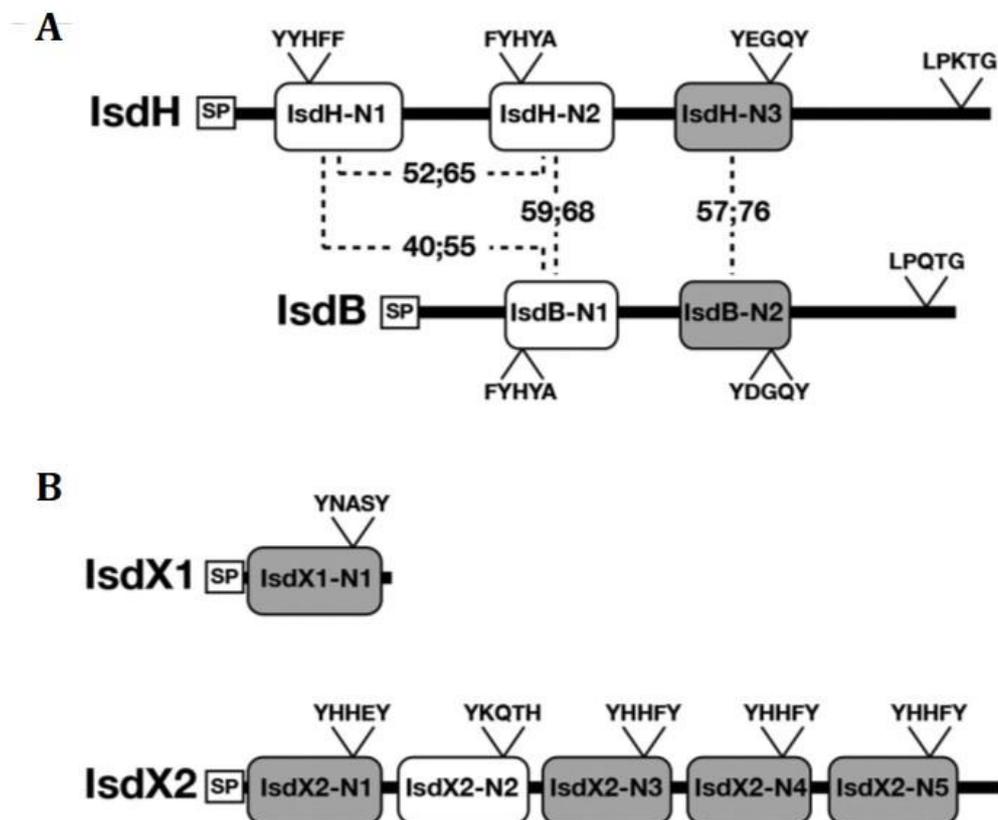


Figure 14 : Organisation des domaines protéiques NEAT de IsdH et IsdB chez *Staphylococcus aureus* et IsdX1 et IsdX2 chez *Bacillus anthracis* (d'après Sheldon *et al.*, 2015). A : Comparaison entre IsdH et IsdB de *S. aureus*. Les nombres représentent le pourcentage d'identité, suivis par le pourcentage total de similarité entre les domaines NEAT. B : Illustration des deux hémophores de *B. anthracis*. Les domaines NEAT représentés par une boîte blanche permettent la fixation de l'hème. Pour chaque domaine NEAT, la séquence liant soit l'hème soit l'hémoglobine est identifiée. SP: peptide signal.

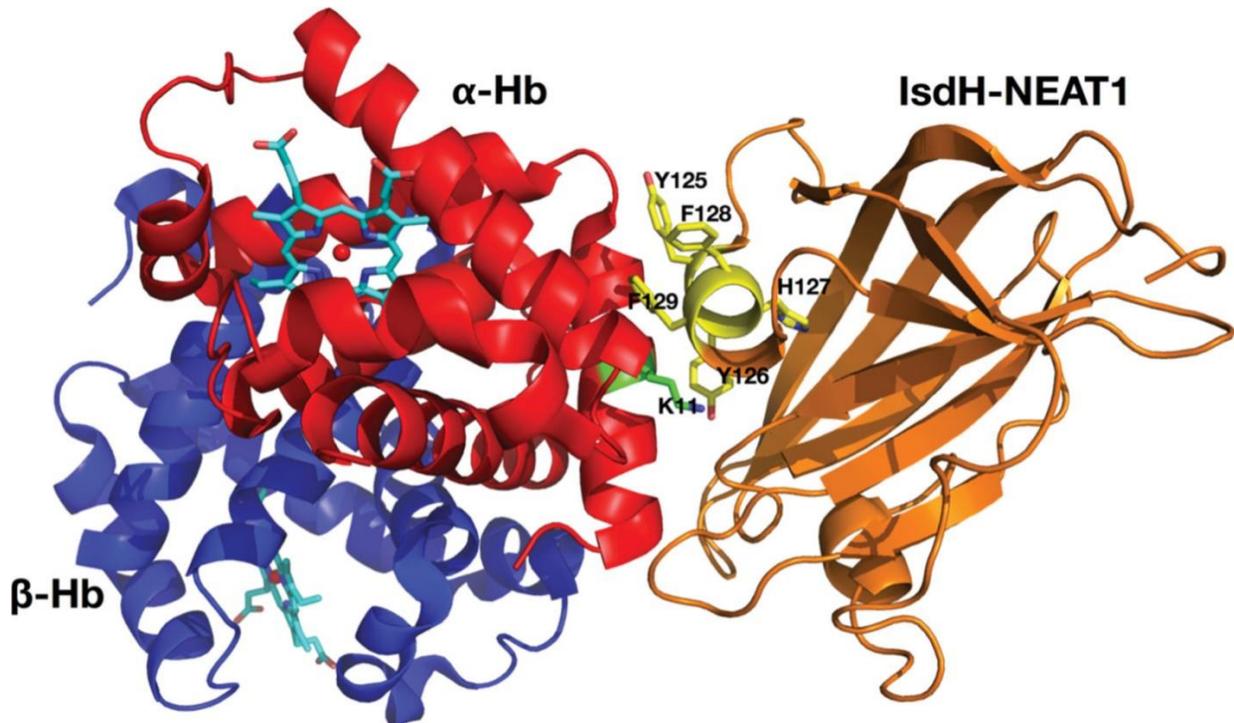


Figure 15 : Interaction entre le domaine NEAT 1 d'IsdH de *Staphylococcus aureus* avec la chaîne alpha de l'hémoglobine humaine. Le diagramme en ruban illustre la liaison de IsdH-N1 (orange) avec la sous-unité α Hb (rouge) du dimère $\alpha:\beta$ Hb (d'après Krishna Kumar *et al.* 2011).

Le système Isd possède chez *S. aureus* une importance biologique centrale dans le cadre de l'acquisition du fer lors de l'infection chez l'hôte. Il a été démontré récemment que Isd fonctionne comme un système d'acquisition du fer de l'hème à très forte affinité pour des concentrations nanomolaires d'hème et d'hémoglobine humaine (Pishchany *et al.*, 2014). De plus, Isd joue un rôle essentiel dans la virulence et le stress au cours de l'infection chez la souris, puisque la délétion simple de *isdA*, *isdB*, *isdC*, *isdG*, *isdH* ou *isdI* sont suffisants pour atténuer ces phénomènes (Pishchany *et al.*, 2014 ; Torres *et al.*, 2006 ; Reniere et Skaar, 2008 ; Visai *et al.*, 2009). En plus de son importance dans la virulence de *S. aureus*, Isd intervient dans la persistance et la formation d'abcès chez l'hôte (Cheng *et al.*, 2009).

5.2.1.2/ Le système Isd chez *B. cereus sensu lato*

Au sein du groupe *B. cereus*, le système d'acquisition de l'hème Isd est lui aussi parmi l'un des mieux décrits dans la littérature, avec des caractéristiques comparables à celles trouvées chez les staphylocoques mais présentant cependant quelques différences. Il a été démontré que *B. anthracis* possèdent les gènes codants pour IsdC et la sortase B au

même titre que *S. aureus*, tandis que les gènes exprimant IsdA, IsdB et IsdH sont absents (Gat *et al.*, 2008 ; A. W. Maresso, Chapa, et Schneewind, 2006). Afin de permettre la fixation de l'hème, *B. anthracis* exprime deux molécules nommées IsdX1 et IsdX2 possédant respectivement 1 et 5 domaines NEAT (Figure 14). Ces deux protéines ne présentent pas de domaines C-terminaux avec des motifs d'ancrage au peptidoglycane : elles sont sécrétées par la bactérie dans le milieu extérieur et sont donc considérées comme les premiers hémophores identifiés chez les bactéries Gram-positives, autrefois considérés comme n'étant l'apanage que des bactéries Gram-négatives (Anthony W. Maresso, Garufi, et Schneewind, 2008 ; Fabian *et al.*, 2009). IsdX1 et IsdX2 sont capables de lier l'hémoglobine de l'hôte, mais ne sont pas capables à l'inverse du système IsD de *S. aureus* de capter la myoglobine ou le complexe hémoglobine-haptoglobine (Gat *et al.*, 2008 ; Anthony W. Maresso, Garufi, et Schneewind, 2008 ; Ekworomadu *et al.*, 2012). Les domaines NEAT de IsdX1 (IsdX1-N1) et IsdX2 (IsdX2 N1 à N5) possèdent des fonctionnalités différentes, IsdX2-N2 présentant une histidine à la place de la seconde tyrosine, perturbant la fixation de l'hème au niveau du motif de liaison :

- IsdX1-N1 et IsdX2-N1, -N3, -N4 et -N5 lient l'hème grâce à un motif de liaison de l'hème conservé YXXXXY.
- IsdX1-N1 et IsdX2-N1 et -N5 ont la possibilité d'extraire l'hème de l'hémoglobine.
- Enfin, IsdX1-N1 et IsdX2-N1, -N3 et -N4 sont capables de transférer l'hème au domaine NEAT de la protéine IsdC (Erin Sarah Honsa et Maresso, 2011 ; Fabian *et al.*, 2009 ; Anthony W. Maresso, Garufi, et Schneewind, 2008).

Chez *B. anthracis*, la fixation de l'hème à la surface de la bactérie serait facilitée par BslK, une protéine avec des domaines d'homologie de la couche S (S-layer homology protein) permettant son ancrage de façon covalente au peptidoglycane et possédant un domaine NEAT (Tarlovsky *et al.*, 2010). De plus, une autre protéine nommée Hal (pour Heme-acquisition leucine rich-repeat protein) et codée par le gène *bas0520* a été mise en évidence récemment (Balderas *et al.*, 2012). Hal est capable de fixer l'hème directement ou de fixer l'hémoglobine afin d'en extraire l'hème. Au total, il est proposé comme modèle (Figure 16) que IsdX1 et BslK transfère l'hème extrait de l'hémoglobine à IsdC tandis que IsdX2 contrôle la quantité d'hème qui est transféré à IsdC. L'hème transite ensuite jusqu'au transporteur ABC homologue de *S. aureus* IsDEF avant que l'hème ne soit dégradée et le fer relargué dans le cytosol *via* l'action d'une oxygénase de type IsdG (Erin Sarah Honsa et Maresso, 2011 ; E. P. Skaar, Gaspar, et Schneewind, 2006).

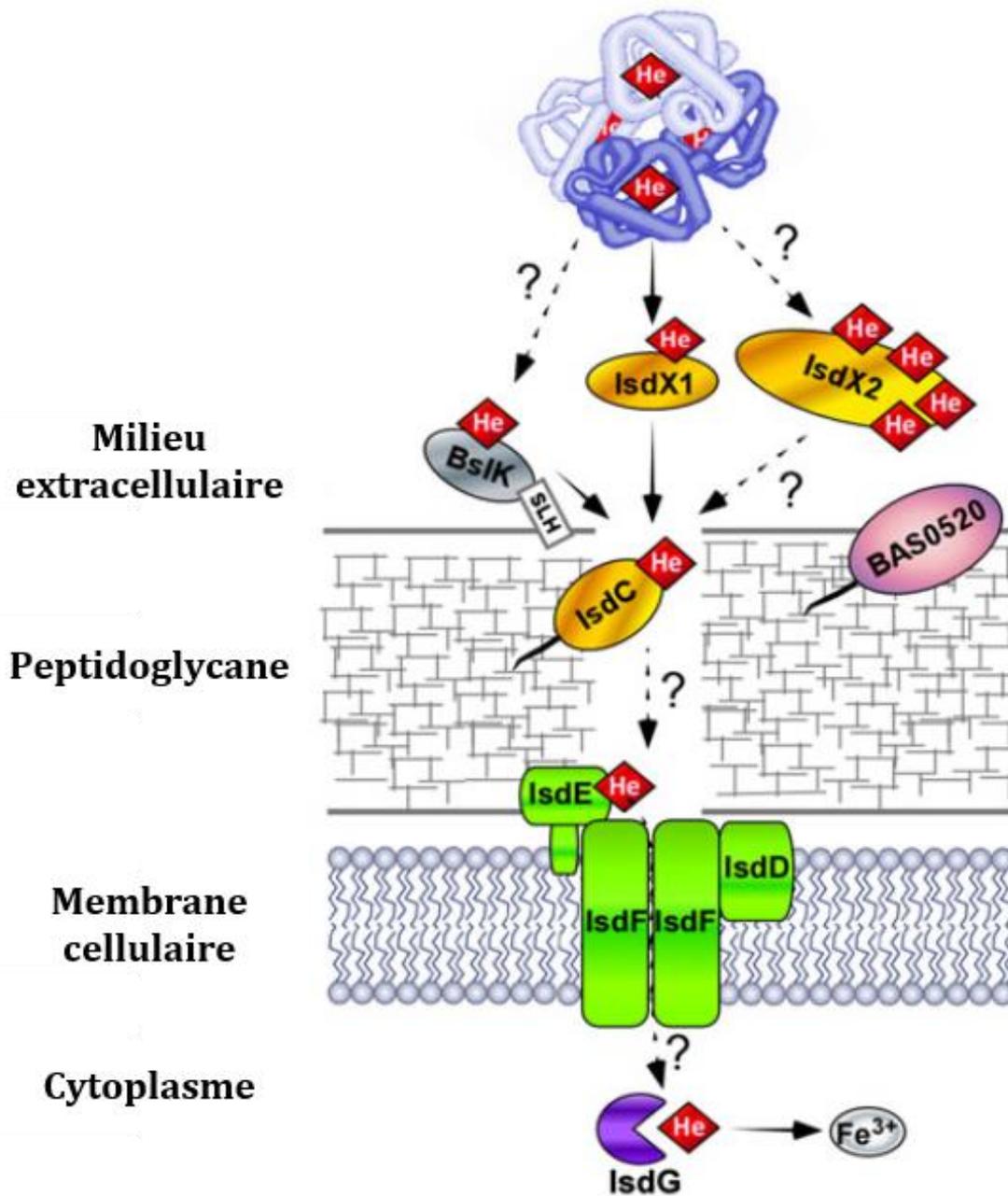


Figure 16 : Acquisition de l'hème chez *Bacillus anthracis* par les domaines NEAT des hémophores sécrétés IsdX1 et IsdX2 (respectivement 1 et 5 domaines NEAT), extrayant l'hème de l'hémoglobine, avec IsdX1 capable de transférer l'hème à IsdX2 et à la protéine IsdC ancrée au peptidoglycane. De plus, une protéine associée à la surface de la cellule, BslK, fixe l'hème avant de le diriger vers IsdC. Le rôle de BAS0520 (Hal) dans cette voie d'acquisition reste inconnu, mais la séquence du domaine NEAT semble prédire une implication dans l'acquisition de l'hème. IsdC semble ensuite permettre le passage de l'hème à travers la membrane cytoplasmique via IsdE et le transporteur de type ABC IsdEFD, utilisant de l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP. La monooxygénase IsdG permet la dégradation de l'hème et la libération de l'atome de fer. Les flèches pleines indiquent des interactions entre domaines NEAT confirmées, tandis que les flèches pointillées sont des propositions de voies de transfert entre domaines NEAT chez *B. anthracis* (d'après Honsa et Maresso, 2011).

Si le système Isd chez les espèces du groupe *B. cereus* est important, son altération n'impacte pas de façon essentielle l'acquisition du fer de l'hémoglobine et de l'hème. En effet, la délétion du locus des gènes IsdC et BslK n'abolit pas l'utilisation de l'hème et de l'hémoglobine chez *B. anthracis* (A. W. Maresso, Chapa, et Schneewind, 2006 ; Balderas *et al.*, 2012), tandis que la triple délétion des gènes *isdC*, *isdX1* et *isdX2* n'induisent pas une virulence plus importante de *B. anthracis* chez l'hôte (Gat *et al.*, 2008), tandis que chez *S. aureus* la délétion de ces gènes atténue la virulence de la bactérie. La délétion du gène codant pour la protéine Hal conduit à un impact plus important de la croissance en comparaison de la délétion de l'opéron *isd* ou du gène codant pour BslK chez *B. anthracis*, dans des milieux ne contenant comme unique source de fer que l'hème ou l'hémoglobine. Ces données suggèrent que Hal joue un rôle essentiel quant à l'acquisition du fer de l'hème et de l'hémoglobine.

5.2.1.3/ IIsA : une protéine unique chez *B. cereus*

Si le système Isd est décrit de manière exhaustive chez *B. anthracis*, d'autres études menées chez *B. cereus* ont mis en lumière l'existence d'une autre protéine importante dans l'acquisition de diverses sources de fer chez l'hôte : IIsA (Figure 17). Cette protéine a été identifiée en 2006 pour la première fois grâce à un système IVET ou *in vivo* expression technology (Sinda Fedhila *et al.* 2006). Cette technique a permis l'identification de nouveaux gènes exprimés spécifiquement *in vivo* au cours de l'infection par voie orale de *G. mellonella*.

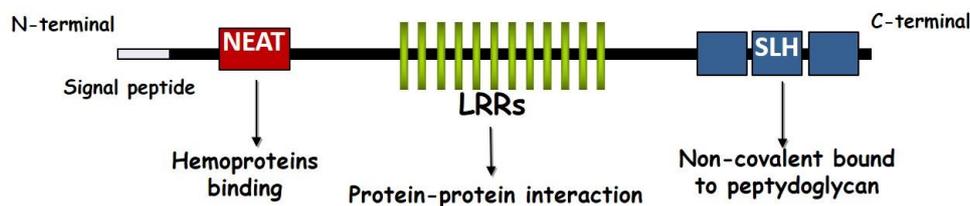


Figure 17: Représentation schématique de la protéine IIsA. Les domaines conservés sont indiqués : NEAT : NEAr iron Transporter ; LRRs : Leucine Rich Repeat ; SLH : Surface Layer Homology (d'après Fedhila *et al.*, 2006 et Daou *et al.*, 2009).

IIsA présente 4 domaines conservés : un peptide signal de 28 acides-aminés dans son domaine N-terminal, puis un domaine NEAT suivi d'un domaine LRR (Leucine-rich repeat) permettant les interactions protéine-protéine et enfin 3 domaines SLH (S-layer

homology) en C-terminal. Cette protéine est ainsi localisée à la surface de la bactérie et exprimée uniquement en condition de carence en fer. Sa région promotrice possède une boîte *fur* corrélant ce phénotype d'expression, Fur étant le régulateur principal de l'homéostasie du fer chez de nombreuses bactéries (Daou *et al.*, 2009). IlsA est unique chez les procaryotes : en effet, elle est capable de lier l'hème et les hémoprotéines grâce à son domaine NEAT, mais aussi la ferritine probablement par son domaine LRR (Daou *et al.*, 2009). Il a récemment été montré le rôle essentiel d'IlsA dans la fixation de la ferritine de rate de cheval à la surface de la bactérie, et la libération du fer contenu dans la ferritine humaine (Segond *et al.*, 2014). IlsA reconnaît indifféremment les sous-unités H et L de la ferritine humaine ou de souris, comme l'ont démontré les tests en ITC (Isothermal Titration Calorimetry). Ainsi, 24 protéines IlsA peuvent lier une molécule de ferritine constituée de 24 sous-unités. La libération du fer dans le milieu extérieur va ensuite nécessiter un second partenaire, la bacillibactine (sidérophore de type catécholate) dont nous détaillerons l'importance chez *B. cereus* plus loin. Enfin, IlsA joue un rôle dans l'acquisition de l'hème et des hémoprotéines, et est capable de transférer grâce à son domaine NEAT l'hème au domaine NEAT de IsdC (Figure 18 et 19, Abi-Khalil *et al.*, 2015). Ce phénomène vient compléter le panel des protéines possédant un domaine NEAT présenté chez *B. anthracis*, permettant de constater chez les espèces du groupe *B. cereus* un large panel de protéines capables de fixer et utiliser de nombreuses sources de fer. En revanche, il ne semble pas exister, au contraire de *S. aureus* ou chez certaines bactéries Gram-négatives, de systèmes permettant l'utilisation de la transferrine ou la lactoferrine comme source de fer.

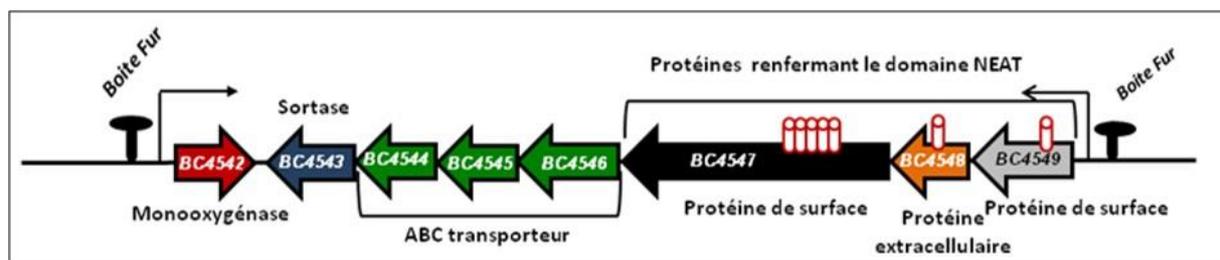


Figure 18: Représentation schématique du locus *isd* chez *B. cereus*

Le locus *Isd* de *B. cereus* est composé de trois protéines à domaine NEAT: BC4549, BC4548 et BC4547. Le nombre de domaines NEAT est symbolisé par les cylindres rouges. Les motifs « NPKTG » et « NSKTA » de BC4549 et BC4547 respectivement, sont les substrats de la sortase B putative (BC4543). Le système ABC est formé de la protéine de liaison au ferrichrome (BC4546), une perméase (BC4545) et d'une ATPase (BC4544). Le système renferme deux boîtes Fur, une en amont de la monoxygénase (BC4542) et une deuxième en amont de la première protéine de surface (BC4549). D'après Abi-Khalil *et al.*, 2015.

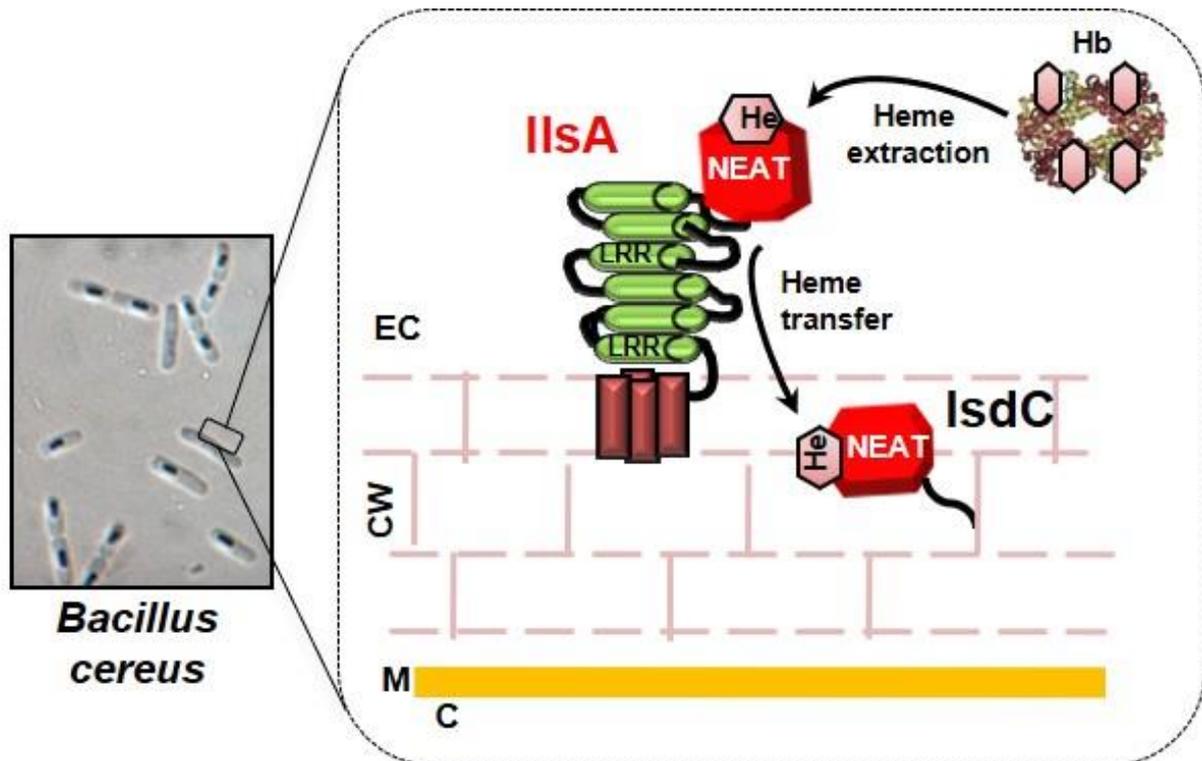


Figure 19: Représentation schématique de l'interaction entre IIsA et IsdC pour l'acquisition du fer de l'hème chez *B. cereus*. Le domaine NEAT d'IIsA est capable de fixer l'hème ou de l'extraire de l'hémoglobine, puis de transférer la molécule d'hème au domaine NEAT d'IsdC, illustrant ainsi l'interaction entre deux systèmes distincts d'acquisition de l'hème chez *Bacillus cereus*. EC : milieu extracellulaire ; CW : peptidoglycane ; M : membrane cytoplasmique ; C : cytoplasme ; Hb : hémoglobine ; He : hème ; NEAT : NEAr iron Transporter ; LRR : Leucine Rich Repeat (d'après Abi-Khalil *et al.*, 2015).

5.2.1.4/ Autres systèmes connus chez *B. cereus*

Bien que moins décrits dans la littérature, et en raison de la faible quantité de publications existantes, il existe chez les bactéries Gram-positives et en particulier chez les espèces du groupe *B. cereus* des systèmes d'acquisition du fer inorganique. En effet, dans des environnements pauvres en oxygène ou à faible pH (favorisant la réduction plutôt que l'oxydation), le fer ferreux (Fe^{2+}) peut être importé dans la cellule par le biais de transporteurs possédant une forte affinité pour les ions Fe^{2+} .

L'un de ces systèmes concerne FeoAB (ferrous iron importer), très conservé et ubiquitaire chez les bactéries Gram-positives bien qu'il soit peu caractérisé (Sheldon, Laakso, et Heinrichs, 2016). Il se constitue de deux petites molécules hydrophiles (FeoA et FeoC) et d'une permease (FeoB) : FeoA interagit avec FeoB afin de permettre l'acquisition du fer ferreux tandis que FeoC se fixe sur FeoB pour empêcher sa protéolyse et ainsi le rôle de

régulateur post-traductionnel de FeoB (Lau, Krewulak, et Vogel, 2016 ; H. Kim, Lee, et Shin, 2013 ; Hyunkeun Kim, Lee, et Shin, 2012).

Le système EfeUOB (elemental ferrous iron uptake system) est lui aussi distribué chez de nombreuses bactéries Gram-négatives et Gram-positives, et en particulier chez l'organisme modèle *B. subtilis*, dont l'expression est indépendante de Fur, régulateur majeur de l'homéostasie du fer chez les bactéries (Marcus Miethke *et al.*, 2013 ; Roy et Griffith, 2017). S'il n'a pas été caractérisé chez *B. cereus*, la proximité entre les deux espèces et la distribution large de ce système ou d'homologues chez d'autres bactéries Gram-positives à faible pourcentage en bases GC telles que *L. monocytogenes* ou *S. aureus* méritent de le mentionner. Il se compose de trois protéines : EfeU est une perméase d'ions ferriques (Fe^{3+}) traversant la membrane cytoplasmique et interagissant avec la peroxydase membranaire EfeB. EfeB catalyse l'oxydation du fer ferreux (Fe^{2+}) constituant la première étape d'oxydo-réduction permettant le transport des ions Fe^{3+} . Enfin, la lipoprotéine EfeO permet la fixation des ions Fe^{3+} formés avant de les transférer à EfeU.

5.2.2/ Voie d'acquisition indirecte

Chez les bactéries Gram-positives, les sidérophores vont être liés à la surface de la couche de peptidoglycane par des protéines spécifiques de liaisons des complexes sidérophore- Fe^{3+} avant de diffuser jusqu'à un transporteur de type ABC (Figure 18), relativement similaire à ce que l'on retrouve chez les bactéries Gram-négatives (Figure 20, Wandersman et Delepelaire, 2004).

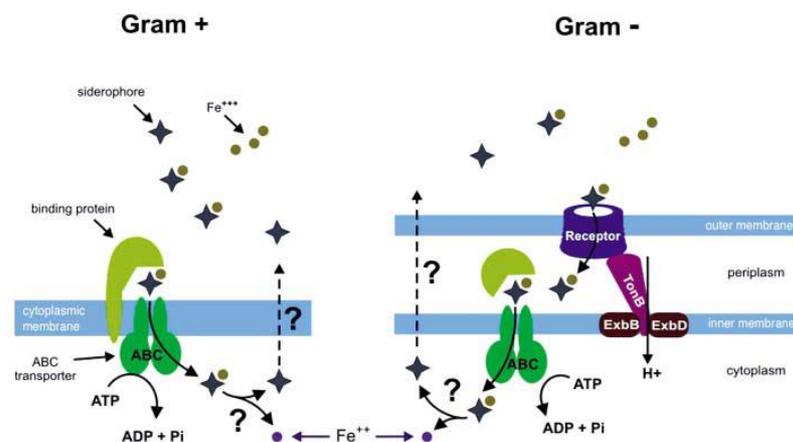


Figure 20: Comparaison de la sécrétion dans le milieu extérieur et de l'internalisation des sidérophores chez les bactéries Gram-positives (gauche) et Gram-négatives (droite). D'après Wandersman *et al.*, 2004.

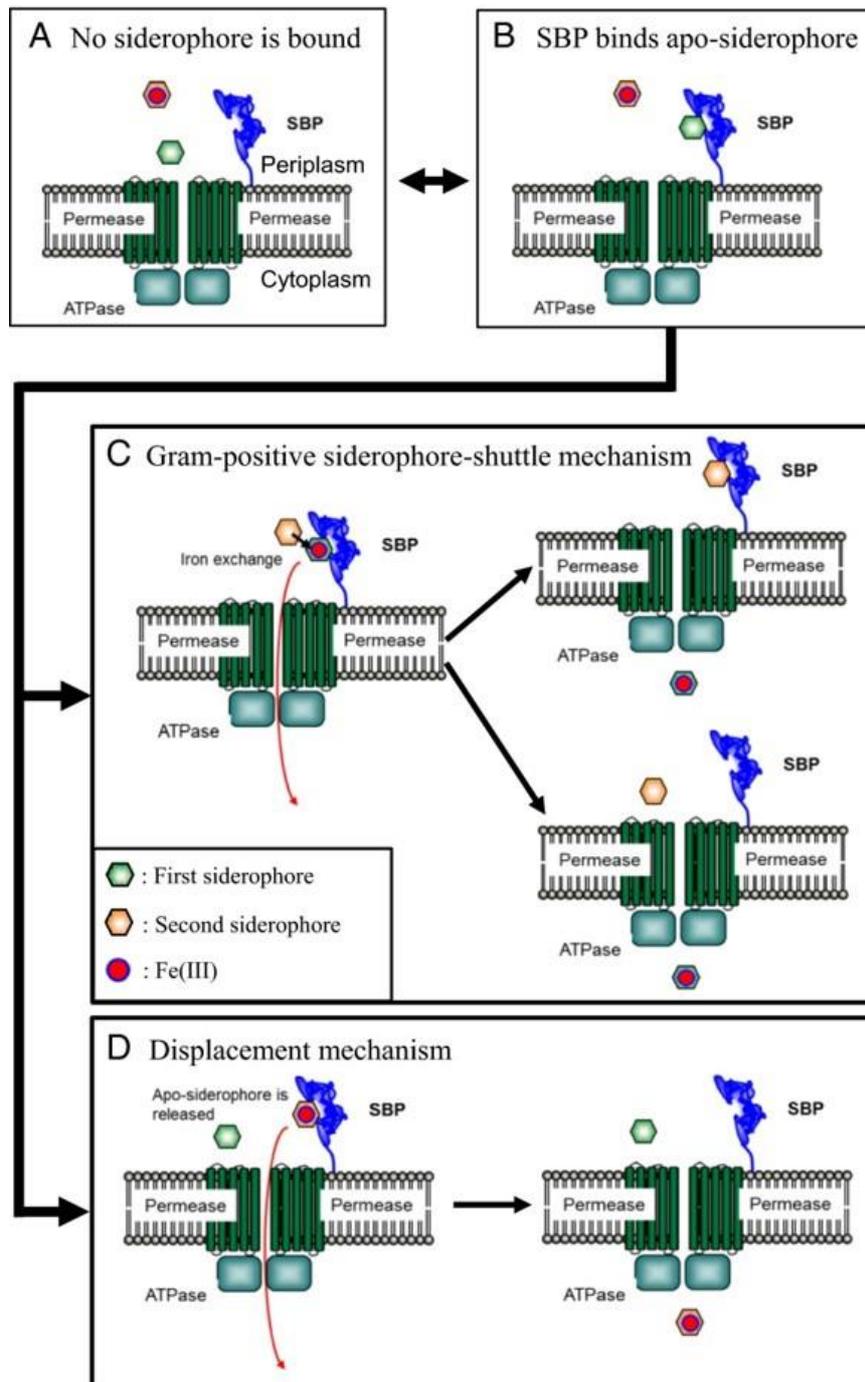


Figure 21: Mécanisme d'internalisation possible des holo-sidérophores (Fe-sidérophore) chez les bactéries Gram-positives. **A** : Aucun sidérophore n'est fixé sur la SBP (Siderophore Binding Protein : protéine de liaison du sidérophore). **B** : Lorsque l'apo-sidérophore est lié au SBP, deux mécanismes de déplacement sont possible : **C** : Le mécanisme de navette des sidérophores chez les bactéries Gram-positives. Le fer est transféré depuis l'holo-sidérophore au complexe apo-sidérophore-SBP, et le nouveau complexe sidérophore-Fe³⁺ est ensuite importé dans le cytoplasme. Le devenir du nouvel apo-sidérophore reste indéterminé, à savoir s'il reste lié au SBP ou s'il est libéré après l'échange de l'atome de fer. **D** : Le mécanisme dit de déplacement. L'apo-sidérophore est libéré par le SBP et remplacé par l'holo-sidérophore. Il n'y a pas d'échange de fer entre les deux sidérophores, et l'holo-sidérophore original est transporté dans le cytoplasme (d'après Fukushima *et al.*, 2013).

Au sein du groupe *B. cereus* on distingue deux sidérophores produits par les espèces qui composent ce groupe et décrit plus particulièrement chez *B. cereus sensu stricto* et *B. anthracis*: la bacillibactine (catécholate) et la pétrobactine (catécholate-carboxyl) (Cendrowski, MacArthur, et Hanna 2004; Wilson et al. 2006). Ces deux sidérophores sont synthétisés par des opérons spécifiques, exportés dans le milieu extérieur puis réimportés par leurs transporteurs spécifiques. Les mécanismes de réimport des complexes sidérophores-Fe³⁺ *via* leurs protéines de liaisons spécifiques ont été étudiés chez les bactéries Gram-positives (Fukushima *et al.*, 2013b ; Fukushima, Allred, et Raymond, 2014), et en particulier chez *B. cereus*, indiquant un système qualifié de déplacement ou un système de navettes qui semble majoritairement employé (Figure 21).

- La bacillibactine est un trimère cyclique composé de glycine, thréonine et de trois résidus acide 2,3-dihydroxybenzoïque (DHBA), le DHBA représentant l'unité la plus commune de coordination du fer utilisée par les sidérophores de type catécholate (M. Miethke et Marahiel, 2007). La bacillibactine est codée par l'opéron *entA-dhbACEBF* (Figure 23) dont l'expression est régulée par Fur, et la synthèse de la molécule se fait exclusivement par un système NRPS (May, Wendrich, et Marahiel, 2001 ; Hotta *et al.*, 2010). Elle est sécrétée ensuite dans le milieu extérieur par un transporteur de type MFS codé par *ymfD* (M. Miethke, Schmidt, et Marahiel, 2008) et le réimport du complexe bacillibactine-Fe³⁺ se fait par l'intermédiaire probable d'un transporteur de type ABC codé par l'opéron *feuABCD/yuiI* régulé lui aussi par Fur (Hotta *et al.*, 2010 ; Zawadzka *et al.*, 2009). FeuA joue le rôle de protéine de liaison du sidérophore au niveau du peptidoglycane, les expériences menées chez l'organisme considéré modèle *Bacillus subtilis* montrant une affinité de FeuA pour le complexe bacillibactine-Fe³⁺ de l'ordre du nanomolaire et son importance dans l'import de la bacillibactine pour permettre la croissance de *B. subtilis* en milieu minimum (Zawadzka *et al.*, 2009 ; Peuckert *et al.*, 2011). De façon intéressante, chez *B. cereus*, FeuA fixe de façon indistincte la bacillibactine et sa molécule chirale l'entérobactine, tandis que *B. subtilis* ne reconnaît que le complexe bacillibactine-Fe³⁺ (Bluhm *et al.*, 2002). La protéine YuiI permet l'hydrolyse dans le cytosol du sidérophore chargé en fer. Toutes ces protéines sont très conservées au sein du groupe *B. cereus* mais possèdent un rôle d'une importance variable selon les espèces. En effet, la bacillibactine possède chez *B. cereus* un rôle central dans le cadre de l'acquisition

du fer de la ferritine (Figure 22) liée à la surface de la bactérie par IIsA, à la fois *in vitro* et dans la virulence *in vivo* lorsque la bactérie est injectée dans l'hémocoel de *G. mellonella* au contraire de la pétrobactine (Daou *et al.*, 2009 ; Segond *et al.*, 2014).

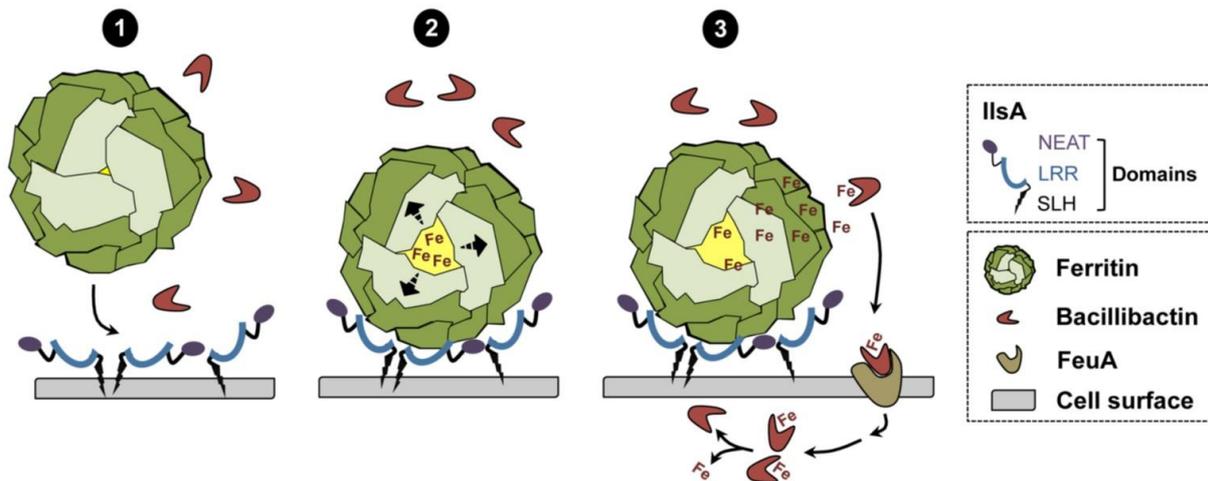


Figure 22: Modèle de l'acquisition du fer de la ferritine chez *Bacillus cereus*. 1 : En milieu carencé de fer, IIsA est synthétisée et ancrée à la surface de la cellule bactérienne, permettant la liaison de la ferritine et ainsi le recrutement de nombreuses molécules de ferritine à la surface de la cellule bactérienne. 2 : Suite à cette interaction, le modèle propose qu'IIsA déstabilise la structure de la ferritine ou permet une meilleure accessibilité au noyau de fer de la ferritine. 3 : Le fer est par conséquent libéré dans le milieu extérieur grâce à l'action d'IIsA et se trouve chélaté notamment par la bacillibactine, avant que le complexe bacillibactine-Fe³⁺ ne soit importé dans la cellule *via* FeuA puis relargué dans le cytoplasme (d'après Segond *et al.*, 2014).

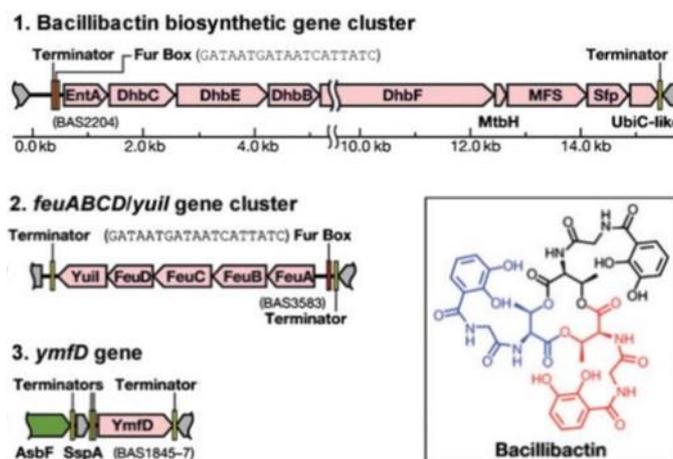


Figure 23: Voie de synthèse de la bacillibactine chez *Bacillus anthracis*. 1 : Les gènes *entA-dhbACEBF* sont impliqués dans l'expression des enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse de la bacillibactine (encadrée) ; 2 : les gènes codants pour le système d'import de la bacillibactine couplée au fer dans le cytoplasme de la bactérie se regroupent sous l'opéron *feuABCD/Yuif* ; 3 : *ymfD* code pour un transporteur de type MFS permettant l'export de la bacillibactine dans le milieu extrérior (d'après Hotta *et al.*, 2010).

- La pétrobactine est un sidérophore possédant différents groupements catécholates et carboxylates. Elle possède une structure linéaire contenant une unité centrale de type citrate et des résidus DHBA différents de la bacillibactine (2,3-DHBA), leur hydroxylation formant des résidus 3,4-DHBA permettant la fixation du fer (Koppisch et al. 2005). La présence de ces types de résidus, uniquement présent chez la pétrobactine et ses dérivés sulfonés, ont un rôle biologique important dans le développement de l'organisme (Hotta et al. 2010). Son rôle est essentiel dans le développement et la pathogénicité de *B. anthracis*, alors que chez *B. cereus* elle n'intervient pas dans l'acquisition du fer de la ferritine *in vitro* ou dans la virulence après injection intra-hémocoelique chez *G. mellonella* (Cendrowski, MacArthur, et Hanna, 2004 ; Segond *et al.*, 2014). Les gènes codant pour la pétrobactine (Figure 25) se regroupent sous l'opéron *asbABCDEF* (anthrax siderophore biosynthesis) et la synthèse de la molécule se fait *via* deux systèmes : NRPS (AsbC, AsbD et AsbE) et enzymatique de type NIS (AsbA et AsbB). Enfin, une synthétase 3-dehydroshikimate/3,4-DHBA est nécessaire pour la production des résidus 3,4-DHBA (Cendrowski, MacArthur, et Hanna, 2004 ; J. Y. Lee *et al.*, 2007 ; Pflieger *et al.*, 2008). Si on ne connaît toujours pas de transporteur permettant la sécrétion de la pétrobactine dans le milieu extérieur, des études récentes ont identifié deux protéines, FatB (régulé par Fur) et FpuA (non régulé par Fur) comme étant capable de lier le complexe pétrobactine-Fe³⁺ à la surface de *B. anthracis* et *B. cereus* (Zawadzka *et al.*, 2009), bien que FpuA seul est important dans la fixation de ce complexe (Carlson Jr *et al.*, 2010). En effet, un mutant $\Delta fpuA$ chez *B. anthracis* est suffisant pour atténuer la croissance en milieu carencé en fer ainsi que la virulence lors d'une infection de spores de *B. anthracis* par inhalation chez la souris (Carlson Jr *et al.*, 2010). FatB est en revanche capable de fixer avec 100 fois plus d'affinité les résidus 3,4-DHBA libres en comparaison des complexes pétrobactine-Fe³⁺, ce qui suggère son implication dans l'acquisition de 3,4-DHBA chargé en fer (Zawadzka *et al.*, 2009). L'acquisition du complexe pétrobactine-Fe³⁺ est médiée par 3 transporteurs ABC (Figure 24) utilisant chacun FpuA comme protéine de liaison de ce complexe (Dixon *et al.*, 2012). Deux de ces transporteurs utilisent la perméase FpuB, et FpuC ou FpuD comme ATPase (FpuB/FpuC ou FpuB/FpuD), tandis que le 3^{ème} transporteur est composé de la perméase FatCD et de l'ATPase FatE (Dixon *et al.*, 2012).

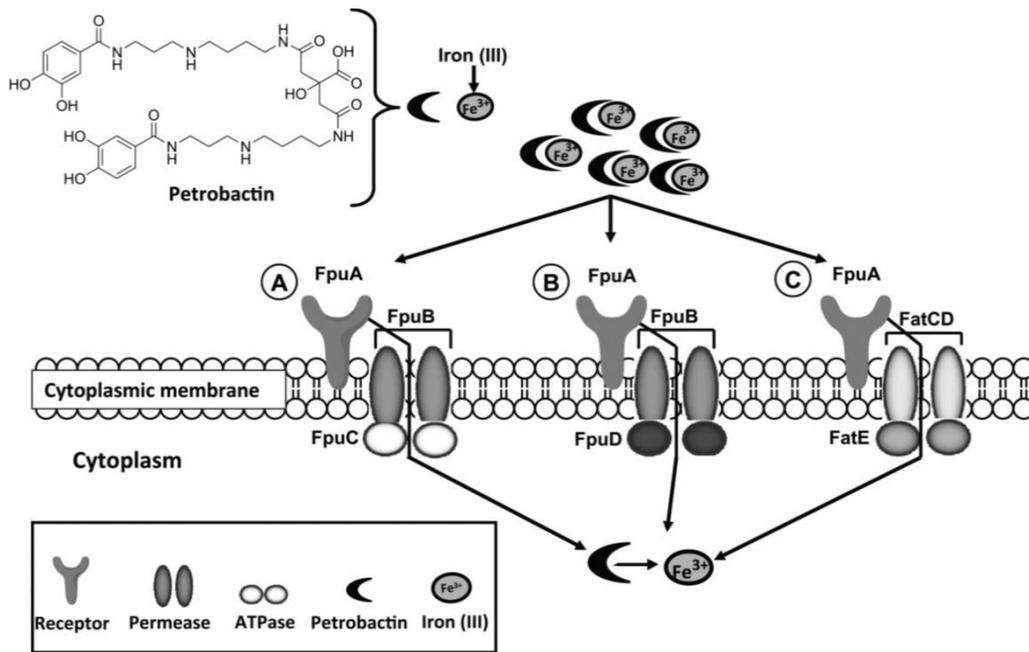


Figure 24: Modèle proposé chez *Bacillus anthracis* pour l'import dans la cellule de la pétrobactine. Les protéines nécessaires pour le réimport de l'holo-pétrobactine (Fe-pétrobactine) requièrent i) le SBP (Siderophore Binding Protein : protéines de liaison du sidérophore) FpuA, ii) deux perméases : FpuB (complexes A et B) ou FatCD (complexe C), et enfin iii) trois ATPases cytoplasmiques, respectivement FpuC, FpuD et FatE (d'après Dixon *et al.*, 2012).

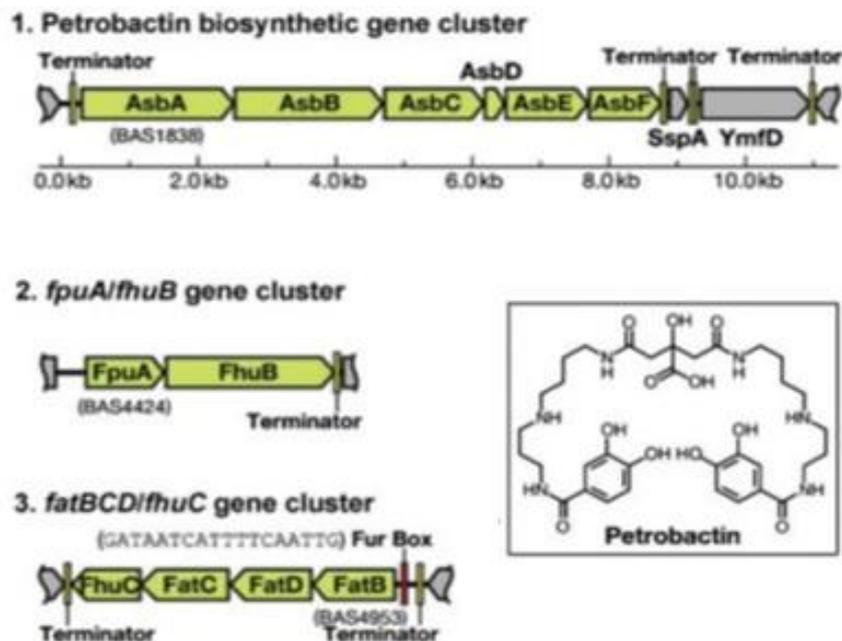


Figure 25: Voie de synthèse de la pétrobactine chez *Bacillus anthracis*. 1 : L'opéron *asbABCDEF* codant pour les enzymes intervenant dans la voie de biosynthèse de la pétrobactine (encadrée) ; 2 et 3 : Les opérons *fpuA/fhuB* et *fatBCD/fhuC* codent pour les protéines permettant l'import de la pétrobactine dans la cellule (d'après Hotta *et al.*, 2010).

5.3/ Régulation de l'homéostasie du fer chez les bactéries

5.3.1/ Carence en fer

Chez les bactéries Gram-négatives et Gram-positives à faible pourcentage en bases GC (Firmicutes) telles que *S. aureus*, *Bacillus spp* et *L. monocytogenes*, le régulateur majeur de l'homéostasie du fer est le répresseur transcriptionnel Fur pour Ferric uptake regulator (Fillat, 2014 ; Ollinger *et al.*, 2006). Chez les Actinomycètes où le pourcentage en base GC est plus élevé, comme par exemple *C. diphtheriae*, cette fonction est remplie par DxtR (diphtheriae toxin repressor), tandis que chez les streptocoques de groupe A (GAS) comme par exemple *S. pyogenes*, c'est MtsR (metal transporter of streptococci regulator) qui contrôle l'expression des gènes impliqués dans l'acquisition du fer et la virulence (Kunkle et Schmitt, 2003 ; Toukoki *et al.*, 2010). Bien que possédant une faible homologie de leur séquences globales, Fur, DxtR et MtsR sont structurellement et fonctionnellement analogues : chacune d'entre elle est une métalloprotéine homodimérique fonctionnant principalement comme répresseurs transcriptionnels des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer. Chaque monomère possède un motif de liaison à l'ADN en forme d'hélice-coude-hélice, un domaine de dimérisation et un site de liaison au fer ferreux (Fe^{2+}) jouant le rôle de co-répresseur (Pohl *et al.*, 2003). Lorsque le fer est en quantité suffisante dans le milieu, il s'associe à chaque sous-unité de la protéine capable de se fixer à l'ADN sur des séquences consensus (pour Fur chez *B. cereus* : TTAGGTTAGCCTAACCTAA) localisées au sein des régions promotrices des gènes cibles, bloquant l'accès à l'ARN polymérase et par conséquent la transcription des gènes situés en aval (Fillat, 2014). Lorsque le milieu est carencé en Fer, il y a dissociation entre les molécules de Fer et la métalloprotéine, ce qui lève la répression transcriptionnelle. Récemment, il a été démontré que la régulation des gènes régulés par Fur chez *B. subtilis* s'effectue de façon séquentielle (Pi et Helmann, 2017b). Chez différentes souches de *B. cereus*, une analyse transcriptomique des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer *in vitro* en milieu carencé en fer a montré une augmentation de l'expression des gènes codants pour la bacillibactine, le système Isd, IIsA ou encore l'ensemble des protéines de liaison des sidérophores (Hayrapetyan *et al.*, 2016).

5.3.2/ Excès de fer

Si les bactéries contrôlent l'expression de leurs gènes en milieu carencé en fer, elles possèdent aussi des systèmes de régulation en cas d'excès de fer ou d'hème, qui est toxique pour les cellules à forte concentration. Un équilibre doit être maintenu afin de maintenir une concentration adéquate d'hème dans le cytosol et une régulation doit s'effectuer ainsi entre import, export, synthèse et dégradation pour contrer la fluctuation de la concentration en hème dans l'environnement (Figure 26). Chez les bactéries Gram-positives il existe 3 mécanismes conservés en termes de fonction. Tout d'abord, les systèmes présentés plus haut (Isd, IIsA, sidérophores) vont être réprimés transcriptionnellement par les régulateurs tels que Fur, DtxR ou MtsR selon les espèces en se fixant sur les régions promotrices en amont de ces gènes. Deuxièmement, les bactéries produisent des protéines telles que les oxygénases permettant de dégrader l'hème. Enfin, des systèmes senseurs répondant aux modulations de la concentration en hème vont réguler l'efflux de cette molécule présente en excès dans le cytosol (Sheldon, Laakso, et Heinrichs, 2016).

Parmi les systèmes connus, nous pouvons citer HrtA et HrtB (heme-regulated transporter) chez *S. aureus*, codés par l'opéron *hrtAB* où l'ATPase HrtA voit sa concentration augmenter drastiquement en réponse à la présence d'hème, et HrtB proposé comme pompe à efflux dans ce système (Friedman *et al.*, 2006). HrtAB est régulé par un système à deux composants HssRS activé en présence d'excès d'hème par une cascade de phosphorylation (Stauff et Skaar, 2009). Des orthologues de ce système se retrouvent largement distribué au sein des Firmicutes, et en particulier chez *B. anthracis* et *C. diphtheriae*. Une délétion de l'opéron *hrtAB* ou de *hssRS* entraîne chez ces espèces une forte sensibilité à l'hème (Stauff et Skaar, 2009 ; Stauff, Torres, et Skaar, 2007). Récemment, un nouveau système, HatRT, a été mis en évidence chez *Clostridium difficile*, bactérie Gram-positif strictement anaérobie infectant le colon. Au cours de l'infection, HatR permet de détecter la concentration en hème dans le cytoplasme, et va influencer l'expression de la pompe à efflux HatT afin de permettre l'export d'hème en cas d'excès dans la cellule (Knippel *et al.*, 2018). D'autres systèmes chez *B. subtilis* peuvent être mentionnés et jouent eux aussi un rôle important dans l'évacuation des ions Fe²⁺. On retrouve par exemple l'ATPase de type P_{1B} PfeT ou encore le régulon PerR, un membre de la famille des métalloprotéines régulatrices telles que Fur et permettant la détoxification des radicaux peroxydes (Pi et Helmann, 2017a).

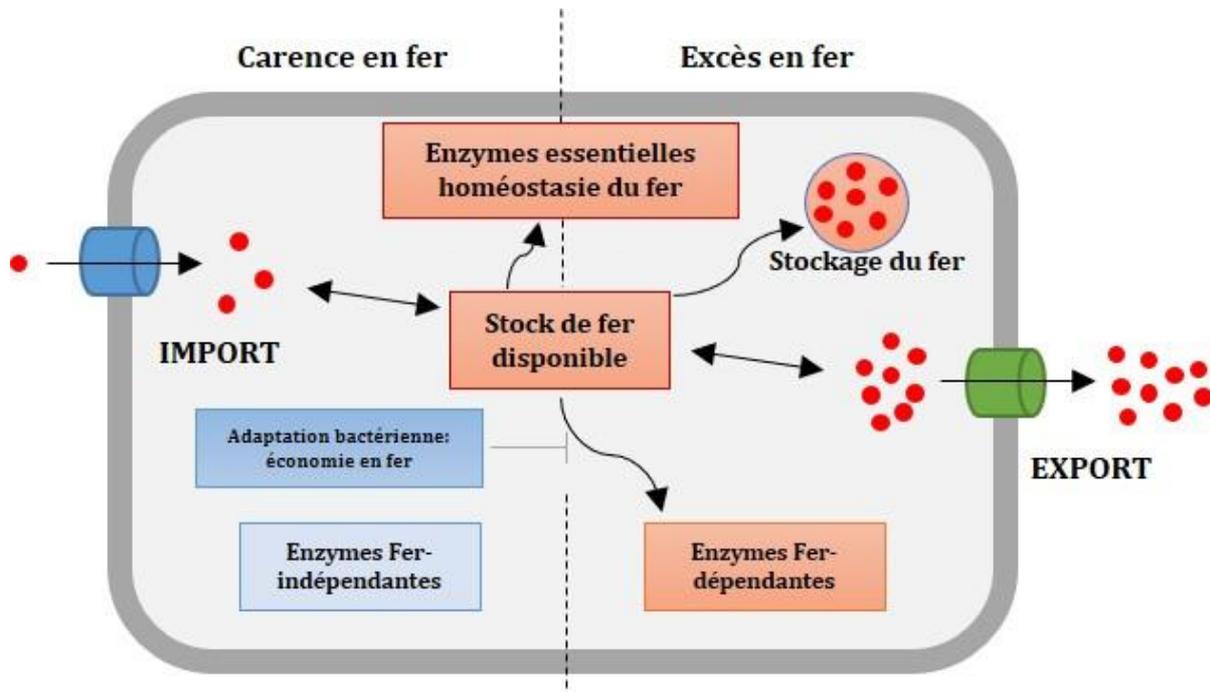


Figure 26 : Schématisation de l'homéostasie du fer chez les bactéries. En condition de carence en fer (à gauche), les systèmes d'acquisition à forte affinité au fer sont induits afin de capter le fer environnant et ainsi maintenir le stock de fer disponible dans la cellule. Lorsque le fer est limitant, ce stock va être partagé afin d'assurer les fonctions cellulaires essentielles, et la bactérie va économiser le fer disponible en inhibant son incorporation à des enzymes moins prioritaires pour son développement. Dans de nombreux cas, les enzymes fer-indépendantes vont prendre le relais d'autres enzymes ou fonctions qui nécessitent normalement du fer. En cas d'excès en fer (à droite), la bactérie va stocker le surplus ou expulser la surcharge *via* des pompes à efflux afin de prévenir la toxicité de l'excès en Fe^{2+} . Les points rouges indiquent les atomes de fer, la bande gris foncé schématise la paroi cellulaire et le remplissage gris clair représente le cytoplasme de la bactérie (d'après Pi et Helmann, 2017).

2. Objectifs de la thèse

1/ Synthèse de la problématique

Au sein de l'équipe Génétique Microbienne et Environnement (GME), les projets de recherche se focalisent sur le groupe *Bacillus cereus*, et en particulier deux espèces que sont *B. thuringiensis* et *B. cereus*, bactéries Gram-positives sporulantes de l'ordre des Firmicutes. L'une des thématiques abordées par notre laboratoire concerne l'étude de la virulence, de la colonisation et de l'adaptation des espèces du groupe *B. cereus* chez l'hôte, et notamment l'importance de l'homéostasie du fer chez la bactérie. Comprendre comment un pathogène récupère le fer de l'hôte, élément très abondant sur Terre mais pourtant peu biodisponible, pour sa propre survie est un sujet de grand intérêt et fait l'objet comme évoqué dans l'introduction de très nombreuses études. Il y a une dizaine d'années, la protéine IIsA a été identifiée chez *B. cereus* grâce au système IVET (*in vivo* Expression Technology) utilisé pour le screening d'expression de gène lors de la l'infection de la chenille *G. mellonella*. IIsA s'exprime principalement dans l'hémocœle et joue un rôle dans la pathogénie de la bactérie (Sinda Fedhila *et al.*, 2006). Cette protéine présente la particularité d'interagir avec différentes sources de fer : les hémoprotéines (hème ou hémoglobine) et la ferritine de différents vertébrés telles que la ferritine humaine, murine ou encore de rate de cheval (Daou *et al.*, 2009 ; Sinda Fedhila *et al.*, 2006). Cette habilité à lier différentes sources de fer rend cette protéine unique jusqu'à présent et à notre connaissance chez les bactéries (Groupes *B. cereus* et *Streptococcus*). L'intérêt revêtu par IIsA a permis par la suite d'approfondir les études à son sujet, et il a été montré l'implication d'un second partenaire, la bacillibactine (sidérophore de type catéchol), pour permettre l'acquisition du fer issu de la ferritine (Segond *et al.*, 2014). De façon plus précise, un modèle est proposé dans lequel IIsA fixe la ferritine à la surface de la bactérie potentiellement par son domaine LRR (Leucine-Rich Repeat). Cette liaison occasionne une déstabilisation de la structure de la ferritine impliquant un relargage dans le milieu extérieur des molécules de fer qu'elle renferme. Ces atomes de fer sont ensuite captés avec une très forte affinité par la bacillibactine avant d'être importés dans le cytosol de la cellule (Détails dans la partie introductive). De plus, une étude récente, toujours menée au sein de notre laboratoire, a pu mettre en évidence l'implication du domaine NEAT (Near Iron Transporter) d'IIsA dans la captation des sources d'hème et leur transfert au domaine NEAT d'IsdC, une protéine ancrée dans le peptidoglycane de la bactérie et faisant

parti du système Isd, très conservé chez les bactéries Gram-positives (Abi-Khalil *et al.*, 2015 ; Sheldon, Laakso, et Heinrichs, 2016).

La bacillibactine chez *B. cereus* joue un rôle déterminant à la fois dans ce processus d'acquisition du fer de la ferritine de vertébrés (*in vitro*), mais aussi dans la virulence chez l'insecte. Ainsi, la délétion du gène *entA* codant pour un des facteurs impliqués dans la synthèse de la bacillibactine (opéron *entA-dhbACEBF*) réduit la mortalité des larves du lépidoptère *G. mellonella* après injection intra-hémocœlique de bactéries en phase végétative de croissance (Segond *et al.*, 2014). Le réimport du complexe bacillibactine-Fe³⁺ est probablement orchestré par un système de type transporteur ABC pour lequel FeuA jouerait le rôle de protéine de liaison spécifique du complexe à la surface de la bactérie (Zawadzka *et al.*, 2009 ; Hotta *et al.*, 2010). Si le mécanisme a été décrit chez *B. subtilis* (Peuckert *et al.*, 2011), son implication dans l'adaptation et la croissance chez *B. cereus* n'a pas été démontré, de même que son rôle *in vivo* au cours de l'infection.

Cependant, si l'importance des gènes en lien avec l'homéostasie du fer chez les bactéries a largement été étudiée, il n'apparaît pas d'études chez *B. cereus* à ce jour mettant en lumière leur expression et implication éventuelle dans le cadre d'une infection par voie orale, qu'il s'agisse de leur impact dans la virulence ou la colonisation intestinale de l'hôte (animal ou insecte). En effet, si *B. cereus* et *B. thuringiensis* sont considérés comme des bactéries opportunistes, principalement par voie orale, les rôles de certaines enterotoxines (Nhe, Hbl et CytK) ou des toxines Cry pour *B. thuringiensis* chez les insectes étant reconnus, la part des facteurs exprimés par *B. cereus* en lien avec l'homéostasie du fer dans l'environnement intestinal n'est pas analysée à ce jour.

2/ Projet de thèse :

A la lumière de ce contexte, mon projet de thèse s'est concentré autour de deux objectifs principaux :

- Déterminer chez *B. cereus* l'implication du système de transport du complexe bacillibactine-Fe³⁺, et en particulier de FeuA (la protéine de liaison située à la surface de la bactérie) dans :
 - La croissance de la bactérie en condition de carence en fer, supplémentée avec diverses sources de fer.

- La virulence de *B. cereus* lors de l'infection par voie intra-hémocoelique ou par voie orale.
- Analyser l'expression des gènes principaux connus de l'homéostasie du fer chez la bactérie au cours de l'infection orale de *B. cereus* chez la larve de *G. mellonella*.

3/ Approches expérimentales :

3.1/ Rôle de FeuA dans la croissance et la virulence de *B. cereus*

Comme il a été mentionné dans l'introduction de mon manuscrit de thèse, les complexes « sidérophores-Fe³⁺ » utilisent des systèmes de transporteurs de type ABC, localisés à la surface de la bactérie, et qui sont spécifiques du sidérophore en question. La bacillibactine, synthétisée par *B. cereus*, est une molécule clef pour l'acquisition du fer de la ferritine (Segond *et al.*, 2014). FeuA est un gène orthologue de la protéine FeuA de *B. subtilis*, faisant partie de l'opéron *feuABCD* (Hotta *et al.*, 2010) et possède des propriétés de liaison au complexe bacillibactine-Fe³⁺ similaires (Marcus Miethke *et al.*, 2006 ; Zawadzka *et al.*, 2009). Le mécanisme de liaison à FeuA et l'importation du fer à travers le transporteur ABC a été décrit chez *B. subtilis* récemment (Peuckert *et al.*, 2011) mais rien n'a encore été étudié chez *B. cereus* dans ce cadre.

De plus, si la bacillibactine est désignée comme un facteur impliqué dans la virulence chez *B. cereus* chez *G. mellonella* le rôle précis occupé lors du processus d'infection après injections intra-hémocœliques n'a pas été étudié. L'hypothèse que nous avons formulé est que FeuA est un élément clef pour la réimportation du fer chez *B. cereus*. Pour tester cette hypothèse, nous avons construit un mutant de délétion du gène *feuA* au sein du locus *feuABCD* ainsi qu'un double mutant délété des gènes *feuA* et *entA* en utilisant la souche mutante $\Delta entA$ (ne synthétisant pas la bacillibactine) déjà construite lors de travaux précédents (Segond *et al.*, 2014). Deux types d'expériences ont été réalisées :

- Des tests de croissance en milieu riche ou en milieu carencé en fer et supplémenté par diverses sources telles que la ferritine de rate de cheval, l'hémoglobine, l'hème ou encore le fer complexé FeSO₄. L'objectif est d'analyser le rôle du système bacillibactine / FeuA dans le développement de la bactérie *in vitro* en fonction des sources de fer présentes dans le milieu.
- Des tests de virulences en injectant par voie intra-hémocœlique (directement dans l'équivalent de la circulation sanguine chez l'insecte) chez la larve de *G.*

mellonella les différentes souches (souche parentale, mutants et mutants complémentés) en phase végétative de croissance. L'objectif étant de comparer la virulence des différentes souches de *B. cereus* impliquant le système de transport de la bacillibactine couplée au fer chez le même modèle insecte utilisé dans les études précédentes (Figure 27).

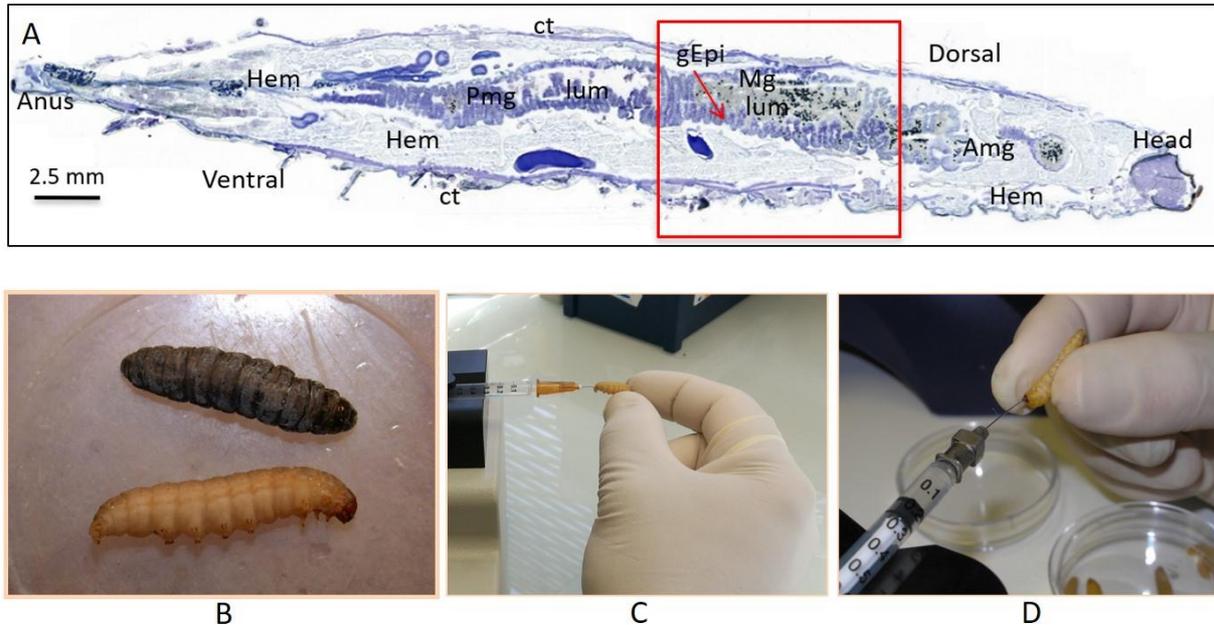


Figure 27: Anatomie de la larve de *Galleria mellonella* et illustration des tests pratiqués par injection de *Bacillus cereus* intra-hémocœlique et par ingestion forcée. **A** : Observation au microscope optique d'une coupe sagittale totale d'une larve entière de *G. mellonella* (cryo-section, 20 µm d'épaisseur). La zone encadrée en rouge indique la region étudiée en LCM et sur laquelle des coupes transverseales (16 µm d'épaisseur) ont été pratiquée après déshydratation et coloration au crésyl violet. **B** : Photo d'une larve de *G. mellonella* vivante (claire) et morte (noire). **C** : Photo d'un test d'inoculation de *B. cereus* par injection intra-hémocœlique et **D** : par ingestion forcée.

lum: Lumen ; Hem: Hémocœle; Ct: Cuticule; Mg: Intestin moyen; Amg: Partie antérieure de l'intestin moyen; Pmg: Partie postérieure de l'intestin moyen; gEpi: Epithélium intestinal (entérocytes); pm: Matrice péritrophique; Head: Tête. (Images équipe GME, Micalis et plateforme Abridge, INRA, Jouy-en-Josas).

3.2/ Analyse de l'expression des gènes liés à l'homéostasie du fer chez *B. cereus* au cours de l'infection par voie orale chez l'insecte modèle *G. mellonella*

Les bactéries pathogènes produisent des sidérophores mais aussi également de nombreux systèmes d'acquisition déterminants dans la virulence durant leur interaction

avec l'hôte afin de s'adapter face à un environnement carencé en fer (Andrews, Robinson, et Rodríguez-Quñones, 2003). *G. mellonella* constitue un modèle d'étude suscitant un intérêt croissant pour son utilisation en tant que modèle d'infection, et en particulier dans le cadre de l'étude d'infection par voie orale pour *B. thuringiensis* mais aussi *B. cereus*, grâce à leur système immunitaire inné comparable à celui des mammifères (Ramarao, Nielsen-Leroux, et Lereclus, 2012 ; S. Fedhila *et al.*, 2010 ; Mikonranta *et al.*, 2017). Ce modèle d'infection a permis la mise en lumière par le système IVET de la protéine de surface IIsA ainsi que d'autres gènes impliqués dans l'acquisition du fer de *B. cereus* au cours de l'infection (Sinda Fedhila *et al.*, 2006 ; Abi-Khalil *et al.*, 2015 ; Daou *et al.*, 2009). Il a été montré dans la littérature chez différents microorganismes l'importance des gènes impliqués dans l'acquisition du fer pour la colonisation d'*E. coli* ou encore *S. enterica* dans l'intestin de souris ou de bovin (Pi *et al.*, 2012 ; Costa *et al.*, 2016). Cependant, si la virulence de *B. cereus* au cours de l'infection orale chez *G. mellonella* a fait l'objet de quelques études (S. Fedhila *et al.*, 2010 ; Salamiou *et al.*, 2000 ; Candela *et al.*, 2019), A ce jour, peu de facteurs liés à l'homéostasie de fer en dehors d'IIsA (Sinda Fedhila *et al.*, 2006) ont été étudié dans le cadre de la pathogénicité par voie orale de *B. cereus* chez *G. mellonella*.

Au regard de l'état de l'art et de la place centrale qu'occupe l'acquisition du fer pour le développement de la grande majorité des microorganismes, et en particulier chez *B. cereus*, le second volet de mon projet de thèse visait à étudier l'expression des gènes liés à l'homéostasie du fer *in vivo*, au cours de l'infection de l'intestin de l'insecte modèle *G. mellonella*. L'hypothèse formulée est que dans un milieu relativement carencé en fer, ces gènes vont avoir un impact quant à la colonisation et donc à la virulence. Pour répondre à cette question, nous avons choisi une approche de type microgénomique (Taylor *et al.*, 2004), en prélevant les échantillons par microdissection laser puis en analysant l'expression de quelques gènes ciblés par RT-qPCR.

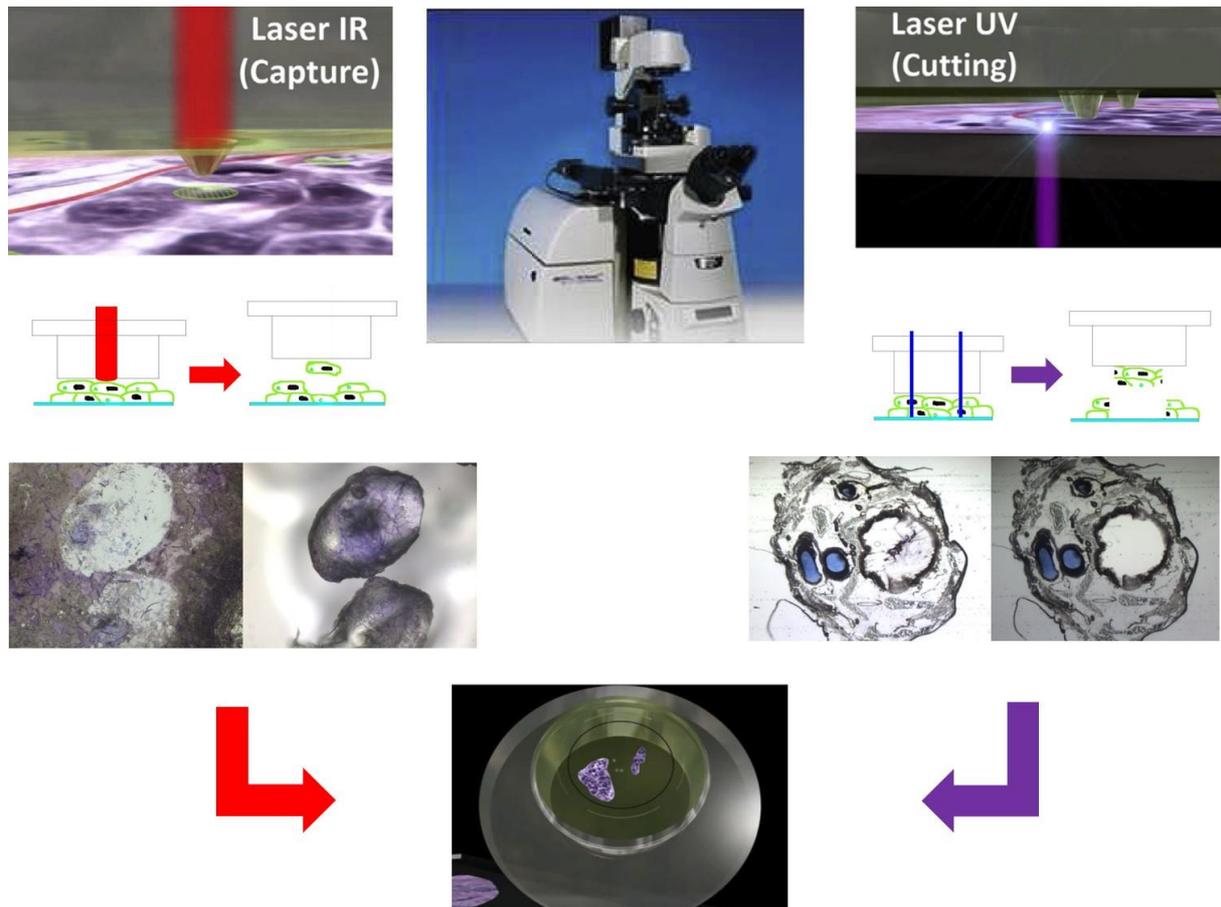


Figure 28: Présentation de la technique de microdissection laser (LCM). Les échantillonnages ont été réalisés avec l'appareil XT[®] Arcturus. La partie gauche du schéma illustre la méthode de prélèvement douce avec le laser infra-rouge (IR, représentation en rouge). A droite du schéma, la méthode de découpage tissulaire utilisant le laser ultra-violet (UV, représentation en violet). Les échantillons de cellules prélevés sont ensuite recueillis sur un petit support et conservés à -80°C avant extraction de l'ARN total.

La microdissection laser (Figure 28, LCM, pour Laser-Capture Microdissection) est une approche permettant le prélèvement de petits échantillons de façon ciblée (Bevilacqua et Ducos 2018 ; Podgorny et Lazarev 2017). Cette technologie permet l'isolation précise de cellules spécifiques au lieu d'une analyse globale sur l'ensemble d'un tissu ou organe (hétérogénéité de la population cellulaire prélevée), et a été utilisée pour l'étude de profils d'expressions au sein de différentes niches écologiques (Hooper, 2004 ; Podgorny et Lazarev, 2017). Son utilisation a donc été plébiscitée à ses débuts en cancérologie afin de permettre une analyse moléculaire de cellules tumorales prélevées dans le tissu d'où elles sont endémiques (Domazet *et al.*, 2008 ; Emmert-Buck *et al.*, 1996). Cependant, elle touche désormais l'analyse de profils d'expressions par différentes techniques moléculaires telles que la qPCR, les puces à ARN ou ADN, les techniques de Next-Generation Sequencing (NGS) et protéomique en cancérologie, Sciences de la Vie,

diagnostics médicaux ou biotechnologies (Espina *et al.*, 2006 ; Podgorny et Lazarev 2017; Bevilacqua et Ducos 2018). De nombreux appareils permettant la capture des échantillons se sont développés, depuis quelques années, 5964 publications sont référencées dans PubMed lorsqu'il est entré dans la barre de recherche « laser microdissection ».

Dans le cadre de ma thèse, nous avons utilisé un appareil de type XT[®] Arcturus, disposant de laser de type infra-rouge (IR) afin de permettre un échantillonnage très fin pouvant être de quelques cellules à peine, ou ultraviolet (UV) pour un échantillonnage plus large. En microbiologie, l'utilisation de la LCM a été employée chez les bactéries notamment mais reste limitée : ainsi, on retrouve quelques études abordant :

- L'organisation spatiale des espèces microbiennes constituant le microbiote intestinal de souris ou mammifères (De Hertogh *et al.*, 2012 ; Lavelle *et al.*, 2015 ; Nava, Friedrichsen, et Stappenbeck 2011).
- L'analyse transcriptomique d'entérocytes de porcs en présence ou absence de microbiote, mettant en lumière un état physiologique de type inflammatoire continue en réponse à l'exposition au microbiote (Chowdhury *et al.*, 2007).
- L'expression des gènes par RT-qPCR d'un pathogène intracellulaire, *Lawsonia intracellularis*, dans les entérocytes de porc, permettant la validation d'une analyse au sein d'une population hétérologue de cellules (Vannucci, Foster, et Gebhart, 2013).
- Les interactions entre plantes et pathogènes, certaines études permettant l'analyse par RNA sequencing du profil transcriptomique de chacun après LCM (Ramsay, Jones, et Wang 2006 ; Roux *et al.*, 2014) A notre connaissance, il n'existe aucune étude s'intéressant au profil transcriptomique d'un pathogène extracellulaire à différents temps de l'infection dans l'intestin de l'hôte. Pour se faire, nous avons donc choisi, après de nombreux tests de faisabilités, l'étude de l'expression de certains gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez *B. cereus* à deux temps de l'infection : 3 heures, le temps de référence dans le cas de notre étude, permettant à la bactérie son adaptation à son nouvel environnement et 16H temps ou elle colonise la surface intestinale. Les chenilles sont infectées par ingestion forcée avec des bactéries en phase exponentielle (à une dose 5×10^6 CFUs/Chenille) associée à la toxine Cry1C, qui permet aux bactéries d'avoir accès à la surface intestinale en fragilisant la matrice péritrophique, barrière qui protège

le tube digestif (Hegedus *et al.*, 2009). La dose correspond à la dose tuant 70% des larves 24H après infection à 37 C°. Les larves sont congelées et les analyses sont faites sur des sections transversales congelées (cryo-coupes). Le laser UV est utilisé afin de prélever une quantité de bactéries plus importante et par conséquent faciliter l'analyse transcriptomique qui en découle. De plus, nous avons sélectionné chez *G. mellonella* une zone de l'intestin située au niveau de l'intestin moyen (correspondant aux cellules présentant des microvillosités favorisant l'absorption des molécules présentes dans le lumen), en se basant sur des études préliminaires montrant une installation préférentielle à 3h et à 16h de *B. cereus*.

Enfin, il est important de noter que nous avons mis en place un élevage de *G. mellonella* axénique de façon à pratiquer des tests sur des larves privées de microbiote intestinal. L'intérêt de l'utilisation de telles chenilles permet de favoriser la collecte de *B. cereus* afin d'éviter une interaction avec d'autres gènes du microbiote de *G. mellonella*. Enfin, pour assurer une analyse en RT-qPCR plus confortable au regard de la faible quantité d'ARN total prélevé, nous avons utilisé un kit de préamplification (TaTaa Biocenter) facilitant ce type d'analyse (Ståhlberg, Kubista, et Åman 2011 ; Andersson *et al.*, 2015).

Les objectifs de cette expérience sont multiples :

- Tester la faisabilité de la technique de LCM dans le cadre de ce type d'analyse.
- Déterminer si les gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez *B. cereus* sont exprimés tout au long de l'infection de *B. cereus* dans l'intestin de *G. mellonella*. Dans le cadre de ma thèse nous nous sommes focalisés sur les gènes codant pour l'expression des protéines FeuA, EntA, IIsA que nous avons étudié plus en profondeur durant le premier volet de ma thèse. De plus, d'autres gènes impliqués dans l'homéostasie du fer ont été ciblés, ainsi que différents gènes codants pour des facteurs de virulence ou encore marqueurs d'un état de stress, permettant de donner une indication de l'environnement physico-chimique dans lequel la bactérie évolue.
- Discuter de la différence d'expression de ces gènes au cours des deux stades d'infection choisis, ou à quel moment de l'infection leur expression est modulée comparativement à l'autre stade d'infection.

3. Résultats

Article 1 : Impacts of the siderophore bacillibactin and its siderophore binding protein FeuA on *Bacillus cereus* iron acquisition and virulence

Authors : Laurent Consentino¹, Agnès Rejasse¹, Christophe Buisson¹, Christina Nielsen-LeRoux¹

¹INRA, UMR 1319 MICALIS - AgroParisTech - Université Paris Saclay, 78350 Jouy en Josas, France

Abstract

Bacillus cereus, a Gram-positive sporulating bacterium, is able to colonize mammal and invertebrate hosts. The colonization capacity is due to specific virulence factors and adaptation mechanisms, as those involved in iron acquisition from iron sources like hemoglobin and ferritin. In *B. cereus*, several systems have been analyzed notably the surface protein IIsA and the ferric iron siderophore bacillibactin (BB); both are important for iron mobilization from ferritins and in insect virulence. In this study we investigated on the possible link between the bacillibactin encoded by *entA-dhbACEBF* locus and the siderophore binding protein FeuA, in iron acquisition from several iron sources and in insect virulence. To get insight into the role of FeuA in the *B. cereus* ATCC 14579 strain, various interruption mutants were analyzed: the $\Delta feuA$ and the $\Delta entA$ single mutants, the $\Delta feuA\Delta entA$ double mutant and the *feuA* complemented strain. The results indicate that the $\Delta feuA$ mutant is affected *in vitro* almost similarly to the $\Delta entA$ mutant with ferritin as sole iron source, but also surprisingly in the presence of heme iron source. In addition, in the absence of FeuA, the BB accumulates in the extracellular medium, indicating that FeuA is indeed the BB major siderophore binding protein, and is essential for the siderophore uptake. Interestingly, *in vivo* infection by intra-hemocoelic injection of the different strains into the insect *Galleria mellonella* showed that the $\Delta feuA$ mutant and particularly the double mutant $\Delta feuA\Delta entA$ were as virulent as the Wild-type strain, while the *feuA* complemented double mutant resulted in the less virulent $\Delta entA$ mutant phenotype. Next, in an attempt to analyse if the absence of the BB-FeuA system would result in expression of another factor involved in iron acquisition, we set up an *in vitro* analysis mimicking a hemocoelic infection. An *in-trans* plasmid born transcriptional *pilsA-gfp* fusion was tested in the various strains and in different growth media. The promoter of *pilsA* was significantly

expressed in the double mutant background but absent from the Wild-type and the single mutants with ferritin as the only iron source. This suggests, that in the absence of the BB-FeuA system, *B. cereus* can modulate expression of iron acquisition or virulence factors to maintain host colonisation.

Introduction

Iron is essential for most living organisms of the life tree. It is involved in several essential processes, like DNA synthesis, respiration, and several biochemical reactions. However, iron is not free in organism as it triggers Fenton reaction, which generates toxic reactive oxygen species damaging cells membrane, nucleic acids and proteins (Andrews, Robinson, et Rodríguez-Quiñones 2003; Touati 2000). Therefore, iron homeostasis is tightly regulated and iron may be bound in the host to hemoprotein or transport and storage protein like transferrin or ferritin (Bradley, Le Brun, et Moore 2016; Kafina et Paw 2017; Ascenzi *et al.*, 2005)). To overcome the lack of free iron in a host the pathogens possess various systems, which allows acquiring iron from host proteins trough binding to surface molecules like Isd (iron surface determinants) and IIsA (Nobles et Maresso 2011; Daou *et al.*, 2009; Abi-Khalil *et al.*, 2015) or via competitive strong iron affinity siderophore molecules (Ellermann et Arthur 2017). In most bacteria the majority of genes related to iron metabolism and homeostasis are under the control of the Fur repressor (ferric uptake regulator) which modulates indirectly pathogenicity during host infection (Fillat 2014; D. R. Harvie 2005; Porcheron et Dozois 2015), although in *Bacillus subtilis* certain genes involved in the acquisition of iron are not under Fur regulation (Roy et Griffith 2017). The production and acquisition of siderophores confers a real advantage for bacteria in their environment, in order to compete against other pathogenic bacteria or host microbiota for iron (Niehus *et al.*, 2017; Eric P. Skaar 2010; Ellermann et Arthur 2017). For instance, the siderophore enterobactin and the specific transporter of the enterobactin-Fe³⁺ complex are determinants in *E. coli* host gut colonization (Pi *et al.*, 2012). Bacterial siderophores have very strong affinity for ferric Fe³⁺ iron, the soluble form at neutral pH and at aerobic conditions.

Bacillus cereus sensu stricto strains are Gram-positive, spore-forming, opportunistic food-borne pathogens, causing emetic or diarrheal symptom (L. P. Stenfors Arnesen, Fagerlund, et Granum 2008; Bottone 2010; Glasset *et al.*, 2018). They belong to the *Bacillus cereus*

group, and are therefore tightly related to the human pathogen *Bacillus anthracis* and the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* (Ivanova *et al.*, 2003). *B. cereus* possesses different strategies to scavenge sequestered iron during the infection. Either by direct interactions, using surface proteins (Daou *et al.*, 2009; Abi-Khalil *et al.*, 2015) or indirect interactions, using both surface proteins to bind the iron source and the high affinity siderophores (Segond *et al.*, 2014) along with other systems like the ferric dicitrate uptake (Duncan R. Harvie *et al.* 2005). Like for several other bacteria, the processes involved in iron homeostasis gene expression, may in *B. cereus* also be under the control of the transcriptional repressor Fur; indeed several genes expose in their promoter region the Fur- DNA-binding box (Duncan R. Harvie *et al.* 2005; Sinda Fedhila *et al.*, 2006). *B. cereus* group bacteria possesses two clusters encoding for the catecholate siderophores, petrobactin and bacillibactin. The major impact of the siderophore bacillibactin (BB) in *Bacillus cereus* ATCC 14579 growth under low iron concentration and in insect virulence has been demonstrated (Segond *et al.*, 2014). They showed also that *in vitro* ferritin bound iron was more easily released via the combined action of the *B. cereus* surface protein IIsA, which is important for binding of host ferritin to the bacterial surface, and the BB like siderophore enterobactin (Segond *et al.*, 2014). But, how the siderophore is transported into the cell was not investigated and complementation and biochemical analysis with the real *B. cereus* group bacillibactin remain to be investigated. In *B. subtilis* and in *B. anthracis* a Siderophore Binding Protein (SBP) allowed the import of iron into the cell (Marcus Miethke *et al.*, 2006; Zawadzka *et al.*, 2009; Peuckert *et al.*, 2011). Indeed, the *feuABCD/yuil* operon encodes the *Bacillus anthracis* ABC transporter system involved in import of the bacillibactin-Fe³⁺ complex in the cell, where the *feuA* encodes the SBP with specific binding to iron charged bacillibactin (Hotta *et al.*, 2010).

To follow up on these findings, in this study we address several questions to get a complete information on the link and importance of FeuA in correlation with bacillibactin (BB) from the ATCC 14579 *Bacillus cereus* strain. We explored, using different mutant strains, the role of FeuA in BB uptake and growth in iron depleted media supplemented or not with Ferritin and heme sources. We also investigated for the first time on the relative impact of this BB/FeuA system in persistence and virulence *in vivo*, using the insect infection model *Galleria mellonella*. Finally, we evaluated the impact of the absence

of this system on expression of *ilsa* as a marker for modulation of Fur regulated genes playing a role in iron acquisition from host Ferritin, the major iron source in insect fluids.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

Bacillus cereus ATCC 14579 (laboratory stock) was used in this study. The mutant *Bacillus cereus* ATCC 14579 $\Delta feuA$ and *Bacillus cereus* ATCC 14579 $\Delta feuA\Delta entA$ were obtained by homologous recombination (see below). *Bacillus cereus* ATCC 14579 $\Delta feuA$ was complemented with plasmid pHT304 $\Omega feuA$. *E. coli* K12 strain TG1 was used as host for cloning. Dam⁻ / Dcm⁻ *E. coli* strain ET12567 (laboratory stock) was used to generate unmethylated DNA for electro-transformation in *B. cereus*. *E. coli* and *B. cereus* were cultured in LB (Luria-Bertani) broth, with vigorous shaking (190 rpm) at 37°C. For electro-transformation, was grown in BHI (Brain Heart Infusion). *E. coli* and *B. cereus* strains were transformed by electroporation as previously (Dower, Miller, et Ragsdale 1988). The following concentrations of antibiotic were used for bacterial selection: ampicillin 100 $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ and kanamycin 25 $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *E. coli*; kanamycin 200 $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ and erythromycin 10 $\mu\text{M}\cdot\text{mL}^{-1}$ for *B. cereus*. The iron chelator, 2,2'-dipyridyl and the horse spleen ferritin (HoSF) were purchased from Sigma-Aldrich. 2,2'-dipyridyl was used at final concentrations of 0.2mM or 0.6 mM and ferritin at 0.3 μM , heme arginate at 5 μM , hemoglobin at 2 μM or FeSO₄ at 200 μM .

DNA manipulations and plasmid constructions

Chromosomal DNA was extracted from *B. cereus* cells with the Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN). Plasmid DNA was extracted from *E. coli* and *B. cereus* using PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega). For *B. cereus*, 5 mg ml⁻¹ of lysozyme was added and cells were incubated at 37°C for 1 h. Restriction enzymes and T4 DNA ligase were used according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). Oligonucleotide primers (Table 2) were synthesized by Sigma-Proligo. PCRs were performed in an Applied Biosystem 2720 Thermal cycler (Applied Biosystem) with Phusion High-Fidelity or Taq DNA Polymerase (New England Biolabs). Amplified fragments were purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega). Digested DNA fragments were separated by electrophoresis on 1% agarose gels and extracted from gels using the

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega). Nucleotide sequences were determined by Serial Cloner software. The thermosensitive plasmids pMAD (Arnaud, Chastanet, et Debarbouille 2004) and pRN5101 (Didier Lereclus *et al.*, 1992) were used for homologous recombination. The low-copy-number plasmid pHT304 (Arantes et Lereclus 1991) was used for complementation experiments with wild-type *feuA* gene under its own promoter. All the plasmids used in this study are reported in Table 1.

Table 1: Strains and plasmids used during this study

Strain or plasmid	Characteristics	Reference
Strain		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC14579	Wild type	Laboratory stock
<i>Bc ΔfeuA</i>	ATCC14579 mutant; <i>Δbc37378</i>	This study
<i>Bc ΔentA</i>	ATCC14579 mutant; <i>Δbc2302</i> ; Kan ^R	Segond <i>et al.</i> , 2014
<i>Bc ΔfeuAΔfeuA</i>	<i>ΔfeuA</i> strain carrying pHT304 <i>ΔfeuA</i> plasmid; Erm ^R	This study
<i>Bc ΔfeuAΔentA</i>	ATCC14579 mutant; <i>Δbc37378</i> and <i>Δbc2302</i> ; Kan ^R	This study
<i>Bc ΔfeuAΔentAΔfeuA</i>	<i>ΔfeuAΔentA</i> strain strain carrying pHT304 <i>ΔfeuA</i> plasmid; Kan ^R , Erm ^R	This study
<i>Escherichia coli</i> K12 strain TG1	Strain used as host for cloning experiments	Segond <i>et al.</i> , 2014
<i>Ec</i> ET12567	Strain used for generation of unmethylated DNA	Segond <i>et al.</i> , 2014
<i>Bc</i> ATCC14579 <i>ΩpilsA-gfp</i>	Wild type strain carrying pHT315 <i>pilsA-gfp</i> plasmid containing <i>ilsA</i> promoter region and <i>gfp</i> transcriptional fusion; Erm ^R	Daou <i>et al.</i> , 2009
<i>Bc ΔfeuAΩpilsA-gfp</i>	<i>ΔfeuA</i> strain carrying pHT315 <i>pilsA-gfp</i> plasmid containing <i>ilsA</i> promoter region and <i>gfp</i> transcriptional fusion; Erm ^R	This study
<i>Bc ΔentAΩpilsA-gfp</i>	<i>ΔentA</i> strain carrying pHT315 <i>pilsA-gfp</i> plasmid containing <i>ilsA</i> promoter region and <i>gfp</i> transcriptional fusion; Kan ^R , Erm ^R	This study
<i>Bc ΔfeuAΔentAΩpilsA-gfp</i>	<i>ΔfeuAΔentA</i> strain carrying pHT315 <i>pilsA-gfp</i> plasmid containing <i>ilsA</i> promoter region and <i>gfp</i> transcriptional fusion; Kan ^R , Erm ^R	This study
Plasmid		
pHT304	Shuttle vector used for complementation; Erm ^R	Segond <i>et al.</i> , 2014
pMAD	Shuttle vector, thermosensitive origin of replication; Amp ^R , Erm ^R	Segond <i>et al.</i> , 2014
pHT304 <i>ΔfeuA</i>	pHT304 with wild-type <i>feuA</i> fragment	This study
pHT315 <i>paphA3'-gfp</i>	Shuttle vector used for transcriptional fusion; Erm ^R	Daou <i>et al.</i> , 2009
pHT315 <i>pilsA-gfp</i>	Shuttle vector carrying <i>ilsA</i> promoter region with <i>gfp</i> transcriptional fusion	This study

Bc, *B. cereus*; *Ec*, *E. coli*; Erm, erythromycin; Kan, kanamycin

Construction of the *B. cereus* mutant strains

B. cereus ΔfeuA was constructed as follows. For *feuA* (*bc3738*) deletion, a 1232 bp BamHI/HindIII DNA fragment and a 1053 bp HindIII/NcoI DNA fragment, corresponding to the chromosomal regions located immediately upstream and downstream from the *feuA* locus with the restriction site sequences (as recommended by manufacturer) added at the 5' extremities, were generated by PCR, using *B. cereus* strain ATCC14579 chromosomal DNA as a template and oligonucleotide pairs ExoFwd–ExoRvse and PermFwd–PermRvse respectively (Table 2). The amplified DNA fragments were digested with the appropriate enzymes and inserted between the BamHI and NcoI sites of the

thermosensitive plasmid pMAD (Arnaud, Chastanet, et Debarbouille 2004) by ligation using the T4 DNA ligase. For the double mutant construction $\Delta feuA\Delta entA$ (bc3738/bc2302) deletion, the *entA* deletion has been conducted as described previously (Segond *et al*, 2014). The amplified DNA fragments and the Kan^R cassette were digested with the appropriate enzymes and inserted between the HindIII and BamHI sites of the thermosensitive plasmid pRN5101. The resulting plasmids pMAD $\Omega feuA$ and pRN5101 $\Omega entA::kan$ were produced in *E. coli*, and then used to transform *B. cereus* wild type for the $\Delta feuA$ mutant and *B. cereus* $\Delta feuA$ for the $\Delta feuA\Delta entA$ mutant strains by electroporation. Integrants resistant to kanamycin (for $\Delta feuA\Delta entA$) and sensitive to erythromycin arose through a double cross-over event, in which the chromosomal wild-type copies of *feuA* and *entA* coding sequences were deleted and replaced by HindIII restrictive sequence and the Kan^R cassette for the *feuA* and $\Delta feuA\Delta entA$ strains respectively. The chromosomal allelic exchanges were checked by PCR, using appropriate primers and by sequencing the insertion sites. The genetic complementation of the $\Delta feuA$ and $\Delta feuA\Delta entA$ mutants was carried out as follows. A 1372 bp DNA fragment corresponding to the *feuA* gene and its putative promoter was amplified by PCR using the *B. cereus* ATCC14579 genomic DNA as a template and feuACompFwd/feuACompRvse as primers (Table 2). The PCR product was digested with BamHI and PstI restriction enzymes and inserted into the plasmid pHT304 (Arantes et Lereclus 1991). The resulting plasmid (pHT304 $\Omega feuA$) was amplified in *E. coli* and then introduced into the *B. cereus* $\Delta feuA$ and $\Delta feuA\Delta entA$ mutant strains by electroporation.

Table 2: Primers sequence used during this study

Name	Sequence 5' - 3'	Restriction site
ExoFwd	CGCGGATCCAGAACATCACCTCTGAAATTAGTATAAC	BamHI
ExoRvse	CCCAAGCTTCTTTATATGTCTCCTCTCGAATTTCA	HindIII
PermFwd	CCCAAGCTTTACAATAAGTAAGGTGCGTTGAATGATA	HindIII
PermRvse	CATGCCATGGTTAAGCATGTCTCTCTCCTCCTC	NcoI
feuACompFwd	CGGGATCCAATTAATAGTGAAGTAATGGG	BamHI
feuACompRvse	AACTGCAGATCATTCAACGCACCTTACTTA	PstI
SqcFwd	ATAGGAAGAATCATTATGAATAATTGCTTGCCA	
SqcRvse	AATAGCACATAGTATTAATAATAATCCCC	

Measurement of catechol production

Extracellular levels of catechols were measured using the Arnow assay (Arnow 1937).

Bacteria were grown overnight (20 h) at 37°C in LB medium + 0.2 mM 2,2'-dipyridyl. Then, samples of cultures were collected, centrifuged and filtered to remove bacteria. Samples were mixed sequentially with equal volumes of 0.5 N HCl, nitrite molybdate reagent (10% sodium nitrite and 10% sodium molybdate), and 1 N NaOH. Positive reactions produce a red colour and absorbance was determined at 510 nm. Data were normalized to OD₆₀₀ from the original culture and the percentages compared to the wild-type catechol levels in the culture supernatants are presented. Three independent replicates were statistically analyzed using the Student's T-test.

CAS assay

The protocol was adapted from (Schwyn et Neilands 1987). Every glass device used for the preparation of solutions was washed before with HCl 6N overnight in order to remove traces of iron. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, France.

To prepare 1 liter of blue agar, 60.5 mg CAS (complex Chrome-Azurol S/iron(III)/hexadecyltrimethylammonium bromide) was dissolved in 50 ml water and mixed with 10 ml iron (II) solution (1 mM FeCl₂ · 6H₂O, 10 mM HCl). Under stirring this solution was slowly added to 72.9 mg HDTMA dissolved in 40 ml water. The resultant dark blue liquid was autoclaved. Also autoclaved was a mixture of 750 ml H₂O, 100 mL 10X MM9 salts, 15 g agar, 30.24 g Pipes, and 12.00 g of a 50% (w/w) NaOH solution to raise the pH to the pK_a of Pipes (6.8). After cooling to 50°C 30 mL casamino acids (10 %), 20 mL of the carbon source (glucose solution 10 %), and other required supplements like vitamins were added as sterile solutions. The dye solution was finally added along the glasswall, with enough agitation to achieve mixing without generation of foam. Each plate received 30 ml of blue agar. *E. coli* specific ingredients: 10 ml glucose (20%) as a carbon source, 1 ml thiamine. HCl (0.2%), and Casaminoacids. One colony of the different strains (Displayed and grown on LB + selected antibiotic depending on the strains properties the day before at laboratory temperature) were streaked into the plates and incubated 24h at 30°C in the dark to avoid bleaching.

***In vitro* Growth assays**

B. cereus strains were grown overnight at 37°C under low iron conditions by inoculating strains in LB medium supplemented with 0.2 mM 2,2'-dipyridyl. Overnight cultures were inoculated into a new LB medium + 0.2 mM 2,2'-dipyridyl at a final OD₆₀₀ of 0.005.

Bacteria from mid-log phase culture were washed twice in LB medium containing 0.6 mM 2,2'-dipyridyl, then inoculated to a final optical density (OD) of about 0.005 into LB medium or LB + 0.6 mM 2,2'-dipyridyl + 0.3 μ M HoSF supplemented or not with 5 μ M Bacillibactin (provided generously by Dr. Rebecca Abergel and purified from *B. subtilis* strains). Stock solution of ferritin was prechelated in 2 mM 2,2'-dipyridyl for two hours in order to eliminate the free iron. Stock solution of heme arginate (38.5 μ M) has been produced following previous study (Tenhunen, Tokola, et Lindén 1987). Briefly, 100 mL of this stock solution is constituted with 40% of 1,2-propandiol, 10% of pure ethanol, hemin, L-arginine and ultra-pure water. Human hemoglobin stock solution (517 μ M) is prepared using hemoglobin, NaOH (0.1 M), Tris-HCl buffer (pH = 7.4, 1M) and Tris-NaCl buffer (pH = 7.4, 50 mM). Inorganic iron FeSO₄ (50 mM) is prepared using salts and ultra-pure water. All the products were purchased to Sigma Aldrich, France. *B. cereus* cells were grown at 37°C in 96-wells microtiter plate under continuous shaking. The OD was measured at 600 nm every hour over 24 hours using a TECAN Infinite F200Pro Microplate Reader (TECAN Group). The assays were repeated at least three times.

Insect Virulence assays

Bacterial strains were grown in LB medium and bacterial concentrations were monitored by optical density measurements and plating dilutions onto LB agar plates. *B. cereus* wild-type and mutant strains were injected separately into the hemocoel of *G. mellonella*. Insect eggs were incubated at 28°C and the larvae reared on beeswax and pollen (La Ruche Roannaise, Roanne, France). Last-instar larvae weighing about 200 mg were injected with 10 μ l of mid-log phase bacteria suspended in PBS, using the microinjector pump (Sk-Scientific) as previously described (Bouillaut *et al.*, 2005). About 1×10^4 bacteria/larva was injected, and each experiment was repeated at least three times with 20 larvae. A control group of larvae was injected with PBS only and no effect was observed. The survival rate (% of alive/total number of infected larvae) was recorded during 72 hours after infection. Statistical analysis was performed using the JMP Statistical Discovery™ software from SAS.

***In vivo* Persistence assay**

Infection of *G. mellonella* by intra-hemocoelic injection was performed as mentioned above with 10 μ l of mid-log phase bacteria groups of 30 larvae were injected. To count

the *B. cereus* Colony Forming Units (CFUs) from the living larvae at 3 and 16 hours post injection, 2 larvae were crushed in 10 ml sterile saline using a Ultraturax homogenizer, serial dilutions were plated onto LB agar plates containing appropriate antibiotics. For each test, 3 technical replicates were performed and at least 3 biological replicates were realized.

***ilsA-gfp* transcriptional fusion assays**

To evaluate the transcription of *ilsA* a plasmid carrying the *ilsA* promoter-*gfp* fusion (plasmid pHT315-*pilsa-gfp*) previously constructed has been used in this study (Daou *et al.*, 2009). This plasmid was transformed by electroporation (as described above) into the *Bacillus cereus* ATCC 14579 Wild-type, the $\Delta feaA$, $\Delta entA$ and the double mutant $\Delta feaA\Delta entA$ strains. Expression was followed in different growth medium: LB broth, LB and the iron chelator, 2,2'-dipyridyl (DIP), LB and DIP supplemented with horse spleen ferritin (HoSF), and finally LB with DIP, HoSF and bacillibactin. Growth and fluorescence were recorded from *B. cereus* cultures grown at 37°C in 96-wells microtiter plate under continuous shaking and cultures were prepared as described above (*cf in vitro* growth assay). The OD was measured at 600 nm every 5 minutes over 24 hours using a TECAN Infinite F200Pro Microplate Reader (TECAN Group). The assays were repeated at least three times. Increase or decrease in GFP was calculated using $(GFP_{(t)} - GFP_{(t-1)}) / (OD_{(t)} - OD_{(t-1)})$ where t is the time of measure, t-1 the previous time of measure, OD the optical density at 600 nm, and GFP the fluorescence value obtained at each given time (Relative fluorescence unit, RUF). Figure 5.A, 5.B, 5.C, and 5.D show the relative fluorescence units (RUF) at each condition and at four time-points: 0 (zero) is the entrance into stationary phase, while -1,-2,-3,-4 hours corresponds to the vegetative log growth phase and hours before time zero.

Results

Catechol siderophore detection

B. cereus ATCC 14579 possess gene clusters encoding for the synthesis of two siderophores: the *entA-dhbBCF* operon for the production of bacillibactin and the *asbABCDEF* operon encoding for petrobactin (Hotta *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2010). It was previously shown that for *B. cereus* ATCC 14579 the majority of produced siderophores was of the bacillibactin type (Segond *et al.*, 2014). Here we characterized the role of the

siderophore binding protein (SBP) FeuA in in the bacillibactin-Fe³⁺ complex uptake. Therefore, the presence of extracellular catechol siderophores was assessed in different stains using the Arnow assay (Figure 1A). Overnight culture supernatant from 0.2 mM Dip chelated LB medium were collected and mixed with the dye to obtain colorimetric quantification of the siderophores present in the supernatants. The relative production was compared to that of the Wild-type (set as 100%) taking into account the OD of the culture and the catechol concentration. The supernatant from the single mutant $\Delta feuA$ had twice the amount of catechol siderophores compared to the wild-type strain, indicating that the produced siderophores are accumulated in the extracellular medium and were not imported into the bacteria. The in-trans complemented $\Delta feuA\Omega feuA$ strain recovered almost completely the Wild-type level. As expected, the bacillibactin mutant $\Delta entA$ and the double mutant $\Delta feuA\Delta entA$ showed a strong decrease of catechol siderophore production, about four times less than the wild-type as formerly reported for the $\Delta entA$ mutant (Segond *et al.*, 2014). In order to further visualize the catechol production, a CAS (Chrome-Azurol S/iron) assay was set up. (Figure 1B). This experiment shows bacterial growth on the blue agar medium containing low amount of available iron, which becomes orange when catechol siderophores are produced, secreted into the extracellular medium and complexed with Fe³⁺. The images clearly show an orange large hallow surrounding the Wild-type and the $\Delta feuA\Omega feuA$ complemented strains, and a larger one for the $\Delta feuA$ mutant as BB accumulates outside the cell, while no orange colour is observed around the $\Delta entA$ and $\Delta feuA\Delta entA$ bacillibactin interrupted strains. Previously it was shown that FeuA (by chemical interaction) that the *B. cereus* SBP FeuA could bind BB (Zawadzka *et al.*, 2009) and here we have evidence for that FeuA is needed for a functional bacillibactin uptake.

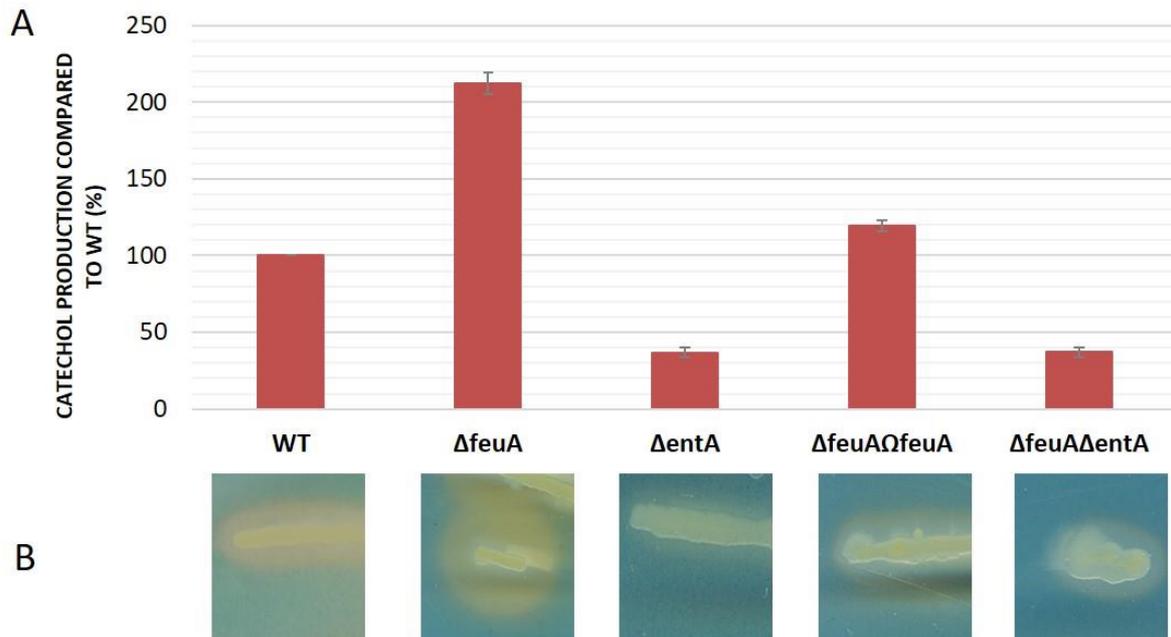


Figure 1: Siderophore accumulation in the extracellular medium for different *Bacillus cereus* strains. A: Catechol production accumulated in a moderate iron-depleted medium (Luria-Bertani broth + 0.2 mM of the iron chelator 2,2'-dipyridyl) using the Arnow test (Arnow, 1937); B: Shows colonies of the various strains spread onto CAS (Chrome-Azurol) blue-plate-agar (Schyn & Neilands 1987). The CAS assay is used as indicator for presence of catechol siderophores. When the agar changes from blue to orange, siderophores have chelated the iron in the medium.

***In vitro* Growth assays**

Ferritin & bacillibactin

In order to rule out how important the Bacillibactin-FeuA iron import system is for iron acquisition from various iron sources, *in vitro* growth curves were produced in a Microplate Reader and were analysed during 24 hours with OD 600nm scores every hour. In LB medium (positive control), the different strains grow in a manner similar to the reference (Wild-type) strain (Figure 2Aa). Conversely, no growth is observed for any of the strains in a LB iron depleted medium (Dip 0.6 μ M, Figure 2Ab). When horse spleen ferritin (HoSF) at 0.3 μ M (final concentration) is added to the depleted medium (Figure 2Ac) the growth phenotype of the reference wild-type strain is restored and the growth

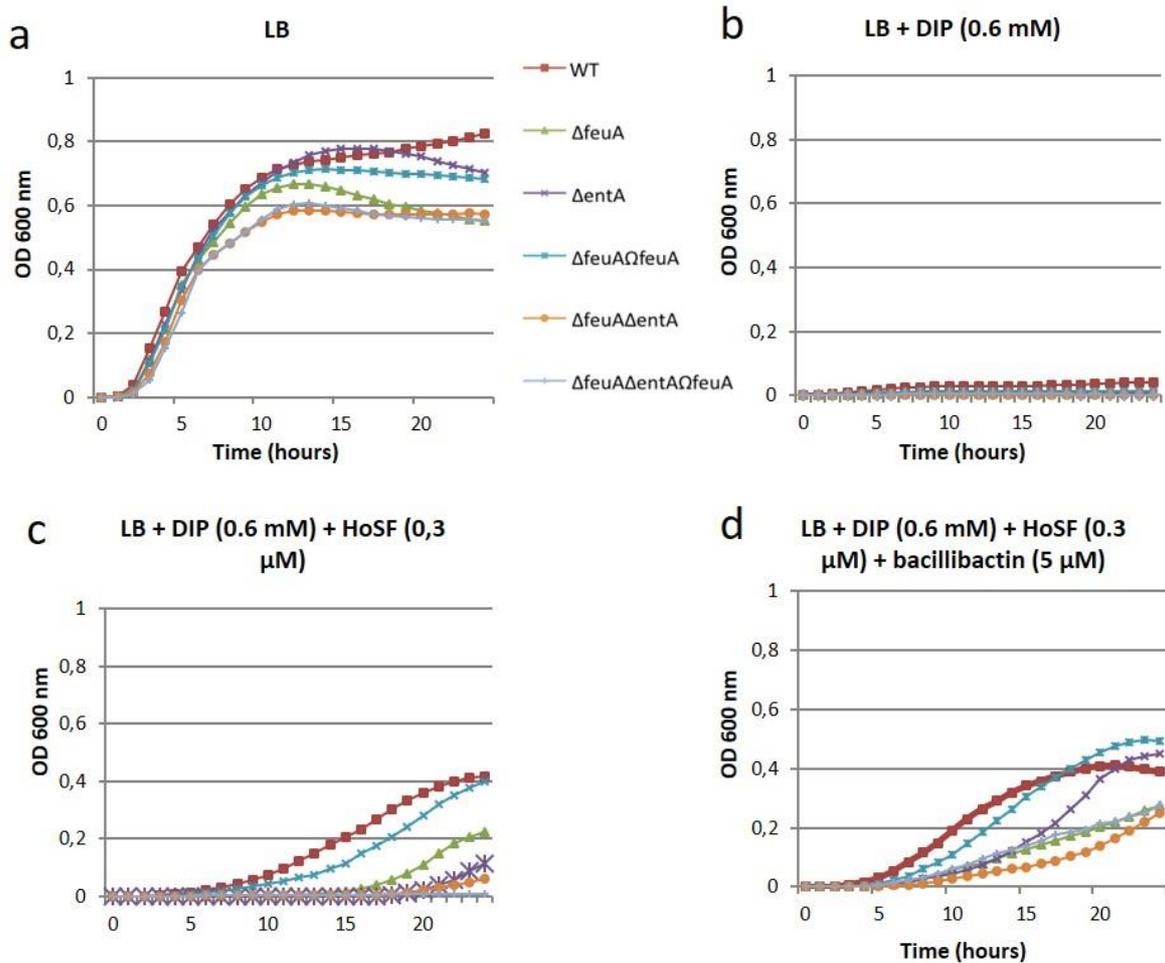


Figure 2A: FeuA and bacillibactin are involved in Growth kinetic in presence of ferritin. The strains were grown in Tecan microtiterplates at 37°C in LB medium (a) and in LB medium treated with 2,2'-dipyridyl (DIP, 0.6 mM) without addition of iron sources (b) or supplemented with ferritin (0.3 μM) (c) or with ferritin (0.3 μM) and bacillibactin (5 μM) (d). Bacterial growth was monitored during 24 hours by measuring the optical density (OD) at 600 nm every hour. Curves are representative of 4 independent experiments.

of the complemented strain $\Delta feuA\Omega feuA$ is comparable to the Wild-type strain. This information indicates a functional complementation, and therefore that the rest of the *feuABCD/yuil* operon is expressed in the *feuA* gene interrupted $\Delta feuA$ mutant. The $\Delta feuA$ mutant shows a longer lag phase, which is increased for the $\Delta dentA$ and $\Delta feuA\Delta dentA$ strains compared to the reference strain. After 24h, the maximum OD of the reference strain and the complemented strain $\Delta feuA\Omega feuA$ are equivalent (OD = 0.4). The $\Delta feuA$, $\Delta dentA$ and $\Delta feuA\Delta dentA$ mutants reach at 24 hours lower values than the Wild-type strain, respectively 0.2, 0.09 and 0.05. When the BB (5 μM) is added to chelate iron from ferritin, the $\Delta dentA$ mutant strain shows a growth phenotype comparable to that of the Wild-type

strain, due to the functional complementation provided by added BB (Figure 2Ad). The $\Delta feuA$ and $\Delta feuA\Delta entA$ mutants have a longer lag phase than the WT strain. However, this difference is shorter than the one in the iron-depleted medium with ferritin alone. The maximum OD of the $\Delta feuA$ and $\Delta feuA\Delta entA$ strains reaches a value of 0.21 and 0.26, which corresponds to the maximum OD reached in the absence of BB. These results show the need for BB and FeuA production to initiate and fulfil optimal growth, in the here studied growth conditions.

Heme arginate, hemoglobin and inorganic iron FeSO₄

The involvement of BB-FeuA in iron uptake from ferritin seems clear but it is not known whether the system also takes part in iron uptake from host molecules like heme and hemoglobin. The iron salt FeSO₄ was used as control for an easy available iron source. Likewise, the addition of ferritin in the iron-depleted medium, the Wild-type phenotype is restored for the $\Delta feuA\Omega feuA$ strain in presence of heme, hemoglobin or FeSO₄ for iron sources. Nevertheless, in presence of hemoglobin (Figure 2Bb) the stationary growth phase appears earlier and the maximum OD turns to be decreased at 24 hours (respectively for the Wild-type and $\Delta feuA\Omega feuA$ strains 0.88 and 0.48). In presence of inorganic iron (FeSO₄), $\Delta entA$, the double mutant strain $\Delta feuA\Omega feuA$ and complemented strain $\Delta feuA\Delta entA\Omega feuA$ have all a delayed lag time phase compared to the Wild-type strain (Figure 2Bc). The $\Delta feuA$ has also a delayed lag time phase compared to the Wild-type, but is less important than for the other mutant strains. Indeed, the lack of BB expression in *B. cereus* is critical in our conditions for free iron uptake, since in addition to the increased lag time, the $\Delta entA$, $\Delta feuA\Delta entA$ and $\Delta feuA\Delta entA\Omega feuA$ also have OD max impacted with respectively 0.41, 0.50 and 0.44) compared to the Wild-type (0.77) and $\Delta feuA$ (0.84) strains.

Interestingly, *B. cereus* strains deprived for BB or FeuA have growth defect in iron-depleted medium supplemented with heme or hemoglobin iron sources. Indeed, the lag time is also delayed compared to the Wild-type strain in both conditions, even though this impact seems enhanced with heme compared to hemoglobin. Regarding heme as the only iron source for *B. cereus*, the maximum OD after 24 hours of growth is decreased around 4 to 5 time for $\Delta entA$ (0.11), $\Delta feuA$ (0.17) compared to the Wild-type strain (0.56), while the lack of both genes blocks the growth in the double mutant strain $\Delta feuA\Delta entA$ (0.03). When hemoglobin is the only iron source, the maximum OD is lower compared to Wild-

type strain (0.88) for $\Delta entA$ (0.25) and $\Delta feuA$ (0.44) and the double mutant strain $\Delta feuA\Delta entA$ (0.29).

These results suggest that both BB and FeuA are required for the uptake of inorganic iron, ferritin iron, and also heme iron sources like heme arginate and hemoglobin. Meanwhile, the defect of FeuA expression has a lower impact compared to BB absence, suggesting the presence of other backup systems allowing import of the BB-Fe³⁺ complex inside the cell.

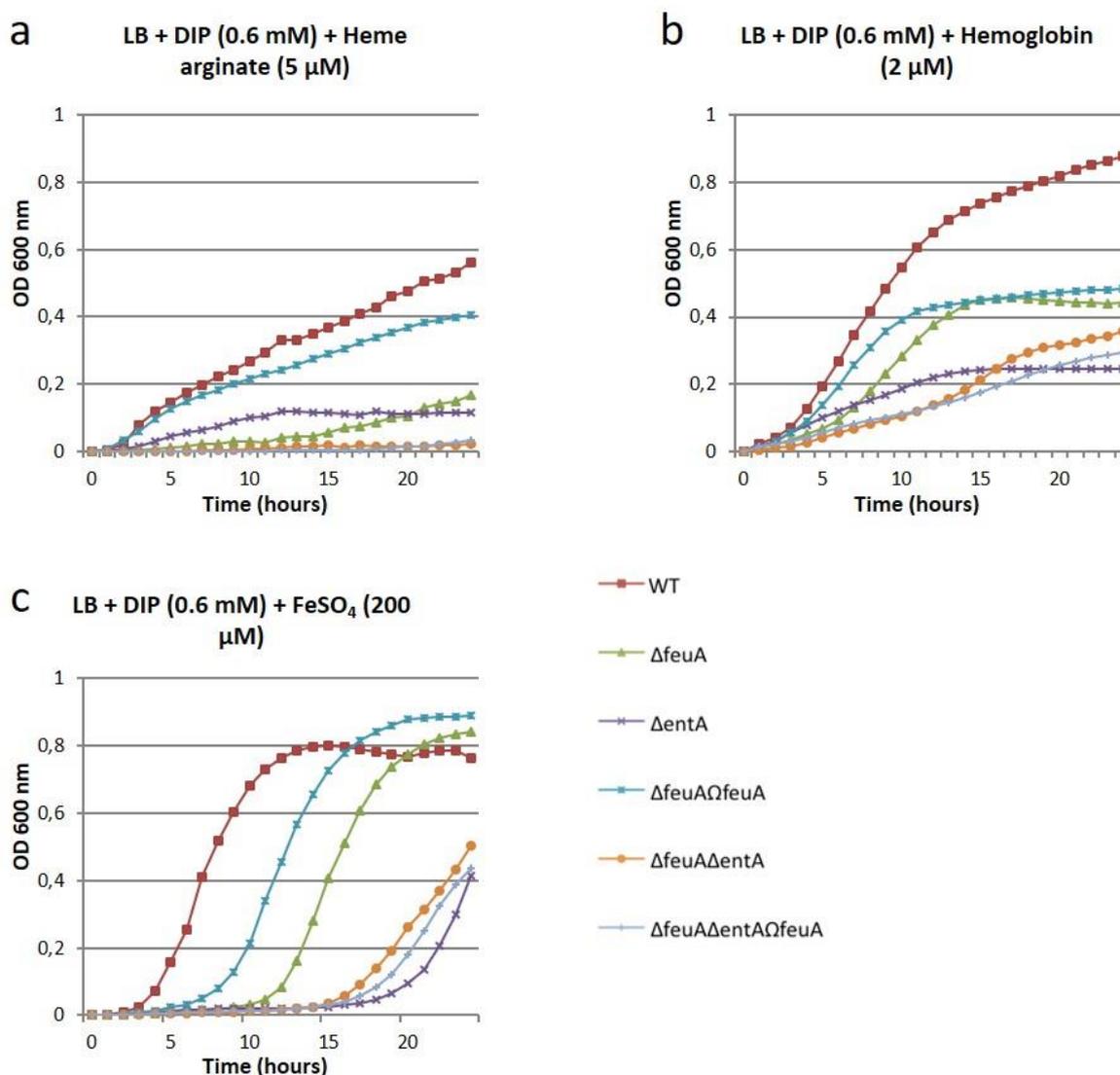


Figure 2B: FeuA and BB are involved in growth kinetic in presence of heme and inorganic iron. The strains were grown in Tecan microtiterplates at 37°C in LB medium treated with 2,2'-dipyridyl (DIP, 0.6 mM) supplemented with heme arginate (5 μ M) (a), hemoglobin (2 μ M) (b) or FeSO₄ (0.2 mM) (c). Bacterial growth was monitored during 24 hours by measuring the optical density (OD) at 600 nm every hour. Curves are representative of 4 independent experiments.

Role of FeuA and FeuA-EntA in insect infection

The above *in vitro* analysis reveals a tight connection between FeuA and BB in iron uptake from several iron sources. Here we address their role in pathogenesis using the infection model *Galleria mellonella*. These larvae were used in previous studies to show the role of both IIsA and BB in infection and for full virulence (Daou *et al.*, 2009; Segond *et al.*, 2014). Following injection into the *G. mellonella* hemocoel, the single $\Delta feuA$ mutant was not affected in virulence, but the bacillibactin single mutant $\Delta entA$ was. Surprisingly the $\Delta feuA \Delta entA$ double mutant induced the same mortality as that induced by the Wild-type strain (Figure 3A), and the FeuA complemented $\Delta feuA \Delta entA \Omega feuA$ strain recovered the BB affected phenotype (Figure. 3B). Larvae injected with filtered 1X PBS all had 100% survival throughout the experiment (Wilcoxon, n=4, p < 0.001). At 24 h and 48 h after injection, the results show a survival that is only statistically different between the mutant strain $\Delta entA$ and $\Delta feuA \Delta entA$, with respectively 60% and 21 % survival at 24H (Figure 3Aa) and 38 %, 15% and 48% survival at 48H (Figure 3Ab) (Wilcoxon, n=4, p < 0.05). At 72H (Figure 3Ac), the $\Delta entA$ strain showed 36 % survival statistically different from the $\Delta feuA \Delta entA$ and Wild-type strains, with respectively 11 % survival (Wilcoxon, n=4, p < 0.05). Despite relatively similar curves to that of the Wild-type and $\Delta feuA \Delta entA$ strains, the mutant strains $\Delta feuA$ and $\Delta feuA \Omega feuA$ do not show statistical differences with the $\Delta entA$ strain. To address this surprising result, we tested the complemented double mutant $\Delta feuA \Delta entA \Omega feuA$ and compared the virulence in the same manner as described above with the Wild-type, the $\Delta entA$ and the $\Delta feuA \Delta entA$ strains (Figure 3B). At 24 h after injection, we observed an attenuated virulence of the $\Delta feuA \Delta entA \Omega feuA$, close to the $\Delta entA$ strain with respectively 28.3 % and 33.3 % of insect survival. These results are statistically different from the Wild-type strain (11.7 % of insect survival, Student t-test, n=3, p < 0.05) and the $\Delta feuA \Delta entA$ (5 %, Student t-test, n=3, p < 0.05). Overall, these observations show that the lack of both BB and FeuA surprisingly results in a Wild-type virulence phenotype and that the FeuA complementation of the $\Delta feuA \Delta entA$ double mutant strain was efficient, since the $\Delta entA$ phenotype was recovered. This also indicates that the $\Delta feuA \Delta entA$ double mutant did not circumvent other mutations.

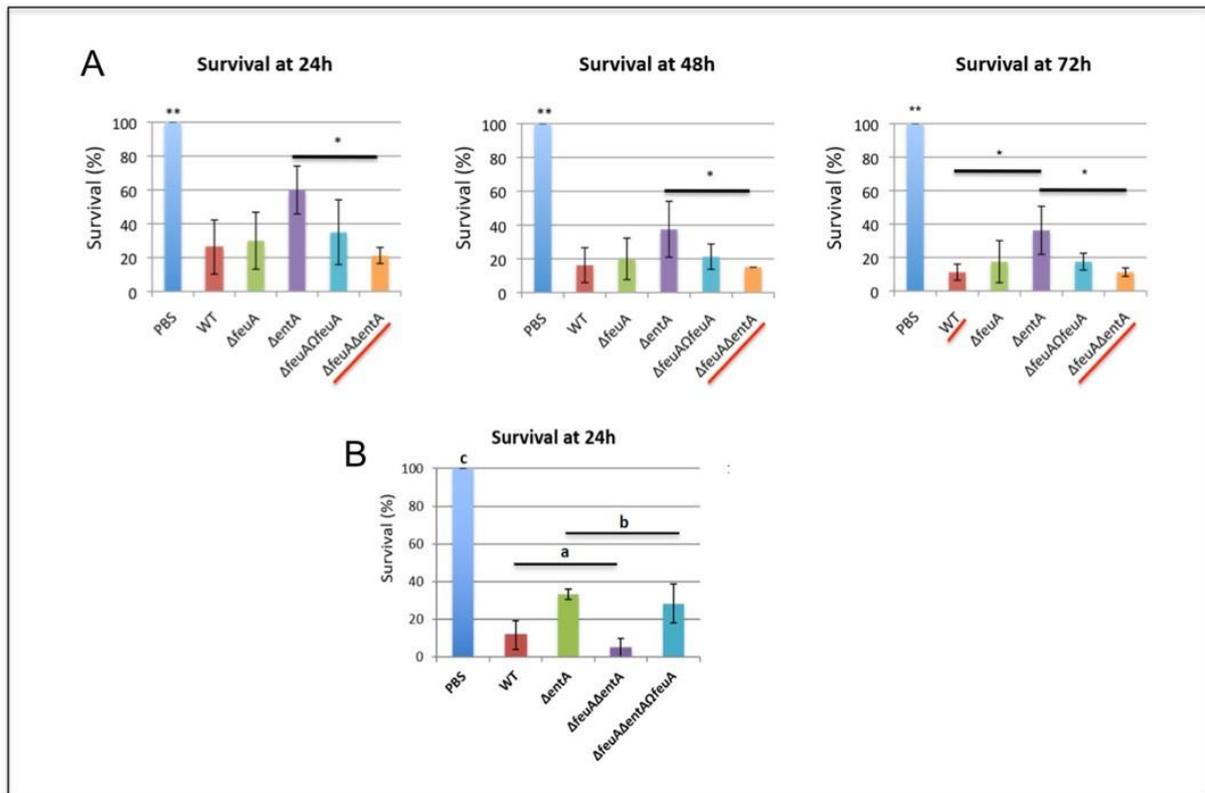


Figure 3: Survival of *Galleria mellonella* larvae following hemocoel infection. 10^4 log phase bacteria from different strains were inoculated and larval mortality/survival was scored at: 24H, 48H and 72H (A) and B only at 24H post inoculation and incubation at 37°C. Assays were run at least three times. The error bars show standard variation. Statistical analyses were performed using the JMP Statistical Discovery™ software from SAS. (For figure 3A: ** the Wilcoxon, $n=4$, $p < 0.001$; * = $n=3$, $p < 0.05$; for figure 3B: Student t-test, $n=3$, $p < 0.05$).

Bacterial persistence during *G. mellonella* infection

The above infection study showed differences in virulence among the strains, which can be due to a lower survival and development rate of the stains in the insect and/or variation in production of adaptation and virulence factors. In order to test one of these issues we analysed the relative persistence of the different strains by bacterial counts from infected larvae at two time points in alive larvae (T3 hours and T16 hours after injection with a dose resulting in 60% mortality with the wild type strain. Despite a bacterial biomass tenfold higher in the Wild-type ($1,16 \cdot 10^7$ CFU / gram of larva) and $\Delta feuA\Delta entA$ strains ($1,19 \cdot 10^7$ CFU / gram of larva) compared to the single mutant $\Delta entA$ ($1,30 \cdot 10^6$ CFU / gram of larva) and the $\Delta feuA\Delta entA$ ($3,51 \cdot 10^7$ CFU / gram of larva), the variation among biological replicates was too strong to highlight any statistical difference between the different strains at both 3H and 16H. Therefore, although less bacteria were found at 3h in the insects treated with the $\Delta entA$ mutant or double mutants, the absence

of the genes do not decrease significantly the development and persistence of the bacteria in *G. mellonella*. Meanwhile the virulence at 24H was different among the strains, thus the *B. cereus* strain deprived of both FeuA and BB might be triggered to over express other virulence factors or iron acquisition systems to be more virulent than the $\Delta entA$ mutant.

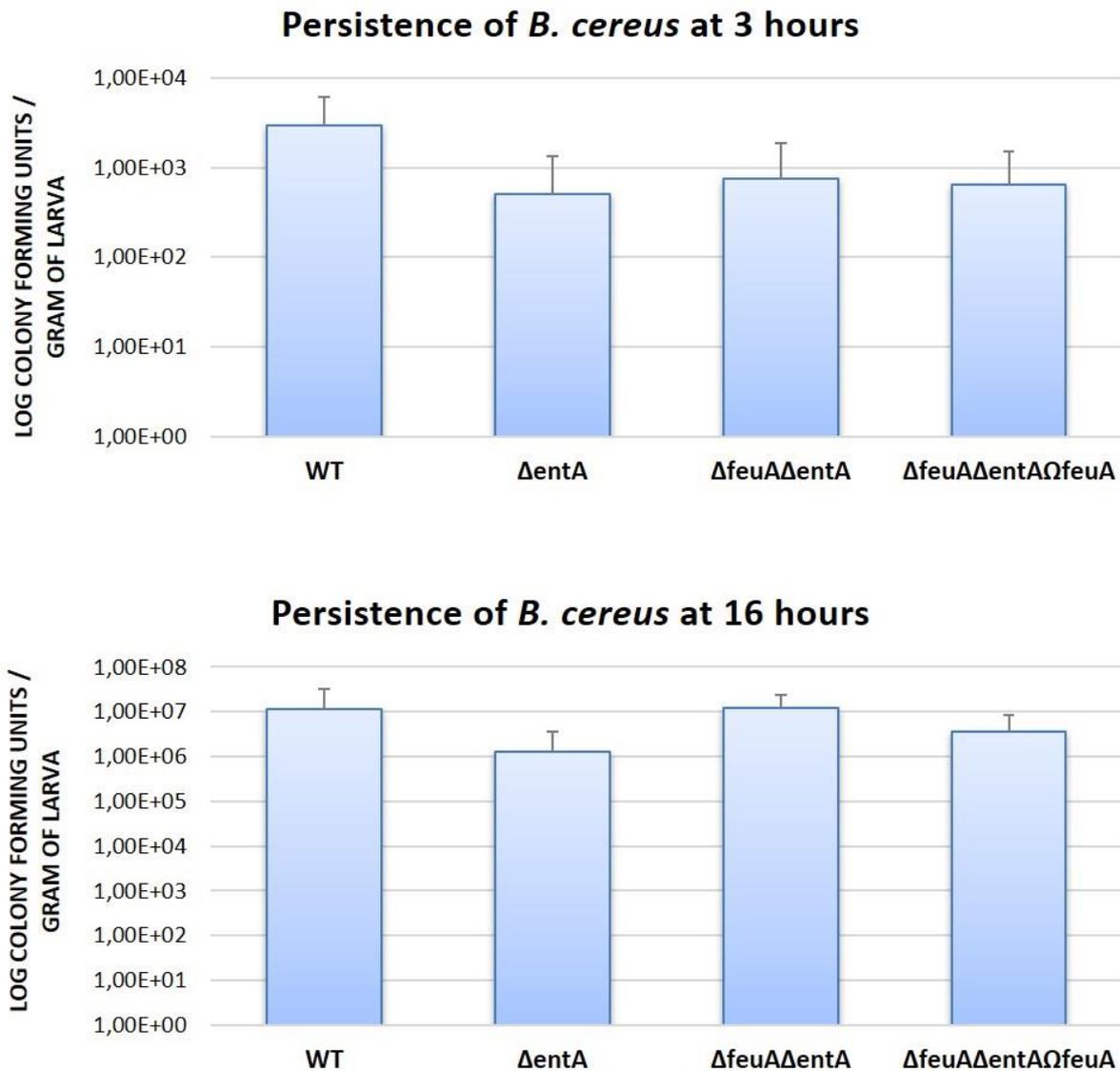


Figure 4: The deletion of *feuA* and *entA* do not influence on the persistence in *Galleria mellonella*. The different strains were injected into the *G. mellonella* haemocoel with a dose around 10⁴ cfu per larva (250 mg). The presence of the bacteria (CFU) was analysed from living larvae at 3 and 16 hours post injection in 2 larvae and averaged per gram. For each test, 3 technical replicates were performed and at least 3 biological replicates were realized.

Transcriptional-IlsA-GFP expression in the various strains

The above persistence experiments revealed that the double mutant was able to survive to the same level as the Wild-type, indicating that there is a compensation for the lack of BB-FeuA system. In order to elucidate why the double mutant was more virulent in the host iron deprived condition we supposed that the double mutant might express iron regulated factors differently from the other strains.

The surface protein IIsA was previously shown to be highly expressed in the hemocoel (Daou *et al.*, 2009) just after injection. Therefore, we chose the expression profile of this protein as a marker for differential expression during *in vitro* growth conditions mimicking iron chelation and the presence of ferritin. The *ilsA* expression profile was analysed by a plasmid born transcriptional promoter *-gfp* fusion, which was transformed into the Wild-type, the $\Delta entA$ mutant, the $\Delta feuA$ mutant and the $\Delta feuA \Delta entA$ double mutant strains. All strains were tested in different growth media (Figure. 5A), and the results indicate low expression of *ilsA* in LB iron rich growth medium at all time points and in all strains. As expected in iron chelated LB medium (Fig. 5B) the expression is strong and the highest expression (about 200.000 relative fluoresces units - RUF) is recorded in the wildtype background in the earliest time point 2 and 3 hours before entrance into the stationary phase. Some and lower expression (50.000- 100.000 RUF) is recorded for the $\Delta feuA \Delta entA$ double mutant at 3 hours and for the other mutants as well, but to a lower extent and not significantly different from the double mutant at time 1 and 0. In the condition where ferritin was added (to mimic the insect hemocoel environment) the *ilsA* transcription level was strongly decreased, compared to LB-Dip in all strains and for all time points except for the double mutant where expression (20.000 RUF) was observed at 1, 2 and 3 hours before time zero (Figure 5C). This indicates that in the double mutant less iron is imported and that IIsA and perhaps other iron regulated molecules could be expressed in the actively dividing cells. Knowing the capacity of IIsA to bind ferritin and the role of BB in the import of iron from ferritin, we analysed the impact of addition of BB to the LB-Dip+HoSF medium (Figure 5D). Also, in this condition, the Wild-type and $\Delta entA$ mutant showed low expression, the double mutant showed high expression (10.000- 20.000 RUF) at 1 and 3 hours before time zero, but surprisingly also in the $\Delta feuA$ mutant *ilsA* was expressed, with 20.000 RUF at time 2 and 3 hours before zero. This might indicate that the addition of BB into the medium, which cannot be imported via FeuA, disturbs the

availability of the ferritin iron in the medium, which was imported *via* another system, in the previous LB-Dip-HoSF growth condition.

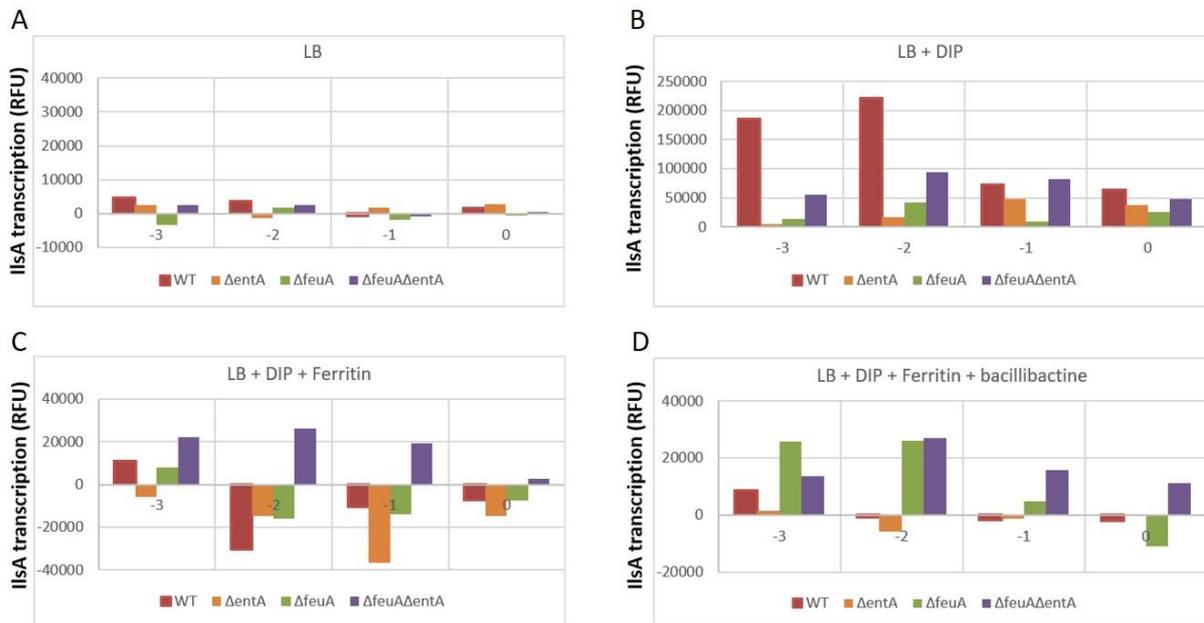


Figure 5: Transcriptional expression of *IIsA* in different genetic backgrounds and growth media. The expression profile was analysed by a plasmid born transcriptional *IIsA*- promoter -*gfp* fusion during log phase growth in microtiter plates. The strains are mentioned on the figures. Expression is measured in Wild-type (WT) and mutants in the growth media: LB (A), LB supplemented with DIP (0.2 mM) (B), LB supplemented with DIP and Horse Spleen Ferritin (HoSF 0.3 μ M) (C) and LB supplemented with DIP (0.2 mM) HoSF (0.3 μ M) and BB (5 μ M) (D), at four time points: 0 = intrance into the stationary phase, -1, -2 -3 are hours before 0. The values are Relative Fluorescence Units (RUF) between two time points taking into account the optical density. The assays were conducted 3 times.

Discussion:

The objectives of this study were to elucidate the role of the BB-FeuA complex in iron uptake from host iron sources and to investigate on the importance of this complex during infection of the alternative host model *G. mellonella*.

The acquisition of extracellular iron by siderophores and their reimportation were studied in depth in Gram-positive bacteria in *Bacillus subtilis* (Marcus Miethke *et al.*, 2006; Abergel *et al.*, 2009; Peuckert *et al.*, 2011). Regarding the *Bacillus cereus* group, the identification of siderophore receptors involved in the reimportation of the Iron / Siderophore complex was conducted too (Zawadzka *et al.*, 2009; Hotta *et al.*, 2010). Accordingly, our results confirm that also for the *B. cereus* ATCC 14579 strain, the FeuA surface substrate binding protein has an essential role in BB uptake in the presence of

various iron sources and notably host iron ferritin, heme and hemoglobin. The Arnow and CAS analysis showed that in the absence of FeuA, the siderophore is accumulated outside the bacteria in the $\Delta feuA$ mutant while in the *feuA* complemented strain exhibits the Wild-type phenotype. These results are in accordance with those previously found for *B. anthracis*.

FeuA and ferritin

Recently, studies have been performed to evaluate the ability of a number of *B. cereus* strains to grow on iron-chelated media supplemented with various iron sources including, hemin, hemoglobin, ferritin, lactoferrin, transferrin or inorganic iron (Hayrapetyan *et al.*, 2016), This study highlighted strain dependent abilities to use these molecules as iron sources.

We previously showed that HoSF can be used as iron source for *B. cereus* growth and that the Fur regulated surface molecules IIsA is important for the binding of various mammalian ferritin sources. In addition, it was revealed that IIsA assisted the siderophore enterobactin in iron release from human ferritin (Segond *et al.*, 2014). Therefore, we focused particularly on ferritin in this study. In *B. cereus* ATCC 14579, the absence of BB ($\Delta entA$) does not allow the acquisition of iron ferritin *in vitro*. In this mutant strain, the addition of BB to an iron depleted medium supplemented with ferritin allows the functional complementation of the $\Delta entA$ strain, accordingly to that previously reported for the addition of *E. coli* enterobactin (Segond *et al.*, 2014). These results highlight the role of the real *B. cereus* group BB in ferritin iron acquisition and the functional homology among these catecholate siderophores. Although FeuA was determined as BB-specific SBP (Zawadzka *et al.*, 2009), its unique involvement in the reimport of BB-Fe³⁺ complex into the bacterium was not tested. It appears in our study that in the absence of FeuA, the iron acquisition from ferritin during the first 18 hours of culture cannot take place (Figure 2Ac). The late exponential phase entry of the $\Delta feuA$ mutant strain can be explained after several hours by the degradation of the Dip in the medium, or by lysis of certain bacteria, resulting in the release of iron which, can be imported by another system. This hypothesis is confirmed by the growth phenotype of the $\Delta feuA \Delta entA$ strain. In the presence of ferritin and absence of BB, the growth curve is similar to that of the $\Delta entA$ mutant strain (Figure 2Ac). In a chelated medium supplemented with ferritin and BB, the growth curve is almost similar to that of the $\Delta feuA$ strain (Figure 2Ad). These results confirm the key role of FeuA

in iron acquisition from vertebrate ferritin in the tested *in vitro* conditions. Besides, the deletion of the entire ortholog locus *feuABC* in *B. subtilis* highlights an expression of this uptake system dependent on xylose, while growth of *B. subtilis* double mutant for *feuABCD* and BB locus *dhbC* in minimal medium seems to be strongly impacted when *feuABC* is lacking even with BB supplementation (Peuckert *et al.*, 2011). These results correlate the importance of the SBP FeuA in the uptake of the different iron sources, even though in *B. cereus* backup systems seem to maintain growth.

However, the bacterium *B. cereus* also produces other membrane and SBP proteins that are able to bind siderophores that are produced by other Gram-positive or Gram-negative bacteria, which gives it an advantage in case of competition for iron acquisition with other microorganisms (Hotta *et al.*, 2010; Tatsuya Fukushima *et al.*, 2013a; Sheldon, Laakso, et Heinrichs 2016). Therefore, *B. cereus* produces FeuA which is the specific SBP for BB (Zawadzka *et al.*, 2009), but synthesizes also other ABC-type transporters capable of binding ferric citrate molecules (Hotta *et al.*, 2010; T. Fukushima *et al.*, 2012) mentioned as "feuA-like" proteins (Hayrapetyan *et al.*, 2016). Compensation can occur, either with other acquisition systems allowing import of inorganic iron inside the cell (Lau, Krewulak, et Vogel 2016; Marcus Miethke *et al.*, 2013), or with a partial reimport of BB (with iron) via these transporters, which could explain the trend observed *in vitro* in iron chelated medium supplemented with ferritin (Figure 2Ac), with a shorter lag phase of $\Delta feuA$ strain compared to the $\Delta entA$ and $\Delta feuA\Delta entA$ strains.

***In vivo* analysis**

To analyse the impact of FeuA during infection, we used the larval stage of *G. mellonella*, which, has proved to be a good model to analyse virulence factor and the infection process of *B. cereus* group bacteria. Indeed, both *ilsA* and the *entA* mutant strains were tested in this insect and they were less virulent than the Wild-type (Daou *et al.*, 2009; Segond *et al.*, 2014), indicating that these factors may play a role for iron acquisition from ferritin, which is the major iron source in insects, and it is present in the hemolymph (body fluid) and the gut (B. S. Kim *et al.*, 2001).

The infection was performed by injection of different strains directly into the hemocoel (Figure 3). Our results indicate no role of FeuA alone, while the BB mutant was less virulent than the Wild-type. Surprisingly, we found the $\Delta feuA\Delta entA$ double mutant more virulent than the $\Delta entA$ mutant and reached that of the Wild-type, while the

$\Delta feuA \Delta entA \Omega feuA$ mutant returned to the low virulent $\Delta entA$ phenotype. This suggests that *in vivo* and in the absence of an important iron acquisition system, the bacteria might adapt and express other factors helping it to persist and develop in the host. To test the hypothesis of modified expression of another iron regulated factor, also involved in ferritin iron acquisition, we analysed *in vitro* the transcriptional expression of *ilsA* using a promoter fusion. The results show that *ilsA* was more expressed in the double mutant background (Figure 4) and particularly in iron chelated medium in the presence of ferritin, which is mimicking the insect hemocoel condition. Meanwhile, the production of more IIsA without BB and FeuA should not increase the capacity for ferritin iron uptake, and therefore other factors might be increased too. It can be IsdC helping in heme iron uptake (Abi-Khalil *et al.*, 2015; A. W. Maresso, Chapa, et Schneewind 2006), or the siderophore petrobactin, which is also produced by *B. cereus* but hasn't been observed as an essential iron uptake system for this species (Segond *et al.*, 2014). Also the cytotoxic hemolysin HlyII has been demonstrated to be expressed in exponential growth phase in an iron-deficient medium (Tran, Guillemet, *et al.*, 2011; Sineva *et al.*, 2012). HlyII is under the control of Fur, the major iron regulatory system in *bacteria* (Fillat 2014), and takes part in lysis of Erythrocytes and macrophages (Tran, Guillemet, *et al.*, 2011). Alternatively, in the absence of BB and FeuA, *B. cereus* might hide itself from the insect innate immunity to permit a better growth, but our persistence analysis did not reveal a significant difference among the strains at the studied time points post injection.

BB-FeuA-Heme

Our results indicate that in the presence of heme arginate and hemoglobin as the only iron sources, the BB-FeuA system takes part in iron uptake. However, siderophores are not expected being able to interfere with or directly acquire heme iron, therefore it is more likely that the acquired iron comes from degradation of the heme sources due to production of heme iron releasing factors like the deferrochelation activity (EfeUOB/FepABC system) as described in *B. subtilis* and *S. aureus* (Roy et Griffith 2017; Turlin *et al.*, 2013). Nevertheless, orthologs of these systems have not been reported in *B. cereus* so far. Meanwhile, it was shown that *E. coli* Enterobactin can attack the heme prosthetic group of myeloperoxidase and inactivates then enzyme activity, indicating a certain level of affinity for the heme prosthetic group by enterobactin (Singh *et al.*, 2015).

Therefore, other studies are needed to elucidate why how the absence of BB decreases the capacity of *B. cereus* to grow on Heme iron sources.

Altogether, our study confirmed the role of the SBP FeuA in BB uptake in the *B. cereus* type strain ATCC 14759, as it was previously recorded for *B. anthracis*. It was also confirmed that extracellular addition of BB complemented as well as *E. coli* enterobactin. The most interesting findings are the role of siderophore in iron acquisition with heme as iron sources, and particularly the finding that the lack of the BB-FeuA systems resulted in a more virulent phenotype in the insect model. Although the *ilsA* promoter – fusion indicated possible iron homeostasis gene expression modulation, further studies are needed to identify which factors are overexpressed in this double mutant background during *in vivo* conditions. In conclusion, our results show that *B. cereus* group bacteria are well equipped to face iron-depleted condition *in vivo* and *in vitro* and confirm the vital role of iron homeostasis for persistence.

Article 2: Laser capture microdissection is an efficient tool to study *Bacillus cereus* iron homeostasis gene expression during *in vivo* gut colonization

Authors : Laurent Consentino¹, Agnès Rejasse¹, Nicolas Crapart^{2,3}, Claudia Bevilacqua² and Christina Nielsen-LeRoux^{1*}

¹ UMR 1319 INRA MICALIS – AgroParisTech, Paris Saclay University, 78350 Jouy en Josas, France ² UMR 1313 GABI, Abridge, INRA , Paris Saclay University, 78350 Jouy en Josas, France, ³ Exilone, Elancourt, France

***Corresponding author:** Christina Nielsen-Leroux, Micalis, GME team, INRA, 4 Avenue Jean Jaures, 78350 Jouy en Josas, France. Email: Christina.nielsen-leroux@inra.fr, Tel +33 1 34652101, Fax. +33134652462

Was Submitted to :

Environmental Microbiology, rejected / advised for Environmental Microbiology Reports

Running title: LCM and *Bacillus cereus* gene expression in the gut

Originality Significance Statement : The study describes for the first time the use of Laser capture microdissection for *in vivo* and precise *in situ* gene expression of an extracellular bacteria. We adapted techniques and analysis (preamplification and qPCR) for gene expression studies with a small amount of bacterial material. We used an original infection model, germ free *Galleria mellonella*, and showed for the first time, how genes involved in iron homeostasis and other physiological adaptation are expressed close to the gut epithelium at two time points in the early steps of infection. Therefore, we believe that our work is of novelty and can be of interest for the community both at the technical and scientific level.

Abstract

Bacillus cereus is a Gram-positive foodborne pathogen closely related to *Bacillus thuringiensis*, an insect pathogen, and both are involved in intestinal infections. It is well established that Iron uptake is essential for full growth and virulence of pathogens during host infection, but little is known about iron homeostasis in a gut environment. Iron is not free in organisms as it triggers production of the harmful reactive oxygen species. In this study, we aimed to assess expression of genes, related to the bacterial iron homeostasis by RT-qPCR, during gut infection. The study was performed with the insect infection model *Galleria mellonella* without microbiota. Laser-capture microdissection (LCM) was tested as a promising tool to target precise areas of the gut for specific dissection of bacteria from frozen larval cryo-section. Our results show i) the reliability of LCM, despite a low amount of collected bacterial RNA; ii) that genes involved in iron homeostasis are slightly modulated during gut infection in relation to expression of cell damaging and oxidative stress factors; and iii) the bacillibactin uptake system is important for gut persistence. All together, iron homeostasis plays a role for settlement of *B. cereus* at early stage of oral infection.

Introduction

Iron is essential for most living organisms of the life tree. It is involved in several vital processes, like DNA synthesis, respiration, and several other biochemical reactions. However, iron isn't free in the organism since it triggers Fenton reaction, which generates reactive oxygen species, which are a threat for cell membrane, nucleic acids and proteins (Andrews, Robinson, et Rodríguez-Quiñones 2003; Touati 2000). Therefore, iron homeostasis is tightly regulated in living organisms. In human beings and other Mammals the majority of iron is bound to heme in hemoproteins, or bound to transport proteins like transferrin or stored in ferritins, which can stock up thousands of iron atoms (Bradley, Le Brun, et Moore 2016; Nairz *et al.*, 2010).

To overcome this lack of free iron, pathogens are equipped with mechanisms able to grab iron from the iron rich host molecules. In this study we target the opportunist food-borne pathogen *Bacillus cereus sensu stricto*, a Gram-positive, spore-forming bacteria causing emetic or diarrheal symptoms in man (Glasset *et al.*, 2016; L. P. Stenfors Arnesen, Fagerlund, et Granum 2008). The *Bacillus cereus sensu stricto* is tightly related to the

human pathogen *Bacillus anthracis* and the invertebrate pathogen *Bacillus thuringiensis* (Bhandari *et al.*, 2013; Guinebretière *et al.*, 2008; Ivanova *et al.*, 2003).

B. cereus owns different strategies to scavenge sequestered iron during the infection, by direct interactions, using surface proteins (Abi-Khalil *et al.*, 2015; Daou *et al.*, 2009; Lau, Krewulak, et Vogel 2016), or indirect interactions, using both surface proteins to bind the iron source and secreted siderophores, which are small molecules with high affinity for free Fe³⁺ (Braun and Hantke, 2011). The siderophore bacillibactin, encoded by genes of the *entA-dhbBCF* cluster (Hotta *et al.*, 2010), has been shown to have major impact on survival in low iron environment. Indeed, the *B. cereus* ATCC 14579 bacillibactin mutant is strongly affected *in vitro* in iron deprived conditions and in virulence following injection into the hemocoel of the insect larvae *Galleria mellonella* (Segond *et al.*, 2014). The *feuABCD / yuil* operon codes in *B.cereus cereus* for an ABC carrier type protein supposed to allow the transport of the bacillibactin / Fe³⁺ complex into the cell, with the gene *feuA* encoding for its specific siderophore binding protein (Zawadzka *et al.*, 2009). Like for several others bacteria, the processes involving iron homeostasis related gene expression in *B. cereus*, are also under the control of the repressor Fur (Ferric Uptake Regulator), which modulates indirectly pathogenicity during host infection (Fillat 2014; D. R. Harvie 2005; Porcheron et Dozois 2015). Furthermore, *in vitro* transcriptomic studies were recently performed in *B. cereus* in iron-depleted conditions highlighting genes which are involved in iron homeostasis (Hayrapetyan *et al.*, 2016).

However, little is known about the role played by genes related to iron homeostasis during gut infection and colonization in pathogenic Gram-positive bacteria. In the Gram-negative *Escherichia coli*, it was found that the catecholate type siderophores and their associated transport systems have a role in the colonization of the mouse urinary tract and gut (Pi *et al.*, 2012; Watts *et al.*, 2012). In addition, genes involved in iron uptake confer fitness advantages to *Salmonella enterica* during growth and colonization in the mouse intestine (Costa *et al.*, 2016). Likewise, gut microbiota and probiotics are reported to be involved in iron uptake in the gut, thereby preventing sustainable colonization of several bacterial species like *Salmonella* (Deriu *et al.*, 2013; Deschemin *et al.*, 2016). Strategies targeting siderophore acquisition of enteric pathogens have been tested as new therapeutic and preventive strategies (Sassone-Corsi *et al.*, 2016).

G. mellonella has been used as a promising and low cost infection model since it harbors a relatively complex innate immune system similar to Mammals (Mikonranta *et al.*, 2017;

Ramarao, Nielsen-Leroux, et Lereclus 2012). The larval stage has been used to analyze Gram-negative (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) or Gram-positive bacteria (e.g. *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*), allowing identification of virulence factors triggering Mammals infections and antimicrobial drugs testing following injection into the hemocoel (Senior *et al.*, 2011; J.-Y. C. Tsai *et al.*, 2017). *G. mellonella* was also proved to be an appropriate model for *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *P. entomophila* and *Listeria monocytogenes* oral infection studies (Fedhila *et al.*, 2010; Salamiou *et al.*, 2000, Mukherjee *et al.*, 2013) and for a *B. cereus* IVET (*in vivo* expression technology) promoter trap screening (Sinda Fedhila *et al.*, 2006). The latter approach allowed to identify a unique surface protein involved in iron acquisition (Abi-Khalil *et al.*, 2015; Daou *et al.*, 2009) and revealed expression of other iron regulated factors during infection (Fedhila *et al.*, 2006) To decipher microorganisms interaction with the host during infection, we have chosen a challenging approach based on laser-capture microdissection (LCM) (Bevilacqua et Ducos 2018). This technology allows the specific isolation of a target region without impact on the gene expression profile and have been used in different ecological niches (Hooper 2004; Podgorny et Lazarev 2017). Originally, LCM was used in cancer research (Domazet *et al.*, 2008; Emmert-Buck *et al.*, 1996; Legres *et al.*, 2014.) and then in broad-range disciplines in life sciences using mostly Mammals as model. But so far only few examples are related to microbiology, for instance to obtain information on the microbiota species spatial organization in the gut (De Hertogh *et al.*, 2012; Lavelle *et al.*, 2015; Nava, Friedrichsen, et Stappenbeck 2011) and host responses comparing conventional versus germ-free enterocytes (Chowdhury *et al.*, 2007). Reports on gene expression of an intracellular bacterial pathogen (Vannucci, Foster, et Gebhart 2013) or plant-microorganisms interactions (Ramsay, Jones, et Wang 2006; Roux *et al.*, 2014) are rare.

In our project, we have developed a method of breeding germ-free *Galleria mellonella* larvae to avoid, in this first attempt, measuring commensal microbiota gene expression. We aimed especially to explore which *B. cereus* genes, reported as being involved in iron homeostasis, are expressed in the insect gut environment as they may play a central role in bacterial settlement and virulence in the host gut. LCM was used for direct selection of bacteria from the intestinal lumen of frozen larvae. The use of LCM for a precise gene expression analysis in an extracellular pathogen during gut colonization has to the best of our knowledge, never been reported before, and the approach is therefore innovative and

should be of relevance for other host pathogen *in vivo* and *in situ* gene expression analyses. We address several objectives: i) Testing the feasibility of the approach; ii) further exploring the role of *B. cereus* genes involved in iron acquisition and virulence during gut colonization in an insect model; iii) Focusing especially on bacillibactin (EntA) and the siderophore binding protein (FeuA) with respect to the role of siderophores in the gut; iv) Evaluate whether iron homeostasis genes expression varies between early and late gut colonization.

Material and Methods:

Construction of the *B. cereus* mutant strains and growth conditions

Bacillus cereus ATCC 14579 parental strain (laboratory stock) was used in this study. *B. cereus* Δ feuA mutant was constructed as follows. For *feuA* (bc3738) deletion, a 1232 bp BamHI/HindIII DNA fragment and a 1053 bp HindIII/NcoI DNA fragment, corresponding to the chromosomal regions located immediately upstream and downstream from the *feuA* locus with the restriction site sequences (as recommended by manufacturer) added at the 5' extremities, were generated by PCR, using *B. cereus* strain ATCC14579 chromosomal DNA as a template and oligonucleotide pairs ExoFwd (5' CGGGATCCAGAACATCACCTCTGAAATTAGTATAAC 3')-ExoRvse (5' CCCAAGCTTCTTTATATGTCTCCTCTCGAATTTTCA 3') and PermFwd (5' CCCAAGCTTTACAATAAGTAAGGTGCGTTGAATGATA 3')-PermRvse (5' CATGCCATGGTTAAGCATGTCTCTCCTCCTC 3') respectively. The amplified DNA fragments were digested with the appropriate enzymes and inserted between the BamHI and NcoI sites of the thermosensitive plasmid pMAD (Arnaud, Chastanet, et Debarbouille 2004) by ligation using the T4 DNA ligase. For the double mutant construction Δ feuA Δ entA (bc3738/bc2302) deletion, the *entA* deletion was made as described previously (Segond *et al.*, 2014). The chromosomal allelic exchanges were checked by PCR, using appropriate primers and by sequencing the insertion sites.

B. cereus strains were cultured in 10 mL volume of LB (Luria-Bertani) broth, with vigorous shaking (190 rpm) at 37°C. At OD_{600 nm} =1, bacteria are harvested by centrifugation (8000 rpm) and washed twice with sterile phosphate saline buffer (PBS) 1X (filtered on a 0.22 μ m membrane, GP Millipore Express® PLUS Membrane). *B. cereus* ATCC 14579 parental strain as control and for further RT-qPCR analyzes were cultured in 10 mL LB or 10 mL LB with an iron chelator, the 2,2'-Bipyridyl (DIP) at 200 μ M, with vigorous shaking (190

rpm) at 37°C and stopped at OD_{600 nm} = 1. Each condition (LB and LB + DIP 200 µM) was performed in three biological replicates. Cultures are then centrifuged at 10000 rpm during 5 minutes. The supernatants are discarded and pellets are stored at - 80°C before total RNA extraction.

Colonization assay in *Galleria mellonella*

G. mellonella eggs were hatched at 25 °C and the larvae reared on beeswax and pollen (La Ruche Roannaise, Roanne, France). Last instar larvae (250–300 mg) were force-fed as previously described (Bouillaut *et al.*, 2005). Thirty larvae were used for each dose. Bacteria were harvested as mentioned above and suspended in Cry1C toxin 0.3 mg/mL at 5x10⁸ colony forming unit (CFU)/mL resulting in a 10 µl dose of 5x10⁶ CFU / larva. Larvae are incubated at 37°C without food. To count *B. cereus* CFUs in the living insects at 3 and 16 hours, 2 larvae were crushed and homogenized with UltraTurax tissue cutter in a finale volume of 10 ml sterile water; dilutions were immediately plated onto LB agar containing appropriate antibiotics. For each test, 3 technical replicates-have been performed. Each test has been done in 3 biological replicates.

***Galleria mellonella* germ-free preparation and infection for LCM**

All the devices and material used for the preparation of germ-free *G. mellonella* are washed with ethanol 70% and then treated twice 10 minutes under UV light in sterile conditions (Microbiological safety cabinet, MSC). Further manipulations including bacteria or *G. mellonella* infection are done within a sterile MSC. UV-treated *G. mellonella* eggs are reared with sterile Cobalt irradiated (intensity 25 kGy, (SAFE Company, Augy, France)) beeswax and pollen, at 27°C. Boxes containing eggs and food are sealed, and incubated at 25°C in humidified incubator. Verification of germ-free status were assessed by inoculation of crushed larvae (3 larvae / batch) in 3 individual Petri dishes and incubated at 37°C 24h. Last instar larvae (200 to 300 mg) were force-fed with a micro-injector (Bouillaut *et al.*, 2005). For each biological replicate, at least 40 larvae were infected with 10 µL solution of a *B. cereus* ATCC 14579 strain and Cry1C, corresponding to 5.10⁶ CFUs *per os* ingestion/larva. Larvae are incubated at 37°C and frozen in isopentane (Sigma-Aldrich) in a Snapfrost equipment (Excilone, France) at 3 and 16 hours post infection. Control larvae were force-fed with 10 µL of either Cry1C toxin (0.3 mg/ml) or sterile PBS.

Tissues Preparation for LCM

The cryo-section process is performed in a cryostat (FSE Shandon, ThermoFisher, France) at -20°C and in a RNA free environment (material treated with RNazap and 70 % ethanol). The frozen infected larvae are stored at -80°C until LCM is performed. For each biological replicate and to obtain enough material for downstream analysis, the second quarter of five larvae were cut out and 10 cross sections per quarter were collected on Arcturus PEN membrane RNase-free glass slides (Excilone, France). 3 to 5 sections were gathered on each slide, and fixed immediately in 75 % cold ethanol in the cryostat before further processing. The larval cross-sections (16 µm thick), were dehydrated and colored following the protocol (Bevilacqua *et al.*, 2010; Bonnet *et al.*, 2011) : 50% ethanol 20 seconds, homemade ethanolic solution of 1% cresyl violet 20-30 seconds, 50% ethanol 20 seconds, 75% ethanol 30 seconds, (95% ethanol 40 seconds) x2, (100% ethanol 1 min) x2, (xylene 5 min) x2. To locate the targeted structures, sections were analyzed under the optical microscope using the XT® Arcturus Technologies microdissection system (Excilone, France).

Laser Capture Microdissection

The LCM process was carried out using the XT® Arcturus Technologies microdissection system and software. Capture, was performed using Arcturus CapSure® LCM Macro Caps (Excilone, France). Bacteria present inside the insect gut were identified using the 20X objectives. PEN Membrane Slides allowed the use of standard IR and UV lasers. UV laser was used to cut around the lumen, avoiding epithelial cells, and IR laser was used to capture and stick the samples on the macro caps without contaminating the sample with non-target-tissue. Efficiency of microdissection was evaluated by examining the after lifting off the CapSure® macro caps. To obtain enough material for downstream analysis, 5 to 10 caps *per* biological replicate were stored at -80°C.

RNA extraction

For each condition (3h or 16h) and biological replicate (three biological replicates overall), the samples sticking over the caps are gently collected using an RNase-free device to remove the film covering the caps, and pooled in the same RNase-free tube. Total RNA was extracted using the Picopure™ RNA Isolation kit (Excilone, France). The protocol recommended by the manufacturer has been modified to adapt with Gram positive bacteria characteristics. To reach an optimal total RNA extraction, the following steps

have been performed:

i/ A volume corresponding to 50 μ L of lysozyme solution (10 mM Tris-HCl pH = 8 / 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) / 1 mg lysozyme) by cap is added in each tube and thoroughly mixed ; ii/ Addition of 0.5 μ L of a 10 % Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) solution to the lysate and well mixed; iii/ Incubation 5 minutes at room temperature; iv/ Addition of 150 μ L of Extraction Buffer (provided by manufacturer); v/ The lysate is passing 5 times through a RNase free needle and syringe; vi/ Addition of 70 % ethanol.

The protocol is ended following the manufacturer procedure. The quality and quantity of the RNA was assessed using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) with an RNA6000 Pico Lab Chip and analyzed by the RNA Integrity Number (RIN) algorithm (Schroeder *et al.*, 2006).

Targeted genes and Quantitative RT-PCR

For this study, we targeted genes involved in *B. cereus* iron homeostasis along with other genes implicated in different bacterial processes. Reference housekeeping genes *rpoB*, *tpi* and *purH* were tested for accurate normalization of data. Primers were designed using Primer Express™ 3 software (Applied Biosystems), adapting the algorithm of primer research for SYBR Green quantitative PCR (qPCR). Efficiency of primers were tested on a cDNA pool obtained from *B. cereus* cultured in LB medium and LB with an iron chelator, the 2,2'-Bipyridyl (DIP), with vigorous shaking (190 rpm) at 37°C and stopped at OD_{600nm} = 1. Primers efficiency has been tested using standard curves with different concentrations of *B. cereus* cultures cDNA and melting curve. Primers were all having 85% at least of efficiency.

Reverse transcription (RT) to obtain cDNA was performed using the TATAA Grandscript cDNA Synthesis Kit (TATAA Biocenter) according to the manufacturer protocol, to allow RT of low copy number targets (Andersson *et al.*, 2015), with a GeneAmp PCR System 2400 (PERKIN ELMER).

Before the qPCR, a pre-amplification (PreAmp) step appeared to be needed, as the amount of bacterial mRNA was too low in the collected samples to get a correct detection during the SYBR Green qPCR analyzes. To perform this pre-amplification, we used the TATAA PreAmp GrandMaster® Mix (TATAA Biocenter). The first step was to prepare a primer pool in nuclease free water (Qiagen) of primers targeting the selected genes. Accordingly with the manufacturer recommendations, each couple of primers presents in the primers

pool has a final concentration of 50 nM. To test the efficiency of PreAmp, we used the same pool of *B. cereus* total RNA extracted. The PreAmp mix is then prepared as following for each biological replicate: 25 μ L of TATAA PreAmp GrandMaster[®] Mix; 20 μ L of primers pool (20 nM final); 5 μ L of undiluted cDNA. The cycling protocol respects the manufacturer recommendations with 18 cycles in a GeneAmp PCR System 2400 (PERKIN ELMER). The PreAmp liability was tested before the targeted experiments, using 2 different concentrations of total RNA extracted from a *B. cereus* cells pool cultured in LB and LB + DIP 0.2 mM. The concentrations were 50 pg and 0.05 pg of total RNA. RT and PreAmp were performed as described above, and control (cDNA without PreAmp) was analyzed too. The relative Ct increase after qPCR is then compared.

SYBR Green qPCR (SYBR qPCR) is performed following the instructions of TATAA Biocenter, using the QuantStudio[™] 12K Flex (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific). For each sample, 2 μ L of PreAmp cDNA is loaded with 10 μ L of TATAA SYBR[®] GrandMaster[®] Mix (1X final), 1.2 μ L of forward and reverse primer (300 nM each) and 2.6 μ L of nuclease free water (provided with the kit). The 3 steps cycling protocol is as following: Pre-denaturation: 95°C, 30 seconds; Cycling: 95°C, 5 seconds followed by 60°C, 30 seconds; Data collection: 70°C, 10 seconds. Data are primarily analyzed and collected with the QuantStudio[™] 12K Flex Software v1.2.2 and further analyzes have been performed using the Thermo Fisher Connect[™] cloud.

RESULTS

Colonization of *Galleria mellonella* gut

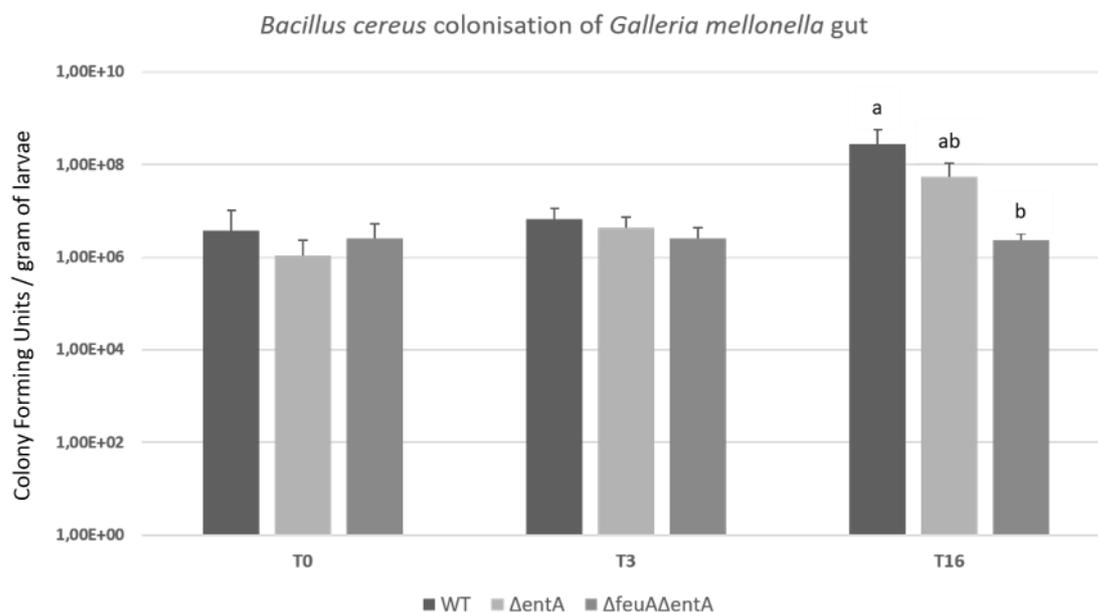


Figure 1: Colonisation of *Galleria mellonella* last instar larval gut by *Bacillus cereus* strains. WT (*B. cereus* ATCC 14579) $\Delta entA$ (bacillibactin mutant), $\Delta feu\Delta entA$ (double mutant of bacillibactin and its siderophore binding protein). Error bars are representing standard deviations of 4 biological trials for each strain. Different letters above histograms indicate significant differences among strains (Student's t-test, n = 4, p < 0.05).

An important role of the siderophore bacillibactin EntA in virulence in *G. mellonella* after injection into the hemocoel has been previously reported (Segond *et al.*, 2014). Furthermore, the enterobactin (chiral molecule of bacillibactin) and its siderophore binding protein (SBP) have been described as key factors for intestine colonization of germ-free mouse by *E. coli* (Pi *et al.*, 2012). We then tested the hypothesis whether both bacillibactin and its putative SBP feuA protein of *B. cereus* have a role in insect gut colonization. For this purpose, we performed an analysis in germ-free *G. mellonella* last instar larvae using 3 different strains of *B. cereus* ATCC 14579: the parental strain (WT), the mutant strain deprived of a chromosomal gene essential for the synthesis of bacillibactin ($\Delta entA$) and the double mutant strain knocked out for genes encoding both bacillibactin and the SBP FeuA ($\Delta feu\Delta entA$).

To evaluate the number of bacteria present in the insect gut we chose two time-points: at an early stage of infection (3 hours) and at a late stage (16 hours) post force-feeding. The bacterial persistence inside the *G. mellonella* was assessed (Figure 1). The *B. cereus* WT

and $\Delta dentA$ strains have a slight but not statistically significant increase of colony forming units (CFUs) from infection time (T0) to 3 hours post-infection, with respectively a mean value of 3.75×10^6 to 6.51×10^6 and 1.05×10^6 to 4.22×10^6 CFUs *per gram* of larvae. The number of bacteria inside the host increased at 16 hours post infection for the WT and the $\Delta dentA$ strains (2.7×10^8 CFUs and 5.32×10^7 CFUs respectively *per gram* of larva), while the double mutant strain $\Delta feuA \Delta dentA$ kept a constant number of bacteria at the three time-points, with 2.55×10^6 , 2.57×10^6 and 2.33×10^6 CFUs per Gram of larva at T0, T3 and T16 hours respectively. At 16 hours post infection the amount of colonizing WT bacteria was statistically different from the double mutant $\Delta feuA \Delta dentA$ strain (Student's t-test, $n = 4$, $p < 0.05$, JMP software), indicating that the deletion of this iron uptake system negatively impacts the fitness of the bacteria.

LCM of *B. cereus* in *G. mellonella* midgut for RT-qPCR analysis

To compare expression of *B. cereus* genes during *G. mellonella* midgut infection, two time points were selected: 3h (designed as control to allow bacterial adaptation in the intestinal environment) and 16 h post infection (bacteria are colonizing the intestinal surface). At 16 hours bacteria were recovered in all 4 sections of the larvae, but the majority was in the second section (midgut) (Figure 2A), which we then used for the sampling. To perform LCM, we cut the area containing the bacteria with the UV laser and then glued it to the bottom of the macro cap.

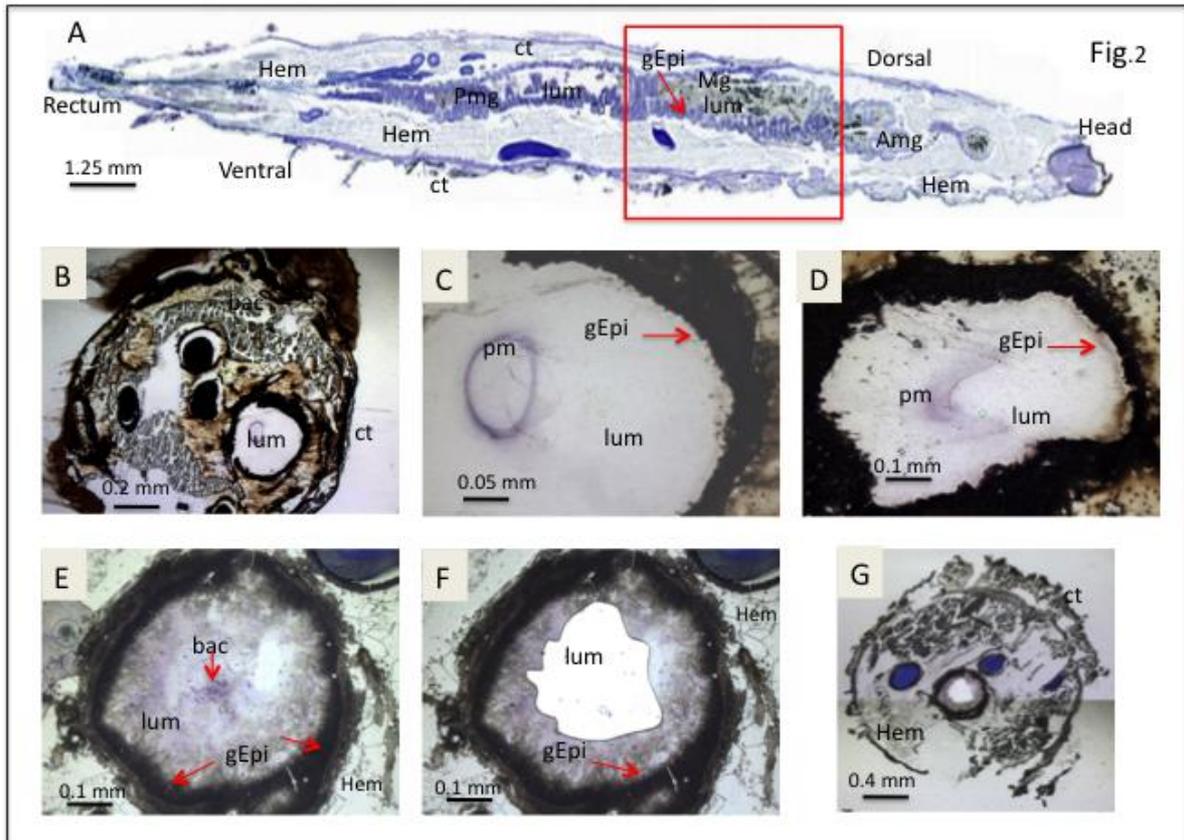


Figure 2: Light microscope observation of whole *Galleria mellonella* larva. (A) Sagittal 20 µm thick cryo-section of whole larvae. The red zone indicates the corresponding area on which cross-sections (16 µm tick) were performed after dehydration and staining, before laser-capture microdissection (B-G). Cross-sections of negative control PBS (C) and Cry1C toxin (D) are presented (lens: *10). The figure E, F and G present a cross-section before (E) and after laser-capture microdissection (F, lens *10; G, lens *2) with UV-cutting. lum: Lumen; Hem: Hemocoel; Ct: Cuticle; Mg: Midgut; Amg: Anterior midgut; Pmg: Posterior midgut; gEpi: gut Epithelium (enterocytes); pm: peritrophic matrix; bac: Bacteria.

First, larvae from the negative control, force-fed with PBS buffer, were analyzed under the microscope following cresyl violet staining (Figure 2C). The intestine and the peritrophic matrix (in violet in the lumen) are visualised and the intestinal surface and peritrophic matrix looked intact. Larvae treated with Cry1C only showed a modified peritrophic matrix at 3H post ingesting (Figure 2D), suggesting that Cry1C might structurally damage this barrier. The LCM, UV-cutting laser was used to collect *B. cereus* samples inside *G. mellonella* lumen (Figures 2E, 2F and 2G). At 3 hours post infection, most of the bacteria are localized in the center of the lumen while bacteria were either closer to the gut epithelial or embedded in detached epithelial cells in the lumen 16 hours post infection.

An example of UV dissected sections is shown on Figure 2F and Figure 2G, indicating that a whole area inside the intestinal lumen has been removed.

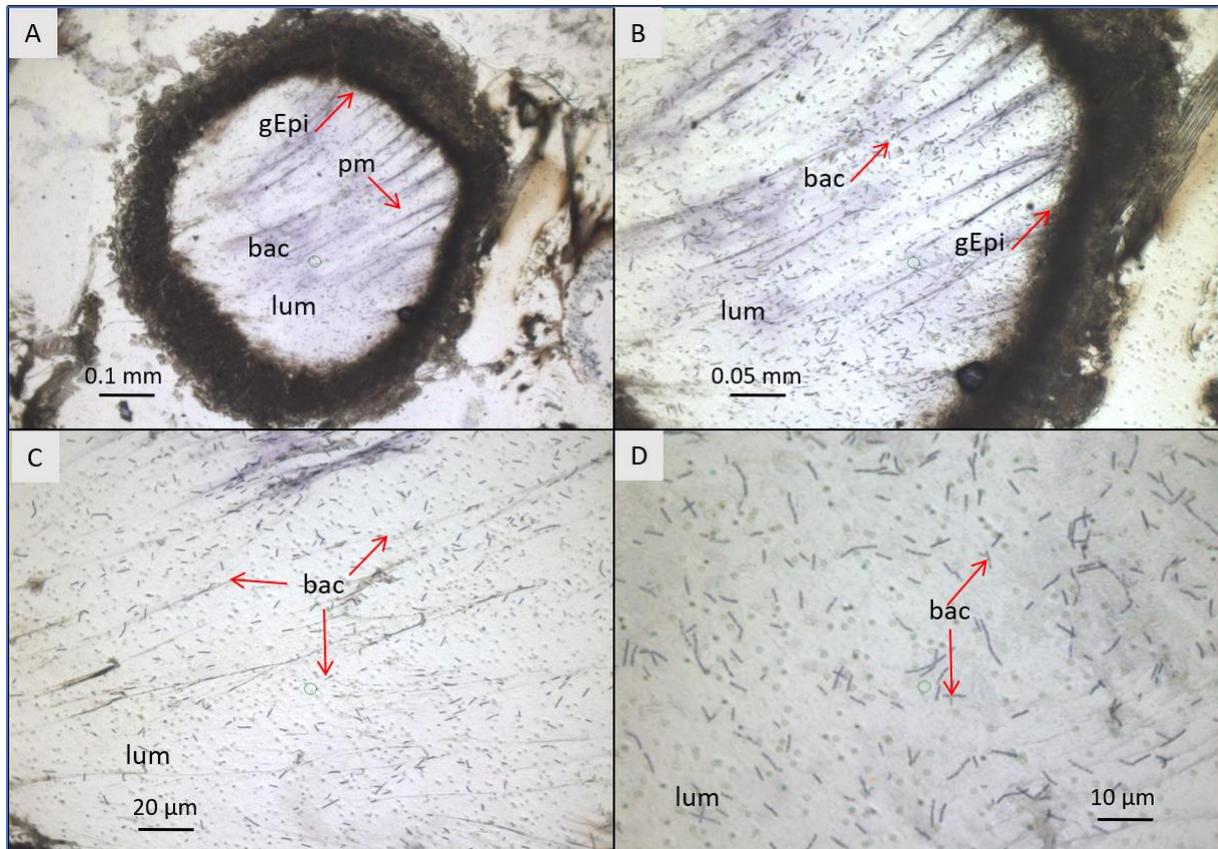


Figure 3: Light microscope observation of *G. mellonella* larvae infected with *B. cereus* 3H post ingestion. Cross-section (16µm) with focus on the intestine (Midgut) and the bacteria after cresyl violet staining and dehydration with ethanol and xylene. (A) lens 4 X magnification; (B) lens 10 X magnification; (C) 20 X lens magnification and (D) 40X lens magnification. lum: intestinal lumen; bac: bacteria; gEpi: Gut Epithelium; pm: Peritrophic matrix.

At 3 hours and 16 hours post infection, the bacteria have crossed the peritrophic matrix probably due to the Cry1C protein synergy action (Salamitou *et al.*, 2000) also the peritrophic matrix cannot be identified properly. The gut epithelium keeps its integrity at 3 hours post ingestion while some enterocyte bleeding is observed at especially 16 hours post ingestion but no apparent strong damage, which could enable the bacteria to colonize the hemocoel, is observed. Differences in bacterial shape and localization in the lumen are observed comparing the 2 time points (Figure 3 and 4). While *B. cereus* is widespread in the gut at the early stage of infection and more individualized, they tend to gather and localize closer to the epithelium at 16 hours. These observations suggest an adaptation of *B. cereus* to this environment and show that the presence of the bacteria influences the intestinal cells by increased bleeding off.

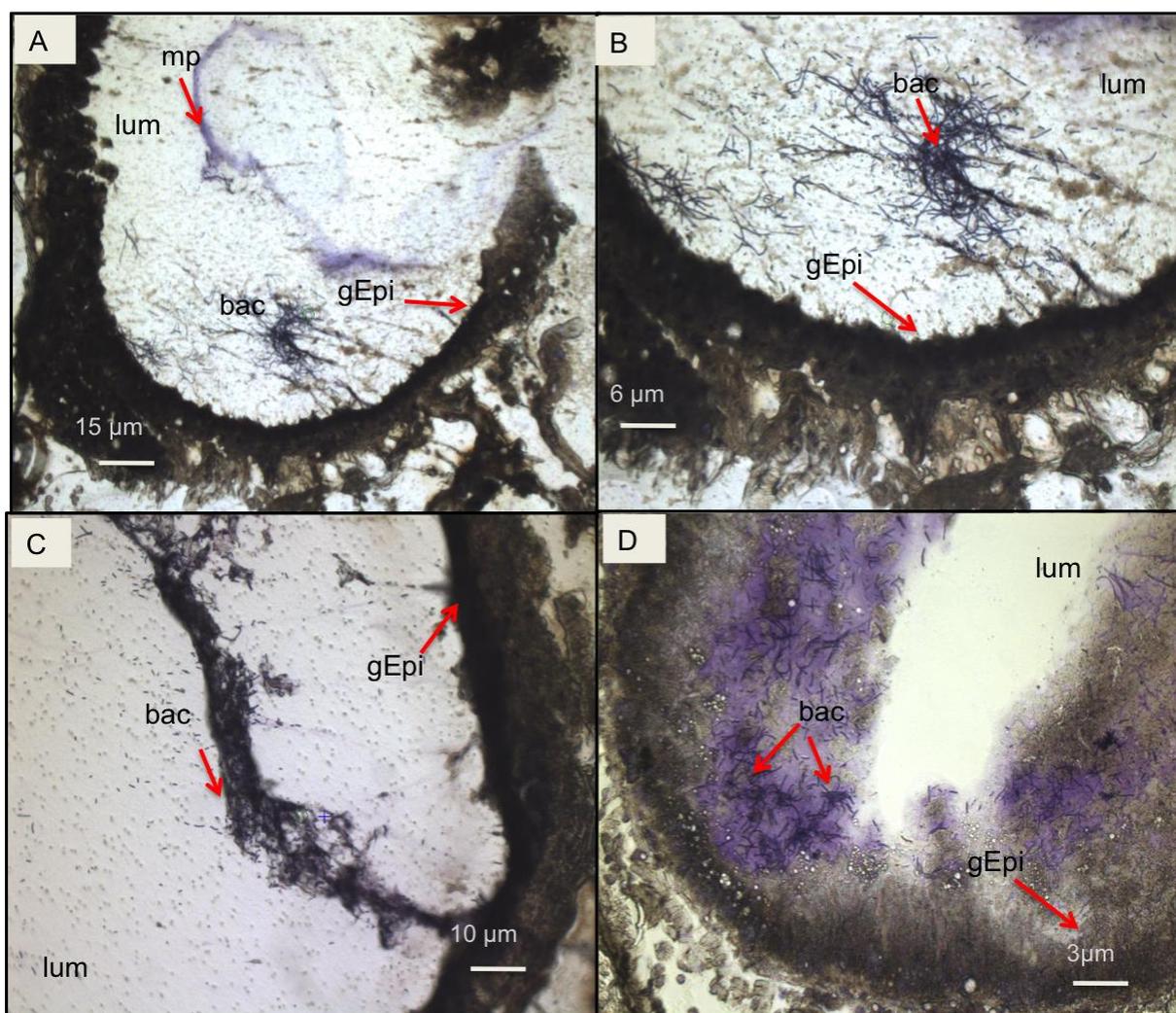


Figure 4: Light microscope observation of *G. mellonella* larvae infected with *B. cereus* 16H post ingestion. Cross-section (16µm) with focus on the intestine (Midgut) and the bacteria after cresyl violet staining and dehydration with ethanol and xylene. (A) lens 4X; (B) lens 10 X; (C) 20 X lens and (D) 40X lens. lum: intestinal lumen; bac: bacteria; gEpi: Gut Epithelium; pm: Peritrophic matrix.

RNA extraction

After gathering the collected samples, the quantity and quality of total RNA was assessed. We compared the bioanalyzer results of LCM total RNA to total RNA extracted from a *B. cereus* planktonic culture stopped at $OD_{600nm} = 1$ (Figure 5A and 5B). Low amount of total RNA was recovered and more surprisingly, the large majority of total RNA was eukaryotic RNA, even though the dissected areas were thoroughly designed to target bacteria and avoid visible epithelium cells of insect's gut. To overcome this very low input of *B. cereus* total RNA and the presence of eukaryotic RNA, we decided to analyze only the target genes in qPCR after PreAmp step. Target-specific PreAmp is usually performed by multiplex PCR using predefined primer pool (Andersson *et al.*, 2015). In this way, we were able to analyze several target genes from microdissected samples. However, the main challenge

of amplification protocol is to preserve the relative transcript levels (Bevilacqua et al, 2017). Today, several kits are commercialized with very reproducible results. In our study, to validate PreAmp reliability, two *B. cereus* reference genes, *rpoB* and *tpi*, were chosen. For both genes and for two cDNA quantities template, we gained around 11 Ct, with respectively at 50 pg and 0.05 pg cDNA 11.18 Ct and 10.71 Ct for *rpoB*, and 11.72 Ct and 11.02 Ct for *tpi* (Figure 6). The efficacy and reliability of this kit was therefore established in our conditions with low-input (50 pg of cDNA) or very low-input (0.05 pg of cDNA) from pure *B. cereus* cultures.

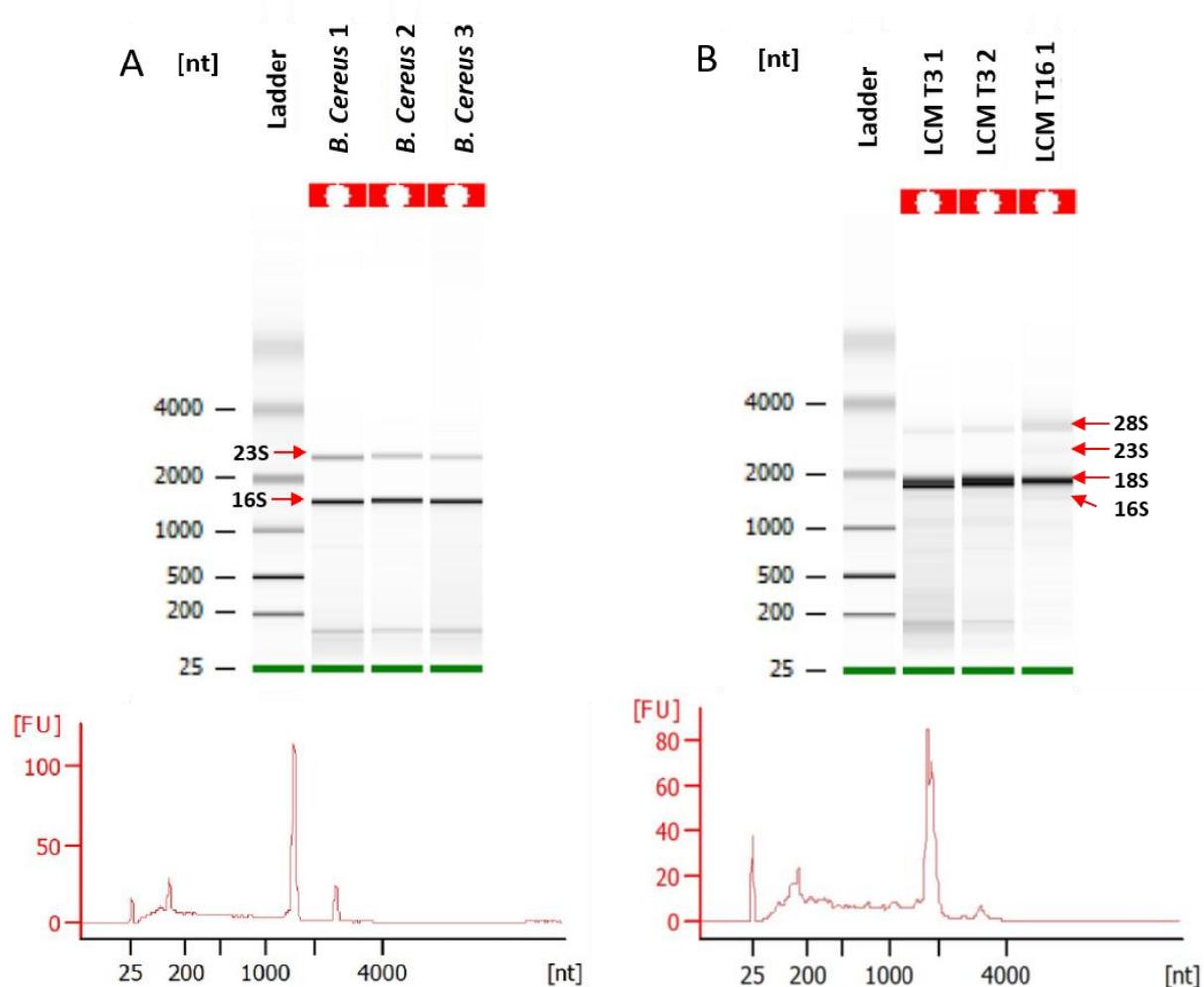


Figure 5: Quality assessment of total RNA samples (Agilent Bioanalyzer). A: tRNA quality of *B. cereus* cultures; B: tRNA quality of *G. mellonella* gut infected with *B. cereus* obtained after Laser-Capture Microdissection at 3 hours (T3) post infection and 16 hours (T16) post infection. 16S and 23S indicate bacterial ribosomal RNA. 18S and 28S indicate eukaryotic ribosomal RNA.

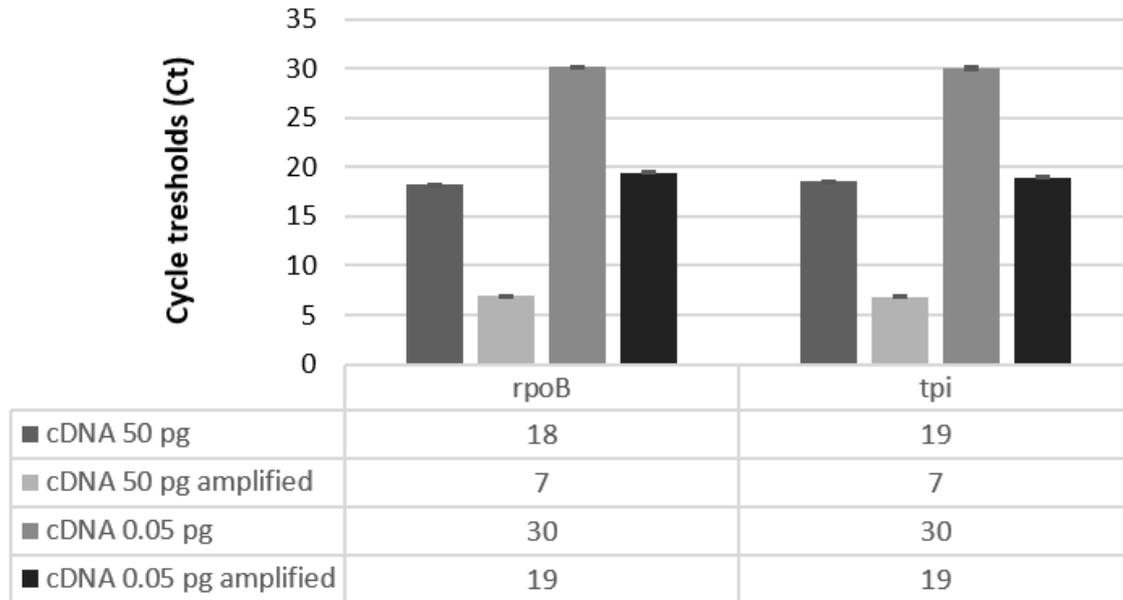


Figure 6: Gene amplification control. The test uses two different quantities of cDNA obtained from *B. cereus* in vegetative phase from LB culture. CT values from Q-PCR analyses of *rpoB* and *tpi* amplicons are indicated. A conserved 11 CT difference is observed between amplified and non-amplified cDNA templates.

RT-qPCR expression of iron homeostasis genes from *in vivo* collected bacteria

To analyze whether genes involved in *B. cereus* iron homeostasis play a role in this adaptation, we targeted genes related to iron homeostasis, along with other genes that could help to understand the environmental context and physiological stress imposed to the bacteria at the time of dissection.

Table 1: *Bacillus cereus* ATCC 14579 genes targeted in the RT-qPCR classified by function

Locus tag	name	Primers (up: forward; down: reverse) 5' to 3'	Function (annotated)
Reference genes			
BC0122	<i>rpoB</i>	CGGCAGCGACAGCTTGTATT GCATGTTTCGCTCCCATAAGTG	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
BC5137	<i>tpi</i>	GAAGTACTTACAAGTAGGTGCA CAAA	topoisomerase
BC0333	<i>purH</i>	TCGCCAGTGAATGCACCAT GGTAGCGCACTTGCATCTGA TCCTGCTTTTGCTGCTTCTTC	bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase

Iron homeostasis

BC1331	<i>ilsA</i>	TGGCCATTGGGCGAAA	iron regulated leucine-rich protein
		CCCCGTCGCCTTTTGATAT	
BC2302	<i>entA</i>	CGGCAAATACGCCGAGAAT	3,3-dihydro-3,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase (gene from bacillibactin operon)
		ACATCGTCGTTGCAGCCTTT	
BC3738	<i>feuA</i>	AGTGCCAGCAAAAAGTAGATAAAA TTG	bacillibactin siderophore binding protein
		TTCCAAGTACTGCCGCATCTT	
BC5106	<i>fatB</i>	GGTTTTGCTGCGCCACAT	petrobactin siderophore binding protein
		AGTCCAACCGAAAATTTTCATACA TT	
BC4528	<i>fpuA</i>	ATATGGATAAAGCATTTCGCTGAT G	petrobactin siderophore binding protein
		CCATTGCGATGTTTTTATCTTTT AAG	
BC4549	<i>isdC</i>	AGTGCAAATATGACCACCACTA CA	iron transport associated protein
		TCGCCACCTACAGCTTTTACATT	
BC0707	<i>feoB</i>	ACTTACCACGTGTCGCGTTTAA	ferrous iron transport protein
		TGTGCGCCGGATCGTT	
BC0616	<i>fec</i>	GGCAAACCTGGCGATAAAGTAAA	Iron (III) dicitrate ABC transporter
		ACGAACATCACCAGGCATGAA	
BC1978- BC1983	<i>asb</i>	ACATGCAAACGACGCAACA	Petrobactin
		GCGTACGCTCTCCAGGTATAGC	

Regulation of genes expression

BC4091	<i>fur</i>	ACACCGCAACGTGAAGCA	ferric uptake regulation protein
		TCTGCGCTTAAATGATCTTCTTC AT	
BC5350	<i>plcR</i>	CGATTGAAATATCATGCCGAATT	transcriptional activator plcR
		AGGCATTACCTCTTTGATAATA TAGC	
BC3826	<i>codY</i>	CGTAGTTAGCCGTCGTGGTAAA	transcriptional repressor CodY
		TGCGTTCGTTTTTCGATTTGTT	

Oxydative stress

BC5445	<i>sodA</i>	CTTGACGGTGAGGAACTCTCTGT	superoxide dismutase
		CCCTTCTTGCAAAGGCGTATC	
BC1155	<i>catalase</i>	TGGTGCGATGCAAGTGAATC	Catalase
		CATGACGGCTCGGTTTCGTA	
BC5044	<i>dps</i>	AGAAGGGATGGTCAAGCAA	ferritin-like iron-binding protein
		GCCTTTTTTCAGTTCGATTAGCA	

Virulence factors

BC1809	<i>nheB</i>	AAGACTTTAATTACAGGGTTATT GGTTACA	non hemolytic enterotoxin lytic L2
BC3523	<i>hlyII</i>	TCTGTTTGCCCTCCTTAGC CTGGAAAACCATCAAGTTACTC	hemolysin II
BC0666	<i>inhA2</i>	TCACCATTTACAAAGATACC AATTATGCGGGATCAGATAATGG GATGCACCCCAACCCAGTTA	immune inhibitor A precursor

The comparison of *Bacillus cereus* gene expression at late stage and early stage of *G. mellonella* midgut infection was then performed using this amplification (Figure 7). The fold change of gene expression at 16 hours compared to 3 hours has been normalized using 3 reference genes: *rpoB*, *tpi* and *purH*. Except for *feoB* and *sodA*, all the genes targeted have a lower expression at 16 hours post infection compared to 3 hours post infection. Only two genes are overexpressed at 16 hours, *hlyII* and *dps*, with expression ratios of 1.86 and 2.60 higher, respectively. Genes involved in iron homeostasis and controlled or not by Fur (*fur* is slightly down-regulated: 0.84) are down regulated, except *feoB*, which corresponds to a protein involved in the ferrous (Fe²⁺) iron transport, which was slightly up (1.12). Nevertheless, this difference is not statistically different. Interestingly, genes involved in oxidative stress have different behavior. While *dps* is up-regulated by 2.60 fold, the superoxide dismutase *sodA* has a level of expression (0.99) similar to the early infection stage, and finally the catalase is down-regulated (0.77). Also, the genes encoding the virulence factors *nheB* (non-hemolytic enterotoxin) and *inhA2* (metalloprotease), which are controlled by the transcriptional activator PlcR, are down-regulated respectively 0.74 and 0.80 fold and the *plcR* itself by 0.65 fold, as well as the global transcriptional regulator *codY* by 0.50 fold.

Differential gene expression at 16 hours compared to 3 hours post infection

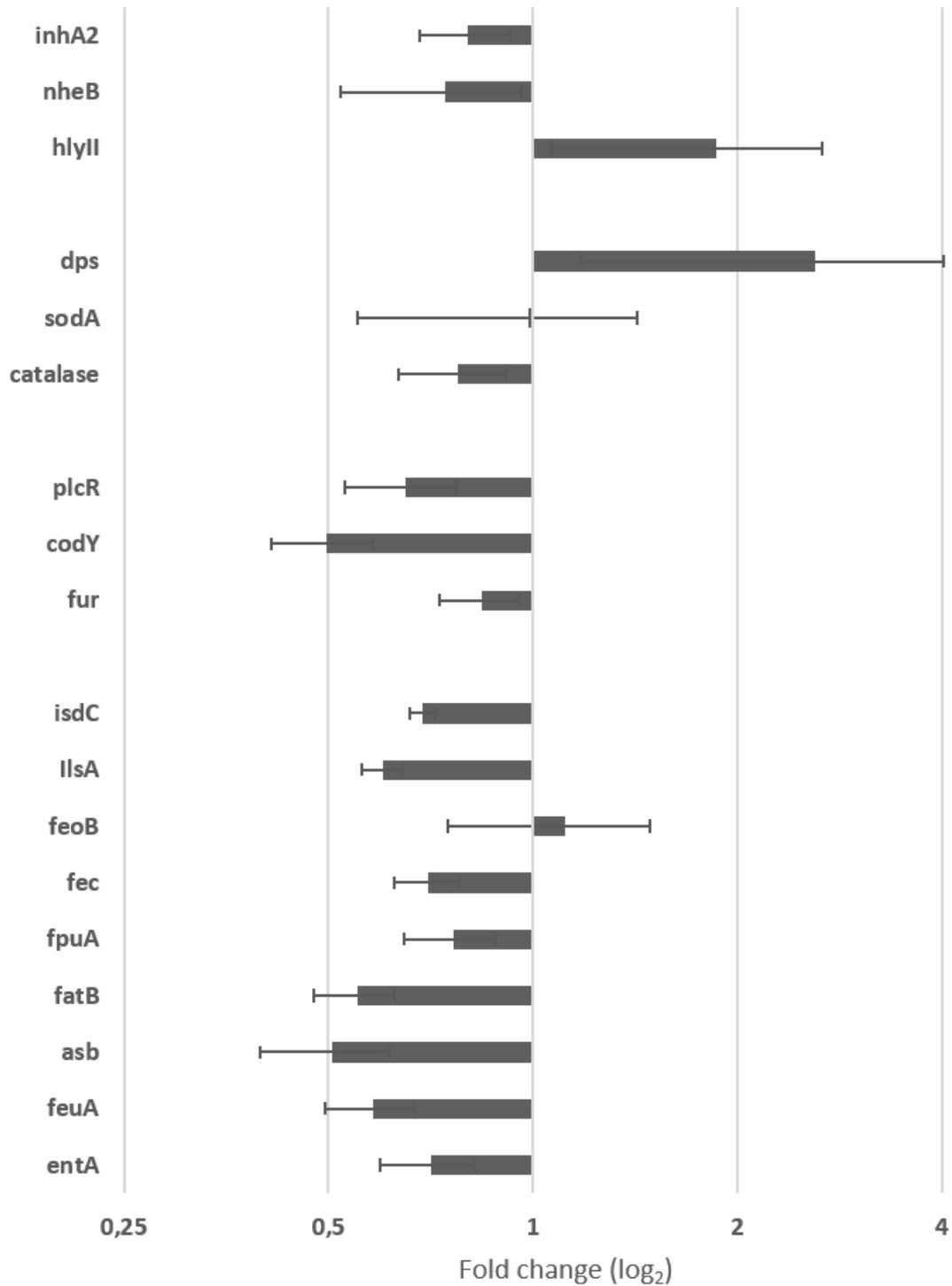


Figure 7: Differential gene expression of *B. cereus* ATCC 14579 parental strain at late infection stage (16 hours) compared to early stage (3 hours) in germ-free *G. mellonella* midgut. Data are normalized, using, 3 reference genes (*rpoB*, *tpi* and *purH*). Error bars indicate the standard deviation of 3 biological replicates.

Discussion

The aim of this study was to perform *in vivo* analyzes that should provide added insight to *B. cereus* host adaptation during gut infection in an insect model. We wanted to assess by a novel and targeted approach whether genes involved in iron homeostasis were differentially expressed as the infection progresses. Indeed, little is known about iron status of enteropathogenic Gram-positive bacteria in the gut environment: how bacteria adapt in the intestinal lumen and which bacterial factors are activated when the host cells are damaged. By using LCM approach, we were able, for the first time, to target a specific area in the midgut to study the adaptation of *B. cereus* during gut infection *in vivo*.

We choose an early step of infection (3 hours), compared to, a later stage (16 hours) post-ingestion. The focus was principally on genes involved in iron homeostasis. Nevertheless, other genes, known as indicators for specific bacterial metabolic activities, were also chosen, which thereby could inform on the bacterial stress in the host environment. Finally, we analyzed the expression of a few genes encoding virulence factors.

The use of LCM to perform this study seemed appropriate given the increased interest for this technique to decipher host–pathogens interactions with respect to microbial aspects (Hooper 2004; Podgorny et Lazarev 2017). Meanwhile, in those papers the targeted genes were focusing on host responses or identification of microbiota species. To our knowledge, none of these studies were specifically focusing on pathogen gene expression at different time points of gut infection. Therefore our study provides evidence for an additional use of LCM for targeted *in situ* genes expression of an extracellular pathogen.

Numerous kits allowing amplification of low or very-low input total RNA from small samples or single cell sequencing methods have been used and compared recent years to perform RNA sequencing (Shanker *et al.*, 2015; Ziegenhain *et al.*, 2017). The lack of poly-A tails in prokaryotic RNAs makes impossible to use an amplification kit based on oligo-dT priming, and therefore reduces the number of available kits for bacteria sampling. Some kits proposing poly-A tailing before amplification have been used in previous studies (Roux *et al.*, 2014) and adaptation with a poly-A tailing kit before choosing another amplification kit was considered, but we wanted to avoid additional step that could bias in our analyzes. The ratio between total RNA amounts of prokaryotic cells compared to eukaryotic cell represents an issue. Some techniques to enrich bacterial mRNA or to perform RNA sequencing for both bacteria and host cells during infection have been proposed in that regard (Nikhil Kumar *et al.*, 2016; Westermann, Gorski, et

Vogel 2012). Performing RNA sequencing as output of the LCM sampling was too uncertain, since eukaryotic RNA was much higher compared to the prokaryotic one, with a ratio around 1/1000 in our experiments and Bioanalyser measurements. These observations indicate the presence of large amount of *G. mellonella* RNA in the lumen outside the epithelial surface, probably caused by cell apoptosis, gut cell turnover and cell lysis due to pore forming toxins (Fedhila *et al.*, 2002; Tran *et al.*, 2013). Also a better stability or slower turnover of eukaryotic RNAm compared to that from bacteria in general might be a reason. The RT-qPCR coupled with target-specific preamplification used in our study is recognized as a powerful tool to analyze differences in targeted gene expressions (Regier et Frey 2010) starting from a low amount of sample (Anderson *et al.*, 2015), therefore the basis for our analysis should be reliable.

All the targeted genes are expressed in the insect gut at both 3 and 16 hours. Genes involved in iron homeostasis which are controlled by Fur, the major repressor of iron homeostasis (*entA*, *feuA*, *fatB*, *fec*, *feoB*, *IlsA*, *IsdC*), and two Fur-independent additional genes (*fpuA*, *asb*) were all down regulated at the later stage of intestinal infection (t16), except *feoB*. It has been previously shown that *in vitro*, Fur-controlled genes, involved in iron uptake, are down-regulated in iron replete conditions, except the *asb* operon, which encodes the siderophore petrobactin (Hayrapetyan *et al.*, 2016). These results suggest that at the early stage of infection, the lack of iron available inside the insect gut lead *B. cereus* to express all genes related to iron uptake to scavenge iron from the host environment until sufficient amount of iron is available in the extracellular medium, which thereby assures enough Fe²⁺ in the bacterial cytoplasm resulting in Fur repression. The role of the siderophore Bacillibactin (encoded by an operon including *entA*) in virulence in *Galleria* was previously shown (Segond *et al.*, 2014), when the bacteria were injected into the hemocoel. Here we show that bacillibactin and its substrate binding protein (FeuA) also have a role in host adaptation in the gut environment. Indeed, the absence of bacillibactin and FeuA reduces the capacity of bacterial growth in the larvae (about 2 log of difference between parental strain and the double mutant at 16 hours post infection). A Similar role of siderophores in a gut environment was shown for *E. coli* strains knocked-out for enterobactin (a catecholate siderophore, like bacillibactin) and the ferric catecholate transporters in germ-free mouse intestinal tract (Pi *et al.*, 2012). By contrast, other studies targeting different genes involved in metal ion uptake for other *E.coli* strains did not show a significant difference (Kupz *et al.*, 2013). In late infection

stage, the upregulation of *feoB* appears not significantly different, even though two out of three biological replicates had positive fold change (1.4 and 1.2 versus 0.7 for the third one). The membrane protein FeoB was identified as a G protein with GTPase activity (Marlovits *et al.*, 2002), allowing import of ferrous iron in bacteria (Hyunkeun Kim, Lee, et Shin 2012). These results suggest that *B. cereus* can use this system in iron uptake supposing an environment rich in ferrous iron and therefore reduce the need to synthesize all the other iron uptake systems involving direct acquisition systems (peptidoglycan linked surface proteins like IsdC, or IIsA) or indirect acquisition systems (using different components like siderophores and their transporters. It was previously reported that IIsA was strongly expressed in the hemocoel of *G. mellonella* by the use of plasmid born transcriptional promoter and fluorescence (GFP) or β -galactosidase (*lacZ*) reporter gene fusions or during IVET promoter activation (Daou *et al.*, 2009; Sinda Fedhila *et al.*, 2006). Here we show that IIsA is indeed expressed in the larval gut while gut expression was not observed with GFP fusions in the previous work, indicating that the RT-qPCR is more sensitive and that stronger transcription is needed to produce enough GFP to be visualized.

To prevent damages caused by reactive oxygen species (ROS) released in the environment, bacteria have to use strategies for notably DNA repair, lipid membranes or proteins (Ezraty *et al.*, 2017). The bacterioferritin Dps is involved in iron storage and protect bacteria from oxidative stress *in vivo* (Z. Wang, Gerstein, et Snyder 2009). In our conditions, this gene harbors the largest positive differential expression at the late stage of infection. This result suggests that inside the gut, the oxidative stress is increasing, probably due to host cell degradation and hence release in the environment of molecules as ferrous iron, which reacts with oxygen to produce reactive oxygen species (ROS) by Fenton reaction. Two other genes were targeted as indicators for the oxidative stress inside *G. mellonella* gut during infection: the superoxide dismutase *sodA* and a catalase gene. It is known that these factors are protecting bacteria from ROS, especially superoxide radicals and H₂O₂ (Valko, Morris, et Cronin 2005), and could be up or downregulated in Gram-positive bacteria. Depending of the metal released in the environment, one can be upregulated while the other one may be downregulated (Behera, Dandapat, et Rath 2014). Here, while catalase is downregulated, *sodA* seems to have a minor variation among replicates (1.1, 1.3 and 0.5). Overall, sensors tend to indicate that

B. cereus has to face a higher level of oxidative stress inside the *G. mellonella* gut 16 hours post infection.

In vivo assays in *G. mellonella* following injection of *B. thuringiensis* into the hemolymph were previously performed to study the level of expression of the hemolysin II (*hlyII*) and its importance in virulence (Tran *et al.*, 2013; Cadot *et al.*, 2010). To our knowledge, *hlyII* expression has not been tested during oral infection in *G. mellonella*. In our study, *hlyII* is overexpressed in late infection stage compared to the beginning of infection. This gene is under control of its own regulator HlyIIR and Fur (D. R. Harvie 2005; Sineva *et al.*, 2012). *HlyII* expression is induced in the hemocoel with low iron and glucose availability (Tran *et al.*, 2013; Elisabeth Guillemet *et al.*, 2013) allowing the bacteria to access to nutrients and promoting growth by degrading host macrophages and erythrocytes (Tran et Ramarao 2013). Even though *fur* is slightly downregulated after 16 hours of infection, as well as the other targeted genes involved in iron homeostasis, the bacteria are still expressing hemolysin II (*hlyII*) when they are close to the epithelium cells. The resulting enterocyte cell lysis may then provide nutrients for the bacteria. The pore-forming activity of HlyII on *Galleria* gut cells remains to be studied, but one might speculate that increased expression of *hlyII* resulting in gut cells damage and release of iron in the ferrous form could explain why *feoB* is more expressed. The Feo systems are widespread in many bacterial species and have essentially been studied in Gram negative bacteria (Lau *et al.*, 2015). Our results might indicate that FeoB has an important role during *B. cereus* host cell interaction. It was reported that the metalloprotease InhA2 has a role in *B. thuringiensis* virulence following oral infection, probably to help to cross the gut barrier (S. Fedhila *et al.*, 2003). Our results show that *inhA2* is lower expressed at late infection stage compared to early infection stage (fold change: 0.8). These results, as well as the observation of corresponding pictures (Figures 3 and 4), indicate that the epithelium degradation probably started very early during infection. The need for high amount of metalloproteases like InhA2 or NheB enterotoxin may be reduced in the later infection stage. Therefore, the corresponding virulence factors genes, *nheB* and *inhA2*, are less expressed. Interestingly, the gene encoding their transcriptional activator *plcR*, the pleiotropic (PapR-PlcR) quorum system (QS) is also downregulated at 16 hours post infection. PlcR is known to be a sensor for several environmental factors, expressed at the early stationary phase (Gohar *et al.*, 2008). All the three genes are still expressed at 16 hours and the dissected bacteria were in high density at both time points, which should

be optimal for QS activation (Leyla Slamti *et al.*, 2014). An explanation for reduced expression at 16 hours may be linked to the fact that there are nutrients available and the bacteria may revert to multiplication and leave the stationary phase. This agrees with the increased colony forming units recorded at 16 hours compared to 3 hours and indicates that the bacteria during host infection may transit from one state to the other. It makes sense here to have an insight of its expression during *G. mellonella* gut infection, since PlcR regulon is very important for full virulence of *B.thuringiensis* and *B. cereus*, following oral infection in *G. mellonella* (Salamitou *et al.*, 2000).

In conclusion, in this study we were able to use a model giving a good insight to *B. cereus* *in vivo* and *in situ* adaptation during gut infection of a simple eukaryotic insect model. We showed that this challenging LCM approach is feasible to investigate bacterial gene expression *in situ*, even with a low amount of collected bacterial total RNA. Genes involved in iron homeostasis could play a key role for bacterial colonization and development inside the gut since these genes are expressed. Meanwhile gene expression does not always result in production of a functional protein and the relative roles of the encoded factors remain to be studied. Some insights of oxidative stress induced by secreted virulence factors resulting in the release of metal ions, especially ferrous iron in the environment, are suggested too. Furthermore, this study is opening perspectives for larger transcriptome analyzes. Indeed, we focused on the bacteria only but host cell responses would be also interesting to follow in order to get a real pathogen-host crosstalk analysis. This would be possible when a *G. mellonella* annotated genome gets available. *G. mellonella* is largely used as an alternative simple model for host pathogen analysis for several human pathogens at the innate cellular and humoral defense level (C. J.-Y. Tsai, Loh, et Proft 2016). We show here it is also useful for in depth *B. cereus*-gut colonization studies. Whether this can be extended to other pathogens or gut commensals as well needs further investigations. Moreover, the possibility to use germ-free *G. mellonella* larvae makes this infection model even more attractive. Meanwhile, whether the observations here performed in *Galleria* are reliable in a mammal model for *B. cereus* intestinal infection also needs more studies.

Acknowledgements : This work was supported by INRA, MICA department and partly funded by the CryMuc project (RISK-OGM) Ministry of French Environmental affairs. L.Consentino received a 3 years PhD doctoral MRT grant (French Higher education) delivered from Doctoral School ABIES (AgroParisTech-University Paris Saclay).

4. Résultats complémentaires

Tests de cytotoxicité de *B. cereus* sur des hémocytes de *G. mellonella*

A la suite des tests de virulence par injection intra-hémocœlique, nous avons pu observer un phénotype inattendu de la souche double mutante $\Delta feuA\Delta entA$. En effet, cette souche présente un phénotype de virulence *in vivo* comparable à celui de la souche Wild-type. Une des hypothèses proposées est que la souche $\Delta feuA\Delta entA$, privée du complexe BB-FeuA, et faisant par conséquent face à un stress important lié au manque de fer, va sécréter dans le milieu extérieur des facteurs de virulence tels que l'hémolysine II (HlyII), de façon à lyser les cellules environnantes et en extraire le fer qu'elles contiennent. Pour vérifier cette hypothèse, des tests *in vitro* de cytotoxicité ont été conduits sur des hémocytes de *G. mellonella*, en mettant ces cellules en contact avec des surnageants de culture des souches *B. cereus* ATCC 14579 Wild-type, $\Delta feuA$, $\Delta entA$ et $\Delta feuA\Delta entA$.

Préparation des cultures et surnageants : Les cultures ont été effectuées en milieu riche (LB) ou modérément chélaté en fer (LB + DIP 0.2 mM) en microplaques. Après 3h (correspondant au début de la phase exponentielle de croissance), les cultures sont collectées (1,2 mL par souche et par condition) puis centrifugées. Les surnageants sont ensuite récupérés puis filtrés (membrane Millex-GV 0.22 μ m) et les culots sont conservés à -80°C pour de futures analyses en RT-qPCR.

Préparation des hémocytes : Les hémocytes proviennent d'hémolymphe issues de chenilles correspondant au dernier stade larvaire de *G. mellonella*. Les larves sont nettoyées 15 s dans de l'eau stérile puis 5 s dans de l'éthanol 70%, avant d'être séchées sur du papier filtre stérile et disposées dans des boîtes de Petri stériles. La cuticule est ensuite ponctionnée au niveau de la troisième fausse patte à l'aide d'une aiguille stérile. Les gouttes d'hémolymphe sont récupérées directement dans un tampon anti-coagulant (AB) (van Sambeek et Wiesner 1999) avec une proportion de 1:4 v/v. Puis, 500 μ l de ce mélange est centrifugé (3000 g) à température ambiante pendant 5 min, et le culot d'hémocytes est resuspendu dans 1 mL d'un mélange 1:1 v/v de tampon AB et de milieu insecte Grace (Sigma Aldrich G8142). La suspension de cellules est conservée sur glace avant d'être utilisée dans l'heure suivant l'extraction. La viabilité des hémocytes est vérifiée en utilisant une coloration au bleu Trypan (la coloration bleue du cytoplasme indique des cellules possédant une membrane lésée, donc abîmées ou mortes), et leur concentration est évaluée à l'aide de cellules de comptages Kova slides (Kova [Intl.com](http://www.intl.com),

Garden Grove, CA, USA). La concentration finale d'hémocytes est de 5×10^6 hémocytes / mL environ.

Test de cytotoxicité : Les surnageants sont dilués dans du milieu Grace pour une proportion 1:5 v/v (pour un volume total de 50 μ L), puis mélangés avec 50 μ L (environ $2,5 \cdot 10^5$ cellules) de la solution d'hémocytes (dilution 1/10^{ème} final). Les 100 μ L de solution sont ensuite incubés 20 min à température ambiante (environ 20°C), et deux répétitions techniques sont préparées par condition. Les tubes sont ensuite centrifugés 1 min à 3,4 rpm, puis lavés avec 50 μ L de milieu Grace. L'opération est répétée deux fois, puis le culot est repris dans 50 μ L de milieu Grace. 20 μ L de cellules sont ensuite mélangées avec 20 μ L de bleu Trypan (0,4%), puis comptées et observées au microscope optique à l'aide de Kova slides.

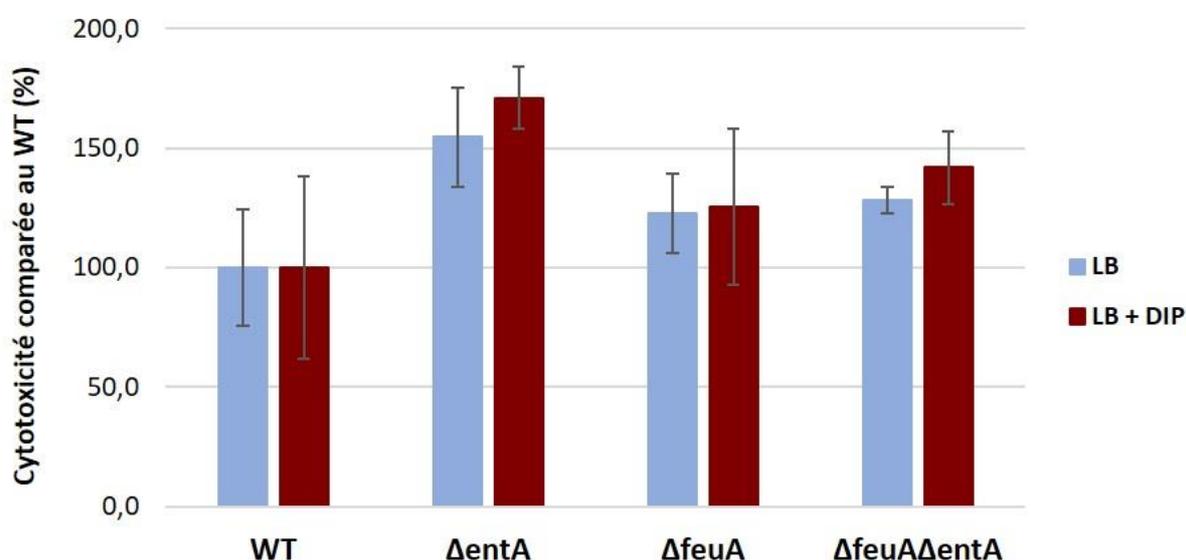


Figure 29: Tests de cytotoxicité de différentes souches de *B. cereus* sur hémocytes de *G. mellonella*. Les tests sont pratiqués à l'aide de surnageants après 3h de cultures (début de phase exponentielle de culture) en milieu riche (LB) ou chélaté en fer (LB + DIP 0.2 mM). Les résultats sont exprimés en pourcentage de cytotoxicité en comparaison avec la souche sauvage de référence (WT) et sont normalisées par rapport à leur densité optique à 600 nm. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de 3 répétitions biologiques pour chaque souche.

Les résultats (Figure 29) ne montrent pas de cytotoxicité statistiquement différente entre les différentes souches et les différentes conditions, en particulier pour le double mutant Δ feuA Δ entA. Il est à noter que les résultats obtenus pour le mutant BB (Δ entA) ne correspondent qu'à deux répétitions biologiques. Il a été observé durant ces tests une variabilité entre les répétitions, qu'il s'agisse du nombre d'hémocytes obtenus ou encore

dans le comptage précis des cellules. Une analyse en RT-qPCR des culots bactériens conservés à -80°C de l'expression du gène codant pour l'hémolysine II (*hlyII*) ainsi que d'autres potentiels facteurs de virulence éventuellement sécrétés permettra d'obtenir un résultat probablement plus précis. Notre approche *in vitro* n'a pas permis de déterminer si l'effet *in vivo* pouvait s'expliquer par un facteur sécrété. Par conséquent, Il serait important d'évaluer l'expression de gènes autre *qu'ilsA* impliqués dans l'acquisition du fer chez le double mutants $\Delta feuA\Delta entA$. De plus, les phénotypes de virulence semblant clair *in vivo* par injection intra-hémocœlique, il serait intéressant de répéter cette analyse en RT-qPCR après extraction d'ARN total de *B. cereus in vivo* 3h après injection hémocœlique.

Régulation de l'expression d'*ilsA* chez *B. cereus*: rôles des régulateurs de transcription Fur et CodY

Comme il a été décrit dans l'introduction de ma thèse, l'homéostasie du fer chez *B. cereus* est contrôlée par le régulateur Fur (Fillat, 2014). Au sein de notre laboratoire, des résultats préliminaires semblent indiquer que CodY, un régulateur clef de la phase stationnaire de croissance, et présent chez les bactéries Gram-positives à faible pourcentage en bases G et C, pourrait avoir une implication dans l'homéostasie du fer. Chez *B. anthracis*, l'implication de CodY dans l'acquisition du fer de l'hème a été mis en évidence. De plus, il apparait que CodY ne régule pas directement Fur, suggérant que la plupart des systèmes d'acquisition du fer chez *B. anthracis* sont régulés de façon indépendantes mais cependant de façon concomitantes par Fur et CodY (Château *et al.*, 2011). CodY est un régulateur pléiotrope impliqué dans la modulation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme, la différenciation cellulaire ou encore la virulence en réponse à l'état nutritionnel de la cellule (Lindbäck *et al.*, 2012; Frenzel *et al.*, 2012; Leyla Slamti *et al.*, 2014). Chez *B. subtilis*, il a été démontré que CodY possède une sérine en position 215 (S215) capable d'être phosphorylée par des sérine/thréonine kinases de type Hanks (STKs), lui conférant sa capacité de liaison à l'ADN (Joseph, Ratnayake-Lecamwasam, et Sonenshein 2005). La phosphorylation opérée par les STKs sur leurs protéines cibles joue un rôle clef dans la régulation du cycle cellulaire et de nombreux processus lié à l'ADN (Garcia-Garcia *et al.*, 2016). Pour étudier l'impact de la phosphorylation de CodY sur les fonctions clefs qu'elle régule, des souches mutantes de *B. cereus* ATCC 14579 ont été

construites, pour lesquelles l'allèle *codY* Wild-type a été remplacé par *codY*-S215A et *codY*-S215D, codant pour une protéine CodY respectivement phospho-ablative (non phosphorylable) et phospho-mimétique (mimant la phosphorylation) (Kortebi *et al.*, submitted). Il apparaît dans cette étude que la souche phospho-mimétique (S215D) présente une abolition de nombreuses fonctions clés telles que la mobilité, la formation de biofilm, la cytotoxicité ou encore la virulence. Les phénotypes observés suggèrent que CodY possède un rôle essentiel dans l'adaptation de la bactérie en réponse à diverses conditions environnementales. Au regard de ces données, nous avons cherché à déterminer si la phosphorylation de CodY jouait un rôle dans l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez *B. cereus* dans un milieu appauvri en fer. Nous avons focalisé notre étude sur l'expression d'*ilsA*, que nous savons contrôlé en amont par Fur. Les souches *B. cereus* ATCC 14579 WT, $\Delta codY$, S215A et S215D (les trois dernières fournies par le Dr. Sandrine Poncet, à l'origine de leur construction et de l'étude Kortebi *et al.*) ont été transformées avec le plasmide pHT315 portant la fusion transcriptionnelle *pilsA-gfp*. Les cultures sont effectuées en microplaques, avec agitation, à l'aide d'un lecteur TECAN Infinite F200Pro (TECAN Group) en milieu riche (LB), en milieu chélaté en fer (LB + DIP 0.2 mM) et en milieu chélaté en fer supplémenté en fer inorganique (LB + DIP 0.2 mM + FeSO₄ 0.2 mM). La fluorescence est calculée en utilisant la formule $(GFP_{(t)} - GFP_{(t-1)}) / (DO_{(t)} - DO_{(t-1)})$ pour laquelle t correspond au temps de mesure, t-1 le temps de mesure précédent, DO la densité optique à 600 nm et GFP la valeur de fluorescence obtenue à chaque temps donné (exprimé en unité de fluorescence relative, RUF). Les résultats préliminaires obtenus sont présentés dans les figures 30 à 32.

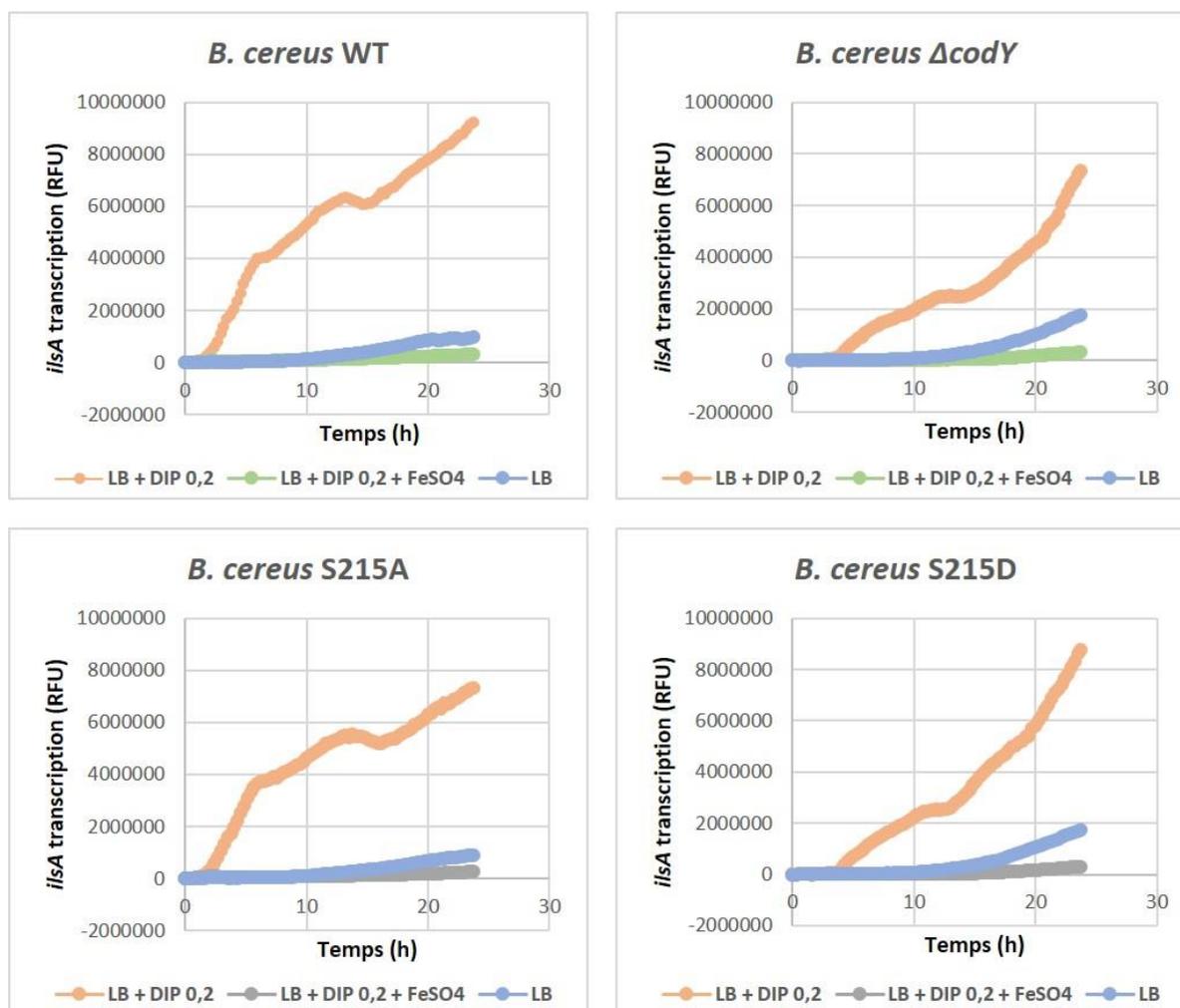


Figure 30: Effet de la phosphorylation de CodY sur l'activité transcriptionnelle de *ilSA* chez *B. cereus* ATCC 14579. Le profil d'expression est analysé à l'aide d'une fusion transcriptionnelle *pilsA-gfp* plasmidique dans la souche sauvage de référence (WT), $\Delta codY$, S215A (souche $\Delta codY$ phospho-ablative) et S215D (souche $\Delta codY$ phospho-mimétique). L'analyse est effectuée en microplaque (n = 3) et dans 3 conditions de culture: milieu riche (LB), milieu chélaté en fer (LB + DIP 0.2 mM) et milieu chélaté en fer et supplémenté en fer inorganique (LB + DIP 0.2 mM + FeSO₄ 0.2 mM). Les valeurs sont exprimées en unité de fluorescence arbitraire (RUF) et normalisée avec la densité optique à chaque point de mesure.

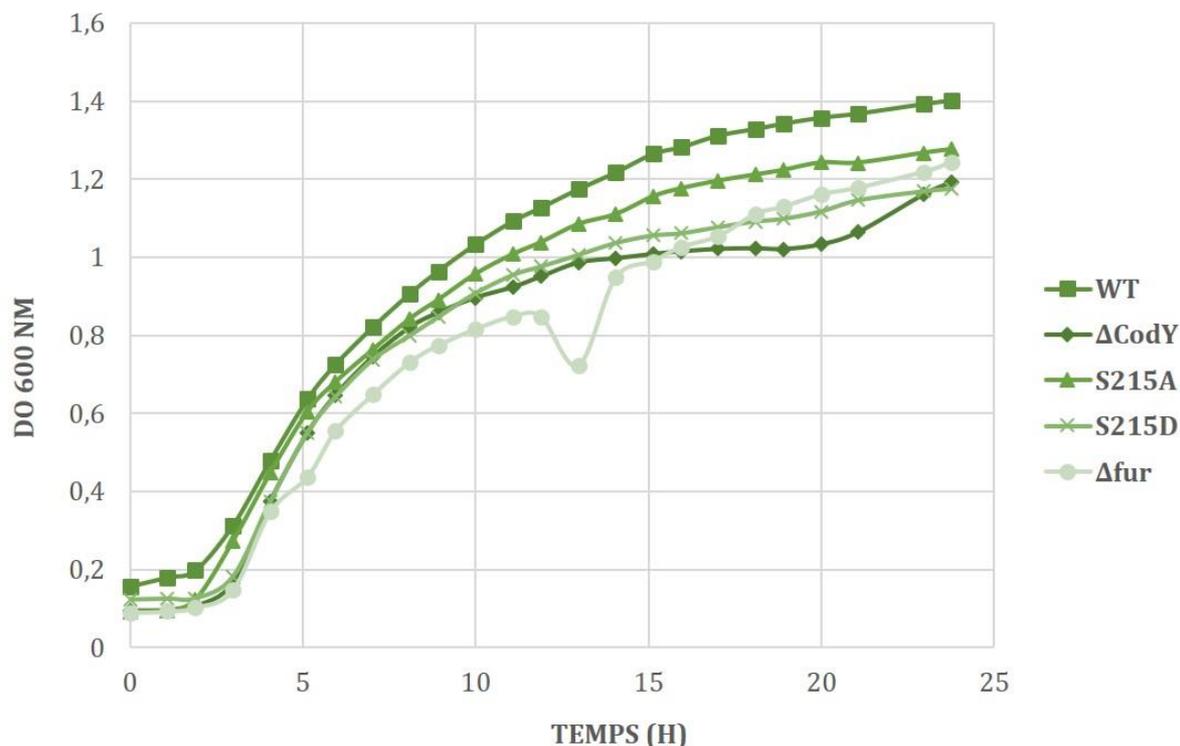


Figure 31: Croissance de *B. cereus* ATCC 14579 en milieu chélaté en fer (LB + DIP 0.2 mM). Les courbes sont la représentation de 3 répétitions biologiques indépendantes.

En milieu riche ou en milieu chélaté en fer et supplémenté en fer inorganique, on ne décèle pas de fluorescence pour l'ensemble des souches étudiées (Figure 30). Ces résultats sont attendus, indiquant qu'*ilsA* ne se trouve pas exprimé en présence de fer suffisamment abondant dans le milieu, son expression étant dans ces conditions réprimée par Fur. La présence ou l'absence de CodY n'influe pas le niveau d'expression d'*ilsA*. En milieu chélaté en fer (LB + DIP 0.2 mM) on observe que dans le fond génétique de la souche sauvage, l'expression d'*ilsA* s'initie au tout début de la phase exponentielle de croissance (après 2h de culture) (Figures 30 et 31). De façon superposable, il est observé le même phénomène avec la souche phospho-ablative S215A. A contrario, on observe chez les souches mutantes $\Delta codY$ et S215D (phospho-mimétique) que l'expression d'*ilsA* ne débute qu'après environ 5h de culture (Figure 30), ce qui correspond pour l'ensemble des souches à l'entrée en phase stationnaire durant laquelle CodY régule de nombreux processus chez les Firmicutes. Les résultats indiquent que CodY permet l'initiation de la transcription d'*ilsA* dès l'entrée en phase exponentielle de croissance dans nos conditions de cultures. La protéine CodY S215A possède une alanine (groupement CH₃) en position 215 au lieu d'une sérine (groupement OH) et n'est par conséquent pas phosphorylable par les STKs (Kortebi *et al.*, submitted). CodY S215D mime de son côté la phosphorylation

de CodY sur son résidu 215 grâce à la charge négative apportée par l'acide aspartique et son groupement COO⁻. L'ADN étant chargé négativement, la phosphorylation de CodY empêche sa fixation sur l'ADN, au niveau de séquences promotrices situées en amont des gènes que CodY régule et nommées « boîtes CodY ». La sérine 215 se situe au niveau de la zone de contact de l'ADN au sein d'un domaine HTH (hélice-tour-hélice) très conservé au sein de Firmicutes (Joseph, Ratnayake-Lecamwasam, et Sonenshein 2005). Les résultats indiquent que la forme non phosphorylée de CodY régule positivement cette initiation de transcription d'*ilsA* en phase végétative de croissance. Au regard de ces données, deux hypothèses sont à vérifier : i/ une régulation directe par fixation sur une boîte CodY de la séquence promotrice d'*ilsA* ; ou ii/ une régulation indirecte *via* l'expression de *fur*, le régulateur principal de l'homéostasie du fer. Nous avons également comparé l'expression en culture *in vitro* d'*ilsA* dans les fonds génétiques WT, $\Delta codY$ et Δfur en utilisant la même fusion transcriptionnelle *pilsA-gfp* que pour les analyses précédentes (Figure 32).

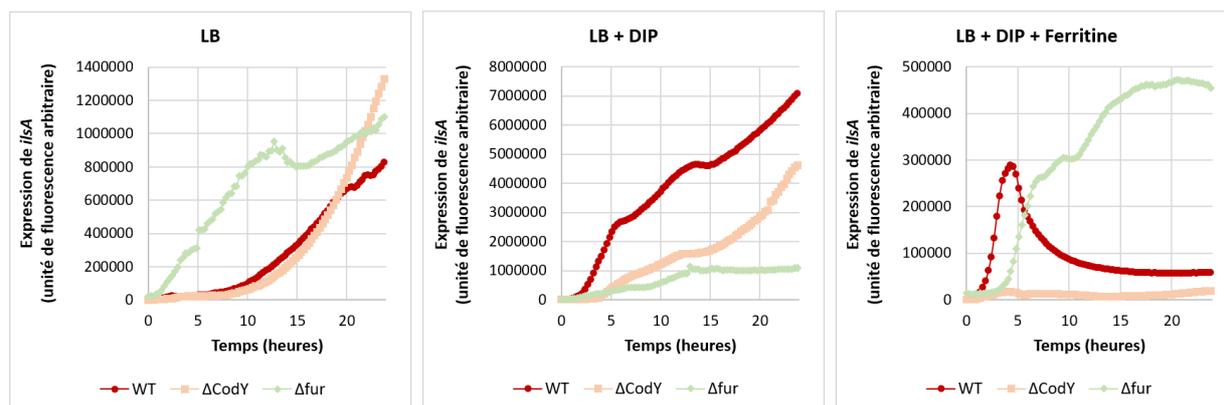


Figure 32: Activité transcriptionnelle du promoteur du gène *ilsA* chez *B. cereus* ATCC 14579 WT, $\Delta codY$ et Δfur . Le profil d'expression est analysé à l'aide d'une fusion transcriptionnelle *pilsA-gfp* plasmidique. L'analyse est effectuée en microplaque (n = 3) en milieu chélaté en fer (LB + DIP 0.2 mM) pendant 24h. Les valeurs sont exprimées en unité de fluorescence arbitraire (UFA).

L'expression d'*ilsA* chez *B. cereus* 14579 WT en milieu chélaté en fer augmente de façon exponentielle dès 2h et se poursuit durant la phase stationnaire jusqu'à 24h, où elle est presque 10 fois supérieure après 24h de culture (7000000 unités de fluorescence arbitraire, UFA) par rapport au milieu LB (environ 800000 UFA). L'expression d'*ilsA* se fait comme attendu de manière constitutive chez le mutant Δfur , la bactérie n'exprimant pas le répresseur Fur, avec une allure de courbe représentative relativement comparable entre les conditions testées. Par conséquent, on retrouve après 24h de culture une valeur assez comparable en milieu LB (1087632 UFA), LB + DIP (1101287 UFA) et en milieu LB + DIP supplémenté en ferritine, avec une valeur finale toutefois deux fois moins

importante (454610 UFA). De façon intéressante, on observe d'après les résultats que la différence d'expression d'*ilsA* entre un temps t et un temps $t+1$ en milieu LB + DIP est plus importante pour la souche WT comparativement à Δfur . Parallèlement, chez le mutant $\Delta codY$ en milieu LB + DIP, la transcription d'*ilsA* est impactée et se rapproche durant la phase exponentielle de croissance et le début de la phase stationnaire (jusqu'à 15h de culture) du niveau d'expression différentielle mesuré chez le mutant Δfur . L'ensemble des résultats suggère que CodY joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie du fer chez *B. cereus*, en parallèle avec Fur, comme cela avait été publié précédemment chez *B. anthracis* (Château *et al.*, 2011). Cependant, le mécanisme de régulation reste inconnu et des analyses complémentaires sont nécessaires pour déterminer si CodY régule directement les gènes impliqués dans l'homéostasie du fer, ou indirectement notamment *via* l'expression de Fur. Au regard de l'ensemble des résultats préliminaires obtenus, divers tests complémentaires sont à pratiquer :

- Déterminer la présence de boîtes CodY en amont des gènes *ilsA* et *fur* ;
- Des analyses en gel retard pour déterminer l'éventuelle fixation de CodY sur les séquences promotrices situées en amont d'*ilsA* et *fur* ;
- Une quantification de l'expression de *fur* avec une construction en fusion transcriptionnelle *pfur-gfp* ou *pfur-lacZ* (β -galactosidase) dans les fonds génétiques WT, $\Delta codY$, S215A et S215D ;
- Faire une analyse transcriptomique globale par RNA-seq ou puce ARN en milieu chélaté (LB + DIP 0.2 mM) et milieu riche (LB) pour déterminer chez les mutants $\Delta codY$ et Δfur l'expression différentielle des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez *B. cereus* ATCC 14579 au cours des phases exponentielles et stationnaires de croissance.

Expression *in vitro* de certains gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez *B. cereus*

Dans le cadre du projet concernant les analyses transcriptomiques *in vivo*, nous avons également effectué une analyse *in vitro* en RT-qPCR sur quelques gènes ciblés régulés par Fur impliqués dans l'homéostasie du fer sur *B. cereus* ATCC 14579 WT. Nous avons comparé le différentiel d'expression en milieu chélaté (LB + DIP 0.2 mM) par rapport à un milieu riche (LB) des gènes codants pour la bacillibactine (*entA*), la protéine spécifique de liaison de la BB à la surface de la bactérie (*feuA*), la pétrobactine (PB, sidérophore produit également par *B. cereus* mais non régulé par Fur) (*asb*), la protéine de liaison de la PB à la

surface de la bactérie (*fatB*), et enfin *ilsA*. Les souches sont cultivées sous agitation (190 rpm) à 37°C et stoppées à $DO_{600} = 1$, puis centrifugées afin de récupérer les culots bactériens. Les ARN totaux sont extraits en utilisant le kit Picopure™ RNA Isolation (Excilone, France). Le protocole recommandé par le fournisseur a été modifié pour l'adapter aux caractéristiques des bactéries Gram-positives et léser plus efficacement la couche épaisse de peptidoglycane et le contrôle de la qualité des ARN fait à l'aide d'un bioanalyser Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) (cf Material and Methods ARTICLE 2). La conversion d'ARN_m en ADN_c est effectuée en utilisant le kit Invitrogen™ SuperScript™ IV VILO™ Master Mix et l'analyse en RT-qPCR à l'aide du kit Master Mix Applied Biosystems™ SYBR™ Green. Les analyses sont pratiquées sur un équipement QuantStudio™ 12K Flex Software v1.2.2 et les résultats sont traités sur l'application Thermo Fisher Connect™ cloud. Les résultats sont représentés figure 33. On observe comme attendu une expression de l'ensemble des gènes ciblés plus importante (environ 2 à 4 fois) en milieu chélaté en fer comparativement à un milieu riche. L'expression différentielle la plus faible correspond à *asb* (1.3), codant pour la PB, et dont l'expression n'est pas soumise à la régulation de Fur et qui faisait office ici de témoin pour comparer l'effet de cette régulation (Figure 33).

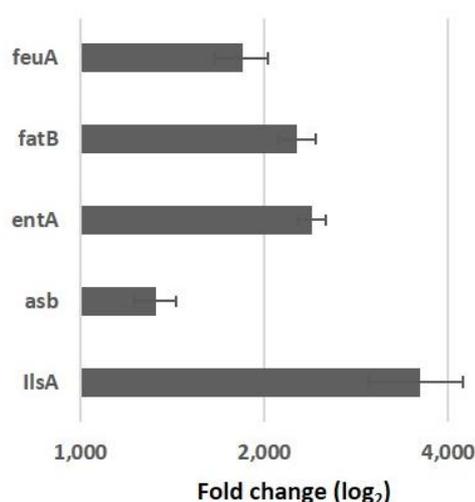


Figure 33: Expression différentielle *in vitro* de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez *B. cereus* ATCC 14579. L'analyse porte sur l'expression de gènes de la souche parentale de référence (WT) en milieu chélaté en fer (LB + DIP 0.2 mM) par rapport à un milieu riche (LB) en phase exponentielle de croissance. Les données sont normalisées en utilisant 3 gènes de références (*rpoB*, *tpi*, *purH*). Les barres d'erreurs indiquent l'écart-type entre 3 répétitions biologiques.

Expressions de gènes de l'hôte *in vivo* dans le lumen (lumière intestinale) de *G. mellonella* axéniques au cours de l'infection par *B. cereus* ATCC 14579

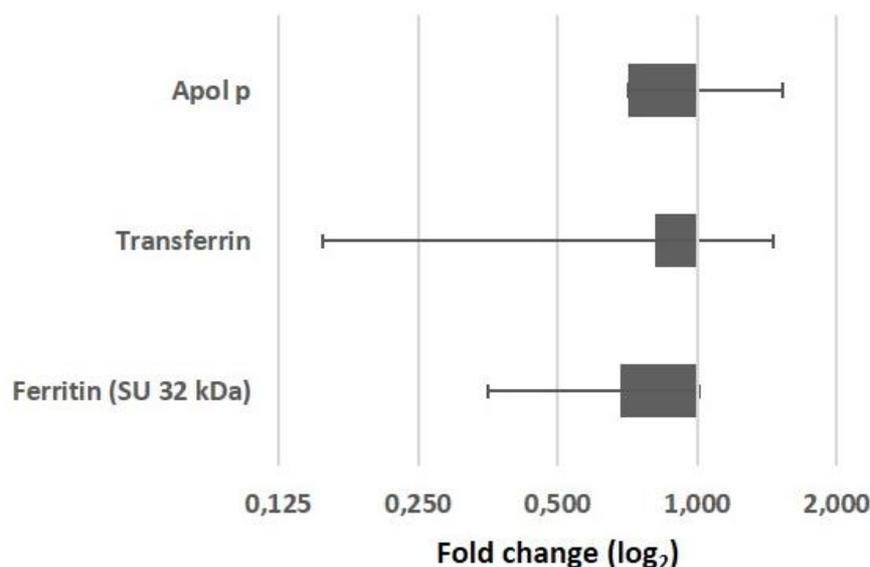


Figure 34 : Expression différentielle de gènes impliqués dans la réponse de *G. mellonella* à une infection par *B. cereus* ATCC 14579. Comparaison de l'expression à un stade tardif d'infection (16h) par rapport à un stade précoce (3h) dans la lumière intestinale de larves axéniques. Les données sont normalisées en utilisant un gène de référence (facteur d'élongation EF1). Les barres d'erreur indiquent l'écart-type de trois répétitions biologiques.

En parallèle des analyses en RT-qPCR *in vivo* menées sur les gènes de *B. cereus* durant l'infection de l'intestin de *G. mellonella*, nous avons également pratiqué des analyses sur quelques gènes de l'hôte. L'objectif était de déterminer si dans le lumen de larves de *G. mellonella* axéniques, de l'ARN eucaryote était présent et si on pouvait retrouver le signal de quelques gènes pouvant être impliqués dans la réponse immunitaire ou encore du métabolisme du fer de *G. mellonella*. Pour cela nous avons sélectionné 3 gènes d'intérêt : la sous-unité 32 kDa de la ferritine (B. S. Kim *et al.*, 2002), la transferrine et la protéine régulatrice de l'apoptose siva-like (Dubovskiy *et al.*, 2016). Les analyses ont été réalisées sur les ARN totaux extraits suivant la méthode décrite dans la section Material and Methods de l'article 2, de même que l'analyse en RT-qPCR. Les résultats (Figure 34) indiquent la présence de l'ensemble de ces trois ARN_m dans la lumière de l'intestin. Cependant, la variabilité entre échantillon est élevée et peut être la conséquence de la lyse des entérocytes de l'hôte, entraînant un relargage du contenu cellulaire dans le lumen. Il

est toutefois intéressant de noter pour *B. cereus* la disponibilité en sources de fer accessible au cours de l'infection au regard de la présence à la fois de ferritine et de transferrine dans le milieu. De plus, il est également possible que *G. mellonella*, en réponse à l'infection, exprime plus abondamment des gènes impliqués dans le stockage du fer afin de limiter pour le pathogène l'accès au fer libre et se protéger d'un état de stress oxydatif lié à la présence de fer libre dans l'intestin (D. Wang *et al.*, 2009 ; B. Y. Kim *et al.*, 2009 ; Otho *et al.*, 2016). Pour vérifier cette hypothèse, des analyses sur les entérocytes de *G. mellonella* au cours de l'infection en comparaison avec des entérocytes issues de chenilles non infectées par *B. cereus* ATCC 14579 permettraient de déterminer l'importance de ces gènes dans la réponse immunitaire.

Expression d'*ilsA* dans l'intestin de *G. mellonella* au cours de l'infection par Digital PCR (ddPCR)

Au regard de la faible quantité d'ARN total de *B. cereus* obtenu après LCM, nous avons adapté le protocole de RT-qPCR en pratiquant une préamplification du pool d'ADN_c obtenu après reverse-transcription grâce au kit TATAA PreAmp GrandMaster® Mix (TATAA Biocenter). De nombreux contrôles ont été mis en place pour tester sa fiabilité et vérifier la robustesse des données obtenues en sortie (*cf* résultats article 2). Dans cette optique, nous avons décidé également de contrôler la présence d'ARN_m dans les échantillons bruts d'ARN total après LCM. Pour cela, nous avons dosé à l'aide d'une Digital PCR (ddPCR) la concentration en ARN_m correspondant à *ilsA*. La ddPCR (ou PCR numérique) est une méthode de détection et d'évaluation quantitative d'acide nucléique en temps réel (Kuypers et Jerome, 2017). La ddPCR fractionne un échantillon d'ADN ou d'ADN_c en de multiples réactions de PCR parallèles en micro-gouttelettes pouvant contenir la molécule cible (positive), d'autres pas (négative). Une seule molécule peut être amplifiée un million de fois ou plus. Dans notre cas de figure, nous avons utilisé un appareil QX200™ Droplet Digital™ PCR Systems (BioRad) pour la lecture et un kit QX200™ ddPCR™ Evagreen Supermix (BioRad) pour permettre la génération des gouttelettes d'huile. Aucun signal ne s'accumule si aucune séquence cible n'est présente. Suite à une analyse de la PCR, la fraction de réactions négatives (gouttelettes ne contenant pas d'ARN_m *ilsA*) permet de générer un comptage absolu du nombre de molécules cibles (gouttelettes contenant de l'ARN_m *ilsA*) au sein de l'échantillon, sans avoir recours à des étalons ou à des contrôles endogènes. 2 µL de chaque échantillon (3 répétitions biologiques à 3h et

16h post-infection) ont été analysés, la température d'hybridation pour les cycles de PCR était de 58°C, et le protocole a suivi les recommandations du fournisseur pour le reste des manipulations. Le contrôle positif choisi provient d'un pool d'ARN total issu des tests en RT-qPCR *in vitro* détaillés précédemment dans la section résultats complémentaires, et le contrôle négatif remplaçait l'ARN par de l'eau Nuclease-free. Les résultats montrent une expression d'*ilsA* dans l'ensemble des échantillons à 3h et 16h post-infection (Figure 35). La ddPCR permet d'obtenir la concentration en nombre de copies par microlitre, et montre ici qu'*ilsA* tend à s'exprimer environ 3 fois plus à T3 (16.6 copies / μ L) qu'à T16 (5.4 copies / μ L). Cependant, il existe une variabilité entre répétition biologique qui ne permet pas ici de dégager une différence statistique entre les deux temps d'infection. Ces résultats permettent néanmoins de mettre en évidence pour la première fois *in vivo* l'expression d'*ilsA* dans l'intestin de l'hôte par *B. cereus* au cours de l'infection.

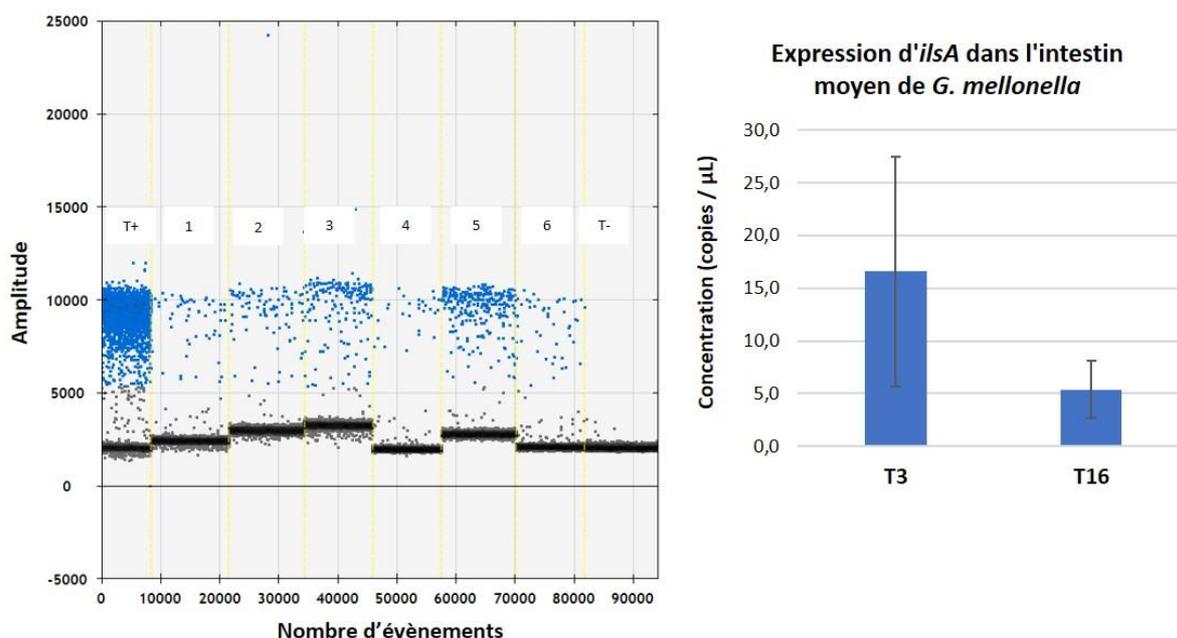


Figure 35: Analyse par ddPCR de l'expression d'*ilsA* au cours de l'infection par *B. cereus* de l'intestin de *G. mellonella*. A gauche : Graphe typique obtenu après ddPCR indiquant en ordonnées la fluorescence mesurée (amplitude) et en abscisse le nombre de gouttelettes comptées (nombre d'évènements). Les points noirs indiquent les gouttelettes négatives et les points bleus situés au-dessus les gouttelettes positives. T+ : Témoin positif ; T- : eau ; 1,3 et 5 : échantillons à T3 ; 2,4 et 6 : échantillons à T16. A droite : Moyenne des concentrations à T3 et à T16 calculées par le logiciel de l'appareil QX200™ Droplet Digital™ PCR Systems (BioRad). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type entre les répétitions biologiques (n = 3).

5. Discussion et Perspectives

La bacillibactine et FeuA, un rôle central chez *B. cereus*

Le fer est un élément essentiel et vital de par son utilité dans de très nombreux processus biologiques fondamentaux pour la quasi-totalité des organismes vivants, des microorganismes aux plantes en passant par les mammifères et l'Homme. Nous avons pu apercevoir dans l'introduction de ma thèse la complexité de la régulation de l'ensemble des gènes et protéines impliqués dans de l'homéostasie du fer. Qu'il s'agisse de l'hôte ou du pathogène, le processus évolutif ayant conduit au développement des diverses stratégies d'acquisition constitue un sujet d'étude particulièrement intéressant et passionnant. Chez les microorganismes, la synthèse, des protéines et molécules permettant l'acquisition et la réimportation du fer ont été largement étudiées, révélant des spécificités chez les bactéries selon qu'elles soient Gram-négatives ou Gram-positives notamment. Concernant le groupe *B. cereus*, notre laboratoire a contribué depuis de nombreuses années à l'enrichissement de la connaissance fondamentale, en se focalisant en particulier sur deux des espèces principales de ce groupe, *B. cereus sensu stricto* et *B. thurigiensis*. Une des études s'est concentrée en particulier sur l'importance des différents sidérophores produits par *B. cereus*, que sont la bacillibactine et la pétrobactine. Cependant, l'étude des systèmes de réimportation dans la cellule par les protéines de transport des sidérophores, et leur impact quant à leur rôle au cours de l'infection de l'intestin de l'hôte restaient à déterminer.

Le couple FeuA-BB, élément clef dans l'acquisition du fer de diverses sources *in vitro*

L'un des objectifs de ma thèse cherchait à élucider le rôle du complexe FeuA-BB dans sa capacité d'utiliser le fer de diverses sources de l'hôte et d'étudier l'importance de ce complexe lors de l'infection d'un modèle alternatif, le stade larvaire de *G. mellonella*.

L'acquisition du fer extracellulaire par les sidérophores et leur réimportation ont été étudiées chez les bactéries Gram-positives, d'abord chez *Bacillus subtilis* (Marcus Miethke *et al.*, 2006 ; Abergel *et al.*, 2009 ; Peuckert *et al.*, 2011). Au sein du groupe *B. cereus*, l'identification des récepteurs des sidérophores impliqués dans la réimportation du complexe fer / sidérophore a également été réalisée (Zawadzka *et al.*, 2009 ; Hotta *et al.*, 2010). Nos résultats confirment que la protéine de surface, FeuA, permettant la liaison du

sidérophore, joue également un rôle essentiel pour la souche *B. cereus* ATCC 14579 dans l'interaction avec la bacillibactine pour l'import du fer issu de diverses sources, notamment la ferritine, l'hème arginate (préférée à l'hémine pour ses propriétés de conservation et d'altération moindre du milieu en termes de pH) et l'hémoglobine. Les analyses colorimétriques par le test d'Arnou et sur boîtes CAS ont montré qu'en l'absence de FeuA, les sidérophores produits par la bactérie, et en particulier la BB, s'accumulaient dans le milieu extérieur, tandis que dans la souche complémentée sur plasmide par *feuA*, il y a restauration du phénotype sauvage.

Il avait été démontré précédemment que la ferritine de rate de cheval (Horse spleen Ferritin) peut être utilisée comme source de fer pour la croissance de *B. cereus* et que la protéine de surface IIsA, régulée par Fur, est importante pour la liaison de diverses sources de ferritine de mammifères. De plus, il a été révélé que IIsA, en présence d'entérobactine (sidérophore produit par les bactéries Gram-négative, molécule chirale de la bacillibactine), facilitait la libération du fer contenu dans la ferritine humaine (Segond *et al.*, 2014). Plus récemment, des études ont également été menées afin d'évaluer l'aptitude de différentes souches de *B. cereus* à se développer *in vitro* dans différents milieux chélatés en fer, et supplémentés avec de l'hémine, de l'hémoglobine, de la ferritine, de la lactoferrine, de la transferrine ou encore du fer inorganique (Hayrapetyan *et al.*, 2016). Cette étude souligne les capacités variables de diverses souches de *B. cereus* à utiliser ces différentes sources de fer, ce qui pose la question de l'influence de l'écosystème particulier dans lequel chacune d'entre elles a été isolée, et par conséquent l'influence de cet écosystème sur le niveau d'expression des différents gènes liés à l'homéostasie du fer.

Dans notre cas de figure, nous avons choisi une souche de référence et choisi les conditions expérimentales en incluant également diverses sources de fer.

Ferritine (Horse spleen Ferritin) comme source de fer

Chez *B. cereus* ATCC 14579, l'absence de BB (*ΔentA*) ne permet pas l'acquisition du fer de la ferritine dans nos conditions *in vitro*. L'ajout de BB dans un milieu appauvri en fer supplémenté en ferritine permet la complémentation fonctionnelle de la souche *ΔentA*, conformément à celle précédemment rapportée pour l'entérobactine de *E. coli* (Segond *et al.*, 2014). Ces résultats mettent en évidence le rôle de la BB chez *B. cereus* dans l'acquisition du fer de la ferritine, et l'homologie fonctionnelle de ces deux sidérophores.

Bien que FeuA ait été déterminée comme étant la protéine de surface liant spécifiquement la BB (Zawadzka *et al.*, 2009), son implication unique dans la réimportation du complexe BB-Fe³⁺ dans la bactérie n'a pas été testée. Il apparaît dans les résultats obtenus qu'en l'absence de FeuA, un retard de croissance est observé concernant l'acquisition du fer de la ferritine au cours des 18 premières heures de culture. L'entrée de phase exponentielle tardive de la souche mutante $\Delta feuA$ peut être expliquée par le relargage de fer après plusieurs heures par la dégradation de l'agent chélateur, le DIP, dans le milieu ou par la lyse de certaines bactéries. Cette hypothèse est confirmée par le phénotype de croissance de la souche $\Delta feuA \Delta entA$. En présence de ferritine et d'absence de BB, la courbe de croissance est similaire à celle de la souche mutante. Dans un milieu chélaté additionné de ferritine et de BB, la courbe de croissance est presque similaire à celle de la souche $\Delta feuA$. Ces résultats confirment le rôle clé de FeuA dans l'acquisition du fer de la ferritine chez les vertébrés dans les conditions *in vitro* testées. Ces résultats peuvent être comparés avec des phénotypes observés dans des études précédentes menées chez l'organisme considéré comme modèle chez les bacilles, *B. subtilis*. En effet, la suppression de l'intégralité du locus orthologue *feuABC* chez *B. subtilis* met en évidence une expression de ce système d'absorption dépendant du xylose, tandis que la croissance de *B. subtilis* double mutant pour *feuABCD* et le locus *dhbC* de BB en milieu minimal semblent être fortement impacté lorsque le transporteur FeuABC est absent, et cela même avec une supplémentation en BB (Peuckert *et al.*, 2011). Ces résultats mettent en corrélation l'importance de la protéine de surface FeuA dans l'absorption des différentes sources de fer, bien que les systèmes de sauvegarde de *B. cereus* semblent contribuer au maintien de la croissance.

Cependant, la bactérie *B. cereus* produit également d'autres protéines membranaires et SBP capables de fixer des sidérophores produits par d'autres bactéries Gram-positives ou Gram-négatives, ce qui lui confère un avantage en cas de concurrence pour l'acquisition du fer avec d'autres microorganismes (Hotta *et al.*, 2010 ; Fukushima *et al.*, 2012 ; Sheldon, Laakso, et Heinrichs, 2016). Par conséquent, *B. cereus* produit FeuA, qui est la SBP spécifique de BB (Zawadzka *et al.*, 2009), mais synthétise également d'autres transporteurs de type ABC capables de se lier à des molécules de citrate ferrique (Fukushima *et al.*, 2012 ; Fukushima *et al.*, 2013b) mentionnés dans certaines études sous le nom de protéines "de type feuA" (Hayrapetyan *et al.*, 2016). Une compensation peut survenir, soit avec un autre système d'acquisition permettant l'importation de fer

inorganique à l'intérieur de la cellule (Lau, Krewulak, et Vogel, 2016 ; Marcus Miethke *et al.*, 2013), soit avec une réimportation partielle de BB (avec du fer) *via* ces transporteurs, ce qui pourrait expliquer la tendance observée *in vitro* dans un milieu chélaté de fer additionné de ferritine, avec une phase de latence plus courte de la souche $\Delta feuA$ par rapport aux taches $\Delta entA$ et $\Delta feuA\Delta entA$.

Hémoprotéines (Hème arginate et hémoglobine) comme sources de fer

Nos résultats indiquent qu'en présence d'hème arginate ou d'hémoglobine, le couple FeuA-BB participe également à l'acquisition du fer contenu dans ces molécules. En effet, l'absence de BB ($\Delta entA$) ou de FeuA ($\Delta feuA$), la croissance de *B. cereus* est impactée, qu'il s'agisse du départ de la croissance (phase de latence augmentée) ou de la DO finale qui est abaissée comparativement à la souche sauvage de référence. De plus, il apparaît de nouveau que l'absence de BB porte un préjudice plus important que celle de FeuA pour *B. cereus*, et nous conforte dans l'idée suggérée précédemment de la présence de systèmes de compensation (« *feuA-like* ») permettant le reimport partiel du couple BB-Fe³⁺ dans le cytoplasme de la cellule (Hotta *et al.*, 2010 ; Hayrapetyan *et al.*, 2016).

Chez *B. cereus*, l'acquisition du fer de l'hème et de l'hémoglobine a surtout été décrit à travers le rôle du système IsD, très répandu au sein des bactéries Gram-positives telles que *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. anthracis* et *B. cereus* (Sheldon, Laakso, et Heinrichs, 2016). Au laboratoire, ce système a fait l'objet d'étude, et a permis notamment de mettre en évidence l'interaction entre les IIsA et Isd par leur domaines NEAT (domaine protéiques permettant la liaison de l'hème) pour permettre le transfert depuis IIsA d'hème au système IsD (Abi-Khalil *et al.*, 2015 ; Daou *et al.*, 2009). Au final, en plus de son importance dans la mobilisation du fer de la ferritine (Segond *et al.*, 2014), IIsA pourrait également participer au relargage d'une partie du fer des hémoprotéines dans le milieu extérieur, conférant au couple FeuA-BB une importance essentielle dans le développement et la croissance de *B. cereus* ATCC 14579, et ce malgré la présence d'autres systèmes impliqués dans l'acquisition du fer. Cette hypothèse semble corroborée par les résultats obtenus précédemment, indiquant notamment chez *B. anthracis* que l'absence d'IsdC n'altère par la mobilisation du fer de l'hème et de l'hémoglobine (A. W. Maresso, Chapa, et Schneewind, 2006 ; Balderas *et al.*, 2012), tandis que la triple délétion des gènes *isdC*, *isdX1* et *isdX2* ne diminuent pas la virulence de la bactérie (Gat *et al.*, 2008).

Les tests de croissance ont été effectués en microplaques avec agitation de façon à permettre une oxygénation au moins partielle du milieu de culture dans les puits. L'état d'oxydation du fer (Fe^{3+} en milieu oxygéné, Fe^{2+} en condition anaérobie) va potentiellement favoriser le type de système d'acquisition utilisé par les bactéries. Chez *B. subtilis*, le système EfeUOB est capable de mobiliser en condition microaérobie le fer sous forme réduite (Fe^{2+}), en induisant grâce à EfeB son oxydation en Fe^{3+} avant de permettre son importation dans le cytoplasme de la cellule (Roy et Griffith 2017 ; Marcus Miethke *et al.*, 2013). Il a également été proposé, toujours chez *B. subtilis*, que la BB module l'activité de EfeUOB, qui va servir de système de secours en l'absence de BB ou probablement en présence de Fe^{2+} (la BB ayant une forte affinité pour Fe^{3+}). De plus, il a également été démontré la présence de gènes orthologues de *efeUOB* chez *S. aureus* se regroupant sous l'opéron *fepABC* et au sein duquel la protéine FepB est capable de fixer l'hème (Turlin *et al.*, 2013). La recherche de gènes orthologues de *efeUOB* ou encore une étude de gènes référencés « *fepB* » ou « *fepB-like* » chez les espèces du groupe *B. cereus* dans certaines publications (Hotta *et al.*, 2010 ; Hayrapetyan *et al.*, 2016) pourrait permettre également de vérifier l'hypothèse d'une compensation de l'absence du couple BB-FeuA, en milieu appauvri en oxygène.

Le couple FeuA-BB dans la virulence intra-hémocœlique chez *G. mellonella*

Pour analyser l'impact de FeuA pendant l'infection, nous avons utilisé le stade larvaire de *G. mellonella*, qui s'est déjà révélé être un modèle utile pour l'analyse des facteurs impliqués dans l'homéostasie fer chez *B. cereus* (Daou *et al.*, 2009 ; Segond *et al.*, 2014). Basé sur ces résultats obtenus précédemment, il semble que IIsA et la BB permettent l'acquisition du fer à partir de la ferritine, principale source de fer chez les insectes et présente dans l'hémolymphe (fluide corporel) et dans l'intestin (B. S. Kim *et al.*, 2001). Nos résultats ne montrent pas dans nos conditions un rôle de FeuA seul dans la virulence, tandis que les résultats obtenus avec la souche mutée pour la BB confirment ce qui avait déjà été démontré, à savoir une virulence atténuée de *B. cereus* (Segond *et al.*, 2014). En revanche, de façon suprenante, l'absence du couple BB-FeuA ($\Delta\text{feuA}\Delta\text{entA}$) rend la souche plus virulente que le simple mutant BB (ΔentA). Lorsque ce double mutant est complété avec un plasmide portant le locus du gène *feuA*, sa virulence est de nouveau atténuée au même titre que le simple mutant BB. Ceci suggère qu'*in vivo*, en l'absence du couple FeuA-BB, la bactérie pourrait s'adapter et exprimer d'autres facteurs l'aidant à

persister et à se développer chez l'hôte. Pour tester l'hypothèse de l'expression modifiée d'un autre facteur régulé par le fer, également impliqué dans l'acquisition du fer de la ferritine, nous avons analysé *in vitro* l'expression transcriptionnelle d'*ilsA*, dont la région promotrice est sous le contrôle de Fur, à l'aide d'un système de fusion GFP. Les résultats montrent qu'*ilsA* est davantage exprimé dans le fond génétique du double mutant et en particulier dans un milieu chélaté en fer et supplémenté en ferritine, condition « mimant » partiellement l'hémocèle de l'insecte. Ces résultats nous permettent de poser des hypothèses expliquant le phénotype observé en virulence et persistance chez la souche mutante privée du couple FeuA-BB : i) le système IsD peut aider à capter le fer de l'hème (source également présent chez *G. mellonella* à 2-3 μM , observation du laboratoire) et la transcription du gène codant pour le système *isd* pourrait être modifiée (Abi-Khalil *et al.*, 2015 ; A. W. Maresso, Chapa, et Schneewind, 2006) ; ii) la pétrobactine, un sidérophore de type catécholate et également produit par *B. cereus*, pourrait intervenir bien qu'elle ne soit pas régulée par Fur ni considérée comme un système d'acquisition essentiel chez *B. cereus* (Segond *et al.*, 2014), du moins lorsque la bacillibactine est produite ; iii) L'hémolysine HlyII s'est révélée être exprimée en début de phase de croissance exponentielle dans un milieu carencé en fer (Tran, Guillemet, *et al.*, 2011 ; Sineva *et al.*, 2012). HlyII est sous le contrôle de Fur (Fillat, 2014) et participe à la lyse des érythrocytes et des macrophages (Tran, Guillemet, *et al.*, 2011). Une production accrue de HlyII pourrait rendre la souche plus cytotoxique : pour tester ces hypothèses, il est envisagé de conduire des analyses en RT-qPCR sur les différentes souches et dans les conditions pour lesquelles une expression accrue d'*ilsA* avait été trouvée. D'après les résultats obtenus (*cf* section « résultats complémentaires »), il n'apparaît pas de différences de cytotoxicité notables sur les hémocytes de *G. mellonella* entre les différents surnageants de culture (à 3h de culture) des souches Wild-type, ΔfeuA , ΔentA et $\Delta\text{feuA}\Delta\text{entA}$ en milieu riche ou chélaté en fer. L'analyse en RT-qPCR sur les culots bactériens issus de ces cultures pourrait apporter une réponse plus précise en comparaison de ces analyses.

FeuA-BB, un avantage compétitif pour *B. cereus*.

Les différents résultats obtenus ont mis en lumière le rôle pivot chez *B. cereus* du couple FeuA-BB. *B. cereus* semble, au moins pour cette souche de référence, avoir évolué en favorisant ce mécanisme dans le cadre de l'acquisition du fer.

Des analyses *in silico* ont montré que chez les bactéries, les sidérophores constituent un marqueur d'évolution, un trait compétitif par rapport aux autres microorganismes d'un biotope donné, leur conférant un avantage lorsqu'elles se spécialisent dans la synthèse d'un sidérophore qui leur est propre (Niehus *et al.*, 2017). Il est intéressant de noter qu'au sein même du groupe *B. cereus*, le BB apparait comme un facteur indispensable pour *B. cereus* tandis que la pétrobactine est quant à elle essentielle au développement de *B. anthracis*. Ces deux espèces, bien qu'appartenant au même groupe, sont d'un point de vue phylogénétique distinctes. En effet, *B. anthracis* formant un groupe monophylétique dans la classification actuelle du groupe *B. cereus* (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) 2016b). Dans le cadre de ma thèse, mes études se sont focalisées sur une souche de référence. Ainsi, s'il apparait que le couple FeuA-BB est indispensable au développement optimal de la bactérie, il est aventureux d'appliquer formellement cette conclusion à l'ensemble des souches de *B. cereus*. En effet, l'influence de la niche écologique particulière dans laquelle évolue la souche bactérienne va influencer sur son métabolisme. La classification du groupe lui-même repose en partie sur différents critères de tolérance aux températures, pH ou salinité de son environnement (Guinebretière *et al.*, 2008 ; Carlin *et al.*, 2013). Si une distinction entre espèces est possible, des différences existent également entre souches d'une même espèce. Récemment, la croissance de différentes souches de *B. cereus* en milieu chélaté en fer et supplémenté par diverses sources de fer a été testé (Hayrapetyan *et al.*, 2016). Les résultats ont montré que la capacité de *B. cereus* à se développer en utilisant une source de fer complexe (hémoglobine, hémine, transferrine, ferritiné, lactoferrine) est très souche dépendante, et ne peut pas toujours être liée à la présence d'un transporteur de fer spécifique. La capacité d'utilisation d'une source complexe de fer est plutôt dictée, comme nos résultats tendent aussi à le démontrer, à la présence combinée (ou de l'absence) de plusieurs systèmes fonctionnels de transport de fer, plutôt qu'à la présence d'un seul système. L'environnement va également jouer un rôle dans la régulation de l'expression des gènes liés à l'homéostasie du fer. Chez les bactéries Gram-négatives, l'existence de facteurs sigma de la famille des ECF (extracytoplasmic function family) permettant la transcription des gènes codants pour l'expression de sidérophores ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa* et *E. coli* (Visca *et al.*, 2002). Ces facteurs de régulation permettent aussi l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des protéines de surface impliquées dans le transport du fer, notamment les protéines permettant la réimportation dans le cytoplasme des complexes sidérophore

– Fe³⁺ (Noinaj *et al.*, 2010). Chez les bactéries Gram-positives, il a été mis en évidence récemment chez *B. subtilis* l'induction séquentielle des gènes régulés par Fur en condition de carence de fer dans l'environnement (Pi et Helmann, 2017b). L'étude chez *B. cereus* de la régulation de l'activation de ces gènes, en particulier en présence/absence de l'ensemble ou d'une des deux molécules du couple FeuA-BB, pourrait donner un aperçu de la faculté d'adaptation de la bactérie pour survivre en modifiant l'expression d'autres gènes impliqués soit dans l'homéostasie du fer, soit dans la virulence de *B. cereus*.

D'un point de vue génomique comparative, il serait également très intéressant d'essayer de déterminer les conditions écologiques particulières qui permettraient de déterminer quel type de système d'acquisition du fer sera privilégié au sein du groupe *B. cereus*. Il avait été montré dans une étude précédente la probabilité d'une co-évolution entre pathogène et hôte, ce qui permettait d'expliquer pourquoi *B. cereus* et *B. thurigiensis* sont d'un point de vue phylogénétique plus distants de *B. anthracis* en relation avec le type d'organismes qu'elles infectent (S. Fedhila *et al.*, 2010). Si l'on additionne cette étude à celle évoquée précédemment concernant les différentes souches de *B. cereus* et leur capacité de développement en fonction de la source de fer disponible (Hayrapetyan *et al.*, 2016), il serait possible de déterminer des biosenseurs adaptés à ces marqueurs permettant de prédire non seulement l'espèce, mais peut-être même la souche particulière potentiellement à risque selon la zone étudiée.

La micro-dissection laser (LCM) comme outil pour l'étude *in vivo* des interactions hôtes-pathogènes

Durant mes travaux de thèse, l'un des objectifs concernait l'étude de l'expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez *B. cereus* au cours de l'infection par voie orale de notre modèle insecte *G. mellonella*. Nous avons choisi d'utiliser pour cela la LCM, que nous avons présenté dans la partie "Objectifs" du manuscrit. Grâce à cette technique nous avons pu, pour la première fois, réaliser une étude localisée de l'expression de certains de ces gènes, à différent temps de l'infection, dans une partie précise de l'intestin de l'hôte. Si le résultat final obtenu se restreint à quelques gènes d'intérêt, l'objectif initial était de coupler la LCM avec une analyse transcriptomique globale par RNA sequencing. Cependant, nous avons dû faire face à divers écueils:

- Dans un premier temps, la faible quantité d'ARN total bactérien obtenu, corrolaire de l'utilisation de cette technique. De nombreux kits permettant l'amplification de

petites quantités d'ARN total, issus de petits échantillons ou d'une seule cellule (single cell sequencing) ont été développés et comparés au cours des dernières années (Shanker *et al.*, 2015 ; Ziegenhain *et al.*, 2017). Notre choix du kit d'extraction Picopure™ RNA Isolation kit (Excilone, France) ainsi le processus optimal de prélèvement des échantillons ont été validés pour l'obtention d'ARN total eucaryote (Bevilacqua *et al.*, 2010 ; Bonnet *et al.*, 2011). Cependant, l'adaptation du processus d'extraction aux ARN_t de *B. cereus* avec l'ajout d'une étape de lyse mécanique a pu contribuer à la dégradation d'une partie de ces ARN_t, réduisant ainsi la quantité finale obtenue dans nos échantillons. Des méthodes d'enrichissement en ARN_m bactérien ont été proposées et utilisées dans certaines études, telles que l'adjonction d'une queue poly-A avant amplification (Roux *et al.*, 2014) ou encore nécessitant une quantité d'ARN_t bactérien de départ suffisamment importante pour permettre son efficacité (Kumar *et al.*, 2016). Par conséquent, le choix des techniques appliquées pour l'étude du profil transcriptomique global par RNA-seq des bactéries durant l'infection a été modifié pour se concentrer sur une approche ciblée de certains gènes de *B. cereus* par RT-qPCR, une méthode d'analyse reconnue comme un outil puissant pour analyser les différences d'expression de gènes ciblées (Regier et Frey 2010). Cette méthode a été également utilisée pour l'étude d'infections intestinales chez *G. mellonella* afin de déterminer l'expression de gènes d'autres agents pathogènes tels que *L. monocytogenes* (Mukherjee *et al.*, 2013) ou chez *B. thuringiensis* (Dubovskiy *et al.*, 2016), la virulence de bactéries du groupe *B. cereus* (S. Fedhila *et al.*, 2010 ; Bouillaut *et al.*, 2005) ou encore des analyses par fusions transcriptionnelles *in vivo* (Daou *et al.*, 2009 ; Sinda Fedhila *et al.*, 2006).

- Deuxièmement, nous avons choisi de placer notre étude d'un point de vue principalement « microbiologique », à savoir déterminer la réponse transcriptomique de *B. cereus* au cours de l'infection lorsque la bactérie se trouve dans la lumière de l'intestin dans les premières heures de l'infection. Cependant, quelques analyses ont tout de même été menées chez *G. mellonella*, concernant des gènes impliqués dans la réponses immunitaires et l'homéostasie du fer tels que l'expression de la transferrine, la sous-unité 32 KDa de la ferritine ou encore de la protéine régulatrice de l'apoptose (Dubovskiy *et al.*, 2016).

- Une autre limitation concernait, au moment où l'étude était menée, l'absence de génome de référence connu pour *G. mellonella*. Au regard du ratio obtenu entre ARN total eucaryote et procaryote (de l'ordre de 1000/1), la pratique et l'analyse en RNA-seq semblait trop difficile et risquée avec nos échantillons. De plus, la connaissance du génome de *G. mellonella*, récemment séquencé et disponible (Kong *et al.*, 2019) aurait permis une analyse bilatérale de l'adaptation transcriptomique au cours de l'infection de *B. cereus* ainsi que la réponse de *G. mellonella* à la présence du pathogène, constituant ainsi une perspective intéressante dans le cadre de recherches futures (Westermann, Gorski, et Vogel, 2012). Néanmoins, nous avons testé en Digital-PCR la présence chez *B. cereus* de l'expression d'*ilsA* dans les échantillons non amplifiés (*cf* section résultats complémentaires). Les analyses ont permis de détecter dans les différents échantillons la présence de leur transcrit, confirmant pour la première fois (sans amplification) de façon directe l'expression d'*ilsA* dans l'intestin de *G. mellonella* au cours de l'infection.
- Enfin, d'un point de vue purement technique concernant l'ensemble du processus, il existe de nombreuses étapes critiques lors de la pratique de la LCM qui peuvent conduire à une altération voire à une dégradation du matériel, depuis l'échantillonnage jusqu'au résultat final (Figure 36).

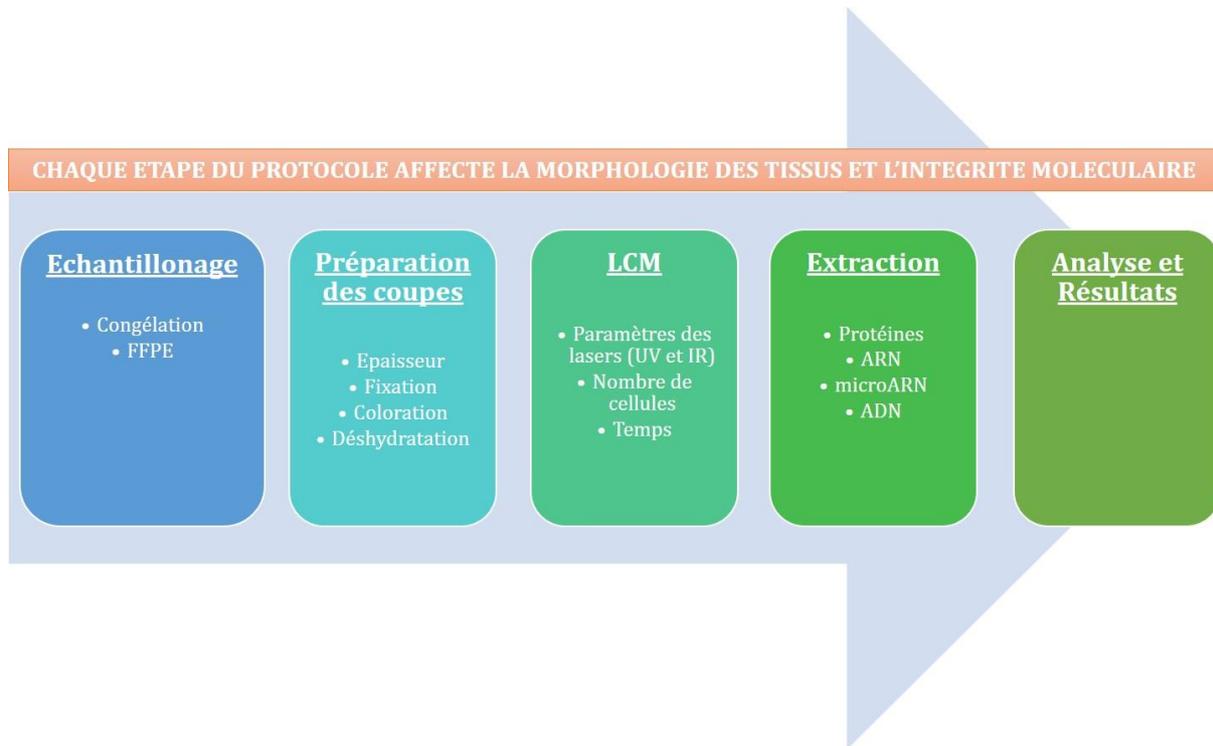


Figure 36: Les différentes étapes critiques du processus de LCM. D'après Bevilacqua et Ducos, 2018. FFPE : Formalin-fixed paraffin-embedded.

Le choix de la LCM et de l'étude d'une zone précise d'infection revêt un intérêt particulier dans le cadre de notre étude. En effet, l'acquisition et la disponibilité en fer pour les bactéries Gram-positives entéropathogènes dans l'environnement intestinal est mal connu: comment les bactéries s'adaptent-elles dans la lumière intestinale et quels facteurs bactériens sont activés lorsque les cellules hôtes sont endommagées. De plus, la biogéographie et l'organisation spatiale des communautés microbiennes influencent particulièrement la pathogénicité d'une espèce bactérienne (Figure 37), notamment dans le cadre d'une infection intestinale (Stacy *et al.*, 2016). La sécrétion des sidérophores impacte la composition de la communauté microbienne environnante, et forme en fonction de la localisation dans l'intestin de l'hôte des niches écologiques particulières, modulant également la réponse immunitaire de l'hôte (Ellermann et Arthur, 2017). Enfin, le choix de l'utilisation de larves de *G. mellonella* dépourvues de microbiote intestinal était aussi un élément clef dans le cadre de nos travaux. La composition de la communauté microbienne résidente dans l'intestin de *G. mellonella* peut aussi influencer la virulence de *B. cereus*, en particulier au regard de la compétition pour acquérir le fer de l'hôte (Stacy, Abraham, *et al.*, 2016), ce qui par conséquent aurait pu compliquer d'avantage notre

étude. Cependant, il serait pertinent dans une future analyse de prendre en compte le facteur microbiote dans le contexte homéostasie du fer en milieu intestinal.

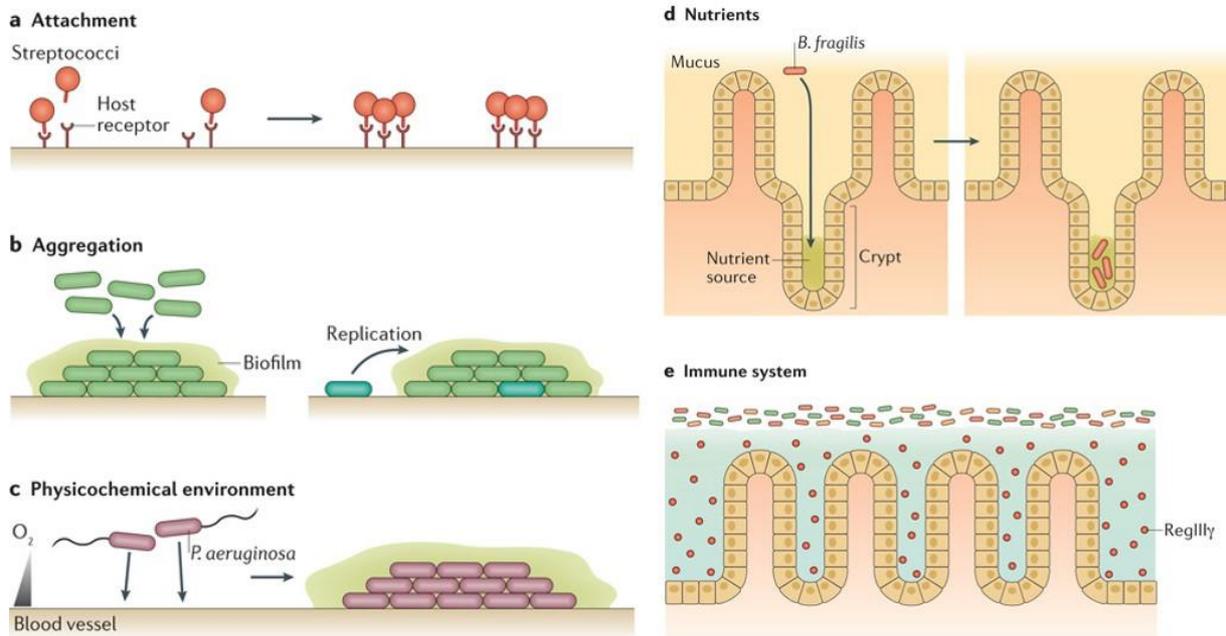


Figure 37: Facteurs environnementaux influençant la composition et la biogéographie du microbiote. **a) Attachement:** La distribution spatiale des récepteurs spécifiques de l'hôte, qui permet la fixation des microorganismes, détermine l'organisation initiale des communautés microbiennes. **b) Aggrégation:** Les bactéries vont se développer sous forme généralement de biofilms, issus de plusieurs bactéries (à gauche) ou d'une cellule (à droite). **c) Environnement physico-chimique:** Les gradients d'oxygène ou de pH peuvent influencer la distribution des bactéries au sein des communautés microbiennes. **d) Nutriments:** La possibilité d'accès et d'utilisation des nutriments dans certaines zones spécifiques peut également influencer la microbiogéographie. **e) Système immunitaire:** L'immunité de l'hôte influence la distribution des communautés microbiennes. Exemple ici de la lectine RegIIIy chez les mammifères, sécrétée par les cellules épithéliales de l'intestin grêle, qui entraîne un espace entre la surface intestinale et le microbiote. D'après Stacy *et al.*, 2016.

L'homéostasie du fer, facteur clef pour *B. cereus* lors de l'infection de l'intestin de l'hôte

En premier lieu, il est important de noter que tous les gènes choisis sont exprimés dans les intestins de l'insecte à 3 et 16 heures. Les gènes impliqués dans l'homéostasie du fer contrôlés par Fur, principal répresseur de l'homéostasie du fer (*entA*, *feuA*, *fatB*, *fec*, *feoB*, *ilsA*, *isdC*) et deux gènes supplémentaires indépendants de Fur (*fpuA*, *asb*) se trouvent moins exprimés au stade tardif de l'infection intestinale (T16), sauf *feoB*. Il a été démontré

précédemment que des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez *B. cereus* et contrôlés par Fur sont régulés négativement *in vitro* en milieu carencé en fer, à l'exception de l'opéron *ash*, codant pour la pétrobactine (Hayrapetyan *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent qu'au début de l'infection, le manque de fer disponible dans l'intestin de l'insecte déclenche chez *B. cereus* l'expression de l'ensemble des gènes impliqués dans l'acquisition du fer de l'environnement hôte, jusqu'à ce qu'une quantité suffisante de fer soit biodisponible. L'expression en termes de valeur seuil (Cycle threshold – Ct) est proportionnelle à celle obtenue *in vitro* et présentée dans la section résultats complémentaires : on est en effet autour de 15 à 20 Ct pour une quantité d'une dizaine de ng d'ARN total extrait en LCM et amplifié 1000 à 10000 fois (autour de 30 Ct sans amplification) alors qu'*in vitro* nous sommes à environ 20 Ct pour une quantité d'ARN total de l'ordre du microgramme. Lorsque la quantité optimale de fer dans le cytoplasme bactérien est atteinte, ces gènes vont être réprimés par Fur.

Le rôle central du couple FeuA-BB dans la virulence intrahémocœlique chez *G. mellonella* a été abordé plus haut dans la discussion. Nous montrons ici que la BB et FeuA jouent également un rôle dans l'adaptation de *B. cereus* chez l'hôte dans l'environnement intestinal. En effet, leur absence réduit la capacité de croissance bactérienne chez les larves (environ 2 log de différence entre la souche sauvage de référence et le double mutant $\Delta feuA \Delta entA$ à T16). Un rôle similaire a été mis en évidence chez *E. coli* pour l'entérobactine (molécule chirale de la BB) et les transporteurs membranaires associés dans le tractus intestinal de souris axéniques (Pi *et al.*, 2012). En revanche, d'autres études ciblant différents gènes impliqués dans l'absorption d'ions métalliques par d'autres souches d'*E. Coli* n'ont pas montré de différence significative (Kupz *et al.*, 2013). En phase d'infection tardive, la régulation positive de *feoB* ne semble pas significativement différente, même si deux réplicats biologiques sur trois présentaient un changement positif (1,4 et 1,2 par rapport à 0,7 pour le troisième). La protéine membranaire FeoB, composant du système Feo, a été identifiée comme une protéine G ayant une activité GTPase (Marlovits *et al.*, 2002), permettant import de fer ferreux dans des bactéries (Hyunkeun Kim, Lee, et Shin, 2012 ; H. Kim, Lee, et Shin 2013). Ces résultats suggèrent que *B. cereus* peut utiliser ce système très répandu chez un grand nombre de bactéries dans l'absorption du fer, en supposant un environnement riche en fer ferreux. L'expression du système Feo réduit ainsi la nécessité de synthétiser tous les autres systèmes d'absorption du fer impliquant des systèmes d'acquisition directe (protéines de

surface liées au peptidoglycane comme IsdC ou IlsA) ou systèmes d'acquisition indirecte (utilisant différents composants tels que les sidérophores et leurs transporteurs). Il a déjà été rapporté qu'*ilsA* était fortement exprimé dans l'hémocoële de *G. mellonella* par l'utilisation soit de fusions transcriptionnelles sur plasmide avec des gènes rapporteurs de fluorescence (GFP) ou d'activité enzymatique β -galactosidase (*lacZ*), ou bien encore lors de l'activation du promoteurs par le système IVET (Daou *et al.*, 2009 ; Sinda Fedhila *et al.*, 2006). Nous montrons ici qu'*ilsA* est en effet exprimé dans l'intestin de la larve alors que sa détection n'a pas été observée dans ces conditions avec les fusions GFP dans les travaux précédents.

Adaptation de *B. cereus* aux changements de l'environnement intestinal de *G. mellonella* au cours de l'infection

Pour prévenir les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) libérées dans l'environnement, les bactéries doivent utiliser des stratégies pour permettre notamment la réparation de l'ADN, des membranes lipidiques ou des protéines (Ezraty *et al.*, 2017). La bactérioferritine Dps est impliquée dans le stockage du fer et protège les bactéries du stress oxydatif *in vivo* (D. Wang *et al.*, 2009 ; Rivera 2017). Dans nos conditions, ce gène présente la plus grande expression différentielle positive au stade tardif de l'infection (T16). Ce résultat suggère que le stress oxydatif augmente dans l'intestin, probablement à cause de la dégradation des cellules hôtes et donc du rejet dans l'environnement de molécules comme le fer ferreux, qui réagit avec l'oxygène pour produire des ROS par réaction de Fenton (Touati, 2000). Deux autres gènes ont été choisis comme indicateurs du stress oxydatif dans l'intestin de *G. mellonella* au cours de l'infection : le gène codant pour la superoxyde dismutase *SodA* et un gène codant pour une catalase. Il est connu que ces facteurs protègent les bactéries contre les ROS, en particulier les radicaux superoxydes et le H_2O_2 (Valko, Morris, et Cronin, 2005), et qu'ils pourraient être régulés à la hausse ou à la baisse chez les bactéries Gram-positives, selon le type métal rejeté dans l'environnement (Behera, Dandapat, et Rath, 2014). Ici, bien que la catalase soit régulée négativement, *sodA* semble présenter une variation parmi les réplicats (1.1, 1.3 et 0.5). Dans l'ensemble, les marqueurs sélectionnés ont tendance à indiquer que *B. cereus* doit faire face à un niveau de stress oxydatif plus élevé dans l'intestin de *G. mellonella* à T16.

Des essais *in vivo* sur *G. mellonella* après injection de *B. thuringiensis* dans l'hémolymphe ont déjà été réalisés pour étudier le niveau d'expression de l'hémolysine II (*hlyII*) et son importance dans la virulence (Tran *et al.*, 2013 ; Cadot *et al.*, 2010). Ce gène est sous le contrôle de son propre régulateur HlyIIR mais également de Fur (D. R. Harvie 2005 ; Sineva *et al.*, 2012). L'expression de *hlyII* est induite dans l'hémocèle avec une faible disponibilité en fer et en glucose (Elisabeth Guillemet *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2013), permettant ainsi à la bactérie d'accéder aux nutriments et favorisant la croissance en dégradant les macrophages et les érythrocytes de l'hôte (Tran *et al.*, 2013). À notre connaissance, l'expression de *hlyII* n'a pas été testée au cours d'une infection par voie orale chez *G. mellonella* : nos résultats montrent que *hlyII* est surexprimé en fin d'infection dans nos conditions. Ainsi, à T16, *B. cereus* continue à exprimer l'hémolysine II lorsqu'il se trouve à proximité des cellules de l'épithélium intestinal, entraînant par conséquent une lyse des entérocytes qui fournissent ainsi des nutriments pour la bactérie. L'activité lytique de HlyII sur les cellules intestinales de *G. mellonella* reste à étudier, mais on peut supposer qu'une production accrue de HlyII, conduisant *in fine* à une libération de fer ferreux, pourrait expliquer pourquoi FeoB est davantage exprimé. Les systèmes Feo sont répandus dans de nombreuses espèces bactériennes et ont été essentiellement étudiés chez les bactéries Gram-négatives (Lau, Krewulak, et Vogel, 2016). Nos résultats pourraient indiquer que FeoB prend le relais des autres gènes principaux impliqués dans l'import du fer à T16 lors de l'interaction de *B. cereus* avec la cellule hôte. Il a été signalé que la métalloprotéase InhA2 joue un rôle dans la virulence de *B. thuringiensis* après une infection orale, probablement pour aider à traverser la barrière intestinale (S. Fedhila *et al.*, 2003). Nos résultats montrent qu'*inhA2* est exprimé plus faiblement au stade d'infection tardif qu'au début du stade d'infection, et l'état de la paroi indique que la dégradation de l'épithélium a probablement commencé très tôt au cours de l'infection. La nécessité d'une quantité élevée de métalloprotéases telles que InhA2 ou l'entérotoxine NheB peut diminuer au cours de l'infection. Par conséquent, les gènes des facteurs de virulence correspondants, *nheB* et *inhA2*, sont moins exprimés. Fait intéressant, le gène codant pour leur activateur de transcription PlcR, est également régulé négativement à T16 comparativement à T3. PlcR est connue pour être un marqueur de plusieurs facteurs environnementaux, et s'exprime au début de la phase stationnaire (Gohar *et al.*, 2008). Les trois gènes sont toujours exprimés à T16 et les bactéries disséquées étaient en forte densité au deux points de prélèvement, ce qui devrait être optimal pour l'activation du

quorum sensing (QS), formant avec son peptide signal PapR un système de QS (Leyla Slamti *et al.*, 2014). Une explication de la réduction de l'expression à T16 peut être liée au fait que des nutriments sont disponibles et que les bactéries peuvent reprendre une phase exponentielle de croissance, et par conséquent quitter la phase stationnaire. Ceci correspond à l'augmentation du nombre de bactéries présentes dans l'intestin des larves à T16 comparativement à T3 et indique qu'au cours de l'infection de l'hôte, *B. cereus* peut passer alternativement d'une phase stationnaire à une phase intermédiaire comme proposé chez *B. thuringiensis* après injection dans l'hémocœle de *G. mellonella* (Verplaetse *et al.*, 2015). Le régulon PlcR est composé d'un grand nombre de facteurs de virulence sécrétés chez *B. cereus*, et son importance a déjà été démontrée pour permettre la pleine virulence de *B. thuringiensis* et *B. cereus* après infection orale de *G. mellonella* (Salamitou *et al.*, 2000). Les résultats présentés dans la section « Résultats complémentaires » montrent une expression forte des gènes de *G. mellonella*, dans la lumière intestinale, mais avec une expression différentielle très variable selon les échantillons entre 3 et 16 h post infection. Ces résultats sont probablement liés à divers facteurs : mécaniques tout d'abord, lors de la coupe des échantillons et leur préparation avant LCM ; la lyse des entérocytes suite à l'infection par *B. cereus*, entraînant un relargage du contenu cellulaire dans la lumière intestinale ; enfin, en conséquence de la seconde hypothèse, l'expression de molécules de stockage du fer tels que la ferritine et la transferrine, de façon à participer à la lutte contre le stress oxydatif à 16 h post-infection, que l'on suspecte au regard de l'expression accrue de la bactérioferritine (*dps*) ou indirectement à travers la surexpression de l'homolysine II (*hlyII*) chez *B. cereus*.

Conclusion générale

Au cours de ma thèse, j'ai pu enrichir mes compétences en génétique bactérienne et biologie moléculaire à travers l'étude d'un système essentiel pour le développement d'un pathogène d'intérêt, d'un point de vue santé publique, *Bacillus cereus* étant la deuxième cause de TIAC en France. J'ai pu ainsi démontrer l'importance d'un point de vue moléculaire du couple bacillibactine-FeuA et son rôle central dans l'acquisition du fer, élément essentiel pour la grande majorité des organismes vivants, à partir de sources variées (ferritine, hème, hémoglobine, fer inorganique), complétant ainsi les connaissances fondamentales apportées à ce sujet. Néanmoins, une étude des systèmes redondants permettant de suppléer une éventuelle déficience de FeuA, et leur part relative

dans la réimportation de la bacillibactine, aurait permis d'avoir une idée plus claire sur le système global. De plus, les données concernant l'utilisation de la transferrine et la lactoferrine montrent que *B. cereus* ATCC 14579 n'est pas capable de mobiliser le fer qu'elles contiennent. Cependant, il existe d'autres souches de *B. cereus* qui elles sont capables d'en extraire leur fer, et une analyse plus large en utilisant d'autres souches de *B. cereus* en ciblant les mêmes gènes auraient pu nous permettre de déterminer l'importance de l'écosystème sur l'adaptation et l'évolution des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer chez *B. cereus*. De plus, au regard de la complexité du système de régulation de l'homéostasie du fer, et l'influence des paramètres environnementaux tels que le gradient d'oxygène ou encore le pH du milieu, pouvant modifier l'état d'oxydation de fer, il aurait été intéressant de déterminer *in vitro* l'impact sur la régulation des systèmes d'acquisition du fer et le rétro-contrôle potentiel sur d'autres voies de régulation chez *B. cereus*. Enfin, il me paraît important également de transposer ce type d'analyses chez *B. thuringiensis*. En effet, de par sa proximité phylogénétique avec *B. cereus*, son importance économique en tant que bioinsecticide, et son rôle spécifique de pathogène d'insectes, l'intérêt d'une étude de l'homéostasie du fer chez cette espèce du groupe *B. cereus* semble indiqué. D'un point de vue plus large, les analyses *in vivo* ont mis en lumière qu'en l'absence du couple BB-FeuA, la virulence de *B. cereus* se trouve augmentée comparativement à la souche sauvage de référence. De plus, les résultats de ma thèse ont permis de mettre en évidence le rôle de certains gènes impliqués dans l'homéostasie du fer dans la colonisation et la pathogénicité de *B. cereus* lors de l'infection de l'intestin de *G. mellonella*. L'utilisation de la LCM dans le cadre de ces analyses a permis pour la première fois d'explorer et d'observer ce phénomène dans une zone précise de l'intestin chez une larve d'insecte dépourvue de microbiote. Sur la base de ces résultats, mes travaux de thèse proposent un premier modèle (Figure 38) avec la souche sauvage de référence de *B. cereus*, sans cependant analyser de façon exhaustive l'expression globale des gènes de *B. cereus* et la réponse de l'hôte au cours de l'infection. La disponibilité récente du génome de *G. mellonella* ouvre de nombreuses possibilités quant à une analyse en Dual-seq, qui permettrait d'obtenir un profil de pathogénicité spécifique, élargissant l'étude non seulement à l'homéostasie du fer chez le pathogène et l'hôte, mais également de voir la régulation globale incluant chez *B. cereus* CodY, important lors de changements métaboliques et environnementaux pour la bactérie, et comparer la souche sauvage de référence avec la souche double mutante pour la BB et FeuA.

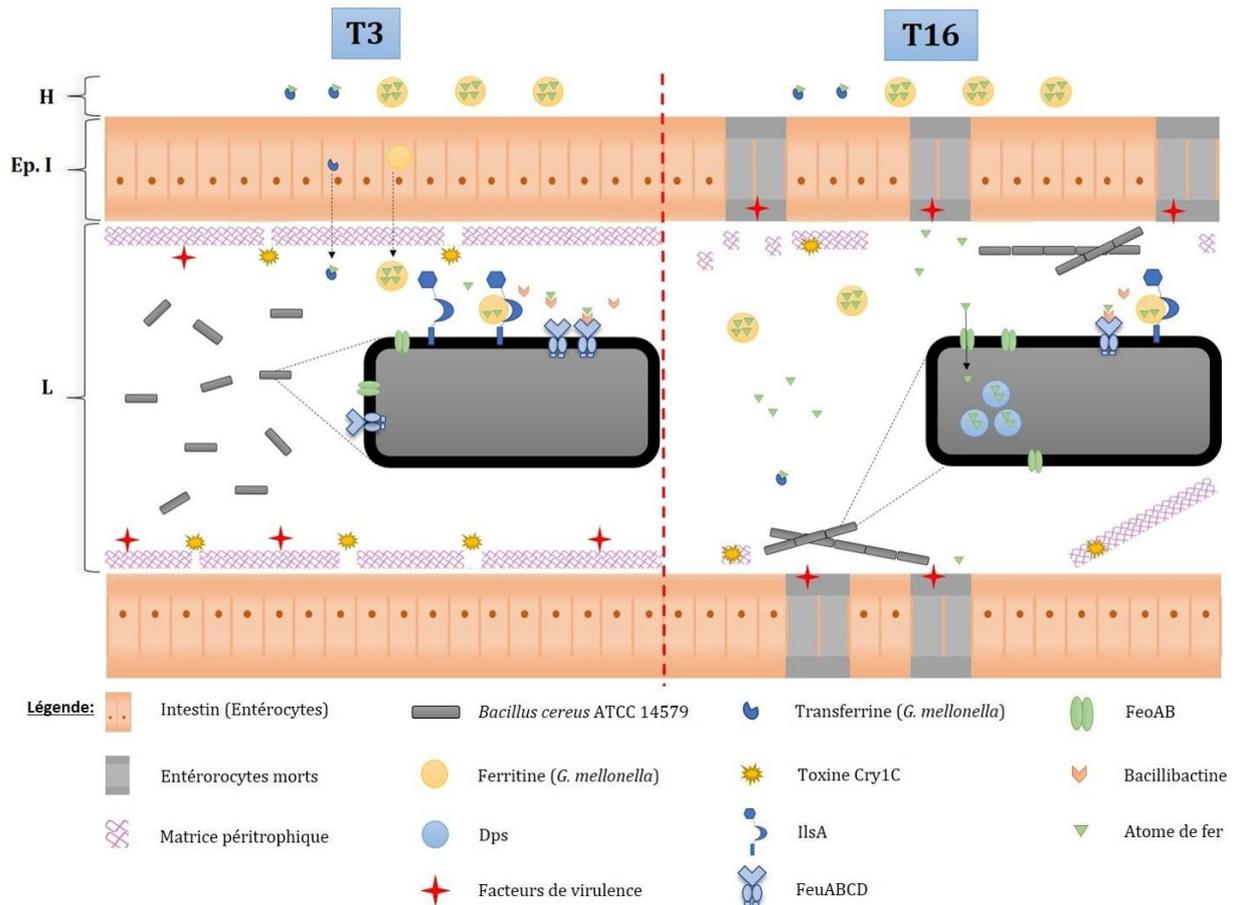


Figure 38 : Représentation schématique de *Bacillus cereus* ATCC 14579 dans l'intestin moyen de larve de *Galleria mellonella* après infection par voie orale. Les traits pointillés rouges verticaux délimitent les deux temps d'infection étudiés (3h et 16h après ingestion). **A gauche (T3)** : *B. cereus* (bâtonnets gris) occupe l'ensemble de la lumière intestinale, sous forme plutôt individualisée. Les sources de fer (transferrine et ferritine) de *G. mellonella* sont circulantes dans l'hémolymphe, mais de nombreux transcrits identifiés dans la lumière intestinale suggèrent une réponse immunitaire de *G. mellonella* dès 3h post-ingestion. La toxine Cry1C (étoile jaune) commence à léser la matrice péritrophique (structure de protection de la paroi intestinale, hachures violettes). En parallèle, *B. cereus* exprime les gènes impliqués dans l'homéostasie du fer et des facteurs de virulence (croix rouges) de façon à lyser les cellules environnantes et en récupérer le fer qu'elles contiennent. Le zoom sur une cellule de *B. cereus* dans la partie droite (en trait épais noir : la paroi cellulaire ; en gris : le cytoplasme) montrent quelques protéines de surface permettant chez *B. cereus* l'acquisition du fer libre (FeoAB) et de la ferritine (IIsA, FeuABCD) ainsi que la bacillibactine. **A droite (T16)** : A 16h, la matrice péritrophique est lésée et *B. cereus* franchi cette barrière pour se retrouver majoritairement sous forme de chaînettes près des entérocytes. La surexpression de *dps* et l'expression de *feoAB* suggèrent que l'environnement intestinal change avec un stress oxydatif important, probablement lié au relargage de fer libre dans la lumière intestinale par les entérocytes lésés (grisés sur le schéma). *B. cereus* continue de produire des facteurs de virulence, surexprimant dans nos conditions l'hémolyse par HlyII. Les gènes impliqués dans l'homéostasie du fer sont moins exprimés, excepté FeoAB (transporteur de fer inorganique), comme l'illustre le zoom dans la partie droite du schéma. H : hémolymphe ; Ep. I : épithélium intestinal ; L : lumière intestinale.

6. Bibliographie

- Abergel, Rebecca J., Anna M. Zawadzka, Trisha M. Hoette, et Kenneth N. Raymond. 2009. « Enzymatic Hydrolysis of Trilactone Siderophores: Where Chiral Recognition Occurs in Enterobactin and Bacillibactin Iron Transport(1) ». *Journal of the American Chemical Society* 131 (35): 12682-92. <https://doi.org/10.1021/ja903051q>.
- Abfalter, Carmen M., Esther Schönauer, Karthe Ponnuraj, Markus Huemer, Gabriele Gadermaier, Christof Regl, Peter Briza, *et al.*, 2016. « Cloning, Purification and Characterization of the Collagenase ColA Expressed by *Bacillus cereus* ATCC 14579 ». Édité par Xianwu Cheng. *PLOS ONE* 11 (9): e0162433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162433>.
- Abi-Khalil, Elise, Diego Segond, Tyson Terpstra, Gwenaëlle André-Leroux, Mireille Kallassy, Didier Lereclus, Fadi Bou-Abdallah, et Christina Nielsen-Leroux. 2015. « Heme Interplay between IIsA and IsdC: Two Structurally Different Surface Proteins from *Bacillus cereus* ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1850 (9): 1930-41. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.06.006>.
- Agaisse, Herve, Myriam Gominet, Ole Andreas Okstad, Anne-Brit Kolsto, et Didier Lereclus. 1999. « PlcR Is a Pleiotropic Regulator of Extracellular Virulence Factor Gene Expression in *Bacillus thuringiensis* ». *Molecular Microbiology* 32 (5): 1043-53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01419.x>.
- Anderson, D. S., P. Adhikari, A. J. Nowalk, C. Y. Chen, et T. A. Mietzner. 2004. « The HFbpABC Transporter from *Haemophilus influenzae* Functions as a Binding-Protein-Dependent ABC Transporter with High Specificity and Affinity for Ferric Iron ». *Journal of Bacteriology* 186 (18): 6220-29. <https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6220-6229.2004>.
- Anderson, Gregory J, et David M Frazer. 2017. « Current Understanding of Iron Homeostasis ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 106 (Supplement 6): 1559S-1566S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155804>.
- Andersson, Daniel, Nina Akrap, David Svec, Tony E Godfrey, Mikael Kubista, Göran Landberg, et Anders Ståhlberg. 2015. « Properties of Targeted Preamplification in DNA and cDNA Quantification ». *Expert Review of Molecular Diagnostics* 15 (8): 1085-1100. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1057124>.
- Andreeva, Zhanna I., Vladimir F. Nesterenko, Maria G. Fomkina, Vadim I. Ternovsky, Natalia E. Suzina, Anastasia Yu Bakulina, Alexander S. Solonin, et Elena V. Sineva. 2007. « The Properties of *Bacillus cereus* Hemolysin II Pores Depend on Environmental Conditions ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1768 (2): 253-63. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.11.004>.
- Andreeva, Zhanna I., Vladimir F. Nesterenko, Igor S. Yurkov, Zhanna I. Budarina, Elena V. Sineva, et Alexander S. Solonin. 2006. « Purification and Cytotoxic Properties of *Bacillus cereus* Hemolysin II ». *Protein Expression and Purification* 47 (1): 186-93. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.10.030>.
- Andrews, Simon C., Andrea K. Robinson, et Francisco Rodríguez-Quiñones. 2003. « Bacterial Iron Homeostasis ». *FEMS Microbiology Reviews* 27 (2-3): 215-37. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00055-X](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00055-X).
- ANSES. 2017. « Saisine n° 2016-SA-0286 ».
- Arantes, Olivia, et Didier Lereclus. 1991. « Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis* ». *Gene* 108 (1): 115-119.

- Arnaud, M., A. Chastanet, et M. Debarbouille. 2004. « New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (11): 6887-91. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004>.
- Arnow, L. Earle. 1937. « Colorimetric determination of the components of 3, 4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures ». *J. biol. Chem* 118 (2): 531-537.
- Arosio, Paolo, Leonardo Elia, et Maura Poli. 2017. « Ferritin, Cellular Iron Storage and Regulation: FERRITIN AND IRON STORAGE ». *IUBMB Life* 69 (6): 414-22. <https://doi.org/10.1002/iub.1621>.
- Arosio, Paolo, Rosaria Ingrassia, et Patrizia Cavadini. 2009. « Ferritins: A Family of Molecules for Iron Storage, Antioxidation and More ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790 (7): 589-99. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.09.004>.
- Arosio, Paolo, et Sonia Levi. 2010. « Cytosolic and Mitochondrial Ferritins in the Regulation of Cellular Iron Homeostasis and Oxidative Damage ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800 (8): 783-92. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.02.005>.
- Asard, Han, Raffaella Barbaro, Paolo Trost, et Alajos Bérczi. 2013. « Cytochromes *b* 561: Ascorbate-Mediated Trans-Membrane Electron Transport ». *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (9): 1026-35. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5065>.
- Ascenzi, Paolo, Alessio Bocedi, Paolo Visca, Fiorella Altruda, Emanuela Tolosano, Tiziana Beringhelli, et Mauro Fasano. 2005. « Hemoglobin and Heme Scavenging ». *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* 57 (11): 749-59. <https://doi.org/10.1080/15216540500380871>.
- Ash, Carol, et Matthew D. Collins. 1992. « Comparative Analysis of 23S Ribosomal RNA Gene Sequences of *Bacillus anthracis* and Emetic *Bacillus cereus* Determined by PCR-Direct Sequencing ». *FEMS Microbiology Letters* 94 (1-2): 75-80. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05292.x>.
- Balderas, M. A., C. L. Nobles, E. S. Honsa, E. R. Alicki, et A. W. Maresso. 2012. « Hal Is a *Bacillus anthracis* Heme Acquisition Protein ». *Journal of Bacteriology* 194 (20): 5513-21. <https://doi.org/10.1128/JB.00685-12>.
- Barber, M. F., et N. C. Elde. 2014. « Escape from Bacterial Iron Piracy through Rapid Evolution of Transferrin ». *Science* 346 (6215): 1362-66. <https://doi.org/10.1126/science.1259329>.
- Bargabus, R.L, N.K Zidack, J.E Sherwood, et B.J Jacobsen. 2002. « Characterisation of Systemic Resistance in Sugar Beet Elicited by a Non-Pathogenic, Phyllosphere-Colonizing *Bacillus mycoides*, Biological Control Agent ». *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61 (5): 289-98. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2003.0443>.
- Baron, Florence, Sophie Jan, Fabienne Gonnet, Maryvonne Pasco, Julien Jardin, BéRangère Giudici, Michel Gautier, Catherine GuéRin-Dubiard, et FrançOise Nau. 2014. « Ovotransferrin Plays a Major Role in the Strong Bactericidal Effect of Egg White against the *Bacillus cereus* Group ». *Journal of Food Protection* 77 (6): 955-62. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-473>.
- Beecher, D. J., T. W. Olsen, E. B. Somers, et A. C. L. Wong. 2000. « Evidence for Contribution of Tripartite Hemolysin BL, Phosphatidylcholine-Preferring Phospholipase C, and Collagenase to Virulence of *Bacillus cereus* Endophthalmitis ». *Infection and Immunity* 68 (9): 5269-76. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.5269-5276.2000>.

- Beecher, Douglas J, Jean L Schoeni, et Amy C Lee Wong. 1995. « Enterotoxigenic Activity of Hemolysin BL from *Bacillus cereus* ». *INFECT. IMMUN.* 63: 6.
- Beecher, Douglas J., et Amy C. L. Wong. 1997. « Tripartite Hemolysin BL from *Bacillus cereus*: HEMOLYTIC ANALYSIS OF COMPONENT INTERACTIONS AND A MODEL FOR ITS CHARACTERISTIC PARADOXICAL ZONE PHENOMENON ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (1): 233-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.233>.
- Behera, Madhumita, Jagneshwar Dandapat, et Chandi Charan Rath. 2014. « Effect of Heavy Metals on Growth Response and Antioxidant Defense Protection in *Bacillus cereus*: Metal Induced Antioxidant Response in *Bacillus cereus* ». *Journal of Basic Microbiology* 54 (11): 1201-9. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300805>.
- Belaidi, Abdel A., et Ashley I. Bush. 2016. « Iron Neurochemistry in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: Targets for Therapeutics ». *Journal of Neurochemistry* 139 (octobre): 179-97. <https://doi.org/10.1111/jnc.13425>.
- Bencze, Krisztina Z., Kalyan C. Kondapalli, Jeremy D. Cook, Stephen McMahon, César Millán-Pacheco, Nina Pastor, et Timothy L. Stemmler. 2006. « The Structure and Function of Frataxin ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 41 (5): 269-91. <https://doi.org/10.1080/10409230600846058>.
- Berezin, Shirly, Yaron Aviv, Hagit Aviv, Elad Goldberg, et Yaakov R. Tischler. 2017. « Replacing a Century Old Technique – Modern Spectroscopy Can Supplant Gram Staining ». *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02212-2>.
- Bevilacqua, Claudia, et Bertrand Ducos. 2018. « Laser Microdissection: A Powerful Tool for Genomics at Cell Level ». *Molecular Aspects of Medicine* 59 (février): 5-27. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.09.003>.
- Bevilacqua, Claudia, Samira Makhzami, Jean-Christophe Helbling, Pierre Defreinaix, et Patrice Martin. 2010. « Maintaining RNA Integrity in a Homogeneous Population of Mammary Epithelial Cells Isolated by Laser Capture Microdissection ». *BMC Cell Biology* 11 (1): 95. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-95>.
- Bhandari, V., N. Z. Ahmod, H. N. Shah, et R. S. Gupta. 2013. « Molecular Signatures for *Bacillus* Species: Demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* Clades in Molecular Terms and Proposal to Limit the Placement of New Species into the Genus *Bacillus* ». *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 63 (Pt 7): 2712-26. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.048488-0>.
- Bluhm, Martin E., Sanggoo S. Kim, Emily A. Dertz, et Kenneth N. Raymond. 2002. « Corynebactin and Enterobactin: Related Siderophores of Opposite Chirality ». *Journal of the American Chemical Society* 124 (11): 2436-37. <https://doi.org/10.1021/ja016651s>.
- Bonnet, Agnes, Claudia Bevilacqua, Francis Benne, Loys Bodin, Corinne Cotinot, Laurence Liaubet, Magali Sancristobal, et al., 2011. « Transcriptome Profiling of Sheep Granulosa Cells and Oocytes during Early Follicular Development Obtained by Laser Capture Microdissection ». *BMC Genomics* 12 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-417>.
- Borisov, Vitaliy B., Robert B. Gennis, James Hemp, et Michael I. Verkhovskiy. 2011. « The Cytochrome B_d Respiratory Oxygen Reductases ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807 (11): 1398-1413. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.06.016>.
- Bottone, E. J. 2010. « *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen ». *Clinical Microbiology Reviews* 23 (2): 382-98. <https://doi.org/10.1128/CMR.00073-09>.

- Bou-Abdallah, Fadi, Justin McNally, Xing Xin Liu, et Artem Melman. 2011. « Oxygen Catalyzed Mobilization of Iron from Ferritin by Iron(III) Chelate Ligands ». *Chem. Commun.* 47 (2): 731-33. <https://doi.org/10.1039/C0CC03454A>.
- Bou-Abdallah, Fadi, Guanghua Zhao, Giorgio Biasiotto, Maura Poli, Paolo Arosio, et N. Dennis Chasteen. 2008. « Facilitated Diffusion of Iron(II) and Dioxygen Substrates into Human H-Chain Ferritin. A Fluorescence and Absorbance Study Employing the Ferroxidase Center Substitution Y34W ». *Journal of the American Chemical Society* 130 (52): 17801-11. <https://doi.org/10.1021/ja8054035>.
- Bouillaut, L., S. Perchat, S. Arold, S. Zorrilla, L. Slamti, C. Henry, M. Gohar, N. Declerck, et D. Lereclus. 2008. « Molecular Basis for Group-Specific Activation of the Virulence Regulator PlcR by PapR Heptapeptides ». *Nucleic Acids Research* 36 (11): 3791-3801. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn149>.
- Bouillaut, L., N. Ramarao, C. Buisson, N. Gilois, M. Gohar, D. Lereclus, et C. Nielsen-LeRoux. 2005. « FlhA Influences *Bacillus thuringiensis* PlcR-Regulated Gene Transcription, Protein Production, and Virulence ». *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12): 8903-10. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.8903-8910.2005>.
- Bowden, Catherine F. M., Meghan M. Verstraete, Lindsay D. Eltis, et Michael E. P. Murphy. 2014. « Hemoglobin Binding and Catalytic Heme Extraction by IsdB Near Iron Transporter Domains ». *Biochemistry* 53 (14): 2286-94. <https://doi.org/10.1021/bi500230f>.
- Bradley, Justin M., Nick E. Le Brun, et Geoffrey R. Moore. 2016. « Ferritins : Furnishing Proteins with Iron ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 21 (1): 13-28. <https://doi.org/10.1007/s00775-016-1336-0>.
- Braun, Volkmar, Karolin Günter, et Klaus Hantke. 1991. « Transport of Iron across the Outer Membrane ». *Biology of Metals* 4 (1): 14-22. <https://doi.org/10.1007/BF01135552>.
- Braun, Volkmar, et Klaus Hantke. 2011. « Recent Insights into Iron Import by Bacteria ». *Current Opinion in Chemical Biology* 15 (2): 328-34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.01.005>.
- Bravo, Alejandra, Sarjeet S. Gill, et Mario Soberón. 2007. « Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt Toxins and Their Potential for Insect Control ». *Toxicon* 49 (4): 423-35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.11.022>.
- Bravo, Alejandra, Supaporn Likitvivanavong, Sarjeet S. Gill, et Mario Soberón. 2011. « *Bacillus thuringiensis* : A Story of a Successful Bioinsecticide ». *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41 (7): 423-31. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.006>.
- Brooks, Cory L., Elena Arutyunova, et M. Joanne Lemieux. 2014. « The Structure of Lactoferrin-Binding Protein B from *Neisseria meningitidis* Suggests Roles in Iron Acquisition and Neutralization of Host Defences ». *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications* 70 (10): 1312-17. <https://doi.org/10.1107/S2053230X14019372>.
- Buchanan, Susan K, Barbara S Smith, Lalitha Venkatramani, Di Xia, Lothar Esser, Maya Palnitkar, et Ranjan Chakraborty. 1999. « Crystal Structure of the Outer Membrane Active Transporter FepA from *Escherichia coli* ». *Nature Structural Biology* 6 (1): 9.
- Burmester, Thorsten, Sabine Klawitter, et Thomas Hankeln. 2007. « Characterization of Two Globin Genes from the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* : Divergent Origin of Nematoceran Haemoglobins ». *Insect Molecular Biology* 16 (2): 133-42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00706.x>.

- Cadot, C., S. L. Tran, M. L. Vignaud, M. L. De Buyser, A. B. Kolsto, A. Brisabois, C. Nguyen-The, D. Lereclus, M. H. Guinebretiere, et N. Ramarao. 2010. « InhA1, NprA, and HlyII as Candidates for Markers To Differentiate Pathogenic from Nonpathogenic *Bacillus cereus* Strains ». *Journal of Clinical Microbiology* 48 (4): 1358-65. <https://doi.org/10.1128/JCM.02123-09>.
- Callegan, M. C., S. T. Kane, D. C. Cochran, M. S. Gilmore, M. Gominet, et D. Lereclus. 2003. « Relationship of PlcR-Regulated Factors to *Bacillus Endophthalmitis* Virulence ». *Infection and Immunity* 71 (6): 3116-24. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3116-3124.2003>.
- Candela, Thomas, Annette Fagerlund, Christophe Buisson, Nathalie Gilois, Anne-Brit Kolstø, Ole Andreas Økstad, Stéphane Aymerich, Christina Nielsen-Leroux, Didier Lereclus, et Michel Gohar. 2019. « CalY Is a Major Virulence Factor and a Biofilm Matrix Protein ». *Molecular Microbiology*, avril, mmi.14184. <https://doi.org/10.1111/mmi.14184>.
- Carlin, F, M Fricker, A Pielaat, S Heisterkamp, R Shaheen, M Salkinojasalonen, B Svensson, C Nguyenthe, et M Ehlingschulz. 2006. « Emetic Toxin-Producing Strains of *Bacillus cereus* Show Distinct Characteristics within the *Bacillus cereus* Group ». *International Journal of Food Microbiology* 109 (1-2): 132-38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.022>.
- Carlin, Frédéric, Christine Albagnac, Ammar Rida, Marie-Hélène Guinebretière, Olivier Couvert, et Christophe Nguyen-the. 2013. « Variation of Cardinal Growth Parameters and Growth Limits According to Phylogenetic Affiliation in the *Bacillus cereus* Group. Consequences for Risk Assessment ». *Food Microbiology* 33 (1): 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.08.014>.
- Carlson Jr, Paul E., Shandee D. Dixon, Brian K. Janes, Katherine A. Carr, Tyler D. Nusca, Erica C. Anderson, Sarra E. Keene, David H. Sherman, et Philip C. Hanna. 2010. « Genetic Analysis of Petrobactin Transport in *Bacillus anthracis* ». *Molecular Microbiology* 75 (4): 900-909. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07025.x>.
- Cendrowski, Stephen, William MacArthur, et Philip Hanna. 2004. « *Bacillus anthracis* Requires Siderophore Biosynthesis for Growth in Macrophages and Mouse Virulence : Anthrax Iron Aquisition ». *Molecular Microbiology* 51 (2): 407-17. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03861.x>.
- Ceuppens, S., S. Timmerly, J. Mahillon, M. Uyttendaele, et N. Boon. 2013. « Small *Bacillus cereus* ATCC 14579 Subpopulations Are Responsible for Cytotoxin K Production ». *Journal of Applied Microbiology* 114 (3): 899-906. <https://doi.org/10.1111/jam.12096>.
- Ceuppens, Siele, Nico Boon, et Mieke Uyttendaele. 2013. « Diversity of *Bacillus cereus* Group Strains Is Reflected in Their Broad Range of Pathogenicity and Diverse Ecological Lifestyles ». *FEMS Microbiology Ecology* 84 (3): 433-50. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110>.
- Chakroun, Maissa, Núria Banyuls, Yolanda Bel, Baltasar Escriche, et Juan Ferré. 2016. « Bacterial Vegetative Insecticidal Proteins (Vip) from Entomopathogenic Bacteria ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80 (2): 329-50. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-15>.
- Château, Alice, Willem van Schaik, Anne Six, Willy Aucher, et Agnès Fouet. 2011. « CodY Regulation Is Required for Full Virulence and Heme Iron Acquisition in *Bacillus anthracis* ». *The FASEB Journal* 25 (12): 4445-56. <https://doi.org/10.1096/fj.11-188912>.

- Cheng, Alice G., Hwan Keun Kim, Monica L. Burts, Thomas Krausz, Olaf Schneewind, et Dominique M. Missiakas. 2009. « Genetic Requirements for *Staphylococcus aureus* Abscess Formation and Persistence in Host Tissues ». *The FASEB Journal* 23 (10): 3393-3404. <https://doi.org/10.1096/fj.09-135467>.
- Cherif, A., L. Brusetti, S. Borin, A. Rizzi, A. Boudabous, H. Khyami-Horani, et D. Daffonchio. 2003. « Genetic Relationship in the ' *Bacillus cereus* Group' by Rep-PCR Fingerprinting and Sequencing of a *Bacillus anthracis* -Specific Rep-PCR Fragment: REP-PCR IN THE *BACILLUS CEREUS* GROUP ». *Journal of Applied Microbiology* 94 (6): 1108-19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01945.x>.
- Chowdhury, Shankar R, Dale E King, Benjamin P Willing, Mark R Band, Jonathan E Beever, Adrienne B Lane, Juan J Loor, *et al.*, 2007. « Transcriptome Profiling of the Small Intestinal Epithelium in Germfree versus Conventional Piglets ». *BMC Genomics* 8 (1): 215. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-215>.
- Cope, Leslie D, Sharon E Thomas, Zbynek Hrkal, et Eric J Hansen. 1998. « Binding of Heme-Hemopexin Complexes by Soluble HxuA Protein Allows Utilization of This Complexed Heme by *Haemophilus influenzae* ». *INFECT. IMMUN.* 66: 6.
- Cornelissen, Cynthia Nau. 2003. « Transferrin-Iron Uptake by Gram-Negative Bacteria ». *Frontiers in Bioscience* 8 (4): d836-847. <https://doi.org/10.2741/1076>.
- Costa, Luciana F., Juliana P.S. Mol, Ana Patricia C. Silva, Auricélio A. Macêdo, Teane M.A. Silva, Geraldo E.S. Alves, Sebastian Winter, *et al.*, 2016. « Iron Acquisition Pathways and Colonization of the Inflamed Intestine by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium ». *International Journal of Medical Microbiology* 306 (8): 604-10. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.10.004>.
- Crickmore, N, D R Zeigler, J Feitelson, E Schnepf, J Van Rie, D Lereclus, J Baum, et D H Dean. 1998. « Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins ». *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.* 62: 7.
- Daou, Nadine, Christophe Buisson, Michel Gohar, Jasmina Vidic, Hélène Bierne, Mireille Kallassy, Didier Lereclus, et Christina Nielsen-LeRoux. 2009. « IIsA, A Unique Surface Protein of *Bacillus cereus* Required for Iron Acquisition from Heme, Hemoglobin and Ferritin ».  dit e par Theresa Koehler. *PLoS Pathogens* 5 (11): e1000675. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000675>.
- De Hertogh, Gert, Bart Lemmens, Peter Verhasselt, Ronald de Hoogt, Xavier Sagaert, Marie Joossens, Gert Van Assche, Paul Rutgeerts, Severine Vermeire, et Jeroen Aerssens. 2012. « Assessment of the Microbiota in Microdissected Tissues of Crohn's Disease Patients ». *International Journal of Inflammation* 2012: 1-11. <https://doi.org/10.1155/2012/505674>.
- Deriu, Elisa, Janet Z. Liu, Milad Pezeshki, Robert A. Edwards, Roxanna J. Ochoa, Heidi Contreras, Stephen J. Libby, Ferric C. Fang, et Manuela Raffatellu. 2013. « Probiotic Bacteria Reduce *Salmonella typhimurium* Intestinal Colonization by Competing for Iron ». *Cell Host & Microbe* 14 (1): 26-37. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.06.007>.
- Deschemin, Jean-Christophe, Marie-Louise Noordine, Aude Remot, Alexandra Willemetz, Clément Afif, François Canonne-Hergaux, Philippe Langella, *et al.*, 2016. « The Microbiota Shifts the Iron Sensing of Intestinal Cells ». *The FASEB Journal* 30 (1): 252-61. <https://doi.org/10.1096/fj.15-276840>.
- Dev, Som, et Jodie L. Babitt. 2017. « Overview of Iron Metabolism in Health and Disease: Iron Metabolism in Health and Disease ». *Hemodialysis International* 21 (avril): S6-20. <https://doi.org/10.1111/hdi.12542>.

- Díaz, Adelaida, Peter C. Loewen, Ignacio Fita, et Xavi Carpena. 2012. « Thirty Years of Heme Catalases Structural Biology ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 525 (2): 102-10. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2011.12.011>.
- Dickson, Claire F., Kaavya Krishna Kumar, David A. Jacques, G. Reza Malmirchegini, Thomas Spirig, Joel P. Mackay, Robert T. Clubb, J. Mitchell Guss, et David A. Gell. 2014. « Structure of the Hemoglobin-IsdH Complex Reveals the Molecular Basis of Iron Capture by *Staphylococcus aureus* ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (10): 6728-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.545566>.
- Dixon, Shandee D., Brian K. Janes, Alexandra Bourgis, Paul E. Carlson Jr, et Philip C. Hanna. 2012. « Multiple ABC Transporters Are Involved in the Acquisition of Petrobactin in *Bacillus anthracis* : Petrobactin Acquisition in *B. anthracis* ». *Molecular Microbiology* 84 (2): 370-82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08028.x>.
- Domazet, Barbara, Gregory T MacLennan, Antonio Lopez-Beltran, et Rodolfo Montironi. 2008. « Laser Capture Microdissection in the Genomic and Proteomic Era : Targeting the Genetic Basis of Cancer ». *Laser Capture Microdissection*, 14.
- Dommel, M. K., E. Frenzel, B. Strasser, C. Blochinger, S. Scherer, et M. Ehling-Schulz. 2010. « Identification of the Main Promoter Directing Cereulide Biosynthesis in Emetic *Bacillus cereus* and Its Application for Real-Time Monitoring of *ces* Gene Expression in Foods ». *Applied and Environmental Microbiology* 76 (4): 1232-40. <https://doi.org/10.1128/AEM.02317-09>.
- Dower, W. J., J. F. Miller, et C. W. Ragsdale. 1988. « High Efficiency Transformation of *E. coli* by High Voltage Electroporation ». *Nucleic Acids Research* 16 (13): 6127-45. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6127>.
- Drakesmith, Hal, Elizabeta Nemeth, et Tomas Ganz. 2015. « Ironing out Ferroportin ». *Cell Metabolism* 22 (5): 777-87. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.006>.
- Drobniewski, F A. 1993. « *Bacillus cereus* and Related Species. » *Clinical Microbiology Reviews* 6 (4): 324-38. <https://doi.org/10.1128/CMR.6.4.324>.
- Dryla, A., B. Hoffmann, D. Gelbmann, C. Giefing, M. Hanner, A. Meinke, A. S. Anderson, et al., 2007. « High-Affinity Binding of the Staphylococcal HarA Protein to Haptoglobin and Hemoglobin Involves a Domain with an Antiparallel Eight-Stranded-Barrel Fold ». *Journal of Bacteriology* 189 (1): 254-64. <https://doi.org/10.1128/JB.01366-06>.
- Drysdale, Jim, Paolo Arosio, Rosangela Invernizzi, Mario Cazzola, Armin Volz, Barbara Corsi, Giorgio Biasiotto, et Sonia Levi. 2002. « Mitochondrial Ferritin : A New Player in Iron Metabolism ». *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 29 (3): 376-83. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0577>.
- Dubovskiy, Ivan M., Ekaterina V. Grizanova, Miranda M. A. Whitten, Krishnendu Mukherjee, Carolyn Greig, Tatiana Alikina, Marsel Kabilov, Andreas Vilcinskis, Viktor V. Glupov, et Tariq M. Butt. 2016. « Immuno-Physiological Adaptations Confer Wax Moth *Galleria mellonella* Resistance to *Bacillus thuringiensis* ». *Virulence* 7 (8): 860-70. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1164367>.
- Duport, Catherine, Michel Jobin, et Philippe Schmitt. 2016. « Adaptation in *Bacillus cereus* : From Stress to Disease ». *Frontiers in Microbiology* 7 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01550>.
- Ebert, Matthias, Peter Schweyen, Martin Bröring, Sebastian Laass, Elisabeth Härtig, et Dieter Jahn. 2017. « Heme and Nitric Oxide Binding by the Transcriptional Regulator DnrF from the Marine Bacterium *Dinoroseobacter shibae* Increases *napD* Promoter Affinity ». *Journal of Biological Chemistry* 292 (37): 15468-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798728>.

- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2016a. « Risks for Public Health Related to the Presence of *Bacillus cereus* and Other *Bacillus spp.* Including *Bacillus thuringiensis* in Foodstuffs ». *EFSA Journal* 14 (7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2016b. « Risks for Public Health Related to the Presence of *Bacillus cereus* and Other *Bacillus spp.* Including *Bacillus thuringiensis* in Foodstuffs ». *EFSA Journal* 14 (7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4524>.
- Ehling-Schulz, Monika, Elrike Frenzel, et Michel Gohar. 2015. « Food–bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus* ». *Frontiers in Microbiology* 6 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00704>.
- Ehling-Schulz, Monika, Martina Fricker, Harald Grallert, Petra Rieck, Martin Wagner, et Siegfried Scherer. 2006. « Cereulide Synthetase Gene Cluster from Emetic *Bacillus cereus* : Structure and Location on a Mega Virulence Plasmid Related to *Bacillus anthracis* Toxin Plasmid PXO ». *BMC Microbiology*, 11.
- Ehling-Schulz, Monika, Martina Fricker, et Siegfried Scherer. 2004. « *Bacillus cereus*, the Causative Agent of an Emetic Type of Food-Borne Illness ». *Molecular Nutrition & Food Research* 48 (7): 479-87. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200400055>.
- Ekworomadu, MarCia T., Catherine B. Poor, Cedric P. Owens, Miriam A. Balderas, Marian Fabian, John S. Olson, Frank Murphy, *et al.*, 2012. « Differential Function of Lip Residues in the Mechanism and Biology of an Anthrax Hemophore ». Édité par Ralph R. Isberg. *PLoS Pathogens* 8 (3): e1002559. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002559>.
- Ellermann, Melissa, et Janelle C. Arthur. 2017. « Siderophore-Mediated Iron Acquisition and Modulation of Host-Bacterial Interactions ». *Free Radical Biology and Medicine* 105 (avril): 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.489>.
- Emmert-Buck, Michael R, Robert F Bonner, Paul D Smith, Rodrigo F Chuaqui, Zhengping Zhuang, Seth R Goldstein, Rhonda A Weiss, et Lance A Liotta. 1996. « Laser Capture Microdissection ». *Science* 274: 4.
- Espina, Virginia, Julia D Wulfkuhle, Valerie S Calvert, Amy VanMeter, Weidong Zhou, George Coukos, David H Geho, Emanuel F Petricoin, et Lance A Liotta. 2006. « Laser-Capture Microdissection ». *Nature Protocols* 1 (2): 586-603. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.85>.
- Ezraty, Benjamin, Alexandra Gennaris, Frédéric Barras, et Jean-François Collet. 2017. « Oxidative Stress, Protein Damage and Repair in Bacteria ». *Nature Reviews Microbiology* 15 (7): 385-96. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>.
- Fabian, Marian, Elena Solomaha, John S. Olson, et Anthony W. Maresso. 2009. « Heme Transfer to the Bacterial Cell Envelope Occurs via a Secreted Hemophore in the Gram-Positive Pathogen *Bacillus anthracis* ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (46): 32138-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040915>.
- Fagerlund, Annette, et Simon P Hardy. 2008. « *Bacillus cereus* Nhe Is a Pore-Forming Toxin with Structural and Functional Properties Similar to the ClyA (HlyE, SheA) Family of Haemolysins, Able to Induce Osmotic Lysis in Epithelia ». *Microbiology* 154 (3) : 693-704. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/014134-0>.
- Fagerlund, Annette, Toril Lindbäck, et Per Einar Granum. 2010. « *Bacillus cereus* Cytotoxins Hbl, Nhe and CytK Are Secreted via the Sec Translocation Pathway ». *BMC Microbiology* 10 (1): 304. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-304>.

- Fedhila, S., C. Buisson, O. Dussurget, P. Serror, I.J. Glomski, P. Liehl, D. Lereclus, et C. Nielsen-LeRoux. 2010. « Comparative Analysis of the Virulence of Invertebrate and Mammalian Pathogenic Bacteria in the Oral Insect Infection Model *Galleria mellonella* ». *Journal of Invertebrate Pathology* 103 (1): 24-29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.09.005>.
- Fedhila, S., M. Gohar, L. Slamti, P. Nel, et D. Lereclus. 2003. « The *Bacillus thuringiensis* PlcR-Regulated Gene *inhA2* Is Necessary, but Not Sufficient, for Virulence ». *Journal of Bacteriology* 185 (9): 2820-25. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2820-2825.2003>.
- Fedhila, S., P. Nel, et D. Lereclus. 2002. « The *InhA2* Metalloprotease of *Bacillus thuringiensis* Strain 407 Is Required for Pathogenicity in Insects Infected via the Oral Route ». *Journal of Bacteriology* 184 (12): 3296-3304. <https://doi.org/10.1128/JB.184.12.3296-3304.2002>.
- Fedhila, Sinda, Nadine Daou, Didier Lereclus, et Christina Nielsen-LeRoux. 2006. « Identification of *Bacillus cereus* Internalin and Other Candidate Virulence Genes Specifically Induced during Oral Infection in Insects: *Bacillus cereus* Internalin ». *Molecular Microbiology* 62 (2): 339-55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05362.x>.
- Ferguson, A. D., E. Hofmann, J. W. Coulton, K. Diederichs, et W. Welte. 1998. « Siderophore-Mediated Iron Transport: Crystal Structure of FhuA with Bound Lipopolysaccharide ». *Science* 282 (5397): 2215-20. <https://doi.org/10.1126/science.282.5397.2215>.
- Fillat, María F. 2014. « The FUR (Ferric Uptake Regulator) Superfamily: Diversity and Versatility of Key Transcriptional Regulators ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 546 (mars): 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.01.029>.
- Finazzi, Dario, et Paolo Arosio. 2014. « Biology of Ferritin in Mammals: An Update on Iron Storage, Oxidative Damage and Neurodegeneration ». *Archives of Toxicology* 88 (10): 1787-1802. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1329-0>.
- Ford, G. C., P. M. Harrison, D. W. Rice, J. M. A. Smith, A. Treffry, J. L. White, et J. Yariv. 1984. « Ferritin: Design and Formation of an Iron-Storage Molecule ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 304 (1121): 551-65. <https://doi.org/10.1098/rstb.1984.0046>.
- Fournier, Clémence, Ann Smith, et Philippe Delepelaire. 2011. « Haem Release from Haemopexin by HxuA Allows *Haemophilus influenzae* to Escape Host Nutritional Immunity: HxuA Releases Haem from Haemopexin ». *Molecular Microbiology* 80 (1): 133-48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07562.x>.
- Frenzel, Elrike, Viktoria Doll, Matthias Pauthner, Genia Lücking, Siegfried Scherer, et Monika Ehling-Schulz. 2012. « CodY Orchestrates the Expression of Virulence Determinants in Emetic *Bacillus cereus* by Impacting Key Regulatory Circuits: CodY Modulates Virulence of *Bacillus cereus* ». *Molecular Microbiology* 85 (1): 67-88. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08090.x>.
- Friedman, David B., Devin L. Stauff, Gleb Pishchany, Corbin W. Whitwell, Victor J. Torres, et Eric P. Skaar. 2006. « *Staphylococcus aureus* Redirects Central Metabolism to Increase Iron Availability ». *PLoS Pathogens* 2 (8): e87. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020087>.
- Fu, Yue, Kevin E. Bruce, Hongwei Wu, et David P. Giedroc. 2016. « The S2 Cu(I) Site in CupA from *Streptococcus pneumoniae* Is Required for Cellular Copper Resistance ». *Metallomics* 8 (1): 61-70. <https://doi.org/10.1039/C5MT00221D>.

- Fukushima, T., A. K. Sia, B. E. Allred, R. Nichiporuk, Z. Zhou, U. N. Andersen, et K. N. Raymond. 2012. « *Bacillus cereus* Iron Uptake Protein Fishes out an Unstable Ferric Citrate Trimer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (42): 16829-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210131109>.
- Fukushima, Tatsuya, Benjamin E. Allred, et Kenneth N. Raymond. 2014. « Direct Evidence of Iron Uptake by the Gram-Positive Siderophore-Shuttle Mechanism without Iron Reduction ». *ACS Chemical Biology* 9 (9): 2092-2100. <https://doi.org/10.1021/cb500319n>.
- Fukushima, Tatsuya, Benjamin E. Allred, Allyson K. Sia, Rita Nichiporuk, Ulla N. Andersen, et Kenneth N. Raymond. 2013a. « Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (34): 13821-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304235110>.
- Fukushima, Tatsuya, Benjamin E. Allred, Allyson K. Sia, Rita Nichiporuk, Ulla N. Andersen, et Kenneth N. Raymond. 2013b. « Gram-positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (34): 13821-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304235110>.
- Furrer, Jason L., Douglas N. Sanders, India G. Hook-Barnard, et Mark A. McIntosh. 2002. « Export of the Siderophore Enterobactin in *Escherichia coli*: Involvement of a 43 KDa Membrane Exporter: Enterobactin Secretion ». *Molecular Microbiology* 44 (5): 1225-34. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02885.x>.
- Galet, Justine, Aurélie Deveau, Laurence Hôtel, Pascale Frey-Klett, Pierre Leblond, et Bertrand Aigle. 2015. « *Pseudomonas fluorescens* Pirates Both Ferrioxamine and Ferricoelichelin Siderophores from *Streptomyces ambofaciens* ». Édité par F. E. Löffler. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (9): 3132-41. <https://doi.org/10.1128/AEM.03520-14>.
- Ganz, Tomas. 2009. « Iron in Innate Immunity: Starve the Invaders ». *Current Opinion in Immunology* 21 (1): 63-67. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.011>.
- Garcia-Garcia, Transito, Sandrine Poncet, Abderahmane Derouiche, Lei Shi, Ivan Mijakovic, et Marie-Françoise Noirot-Gros. 2016. « Role of Protein Phosphorylation in the Regulation of Cell Cycle and DNA-Related Processes in Bacteria ». *Frontiers in Microbiology* 7:184 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00184>.
- Garner, Bianca, Elrica Brown, Martha Taplin, Angel Garcia, et Baracka Williams-Mapp. 2016. « Transferrin Impacts *Bacillus thuringiensis* Biofilm Levels ». *BioMed Research International* 2016: 1-7. <https://doi.org/10.1155/2016/3628268>.
- Gassmann, A. J., J. L. Petzold-Maxwell, E. H. Clifton, M. W. Dunbar, A. M. Hoffmann, D. A. Ingber, et R. S. Keweshan. 2014. « Field-Evolved Resistance by Western Corn Rootworm to Multiple *Bacillus thuringiensis* Toxins in Transgenic Maize ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (14): 5141-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317179111>.
- Gat, Orit, Galia Zaide, Izhak Inbar, Haim Grosfeld, Theodor Chitlaru, Haim Levy, et Avigdor Shafferman. 2008. « Characterization of *Bacillus anthracis* Iron-Regulated Surface Determinant (Isd) Proteins Containing NEAT Domains ». *Molecular Microbiology*, novembre. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06460.x>.

- Gaudin, Catherine F. M., Jason C. Grigg, Angelé L. Arrieta, et Michael E. P. Murphy. 2011. « Unique Heme-Iron Coordination by the Hemoglobin Receptor IsdB of *Staphylococcus aureus* ». *Biochemistry* 50 (24): 5443-52. <https://doi.org/10.1021/bi200369p>.
- Giardine, Belinda, Joseph Borg, Douglas R Higgs, Kenneth R Peterson, Sjaak Philipsen, Donna Maglott, Belinda K Singleton, *et al.*, 2011. « Systematic Documentation and Analysis of Human Genetic Variation in Hemoglobinopathies Using the Microattribution Approach ». *Nature Genetics* 43 (4): 295-301. <https://doi.org/10.1038/ng.785>.
- Gillis, Annika, et Jacques Mahillon. 2014. « Phages Preying on *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: Past, Present and Future ». *Viruses* 6 (7): 2623-72. <https://doi.org/10.3390/v6072623>.
- Gilmore, M S, A L Cruz-Rodz, M Leimeister-Wächter, J Kreft, et W Goebel. 1989. « A *Bacillus cereus* Cytolytic Determinant, Cereolysin AB, Which Comprises the Phospholipase C and Sphingomyelinase Genes: Nucleotide Sequence and Genetic Linkage. » *Journal of Bacteriology* 171 (2): 744-53. <https://doi.org/10.1128/jb.171.2.744-753.1989>.
- Glasset, Benjamin, Sabine Herbin, Sophie A. Granier, Laurent Cavalié, Emilie Lafeuille, Cyprien Guérin, Raymond Ruimy, *et al.*, 2018. « *Bacillus cereus*, a Serious Cause of Nosocomial Infections: Epidemiologic and Genetic Survey ». Édité par Theresa M. Koehler. *PLOS ONE* 13 (5): e0194346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194346>.
- Glasset, Benjamin, Sabine Herbin, Laurent Guillier, Sabrina Cadel-Six, Marie-Léone Vignaud, Joel Grout, Sylvie Pairaud, *et al.*, 2016. « *Bacillus cereus*-Induced Food-Borne Outbreaks in France, 2007 to 2014: Epidemiology and Genetic Characterisation ». *Eurosurveillance* 21 (48). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.48.30413>.
- Gleixner, Eva, Fabian Ripp, Thomas A. Gorr, Reinhard Schuh, Christian Wolf, Thorsten Burmester, et Thomas Hankeln. 2016. « Knockdown of *Drosophila* Hemoglobin Suggests a Role in O₂ Homeostasis ». *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 72: 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2016.03.004>.
- Gnandt, Emmanuel, Katerina Dörner, Marc F.J. Strampraad, Simon de Vries, et Thorsten Friedrich. 2016. « The Multitude of Iron-Sulfur Clusters in Respiratory Complex I ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857 (8): 1068-72. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.02.018>.
- Gohar, Michel, Karoline Faegri, Stephane Perchat, Solveig Ravnum, Ole Andreas Okstad, Myriam Gominet, Anne-Brit Kolsto, et Didier Lereclus. 2008. « The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus* ». *PLoS One* 3 (7): e2793.
- Gominet, Myriam, Leyla Slamti, Nathalie Gilois, Matthias Rose, et Didier Lereclus. 2001. « Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* *plcR* regulon and for virulence ». *Molecular microbiology* 40 (4): 963-975.
- Gomme, Peter T., Karl B. McCann, et Joseph Bertolini. 2005. « Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions ». *Drug discovery today* 10 (4): 267-273.
- Grigg, Jason C., Christie L. Vermeiren, David E. Heinrichs, et Michael E. P. Murphy. 2007. « Heme Coordination by *Staphylococcus aureus* IsdE ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (39): 28815-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704602200>.
- Gros, G., B. A. Wittenberg, et T. Jue. 2010. « Myoglobin's Old and New Clothes: From Molecular Structure to Function in Living Cells ». *Journal of Experimental Biology* 213 (16): 2713-25. <https://doi.org/10.1242/jeb.043075>.

- Guérin, Alizée, Helene Thorsen Rønning, Claire Dargaignaratz, Thierry Clavel, Véronique Broussolle, Jacques Mahillon, Per Einar Granum, et Christophe Nguyen-The. 2017. « Cereulide Production by *Bacillus weihenstephanensis* Strains during Growth at Different PH Values and Temperatures ». *Food Microbiology* 65 (août): 130-35. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.02.006>.
- Guillemet, E., C. Cadot, S.-L. Tran, M.-H. Guinebretiere, D. Lereclus, et N. Ramarao. 2010. « The InhA Metalloproteases of *Bacillus Cereus* Contribute Concomitantly to Virulence ». *Journal of Bacteriology* 192 (1): 286-94. <https://doi.org/10.1128/JB.00264-09>.
- Guillemet, Elisabeth, Seav-Ly Tran, Céline Cadot, Didier Rognan, Didier Lereclus, et Nalini Ramarao. 2013. « Glucose 6P Binds and Activates HlyIIR to Repress *Bacillus Cereus* Haemolysin HlyII Gene Expression ». Édité par Willem van Schaik. *PLoS ONE* 8 (2): e55085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055085>.
- Guinebretière, Marie-Hélène, Fabiano L. Thompson, Alexei Sorokin, Philippe Normand, Peter Dawyndt, Monika Ehling-Schulz, Birgitta Svensson, *et al.*, 2008. « Ecological Diversification in the *Bacillus Cereus* Group ». *Environmental Microbiology* 10 (4): 851-65. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01495.x>.
- Guinebretiere, M.-H., S. Auger, N. Galleron, M. Contzen, B. De Sarrau, M.-L. De Buyser, G. Lamberet, *et al.*, 2013. « *Bacillus cytotoxicus* Sp. Nov. Is a Novel Thermotolerant Species of the *Bacillus cereus* Group Occasionally Associated with Food Poisoning ». *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 63 (Pt 1): 31-40. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.030627-0>.
- Gunshin, Hiromi, Bryan Mackenzie, Urs V. Berger, Yoshimi Gunshin, Michael F. Romero, Walter F. Boron, Stephan Nussberger, John L. Gollan, et Matthias A. Hediger. 1997. « Cloning and Characterization of a Mammalian Proton-Coupled Metal-Ion Transporter ». *Nature* 388 (6641): 482-88. <https://doi.org/10.1038/41343>.
- Hankeln, Thomas, Viviane Jaenicke, Laurent Kiger, Sylvia Dewilde, Guy Ungerechts, Marc Schmidt, Joachim Urban, Michael C. Marden, Luc Moens, et Thorsten Burmester. 2002. « Characterization of *Drosophila* Hemoglobin: EVIDENCE FOR HEMOGLOBIN-MEDIATED RESPIRATION IN INSECTS ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (32): 29012-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204009200>.
- Hankeln, Thomas, Sabine Klawitter, Melanie Krämer, et Thorsten Burmester. 2006. « Molecular Characterization of Hemoglobin from the Honeybee *Apis mellifera* ». *Journal of Insect Physiology* 52 (7): 701-10. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.03.010>.
- Hannauer, M., Y. Barda, G. L. A. Mislin, A. Shanzer, et I. J. Schalk. 2010. « The Ferrichrome Uptake Pathway in *Pseudomonas aeruginosa* Involves an Iron Release Mechanism with Acylation of the Siderophore and Recycling of the Modified Desferrichrome ». *Journal of Bacteriology* 192 (5): 1212-20. <https://doi.org/10.1128/JB.01539-09>.
- Hardy, Simon P, Terje Lund, et Per Einar Granum. 2001. « CytK Toxin of *Bacillus cereus* Forms Pores in Planar Lipid Bilayers and Is Cytotoxic to Intestinal Epithelia ». *FEMS Microbiology Letters* 197 (1): 47-51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10581.x>.
- Harrison, Pauline M., et Paolo Arosio. 1996. « The Ferritins: Molecular Properties, Iron Storage Function and Cellular Regulation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1275 (3): 161-203. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00022-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00022-9).

- Harvie, D. R. 2005. « *Bacillus cereus* Fur Regulates Iron Metabolism and Is Required for Full Virulence ». *Microbiology* 151 (2): 569-77. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27744-0>.
- Harvie, Duncan R., et David J. Ellar. 2005. « A Ferric Dicitrate Uptake System Is Required for the Full Virulence of *Bacillus cereus* ». *Current Microbiology* 50 (5): 246-50. <https://doi.org/10.1007/s00284-004-4442-0>.
- Haydar, Abbass, Seav-Ly Tran, Elisabeth Guillemet, Claire Darrigo, Stéphane Perchat, Didier Lereclus, Laurent Coquet, Thierry Jouenne, et Nalini Ramarao. 2018. « InhA1-Mediated Cleavage of the Metalloprotease NprA Allows *Bacillus cereus* to Escape From Macrophages ». *Frontiers in Microbiology* 9 (mai). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01063>.
- Hayrapetyan, Hasmik, Roland Siezen, Tjakko Abee, et Masja Nierop Groot. 2016. « Comparative Genomics of Iron-Transporting Systems in *Bacillus cereus* Strains and Impact of Iron Sources on Growth and Biofilm Formation ». *Frontiers in Microbiology* 7 (juin). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00842>.
- Heckel, D. G. 2012. « Insecticide Resistance After Silent Spring ». *Science* 337 (6102): 1612-14. <https://doi.org/10.1126/science.1226994>.
- Hegedus, Dwayne, Martin Erlandson, Cedric Gillott, et Umut Toprak. 2009. « New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function ». *Annual Review of Entomology* 54 (1): 285-302. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090559>.
- Helgason, E., N. J. Tourasse, R. Meisal, D. A. Caugant, et A.-B. Kolsto. 2004. « Multilocus Sequence Typing Scheme for Bacteria of the *Bacillus cereus* Group ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (1): 191-201. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.191-201.2004>.
- Helgason, Erlendur, Dominique A Caugant, Ingar Olsen, et Anne-Brit Kolstø. 2000. « Genetic Structure of Population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* Isolates Associated with Periodontitis and Other Human Infections ». *J. CLIN. MICROBIOL.* 38: 8.
- Hentze, Matthias W., Martina U. Muckenthaler, Bruno Galy, et Clara Camaschella. 2010. « Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism ». *Cell* 142 (1): 24-38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.028>.
- Hickman, Samuel J., Rachael E. M. Cooper, Luca Bellucci, Emanuele Paci, et David J. Brockwell. 2017. « Gating of TonB-Dependent Transporters by Substrate-Specific Forced Remodelling ». *Nature Communications* 8 (avril): 14804. <https://doi.org/10.1038/ncomms14804>.
- Hill, K. K., L. O. Ticknor, R. T. Okinaka, M. Asay, H. Blair, K. A. Bliss, M. Laker, et al., 2004. « Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* Isolates ». *Applied and Environmental Microbiology* 70 (2): 1068-80. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.1068-1080.2004>.
- Hintze, K. J., et E. C. Theil. 2005. « DNA and mRNA Elements with Complementary Responses to Hemin, Antioxidant Inducers, and Iron Control Ferritin-L Expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (42): 15048-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505148102>.
- Honsa, Erin S., Anthony W. Maresso, et Sarah K. Highlander. 2014. « Molecular and Evolutionary Analysis of NEAr-Iron Transporter (NEAT) Domains ». Édité par Ivo G. Boneca. *PLoS ONE* 9 (8): e104794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104794>.

- Honsa, Erin Sarah, et Anthony William Maresso. 2011. « Mechanisms of Iron Import in Anthrax ». *BioMetals* 24 (3): 533-45. <https://doi.org/10.1007/s10534-011-9413-x>.
- Hooper, L. 2004. « Laser Microdissection: Exploring Host–Bacterial Encounters at the Front Lines ». *Current Opinion in Microbiology* 7 (3): 290-95. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.04.004>.
- Hoton, Florence M., Nadine Fornelos, Elise N'Guessan, Xiaomin Hu, Izabela Swiecicka, Katelijne Dierick, Elina Jääskeläinen, Mirja Salkinoja-Salonen, et Jacques Mahillon. 2009. « Family Portrait of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* Cereulide-Producing Strains ». *Environmental Microbiology Reports* 1 (3): 177-83. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00028.x>.
- Hotta, K., C.-Y. Kim, D. T. Fox, et A. T. Koppisch. 2010. « Siderophore-Mediated Iron Acquisition in *Bacillus anthracis* and Related Strains ». *Microbiology* 156 (7): 1918-25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.039404-0>.
- Hu, X., G. Van der Auwera, S. Timmerly, L. Zhu, et J. Mahillon. 2009. « Distribution, Diversity, and Potential Mobility of Extrachromosomal Elements Related to the *Bacillus anthracis* PX01 and PX02 Virulence Plasmids ». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (10): 3016-28. <https://doi.org/10.1128/AEM.02709-08>.
- Hüttemann, Maik, Stefan Helling, Thomas H. Sanderson, Christopher Sinkler, Lobelia Samavati, Gargi Mahapatra, Ashwathy Varughese, *et al.*, 2012. « Regulation of Mitochondrial Respiration and Apoptosis through Cell Signaling: Cytochrome c Oxidase and Cytochrome c in Ischemia/Reperfusion Injury and Inflammation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817 (4): 598-609. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2011.07.001>.
- Ivanova, Natalia, Alexei Sorokin, Iain Anderson, Nathalie Galleron, Benjamin Candelon, Vinayak Kapatral, Anamitra Bhattacharyya, Gary Reznik, Natalia Mikhailova, et Alla Lapidus. 2003. « Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis* ». *Nature* 423 (6935): 87.
- Izadi-Pruneyre, Nadia, Frédéric Huché, Gudrun S. Lukat-Rodgers, Anne Lecroisey, Robert Gilli, Kenton R. Rodgers, Cécile Wandersman, et Philippe Delepelaire. 2006. « The Heme Transfer from the Soluble HasA Hemophore to Its Membrane-Bound Receptor HasR Is Driven by Protein-Protein Interaction from a High to a Lower Affinity Binding Site ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (35): 25541-50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603698200>.
- Jacobs, T., M.D. Cima-Cabal, A. Darji, F.J. Méndez, F. Vázquez, A.A.C. Jacobs, Y. Shimada, Y. Ohno-Iwashita, S. Weiss, et Juan R. de los Toyos. 1999. « The Conserved Undecapeptide Shared by Thiol-Activated Cytolysins Is Involved in Membrane Binding ». *FEBS Letters* 459 (3): 463-66. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01297-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01297-1).
- Jeney, V. 2002. « Pro-Oxidant and Cytotoxic Effects of Circulating Heme ». *Blood* 100 (3): 879-87. <https://doi.org/10.1182/blood.V100.3.879>.
- Jiménez, Guillermo, Mercedes Urdiain, Ana Cifuentes, Aránzazu López-López, Anicet R. Blanch, Javier Tamames, Peter Kämpfer, *et al.*, 2013. « Description of *Bacillus toyonensis* Sp. Nov., a Novel Species of the *Bacillus cereus* Group, and Pairwise Genome Comparisons of the Species of the Group by Means of ANI Calculations ». *Systematic and Applied Microbiology* 36 (6): 383-91. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.04.008>.

- Johnson, Zaiga, Urs A. Ochsner, et Michael L. Vasil. 2000. « Genetics and Regulation of Two Distinct Haem-Uptake Systems, Phu and Has, in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Microbiology* 146 (1): 185-98. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-1-185>.
- Jordan, L. D., Y. Zhou, C. R. Smallwood, Y. Lill, K. Ritchie, W. T. Yip, S. M. Newton, et P. E. Klebba. 2013. « Energy-Dependent Motion of TonB in the Gram-Negative Bacterial Inner Membrane ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (28): 11553-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304243110>.
- Joseph, P., M. Ratnayake-Lecamwasam, et A. L. Sonenshein. 2005. « A Region of *Bacillus subtilis* CodY Protein Required for Interaction with DNA ». *Journal of Bacteriology* 187 (12): 4127-39. <https://doi.org/10.1128/JB.187.12.4127-4139.2005>.
- Kafina, Martin D., et Barry H. Paw. 2017. « Intracellular Iron and Heme Trafficking and Metabolism in Developing Erythroblasts ». *Metallomics* 9 (9): 1193-1203. <https://doi.org/10.1039/C7MT00103G>.
- Karas, Vlad O., Ilja Westerlaken, et Anne S. Meyer. 2015. « The DNA-Binding Protein from Starved Cells (Dps) Utilizes Dual Functions To Defend Cells against Multiple Stresses ». Édité par R. L. Gourse. *Journal of Bacteriology* 197 (19): 3206-15. <https://doi.org/10.1128/JB.00475-15>.
- Kawaoka, Shinpei, Susumu Katsuma, Yan Meng, Nobumitsu Hayashi, Kazuei Mita, et Toru Shimada. 2009. « Identification and Characterization of Globin Genes from Two Lepidopteran Insects, *Bombyx mori* and *Samia Cynthia ricini* ». *Gene* 431 (1-2): 33-38. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.11.004>.
- Keim, P, A Kalif, J Schupp, K Hill, S E Travis, K Richmond, D M Adair, M Hugh-Jones, C R Kuske, et P Jackson. 1997. « Molecular Evolution and Diversity in *Bacillus anthracis* as Detected by Amplified Fragment Length Polymorphism Markers. » *Journal of Bacteriology* 179 (3): 818-24. <https://doi.org/10.1128/jb.179.3.818-824.1997>.
- Keim, Paul, Jeffrey M. Gruendike, Alexandra M. Klevytska, James M. Schupp, Jean Challacombe, et Richard Okinaka. 2009. « The Genome and Variation of *Bacillus anthracis* ». *Molecular Aspects of Medicine* 30 (6): 397-405. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2009.08.005>.
- Kepp, Kasper Planeta. 2017. « Heme: From Quantum Spin Crossover to Oxygen Manager of Life ». *Coordination Chemistry Reviews* 344 (août): 363-74. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.08.008>.
- Kim, Beom Su, Chang Seok Lee, Ji Yeon Seol, Chi Young Yun, et Hak R. Kim. 2002. « Cloning and Expression of 32 KDa Ferritin From *Galleria mellonella* ». *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 51 (2): 80-90. <https://doi.org/10.1002/arch.10050>.
- Kim, Beom Su, Chang Seok Lee, Chi Young Yun, Sung Moon Yeo, Won Mock Park, et Hak R. Kim. 2001. « Characterization and immunological analysis of ferritin from the hemolymph of *Galleria mellonella* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 129 (2): 501-509.
- Kim, Bo Yeon, Kwang Sik Lee, Hyung Joo Yoon, Iksoo Kim, Jianhong Li, Hung Dae Sohn, et Byung Rae Jin. 2009. « Expression Profile of the Iron-Binding Proteins Transferrin and Ferritin Heavy Chain Subunit in the Bumblebee *Bombus ignitus* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 153 (2): 165-70. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2009.02.014>.
- Kim, H., H. Lee, et D. Shin. 2013. « The FeoC Protein Leads to High Cellular Levels of the Fe(II) Transporter FeoB by Preventing FtsH Protease Regulation of FeoB in *Salmonella enterica* ». *Journal of Bacteriology* 195 (15): 3364-70. <https://doi.org/10.1128/JB.00343-13>.

- Kim, Hyung J., Oleh Khalimonchuk, Pamela M. Smith, et Dennis R. Winge. 2012. « Structure, Function, and Assembly of Heme Centers in Mitochondrial Respiratory Complexes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823 (9): 1604-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.008>.
- Kim, Hyunkeun, Hwiseop Lee, et Dongwoo Shin. 2012. « The FeoA Protein Is Necessary for the FeoB Transporter to Import Ferrous Iron ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 423 (4): 733-38. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.027>.
- Knippel, Reece J., Joseph P. Zackular, Jessica L. Moore, Arianna I. Celis, Andy Weiss, M. Kay Washington, Jennifer L. DuBois, Richard M. Caprioli, et Eric P. Skaar. 2018. « Heme Sensing and Detoxification by HatRT Contributes to Pathogenesis during *Clostridium difficile* Infection ». Édité par Theresa M. Koehler. *PLOS Pathogens* 14 (12): e1007486. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007486>.
- Knowles, Barbara H, et David J Ellar. 1987. « Colloid-Osmotic lysis Is a General Feature of the Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins with Different Insect Specificity ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 924: 507-18.
- Kong, Hyun Gi, Hyun Ho Kim, Joon-hui Chung, JeHoon Jun, Soohyun Lee, Hak-Min Kim, Sungwon Jeon, Seung Gu Park, Jong Bhak, et Choong-Min Ryu. 2019. « The *Galleria mellonella* Hologenome Supports Microbiota-Independent Metabolism of Long-Chain Hydrocarbon Beeswax ». *Cell Reports* 26 (9): 2451-2464.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.018>.
- Koppisch, Andrew T., Cindy C. Browder, Amanda L. Moe, Jacob T. Shelley, Blaine A. Kinkel, Larry E. Hersman, Srinivas Iyer, et Christy E. Ruggiero. 2005. « Petrobactin Is the Primary Siderophore Synthesized by *Bacillus anthracis* Str. Sterne under Conditions of Iron Starvation ». *BioMetals* 18 (6): 577-85. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-1782-6>.
- Koster, Wolfgang. 2005. « Cytoplasmic Membrane Iron Permease Systems in the Bacterial Cell Envelope ». *Frontiers in Bioscience* 10 (1-3): 462. <https://doi.org/10.2741/1542>.
- Krishna Kumar, Kaavya, David A. Jacques, Gleb Pishchany, Tom Caradoc-Davies, Thomas Spirig, G. Reza Malmirchegini, David B. Langley, et al., 2011. « Structural Basis for Hemoglobin Capture by *Staphylococcus aureus* Cell-Surface Protein, IsdH ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (44): 38439-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.287300>.
- Kronstad, James W, et H R Whiteley. 1984. « Inverted Repeat Sequences Flank a *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Gene ». *J. BACTERIOL.* 160: 8.
- Kumar, Ankit, Anil Prakash, et B. N. Johri. 2011. « *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem ». In *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*, édité par Dinesh K. Maheshwari, 37-59. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2.
- Kumar, Nikhil, Mingqun Lin, Xuechu Zhao, Sandra Ott, Ivette Santana-Cruz, Sean Daugherty, Yasuko Rikihisa, et al., 2016. « Efficient Enrichment of Bacterial mRNA from Host-Bacteria Total RNA Samples ». *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep34850>.
- Kumar, Nitin, Alessandra Astegno, Jian Chen, Alejandro Giorgetti, et Paola Dominici. 2016. « Residues in the Distal Heme Pocket of *Arabidopsis* Non-Symbiotic Hemoglobins: Implication for Nitrite Reductase Activity ». *International Journal of Molecular Sciences* 17 (5): 640. <https://doi.org/10.3390/ijms17050640>.

- Kumar, Ritesh, Scott Lovell, Hirotohi Matsumura, Kevin P. Battaile, Pierre Moënne-Loccoz, et Mario Rivera. 2013. « The Hemophore HasA from *Yersinia pestis* (HasA_{yp}) Coordinates Hemin with a Single Residue, Tyr75, and with Minimal Conformational Change ». *Biochemistry* 52 (16): 2705-7. <https://doi.org/10.1021/bi400280z>.
- Kunkle, C. A., et M. P. Schmitt. 2003. « Analysis of the *Corynebacterium diphtheriae* DtxR Regulon: Identification of a Putative Siderophore Synthesis and Transport System That Is Similar to the *Yersinia* High-Pathogenicity Island-Encoded Yersiniabactin Synthesis and Uptake System ». *Journal of Bacteriology* 185 (23): 6826-40. <https://doi.org/10.1128/JB.185.23.6826-6840.2003>.
- Kupke, Thomas, Max Lechner, Georg Kaim, et Friedrich Gotz. 1989. « Improved Purification and Biochemical Properties of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C from *Bacillus thuringiensis* ». *European Journal of Biochemistry* 185 (1): 151-55. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15096.x>.
- Kupz, Andreas, André Fischer, Dietrich H. Nies, Gregor Grass, Ulf B. Göbel, Stefan Bereswill, et Markus M. Heimesaat. 2013. « Impact of Metal Ion Homeostasis of Genetically Modified *Escherichia coli* Nissle 1917 and K12 (W3110) Strains on Colonization Properties in the Murine Intestinal Tract ». *European Journal of Microbiology and Immunology* 3 (3): 229-35. <https://doi.org/10.1556/EuJMI.3.2013.3.12>.
- Kuypers, Jane, et Keith R. Jerome. 2017. « Applications of Digital PCR for Clinical Microbiology ». Édité par Colleen Suzanne Kraft. *Journal of Clinical Microbiology* 55 (6): 1621-28. <https://doi.org/10.1128/JCM.00211-17>.
- Lambert, Bart, et Marnix Peferoen. 1992. « Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis* ». *BioScience* 42 (2): 112-22. <https://doi.org/10.2307/1311652>.
- Lapidus, Alla, Eugene Goltsman, Sandrine Auger, Nathalie Galleron, Béatrice Ségurens, Carole Dossat, Miriam L. Land, et al., 2008. « Extending the *Bacillus cereus* Group Genomics to Putative Food-Borne Pathogens of Different Toxicity ». *Chemico-Biological Interactions* 171 (2): 236-49. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.03.003>.
- Lau, Cheryl K. Y., Karla D. Krewulak, et Hans J. Vogel. 2016. « Bacterial Ferrous Iron Transport: The Feo System ». Édité par Wilbert Bitter. *FEMS Microbiology Reviews* 40 (2): 273-98. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv049>.
- Lavelle, A, G Lennon, O O'Sullivan, N Docherty, A Balfe, A Maguire, H E Mulcahy, et al., 2015. « Spatial Variation of the Colonic Microbiota in Patients with Ulcerative Colitis and Control Volunteers ». *Gut* 64 (10): 1553-61. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307873>.
- Le Monde. 2018. « Anthrax dans les Hautes-Alpes : un syndicat agricole porte plainte contre X ». 2018. https://www.lemonde.fr/sante/article/2018/08/23/anthrax-dans-les-hautes-alpes-un-syndicat-agricole-porte-plainte-pour-connaître-la-verité_5345548_1651302.html.
- Lechner, M., T. Kupke, S. Stefanovic, et F. Götz. 1989. « Molecular Characterization and Sequence of Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C of *Bacillus thuringiensis* ». *Molecular Microbiology* 3 (5): 621-26. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00209.x>.

- Lechner, S., R. Mayr, K. P. Francis, B. M. PRUss, T. Kaplan, E. WIEssNER-GUNKEL, G. S. A. B. Stewart, et S. Scherer. 1998. « *Bacillus weihenstephanensis* Sp. Nov. Is a New Psychrotolerant Species of the *Bacillus cereus* Group ». *International Journal of Systematic Bacteriology* 48 (4): 1373-82. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-4-1373>.
- Lee, J. Y., B. K. Janes, K. D. Passalacqua, B. F. Pflieger, N. H. Bergman, H. Liu, K. Hakansson, et al., 2007. « Biosynthetic Analysis of the Petrobactin Siderophore Pathway from *Bacillus anthracis* ». *Journal of Bacteriology* 189 (5): 1698-1710. <https://doi.org/10.1128/JB.01526-06>.
- Lee, Jung Yeop, Karla D. Passalacqua, Philip C. Hanna, et David H. Sherman. 2011. « Regulation of Petrobactin and Bacillibactin Biosynthesis in *Bacillus anthracis* under Iron and Oxygen Variation ». Édité par Sarah K. Highlander. *PLoS ONE* 6 (6): e20777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020777>.
- Legrand, Dominique, et Joël Mazurier. 2010. « A Critical Review of the Roles of Host Lactoferrin in Immunity ». *BioMetals* 23 (3): 365-76. <https://doi.org/10.1007/s10534-010-9297-1>.
- Legres, Luc G, Anne Janin, Christophe Masselon, et Philippe Bertheau. s. d. « Beyond Laser Microdissection Technology: Follow the Yellow Brick Road for Cancer Research », 28.
- Lereclus, D, H Agaisse, M Gominet, S Salamitou, et V Sanchis. 1996. « Identification of a *Bacillus thuringiensis* Gene That Positively Regulates Transcription of the Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C Gene at the Onset of the Stationary Phase. » *Journal of Bacteriology* 178 (10): 2749-56. <https://doi.org/10.1128/jb.178.10.2749-2756.1996>.
- Lereclus, D., H. Agaisse, C. Grandvalet, S. Salamitou, et M. Gominet. 2000. « Regulation of Toxin and Virulence Gene Transcription in *Bacillus thuringiensis* ». *International Journal of Medical Microbiology* 290 (4-5): 295-99. [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80024-7](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80024-7).
- Lereclus, D, J Ribiert, A Klier, et G Menou. s. d. « A Transposon-like Structure Related to the δ -Endotoxin Gene of *Bacillus thuringiensis* », 7.
- Lereclus, Didier, Myriam Vallade, Josette Chaufaux, Olivia Arantes, et Sophie Rambaud. 1992. « Expansion of Insecticidal Host Range of *Bacillus thuringiensis* by *in vivo* Genetic Recombination ». *Bio/Technology* 10 (4): 418-21. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-418>.
- Létoffé, S, J M Ghigo, et C Wandersman. 1994. « Secretion of the *Serratia marcescens* HasA Protein by an ABC Transporter. » *Journal of Bacteriology* 176 (17): 5372-77. <https://doi.org/10.1128/jb.176.17.5372-5377.1994>.
- Levi, Sonia, Stephen J Yewdall, Ermanna Rovida, Alberto Albertini, et Paolo Arosio. 1992. « Evidence That H- and L-Chains Have Co-Operative Roles in the Iron-Uptake Mechanism of Human Ferritin » 288: 6.
- Lewis, L.A. 1998. « Transport of Intact Porphyrin by HpuAB, the Hemoglobin- Haptoglobin Utilization System of *Neisseria meningitidis* ». *J. BACTERIOL.* 180: 5.
- Lewis, L. A., M. Gipson, K. Hartman, T. Ownbey, J. Vaughn, et D. W. Dyer. 1999. « Phase Variation of HpuAB and HmbR, Two Distinct Haemoglobin Receptors of *Neisseria meningitidis* DNM2 ». *Molecular Microbiology* 32 (5): 977-89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01409.x>.
- Lindback, T. 2004. « Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe Enterotoxin ». *Microbiology* 150 (12): 3959-67. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27359-0>.

- Lindbäck, Toril, Maarten Mols, Coraline Basset, Per Einar Granum, Oscar P. Kuipers, et Ákos T. Kovács. 2012. « CodY, a Pleiotropic Regulator, Influences Multicellular Behaviour and Efficient Production of Virulence Factors in *Bacillus cereus*: Role of CodY of *B. Cereus* ». *Environmental Microbiology* 14 (8): 2233-46. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02766.x>.
- Liu, Xiaofeng, et Elizabeth C. Theil. 2005. « Ferritins: Dynamic Management of Biological Iron and Oxygen Chemistry ». *Accounts of Chemical Research* 38 (3): 167-75. <https://doi.org/10.1021/ar0302336>.
- Liu, Xiufeng, Mingshan Huang, Huijuan Zhang, Wei Li, Zhengyu Pang, Ping Lin, et Hua Qian. 2016. « Application of Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) in *Bacillus cereus* Typing ». *Int J Clin Exp Pathol* 9(9): 9497-9502. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/15718.7043>.
- Liu, Yang, Qiliang Lai, Markus Göker, Jan P. Meier-Kolthoff, Meng Wang, Yamin Sun, Lei Wang, et Zongze Shao. 2015. « Genomic Insights into the Taxonomic Status of the *Bacillus cereus* Group ». *Scientific Reports* 5 (1). <https://doi.org/10.1038/srep14082>.
- Liu, Yang, Qiliang Lai, et Zongze Shao. 2018. « Genome Analysis-Based Reclassification of *Bacillus weihenstephanensis* as a Later Heterotypic Synonym of *Bacillus mycoides* ». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68 (1): 106-12. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002466>.
- Llamas, M. A., M. Sparrius, R. Kloet, C. R. Jimenez, C. Vandenbroucke-Grauls, et W. Bitter. 2006. « The Heterologous Siderophores Ferrioxamine B and Ferrichrome Activate Signaling Pathways in *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Bacteriology* 188 (5): 1882-91. <https://doi.org/10.1128/JB.188.5.1882-1891.2006>.
- Locher, Kaspar P, Bernard Rees, Ralf Koebnik, Andre Mitschler, Luc Moulinier, Jurg P Rosenbusch, et Dino Moras. 1998. « Transmembrane Signaling across the Ligand-Gated FhuA Receptor: Crystal Structures of Free and Ferrichrome-Bound States Reveal Allosteric Changes », *Cell* 95: 771-778. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81700-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81700-6).
- Locke, Michael, et H Nichol. 1992. « Iron Economy in Insects: Transport, Metabolism, and Storage ». *Annual Review of Entomology* 37: 195-215.
- López, Ana C., Jessica Minnaard, Pablo F. Pérez, et Adriana M. Alippi. 2015. « A Case of Intoxication Due to a Highly Cytotoxic *Bacillus cereus* Strain Isolated from Cooked Chicken ». *Food Microbiology* 46 (avril): 195-99. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.005>.
- Lund, Terje, Marie-Laure De Buyser, et Per Einar Granum. 2000. « A New Cytotoxin from *Bacillus cereus* That May Cause Necrotic Enteritis ». *Molecular Microbiology* 38 (2): 254-61. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02147.x>.
- Lyu, Yan, Lidan Ye, Jun Xu, Xiaohong Yang, Weiwei Chen, et Hongwei Yu. 2016. « Recent Research Progress with Phospholipase C from *Bacillus cereus* ». *Biotechnology Letters* 38 (1): 23-31. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1962-6>.
- Malachowa, Natalia, et Frank R DeLeo. 2011. « *Staphylococcus aureus* Survival in Human Blood ». *Virulence* 2 (6): 567-69. <https://doi.org/10.4161/viru.2.6.17732>.
- Maresso, A. W., T. J. Chapa, et O. Schneewind. 2006. « Surface Protein IsdC and Sortase B Are Required for Heme-Iron Scavenging of *Bacillus anthracis* ». *Journal of Bacteriology* 188 (23): 8145-52. <https://doi.org/10.1128/JB.01011-06>.

- Marengo, Anthony W., Gabriella Garufi, et Olaf Schneewind. 2008. « *Bacillus anthracis* Secretes Proteins That Mediate Heme Acquisition from Hemoglobin ». Édité par Theresa Koehler. *PLoS Pathogens* 4 (8): e1000132. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000132>.
- Marlovits, Thomas C., Winfried Haase, Christian Herrmann, Stephen G. Aller, et Vinzenz M. Unger. 2002. « The Membrane Protein FeoB Contains an Intramolecular G Protein Essential for Fe(II) Uptake in Bacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (25): 16243-48.
- Marraffini, Luciano A., Hung Ton-That, Yinong Zong, Sthanam V. L. Narayana, et Olaf Schneewind. 2004. « Anchoring of Surface Proteins to the Cell Wall of *Staphylococcus aureus*: A CONSERVED ARGININE RESIDUE IS REQUIRED FOR EFFICIENT CATALYSIS OF SORTASE A ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (36): 37763-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405282200>.
- Martsev, S. P., A. P. Vlasov, et P. Arosio. 1998. « Distinct Stability of Recombinant L and H Subunits of Human Ferritin: Calorimetric and ANS Binding Studies ». *Protein Engineering Design and Selection* 11 (5): 377-81. <https://doi.org/10.1093/protein/11.5.377>.
- May, Jürgen J., Thomas M. Wendrich, et Mohamed A. Marahiel. 2001. « The *Dhb* Operon of *Bacillus subtilis* Encodes the Biosynthetic Template for the Catecholic Siderophore 2,3-Dihydroxybenzoate-Glycine-Threonine Trimeric Ester Bacillibactin ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (10): 7209-17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009140200>.
- Mazmanian, S. K. 2003. « Passage of Heme-Iron Across the Envelope of *Staphylococcus aureus* ». *Science* 299 (5608): 906-9. <https://doi.org/10.1126/science.1081147>.
- Mazmanian, Sarkis K., Hung Ton-That, Kenneth Su, et Olaf Schneewind. 2002. « An iron-regulated sortase anchors a class of surface protein during *Staphylococcus aureus* pathogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (4): 2293-2298.
- McKie, A. T. 2001. « An Iron-Regulated Ferric Reductase Associated with the Absorption of Dietary Iron ». *Science* 291 (5509): 1755-59. <https://doi.org/10.1126/science.1057206>.
- Merchant, Sabeeha S., et John D. Helmann. 2012. « Elemental Economy ». In *Advances in Microbial Physiology*, 60:91-210. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398264-3.00002-4>.
- Miethke, M., et M. A. Marahiel. 2007. « Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (3): 413-51. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00012-07>.
- Miethke, M., S. Schmidt, et M. A. Marahiel. 2008. « The Major Facilitator Superfamily-Type Transporter YmfE and the Multidrug-Efflux Activator Mta Mediate Bacillibactin Secretion in *Bacillus subtilis* ». *Journal of Bacteriology* 190 (15): 5143-52. <https://doi.org/10.1128/JB.00464-08>.
- Miethke, Marcus, Oliver Klotz, Uwe Linne, Jürgen J. May, Carsten L. Beckering, et Mohamed A. Marahiel. 2006. « Ferri-Bacillibactin Uptake and Hydrolysis in *Bacillus subtilis* ». *Molecular Microbiology* 61 (6): 1413-27. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05321.x>.

- Miethke, Marcus, Carmine G. Monteferrante, Mohamed A. Marahiel, et Jan Maarten van Dijl. 2013. « The *Bacillus subtilis* EfeUOB Transporter Is Essential for High-Affinity Acquisition of Ferrous and Ferric Iron ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833 (10): 2267-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.027>.
- Mikonranta, Lauri, Franziska Dickel, Johanna Mappes, et Dalial Freitak. 2017. « Lepidopteran Species Have a Variety of Defence Strategies against Bacterial Infections ». *Journal of Invertebrate Pathology* 144 (mars): 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2017.01.012>.
- Miller, Halie K., et Victoria Auerbuch. 2015. « Bacterial Iron–Sulfur Cluster Sensors in Mammalian Pathogens ». *Metallomics* 7 (6): 943-56. <https://doi.org/10.1039/C5MT00012B>.
- Mislin, Gaëtan L.A., Françoise Hoegy, David Cobessi, Keith Poole, Didier Rognan, et Isabelle J. Schalk. 2006. « Binding Properties of Pyochelin and Structurally Related Molecules to FptA of *Pseudomonas aeruginosa* ». *Journal of Molecular Biology* 357 (5): 1437-48. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.080>.
- Missiakas, Dominique, et Olaf Schneewind. 2017. « Assembly and Function of the *Bacillus anthracis* S-Layer ». *Annual Review of Microbiology* 71 (1): 79-98. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093512>.
- Moayeri, Mahtab, Diana Haines, Howard A. Young, et Stephen H. Leppla. 2003. « *Bacillus anthracis* Lethal Toxin Induces TNF- α -Independent Hypoxia-Mediated Toxicity in Mice ». *Journal of Clinical Investigation* 112 (5): 670-82. <https://doi.org/10.1172/JCI200317991>.
- Morgenthau, Ari, Anastassia Pogoutse, Paul Adamiak, Trevor F Moraes, et Anthony B Schryvers. 2013. « Bacterial Receptors for Host Transferrin and Lactoferrin: Molecular Mechanisms and Role in Host–Microbe Interactions ». *Future Microbiology* 8 (12): 1575-85. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.125>.
- Muckenthaler, Martina U., Bruno Galy, et Matthias W. Hentze. 2008. « Systemic Iron Homeostasis and the Iron-Responsive Element/Iron-Regulatory Protein (IRE/IRP) Regulatory Network ». *Annual Review of Nutrition* 28 (1): 197-213. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.28.061807.155521>.
- Mukherjee, Krishnendu, Ramya Raju, Rainer Fischer, et Andreas Vilcinskas. 2013. « *Galleria mellonella* as a Model Host to Study Gut Microbe Homeostasis and Brain Infection by the Human Pathogen *Listeria monocytogenes* ». In *Yellow Biotechnology I*, édité par Andreas Vilcinskas, 135:27-39. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2013_203.
- Nair, S., et S. E. Finkel. 2004. « Dps Protects Cells against Multiple Stresses during Stationary Phase ». *Journal of Bacteriology* 186 (13): 4192-98. <https://doi.org/10.1128/JB.186.13.4192-4198.2004>.
- Nairz, Manfred, Andrea Schroll, Thomas Sonnweber, et Günter Weiss. 2010. « The Struggle for Iron - a Metal at the Host-Pathogen Interface: Iron at the Host-Pathogen Interface ». *Cellular Microbiology* 12 (12): 1691-1702. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01529.x>.
- Nakaminami, Hidemasa, Chunhui Chen, Que Chi Truong-Bolduc, Eu Suk Kim, Yin Wang, et David C. Hooper. 2017. « Efflux Transporter of Siderophore Staphyloferrin A in *Staphylococcus aureus* Contributes to Bacterial Fitness in Abscesses and Epithelial Cells ». Édité par Nancy E. Freitag. *Infection and Immunity* 85 (8). <https://doi.org/10.1128/IAI.00358-17>.

- Nava, Gerardo M, Hans J Friedrichsen, et Thaddeus S Stappenbeck. 2011. « Spatial Organization of Intestinal Microbiota in the Mouse Ascending Colon ». *The ISME Journal* 5 (4): 627-38. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.161>.
- Neilands, J. B. 1984. « Methodology of siderophores ». In *Siderophores from microorganisms and plants*, 1–24. Springer.
- Neilands, J. B. 1995. « Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (45): 26723–26726.
- Nicolas, Gaël, Lydie Viatte, Myriam Bennoun, Carole Beaumont, Axel Kahn, et Sophie Vaulont. 2002. « Hepcidin, A New Iron Regulatory Peptide ». *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 29 (3): 327-35. <https://doi.org/10.1006/bcmd.2002.0573>.
- Niehus, Rene, Aurore Picot, Nuno M. Oliveira, Sara Mitri, et Kevin R. Foster. 2017. « The Evolution of Siderophore Production as a Competitive Trait: THE COMPETITIVE EVOLUTION OF SIDEROPHORES ». *Evolution* 71 (6): 1443-55. <https://doi.org/10.1111/evo.13230>.
- Nobles, Christopher L., et Anthony W. Maresso. 2011. « The Theft of Host Heme by Gram-Positive Pathogenic Bacteria ». *Metallomics* 3 (8): 788. <https://doi.org/10.1039/c1mt00047k>.
- Noinaj, Nicholas, Maude Guillier, Travis J. Barnard, et Susan K. Buchanan. 2010. « TonB-Dependent Transporters: Regulation, Structure, and Function ». *Annual Review of Microbiology* 64 (1): 43-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>.
- Occhino, Deborah A., Elizabeth E. Wyckoff, Douglas P. Henderson, Thomas J. Wrona, et Shelley M. Payne. 1998. « Vibrio Cholerae Iron Transport: Haem Transport Genes Are Linked to One of Two Sets of TonB, ExbB, ExbD Genes ». *Molecular Microbiology* 29 (6): 1493-1507. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01034.x>.
- Okstad, O. A., N. J. Tourasse, F. B. Stabell, C. K. Sundfaer, W. Egge-Jacobsen, P. A. Risoen, T. D. Read, et A.-B. Kolsto. 2004. « The Bcr1 DNA Repeat Element Is Specific to the *Bacillus cereus* Group and Exhibits Mobile Element Characteristics ». *Journal of Bacteriology* 186 (22): 7714-25. <https://doi.org/10.1128/JB.186.22.7714-7725.2004>.
- Oliwa-Stasiak, Kamila, Olga Kolaj-Robin, et Catherine C. Adley. 2011. « Development of Real-Time PCR Assays for Detection and Quantification of *Bacillus cereus* Group Species: Differentiation of *B. weihenstephanensis* and Rhizoid *B. pseudomycoloides* Isolates from Milk ». *Applied and Environmental Microbiology* 77 (1): 80-88. <https://doi.org/10.1128/AEM.01581-10>.
- Ollinger, J., K.-B. Song, H. Antelmann, M. Hecker, et J. D. Helmann. 2006. « Role of the Fur Regulon in Iron Transport in *Bacillus subtilis* ». *Journal of Bacteriology* 188 (10): 3664-73. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3664-3673.2006>.
- Ordway, G. A. 2004. « Myoglobin: An Essential Hemoprotein in Striated Muscle ». *Journal of Experimental Biology* 207 (20): 3441-46. <https://doi.org/10.1242/jeb.01172>.
- Oren, A., et G. M. Garrity. 2014. « List of New Names and New Combinations Previously Effectively, but Not Validly, Published ». *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 64 (Pt 1): 1-5. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.060285-0>.

- Otho, Sohail Ahmed, Kangkang Chen, Yongdong Zhang, Peng Wang, et Zhiqiang Lu. 2016. « Silkworm Ferritin 1 Heavy Chain Homolog Is Involved in Defense against Bacterial Infection through Regulation of Haemolymph Iron Homeostasis ». *Developmental & Comparative Immunology* 55 (février): 152-58. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.10.022>.
- Ow, Yong-Ling P., Douglas R. Green, Zhenyue Hao, et Tak W. Mak. 2008. « Cytochrome c: Functions beyond Respiration ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (7): 532-42. <https://doi.org/10.1038/nrm2434>.
- Palma, Leopoldo, Delia Muñoz, Colin Berry, Jesús Murillo, et Primitivo Caballero. 2014. « *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity ». *Toxins* 6 (12): 3296-3325. <https://doi.org/10.3390/toxins6123296>.
- Parkkinen, Jaakko, Leni von Bonsdorff, Freja Ebeling, et Leila Sahlstedt. 2002. « Function and Therapeutic Development of Apotransferrin ». *Vox Sanguinis* 83 (août): 321-26. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2002.tb05327.x>.
- Patiño-Navarrete, Rafael, et Vincent Sanchis. 2017. « Evolutionary Processes and Environmental Factors Underlying the Genetic Diversity and Lifestyles of *Bacillus cereus* Group Bacteria ». *Research in Microbiology* 168 (4): 309-18. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.07.002>.
- Paul, Viktoria Désirée, et Roland Lill. 2015. « Biogenesis of Cytosolic and Nuclear Iron-Sulfur Proteins and Their Role in Genome Stability ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1853 (6): 1528-39. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.12.018>.
- Pena-Gonzalez, Angela, Luis M. Rodriguez-R, Chung K. Marston, Jay E. Gee, Christopher A. Gulvik, Cari B. Kolton, Elke Saile, Michael Frace, Alex R. Hoffmaster, et Konstantinos T. Konstantinidis. 2018. « Genomic Characterization and Copy Number Variation of *Bacillus anthracis* Plasmids PXO1 and PXO2 in a Historical Collection of 412 Strains ». Édité par Rup Lal. *MSystems* 3 (4). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00065-18>.
- Pettersson, Annika, Thorsten Prinz, Arzu Umar, Jenny van der Biezen, et Jan Tommassen. 1998. « Molecular Characterization of LbpB, the Second Lactoferrin-Binding Protein of *Neisseria meningitidis* ». *Molecular Microbiology* 27 (3): 599-610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00707.x>.
- Peuckert, Florian, Ana Laura Ramos-Vega, Marcus Miethke, Clemens J. Schwörer, Alexander G. Albrecht, Markus Oberthür, et Mohamed A. Marahiel. 2011. « The Siderophore Binding Protein FeuA Shows Limited Promiscuity toward Exogenous Triscatecholates ». *Chemistry & Biology* 18 (7): 907-19. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.05.006>.
- Pfleger, B. F., Y. Kim, T. D. Nusca, N. Maltseva, J. Y. Lee, C. M. Rath, J. B. Scaglione, et al., 2008. « Structural and Functional Analysis of AsbF: Origin of the Stealth 3,4-Dihydroxybenzoic Acid Subunit for Petrobactin Biosynthesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (44): 17133-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808118105>.
- Pham, Daphne Q.D., et Joy J. Winzerling. 2010. « Insect Ferritins: Typical or Atypical? ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1800 (8): 824-33. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.004>.
- Pi, Hualiang, et John D. Helmann. 2017a. « Ferrous Iron Efflux Systems in Bacteria ». *Metallomics* 9 (7): 840-51. <https://doi.org/10.1039/C7MT00112F>.

- Pi, Hualiang, et John D. Helmann. 2017b. « Sequential Induction of Fur-Regulated Genes in Response to Iron Limitation in *Bacillus subtilis* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (48): 12785-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713008114>.
- Pi, Hualiang, Shari A. Jones, Lynn E. Mercer, Jessica P. Meador, Joyce E. Caughron, Lorne Jordan, Salette M. Newton, Tyrrell Conway, et Phillip E. Klebba. 2012. « Role of Catecholate Siderophores in Gram-Negative Bacterial Colonization of the Mouse Gut ». Édité par Markus M. Heimesaat. *PLoS ONE* 7 (11): e50020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050020>.
- Pigott, C. R., et D. J. Ellar. 2007. « Role of Receptors in *Bacillus thuringiensis* Crystal Toxin Activity ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (2): 255-81. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00034-06>.
- Pilo, Paola, et Joachim Frey. 2011. « *Bacillus anthracis*: Molecular Taxonomy, Population Genetics, Phylogeny and Patho-Evolution ». *Infection, Genetics and Evolution* 11 (6): 1218-24. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.05.013>.
- Pilpa, Rosemarie M., Evgeny A. Fadeev, Valerie A. Villareal, Melissa L. Wong, Martin Phillips, et Robert T. Clubb. 2006. « Solution Structure of the NEAT (NEAr Transporter) Domain from IsdH/HarA: The Human Hemoglobin Receptor in *Staphylococcus aureus* ». *Journal of Molecular Biology* 360 (2): 435-47. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.05.019>.
- Pilpa, Rosemarie M., Scott A. Robson, Valerie A. Villareal, Melissa L. Wong, Martin Phillips, et Robert T. Clubb. 2009. « Functionally Distinct NEAT (NEAr Transporter) Domains within the *Staphylococcus aureus* IsdH/HarA Protein Extract Heme from Methemoglobin ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (2): 1166-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806007200>.
- Pishchany, Gleb, Jessica R. Sheldon, Claire F. Dickson, Md Tauqeer Alam, Timothy D. Read, David A. Gell, David E. Heinrichs, et Eric P. Skaar. 2014. « IsdB-Dependent Hemoglobin Binding Is Required for Acquisition of Heme by *Staphylococcus aureus* ». *The Journal of Infectious Diseases* 209 (11): 1764-72. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit817>.
- Podgorny, Oleg V., et Vassili N. Lazarev. 2017. « Laser Microdissection: A Promising Tool for Exploring Microorganisms and Their Interactions with Hosts ». *Journal of Microbiological Methods* 138 (juillet): 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.01.001>.
- Pohl, Ehmke, Jon C. Haller, Ana Mijovilovich, Wolfram Meyer-Klaucke, Elspeth Garman, et Michael L. Vasil. 2003. « Architecture of a Protein Central to Iron Homeostasis: Crystal Structure and Spectroscopic Analysis of the Ferric Uptake Regulator: Crystal Structure of a Fur/Zur Family Member ». *Molecular Microbiology* 47 (4): 903-15. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03337.x>.
- Pomerantsev, A. P., K. V. Kalnin, M. Osorio, et S. H. Leppla. 2003. « Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C and Sphingomyelinase Activities in Bacteria of the *Bacillus cereus* Group ». *Infection and Immunity* 71 (11): 6591-6606. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6591-6606.2003>.
- Pomerantsev, Andrei P., Olga M. Pomerantseva, Andrew S. Camp, Radhika Mukkamala, Stanley Goldman, et Stephen H. Leppla. 2009. « PapR Peptide Maturation: Role of the NprB Protease in *Bacillus cereus* 569 PlcR/PapR Global Gene Regulation ». *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 55 (3): 361-77. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00521.x>.

- Porcheron, Gaëlle, et Charles M. Dozois. 2015. « Interplay between Iron Homeostasis and Virulence: Fur and RyhB as Major Regulators of Bacterial Pathogenicity ». *Veterinary Microbiology* 179 (1-2): 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.024>.
- Poulos, Thomas L. 2014. « Heme Enzyme Structure and Function ». *Chemical Reviews* 114 (7): 3919-62. <https://doi.org/10.1021/cr400415k>.
- Priest, F. G., M. Barker, L. W. J. Baillie, E. C. Holmes, et M. C. J. Maiden. 2004. « Population Structure and Evolution of the *Bacillus cereus* Group ». *Journal of Bacteriology* 186 (23): 7959-70. <https://doi.org/10.1128/JB.186.23.7959-7970.2004>.
- Priest, F. G., M. Goodfellow, et C. Todd. 1988. « A Numerical Classification of the Genus *Bacillus* ». *Microbiology* 134 (7): 1847-82. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-7-1847>.
- Py, Béatrice, et Frédéric Barras. 2014. « Du fer et du soufre dans les protéines: Comment la cellule construit-elle les cofacteurs fer-soufre essentiels à son fonctionnement? ». *médecine/sciences* 30 (12): 1110-22. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143012014>.
- Ramarao, Nalini, et Didier Lereclus. 2005. « The InhA1 Metalloprotease Allows Spores of the *B. cereus* Group to Escape Macrophages: InhA1 Allows *B. Thuringiensis* Escape from Macrophages ». *Cellular Microbiology* 7 (9): 1357-64. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00562.x>.
- Ramarao, Nalini, Christina Nielsen-Leroux, et Didier Lereclus. 2012. « The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 70 (décembre). <https://doi.org/10.3791/4392>.
- Ramarao, Nalini, et Vincent Sanchis. 2013. « The Pore-Forming Haemolysins of *Bacillus cereus*: A Review ». *Toxins* 5 (6): 1119-39. <https://doi.org/10.3390/toxins5061119>.
- Ramsay, Kerry, Michael G. K. Jones, et Zhaohui Wang. 2006. « Laser Capture Microdissection: A Novel Approach to Microanalysis of Plant-Microbe Interactions ». *Molecular Plant Pathology* 7 (5): 429-35. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00348.x>.
- Raven, J. A. 2013. « Iron Acquisition and Allocation in Stramenopile Algae ». *Journal of Experimental Botany* 64 (8): 2119-27. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert121>.
- Raymond, Ben, et Brian A. Federici. 2017. « In Defence of *Bacillus thuringiensis*, the Safest and Most Successful Microbial Insecticide Available to Humanity—a Response to EFSA ». *FEMS Microbiology Ecology* 93 (7). <https://doi.org/10.1093/femsec/fix084>.
- Raymond, K. N., E. A. Dertz, et S. S. Kim. 2003. « Enterobactin: An Archetype for Microbial Iron Transport ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (7): 3584-88. <https://doi.org/10.1073/pnas.0630018100>.
- Regier, Nicole, et Beat Frey. 2010. « Experimental Comparison of Relative RT-QPCR Quantification Approaches for Gene Expression Studies in Poplar ». *BMC Molecular Biology* 11 (1): 57. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-57>.
- Reimann, C. 2012. « Inner-Membrane Transporters for the Siderophores Pyochelin in *Pseudomonas aeruginosa* and Enantio-Pyochelin in *Pseudomonas fluorescens* Display Different Enantioselectivities ». *Microbiology* 158 (Pt_5): 1317-24. <https://doi.org/10.1099/mic.0.057430-0>.

- Reniere, Michelle L., et Eric P. Skaar. 2008. « *Staphylococcus aureus* Haem Oxygenases Are Differentially Regulated by Iron and Haem ». *Molecular Microbiology* 69 (5): 1304-15. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06363.x>.
- Richardson, Anthony R, et Igor Stojiljkovic. 1999. « HmbR, a Hemoglobin-Binding Outer Membrane Protein of *Neisseria meningitidis*, Undergoes Phase Variation ». *J. BACTERIOL.* 181: 8.
- Rivera, Mario. 2017. « Bacterioferritin: Structure, Dynamics, and Protein–Protein Interactions at Play in Iron Storage and Mobilization ». *Accounts of Chemical Research* 50 (2): 331-40. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.6b00514>.
- Rohde, K. H., et D. W. Dyer. 2004. « Analysis of Haptoglobin and Hemoglobin-Haptoglobin Interactions with the *Neisseria meningitidis* TonB-Dependent Receptor HpuAB by Flow Cytometry ». *Infection and Immunity* 72 (5): 2494-2506. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.5.2494-2506.2004>.
- Rosselló-Mora, Ramon. 2003. « Opinion: The Species Problem, Can We Achieve a Universal Concept? ». *Systematic and Applied Microbiology* 26 (3): 323-26. <https://doi.org/10.1078/072320203322497347>.
- Roux, Brice, Nathalie Rodde, Marie-Françoise Jardinaud, Ton Timmers, Laurent Sauviac, Ludovic Cottret, Sébastien Carrère, et al., 2014. « An Integrated Analysis of Plant and Bacterial Gene Expression in Symbiotic Root Nodules Using Laser-Capture Microdissection Coupled to RNA Sequencing ». *The Plant Journal* 77 (6): 817-37. <https://doi.org/10.1111/tpj.12442>.
- Roy, Emily M., et Kevin L. Griffith. 2017. « Characterization of a Novel Iron Acquisition Activity That Coordinates the Iron Response with Population Density under Iron-Replete Conditions in *Bacillus subtilis* ». Édité par Tina M. Henkin. *Journal of Bacteriology* 199 (1). <https://doi.org/10.1128/JB.00487-16>.
- Saile, E., et T. M. Koehler. 2006. « *Bacillus anthracis* Multiplication, Persistence, and Genetic Exchange in the Rhizosphere of Grass Plants ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (5): 3168-74. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3168-3174.2006>.
- Salamitou, Sylvie, Françoise Ramisse, Michel Brehélin, Denis Bourguet, Nathalie Gilois, Myriam Gominet, Eric Hernandez, et Didier Lereclus. 2000. « The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects ». *Microbiology* 146 (11): 2825–2832.
- Sambeek, Jessica van, et Andreas Wiesner. 1999. « Successful Parasitism of Locusts by Entomopathogenic Nematodes Is Correlated with Inhibition of Insect Phagocytes ». *Journal of Invertebrate Pathology* 73 (2): 154-61. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4823>.
- Sanahuja, Georgina, Raviraj Banakar, Richard M. Twyman, Teresa Capell, et Paul Christou. 2011. « *Bacillus thuringiensis*: A Century of Research, Development and Commercial Applications: A Century of *Bacillus thuringiensis* ». *Plant Biotechnology Journal* 9 (3): 283-300. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2011.00595.x>.
- Sassone-Corsi, Martina, Phoom Chairatana, Tengfei Zheng, Araceli Perez-Lopez, Robert A. Edwards, Michael D. George, Elizabeth M. Nolan, et Manuela Raffatellu. 2016. « Siderophore-Based Immunization Strategy to Inhibit Growth of Enteric Pathogens ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (47): 13462-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606290113>.

- Sastalla, Inka, Rasem Fattah, Nicole Coppage, Poulomi Nandy, Devorah Crown, Andrei P. Pomerantsev, et Stephen H. Leppla. 2013. « The *Bacillus cereus* Hbl and Nhe Tripartite Enterotoxin Components Assemble Sequentially on the Surface of Target Cells and Are Not Interchangeable ». Édité par Theresa M. Koehler. *PLoS ONE* 8 (10): e76955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076955>.
- Schalk, Isabelle J., Gaëtan L.A. Mislin, et Karl Brillet. 2012. « Structure, Function and Binding Selectivity and Stereoselectivity of Siderophore–Iron Outer Membrane Transporters ». In *Current Topics in Membranes*, 69:37-66. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394390-3.00002-1>.
- Schneewind, Olaf, et Dominique Missiakas. 2014. « Sec-Secretion and Sortase-Mediated Anchoring of Proteins in Gram-Positive Bacteria ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1843 (8): 1687-97. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.11.009>.
- Schnepf, E, N Crickmore, J Van Rie, D Lereclus, J Baum, J Feitelson, D R Zeigler, et D H Dean. 1998. « *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins ». *MICROBIOL. MOL. BIOL. REV.* 62: 32.
- Schnepf, H. E., et H. R. Whiteley. 1981. « Cloning and Expression of the *Bacillus thuringiensis* Crystal Protein Gene in *Escherichia coli*. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78 (5): 2893-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.5.2893>.
- Schroeder, Andreas, Odilo Mueller, Susanne Stocker, Ruediger Salowsky, Michael Leiber, Marcus Gassmann, Samar Lightfoot, Wolfram Menzel, Martin Granzow, et Thomas Ragg. 2006. « The RIN: An RNA Integrity Number for Assigning Integrity Values to RNA Measurements ». *BMC Molecular Biology*, 14.
- Schuth, Nils, Stefan Mebs, Dennis Huwald, Pierre Wrzolek, Matthias Schwalbe, Anja Hemschemeier, et Michael Haumann. 2017. « Effective Intermediate-Spin Iron in O₂-Transporting Heme Proteins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (32): 8556-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706527114>.
- Schwyn, Bernhard, et J.B. Neilands. 1987. « Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores ». *Analytical Biochemistry* 160 (1): 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9).
- Segond, Diego, Elise Abi Khalil, Christophe Buisson, Nadine Daou, Mireille Kallassy, Didier Lereclus, Paolo Arosio, Fadi Bou-Abdallah, et Christina Nielsen Le Roux. 2014. « Iron Acquisition in *Bacillus cereus*: The Roles of IIsA and Bacillibactin in Exogenous Ferritin Iron Mobilization ». Édité par Andreas Peschel. *PLoS Pathogens* 10 (2): e1003935. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003935>.
- Senesi, Sonia, et Emilia Ghelardi. 2010. « Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins ». *Toxins* 2 (7): 1690-1703. <https://doi.org/10.3390/toxins2071690>.
- Senior, N. J., M. C. Bagnall, O. L. Champion, S. E. Reynolds, R. M. La Ragione, M. J. Woodward, F. J. Salguero, et R. W. Titball. 2011. « *Galleria mellonella* as an Infection Model for *Campylobacter jejuni* Virulence ». *Journal of Medical Microbiology* 60 (5): 661-69. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.026658-0>.
- Shanker, Savita, Ariel Paulson, Howard J. Edenberg, Allison Peak, Anoja Perera, Yuriy O. Alekseyev, Nicholas Beckloff, et al., 2015. « Evaluation of Commercially Available RNA Amplification Kits for RNA Sequencing Using Very Low Input Amounts of Total RNA ». *Journal of Biomolecular Techniques: JBT*, avril, jbt.15-2601-001. <https://doi.org/10.7171/jbt.15-2601-001>.

- Shannon, J. G., C. L. Ross, T. M. Koehler, et R. F. Rest. 2003. « Characterization of Anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* Cholesterol-Dependent Cytolysin ». *Infection and Immunity* 71 (6): 3183-89. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3183-3189.2003>.
- Sheldon, Jessica R., Holly A. Laakso, et David E. Heinrichs. 2016. « Iron Acquisition Strategies of Bacterial Pathogens ». In *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition*, édité par Indira T. Kudva, Nancy A. Cornick, Paul J. Plummer, Qijing Zhang, Tracy L. Nicholson, John P. Bannantine, et Bryan H. Bellaire, 43-85. American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0010-2015>.
- Shiva, Sruti, Zhi Huang, Rozalina Grubina, Junhui Sun, Lorna A. Ringwood, Peter H. MacArthur, Xiuli Xu, Elizabeth Murphy, Victor M. Darley-Usmar, et Mark T. Gladwin. 2007. « Deoxymyoglobin Is a Nitrite Reductase That Generates Nitric Oxide and Regulates Mitochondrial Respiration ». *Circulation Research* 100 (5): 654-61. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000260171.52224.6b>.
- Shoji, Osami, et Yoshihito Watanabe. 2014. « Peroxygenase Reactions Catalyzed by Cytochromes P450 ». *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 19 (4-5): 529-39. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1106-9>.
- Sia, Allyson K, Benjamin E Allred, et Kenneth N Raymond. 2013. « Siderocalins: Siderophore Binding Proteins Evolved for Primary Pathogen Host Defense ». *Current Opinion in Chemical Biology* 17 (2): 150-57. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.11.014>.
- Sineva, E., A. Shadrin, E. A. Rodikova, Z. I. Andreeva-Kovalevskaya, A. S. Protsenko, S. G. Mayorov, D. Y. Galaktionova, E. Magelky, et A. S. Solonin. 2012. « Iron Regulates Expression of *Bacillus cereus* Hemolysin II via Global Regulator Fur ». *Journal of Bacteriology* 194 (13): 3327-35. <https://doi.org/10.1128/JB.00199-12>.
- Singh, Vishal, Beng San Yeoh, Xia Xiao, Manish Kumar, Michael Bachman, Niels Borregaard, Bina Joe, et Matam Vijay-Kumar. 2015. « Interplay between Enterobactin, Myeloperoxidase and Lipocalin 2 Regulates *E. coli* Survival in the Inflamed Gut ». *Nature Communications* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms8113>.
- Skaar, E. P., A. H. Gaspar, et O. Schneewind. 2006. « *Bacillus anthracis* IsdG, a Heme-Degrading Monooxygenase ». *Journal of Bacteriology* 188 (3): 1071-80. <https://doi.org/10.1128/JB.188.3.1071-1080.2006>.
- Skaar, Eric P. 2010. « The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts ». *PLoS pathogens* 6 (8). <http://search.proquest.com/openview/f439d134c30a4ed436d6708fdcc2e5cd/1?pq-origsite=gscholar>.
- Skaar, Eric P., Andrew H. Gaspar, et Olaf Schneewind. 2004. « IsdG and IsdI, Heme-Degrading Enzymes in the Cytoplasm of *Staphylococcus aureus* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (1): 436-43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307952200>.
- Slamti, L. 2002. « A Cell-Cell Signaling Peptide Activates the PlcR Virulence Regulon in Bacteria of the *Bacillus cereus* Group ». *The EMBO Journal* 21 (17): 4550-59. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf450>.
- Slamti, Leyla, Christelle Lemy, Céline Henry, Alain Guillot, Eugénie Huillet, et Didier Lereclus. 2016. « CodY Regulates the Activity of the Virulence Quorum Sensor PlcR by Controlling the Import of the Signaling Peptide PapR in *Bacillus thuringiensis* ». *Frontiers in Microbiology* 6: 1501. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01501>.

- Slamti, Leyla, Stéphane Perchat, Eugénie Huillet, et Didier Lereclus. 2014. « Quorum Sensing in *Bacillus thuringiensis* Is Required for Completion of a Full Infectious Cycle in the Insect ». *Toxins* 6 (8): 2239-55. <https://doi.org/10.3390/toxins6082239>.
- Smith, Ann, et Russell J. McCulloh. 2015. « Hemopexin and Haptoglobin: Allies against Heme Toxicity from Hemoglobin Not Contenders ». *Frontiers in Physiology* 6 (juin). <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00187>.
- Sorokin, A., B. Candelon, K. Guilloux, N. Galleron, N. Wackerow-Kouzova, S. D. Ehrlich, D. Bourguet, et V. Sanchis. 2006. « Multiple-Locus Sequence Typing Analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Reveals Separate Clustering and a Distinct Population Structure of Psychrotrophic Strains ». *Applied and Environmental Microbiology* 72 (2): 1569-78. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.2.1569-1578.2006>.
- Soufiane, Brahim, et Jean-Charles Côté. 2013. « *Bacillus weihenstephanensis* Characteristics Are Present in *Bacillus cereus* and *Bacillus mycoides* Strains ». *FEMS Microbiology Letters* 341 (2): 127-37. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12106>.
- Sozhamannan, Shanmuga, Michael D Chute, Farrell D McAfee, Derrick E Fouts, Arya Akmal, Darrell R Galloway, Alfred Mateczun, Leslie W Baillie, et Timothy D Read. 2006. « The *Bacillus anthracis* Chromosome Contains Four Conserved, Excision-Proficient, Putative Prophages ». *BMC Microbiology*, 11.
- Spiro, Thomas G., Alexandra V. Soldatova, et Gurusamy Balakrishnan. 2013. « CO, NO and O₂ as Vibrational Probes of Heme Protein Interactions ». *Coordination Chemistry Reviews* 257 (2): 511-27. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.008>.
- Stacy, Apollo, Nader Abraham, Peter Jorth, et Marvin Whiteley. 2016. « Microbial Community Composition Impacts Pathogen Iron Availability during Polymicrobial Infection ». Édité par Alan R. Hauser. *PLOS Pathogens* 12 (12): e1006084. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006084>.
- Stacy, Apollo, Luke McNally, Sophie E. Darch, Sam P. Brown, et Marvin Whiteley. 2016. « The Biogeography of Polymicrobial Infection ». *Nature Reviews Microbiology* 14 (2): 93-105. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.8>.
- Ståhlberg, Anders, Mikael Kubista, et Pierre Åman. 2011. « Single-Cell Gene-Expression Profiling and Its Potential Diagnostic Applications ». *Expert Review of Molecular Diagnostics* 11 (7): 735-40. <https://doi.org/10.1586/erm.11.60>.
- Stauff, Devin L., et Eric P. Skaar. 2009. « The Heme Sensor System of *Staphylococcus aureus* ». In *Contributions to Microbiology*, édité par M. Collin et R. Schuch, 16:120-35. Basel: KARGER. <https://doi.org/10.1159/000219376>.
- Stauff, Devin L., Victor J. Torres, et Eric P. Skaar. 2007. « Signaling and DNA-Binding Activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS Two-Component System Required for Heme Sensing ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (36): 26111-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703797200>.
- Stenfors Arnesen, Lotte, Per Einar Granum, Christophe Buisson, Jon Bohlin, et Christina Nielsen-LeRoux. 2011. « Using an Insect Model to Assess Correlation between Temperature and Virulence in *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus cereus*: *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cereus* and Virulence ». *FEMS Microbiology Letters* 317 (2): 196-202. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02229.x>.
- Stenfors Arnesen, Lotte P., Annette Fagerlund, et Per Einar Granum. 2008. « From Soil to Gut: *Bacillus cereus* and Its Food Poisoning Toxins ». *FEMS Microbiology Reviews* 32 (4): 579-606. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x>.

- Stojiljkovic, Igor. s. d. « Hemin Uptake System of *Yersinia enterocolitica*: Similarities with Other TonB-Dependent Systems in Gram-Negative Bacteria », 9.
- Stojiljkovic, Igor, et Donna Perkins-Balding. 2002. « Processing of Heme and Heme-Containing Proteins by Bacteria ». *DNA and Cell Biology* 21 (4): 281-95. <https://doi.org/10.1089/104454902753759708>.
- « Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2016. » 2016, 11.
- Tabashnik, Bruce E, Thierry Brévault, et Yves Carrière. 2013. « Insect Resistance to Bt Crops: Lessons from the First Billion Acres ». *Nature Biotechnology* 31 (6): 510-21. <https://doi.org/10.1038/nbt.2597>.
- Takahashi, Takuya, et Serdar Kuyucak. 2003. « Functional Properties of Threefold and Fourfold Channels in Ferritin Deduced from Electrostatic Calculations ». *Biophysical Journal* 84 (4): 2256-63. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75031-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75031-0).
- Tang, Xiaona, et Bing Zhou. 2013. « Iron Homeostasis in Insects: Insights from *Drosophila* Studies: Iron Homeostasis in Insects ». *IUBMB Life* 65 (10): 863-72. <https://doi.org/10.1002/iub.1211>.
- Tarlovsky, Y., M. Fabian, E. Solomaha, E. Honsa, J. S. Olson, et A. W. Maresso. 2010. « A *Bacillus anthracis* S-Layer Homology Protein That Binds Heme and Mediates Heme Delivery to IsdC ». *Journal of Bacteriology* 192 (13): 3503-11. <https://doi.org/10.1128/JB.00054-10>.
- Tausch, Franziska, Richard Dietrich, Kristina Schauer, Robert Janowski, Dierk Niessing, Erwin Märtlbauer, et Nadja Jessberger. 2017. « Evidence for Complex Formation of the *Bacillus cereus* Haemolysin BL Components in Solution ». *Toxins* 9 (9): 288. <https://doi.org/10.3390/toxins9090288>.
- Tay, Wee Tek, Rod J. Mahon, David G. Heckel, Thomas K. Walsh, Sharon Downes, William J. James, Sui-Fai Lee, Annette Reineke, Adam K. Williams, et Karl H. J. Gordon. 2015. « Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry2Ab Is Conferred by Mutations in an ABC Transporter Subfamily A Protein ». Édité par Harmit S. Malik. *PLOS Genetics* 11 (11): e1005534. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005534>.
- Taylor, Theresa B., Prashant R. Nambiar, Rajiv Raja, Evelyn Cheung, Daniel W. Rosenberg, et Birgit Anderegg. 2004. « Microgenomics: Identification of New Expression Profiles via Small and Single-Cell Sample Analyses ». *Cytometry* 59A (2): 254-61. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20051>.
- Tenhunen, R., O. Tokola, et I.-B. Lindén. 1987. « Haem arginate: a new stable haem compound ». *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 39 (10): 780-786.
- Theil, Elizabeth C. 2007. « Coordinating Responses to Iron and Oxygen Stress with DNA and mRNA Promoters: The Ferritin Story ». *BioMetals* 20 (3-4): 513-21. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9063-6>.
- Theil, Elizabeth C. 2013. « Ferritin: The Protein Nanocage and Iron Biomineral in Health and in Disease ». *Inorganic Chemistry* 52 (21): 12223-33. <https://doi.org/10.1021/ic400484n>.
- Thom, C. S., C. F. Dickson, D. A. Gell, et M. J. Weiss. 2013. « Hemoglobin Variants: Biochemical Properties and Clinical Correlates ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3 (3): a011858-a011858. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011858>.

- Ticknor, L. O., A.-B. Kolsto, K. K. Hill, P. Keim, M. T. Laker, M. Tonks, et P. J. Jackson. 2001. « Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Soil Isolates ». *Applied and Environmental Microbiology* 67 (10): 4863-73. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.10.4863-4873.2001>.
- Tiedemann, Michael T., David E. Heinrichs, et Martin J. Stillman. 2012. « Multiprotein Heme Shuttle Pathway in *Staphylococcus aureus*: Iron-Regulated Surface Determinant Cog-Wheel Kinetics ». *Journal of the American Chemical Society* 134 (40): 16578-85. <https://doi.org/10.1021/ja305115y>.
- Torres, V. J., G. Pishchany, M. Humayun, O. Schneewind, et E. P. Skaar. 2006. « *Staphylococcus aureus* IsdB Is a Hemoglobin Receptor Required for Heme Iron Utilization ». *Journal of Bacteriology* 188 (24): 8421-29. <https://doi.org/10.1128/JB.01335-06>.
- Touati, Danièle. 2000. « Iron and Oxidative Stress in Bacteria ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1518>.
- Toukoki, Chadia, Kathryn M. Gold, Kevin S. McIver, et Zehava Eichenbaum. 2010. « MtsR Is a Dual Regulator That Controls Virulence Genes and Metabolic Functions in Addition to Metal Homeostasis in the Group A *Streptococcus*: Regulation of Gene Expression by MtsR ». *Molecular Microbiology* 76 (4): 971-89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07157.x>.
- Tourasse, Nicolas J., Erlendur Helgason, Are Klevan, Patricia Sylvestre, Maryse Moya, Michel Haustant, Ole Andreas Økstad, Agnès Fouet, Michèle Mock, et Anne-Brit Kolstø. 2011. « Extended and Global Phylogenetic View of the *Bacillus cereus* Group Population by Combination of MLST, AFLP, and MLEE Genotyping Data ». *Food Microbiology* 28 (2): 236-44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.06.014>.
- Tourasse, N.J., E. Helgason, O.A. Okstad, I.K. Hegna, et A.-B. KolstO. 2006. « The *Bacillus cereus* Group: Novel Aspects of Population Structure and Genome Dynamics ». *Journal of Applied Microbiology* 101 (3): 579-93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03087.x>.
- Tran, Seav-Ly, Elisabeth Guillemet, Didier Lereclus, et Nalini Ramarao. 2013. « Iron Regulates *Bacillus thuringiensis* Haemolysin HlyII Gene Expression during Insect Infection ». *Journal of Invertebrate Pathology* 113 (3): 205-8. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.04.001>.
- Tran, Seav-Ly, Elisabeth Guillemet, Maud Ngo-Camus, Cyril Clybouw, Andrea Puhar, Arnaud Moris, Michel Gohar, Didier Lereclus, et Nalini Ramarao. 2011. « Haemolysin II Is a *Bacillus cereus* Virulence Factor That Induces Apoptosis of Macrophages: *Bacillus cereus* HlyII Is a Toxic Factor Inducing Apoptosis ». *Cellular Microbiology* 13 (1): 92-108. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01522.x>.
- Tran, Seav-Ly, Andrea Puhar, Maud Ngo-Camus, et Nalini Ramarao. 2011. « Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus* ». Édité par Jean-Pierre Gorvel. *PLoS ONE* 6 (9): e22876. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022876>.
- Tran, Seav-Ly, et Nalini Ramarao. 2013. « *Bacillus cereus* Immune Escape: A Journey within Macrophages ». *FEMS Microbiology Letters* 347 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12209>.
- Tsai, Catherine Jia-Yun, Jacelyn Mei San Loh, et Thomas Proft. 2016. « *Galleria mellonella* Infection Models for the Study of Bacterial Diseases and for Antimicrobial Drug Testing ». *Virulence* 7 (3): 214-29. <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>.

- Tsai, Jia-Yun C., Jacelyn M. S. Loh, Fiona Clow, Natalie Lorenz, et Thomas Proft. 2017. « The Group A *Streptococcus* Serotype M2 Pilus Plays a Role in Host Cell Adhesion and Immune Evasion: Functional Analysis of the GAS Serotype M2 Pilus ». *Molecular Microbiology* 103 (2): 282-98. <https://doi.org/10.1111/mmi.13556>.
- Turlin, Evelyne, Michel Débarbouillé, Katarzyna Augustyniak, Anne-Marie Gilles, et Cécile Wandersman. 2013. « *Staphylococcus aureus* FepA and FepB Proteins Drive Heme Iron Utilization in *Escherichia coli* ». Édité par Alain Charbit. *PLoS ONE* 8 (2): e56529. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056529>.
- Vachon, Vincent, Raynald Laprade, et Jean-Louis Schwartz. 2012. « Current Models of the Mode of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal Crystal Proteins: A Critical Review ». *Journal of Invertebrate Pathology* 111 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001>.
- Valko, M., H. Morris, et M. Cronin. 2005. « Metals, Toxicity and Oxidative Stress ». *Current Medicinal Chemistry* 12 (10): 1161-1208. <https://doi.org/10.2174/0929867053764635>.
- Van der Auwera, Géraldine A., Sophie Timmerly, Florence Hoton, et Jacques Mahillon. 2007. « Plasmid Exchanges among Members of the *Bacillus cereus* Group in Foodstuffs ». *International Journal of Food Microbiology* 113 (2): 164-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.06.030>.
- Vandamme, P, B Pot, M Gillis, P De Vos, K Kersters, et J Swings. 1996. « Polyphasic Taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics ». *MICROBIOL. REV.* 60: 32.
- Vandenesch, François, G. Lina, et Thomas Henry. 2012. « *Staphylococcus aureus* Hemolysins, Bi-Component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? » *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00012>.
- Vannucci, Fabio A, Douglas N Foster, et Connie J Gebhart. 2013. « Laser Microdissection Coupled with RNA-Seq Analysis of Porcine Enterocytes Infected with an Obligate Intracellular Pathogen (*Lawsonia intracellularis*) ». *BMC Genomics* 14 (1): 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-421>.
- Venkateswaran, Kasthuri, Nitin K. Singh, Aleksandra Checinska Sielaff, Robert K. Pope, Nicholas H. Bergman, Sandra P. van Tongeren, Nisha B. Patel, et al., 2017. « Non-Toxin-Producing *Bacillus cereus* Strains Belonging to the *B. anthracis* Clade Isolated from the International Space Station ». Édité par Holly Bik. *MSystems* 2 (3): e00021-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00021-17>.
- Vercellotti, G. M., G. Balla, J. Balla, K. Nath, J. W. Eaton, et H. S. Jacob. 1994. « Heme and the Vasculature: An Oxidative Hazard That Induces Antioxidant Defenses in the Endothelium ». *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* 22 (2): 207-13. <https://doi.org/10.3109/10731199409117415>.
- Verplaetse, Emilie, Leyla Slamti, Michel Gohar, et Didier Lereclus. 2015. « Cell Differentiation in a *Bacillus thuringiensis* Population during Planktonic Growth, Biofilm Formation, and Host Infection ». Édité par Frederick M. Ausubel. *MBio* 6 (3): e00138-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00138-15>.
- Veysseyre, F., C. Fourcade, J.-P. Lavigne, et A. Sotto. 2015. « *Bacillus Cereus* Infection: 57 Case Patients and a Literature Review ». *Médecine et Maladies Infectieuses* 45 (11-12): 436-40. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.09.011>.

- Vilas-Boas, G., V. Sanchis, D. Lereclus, M. V. F. Lemos, et D. Bourguet. 2002. « Genetic Differentiation between Sympatric Populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* ». *Applied and Environmental Microbiology* 68 (3): 1414-24. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.3.1414-1424.2002>.
- Villareal, Valerie A., Rosemarie M. Pilpa, Scott A. Robson, Evgeny A. Fadeev, et Robert T. Clubb. 2008. « The IsdC Protein from *Staphylococcus aureus* Uses a Flexible Binding Pocket to Capture Heme ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (46): 31591-600. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801126200>.
- Visai, L., N. Yanagisawa, E. Josefsson, A. Tarkowski, I. Pezzali, S. H. M. Rooijackers, T. J. Foster, et P. Speziale. 2009. « Immune Evasion by *Staphylococcus aureus* Conferred by Iron-Regulated Surface Determinant Protein IsdH ». *Microbiology* 155 (3): 667-79. <https://doi.org/10.1099/mic.0.025684-0>.
- Visca, Paolo, Livia Leoni, Megan J. Wilson, et Iain L. Lamont. 2002. « Iron Transport and Regulation, Cell Signalling and Genomics: Lessons from *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: Iron Starvation ECF Factors ». *Molecular Microbiology* 45 (5): 1177-90. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03088.x>.
- Wandersman, Cécile, et Philippe Delepelaire. 2004. « Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores ». *Annual Review of Microbiology* 58 (1): 611-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>.
- Wandersman, Cécile, et Philippe Delepelaire. 2012. « Haemophore Functions Revisited: Haemophore Functions Revisited ». *Molecular Microbiology* 85 (4): 618-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08136.x>.
- Wang, Dong, Bo Yeon Kim, Kwang Sik Lee, Hyung Joo Yoon, Zheng Cui, Wei Lu, Jing Ming Jia, Doh Hoon Kim, Hung Dae Sohn, et Byung Rae Jin. 2009. « Molecular Characterization of Iron Binding Proteins, Transferrin and Ferritin Heavy Chain Subunit, from the Bumblebee *Bombus ignitus* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 152 (1): 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.09.082>.
- Wang, Zhong, Mark Gerstein, et Michael Snyder. 2009. « RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics ». *Nature Reviews Genetics* 10 (1): 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>.
- Watanabe, Masato, Yoshikazu Tanaka, Ayuko Suenaga, Makoto Kuroda, Min Yao, Nobuhisa Watanabe, Fumio Arisaka, Toshiko Ohta, Isao Tanaka, et Kouhei Tsumoto. 2008. « Structural Basis for Multimeric Heme Complexation through a Specific Protein-Heme Interaction: THE CASE OF THE THIRD NEAT DOMAIN OF IsdH FROM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (42): 28649-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803383200>.
- Watts, Rebecca E., Makrina Totsika, Victoria L. Challinor, Amanda N. Mabbett, Glen C. Ulett, James J. De Voss, et Mark A. Schembri. 2012. « Contribution of Siderophore Systems to Growth and Urinary Tract Colonization of Asymptomatic Bacteriuria *Escherichia coli* ». Édité par S. M. Payne. *Infection and Immunity* 80 (1): 333-44. <https://doi.org/10.1128/IAI.05594-11>.
- Weber, Roy E., et Serge N. Vinogradov. 2001. « Nonvertebrate Hemoglobins: Functions and Molecular Adaptations ». *Physiological Reviews* 81 (2): 569-628. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.569>.
- Westermann, Alexander J., Stanislaw A. Gorski, et Jörg Vogel. 2012. « Dual RNA-Seq of Pathogen and Host ». *Nature Reviews Microbiology* 10 (9): 618-30. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2852>.

- Wilson, Melissa K., Rebecca J. Abergel, Jean E. L. Arceneaux, Kenneth N. Raymond, et B. Rowe Byers. 2010. « Temporal Production of the Two *Bacillus anthracis* Siderophores, Petrobactin and Bacillibactin ». *BioMetals* 23 (1): 129-34. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9272-x>.
- Wilson, Melissa K., Rebecca J. Abergel, Kenneth N. Raymond, Jean E.L. Arceneaux, et B. Rowe Byers. 2006. « Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 348 (1): 320-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.07.055>.
- Wojda, Iwona. 2017. « Immunity of the Greater Wax Moth *Galleria mellonella*: *Galleria mellonella* Immunity ». *Insect Science* 24 (3): 342-57. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12325>.
- Wyckoff, Elizabeth E., Donald Duncan, Alfredo G. Torres, Melody Mills, Kamiel Maase, et Shelley M. Payne. 1998. « Structure of the *Shigella dysenteriae* Haem Transport Locus and Its Phylogenetic Distribution in Enteric Bacteria ». *Molecular Microbiology* 28 (6): 1139-52. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00873.x>.
- Yeterian, Emilie, Lois W. Martin, Iain L. Lamont, et Isabelle J. Schalk. 2009. « An Efflux Pump Is Required for Siderophore Recycling by *Pseudomonas aeruginosa*: Siderophore Recycling by an Efflux Pump ». *Environmental Microbiology Reports* 2 (3): 412-18. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00115.x>.
- Yi, Yanglei, Zhibo Li, Chunxu Song, et Oscar P. Kuipers. 2018. « Exploring Plant-Microbe Interactions of the Rhizobacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus mycoides* by Use of the CRISPR-Cas9 System: CRISPR-Cas9 for Rhizospheric *Bacillus* ». *Environmental Microbiology*, août. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14305>.
- Yukl, Erik T., Mohamed A. Elbaz, Michiko M. Nakano, et Pierre Moënne-Loccoz. 2008. « Transcription Factor NsrR from *Bacillus subtilis* Senses Nitric Oxide with a 4Fe-4S Cluster ». *Biochemistry* 47 (49): 13084-92. <https://doi.org/10.1021/bi801342x>.
- Zawadzka, Anna M., Rebecca J. Abergel, Rita Nichiporuk, Ulla N. Andersen, et Kenneth N. Raymond. 2009. « Siderophore-Mediated Iron Acquisition Systems in *Bacillus cereus*: Identification of Receptors for Anthrax Virulence-Associated Petrobactin ». *Biochemistry* 48 (16): 3645-57. <https://doi.org/10.1021/bi8018674>.
- Zhang, Caiguo. 2014. « Essential Functions of Iron-Requiring Proteins in DNA Replication, Repair and Cell Cycle Control ». *Protein & Cell* 5 (10): 750-60. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0083-7>.
- Zhao, Guanghua, Pierpaolo Ceci, Andrea Ilari, Laura Giangiacomo, Thomas M. Laue, Emilia Chiancone, et N. Dennis Chasteen. 2002. « Iron and Hydrogen Peroxide Detoxification Properties of DNA-Binding Protein from Starved Cells: A FERRITIN-LIKE DNA-BINDING PROTEIN OF *ESCHERICHIA COLI* ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (31): 27689-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202094200>.
- Ziegenhain, Christoph, Beate Vieth, Swati Parekh, Björn Reinius, Amy Guillaumet-Adkins, Martha Smets, Heinrich Leonhardt, Holger Heyn, Ines Hellmann, et Wolfgang Enard. 2017. « Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods ». *Molecular Cell* 65 (4): 631-643.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.023>.

Titre : Mécanismes d'acquisition du fer de l'hôte chez *Bacillus cereus* : rôle du couple bacillibactine-FeuA et expression des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer *in vivo* durant l'infection intestinale chez l'insecte.

Mots clés : *Bacillus cereus*, fer, sidérophore, interaction hôte-pathogène, insecte, Microdissection laser

Résumé : L'apport de fer est essentiel pour la plupart des organismes vivants, incluant la majorité des bactéries pathogènes. Cependant, le fer libre est toxique : il est lié à des protéines de stockage et de transport (*e.g.* ferritine, hémoprotéines...) et voit son homéostasie finement régulée. Afin d'extraire le fer de ces protéines, les bactéries utilisent divers systèmes tels que des protéines de surface ou encore des sidérophores. *Bacillus cereus* est une bactérie Gram-positif sporulante, pathogène opportuniste chez l'homme, 2^{ème} cause en France de toxi-infection alimentaire collective. Chez *B. cereus*, la protéine de surface IIsA et le sidérophore bacillibactine (BB) sont impliqués dans l'acquisition du fer de la ferritine exogène et elles sont importantes pour l'infection de l'insecte modèle *Galleria mellonella*. Mes travaux présentaient deux parties : tout d'abord, l'étude de l'import du complexe BB-Fe³⁺ dans la cellule par FeuA, protéine de liaison de ce complexe à la surface de la bactérie, souligne le rôle central du couple BB-FeuA. La délétion des gènes codants pour ces deux molécules limite l'acquisition par *B. cereus* du fer de la ferritine, de l'hème, de l'hémoglobine et du fer inorganique *in vitro*. En revanche, elle présente un phénotype de virulence *in vivo* comparable à la souche de référence dans le cas d'injection intra-hémocœlique de

larves de *G. mellonella*. Ce résultat surprenant suggère un probable rétrocontrôle sur l'expression de facteurs de virulence lorsque *B. cereus* ne produit ni BB ni FeuA, et se trouve par conséquent fortement carencé en fer. Le second volet de mes travaux s'intéresse à l'expression des gènes liés à l'homéostasie du fer *in vivo*, au cours de l'infection de l'intestin de larves de *G. mellonella* axéniques. Nous avons choisi une approche de type microgénomique, en prélevant les échantillons par microdissection laser, sur de façon à prélever de petits échantillons dans une zone définie, puis en analysant l'expression de quelques gènes ciblés par RT-qPCR et ddPCR à 3h et 16h post ingestion. Nos résultats montrent que : i) la colonisation intestinale de *G. mellonella* est impactée lorsque *B. cereus* est dépourvu du couple BB-FeuA ; ii) *ilsA* est exprimé lors de l'infection intestinale ; iii) les gènes ciblés impliqués dans l'homéostasie du fer sont activés dès le début de l'infection, suggérant un rôle dans l'adaptation et la pathogénicité ; iv) une faible modulation de l'expression est observée entre les deux temps. Ces travaux ouvrent de nouvelles connaissances fondamentales sur l'homéostasie du fer et des perspectives quant à l'utilisation de nouvelles techniques pour l'étude *in situ* des interactions hôte-pathogène.

Title : Mechanisms of host iron acquisition in *Bacillus cereus* : role of bacillibactin-FeuA in iron uptake and expression of genes involved in iron homeostasis *in vivo* during insect gut infection.

Keywords : *Bacillus cereus*, iron, siderophore, host-pathogen interaction, insect, Laser-capture microdissection

Abstract : Iron acquisition is essential for most living organisms, including many pathogenic bacteria. However, free iron is toxic: it is bound into storage or transport proteins (*e.g.* ferritin, hemoproteins...) and iron homeostasis is tightly regulated. To scavenge iron from these sources, bacteria possess several systems to acquire the bound iron, by surface proteins or siderophores. *Bacillus cereus* is a sporeforming Gram-positive bacterium, opportunistic human pathogen, 2nd cause of food-borne disease in France. It has been demonstrated that the *B. cereus* surface protein IIsA and the siderophore bacillibactin (BB) are involved in iron acquisition from ferritin and that these two molecules are important for infection of the insect model *G. mellonella*. My thesis project focused on two parts: first the study of the BB-Fe³⁺ complex import into the cell by the siderophore binding protein FeuA highlights the central role of both BB and FeuA. The deletion of the genes encoding for these two molecules limits iron acquisition by *B. cereus* from ferritin, heme, hemoglobin and inorganic iron *in vitro*. On the other hand, the virulence phenotype during intra-haemocelic

infection of *G. mellonella* is similar to the Wild-type strain. These results suggest a possible feedback on the expression of virulence factor genes when *B. cereus* is unable to synthesize both BB and FeuA, and therefore are under high stress. The second part of my work focused on the expression of genes involved in iron homeostasis *in vivo*, during gut infection of germ-free larvae of *G. mellonella*. We chose to perform a microgenomic approach, using laser-capture microdissection to get small samples in targeted areas, and then analysing the expression of chosen genes by RT-qPCR and ddPCR at two time points post ingestion. The results show that : i) the colonisation of *G. mellonella* gut is impacted when *B. cereus* is deprived of both BB and FeuA ; ii) *ilsA* is expressed during gut infection ; iii) iron homeostasis is involved in adaptation and pathogenicity from the early step of infection of the insect gut ; iv) only weak gene expression modulation occurred between the two timepoints. This work gives new fundamental knowledge about *B. cereus* iron homeostasis, and highlights the use of new techniques regarding the *in situ* study of host-pathogen interactions.