

Ecole Doctorale
"Science des Procédés-Science des Aliments"

Université Montpellier II

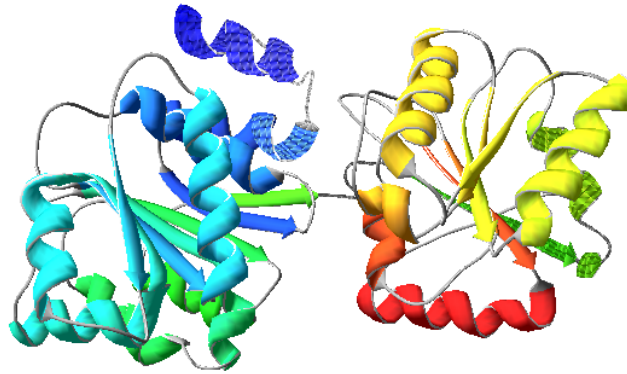
Thèse

pour obtenir le titre de

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

Discipline: Biotechnologie, Microbiologie

Franck PANDIANI



Mécanismes d'adaptation aux basses températures de croissance de la bactérie pathogène *B. cereus* : rôle des hélicases à ARN

Soutenue publiquement le 16 décembre 2010 devant le jury composé de:

Rapporteurs	M. Jean Michel Panoff	Professeur de l'Université de Caen
	M. Yves Le Loir	Directeur de recherche INRA
Examineurs	Mme Catherine Duport	Professeur de l'Université d'Avignon
	Mme Isabelle Iost	Chargée de recherche CNRS
	M. Christophe Nguyen-the	Directeur de recherche INRA
	Mme Véronique Broussolle	Chargée de recherche INRA

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

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mon travail, et en particulier Messieurs Jean Michel Panoff et Yves le Loir, rapporteurs de ma thèse.

Merci à toi Isabelle pour ton accueil si chaleureux lors de mes séjours à Bordeaux, pour ta gentillesse et ta grande disponibilité. Je te suis extrêmement reconnaissant de m'avoir donné accès aux techniques concernant les ribosomes et pour avoir partagé un peu de ton savoir avec moi.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur A.J Carpousis pour ses nombreux conseils prodigués tout au long de ma thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Monsieur Y. Bayon de Noyer pour m'avoir accueilli au sein de son entreprise en tant que moniteur conseil et pour m'avoir initié au monde de l'industrie agroalimentaire.

Avec la rédaction du manuscrit de thèse s'achève une aventure, un cycle de vie, propice à faire le point sur le chemin parcouru jusqu'à ce jour et point de départ de la vie d'après.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont traversé ma vie, toutes ces personnes avec qui j'ai partagé une heure, un mois ou plus et qui ont toutes contribué à leur façon à faire ce que je suis devenu. Je suis riche de toutes les expériences que nous avons pu partager.

Certaines personnes ont marqué plus fortement et mon parcours professionnel que ce soit par leur charisme, leur bienveillance, leur amitié ou leur amour.

J'adresse tous mes remerciements aux Professeurs Michel Fons et Thierry Giardina qui ont su me transmettre leur passion pour la recherche et me donner l'envie de réaliser une thèse.

Au cours de ces 4 années passées au sein de ce laboratoire, j'ai eu la chance de côtoyer des chercheurs confirmés qui ont tous contribué à enrichir ma culture scientifique. Je ne

saurais donc oublier Monsieur Frédéric Carlin pour ses nombreux conseils avisés et pour nos discussions sur l'orientation professionnelle. Mes remerciements les plus sincères s'adressent à Monsieur Julien Brillard pour les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues, pour le temps consacré à m'apprendre de nombreuses techniques, ainsi que pour ses idées toujours brillantes. J'ai pu rédiger ce manuscrit dans une ambiance agréable et studieuse grâce à mon collègue de bureau de ces 6 derniers mois de thèse, Monsieur Michel Jobin qui m'a apporté calme, soutien et bonne humeur dans tous les moments.

Deux personnes ont eu pour moi un rôle inestimable au cours de ce travail de thèse. Tout d'abord, Monsieur Christophe Nguyen-the, directeur de notre laboratoire. Christophe, je vous adresse mes plus profonds remerciements et toute ma gratitude pour votre disponibilité permanente malgré vos nombreuses sollicitations, pour toutes les discussions scientifiques au cours desquelles vous m'avez montré le chemin de la réflexion. Je suis également heureux d'avoir pu partager avec vous l'expérience du monitorat conseil et bénéficier ainsi de votre connaissance de l'industrie agroalimentaire.

Au cours de ce travail de thèse j'ai été guidé par Madame Véronique Broussolle. Véro, je ne sais comment t'exprimer toute ma reconnaissance pour ton encadrement au quotidien. Tu m'as transmis le savoir être et les savoir faire d'un chercheur. Tu as toujours été à mes côtés pour me pousser dans les moments de découragements pour obtenir le meilleur de moi-même et me donner confiance en moi. Ces 4 années à tes côtés ont également été un enrichissement personnel et l'occasion pour moi d'acquérir de la maturité. Je me sens prêt désormais à voler de mes propres ailes sans aucune appréhension. La langue française n'a pas inventé d'autre mot pour remercier alors je te dis avec tout mon cœur : merci pour tout.

Je tiens également à remercier Benoit, Gérémy, Florian, Sabrina et Caroline pour leur bonne humeur et pour les bons moments passés ensemble. Merci également à tous les membres du laboratoire.

Sur un plan plus personnel, je tiens à remercier du plus profond de mon cœur mes parents pour leur amour quotidien, pour leur présence dans tous les moments, pour les sacrifices consentis pour ma réussite scolaire. Même si nous ne nous sommes pas toujours compris, nous sommes restés une famille unie.

Je souhaite exprimer toute mon amitié aux personnes qui ont été à mes côtés tout au long de ces années. Merci à Christelle et Marie Solenne, même si nous ne nous voyons pas autant que nous le souhaiterions, votre soutien a toujours été précieux. Merci à toi Florian pour ta bonne humeur, pour les parties de squash et de PES qui m'ont bien changé les idées.

Merci à Lucille pour ta présence et ton amitié réconfortante ainsi que pour tous les bons moments passés dans ton coin de paradis. Merci également à tes parents pour nous avoir toujours aussi bien accueillis.

Aline, je suis vraiment heureux de t'avoir rencontrée et je suis encore plus heureux que nos rapports professionnels se soient peu à peu transformés en amitié. Bien que nous soyons séparés par des milliers de kilomètres, tu m'as toujours apporté ton soutien et tu as toujours été présente pour m'écouter, me réconforter et me redonner la « pêche ». Je me languis de ton retour en métropole pour que nous puissions nous revoir.

Merci à toi Benoit dit bébé Ribenut, ton arrivée au labo nous a apporté de la bonne humeur avec tes blagues mythiques et tes jeux de mots d'un autre monde. Je garde un excellent souvenir de toutes nos conversations scientifiques et de toutes nos tentatives de modélisation. Même si je ne te connais que depuis moins de douze mois (spéciale dédicace), tu m'as beaucoup aidé à relativiser, à aller de l'avant durant les derniers mois de thèse et la rédaction de ce manuscrit. Notre vision similaire de la vie nous a rapproché et je souhaite de tout mon cœur que nous gardions contact.

Laurent, tu m'as apporté au cours de ces années tellement de réconfort, nous avons partagé tellement de bons moments qui ont été pour moi des occasions de m'évader et de repartir de plus belle. Tu as toujours été là et surtout dans les moments difficiles, à mes côtés quoi qu'il arrive. Nous avons grandi ensemble et pour moi qui suis fils unique, j'ai trouvé en toi bien plus qu'un ami. Tu es pour moi un frère. Je suis heureux d'avoir pu rencontrer Marion que j'adopte bien volontiers tellement elle est adorable. Enfin je tiens à remercier, Patrick, Colette et Nico pour m'avoir toujours accueilli chez eux comme un membre de leur famille.

Pour clore ce chapitre des remerciements, j'ai choisi la personne la plus importante à mes yeux. Charlotte, nous avons traversé ensemble tant de bons moments, mais aussi tant d'évènements difficiles et cruels. Tu as toujours été à mes côtés, mon épaule pour pleurer, ma confidente sans jamais d'autre jugement que ton amour. Tu m'as toujours épaulé, rassuré,

soutenu, tu as fait preuve d'une patience exemplaire lorsque tu subissais toutes mes répétitions de présentations, lorsque tu relisais tous mes rapports. Je te présente toutes mes excuses pour ne pas avoir été suffisamment présent à tes côtés. Je suis heureux de construire mon avenir avec toi. XoXo

« On ne voit bien qu'avec le cœur. L'essentiel est invisible pour les yeux »

« Le petit Prince, Antoine de Saint Exupery »

A mes parents

A mon petit frère

A la femme de ma vie

« Notre vie vaut ce qu'elle nous a coûté d'efforts »

(François Mauriac)

Table des matières

Table des illustrations	1
Liste des abréviations	2
Avant-propos	4
Etude bibliographique.....	6
I. <i>Bacillus cereus</i>: un pathogène alimentaire capable de croître à basse température	6
1. Groupe <i>Bacillus cereus</i>	6
a. Caractéristiques et identification.....	6
b. <i>B. cereus</i> , agent de toxi infection alimentaire	8
2. Diversité écologique de <i>B. cereus</i>	8
II. Mécanismes bactériens d'adaptation aux basses températures de croissance	11
1. Le froid altère les fonctions essentielles de la bactérie	11
a. Définition du stress froid	11
b. Réponse au stress froid.....	12
2. Mécanismes de perception et d'adaptation à basse température.....	15
a. Maintien des échanges avec le milieu extérieur.....	15
b. Modification de la topologie des acides nucléiques	17
c. Synthèse protéique à basse température.....	19
d. Modification du métabolisme	22
e. Repliement des protéines à basse température.....	24
f. Régulateurs transcriptionnels majeurs à basse température.....	25
g. Choc froid, adaptation au froid et sporulation	26
h. Adaptation des bactéries psychrotrophes	27
III. Les hélicases à ARN	30
1. Hélicase à ARN à boîte DEAD: de la structure à la fonction	30
a. Structure des hélicases à ARN.....	31
b. Activités des hélicases à ARN.....	32
2. Hélicase à ARN et adaptation aux stress.....	38
3. Importance des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid: implication et rôles.....	39
a. Implication dans l'adaptation au froid.....	39
b. Rôle dans la traduction et la biogenèse des ribosomes à basse température	39
c. Implication dans la dégradation des ARN	41
IV. Adaptation au froid de <i>B. cereus</i>	46
V. Présentation du sujet de thèse	49
Résultats.....	50
Chapitre 1: Identification de gènes impliqués dans l'adaptation au froid de <i>B. cereus</i>	50
1. Introduction à l'étude	50
2. Stratégie envisagée	51
a. Construction et criblage à basse température d'une banque de mutants transpositionnels	51
b. Identification des gènes interrompus par le transposon.....	51
c. Caractérisation du gène <i>BC0259</i>	52
3. Résultats et discussion	53

4. Insertional mutagenesis reveals genes involved in <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 growth at low temperature	55
Abstract	56
Introduction	57
Materials and methods	58
Results	61
Discussion	66
References	69
Chapitre 2 : Implication des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid de <i>B. cereus</i>.....	73
1. Introduction à l'étude	73
2. Stratégie envisagée	74
a. Quantification de l'expression des gènes codant pour les hélicases à ARN	74
b. Délétion des gènes codant pour les hélicases à ARN.....	74
c. Caractérisation des mutants de délétion.....	75
d. Complémentation des mutants de délétion	75
3. Résultats et discussion	76
4. Differential Involvement of the Five RNA Helicases in the Adaptation of <i>Bacillus cereus</i> ATCC14579 to Low Growth Temperatures	78
Abstract	79
Introduction	80
Materials and Methods	82
Results	89
Discussion	100
References	105
Chapitre 3 : Implication des hélicases à ARN dans l'adaptation aux stress abiotiques de <i>B. cereus</i>	110
1. Introduction à l'étude	110
2. Stratégie envisagée	111
a. Croissance de la souche sauvage et des mutants Δcsh en condition de stress abiotique.....	111
3. Résultats et discussion	112
4. Implication of the five RNA helicases in <i>B. cereus</i> ATCC 14579 adaptation to abiotic stresses 115	115
Abstract	116
Material and Methods	117
Results	119
Discussion	127
References	130
Chapitre 4 : L'hélicase à ARN <i>CshA</i> est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr à basse température.	133
1. Introduction à l'étude	133

2. Stratégie envisagée	135
a. Analyse de profils ribosomiques et localisation de CshA.....	135
b. Détermination de la qualité des ARN extraits.....	135
c. Identification des partenaires protéiques de CshA.....	136
3. Résultats et discussion	137
4. <i>The DEAD-box RNA helicase CshA of Bacillus cereus ATCC 14579 is associated to ribosomes and essential for RNA stability at low temperature</i>	139
Abstract	140
Material and methods	141
Results	144
Discussion	152
References	155
<i>Expériences complémentaires</i>	158
<i>Conclusion générale et perspectives</i>	163
<i>Références bibliographiques</i>	171
<i>Valorisation du travail de thèse</i>	189
Résumé	198

Table des illustrations de l'étude bibliographique

Figure 1: observation au microscope optique : de cellules végétatives (A) et de spores (B) de <i>B. cereus</i> (INRA, Avignon)	6
Figure 2: Colonies de <i>B. cereus</i> ATCC 14579	1
Figure 3: Diversité écologique du groupe <i>B. cereus</i>	10
Figure 4: Evolution de la synthèse protéique après une chute de température	13
Tableau 1: Gènes et protéines de choc froid d' <i>E. coli</i>	14
Figure 5: Exemple d'adaptation de la membrane de <i>B. subtilis</i> à une baisse de température	16
Figure 6: Positionnement des différents éléments régulateurs de l'expression de <i>CspA</i> d' <i>E. coli</i> à basse température	20
Figure 7: Séquence primaire des acides aminés de <i>CspA</i>	21
Figure 8: Régulation de l'expression d'un gène par une protéine senseur de la température :	25
Figure 9: Cladogramme schématique représentant les 3 familles identifiées de SF1 et les 9 familles identifiées de SF2	31
Figure 10: (A) Représentation schématique de la répartition des 9 motifs conservés sur la séquence primaire d'une hélicase à ARN	32
Figure 11: Schématisation du déroulement des ARN selon le "Inchworm model".)	35
Figure 12: Schématisation du déroulement des ARN selon le "Modified rolling model".	35
Figure 13: . Schématisation du déroulement des ARN selon le "destabilization model".	37
Figure 14: Principales voies de dégradation des ARNm chez <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i>	42
Figure 15: Organisation de l'assemblage du dégradosome de <i>E. coli</i>	44
Figure 16: Représentation schématique du dégradosome de <i>B. subtilis</i>	45

Liste des abréviations

ADN/DNA	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADP	Adénosine Di Phosphate
AMP	Adénosine Mono Phosphate
Ap	Ampicilline
ARN/RNA	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BC	<i>Bacillus cereus</i>
CAP	Cold Acclimation Protein ou protéine d'acclimatation au froid
CSH	Cold Shock Helicase ou helicase de choc froid
CSP	Cold Shock Protein ou protéine de choc froid
D.O	Densité optique
Da	Dalton
DEAD	Acide aspartique-Acide Glutamique-Alanine-Acide aspartique
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acétate
EGTA	Ethylene Glycol Tetra-acetic Acid
Em	Erythromycine
HCl	Acide Chlorhydrique
kb	kilo base
LB	Luria Bertani
ORF	Open Reading Frame ou cadre ouvert de lecture
pb	paire de base
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
PM	Poids Moléculaire
PNPase	PolyNucléotidePhosphorylase
RACE-PCR	Rapid Amplification of cDNA Ends ou réaction d'amplification par PCR des extrémités de ADNc
RNase	RiboNucléase

RNP	Ribo Nucleo Proteine
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
TAE	Tris Acetate EDTA
TAP-Tag	Tandem Affinity Purification ou Purification par Affinité en Tandem
TIAC	Toxi Infection Alimentaire Collective
Tn	Transposon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethane
UV	Ultra Violet
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
Xyl	Xylose

Avant-propos

La dernière décennie a été source de nombreuses évolutions de nos comportements alimentaires. L'accélération des rythmes de vie et de travail ne laisse que peu de temps pour la confection de plats cuisinés "faits maison". Dans un souci de gain de temps et de praticité, les consommateurs se sont tournés vers une cuisine prête à l'emploi, rapide et pratique. Pour répondre à cette demande, les industriels de l'agroalimentaire ont multiplié les innovations et les références créant ainsi un marché de plats cuisinés prêts à consommer.

Ces plats sont composés pour la plupart de légumes, de viandes ou de poissons. La conservation des qualités nutritionnelles et organoleptiques de ces produits fragiles nécessite un nombre limité de transformations dont l'intensité doit être maîtrisée. La principale transformation consiste en un chauffage modéré entre 65°C et 100°C sur une période allant de 45 à 90 minutes, conduisant à une cuisson non stérilisante appelée pasteurisation. Les plats cuisinés sont ensuite emballés sous vide ou sous atmosphère protectrice et leur conservation s'effectue entre 2°C et 6°C.

La pasteurisation permet la destruction de toutes les formes végétatives présentes dans les matières premières. En revanche, elle n'est pas suffisante pour éliminer les spores qui sont des formes de résistance. Pour retarder le développement de ces spores, les produits doivent être conservés sous chaîne du froid. Parmi les bactéries sporulées rencontrées dans les plats cuisinés pasteurisés, *Bacillus cereus* est particulièrement fréquent. Les spores de ce pathogène de l'Homme possèdent des propriétés de résistance aux traitements thermiques et de désinfections couramment utilisés pour le nettoyage des équipements. Elles possèdent également des propriétés importantes d'adhésion aux surfaces permettant ainsi la persistance de ces spores dans la chaîne de fabrication des aliments.

La persistance de ces formes de résistance et leur multiplication dans les aliments présentent un risque microbiologique non négligeable pour le consommateur. En effet, l'ingestion d'aliments contaminés par une grande quantité de cellules de *B. cereus*, peut conduire à des toxi-infections alimentaires.

B. cereus est la quatrième cause de toxi-infection alimentaire collective (TIAC) en France en 2009. Les populations associées à ces TIAC sont souvent très importantes, de

l'ordre de 10^4 à 10^6 unités formant colonie par gramme d'aliment. Un tel niveau de population suggère que la bactérie soit capable de survivre et de s'adapter aux conditions de stress rencontrées tout au long de la chaîne de fabrication des aliments.

L'adaptation de *B. cereus* aux conditions de conservations à basse température est l'une des étapes clés, conditionnant un développement bactérien suffisant pour être cause de TIAC. Les recherches menées au sein de l'unité Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale sont centrées sur l'étude moléculaire des mécanismes permettant la survie et le développement de *B. cereus* aux températures de réfrigération, ainsi que l'appréciation quantitative du risque lié à la consommation de produits prêts à consommer.

Ce travail s'inscrit dans la démarche d'une meilleure compréhension des mécanismes d'adaptation au froid de *B. cereus*, afin de permettre une maîtrise accrue des risques de sa survie et de sa croissance au cours de la conservation des aliments.

Etude bibliographique

I. *Bacillus cereus*: un pathogène alimentaire capable de croître à basse température

1. Groupe *Bacillus cereus*

a. Caractéristiques et identification

Le groupe *Bacillus cereus sensu lato* est composé de 6 espèces reconnues extrêmement proches phylogénétiquement: *B. thuringiensis*, entomopathogène utilisé en agriculture comme agent de lutte contre les insectes (Schnepf *et al.*, 1998; Aronson and Shai, 2001), *B. anthracis*, pathogène de l'Homme et de l'animal, agent causal de l'anthrax (Mock and Fouet, 2001), *B. mycooides* et *B. pseudomycooides*, espèces caractérisées par la formation de rhizoïdes (Nakamura, 1998), *B. weihenstephanensis*, qui réunit des espèces psychrotrophes capables de croître en dessous de 7°C (Lechner *et al.*, 1998) et *Bacillus cereus sensu stricto*, agent de TIAC mais aussi impliqué dans certains cas de surinfections locales (Bottone, 2010). L'ensemble des travaux de thèse exposés dans ce manuscrit porte sur la souche de référence de l'espèce *Bacillus cereus sensu stricto* ATCC 14579 qui a été isolée, à l'origine, de l'air d'une étable au Royaume Uni au XIXe siècle (Frankland and Frankland, 1887) et dont le génome a été séquencé et publié pour la première fois en 2003 (Ivanova *et al.*, 2003)

B. cereus est un bacille à Gram positif d'environ 1µm de large et de 3 à 5 µm de long, capable de produire des endospores, aérobie-anaérobie facultatif possédant une ciliature péritriche. Les spores ovoïdes de *B. cereus*, non déformantes, sont situées en position centrale ou subterminale, à raison d'une spore par cellule (Figure 1). La gamme de température de croissance varie de 5 à 50°C, avec un optimum compris entre 30°C et 45°C (Kramer and Gilbert, 1989; Guinebretiere *et al.*, 2008).

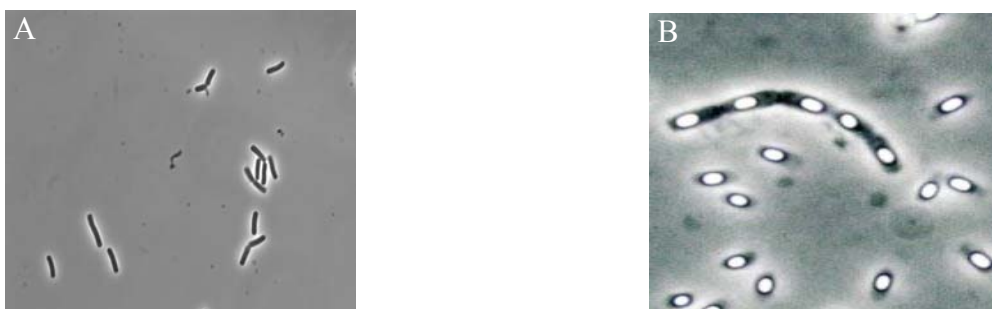


Figure 1: observation au microscope optique : de cellules végétatives (A) et de spores (B) de *B. cereus* (INRA, Avignon)

Il est possible de distinguer *B. cereus* des autres *Bacillus* de morphologie similaire de part la mobilité, l'activité hémolytique, l'incapacité à fermenter le mannitol, ainsi que par la production d'une lécithinase extrêmement active (Guinebretiere and Sanchis, 2003). Le milieu MYP (mannitol- egg yolk- phenol red-polymyxin agar) permet de mettre en évidence l'activité lécithinase par un précipité visible autour de la colonie, et l'incapacité de *B. cereus* à fermenter le mannitol, qui se traduit par une coloration rose rouge autour de la colonie (Fricker *et al.*, 2008) (Figure 2A). L'activité hémolytique est mise en évidence par étalement sur gélose au sang de mouton et se manifeste par une zone de lyse caractéristique aux abords de la bactérie (Figure 2B). La mobilité importante de *B. cereus* est étudiée sur un milieu dit de mobilité (agar à 0.25%) (Figure 2C).

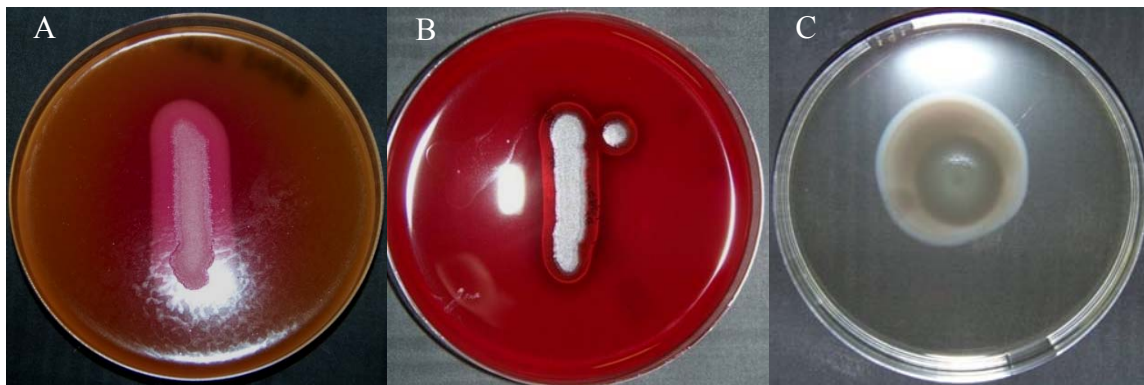


Figure 2: Colonies de *B. cereus* ATCC 14579 après 24h d'incubation à 30°C sur milieu MYP (A), gélose au sang de mouton (B), milieu de mobilité (C)

B. cereus est une bactérie largement répandue dans la nature, présente dans plusieurs réservoirs. Elle pourrait vivre en symbiose dans l'intestin de différentes espèces d'arthropodes, où elle serait capable d'accomplir un cycle complet de multiplication, sporulation, germination des spores (Margulis *et al.*, 1998). Cette espèce saprophyte du sol est également capable de se multiplier et de produire des spores qui lui permettront de persister dans le sol où elle est extrêmement représentée (Kotiranta *et al.*, 2000; Vilain *et al.*, 2006). Ces spores sont retrouvées comme contaminant des matières premières en contact direct ou indirect avec le sol.

Les propriétés de résistance aux traitements thermiques et de désinfections conduisent à la persistance de spores dans les aliments transformés (Guinebretiere and Sanchis, 2003). La conservation de ces produits dans des conditions non adaptées, permettant la germination des spores puis la croissance de *B. cereus*, est à l'origine de TIAC.

b. *B. cereus*, agent de toxico-infection alimentaire

B. cereus est la quatrième cause de TIAC en France, avec 330 cas déclarés en 2008 soit environ 11.8% des TIAC recensées (INVS, 2009).

Deux types de syndromes, l'un émétique et l'autre diarrhéique, sont associés aux TIAC impliquant *B. cereus*. Le syndrome émétique est dû à une intoxication, suite à l'ingestion d'une toxine appelée céréulide, préformée dans l'aliment avant ingestion. Les principales manifestations de ce syndrome durent entre 6 et 24h et sont retrouvées dès la première demi-heure et jusque dans les 6h suivant l'ingestion de l'aliment contaminé (Ehling-Schulz *et al.*, 2004). Le syndrome diarrhéique est le résultat de l'ingestion de cellules végétatives ou de spores, qui produiront des toxines au niveau de l'intestin. Le temps d'incubation est donc plus long que pour le précédent syndrome, et les premiers symptômes ne s'expriment généralement qu'au-delà de 6h après l'ingestion pour une durée variant entre 12 et 24h (Granum *et al.*, 1993; Clavel *et al.*, 2007). Ces deux syndromes requièrent une population importante comprise entre 10^5 et 10^8 cellules par gramme d'aliment.

Les TIAC à *B. cereus* sont généralement bénignes, néanmoins quelques épisodes mortels ont été décrits montrant que la virulence de *B. cereus* n'est pas à négliger (Lund *et al.*, 2000; Dierick *et al.*, 2005).

2. Diversité écologique de *B. cereus*

B. cereus est un groupe composé de différentes espèces proches génétiquement réunies sous la dénomination de "Groupe *B. cereus*" ou "*B. cereus* sensu lato". Les études récentes montrent que la classification en 6 espèces basée sur la virulence, la physiologie ou encore la morphologie, ne correspond pas à des critères de divergence génétique (Guinebretiere and Sanchis, 2003; Hill *et al.*, 2004). Une gamme très large de température de croissance est enregistrée au sein du Groupe *B. cereus*. La température de croissance varie entre souche et ne correspond pas à une espèce de ce groupe. L'espèce définie comme psychrotolérante *B. weihenstephanensis* ne contient pas de souches non psychrotolérantes, mais certaines souches psychrotolérantes n'appartiennent pas à l'espèce *B. weihenstephanensis*.

Afin d'éclaircir la classification existante, Guinebretière et al (*Guinebretiere et al., 2008*) ont montré que la structure génétique du groupe *B. cereus* regroupait au sein d'un même groupe phylogénétique, des souches appartenant à des espèces différentes mais partageant le même domaine de température de croissance. Les auteurs ont ainsi étudié les relations phylogénétiques de 425 souches des six espèces de *B. cereus*, par analyse de profils fAFLP, séquences du gène de ménage *panC* et recherche de signatures de psychrotrophie sur les séquences des gènes *rrs* et *cspA*.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de 7 groupes phylogénétiques distincts, possédant une gamme de température propre à chacun et qui sont représentés dans la Figure 3. Le groupe I regroupe les souches de l'espèce *pseudomycoïdes*, dont la température de croissance est comprise entre 10°C et 43°C. Les groupes III, IV et V regroupent les souches de *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis*, les plus mésophiles du groupe *B. cereus*. Le caractère mésophile est de plus en plus marqué du groupe V vers le groupe III qui regroupe les souches de *B. anthracis*. Le groupe VII contient les souches les plus thermophiles, dont la température de croissance varie de 20°C à 50°C. Ce groupe est très éloigné des 6 autres et il a été récemment proposé que la souche NVH-391.98 soit représentative d'une nouvelle espèce thermophile appelé *B. cytotoxicus* (Auger et al., 2008).

Le groupe II est composé des souches psychrotrophes de *B. cereus* et *B. thuringiensis* et le groupe VI contient les souches psychrotrophes de *B. weihenstephanensis* et *B. mycoïdes*. Ces deux groupes psychrotrophes se différencient par leur gamme de température de croissance: les souches du groupe II ne présentent pas de croissance en dessous de 7°C et peuvent croître jusqu'à 40°C, alors que celles du groupe VI sont capables de croître dès 5°C mais sont incapables de croître au-delà de 37°C. Seules les souches appartenant au groupe VI possèdent une signature de psychrophilie dans la séquence du gène *cspA*, qui est un bon marqueur de discrimination entre les deux groupes de souches psychrotrophes. Cette classification confirme que les souches psychrotrophes ne sont pas obligatoirement membres de l'espèce *B. weihenstephanensis* (Stenfors and Granum, 2001).

Le groupe VII serait le groupe le plus proche d'un ancêtre commun, et Guinebretière et al suggèrent que le groupe *B. cereus* soit issu d'un ancêtre thermophile et qu'il évolue vers la psychrophilie, permettant ainsi une adaptation à de nouvelles niches écologiques. La coexistence de deux groupes psychrotrophes semble indiquer des évolutions parallèles, en

réponse à une même contrainte. Les souches du groupe VI sont les plus fortement marquées par le caractère psychrotrophe, alors que les souches du groupe II semblent être en cours de différenciation des groupes mésophiles.

Les souches impliquées dans des cas de TIAC sont regroupées majoritairement dans les groupes III, IV et VII. Les souches psychrotrophes du groupe VI n'ont pas été associées à des TIAC et possèdent un faible potentiel cytotoxique *in vitro* (Cadot *et al.*, 2010). Certaines souches du groupe VI sont toutefois capables de produire la toxine émétique et la capacité à synthétiser cette toxine, apportée par un plasmide, pourrait être transférée d'une souche vers une autre (Thorsen *et al.*, 2006). Au contraire du groupe VI, le groupe II (psychrotrophe) comporte des souches isolées de TIAC. Il existe donc un risque d'émergence de souches productrices de toxine et capables de s'adapter aux températures de réfrigération.

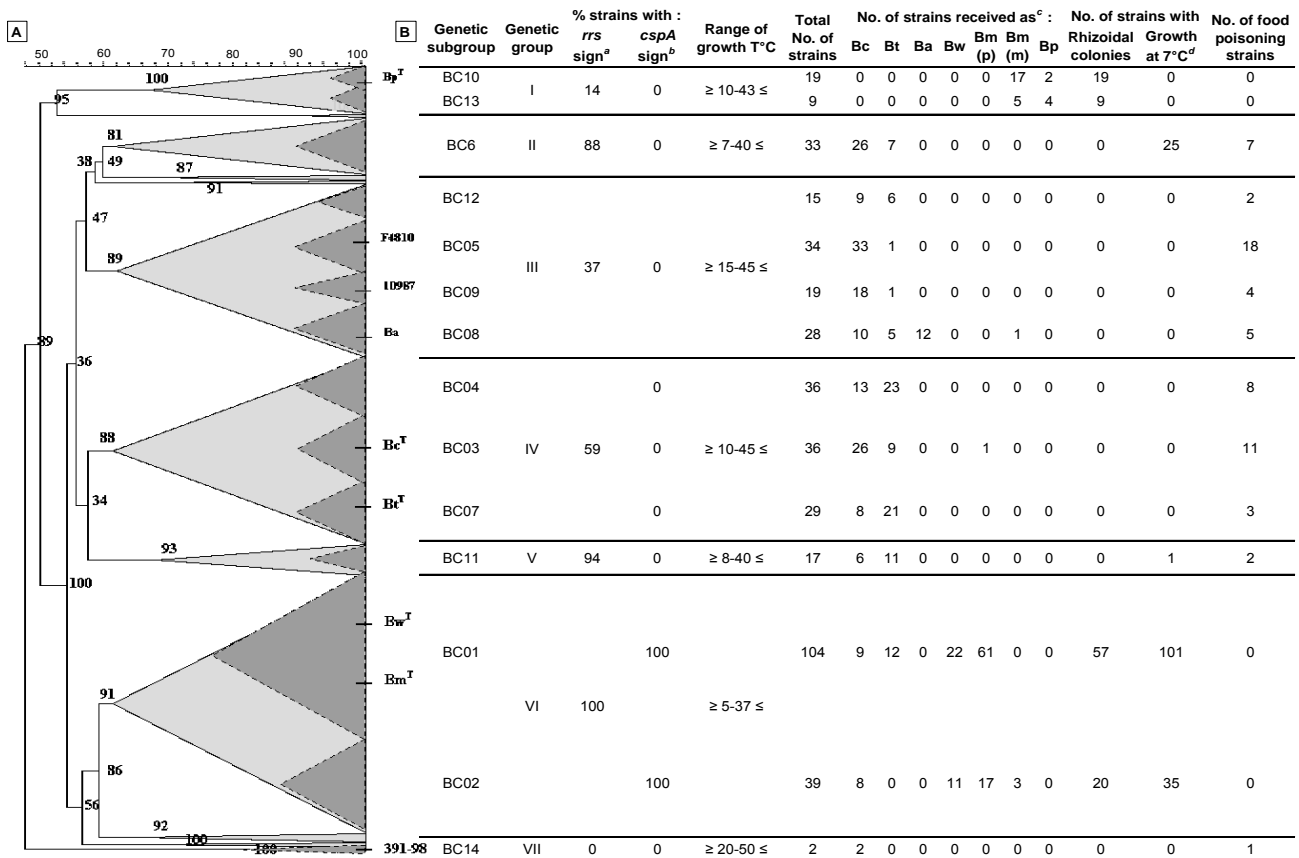


Figure 3: Diversité écologique du groupe *B. cereus* (Guinebretière et al, 2008)

tel-00765823, version 1 - 17 Dec 2012

II. Mécanismes bactériens d'adaptation aux basses températures de croissance

1. Le froid altère les fonctions essentielles de la bactérie

a. Définition du stress froid

La température interne des bactéries est directement dépendante de celle de l'environnement dans lequel elles évoluent, puisqu'elles sont incapables de réguler leur température. L'adaptation des bactéries au froid nécessite donc qu'elles puissent réaliser les réactions nécessaires à la vie cellulaire, dans des conditions thermo-dynamiquement défavorables (Georlette *et al.*, 2004).

Les bactéries ont la capacité de coloniser des environnements extrêmement différents, souvent caractérisés par des changements brutaux de température. Les bactéries doivent être alors capables de s'adapter à l'environnement hostile dans lequel elles évoluent. La basse température perturbe fortement les systèmes biologiques, tant sur un plan physiologique que métabolique. Le développement de la bactérie se fait au prix du maintien de toutes les fonctions vitales telles que les échanges avec le milieu extérieur, la réplication de son matériel génétique, la transcription et la traduction des ARNm en protéines. Les perturbations engendrées par le froid sont le fruit d'une modification drastique des paramètres thermodynamiques au sein de la cellule, réduisant ou empêchant les réactions biochimiques (Georlette *et al.*, 2004; Bjelic *et al.*, 2008).

Le froid est une description qualitative de la température, relativement à la température optimale de croissance d'un organisme. Pour une bactérie mésophile, telle que *E. coli*, le transfert de 37°C à 15°C entraîne la mise en place d'une réponse adaptative au stress froid permettant un retour à une croissance normale (Jones *et al.*, 1996; Ray, 2006). *Methanococcus jannaschii* est une archaebactérie hyperthermophile dont l'optimum de croissance se situe au-delà de 80°C: son transfert à une température suboptimale de 65°C entraîne la mise en place d'une réponse permettant une reprise de croissance adaptative, de même type que celle d'*E. coli*. Au cours de cette phase d'adaptation, qui se traduit par un arrêt de croissance, il y a surexpression de gènes en lien avec la transcription, la traduction, ou le repliement des protéines (Boonyaratanakornkit *et al.*, 2005). Le gène le plus surexprimé est

celui codant pour une hélicase à ARN à boîte DEAD (MJ0669), dont la structure fut résolue en 2001 (Story *et al.*, 2001). Une réponse similaire est observée lors du transfert, de 95°C à 72°C, de l'archaebactérie *Pyrococcus furiosus* (Weinberg *et al.*, 2005).

L'archaebactérie *Methanococoides burtonii* est, quant à elle, parfaitement adaptée à l'environnement polaire dans lequel elle évolue, bien que sa température optimale de croissance soit de 23°C. L'analyse du protéome de cellules cultivées à 4°C vs 23°C révèle la surproduction d'un grand nombre de protéines permettant l'adaptation au froid de cette archaee, ces protéines sont impliquées dans de nombreuses fonctions vitales de la cellule telles que le métabolisme énergétique, la synthèse de précurseurs métaboliques ou bien la régulation de l'expression des gènes (Goodchild *et al.*, 2004).

Ces différents exemples montrent combien la notion de stress froid est en fait relative, le paramètre important étant l'amplitude entre la température du milieu et la température optimale de croissance de la bactérie (ΔT). Lorsque ce ΔT augmente, la bactérie met en place une réponse adaptative connue sous le nom de "cold shock response" (Thieringer *et al.*, 1998).

b. Réponse au stress froid

Un abaissement important de la température environnementale induit un ralentissement ou un arrêt total de la croissance bactérienne. Cette phase de latence, décrite chez *E. coli* sous le nom de "cold acclimation phase", permettrait à la bactérie de mettre en place tous les mécanismes nécessaires à l'adaptation au froid (Graumann and Marahiel, 1996; Hebraud and Potier, 1999). Cette « cold shock response » se traduit par un arrêt partiel ou total de la synthèse de protéines de ménage au profit de la synthèse de protéines impliquées dans l'adaptation de toute la machinerie cellulaire et dans la protection de la cellule du froid (Thieringer *et al.*, 1998; Hebraud and Potier, 1999; Weber and Marahiel, 2002; Phadtare, 2004)

Cette réponse, principalement étudiée chez *E. coli* et *B. subtilis*, se déroule en deux phases et induit la production de deux grandes familles de protéines (Figure 4): la première phase se déroule immédiatement après la chute de température, il s'agit d'une réponse rapide et aigue au cours de laquelle se déroule une synthèse massive et transitoire de protéines de classe I, appelées « Cold Shock Proteins » ou CSP. La seconde phase se déroule plus

tardivement lorsque les CSP sont déjà en place et implique des protéines de classe II appelées « Cold Acclimation Proteins » ou CAPs. Ces protéines CAP, qui sont synthétisées progressivement jusqu'à atteindre un niveau modéré, sont déjà présentes à 37°C, alors que les CSP sont indétectables (Jones *et al.*, 1987; Thieringer *et al.*, 1998; Beckering *et al.*, 2002; Phadtare, 2004).

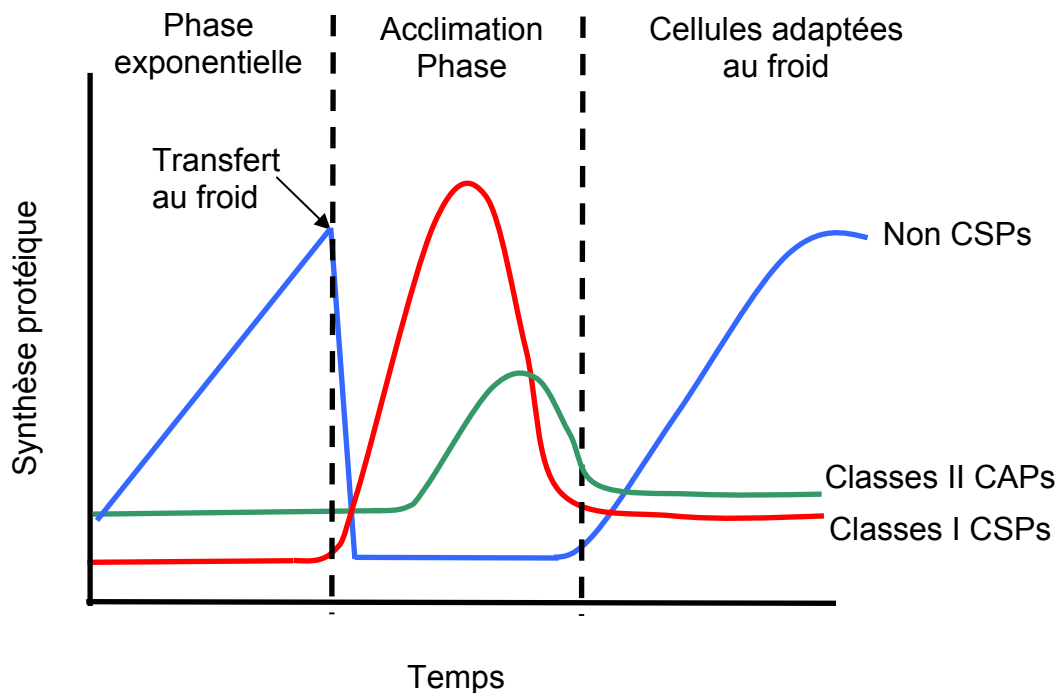


Figure 4: Evolution de la synthèse protéique après une chute de température (d'après Thieringer et al, 1998)

L'action des CSPs et CAPs permet l'adaptation de la bactérie à son milieu qui peut ainsi reprendre la synthèse des protéines de ménage, associée à un redémarrage de la croissance bactérienne, au cours de laquelle la synthèse de CAPs se poursuit jusqu'à une stabilisation du taux de croissance. Les protéines de classe I et II sont impliquées dans la mise en place d'une réponse adaptative à une baisse brutale de température. Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions et notamment dans la régulation de l'expression des gènes ainsi que dans le maintien d'une traduction efficace à basse température (Tableau 1).

Tableau 1:

Gène	Protéine	Fonction
aceE	AceE	Pyruvate dehydrogenase (decarboxylase)
aceF	AceF	Pyruvate dehydrogenase (dihydrolipoyltransacetylase)
cspA	CspA	RNA and DNA binding (CCAAT/GGTTA); RNA chaperone; transcriptional and translational enhancer
cspB	CspB	Unknown; RNA binding (U/T stretches)
cspE	CspE	RNA binding (AU/AT rich regions); nascent RNA chaperone; transcriptional antiterminator; PNPase and RNase E inhibitor
cspG	CspG	Unknown
cspI	CspI	Unknown
deaD	DeaD	RNA helicase; ribosome assembly?; RNA degradation?
dnaA	DnaA	DNA binding and replication (initiation); transcriptional regulator
gyrA	GyrA	DNA-binding/cleaving/rejoining subunit of gyrase
hns	H-NS	Nucleoid protein; transcriptional repressor; DNA supercoiling
hscA	Hsc66	DnaK homologue (Hsp70-type protein chaperone)
hscB	HscB	DnaJ homologue
hupB	HU _B	Nucleoid protein; DNA supercoiling
infA	IF1	Translation initiation, RNA binding
infB	IF2	Translation initiation; fMet-tRNA binding; protein chaperone
infC	IF3	Translation initiation; initiation site selection; RNA binding
nusA	NusA	Transcription elongation/termination/antitermination
otsA	OtsA	Trehalose phosphate synthase
otsB	OtsB	Trehalose phosphatase
pnp	PNPase	Exonuclease; degradosome component
rbfA	RbfA	Ribosome assembly/maturation
recA	RecA	Homologous recombination; SOS response
Tig	Trigger factor	Multiple stress protein; protein chaperone; ribosome binding
ves	Ves	Unknown
yfiA	pY	Translational (A-site) inhibitor

Gènes et protéines de choc froid d'*E. coli* (Gualerzi et al., 2003)

2. Mécanismes de perception et d'adaptation à basse température

La réponse adaptative au froid mise en place par les bactéries est multifactorielle car toutes les fonctions vitales sont affectées par une baisse de la température, que ce soit la fluidité membranaire, la topologie des acides nucléiques, l'adaptation de la machinerie traductionnelle, le métabolisme ou bien encore la conformation des protéines (Panoff *et al.*, 1998). La bactérie pourrait ainsi percevoir les variations de son environnement au travers de ces altérations induites à basse température (Shivaji and Prakash, 2010).

a. Maintien des échanges avec le milieu extérieur

La membrane plasmique joue un rôle essentiel dans la physiologie bactérienne en assurant l'interface entre le milieu intérieur et extérieur. Elle est le siège de nombreux transports actifs et passifs assurant l'équilibre osmotique et l'apport de nutriment à la cellule. Ces fonctions ne peuvent être assurées que si elle est dans un état fluide (Mansilla *et al.*, 2004). Une chute de température, en dessous du point de fusion des acides gras composant la membrane, entraîne la transition d'un état fluide (désordonné) vers un état non fluide (ordonné) dont le résultat est une rigidification de la membrane. En réponse, les bactéries peuvent modifier la composition et les propriétés de leurs acides gras membranaires.

La modification des acides gras peut se faire selon trois modalités: i) l'insaturation des acides gras, ii) la variation du niveau de ramification et iii) la diminution de la longueur des chaînes carbonées.

L'insaturation des acides gras conduit à un abaissement de leurs points de fusion permettant ainsi à la membrane de retrouver sa fonctionnalité. Les acides gras peuvent être synthétisés *de novo* ou résulter de l'introduction de doubles liaisons dans des acides gras existants par des désaturases. La rigidification de la membrane de la cyanobactérie *Synechocystis* par ajout de palladium induit la surexpression du gène *desA* codant pour une désaturase (Vigh *et al.*, 1993). La délétion de cette désaturase entraîne la surexpression de nombreux gènes connus pour être induits en réponse au froid (Inaba *et al.*, 2003). Le rôle du système à deux composants DesK/DesR dans la perception de la température a pu être démontré chez *B. subtilis*. A basse température, la forme phosphorylée de DesR serait capable d'induire l'expression du gène *des*, codant pour une désaturase, par fixation sur sa région

promotrice (Figure 5) (Aguilar *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2001; Weber and Marahiel, 2002). A basse température et en anaérobiose, l'induction du système DesKR ne conduit pas à la désaturation des acides gras membranaires. Dans ces conditions le maintien de la fonctionnalité membranaire serait exclusivement assuré par l'augmentation de la proportion d'acide gras antéiso (Beranova *et al.*, 2010). Un système comparable, CpxA- CpxR a été décrit chez *E. coli* (De Wulf *et al.*, 2000).

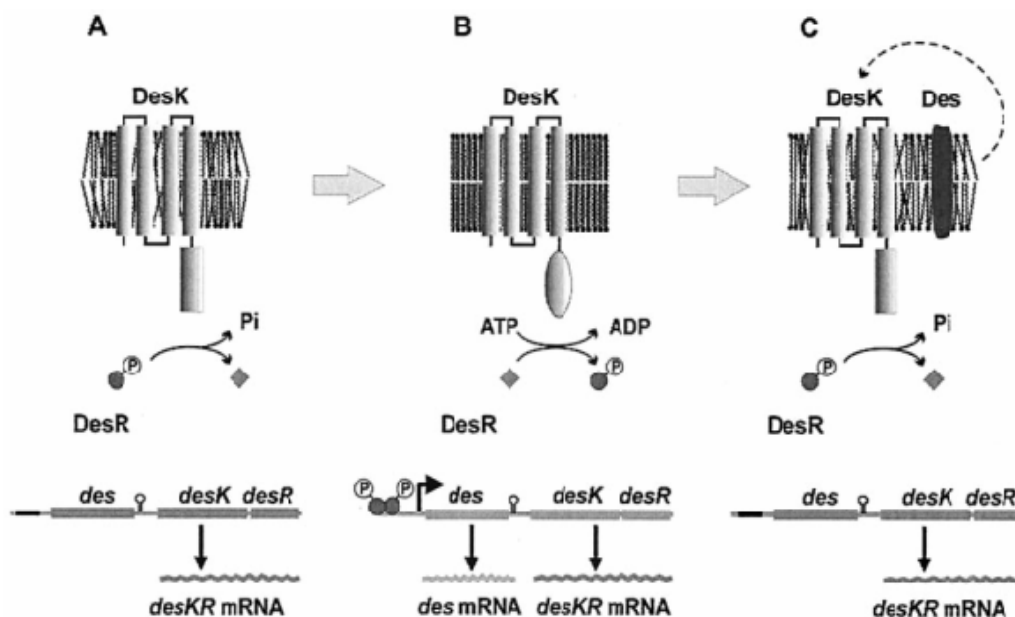


Figure 5: Exemple d'adaptation de la membrane de *B. subtilis* à une baisse de température: (A) à température optimale pas d'expression du gène *des* (B) une baisse de température entraîne l'activation de DesK qui phosphoryle DesR qui pourra alors entraîner la transcription du gène *des* (C) La desaturase peut modifier l'insaturation des acides gras membranaires et donc modifier sa fluidité (Mansilla *et al.*, 2004)

L'introduction d'une insaturation en position *cis* ou *trans* modifie les propriétés thermodynamiques des acides gras. L'isomère *cis* d'un acide gras procure une fluidité plus importante à la membrane que l'isomère *trans*. La bactérie psychrotrophe *Pseudomonas syringae* présente une augmentation de la quantité d'acide gras *trans* lors d'une croissance à 28°C par rapport à une croissance à 5°C (Kiran *et al.*, 2004; Kiran *et al.*, 2005).

La fluidité membranaire, notamment des bactéries de la famille des *Bacillus* peut être également régulée en augmentant la proportion d'acide gras branchés *antéiso* (Kaneda, 1991). En effet, les phospholipides possédant des acides gras ramifiés *antéiso* ont un point de fusion

abaissé en comparaison avec leurs homologues possédant une ramification *iso* (Lewis and McElhaney, 1985; Mantsch *et al.*, 1985).

Les acides gras à chaîne courte ont un point de fusion plus bas que les acides gras à chaîne longue: *Brevibacterium fermentans* est ainsi capable d'augmenter la quantité d'acide gras C15:0 et de réduire celle de C17:0 lors d'une diminution de la température en dessous de 30°C (Suutari and Laakso, 1992)

Listeria monocytogenes adapte sa fluidité membranaire à basse température notamment en réduisant la longueur de ses acides gras et en utilisant des acides aminés ramifiés tel que l'isoleucine comme précurseurs des acides gras antéiso dont la proportion membranaire peut augmenter de 70% lors d'une baisse importante de température (Zhu *et al.*, 2005). La surproduction préférentielle d'acide gras antéiso serait sous le contrôle de FabH qui est l'une des premières enzymes de la voie de condensation des acides gras, orientant ainsi la synthèse des différents acides gras en fonction du précurseur impliqué dans la réaction. A 10°C, l'efficacité catalytique de cette enzyme est maximale en présence du précurseur des acides gras antéiso, expliquant la forte surproduction de ces acides gras à basse température (Singh *et al.*, 2009).

La membrane bactérienne est le premier élément au contact de l'environnement extérieur et son implication dans la perception de la température suggère qu'elle pourrait être le premier élément dans le déclenchement de la réponse à une chute de température. Néanmoins, l'ensemble des mécanismes décrits dans l'adaptation de la fluidité membranaire semble varier d'un micro-organisme à l'autre et ne pas pouvoir être généralisé pour expliquer l'adaptation cellulaire à une variation de température.

b. Modification de la topologie des acides nucléiques

Il a été proposé que la baisse de température puisse être à l'origine de modification de la conformation des acides nucléiques de la bactérie (Eriksson *et al.*, 2002). Cette altération pourrait permettre à la bactérie de percevoir le changement de température dans son environnement.

i. Conformation de l'ADN

Les molécules d'ADN bactérien, chromosome et plasmides, sont généralement des structures circulaires, closes de manière covalente. La modification des paramètres thermodynamiques se traduit par une modification de l'enroulement de l'ADN pour compenser les variations d'énergie et éviter la dénaturation du brin d'ADN.

La baisse de température entraîne la formation de super enroulements négatifs de l'ADN, donnant une molécule d'ADN beaucoup plus compacte (Eriksson *et al.*, 2002). Cette modification de la topologie de l'ADN modifie la localisation des boîtes promotrices -35 et -10, entraînant par conséquent une variation positive ou négative de l'expression de nombreux gènes.

L'expression du gène de virulence *virF* de *Shigella exneri* peut être supprimée par une protéine CAP, la protéine H-NS, qui est capable de se lier à la région promotrice de *virF* à basse température (Tobe *et al.*, 1993). A 37°C, la région promotrice acquiert une conformation empêchant l'interaction avec H-NS et permettant l'activation transcriptionnelle de *virF* (Falconi *et al.*, 1998; Prosseda *et al.*, 1998).

Un tel changement de la topologie de l'ADN peut être modifié par l'action d'ADN gyrases, qui ont la capacité de relâcher localement les tensions induites par les super tours négatifs et ainsi permettre un repositionnement des régions promotrices. Les gyrases de *E. coli* et *B. subtilis* ont été décrites comme participant à l'adaptation au froid de ces bactéries en tant que CAPs et sont légèrement surexprimées suite à une chute de la température (Jones *et al.*, 1992; Beckering *et al.*, 2002).

Il a été récemment démontré que l'expression des gènes impliqués dans l'adaptation au froid est inhibée lorsque le super enroulement négatif de l'ADN est empêché (Prakash *et al.*, 2009). L'ensemble de ces observations suggère que la topologie de l'ADN joue un rôle dans la perception de la baisse de température et ainsi permettre l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress froid.

ii. Topologie de l'ARN

Les ARN sont capables de former des structures secondaires et tertiaires (Andersen and Delilhas, 1990), ainsi que des liaisons ARN/ARN (Lease and Belfort, 2000). Ces propriétés confèrent aux bactéries la capacité à percevoir un changement de température (Lai, 2003; Waldminghaus *et al.*, 2005). La protéine LcrF de *Yersinia pestis* est un facteur de virulence dont l'ARNm est capable de servir de thermo-senseur (Hoe and Goguen, 1993). A 25°C, l'ARNm est sous la forme de structure secondaire empêchant sa traduction. A plus haute température, les ARNm perdent leur structure secondaire permettant ainsi la production de protéines (Hoe and Goguen, 1993).

Un autre exemple illustrant l'importance de la topologie des ARN à différentes températures est celui de *prfA*, régulateur majeur de la virulence de *L. monocytogenes*. La traduction de PrfA entraîne l'activation des gènes de virulence. L'ARNm codant cet activateur possède une région 5' non traduite capable de réguler sa propre traduction. Ainsi à 37°C, l'ARN *prfA* est traduit par les ribosomes alors qu'en dessous de 30°C, la région 5' non traduite forme une structure secondaire stable capable de masquer le site de fixation des ribosomes, empêchant ainsi sa traduction. Ceci explique l'absence de virulence de *L. monocytogenes* à basse température (Johansson *et al.*, 2002)

c. Synthèse protéique à basse température

L'éloignement de la température optimale de croissance se traduit par un arrêt de la synthèse des protéines de ménage, dû aux perturbations subies par la machinerie traductionnelle. La bactérie adapte sa synthèse protéique aux nouvelles conditions environnementales, en produisant préférentiellement des CSPs qui permettent d'adapter les ribosomes à la traduction des ARNm codant pour des protéines non CSPs à basse température.

i. Production préférentielle de CSPs

La protéine CspA est majoritairement produite par *E. coli* en réponse à une baisse de température. Elle appartient à une famille qui comprend 9 membres, CspA à CspI, mais seules CspA, CspB, CspG et CspI sont induites par le froid et possèdent des fonctionnalités

redondantes (Yamanaka *et al.*, 1998). La régulation de l'expression de ces protéines se fait à la fois au niveau transcriptionnel et traductionnel (Figure 6).

Au niveau transcriptionnel, une région située en amont de la boîte -35 riche en A et T connue sous le nom de "AT rich up element" joue un rôle positif dans la transcription de ces gènes (Mitta *et al.*, 1997). Ces 4 CSPs induites par le froid se caractérisent par une extrémité 5' non traduite particulièrement longue. Cette extrémité 5' contient une séquence unique et extrêmement conservée de 11 bases appelée "cold box" (Jiang *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 2002). Cette région non traduite est également retrouvée sur les ARNm de nombreux gènes induits par une baisse de température. Ce site aurait pour rôle de stabiliser l'ARNm à basse température et de le déstabiliser à 37°C. La demi-vie de l'ARNm passerait ainsi de 12 secondes à 37°C à 20 minutes à 15°C (Mitta *et al.*, 1997). Cette cold-box permettrait l'autorégulation négative de l'expression de *cspA* par CspA (Phadtare *et al.*, 1999). La délétion de l'extrémité 5' non traduite entraîne une surexpression de *cspA* et un arrêt de croissance de la bactérie (Bae *et al.*, 1997).

L'ARNm de *cspA* contient sur sa partie traduite une séquence unique de 14 bases, située en aval du site d'initiation. Cette région, nommée "downstream box" (DB) et complémentaire de l'avant dernière boucle de l'ARNr 16S, est également retrouvée sur les ARNm codant pour CspB, CspG, CspI, CsdA et RbfA qui sont toutes des protéines induites lors d'une baisse de température (Mitta *et al.*, 1997). Ce motif aurait pour rôle de faciliter la formation du complexe d'initiation de la traduction à basse température, expliquant la traduction préférentielle de ces ARNm à basse température (Mitta *et al.*, 1997; Moll *et al.*, 2001).

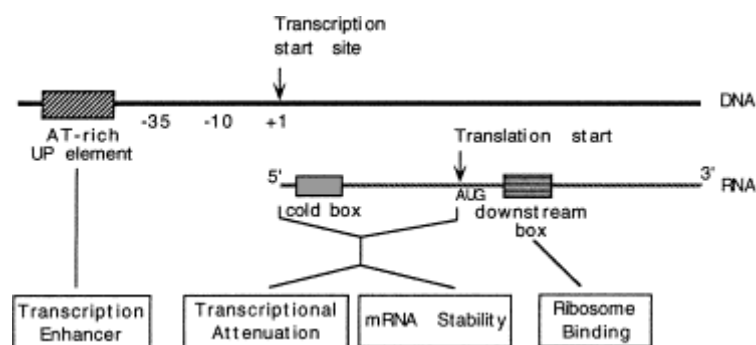


Figure 6: Positionnement des différents éléments régulateurs de l'expression de CspA d'*E. coli* à basse température (Thieringer *et al.*, 1998)

Ces protéines CSP sont retrouvées chez les bactéries à Gram positif et négatif, mais pas chez les archae et les cyanobactéries. Il existe des variations dans la production de CSP à basse température selon les espèces, seules CspC et CspD sont produites chez *B. subtilis* par exemple (Graumann *et al.*, 1996).

Les membres de la famille de CspA sont composés de 5 feuillets β , formant un tonneau β à la surface duquel sont exposés des résidus aromatiques et basiques permettant l'interaction avec les acides nucléiques. Ces protéines présentent des sites de fixation aux acides nucléiques RNP1 et RNP2 sur les feuillets $\beta 2$ et $\beta 3$ respectivement (Figure 7). Ces motifs confèreraient aux CSP des fonctions protéines chaperons en se fixant notamment sur les ARNm en cours de transcription, empêchant la formation de structures secondaires qui bloquent leur traduction. Cette stabilisation permet également la dégradation des ARNm à basse température (Graumann and Marahiel, 1998; Phadtare *et al.*, 1999). Certaines protéines CSPs, telles que RbfA ou CsdA, peuvent également interagir avec les ribosomes pour permettre une adaptation des ribosomes à la basse température.

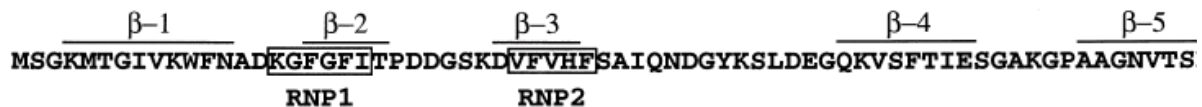


Figure 7: Séquence primaire des acides aminés de CspA, les feuillets β sont représentés par des traits et les sites de fixation aux ARNs sont encadrés (Max *et al.*, 2007)

ii. Adaptation de la machinerie traductionnelle

L'arrêt de la synthèse protéique suite à une baisse de température est dû à l'incapacité des ribosomes à traduire les ARNm ne contenant pas les éléments de régulation au froid. La stabilisation de structures secondaires au niveau des ARNm entraîne en effet une impossibilité à former un complexe d'initiation fonctionnel.

Les ribosomes semblent être un élément central dans la perception d'une baisse de température et dans le déclenchement de la réponse au froid. En effet, l'ajout de chloramphénicol, qui inhibe le fonctionnement des ribosomes, induit la production de CSPs (Vanbogelen and Neidhardt, 1990).

Les protéines produites préférentiellement au froid ont pour rôle d'adapter la machinerie traductionnelle afin que les ribosomes puissent à nouveau être capables de traduire les ARNm codant les protéines de ménage. Parmi les protéines CSP d'*E. coli*, produites en réponse à un choc froid, 3 protéines sont impliquées dans la traduction: i) IF2, facteur d'initiation permettant la liaison entre la sous-unité ribosomale 30S et l'ARNt initiateur (Gualerzi and Pon, 1990), ii) CsdA, hélicase à ARN dont le rôle serait de dérouler les structures secondaires d'ARNm et de participer au maintien de la conformation du ribosome à basse température (Jones *et al.*, 1996; Charollais *et al.*, 2004), iii) RbfA, facteur de liaison au ribosome capable d'interagir avec la sous-unité 30S du ribosome (Jones and Inouye, 1996). La présence de ces trois protéines est indispensable pour obtenir une croissance optimale d'*E. coli* à basse température, et semble nécessaire afin que les ribosomes soient fonctionnels à basse température.

Toutes ces données permettent de penser que les ribosomes, dont la fonction de traduction des gènes de ménage est altérée par le froid, synthétiseraient d'abord les protéines CSPs et CAPs. L'association de certaines de ces protéines telles que IF2, RbfA ou CsdA chez *E. coli* permettrait un retour à une synthèse protéique normale à basse température (Thieringer *et al.*, 1998; Giuliadori *et al.*, 2004).

d. Modification du métabolisme

Peu d'études décrivent la modification du métabolisme des bactéries en réponse à une baisse de température. Cette adaptation du métabolisme semble pourtant être indispensable pour permettre à la bactérie de produire l'énergie dont elle a besoin pour se multiplier dans des conditions où le rendement énergétique ne semble pas être optimal.

L'importance du tréhalose dans l'adaptation au froid *E. coli* a été rapportée, la délétion des gènes *otsA* et *otsB*, impliqués dans la synthèse du tréhalose entraînant une baisse de la viabilité à 4°C (Kandror *et al.*, 2002). Une chute de température de 37°C à 16°C entraîne une augmentation du niveau de tréhalose intracellulaire d'un facteur 8. Les ARNm de ces deux gènes sont stabilisés à 16°C et possèdent une "cold box". Le rôle exact du tréhalose n'est pas élucidé mais plusieurs hypothèses ont été émises: i) il empêcherait la dénaturation et

l'agrégation des protéines, ii) il protégerait la cellule du stress oxydatif, iii) il stabiliserait les membranes (Kandror *et al.*, 2002).

L'étude transcriptomique de la réponse au froid de *E. coli* montre également la surexpression de ces deux gènes respectivement d'un facteur 4.3 et 2.7 (Phadtare and Inouye, 2004). Elle démontre également la surexpression de gènes impliqués dans le transport et le métabolisme de nombreux sucres, tels que le fructose, glucose, glycérol, maltose, mannose, ribose et xylose mais aussi des gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés. En revanche, certains gènes impliqués dans le métabolisme énergétique de la cellule sont sous exprimés (Phadtare and Inouye, 2004). Aucun rôle protecteur des fonctions bactériennes n'est connu actuellement pour ces sucres, il est donc probable qu'ils participent à la reprise de la croissance suite à un choc froid.

L'étude transcriptionnelle réalisée lors d'un choc froid de 37°C à 15°C chez *B. subtilis* montre une répression des gènes codant pour la plupart des voies de synthèses des acides aminés (Beckering *et al.*, 2002). L'arrêt de la traduction lors d'une baisse de la température pourrait conduire à l'accumulation d'une grande quantité d'acides aminés ayant pour effet un rétro contrôle négatif de leurs synthèses. Après un choc froid, de nombreux opérons codant pour la synthèse des bases azotées ainsi que pour la synthèse de coenzymes sont sous exprimés. Il y a également une répression de certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la glycolyse ou dans le cycle de Krebs, ainsi qu'une sous expression de l'opéron codant pour l'ATP synthase (Beckering *et al.*, 2002). Les gènes codant certaines enzymes de dégradation de la paroi cellulaire sont inhibés probablement en réponse à la baisse du taux de croissance de la bactérie à basse température. En revanche les gènes codant pour les protéines ribosomales, fonction la plus affectée à basse température, sont fortement surexprimés lors d'une baisse importante de la température (Kaan *et al.*, 2002).

L'adaptation de *L. monocytogenes* à une chute de température de 37°C à 4°C entraîne la surexpression de 30 gènes indépendamment de la phase croissance. Ces gènes sont tous impliqués dans des voies connues pour être la cible des effets délétères engendrés par le froid, telles que le maintien de la fonctionnalité membranaire, ou bien encore la transcription et la traduction. Les gènes codant pour les facteurs majeurs de virulence de cette bactérie, *hly*, *plcA* et *plcB*, dont l'expression est sous la dépendance de PrfA, seront donc par conséquent sous exprimés lors d'une baisse de température et ce, quelle que soit la phase de croissance (Chan *et al.*, 2007).

Il semble que les fonctions centrales du métabolisme soient affectées par une baisse de température, en réponse notamment à une baisse du métabolisme général et à l'accumulation de produits provoquant l'inhibition de ce métabolisme. Les réponses mises en jeu pour adapter le métabolisme sont multiples, certaines sont partiellement élucidées notamment l'adaptation du métabolisme des acides gras ou du métabolisme énergétique, d'autres en revanche restent à établir. Il se pourrait que la bactérie utilise différents sucres comme source de carbone afin de permettre une reprise du métabolisme lorsque la bactérie est adaptée (Han and Lee, 2006)

e. Repliement des protéines à basse température

La conformation des protéines est une propriété fondamentale qui leur confère leurs activités et leurs spécificités d'action. La modification de cette conformation pourra conduire à une réduction ou à une perte de l'activité intrinsèque de la protéine. La réduction des paramètres thermodynamiques observée lors d'une baisse de température peut perturber la structure tridimensionnelle des protéines en rigidifiant la structure ce qui pourra empêcher l'interaction avec d'autres protéines ou bien avec le substrat de la protéine enzymatique.

A l'image des chaperons moléculaires nécessaires pour maintenir les acides nucléiques dans une conformation correcte, il existe des chaperons permettant le maintien ou l'acquisition de structure compatible avec la fonction de la protéine. L'enzyme peptidyl prolyl isomérases (PPIp) a été découverte associée aux ribosomes formant le "Trigger Factor": induite ou accumulée au froid, elle catalyse l'isomérisation *cis-trans* des liaisons peptidiques impliquant des prolines (Graumann *et al.*, 1996; Graumann and Marahiel, 1999) et assure le repliement des protéines *in vitro* (Liu *et al.*, 2010). La délétion du gène correspondant induit un phénotype cryosensible chez *E. coli* (Kandror and Goldberg, 1997). L'isomérisation des protéines pourrait conférer, à l'image de celle subie par les acides gras, une plus grande flexibilité permettant le maintien de leurs fonctions à basse température.

La modification de la conformation des protéines en fonction de la température laisse supposer que celle-ci puisse jouer le rôle de senseur lors d'une chute de température. La protéine TlpA de *Salmonella typhimurium* qui est un facteur de régulation de la virulence de *Salmonella* a la capacité de percevoir les variations de température et, en réponse, de réguler l'expression de certains gènes (Figure 8). A 28°C, cette protéine est capable de se lier à l'ADN sous forme d'oligomères réprimant ainsi sa propre expression. Un passage à 43°C

entraîne une diminution de l'oligomérisation de cette protéine qui devient incapable de se lier à l'ADN, entraînant l'expression du gène *tlpA*. La capacité de cette protéine à percevoir la température est liée à la structure boucle/ boucle qui subit des modifications de conformations lors du changement de température (Hurme *et al.*, 1996; Hurme *et al.*, 1997)

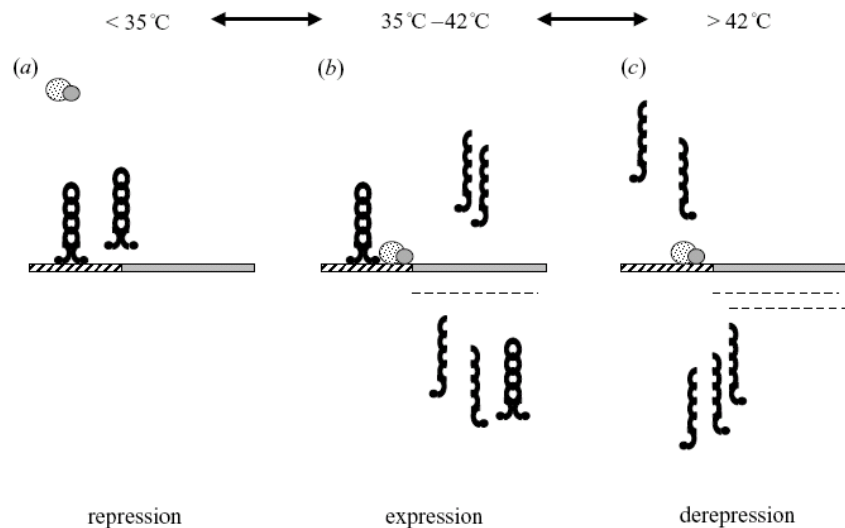


Figure 8: Régulation de l'expression d'un gène par une protéine senseur de la température : (a) en dessous de 35°C, la protéine TlpA est sous forme de dimère et peut réprimer l'expression du gène *tlpA* en se fixant sur sa région promotrice (b) lors d'une transition de température, l'oligomérisation de la protéine est diminuée, l'interaction avec la région promotrice est moins forte, il y a expression de *tlpA*, (c) au-dessus de 42°C, il n'existe plus de forme oligomérisée de la protéine qui ne peut donc plus interagir avec la région promotrice. Il y a alors levée de la répression du gène *tlpA*. Les cercles ombrés représentent l'ARN polymérase, les lignes discontinues les ARNm, les serpentins TlpA (Eriksson *et al.*, 2002)

f. Régulateurs transcriptionnels majeurs à basse température

Les facteurs de régulations transcriptionnels sont synthétisés en réponse à de nombreux stress et agissent en régulant l'expression de certains gènes, en se fixant sur des motifs spécifiques présents dans les régions promotrices de ces gènes.

Parmi les nombreux facteurs transcriptionnels décrits, le facteur σB de *B. subtilis* régule des gènes qui sont impliqués dans l'adaptation à certains stress, tels que la chaleur, la salinité, l'éthanol, le stress acide ou bien le stress nutritionnel lors de l'entrée en phase stationnaire (Hecker and Volker, 2001).

Ce facteur σB est également surexprimé au cours de la croissance à basse température mais n'induit pas la surexpression de gènes sous sa dépendance lors d'une baisse brutale de température de 37° à 15°C (Beckering *et al.*, 2002; Brigulla *et al.*, 2003; Mendez *et al.*, 2004)

En d'autres termes, le facteur σ_B ne serait pas impliqué dans l'adaptation durant la réponse au choc froid mais lorsque la cellule sort de cette phase d'adaptation pour entrer en phase de croissance.

Un facteur de transcription alternatif σ_L pourrait également être impliqué dans l'adaptation à basse température de *B. subtilis* en régulant l'expression de gènes impliqués dans l'adaptation de la membrane (Wiegshoff *et al.*, 2006).

Une réponse similaire est observée chez *L. monocytogenes* lors d'une baisse de température de 37°C à 4°C. On observe la surexpression du gène *sigB* dans les 30 minutes qui suivent le choc froid, sans surexpression des gènes placés sous son contrôle. σ_B pourrait donc jouer un rôle en permettant l'augmentation de l'expression des gènes indispensables à l'adaptation au froid (Chan *et al.*, 2007). Toutefois, *L. monocytogenes* est capable de croître à 4°C en l'absence de σ_B , ce qui indique que *Listeria* est capable de mettre en place des mécanismes indépendants de σ_B , pour s'adapter et croître à basse température.

g. Choc froid, adaptation au froid et sporulation

Afin de se protéger, certaines bactéries, telles que *B. subtilis*, ont la capacité de produire des spores en réponse à un environnement stressant, telle une baisse brutale de la température. La sporulation est un phénomène complexe dans lequel intervient un nombre important de senseurs et de régulateurs transcriptionnels. Parmi tous ces régulateurs les facteurs de transcription Spo0A et σ_B sont les acteurs majeurs de la régulation de la cascade de réactions conduisant à la sporulation. Ces deux facteurs, comme précédemment décrits pour σ_B , ne sont pas exprimés au cours de l'adaptation au froid, expliquant pourquoi ces deux gènes n'ont pas été initialement décrits comme impliqués dans l'adaptation au froid de *B. subtilis*. En l'absence de ces deux gènes, les cellules soumises à un choc froid présentent une capacité réduite à s'adapter au stress froid (Mendez *et al.*, 2004).

La surexpression de Spo0A à basse température durant la phase exponentielle n'entraîne pas une sporulation plus importante de la population. Il semble que durant le choc froid, Spo0A ait un rôle différent de celui qui lui est habituellement attribué, à savoir le contrôle de l'entrée en sporulation. En effet, Spo0A et σ_B correspondraient à une classe

secondaire de gènes qui ne sont pas nécessaires à l'adaptation au choc froid mais plutôt à la survie de la cellule lors de la croissance en condition de stress froid (Mendez *et al.*, 2004). Enfin, l'un des senseurs impliqués dans le déclenchement de la sporulation, sous le contrôle de SpoA, est la kinase membranaire KinC : son activité serait partiellement inhibée par les acides gras insaturés, qui sont synthétisés pour adapter la membrane suite à un choc froid. Ceci pourrait expliquer en partie le délai qui existe entre le choc froid et l'entrée en sporulation de la population bactérienne (Strauch *et al.*, 1992).

Les spores produites à basse température présentent une composition et des propriétés largement modifiées par rapport à celles produites à températures optimales. A 10°C, les spores de *B. cereus* contiennent moins d'acide dipicolinique et la proportion d'acide gras antéiso est augmentée. Ces spores produites à basse température présentent une plus grande sensibilité à la chaleur et aux UV que celles produites à 30°C (Planchon *et al.*, 2010)

h. Adaptation des bactéries psychrotrophes

Les bactéries psychrotrophes sont capables de croître à des températures proches de 0°C nécessitant une adaptation au froid, mais leur optimum de croissance se situe autour de 22°C-25°C

L'adaptation de ces bactéries à une baisse de température suit les mêmes principes que pour les bactéries mésophiles, à savoir que cette réponse doit permettre d'adapter la bactérie aux nouvelles conditions environnementales. Ainsi, les cibles de régulation et d'adaptation sont les mêmes, mais les modalités et la rapidité de réponse peuvent varier par rapport aux bactéries mésophiles.

L'adaptation de la fluidité membranaire est proche de celles des bactéries mésophiles mais il semble que l'insaturation des acides gras soit plus rapide (Russell, 1990). Les bactéries psychrotrophes doivent être capables de réaliser l'ensemble des réactions biochimiques dans des conditions thermo dynamiquement défavorables. La comparaison des enzymes issues de bactéries mésophiles et psychrotrophes montre un caractère thermolabile plus marqué chez les psychrotrophes mais surtout une efficacité catalytique bien supérieure (Spiwok *et al.*, 2007; Bjelic *et al.*, 2008; Metpally and Reddy, 2009).

Les bactéries psychrotrophes sont elles aussi soumises à une réponse de type « cold-shock » lorsque la température du milieu s'écarte de leur température optimale de croissance.

L'étude de la réponse adaptative à une baisse de température de bactéries psychrotrophes telles que *Vibrio* sp. ANT-300 (Araki, 1991; Araki, 1991) *B. psychrophilus* (Whyte and Inniss, 1992), *A. globiformis* (Berger *et al.*, 1996) and *P. fragi* (Michel *et al.*, 1997) indique que cette réponse diffère de celle des bactéries mésophiles par sa dynamique de mise en œuvre (Hebraud and Potier, 1999) : une baisse brutale de température entraîne un arrêt de croissance des bactéries psychrotrophes, mais cette phase de latence n'est pas accompagnée d'une inhibition de la synthèse des gènes de ménage, comme cela est observé pour les bactéries mésophiles.

Les bactéries psychrotrophes seraient capables d'adapter le nombre de CSPs ou CAPs produites, et ce en fonction de l'intensité de la variation de température. Ainsi, plus la variation entre la température optimale et la température de croissance est importante, plus le nombre de CSPs ou CAPs produit est important. Enfin, la synthèse des CAPs se poursuit tant que la bactérie psychrotrophe croît à basse température, alors cette synthèse diminue progressivement une fois que la bactérie mésophile est adaptée au stress froid

La réponse au froid des bactéries psychrotrophes est un domaine peu étudié donc peu d'éléments sont connus sur la présence de protéines de type CspA. Des études ont montré l'existence de ces protéines chez *Listeria* (Francis and Stewart, 1997), *B. cereus* (Mayr *et al.*, 1996) et *Pseudomonas fragi* (Hebraud *et al.*, 1994). Il n'existe aucun domaine ou motif particulier permettant de les différencier des CspA-like de bactéries mésophiles. Le nombre de CspA-like varie d'une espèce psychrotrophe à l'autre, avec par exemple, 4 protéines CspA-like chez *P. fragi* toutes induites par le froid (Hebraud *et al.*, 1994), et 6 chez *B. cereus* dont seule CspA est surexprimée au froid (Mayr *et al.*, 1996).

Il semble que la régulation de l'expression des protéines impliquées dans la phase d'adaptation soit beaucoup plus fine chez les bactéries psychrotrophes. Les bactéries psychrophiles, dont l'optimum de croissance est situé autour de 15°C (Ray, 2006), sont capables de croître à des températures inférieures à 4°C, grâce à des stratégies d'adaptation qui diffèrent de celles mises en place par les bactéries mésophiles et psychrotrophes et que nous ne développerons pas d'avantage ici.

L'adaptation au froid des bactéries semble être multifactorielle, néanmoins, il apparaît que l'adaptation de la machinerie traductionnelle est un élément central du fait de l'arrêt de la traduction au cours de la réponse des bactéries mésophiles à un choc froid, arrêt capable d'induire également une réponse. D'autre part, il est indispensable que cette machinerie soit adaptée pour pouvoir permettre une sortie de la phase de latence et ainsi une reprise de croissance. Une famille d'enzymes, les hélicases à ARN, semble jouer un rôle important dans cette adaptation.

III. Les hélicases à ARN

Les ARN ont un rôle prépondérant dans l'expression des gènes. Les ARNm sont traduits en protéines par les ribosomes par l'intermédiaire des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert. La fonctionnalité des ARNm repose sur leurs conformations : l'acquisition de structures secondaires à basse température empêche leur traduction mais aussi leur dégradation et donc plus généralement leur "turn-over". La dynamique d'expression des gènes est un paramètre prépondérant pour permettre l'adaptation à un environnement stressant. Le maintien de cette dynamique passe par la capacité de la cellule à déstabiliser les structures secondaires. En réponse à l'arrêt de traduction observé lors d'une chute de température, les bactéries mésophiles produisent des hélicases à ARN, capables de dérouler ces structures secondaires.

1. Hélicase à ARN à boîte DEAD: de la structure à la fonction

Les hélicases à ARN sont largement distribuées au sein des génomes eucaryotes, procaryotes et viraux (Shiratori *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 2003). Ces protéines sont généralement classées dans les superfamilles SF1 et SF2 des hélicases (Gorbalenya and Koonin, 1993). Elles possèdent toutes deux motifs, Walker A et B, retrouvés également dans la structure de nombreuses ATPases (Walker *et al.*, 1982) et sont actives sous forme de monomères ou de dimères (Shiratori *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 2003).

Dans la famille SF2, sont regroupées les hélicases à ARN à boîte DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) partageant toutes neufs motifs conservés impliqués dans leurs fonctions ATPase et hélicase (Figure 9) (Tanner *et al.*, 2003). A ce jour, le motif DEAD caractéristique des hélicases à ARN a été identifié dans plus de 500 protéines référencées dans les bases de données. Les hélicases à ARN à boîte DEAD jouent un rôle fondamental dans les mécanismes touchant aux ARN, de la transcription à la dégradation des ARNm, aussi bien chez les eucaryotes que les procaryotes (de la Cruz *et al.*, 1999; Chamot *et al.*, 2005; Ando and Nakamura, 2006).

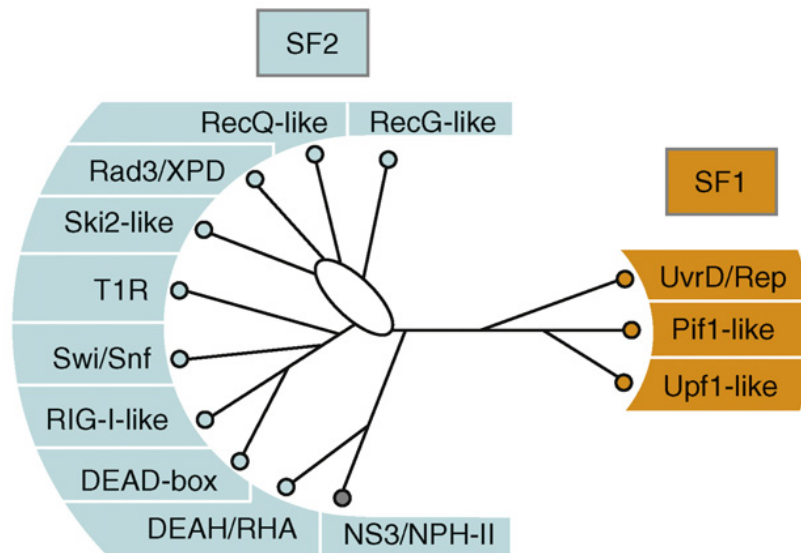


Figure 9: Cladogramme schématisique représentant les 3 familles identifiées de SF1 et les 9 familles identifiées de SF2 (Fairman-Williams *et al.*, 2010)

a. Structure des hélicases à ARN

La structure tridimensionnelle de nombreuses hélicases à ARN à boîtes DEAD a été résolue (Benz *et al.*, 1999; Caruthers *et al.*, 2000; Story *et al.*, 2001; Carmel and Matthews, 2004; Shi *et al.*, 2004). Ces enzymes consistent en deux domaines globulaires liés de manière covalente. Chaque domaine est constitué de 5 feuillets β , entourés de 5 hélices α ressemblant fortement à la structure de l'ATPase RecA (Story and Steitz, 1992).

Ces deux domaines sont composés d'environ 350 à 400 acides aminés constituant le core-enzyme. L'extrémité N-terminale, correspondant au domaine 1, contient les motifs Q, I et II de fixation à l'ATP, le motif III d'hydrolyse de l'ATP et les motifs Ia et Ib de fixation à l'ARN (Figure10). La fixation de l'ATP sur le motif III entraînerait une augmentation de l'affinité de la protéine pour l'ARN simple brin. La fixation de l'ARN entraîne alors l'hydrolyse de l'ATP en ADP ce qui a pour effet d'abaisser l'affinité de la protéine pour l'ARN simple brin et d'entraîner la translocation sur le brin d'ARN ou bien son relargage (Banroques *et al.*, 2010). L'extrémité C-terminale, correspondant au domaine 2, est composée des motifs IV et V de liaison à l'ARN et du motif VI assurant le lien entre l'activité ATPase et l'activité de déroulement des ARN (Figure 10).

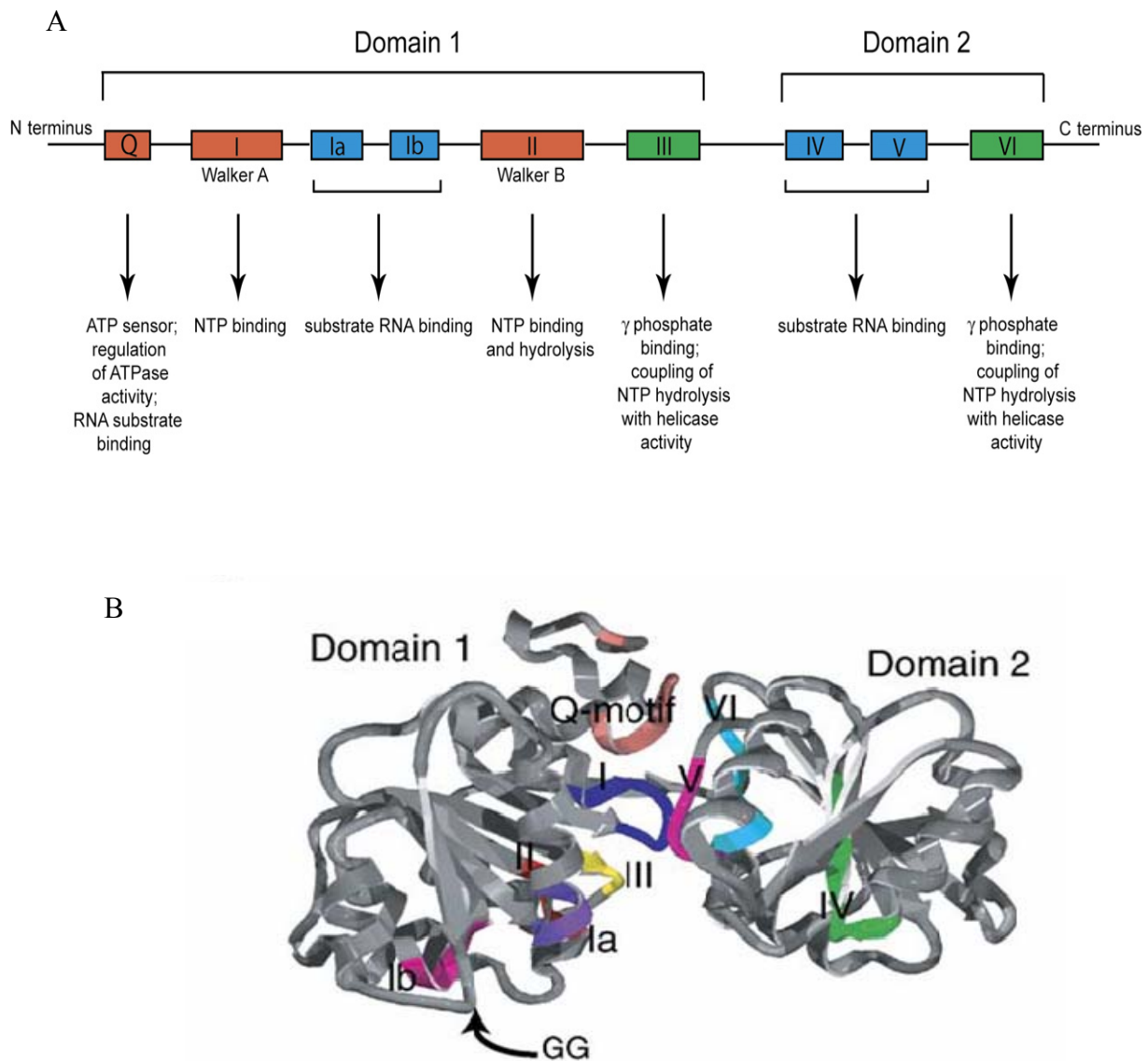


Figure 10: (A) Représentation schématique de la répartition des 9 motifs conservés sur la séquence primaire d'une hélicase à ARN. Le rôle putatif attribué à chacun des motifs est noté sous le motif correspondant. Le motif DEAD est contenu au sein du motif III (Bleichert *et al.*, 2007). (B) Structure cristalline résolue de l'hélicase MjDEAD de *Methanococcus janaashi*. Les motifs conservés sont représentés sur la structure 3D (Story *et al.*, 2001)

b. Activités des hélicases à ARN

Les hélicases à ARN à boîte DEAD possèdent une activité ATPase qui semble être en général dépendante de la présence d'ARN (Rocak and Linder, 2004). Cependant, l'activité ATPase de l'hélicase DbpA d'*E. coli* est fortement augmentée en présence d'une séquence spécifique de l'ARNr 23S (Tsu *et al.*, 2001). Les hélicases à ARN à boîte DEAD ont une faible affinité pour l'ATP *in vitro*, comme en atteste les valeurs de Km reportées dans différentes études qui vont de 80 μ M (Lorsch and Herschlag, 1998) à 1mM en présence d'ARN (Iggo and Lane, 1989; Iost *et al.*, 1999; Yu and Owttrim, 2000).

Les études sont très souvent menées à partir de la purification d'enzymes recombinantes, sans prendre en compte l'existence potentielle de cofacteurs ou de substrats spécifiques pouvant augmenter l'affinité pour l'ATP. Il semble que des protéines, telles que CsdA et SrmB d'*E. coli*, n'aient pas d'activité ATPase en présence d'ARN à bouts francs, alors que l'activité ATPase de la protéine RhlE d'*E. coli* serait stimulée en présence d'ARN à bouts francs ou avec des ARN à bouts sortants en 5' ou 3', probablement du fait de leurs structures respectives (Bizebard *et al.*, 2004).

L'activité ATPase des hélicases à ARN et la fixation sur leur substrat ARN, pourraient se faire de manière coopérative. En effet, la fixation d'ARN semble être plus forte en présence d'ATP, et semble être extrêmement réduite en présence d'ADP (Lorsch and Herschlag, 1998; Peck and Herschlag, 2003; Cordin *et al.*, 2004). Les mécanismes qui conduisent les hélicases à ARN à boîte DEAD à différencier l'ADN de l'ARN sont inconnus. L'une des hypothèses est que l'hélicase pourrait interagir de manière spécifique avec la fonction hydroxy située en 2' (Cordin *et al.*, 2006).

Certaines hélicases à ARN possèdent, en plus de leur core enzyme, une extrémité N-terminale ou C-terminale, qui leur conférerait une spécificité d'action. La protéine DbpA d'*E. coli* possède au niveau de son extrémité C-terminale, un domaine supplémentaire de fixation spécifique à la région H92 de l'ARNr 23S (Karginov and Uhlenbeck, 2004). Le transfert de l'extrémité C-terminale de DbpA, sur la protéine SrmB d'*E. coli* rend cette protéine capable d'interagir spécifiquement avec la région H92, sans modifier ses propriétés enzymatiques (Kossen *et al.*, 2002). L'extension C-terminale de la protéine SrmB serait quant à elle impliquée dans le maintien de la stabilité du complexe formé avec les protéines ribosomales L4 et L24 et l'ARN 23S (Trubetskoy *et al.*, 2009). La spécificité des hélicases à ARN nécessiterait l'établissement de nombreuses interactions protéine-protéine ou protéine-ARN avec d'autres facteurs.

La capacité des hélicases à ARN à boîte DEAD à dérouler les structures secondaires d'ARN a été démontrée (Rocak and Linder, 2004; Ando and Nakamura, 2006): elles ont pour cela besoin d'une extrémité libre sur l'ARN (Soultanas and Wigley, 2001; Tanner and Linder, 2001; Bizebard *et al.*, 2004; Rocak and Linder, 2004). Cependant, un petit nombre d'hélicase à ARN sont capables de dérouler des ARN sans extrémité libre. Il a été proposé que ces hélicases à ARN puissent se lier à un ARN double brin et que l'hydrolyse de l'ATP puisse induire un déroulement local (Rogers *et al.*, 2001; Bizebard *et al.*, 2004). Il serait également

possible que la déstabilisation partielle à une extrémité puisse suffire à fournir une extrémité libre, apte à permettre l'initiation du déroulement de la structure secondaire.

La plupart des hélicases à ARN est capable d'initier le déroulement des structures secondaires, indifféremment à partir d'une extrémité 5' ou 3' libre. Cependant, certaines hélicases à ARN à boîte DEAD, telle que DbpA d'*E. coli*, ne serait capable de fonctionner qu'à partir d'une extrémité 3' libre dans le sens 3'-5' (Diges and Uhlenbeck, 2005).

Les hélicases à ARN sont des enzymes dont la processivité est assez faible, c'est-à-dire qu'à chaque liaison avec leur substrat, elles ne déstabilisent que 5 à 6 nucléotides (Rogers *et al.*, 1999) : lorsque les hélicases sont liées à de l'ADP, leur affinité pour l'ARN est faible, et l'hélicase se dissocierait de son substrat lors de chaque cycle d'hydrolyse de l'ATP (Lorsch and Herschlag, 1998). Certaines hélicases à ARN possèdent une extrémité N ou C-terminale riche en acides aminés basiques, Glycine et Arginine, qui pourrait participer à la liaison aux ARN et ainsi augmenter la processivité de l'enzyme. L'activité des hélicases à ARN est directement dépendante de la stabilité des duplexes d'ARN: il semble que plus le duplex est stable, moins l'hélicase est active (Rossler *et al.*, 2001; Bizebard *et al.*, 2004).

De nombreux modèles visant à expliquer le mode d'action des hélicases à ARN ont été proposés (Tanner and Linder, 2001; Rocak and Linder, 2004; Tuteja and Tuteja, 2004). Cependant deux modèles sont communément admis : i) le modèle « inchworm » (Figure 11), ii) le modèle « active rolling » (Figure 12).

Dans le premier modèle l'hélicase à ARN se déplace le long de l'ARN en alternant les cycles d'ouverture et de fermeture de la partie centrale entre les deux domaines grâce à l'hydrolyse de l'ATP et déplace ainsi les obstacles rencontrés en « rampant » le long du brin d'ARN.

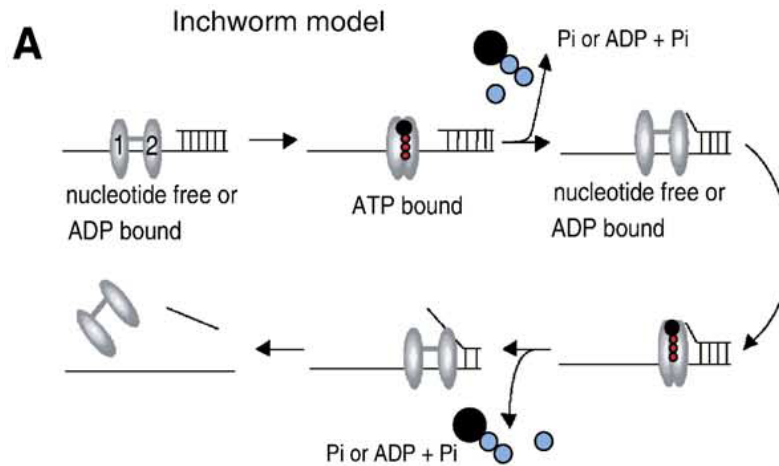


Figure 11: Schématisation du déroulement des ARN selon le "Inchworm model". L'ATP est représenté en rouge, l'ADP en bleu et les domaines 1 et 2 sont notés (Cordin et al, 2006)

Le second modèle nécessite un dimère d'hélicases à ARN, où les sous unités alternent réciproquement entre une haute et une faible affinité pour l'ARN grâce à l'hydrolyse de l'ATP. Cette alternance permet au duplex de se mouvoir sur le brin d'ARN et de dérouler les structures secondaires.

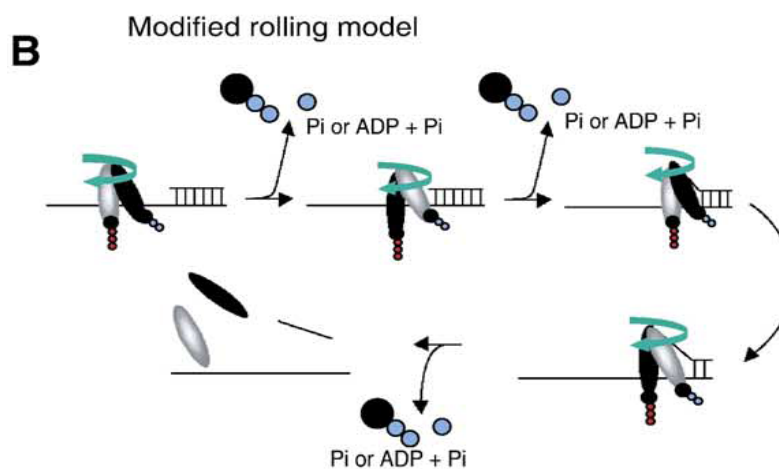


Figure 12: Schématisation du déroulement des ARN selon le "Modified rolling model". L'ATP est représenté en rouge, l'ADP en bleu et les dimères sont représentés en gris et noirs (Cordin et al, 2006)

Ces modèles ne sont pas pleinement satisfaisants pour expliquer que l'activité des hélicases à ARN est non processive et non directionnelle et Cordin *et al* 2006 propose donc un troisième modèle nommé « destabilization model ». Les précédentes hypothèses formulées ne permettent pas de prendre en compte réellement le rôle de l'ATP dans le fonctionnement de ces hélicases lors du déroulement des structures secondaires d'ARN

Ce modèle propose deux types d'actions différentes des hélicases à ARN en fonction du rôle directe ou indirecte de l'ATP. Ce modèle repose sur la variation d'affinité des hélicases à ARN lors de la fixation de l'ATP puis de son hydrolyse en AMP.

Les deux modes de fonctionnement proposés sont schématisés figure 13 : dans la première hypothèse du modèle (voie a) l'hélicase à ARN se fixerait sur la partie simple brin de l'ARN et subirait une série de réarrangement au cours du cycle de liaison et d'hydrolyse de l'ATP. Ces modifications consisteraient en un changement relatif des positions des domaines 1 et 2 entraînant, si l'hélicase est suffisamment proche de la zone double brin, une déstabilisation de quelques bases qui pourra conduire à la déstabilisation complète du duplex d'ARN. Dans ce mode de fonctionnement l'énergie produite lors de l'hydrolyse de l'ATP est directement utilisée pour permettre la fonction de l'hélicase à ARN via le changement de conformation

La seconde hypothèse (voie b) propose que la fixation de l'ATP sur l'hélicase à ARN entraîne une modification de la conformation et un changement de position relatif de certains motifs qui sont liés avec l'ARN. Cette modification conduirait donc de fait à une déstabilisation de la conformation double brin de l'ARN. L'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP permettrait de dissocier l'hélicase à ARN du brin d'ARN. L'ATP semble donc avoir un rôle plus indirect dans la fonction de l'hélicase à ARN.

Dans les deux cas deux issues sont possibles suite à l'action de l'hélicase à ARN soit la déstabilisation est suffisante pour permettre le déroulement complet de la structure double brin soit l'énergie apportée n'est pas suffisante pour déstabiliser totalement cette structure et les quelques bases dissociées pourront se rapparier (Rogers *et al.*, 2001)

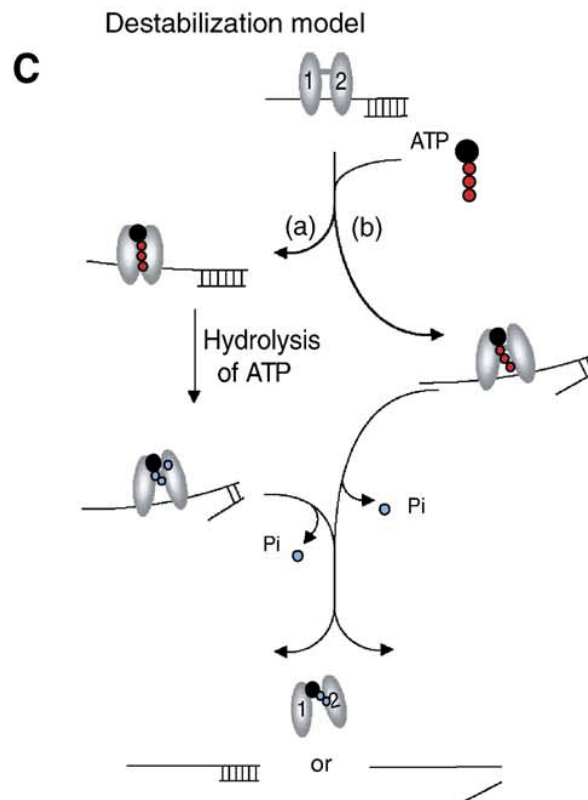


Figure 13: Schématisation du déroulement des ARN selon le "destabilization model". L'ATP est représentée en rouge, l'ADP en bleu et les domaines 1 et 2 sont notés. En fonction de la stabilité du duplex d'ARN, il y aura déroulement de la structure double brin selon deux mécanismes probables (a) la fixation de l'ATP entraîne un changement de conformation de l'hélicase à ARN qui sera de nouveau modifiée lors de l'hydrolyse de l'ATP conduisant à la dissociation de quelques bases ou (b) la fixation de l'ATP entraîne une modification de la conformation de l'hélicase à ARN permettant la dissociation de la structure double brin et l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP permet à la protéine de se dissocier du brin d'ARN

Les hélicases à ARN seraient également capable de catalyser la réaction inverse du déroulement des structures secondaires, car elles sont capables de favoriser l'hybridation d'ARN double brin complémentaire. L'hélicase CrhR de *Synechocystis* serait capable d'agir via un phénomène de migration de branche qui combine à la fois l'activité de déroulement et l'activité d'hybridation (Chamot *et al.*, 2005). Cette activité d'hybridation pourrait être due aux domaines qui se situent hors du core enzyme, riche en glycine et arginine à l'image des hélicases Gu, p68 et p72 (Lamm *et al.*, 1996; Valdez *et al.*, 1997). De même l'extrémité C-terminale de l'hélicase à ARN YxiN de *B. subtilis* est responsable de l'interaction spécifique avec la boucle 92 de la région V de l'ARNr 23S. Le transfert de cette extrémité C-terminale d'YxiN sur l'hélicase à ARN SrmB d'*E. coli* confère à cette dernière la même spécificité pour l'ARNr 23S (Kossen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006).

Les hélicases à ARN à boîte DEAD, de par leurs propriétés, participent à tous les processus impliquant les ARNs de la biogenèse des ribosomes, à la traduction ou bien la dégradation des ARNm. Ces fonctions vitales sont affectées lorsque la cellule est soumise à un stress abiotique et le maintien de ces fonctions fait alors intervenir des hélicases à ARN à boîte DEAD.

2. Hélicase à ARN et adaptation aux stress

A ce jour, il n'existe que peu d'études concernant l'implication des hélicases à ARN dans l'adaptation aux conditions de stress, autre que le froid, que peut rencontrer une bactérie.

L'expression du gène codant pour l'hélicase à ARN CrhR de la cyanobactérie *Synechocystis* est régulée par les variations de lumière en modifiant l'état rédox de la chaîne de transport des électrons (Kujat and Owtrim, 2000). L'expression du gène est également régulée par le froid et la concentration en sel (Vinnemeier and Hagemann, 1999; Chamot *et al.*, 2005). Cette hélicase, qui assurerait le maintien de la capacité photosynthétique, est capable de catalyser à la fois le déroulement des structures secondaires mais aussi d'assurer des réarrangements au niveau de complexes d'ARN.

L'inactivation d'un gène codant pour une hélicase à ARN de *Clostridium perfringens* qui présente 50% d'identité avec CshA de *B. subtilis*, conduit à une meilleure survie des cellules lorsqu'elles sont soumises à un stress oxydant. Cette hélicase jouerait donc un rôle de régulateur négatif dans l'adaptation au stress oxydant. Cette fonction de régulation négative dans l'adaptation est extrêmement originale puisque les hélicases à ARN sont habituellement décrites comme permettant ou facilitant l'adaptation à un stress (Briolat and Reysset, 2002).

L'implication des hélicases à ARN dans l'adaptation au stress froid a été très étudiée car le stress froid est l'un des stress les plus répandus à la surface de la planète et de nombreuses bactéries doivent faire face à de brutales chutes de température. L'adaptation des bactéries aux conditions de réfrigération est également un problème de tout premier ordre pour la sécurité microbiologique des aliments.

3. Importance des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid: implication et rôles

a. Implication dans l'adaptation au froid

L'implication des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid a été mise en évidence chez de nombreuses bactéries dont *B. subtilis* (Hunger *et al.*, 2006) et *E. coli* (Jones *et al.*, 1996; Charollais *et al.*, 2003; Charollais *et al.*, 2004), mais aussi des archaebactéries telles que *Methanococcoides burtoni* (Lim *et al.*, 2000) ou des cyanobactéries (Chamot *et al.*, 1999). Au sein des génomes bactériens, le nombre de gènes codant pour des hélicases à ARN varie en fonction de l'espèce considérée. Ainsi concernant les bactéries modèles, *B. subtilis* possède 4 gènes *cshA*, *cshB*, *yfml*, et *dbpA* codant pour des hélicases à ARN: alors que *E. coli* en possède 5: *cshA*, *srmB*, *dbpA*, *rhlB*, et *rhlE*.

La délétion des gènes *csdA* et *srmB* d'*E. coli* conduit à l'apparition de mutants cryosensibles, indiquant que ces hélicases à ARN ont un rôle important mais non indispensables pour permettre une croissance à basse température (Charollais *et al.*, 2003; Charollais *et al.*, 2004). En effet, aucune des hélicases à ARN d'*E. coli* n'est indispensable individuellement pour permettre la croissance à basse température (Iost and Dreyfus, 2006). En revanche, la délétion simple de chacun des gènes codant pour les hélicases à ARN CshA et CshB de *B. subtilis* n'a pas d'impact sur la croissance au froid mais la délétion simultanée de l'un des 2 gènes et d'un gène *csp* entraîne un retard de croissance à basse température (Hunger *et al.*, 2006).

Le rôle des hélicases à ARN dans la traduction et la régulation de la dégradation des ARNm a été principalement étudiée chez les bactéries modèles *E. coli* et *B. subtilis*.

b. Rôle dans la traduction et la biogenèse des ribosomes à basse température

Les hélicases à ARN CsdA d'*E. coli* et CshA de *B. subtilis*, dont les gènes sont surexprimés lors d'une baisse de température, sont impliquées dans la biogenèse des ribosomes (Jones *et al.*, 1996; Hunger *et al.*, 2006). En effet, un mutant $\Delta csdA$ d'*E. coli* présente à 15°C un déficit en sous-unité 50S libre et un excès en une nouvelle particule qui sédimente autour de 40S et qui correspondrait à une particule 50S mal repliée. A 15°C, CsdA devient l'un des composants majeurs de la sous-unité 70S, alors qu'elle est indétectable à 37°C (Charollais *et al.*, 2004; Iost and Dreyfus, 2006). L'hélicase CshA de *B. subtilis* est

également localisée de manière spécifique au niveau de la sous-unité 50S du ribosome (Ando and Nakamura, 2006).

Une autre hélicase à ARN d'*E. coli*, SrmB, a un rôle dans la conformation de la sous-unité 50S du ribosome au froid, en interagissant avec l'ARNr 23S, précurseur de cette sous-unité, et ce bien que son gène ne soit pas surexprimé à basse température (Charollais *et al.*, 2003; Trubetskoy *et al.*, 2009).

Il a été démontré que l'hélicase à ARN CshB de *B. subtilis* co-localise avec la protéine CspB, qui est capable de se lier aux acides nucléiques durant les phases actives de la traduction (Hunger *et al.*, 2006). Cette interaction suggère que CshB jouerait un rôle important dans l'initiation de la traduction à basse température (Beckering *et al.*, 2002; Hunger *et al.*, 2006).

La capacité de CshA de *B. subtilis* ainsi que de CsdA et SrmB d'*E. coli* à dérouler les structures secondaires d'ARN a également été démontrée (Bizebard *et al.*, 2004; Ando and Nakamura, 2006).

La délétion du gène codant pour l'hélicase à ARN RhIE d'*E. coli* n'entraîne pas de phénotype particulier à basse température dans la souche sauvage mais renforce le défaut de croissance du mutant $\Delta csdA$ et atténue celui du mutant $\Delta srmB$ à 20°C (Jain, 2008). Le gène *rhIE* a été identifié comme suppresseur de la mutation du gène *csdA* lorsque ce gène est présent en multicopies. En effet lorsque le gène *rhIE* est apporté en trans sur un plasmide dans le mutant $\Delta csdA$, qui présente normalement un taux de croissance ralenti à 20°C, il y a restauration du phénotype sauvage. A l'inverse, l'apport de ce gène dans le mutant $\Delta srmB$ amplifie le phénotype cryosensible. De plus, l'hélicase à ARN RhIE a été localisée au niveau des ribosomes tout comme SrmB et CsdA (Jain, 2008)..

Ces observations ont conduit à émettre l'existence de deux conformations différentes du pré ARNr 23S, chacune d'elle nécessitant soit CsdA soit SrmB pour pouvoir être maturé correctement. RhIE jouerait alors un rôle d'intermédiaire permettant le passage d'une conformation à l'autre. L'absence de RhIE conduirait donc à une prépondérance de la forme dépendante de CsdA et inversement lorsque RhIE est surproduite. RhIE jouerait donc aussi un rôle important dans l'adaptation des ribosomes à basse température (Jain, 2008).

La contribution de chacune des 5 hélicases à ARN dans l'adaptation au froid d'*E. coli* a été récemment étudiée, en testant toutes les combinaisons possibles de délétion des 5 gènes, du simple au quintuple mutant (Jagessar and Jain, 2010) : A 37°C tous les mutants présentent le même temps de génération que la souche sauvage à l'exception du mutant $\Delta csdA$. En revanche, à 25°C le défaut de croissance augmente avec le nombre de gène d'hélicase délété. Le défaut de croissance des mutants est dû à l'augmentation de la proportion de pré ARNr 23S non mûré. L'analyse des profils ribosomiques des mutants de délétions montre clairement un lien entre l'accumulation de plus en plus importante du précurseur non mûré 40S de la grande sous unité ribosomal 50S et le nombre de gène délété. Il semble donc que toutes les hélicases à ARN d'*E. coli* soient capables de jouer un rôle dans la conformation et la maturation des ribosomes à basse température.. Les différentes hélicases à ARN d'*E. coli* telles que CsdA ou SrmB, pourraient donc avoir la même fonction de maturation du ribosome via deux mécanismes indépendants. Ces hélicases pourraient également partager des mécanismes similaires, dont la redondance assure une fonction importante pour l'adaptation de la cellule à basse température (Jagessar and Jain, 2010).

Les hélicases à ARN auraient pour rôle d'une part de participer à la maturation fonctionnelle des ribosomes à basse température, et d'autre part de dérouler les structures secondaires d'ARNm permettant ainsi une reprise de la traduction.

c. Implication dans la dégradation des ARN

La plupart des ARNm est dégradée rapidement après synthèse pour permettre une adaptation rapide au changement d'environnement. La régulation de la dégradation des ARNm est probablement le mécanisme le plus important dans le contrôle post transcriptionnel de l'expression des gènes (Marcaida *et al.*, 2006).

Chez *E. coli*, la stabilité de l'ARNm codant CspA est fortement augmentée en absence de CsdA à basse température, alors que la surexpression de CsdA entraîne une dégradation importante de cet ARNm. A basse température, il semble donc que le rôle majeur de l'hélicase à ARN CsdA soit de participer à la dégradation des ARNm (Awano *et al.*, 2007).

La dégradation des ARN d' *E. coli* implique de nombreuses enzymes regroupées au sein d'un complexe multienzymatique appelé dégradosome. Il jouerait un rôle dans la régulation de l'expression des gènes et par conséquent dans l'adaptation aux variations

environnementales, telles qu'une chute de la température (Regnier and Arraiano, 2000; Condon, 2007; Carpousis *et al.*, 2009).

La séquence de dégradation des ARNm a été étudiée principalement chez les bactéries modèles *E. coli* et *B. subtilis* (Condon, 2007):

La dégradation des ARNm chez *E. coli* commence par l'action d'une endoribonucléase E (Rnase E) qui peut être remplacée par d'autres ribonucléases telles que les Rnase G, RNase III, Rnase P et RNase Z. Cette endonucléase agit en collaboration avec la polynucléotide phosphorylase (PNPase), l'hélicase à ARN RhlB et l'énolase, formant le dégradosome. L'action de l'endonucléase génère des extrémités 3' qui ne sont pas protégées par des structures secondaires ce qui permet l'action dans le sens 3'-5' des exonucléases telles que la PNPase, la RNase II et la RNase R. L'hélicase RhlB aurait pour rôle de faciliter l'action de la PNPase en déroulant les structures secondaires formées (Figure 14a).

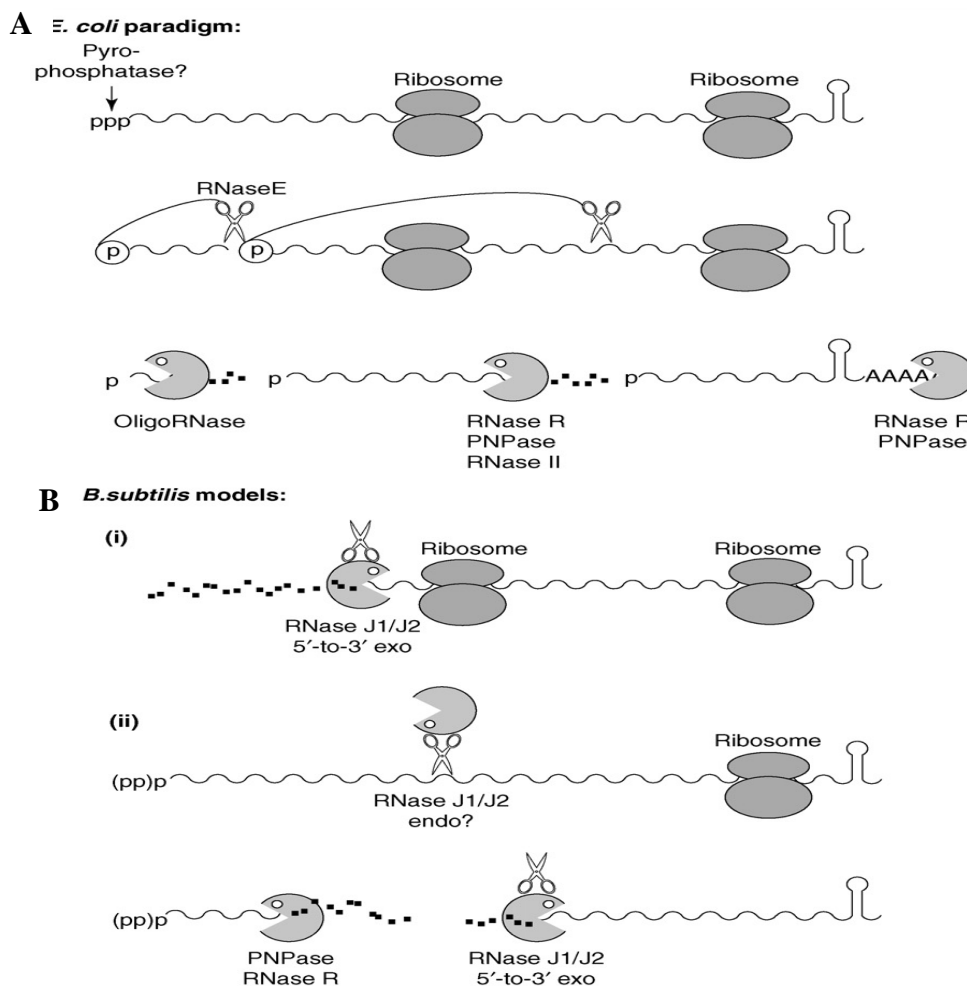


Figure 14: Principales voies de dégradation des ARNm chez (a) *E. coli* et (b) *B. subtilis* (Condon, 2007)

Chez les bactéries à Gram positif, il a longtemps été proposé que la dégradation des ARNm diffère de celle des bactéries à Gram négatif du fait de l'absence d'homologues d'enzymes clés impliquées dans le dégradosome, telles que la RNase E et la RNase II.

La dégradation des ARNm chez *B. subtilis* ferait d'abord intervenir une phosphorolyse et non une hydrolyse de l'ARNm. La RNase J1 aurait à la fois un rôle d'endonucléase et d'exonucléase 5'-3' permettant la dégradation des ARNm en association avec la PNPase et la RNase R qui ont une activité exonucléase 3'-5' (Figure 14b) (Condon, 2007). Néanmoins, la découverte récente d'un complexe similaire au dégradosome chez *B. subtilis* nécessite de revoir les modalités de dégradations des ARNm chez les bactéries à Gram positif

Le dégradosome de *E. coli* est donc composé de la RNase E, de la PNPase, de l'hélicase à ARN RhlB et de l'enolase (Regonesi *et al.*, 2006; Carpousis, 2007; Chandran *et al.*, 2007; Worrall *et al.*, 2008).

La RNase E semble être le composant de base de ce complexe multienzymatique (Figure 15). En effet, elle possède en dehors de son domaine catalytique, différents domaines de fixation pour les composants du dégradosome. La RNase E posséderait également un domaine de fixation au cytosquelette et une hélice hydrophobe lui permettant un ancrage à la membrane et donc une certaine compartimentation de la dégradation des ARNm (Taghbalout and Rothfield, 2007; Khemici *et al.*, 2008; Taghbalout and Rothfield, 2008; Taghbalout and Rothfield, 2008; Taghbalout and Yang, 2010)

L'hélicase à ARN RhlB aurait pour fonction de dérouler les structures secondaires des ARNm, car les enzymes de dégradation présentes au sein de ce complexe nécessitent une extrémité simple brin pour pouvoir agir (Khemici *et al.*, 2005).

Ce complexe multienzymatique est une structure dynamique qui peut subir des réarrangements au cours du temps. Il semble que lors d'une baisse de température, le dégradosome est adapté à cette nouvelle condition par l'ajout de l'hélicase à ARN CsdA (Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004). Le site de fixation de CsdA au niveau de la RNase E est distinct de celui de RhlB et ce site peut fixer *in vitro* indifféremment RhlE ou SrmB qui sont deux autres hélicases à boîte DEAD (Khemici *et al.*, 2004). Les modifications entraînant le remodelage du dégradosome et l'incorporation d'une nouvelle hélicase ne sont pas encore établies. L'ajout d'une deuxième hélicase à basse température pourrait avoir pour rôle de

faciliter le déroulement des structures secondaires d'ARNm, mais l'avantage que confère la présence de deux hélicases à ARN simultanément reste à élucider

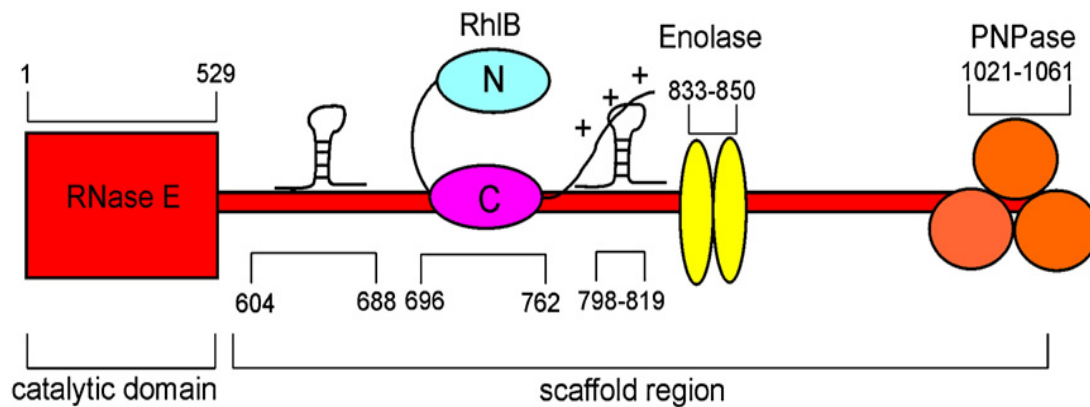


Figure 15: Organisation de l'assemblage du dégradosome de *E. coli* : l'endonucléase RNaseE possède un domaine catalytique qui s'étend des résidus 1 au 529 et un domaine non structuré possédant des microdomaines contenant les sites de fixation pour les autres composants : l'hélicase RhIB, une enzyme glycolytique l'enolase et une exoribonucléase PNPase. Deux sites de fixation aux ARN entourant le site d'interaction avec RhIB sont représentés (Worrall et al, 2008).

L'analyse bioinformatique de génomes d'espèces bactériennes à Gram négatif ou à Gram positif montre que les gènes codant pour les composants de base du dégradosome ne sont pas toujours présents. L'étude suggère donc qu'il puisse exister des dégradosomes alternatifs, construits autour de la RNase E mais avec d'autres composants comme la RNase R chez *Pseudomonas* par exemple (Marcaida *et al.*, 2006).

Il semble que très peu de bactéries à Gram positif possèdent le gène codant pour la RNase E mais plutôt la RNase G (Iost and Dreyfus, 2006). Ceci suggère que s'il existe chez ces espèces une structure de dégradation des ARNm, elle soit différente du dégradosome d'*E. coli*. Il existe ainsi une forme de dégradosome simplifiée (RNase E et PNPase) chez les souches de *Streptomyces*. *B. subtilis* possède 11 ribonucléases pouvant potentiellement être impliquées dans la dégradation des ARNm mais les clivages au sein des ARNm proviendraient plutôt de maturations (Condon, 2007). Une étude récente a démontré l'existence d'un dégradosome minimal de *B. subtilis* impliquant trois RNases, Rnase J1, J2 et Rny, la PNPase et deux enzymes impliquées dans des activités glycolytiques, l'enolase et la 6P-fructokinase (Commichau *et al.*, 2009).

Très récemment, une étude a montré que ce dégradosome implique également l'hélicase à ARN CshA, dont la capacité de dimérisation est démontrée pour la première fois

et qui interagit avec ses partenaires via son extrémité C-terminale (Lehnik-Habrink *et al.*, 2010). Le dégradosome de *B. subtilis* a été purifié avec la fraction membranaire, ce qui laisse penser à un ancrage du complexe à la membrane bactérienne (Figure 16)

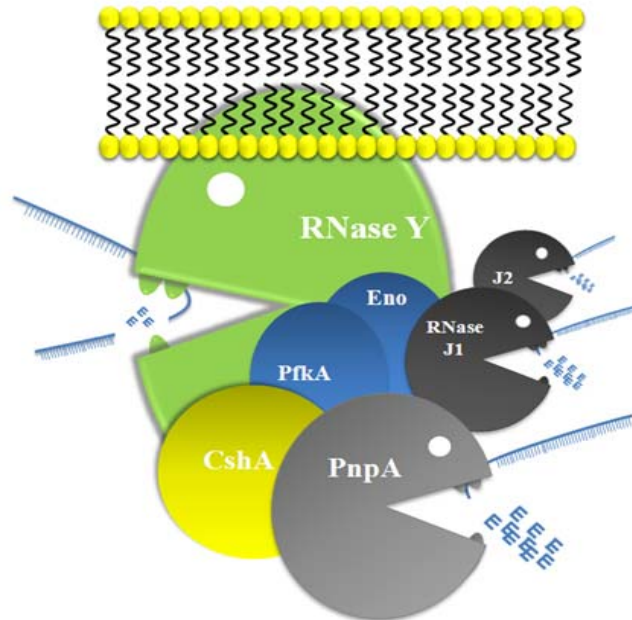


Figure 16: Représentation schématique du dégradosome de *B. subtilis* : Le complexe est lié à la membrane via la RNase Y représentée en vert, qui interagit directement avec la phosphofructokinase (PfkA), l'énolase (Eno), la PNPase (PnpA) et la RNase J1. L'hélicase CshA interagit également avec la RNase Y, PnpA, PfkA et Eno. La RNase J2 interagit avec J1 (Lehnik-Habrink *et al.*, 2010)

IV. Adaptation au froid de *B. cereus*

B. cereus est une bactérie largement disséminée dans la nature et qui doit donc être capable de s'adapter à de nombreuses variations de température. La structuration en groupes phylogénétiques associés à un domaine de croissance indique que l'adaptation de *B. cereus* est un phénomène important dans l'évolution de cette bactérie, ce qui en fait un bon modèle d'étude des mécanismes de l'adaptation au froid.

L'existence de souches de *B. cereus* capables de croître à 4°C et 7°C mais pas à 43°C a conduit à la recherche de signatures moléculaires spécifiques des souches psychrotolérantes. Comme nous l'avons déjà décrit, ces souches ont été regroupées dans l'espèce *Bacillus weihenstephanensis*. Cette espèce se définit outre son domaine de croissance par la présence d'une signature particulière au sein de la séquence du gène codant la protéine CspA qui ne semble pas donner une fonctionnalité particulière à cette protéine (Francis *et al.*, 1998; Lechner *et al.*, 1998). Ces propriétés concernent aussi *Bacillus mycoides* qui constitue le groupe génétique VI avec *B. weihenstephanensis* comme décrit dans le paragraphe I-2 (Guinebretière *et al.* 2008). En outre, une séquence de l'ADNr 16S modifiée semble caractéristique de la psychrotrophie. Les souches de *B. cereus* contiennent entre 6 et 10 copies d'ADNr 16S. Certaines souches ne possèdent la signature psychrotrophe que sur une partie des opérons ADNr. Cette signature est distribuée dans tout le groupe *B. cereus*, et n'est pas restreinte au groupe VI comme la signature CspA. La capacité à croître à basse température semble être corrélée avec la prépondérance de la signature psychrotrophe (Lechner *et al.*, 1998; Pruss *et al.*, 1999).

La croissance de *B. cereus* à une température, proche de sa limite de croissance, entraîne une hétérogénéité de la population. Celle-ci se traduit par la coexistence d'une population qui est capable de s'adapter au stress froid et d'un pourcentage de la population qui ne parvient pas à reprendre une croissance et donc ne s'adapte pas à ces conditions de culture. Cette incapacité à s'adapter proviendrait d'une perte d'intégrité membranaire (den Besten *et al.*, 2010).

A l'image de la réponse mise en place par de nombreuses autres espèces bactériennes lors d'un choc froid, *B. cereus* maintient la fonctionnalité de sa membrane en augmentant l'insaturation de ses acides gras (Haque and Russell, 2004). La comparaison des profils d'acides gras membranaires à 37°C et 12°C montre plusieurs différences dont notamment une

surproduction à basse température d'un acide gras insaturé à 13C. La délétion d'une lipase de *B. cereus* ATCC 14579 ne permet pas l'augmentation de la proportion de cet acide gras insaturé et altère la croissance du mutant à 12°C par rapport à la souche sauvage (Brillard *et al.*, 2010).

La comparaison des protéomes extraits de cellules de la souche *Bacillus cereus* WSBC 10201 cultivées à 30°C et 7°C indique qu'une petite protéine de choc froid CspA semble être la protéine majoritairement synthétisée à basse température par *B. cereus* (Mayr *et al.*, 1996). Il existe chez *B. cereus* 4 autres protéines de choc froid nommées CspB à E, mais seule CspA semble être induite par le froid. CspA qui présente 63% de similarité avec CspA d' *E. coli* et 71% avec CspB de *B. subtilis* est capable d'interagir sous forme de dimère avec l'ADN (Mayr *et al.*, 1996).

Un régulateur de réponse de *B. cereus* a été identifié comme étant exprimé lors de la croissance à basse température, ce régulateur qui n'appartient pas à la famille des régulateurs de réponse DesR, serait impliqué dans le contrôle de l'expression d'enzymes de modifications du peptidoglycane telles que les mureines hydrolases (Brillard *et al.*, 2010).

A basse température, *B. cereus* modifierait son métabolisme en utilisant le glucose comme source de carbone via le cycle de Krebs vers une métabolisation du glucose par la voie des pentoses phosphates et l'oxydation de l'acétate (Chung *et al.*, 1975). En conséquence, il y a une diminution importante des métabolites résultant du métabolisme du glucose, tels que les acides organiques excrétés dans le milieu dont les quantités relatives sont entre 2 et 8 fois moins importantes à 7°C qu'à 32°C (Chung *et al.*, 1975).

La capacité d'adaptation aux basses températures est l'un des facteurs permettant à *B. cereus* de provoquer des TIAC. La compréhension de ces mécanismes est donc un enjeu important afin de mieux prédire et mieux maîtriser la croissance de ce pathogène.

L'étude de la résistance au choc froid se caractérise par le transfert d'une température optimale vers une température froide et cherche à déterminer les facteurs permettant la survie dans les premières minutes suivant le choc froid, l'étude de l'adaptation aux basses températures de croissance cherche à identifier les mécanismes assurant la survie, la reprise de croissance et le développement bactérien optimal dans des conditions de stress froid.

Les études visant à comprendre cette capacité d'adaptation aux basses températures se sont principalement focalisées sur des variations de métabolisme énergétique ou lipidique et sur l'existence d'une hétérogénéité de population dans ces conditions défavorables de croissance.

Cependant l'une des clés majeures de l'adaptation aux conditions de stress chez les bactéries semble être la régulation de l'expression des gènes. A ce jour, seules les études ayant identifiées d'une part l'existence d'une signature caractéristique de la croissance au froid au niveau de l'ADNr16S et, d'autre part l'expression spécifique d'un certain nombre de gènes durant la croissance à basse température de *B. cereus* ont envisagé cette adaptation sur un plan moléculaire.

Les hélicases à ARN semblent jouer un rôle prépondérant dans le contrôle de l'expression des gènes à basse température en étant impliquées aussi bien dans la traduction que dans la dégradation des ARNm. Ainsi, l'étude de l'implication et du rôle des hélicases à ARN de *B. cereus* permettrait de comprendre comment *B. cereus* s'adapte lorsqu'il est soumis à un stress froid.

V. Présentation du sujet de thèse

L'appréciation quantitative du risque lié à la consommation de produits prêts à consommer potentiellement contaminés par *B. cereus*, se base sur des modèles prédictifs de croissance. La phase de latence observée au cours de la croissance à basse température est un phénomène extrêmement délicat à modéliser. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'adaptation au froid de *B. cereus* pourraient permettre à terme une maîtrise accrue des risques de survie et de croissance de souches mésophiles de *B. cereus* productrices de toxines au cours de la conservation des aliments.

Dans cette optique plusieurs approches ont été entreprises dans notre laboratoire afin d'identifier les gènes et les mécanismes impliqués dans cette adaptation au froid. Une approche sans *a priori* a consisté à construire une banque de mutants transpositionnels et à sélectionner les mutants cryosensibles. Un de ces mutants possédait un transposon inséré dans la région promotrice d'une hélicase à ARN, suggérant un rôle important de cette protéine chez *B. cereus*.

A partir de ce résultat, nous avons investigué au cours de ce travail de thèse, le rôle possible des différentes hélicases à ARN dans l'adaptation à basse température d'une souche modèle ATCC 14579 de *B. cereus*. Les spécificités d'action et les mécanismes mis en jeu ont également été étudiés.

Résultats

Chapitre 1: Identification de gènes impliqués dans l'adaptation au froid de *B. cereus*

1. Introduction à l'étude

Les souches appartenant au groupe *B. cereus sensu lato* possèdent un domaine de croissance extrêmement large de 7°C à 50°C. Ces souches sont divisées en 7 groupes phylogénétiques qui regroupent des souches dont le domaine de croissance est proche (Guinebretiere *et al.*, 2008). Les souches psychrotrophes sont retrouvées dans le groupe génétique VI, qui inclut toutes les souches de l'espèce *B. weihenstephanensis*, qui sont peu productrices de toxines (Francis *et al.*, 1998; von Stetten *et al.*, 1998; Choma *et al.*, 2000; Guinebretiere *et al.*, 2008) et dans le groupe génétique II, qui comprend également des souches associées à des cas de toxi infections alimentaires (Stenfors and Granum, 2001; Arnesen *et al.*, 2008; Guinebretiere *et al.*, 2008).

Les toxi-infections alimentaires à *B. cereus* impliquent toujours des populations importantes, ce qui signifie que cette bactérie doit être capable de se multiplier fortement durant les étapes qui précèdent la consommation de l'aliment et notamment durant la réfrigération. L'adaptation au froid de *B. cereus* implique des protéines de chocs froids, telles que la protéine CspA, qui est majoritairement induite suite à un choc froid chez *B. weihenstephanensis* (Mayr *et al.*, 1996). Cette protéine agirait comme un chaperon moléculaire en empêchant la formation de structures secondaires dans les ARNm à basse température.

Lors d'une croissance à basse température ou d'un choc froid, la membrane bactérienne se rigidifie, ce qui peut altérer les échanges entre le milieu extérieur et le milieu intérieur. La bactérie doit donc s'adapter pour assurer le maintien de la fluidité membranaire: des études ont montré que *B. cereus* s'adapte en augmentant notamment la proportion d'acides gras branchés, en diminuant les acides gras à chaînes longues, en augmentant le rapport d'acides gras antéiso/ iso mais aussi la quantité d'acides gras insaturés afin d'abaisser le point de fusion de la membrane (Haque and Russell, 2004).

Bien que d'autres mécanismes puissent être impliqués dans l'adaptation au froid, comme cela a été rapporté pour d'autres espèces bactériennes, très peu de données étaient disponibles lorsque nous avons débuté notre étude sur les mécanismes d'adaptation de *B. cereus* aux basses températures de croissance.

Nous avons donc entrepris par une approche sans a priori de:

- **Déterminer quels sont les gènes importants pour l'adaptation et la croissance à basse température de *B. cereus***
- **Caractériser les gènes potentiellement impliqués dans cette adaptation.**

2. Stratégie envisagée

- a. Construction et criblage à basse température d'une banque de mutants transpositionnels

Une banque de mutants transpositionnels a été construite par insertion d'un élément mobile appelé mini*Tn10*, de manière aléatoire dans le génome de la bactérie *B. cereus* ATCC 14579. Cette banque a été criblée à basse température, avant mon arrivée au laboratoire, afin de sélectionner les mutants dont la croissance est affectée à 10°C par rapport à la souche sauvage, mais ayant une capacité de croissance comparable à 30°C. Pour cela, les mutants ont d'abord été sélectionnés sur milieu gélosé puis leur défaut de développement à basse température a été confirmé par des croissances en milieu liquide. Ce criblage a permis d'identifier 4 clones dont la croissance est affectée de manière reproductible à 10°C. La présence d'une seule copie du transposon au sein du génome de *B. cereus* a été confirmée par Southern-blot afin d'éliminer la possibilité que le phénotype observé résulte de la mutation de plus d'un gène.

- b. Identification des gènes interrompus par le transposon

L'ADN génomique des 4 souches mutantes a été extrait puis soumis à l'action d'une enzyme de restriction absente de la séquence du transposon et générant un grand nombre de fragments aléatoires. Les fragments ainsi générés ont été soumis à l'action d'une ADN ligase afin de les circulariser. L'ADN circularisé a été transformé dans *E. coli* et les transformants

sélectionnés pour leur résistance à la spectinomycine conférée par la présence du transposon. L'ADN circulaire extrait des clones résistant a été amplifié par PCR inverse, les produits de PCR générés ont été séquencés, et les gènes identifiés par comparaison avec la séquence complète du génome de *B. cereus*.

c. Caractérisation du gène *BC0259*

Le mutant, dont la croissance est affectée de manière reproductible, présente l'insertion d'un transposon dans la région promotrice du gène *BC0259*, codant pour une hélicase à ARN putative. Cette ARN hélicase a tout d'abord été nommée YdbR dans le génome de *B. cereus* ATCC 14579, par homologie avec *Bacillus subtilis* puis renommée CshA.

i. Détermination de l'unité de transcription

La séquence du gène *BC0259* a été étudiée chez la souche sauvage cultivée à 10°C par la méthode 5'RACE-PCR, afin de déterminer le site d'initiation de la transcription. Cette technique est présentée dans le schéma suivant :

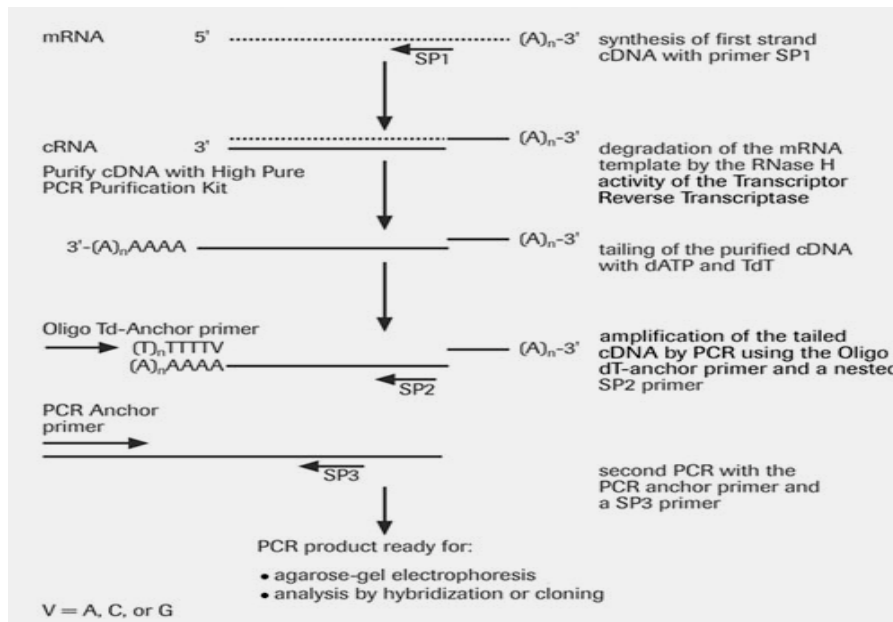


Illustration du protocole de la technique 5'RACE PCR (Kit Roche)

tel-00765823, version 1 - 17 Dec 2012

L'analyse bioinformatique de la région promotrice a permis, après avoir déterminé le site d'initiation de la transcription, d'identifier les éléments putatifs de la régulation de la transcription présents dans la région promotrice.

ii. Expression du gène BC0259

Des expériences de RT-PCR ont été réalisées afin de déterminer si ce gène est transcrit sous la forme d'un ARNm monocistronique ou bien co-transcrit avec les gènes environnants. L'effet de l'insertion du transposon sur l'expression du gène *BC0259* a été étudié. Pour cela, des cellules de la souche sauvage et du mutant ont été cultivées à 10°C et 30°C et les ARN totaux de ces cellules ont été extraits. Le niveau d'expression du gène dans le mutant transpositionnel a été comparé à celui de la souche sauvage par une méthode de RT-PCRq, qui repose sur le suivi en temps réel de l'incorporation d'un marqueur fluorescent dans l'ADN double brin en cours de formation et issu des ARNm: plus un ARNm est présent en grande quantité, plus le signal de fluorescence dépasse rapidement le seuil de détection (Ct). Il s'agit d'une quantification relative du gène, normalisée à l'aide de l'expression du gène codant pour l'ARNr16S, dans la condition testée par rapport à une condition de référence selon les formules suivantes :

Etape 1: normalisation par rapport au contrôle endogène

$$Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{contrôle endogène}} = \Delta Ct$$

Etape 2: normalisation par rapport au standard

$$\Delta Ct_{\text{condition testée}} - \Delta Ct_{\text{condition référence}} = \Delta \Delta Ct$$

Etape 3: détermination de la variation du niveau d'expression relative du gène cible

$$2^{-\Delta \Delta Ct}$$

3. Résultats et discussion

Le mutant présentant l'insertion du transposon dans la région promotrice du gène *BC0259*, possède une phase de latence augmentée à 10°C d'environ 50 h par rapport à la souche sauvage. L'expression du gène *BC0259* est 2.7 fois moins importante dans le mutant

que dans la souche sauvage à 10°C au cours de la phase de latence, alors que les niveaux d'expression sont comparables pour les deux souches en phase exponentielle. La cartographie du transcrit a révélé la présence, en amont et en aval du site d'initiation de la transcription, d'éléments putatifs de régulation de la transcription et de la traduction à basse température de type « cold box ». La difficulté du mutant à s'adapter au froid semble être due à la dérégulation de l'expression du gène *BC0259*, suggérant un rôle important de ce gène au cours de la phase d'adaptation. Cette dérégulation de l'expression semble être consécutive à l'insertion du transposon à 61pb en amont du codon d'initiation, ce qui pourrait perturber la conformation de la région promotrice et empêcher la fonction des éléments de régulation identifiés.

Le gène *BC0259* joue un rôle majeur dans la capacité d'adaptation au froid de *B. cereus* et son niveau d'expression au cours de la phase de latence conditionne cette capacité d'adaptation.

4. Insertional mutagenesis reveals genes involved in *Bacillus cereus*

ATCC 14579 growth at low temperature

Véronique Broussolle^{1,2*}, Franck Pandiani^{1,2}, Nabila Haddad^{1,2}, Caroline Michaud^{1,2}, Frédéric Carlin^{1,2}, Christophe Nguyen-the^{1,2} and Julien Brillard^{1,2}.

Published in FEMS Microbiology Letters (2010) 306: 177-183.

¹INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

²Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

* Corresponding author: INRA, UMR408, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France.

E-mail: broussol@avignon.inra.fr; Tel: (33) (0) 432 72 25 18. Fax: (33) (0) 432 72 24 92

Running head: *B. cereus* growth at low temperature

Keywords: *B. cereus*, low temperature, transposon mutagenesis, RNA helicase

Abstract

Transposon mutagenesis of *Bacillus cereus* ATCC 14579 yielded cold-sensitive mutants. Mutants of genes encoding enzymes of the central metabolism were affected by cold but also by other stresses, such as pH or salt whereas a mutant with transposon insertion in the promoter region of BC0259 gene, encoding a putative DEAD-box RNA helicase displaying homology with *Escherichia coli* CsdA and *Bacillus subtilis* CshA RNA helicases, was only cold-sensitive. Expression of BC0259 gene at 10°C is reduced in the mutant. Analysis of the 5' untranslated region revealed the transcriptional start and putative cold shock responsive elements. The role of this RNA helicase in cold adaptive response of *B. cereus* is discussed.

Introduction

Bacillus cereus is a Gram-positive, endospore forming bacterium which frequently causes emetic and diarrhoeal types of foodborne illnesses. The growth domains of strains of *B. cereus sensu lato* range from nearly thermophilic to psychrotrophic and correlate with several phylogenetic clusters (Guinebretiere *et al.*, 2008). The psychrotrophic strains are shared between two genetic groups: Group VI includes all *B. weihenstephanensis* strains (Francis *et al.*, 1998; von Stetten *et al.*, 1998) having a low ability to cause gastro-enteritis (Choma *et al.*, 2000; Guinebretiere *et al.*, 2008), whereas psychrotolerant strains of Group II have been associated to food poisoning outbreaks (Stenfors and Granum, 2001; Arnesen *et al.*, 2008; Guinebretiere *et al.*, 2008). *B. cereus* foodborne poisonings are the result of ingestion of foods supporting a high rate of the bacterium multiplication and the adaptation to low temperatures in case of refrigerated storage. Cold shock-proteins are involved in *B. cereus* low temperature adaptation, for instance in *B. weihenstephanensis* strains where CspA protein appears to be strongly induced during low temperature continuous growth and cold shock (Mayr *et al.*, 1996). This protein may act as a chaperon to block the formation of RNA secondary structures at low temperature. *B. cereus* adapts membrane fluidity during low temperature growth by increasing the proportion of branched-chain fatty acids and decreasing their equivalent chain-length, and increasing the anteiso-/iso-branched ratio and the proportion of unsaturated fatty acids (Haque and Russell, 2004). Other mechanisms are likely involved as described for other bacteria. No functional evidence for the role of a gene in the cold adaptation of *B. cereus* has been obtained so far. To find genes specifically involved in low temperature adaptation of *B. cereus*, a random transposition mutant library constructed in the ATCC 14579 type strain was screened.

Materials and methods

Strains and growth conditions

B. cereus ATCC 14579 (WT) and *E. coli* cells were routinely grown in Luria-Bertani broth (LB) under vigorous shaking. When required, the antibiotics used for bacterial selection were: ampicillin at 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *E. coli*, spectinomycin at 275 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *B. cereus* and 70 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *E. coli* and erythromycin at 2 to 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for *B. cereus*. Growth of mutants was compared to WT in LB medium, either in flasks (100 ml) at 30°C and 10°C or in microplates using a Bioscreen C analyser (Labsystems, Uxbridge, UK) to test various pH and NaCl concentration. Flasks and microplates were vigorously shaken. In flasks, OD₆₀₀ and plate counts were followed. In Bioscreen C, OD₆₀₀ was recorded every 15 min, with three replicate wells for each pH and NaCl concentration. To test survival at 4°C, 2.5 ml tubes containing LB or LB+10 $\mu\text{g/ml}$ of chloramphenicol were inoculated with exponential phase subcultures of WT and mutant cells and incubated at 4°C for 35 days. The number of survivors was determined by plating on triplicate LB agar plates, 100 μl volumes of serial dilutions in demineralised water of the culture stored at 4°C and counting the colonies formed after 16h incubation at 30°C. This experiment was done in duplicate.

Transposon mutagenesis

The thermosensitive plasmid pIC333 (10 μg), carrying the mini-Tn10 transposon with the spectinomycin resistance gene, was introduced by electroporation (Mahillon and Lereclus, 2000) into *B. cereus* ATCC 14579 to produce a library of mutants following a protocol adapted from (Gominet *et al.*, 2001). Spectinomycin-resistant mutants were screened for impaired growth at 10°C on LB-agar plates and in LB broth. For identification of the mutated genes, DNA regions surrounding sites of the mini-Tn10 insertion were sequenced by inverse PCR from *B. cereus* chromosome using E1 and E3. Transposon insertion in mutant strains was checked by Southern hybridisation. Mutant DNAs were digested to completion with

EcoRI, electrophoresed and transferred to positively charged nylon membrane. The filter was hybridised with a ³²P-labelled mini-Tn10 probe, generated by PCR using the E2 (5'-GCTAAAACAATAGCCAAATC-3') and E4 (5'-ACTGTTCAATAAAGCTGACC-3') primers.

DNA manipulation

Plasmid DNA was extracted from *B. cereus* and *E. coli* by a standard alkaline lysis procedure (Brillard *et al.*, 2008). Chromosomal DNA was extracted from *B. cereus* cells harvested in mid-log phase (Guinebretiere *et al.*, 2003). PCR was performed using the Expand high fidelity DNA polymerase (Roche Applied Science). Amplified DNA fragments were purified using the PCR purification Kit (Roche Applied Science), digested and extracted from 0.7 % agarose gels using the DNA gel extraction kit (Millipore). DNA sequencing was performed by Cogenics.

RT-PCR and relative qRT-PCR

Total RNAs were extracted from 2 independent cultures of *B. cereus* WT and from 2 independent cultures of 9H2 cells grown in LB broth at 30°C (OD₆₀₀=1.0) or at 10°C (OD₆₀₀=0.2 and OD₆₀₀=1.0), using the RNA extraction Pro-blue kit (Q-Biogen). cDNA synthesis from 500 ng of total RNA treated with the DNaseI (Roche Applied Science) was performed using the Titan One Tube RT-PCR System (Roche Applied Science). Specific amplifications were performed by 30 cycles of PCR with Expand-High Fidelity polymerase (Roche Applied Science), using the primers ydbRF (5'-GCGCGTCGACCGGCTATGATGTTTTCTTTC-3') and ydbRR (5'-GCGCGAATTCAGAGGCTACACCAATTCAAG-3') for BC0259 gene, mfep6F (5'-GCGCCAATTGAGCATACTACAAGCGTATTGC-3') and ydcAR (5'-AATGCACACTCATCGCAACG-3') for a region overlapping BC0259 and BC0260, and SP1 (5'-TGCCCAATAATATCTTTACC-3') and murFF (5'-AGATTTACAAGCAGTAGTCG-3') for a region overlapping BC0258 and BC0259 genes.

Quantitative Real-time RT-PCR was performed using a Light-Cycler equipment and the LightCycler RNA Amplification kit SYBR Green I (Roche Applied Science) as previously described (Duport *et al.*, 2006; Brillard *et al.*, 2008). The primers used were ydbRFq (5'-TTTACCGATTTATGGTGGTC-3') and ydbRRq (5'-TAGAACTGCTGAATGTTTGG-3') and 16SF (5'-GGTAGTCCACGCCGTAAACG-3') and 16SR (5'-GACAACCATGCACCACCTG-3') for amplification of BC0259 and *ssu* cDNA, respectively. Change in mRNA amount was normalized to the RNA level of the *ssu* gene encoding 16S RNA and quantified by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using the mathematical model previously described (Pfaffl, 2001). Only ratios of ≤ 0.5 and ≥ 2 were considered to be significant (i.e., $P \leq 0.05$) according to the precision of the method. The coefficient of variation of the ΔCt values (where ΔCt represents the differences in threshold cycle between the target and the control gene) was $< 30\%$.

Mapping of the transcriptional start site

The 5' end of the BC0259 mRNA extracted from WT cells grown at 10°C to $OD_{600}=0.2$ was mapped with a 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR product obtained with the 3'/5' RACE kit, 2nd generation (Roche Applied Science). Briefly, the first-strand cDNA was synthesized from 500 ng of total RNA with BC0259 -specific primer SP3 (5'-GTACCAACAATAATGTGTGG-3'). After purification and dA-tailing of the cDNA, a PCR with the dT-anchor oligonucleotide primer and two BC0259 -specific primers SP1 and SP2 (5'-CCGATTCTTTATGTGTATCC-3') led to PCR products of 275 bp and 352 bp respectively. These amplicons were cloned in pCR4-TOPO vector (Invitrogen). Several clones were sequenced

***In silico* analysis**

DNA and amino acid sequences were analyzed using ExpASy servers (<http://au.expasy.org/>). DNA and protein homology searches were analysed by BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequences were aligned using MultAlin program (Corpet, 1988). The genome sequence of *B. cereus* ATCC 14579 is located at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Results

Selection and identification of *B. cereus* cold-sensitive mutants

A total of 4,700 spectinomycin-resistant clones of the mini-Tn10 library constructed in *B. cereus* ATCC 14579 (WT), together with the WT strain as a control, were patched on LB-agar plates and grown at 10°C. The temperature of 10°C is close to the growth limit of that strain: no growth was observed in LB broth at 9°C while growth was slow at 10°C (data not shown). WT colonies were visible on agar after 2 days. Colonies of 10 mutants were visible only after 18 days and 13 clones did not form colonies after 21 days. These 23 cold-sensitive mutants were further tested for growth in LB medium with shaking at 30°C and 10°C. After three independent cultures, 4 clones were reproducibly impaired for growth at 10°C, 8C12, 11D1, 9H2 and 34G8 mutants (Fig 1a).

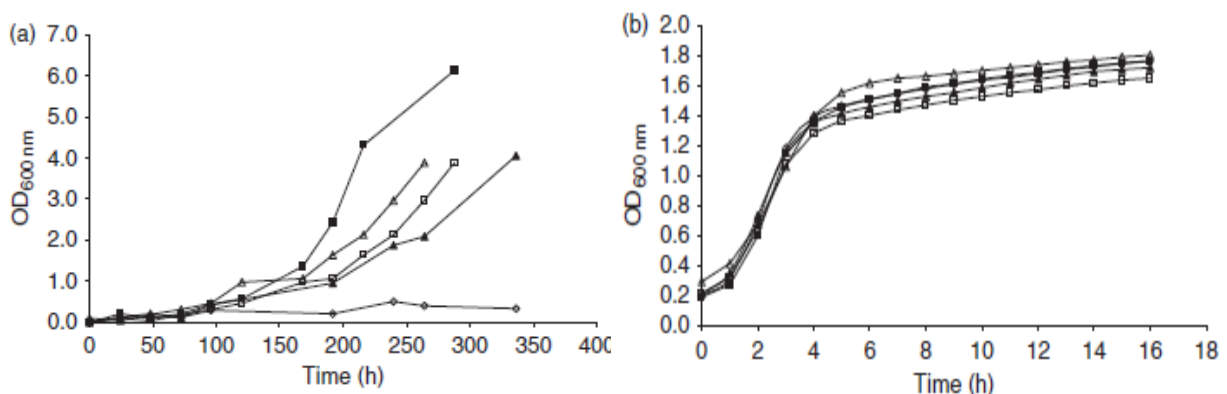


Fig. 1. Growth at 10 °C (a) and 30 °C (b) of *Bacillus cereus* ATCC 14579 (■), 34G8 (◇), 8C12 (△) 9H2 (▲), 11D1 (□) mutant strains in LB broth. Values are means of duplicate independent cultures.

These 4 strains belong to the group of mutants that did not form any colony after 21 days incubation at low temperature. All grew as the WT strain at 30°C (Fig 1b). Southern

hybridisations confirmed that all mutants carried a single copy of the transposon (data not shown). For the 34G8 and 8C12 mutants, sequencing of the DNA flanking the transposon insertion site revealed that *miniTn10* was inserted in the same chromosomal region, respectively in the BC3773 and BC3774 ORFs, coding for the subunit α and β of the pyruvate ferredoxin oxidoreductase involved in the reductive monocarboxylic acid cycle. In the 11D1 mutant, transposon was inserted in the promoter region of the BC3118 gene, encoding a small cytochrome P450-like enzyme with unknown function. In the mutant 9H2, transposon was inserted in the 5' untranslated region of the BC0259 gene coding for a putative RNA helicase. These mutants were then tested in various stress conditions. Only the mutant 9H2 behaved as the WT over the range of pH (Fig 2a) and NaCl (Fig 2b) concentration tested, suggesting that the mutation altered a gene important for cold adaptation and not for adaptation to other stresses: this mutant was therefore selected for further characterisation.

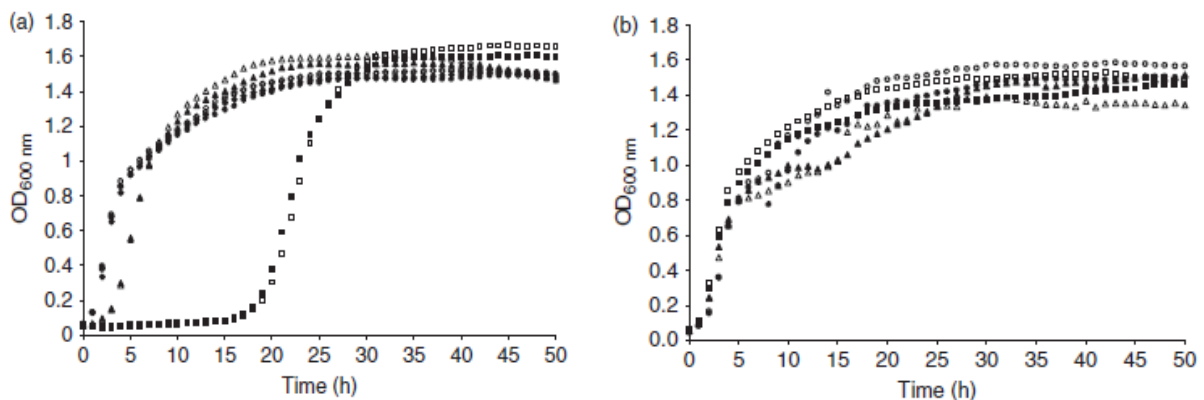


Fig. 2. Growth of WT (solid symbols) and 9H2 (open symbols) strains in iLB broth at varying pH [a; pH 4.3 (■, □), 4.8 (▲, △), 7.3 (●, ○), 8.0 (◆, ◇)] and NaCl concentrations [b; NaCl 1% (■, □), 2% (▲, △), 3% (●, ○), 5% (◆, ◇)]. No growth was observed at pH 4.0 and 6% NaCl. Values are means of triplicate independent cultures.

Cold-phenotype of 9H2 mutant

Growth of the mutant 9H2 at 10°C was delayed by approximately 100h compared to WT, whereas at 30°C growth of both strains was identical (Fig 1). Stable cell counts during extended lag at 10°C suggest cell adaptation rather than death (not shown). The morphology of 9H2 cells at 30°C was similar to that of WT cells (data not shown). At 10°C, WT and 9H2

cells were longer than at 30°C and 9H2 formed large aggregates (single cells were rarely observed). During incubation at 4°C, viable counts decreased regularly over time and after 35 days, a viability loss of 5 log cfu was observed for WT cells vs 4 log cfu for 9H2 cells (Fig 3). In presence of chloramphenicol, an inhibitor of protein translation, a viability loss of only 2 log cfu was observed for WT and 9H2 cells.

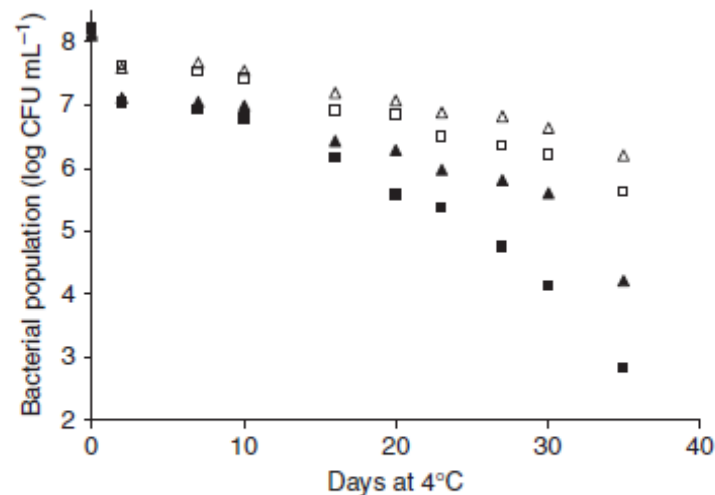


Fig. 3. Survival at 4 °C in LB medium (filled symbols) or in LB+chloramphenicol (open symbols) of WT *Bacillus cereus* (■, □) and 9H2 mutants (▲, △). Values are means of duplicate independent cultures.

Description of BC0259 gene and product

In 9H2 mutant, transposon was inserted 61 bp upstream of the start codon of BC0259 gene encoding an RNA helicase (Fig 4a). We confirmed by sequence analysis that the promoter located in the transposon was oriented in the opposite way of BC0259 transcription which is consequently only driven by its own promoter. The 1,599-bp coding sequence of BC0259 has putative ribosome-binding site 5 nucleotides upstream the TTG start codon. In the WT strain, a transcriptional start site (T) located 140 bp from the start codon (Fig 4a) was determined by 5' RACE PCR (not shown). Upstream, a potential σ_A -type promoter was identified with a (TATAAT) -10 box, and a (TTTACA) -35 box, exhibiting high conservation with the *B. subtilis* consensus sequences. A sequence motif TGAAGAATATA, highly similar to the

consensus sequence of the bacterial cold-box element (TGA (C/A) N (A/T) ACANA (Hunger *et al.*, 2006) was mapped at +25 bp downstream of the transcriptional start (Fig 4a). Two additional putative boxes also displaying homology with cold-box consensus sequences were located upstream of the -10 and -35 promoter regions. The BC0259 gene is followed by an inverted repeat with a ΔG° of -28.3 kcal/mol.

This repeat could be a transcriptional terminator suggesting a BC0259 transcription as a single unit (Fig 4A). RT-PCR with RNA from WT and mutant cultures at 10°C and 30°C confirmed that BC0259 gene was not co-transcribed with the upstream and downstream genes (data not shown). The BC0259 gene encodes a protein of 533 amino acids (aa) with a calculated Mw of 59,400 Da and a pI of 9.58. Alignment of the BC0259 aa sequence with NR-database sequences showed the presence of nine motifs highly conserved in the DEAD-box family of RNA helicases (Fig 4b). Motif I (Walker A) and motif II (Walker B) are required for NTP/ATP binding and hydrolysis. Motif III has been suggested to couple NTP hydrolysis to helicase activity. Motif VI was shown to function in ATP hydrolysis. Motifs Ia, Ib, IV and V bind to substrate RNA. The Q motif is thought to be specific to DEAD-box RNA helicases and acts as an ATP sensor (Cordin *et al.*, 2006; Bleichert and Baserga, 2007). In addition to this core protein, BC0259 is flanked by a C-terminal domain of approximately 92 aa, rich in glycine and arginine and containing several RNRD (arginine/asparagine/arginine/aspartic acid) repetitions conserved in the BC0259 homologues of the sequenced genomes of the *B. cereus* group strains.

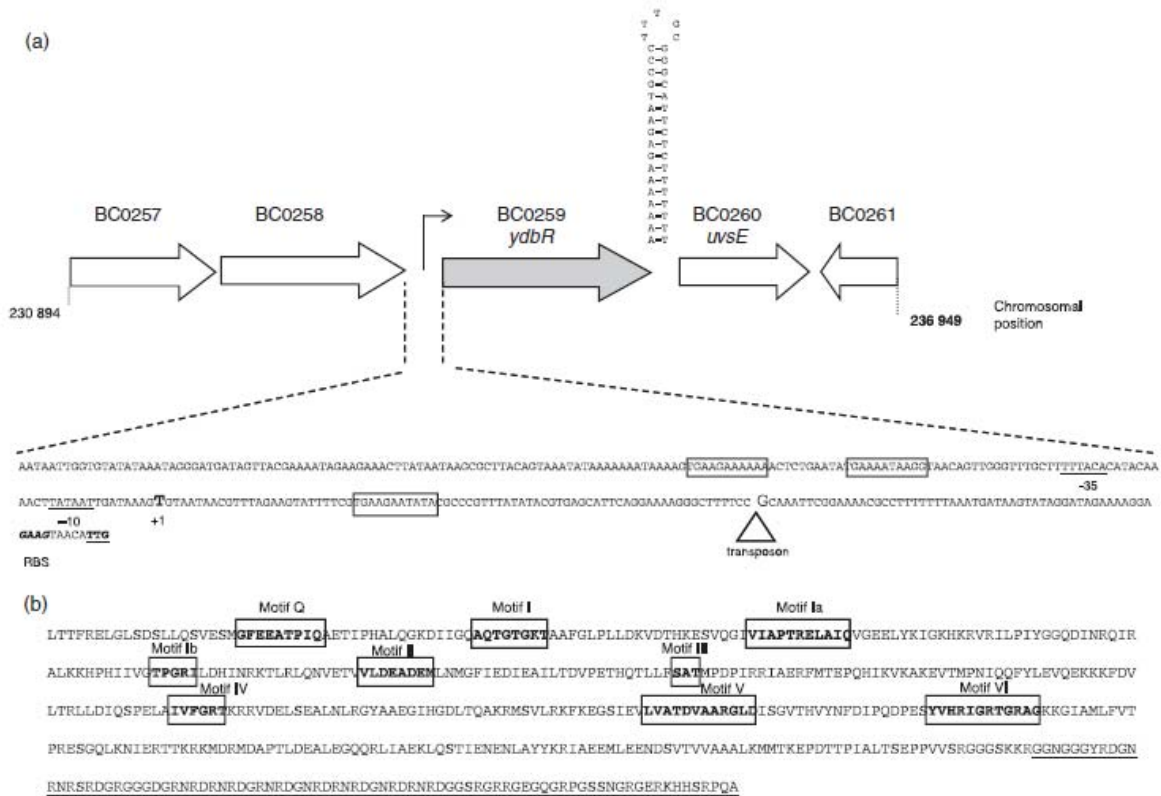


Fig. 4. (a) Map of the *Bacillus cereus* ATCC 14579 BC0259 chromosomal region. Arrows represent ORFs. Putative function of gene products: BC0257, α -alanine- α -alanine ligase; BC0258, UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide- α -alanyl- α -alanine ligase; BC0259, ATP-dependent RNA helicase; BC0260, UV-endonuclease and BC0261, hypothetical protein. Small arrows represent the putative promoter. In the 310-bp BC0259 promoter region, putative -10 and -35 σ_{A} boxes (underlined), initiation of transcription (bold), RBS (bold italic) are indicated, and the start codon (bold and underlined). Putative cold-boxes are boxed. The position of the mini-Tn10 transposon integrated in the 9H2 chromosome is indicated. The predicted stem-loop at the end of BC0259 is represented. (b) Amino acid sequence of BC0259 of *B. cereus* ATCC 14579. The nine conserved sequence motifs of RNA helicases are boxed, and the C-terminal domain is underlined.

Expression of *BC0259* gene

BC0259 gene expression at 10°C and 30°C in WT and 9H2 cultures at $OD_{600}=1.0$ was tested by RT-PCR experiments. WT transcripts were detected at 30°C and 10°C and amplicons were also obtained from 9H2 RNA (data not shown), indicating that insertion of the transposon upstream *BC0259* gene did not abolish its expression at both 30°C and 10°C. RNAs were then quantified by real-time RT-PCR in cells i) grown at 30°C at $OD_{600}=1.0$ and ii) grown at 10°C at $OD_{600}=0.2$ and $OD_{600}=1.0$. Expression of *BC0259* was 1.85 fold higher when WT cells were grown at 30°C and at $OD_{600}=0.2$ than at $OD_{600}=1.0$. It was 2.1 fold higher when the cells were grown at 10°C at similar ODs (data not shown). Thus, this gene was more expressed during the lag phase, at both tested temperatures. When compared to WT, *BC0259*

expression was repressed in 9H2 for cells grown at 10°C and at OD₆₀₀=0.2, corresponding to bacteria that were in the lag-phase and thus presumably adapting to low temperature (Table 1).

Table 1. Relative expression of the BC0259 gene in the 9H2 mutant vs. the WT *Bacillus cereus* strain at 10 and 30°C

Temperature (°C)	OD _{600nm}	mRNA level (n-fold) 9H2 vs. the WT strain*
30	1.0	+1.60
10	0.2	-2.70
10	1.0	+1.05

*For each condition, at least two measurements of the mRNA level from two independent cultures were performed. Only ratios of ≤ 0.5 and ≥ 2 were considered to be significant (i.e. $P \leq 0.05$) (see Materials and methods), + and - indicate, respectively, upregulation and down-regulation.

Discussion

B. cereus ATCC 14579 cold-adaptation genes were identified by a transposon mutagenesis strategy. One of the cold-sensitive mutants harbours a transpositional insertion upstream the BC3118 encoding a putative P450-cytochrome enzyme. This small protein of 86 amino acids is conserved in all the available genomes of the *B. cereus* group but no specific function was assigned to this enzyme and no link was described with low temperature adaptation. A second set of mutants presented defects in growth at 10°C: in those two mutants, transposon interrupted the two genes BC3773 and BC3774, encoding two subunits of the pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFOR). This enzyme catalyses the coenzyme A (CoA)-dependent oxidative decarboxylation of pyruvate with a ferredoxin as the electron acceptor (Charon *et al.*, 1999). The role of the PFOR in *B. cereus* cold adaptation is not clear. Bacteria in general modulate membrane fluidity by altering their fatty acid composition (Mansilla *et al.*, 2004). Absence of the PFOR activity may lead to a diminution of the quantities of acetyl-CoA, one of the precursor metabolite of the fatty acids synthesis. By the reverse reaction, mutation of PFOR activity could also decrease the amount of pyruvate produced from acetyl-CoA, leading to a decrease of the biosynthesis of amino acids such as

alanine, valine and leucine with an impact on protein synthesis. All these mutants showed impaired growth at low temperature but were also affected by salt or acid stresses. In contrast, the 9H2 mutant showed a marked and interesting cold-sensitive phenotype through a delayed growth at 10°C compared to WT, but was neither impaired in its growth at optimal temperature, nor in various tested stressful conditions. The 9H2 cell morphology at 30°C was similar to the WT. However at 10°C, 9H2 mutant formed long filamentous cells, while WT did not, suggesting that BC0259 could contribute to regular cell division of *B. cereus* at low temperature, as proposed for *E. coli* Δ *csdA* cells (Jones *et al.*, 1996).

BC0259 product was annotated in *B. cereus* ATCC 14579 genome as an RNA helicase with nine motifs that constitute the conserved helicase core and a DEAD box revealing that it belongs to the DEAD-box subgroup of the helicase superfamily 2 (Bleichert and Baserga, 2007). RNA helicases participate in many aspects of RNA metabolism (Silverman *et al.*, 2003) and some have been shown to be cold-induced (Jones *et al.*, 1996; Chamot *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2000). The 9H2 mutant harbours a transpositional insertion upstream BC0259 gene which reduced BC0259 gene expression during adaptation at 10°C, but not at 30°C, as revealed by qRT-PCR experiments. Insertion of the transposon may therefore interfere with elements of transcriptional or post-transcriptional regulation, leading to lower amounts of BC0259 transcripts during 9H2 adaptation at 10°C which could explain the growth delay compared to WT cells. Cold-induced transcripts have long 5' untranslated region (UTR) containing cold-box elements described in *E. coli*, *B. subtilis* or archeobacteria (Jiang *et al.*, 1996; Chamot *et al.*, 1999; Hunger *et al.*, 2006). These cis-elements modulate the stability of cold-induced mRNAs at low temperatures (Gualerzi *et al.*, 2003). Analysis of BC0259 5'-UTR revealed the presence of such cold-box elements, with (i) one box possibly located downstream of the +1 of transcription (thus on BC0259 mRNA) and (ii) two other conserved sequences located upstream from the +1 of transcription. The significance of these sequences

upstream of the BC0259 promoter remains to be determined. However, the role of cold-boxes in transcriptional regulation of cold genes has already been suggested elsewhere (Fang, *et al.*, 1997, Mitta, *et al.*, 1997).

The cold-phenotype of the 9H2 mutant is not due to a complete defect of RNA helicase encoding gene expression, as previously reported in other species with knockout mutants (Charollais *et al.*, 2004; Ando and Nakamura, 2006). This study clearly shows that the expression level of BC0259 gene and consequently the amount of transcripts in the cell has a great impact on low temperature adaptation of *B. cereus*. BC0259 was expressed at a higher level (about 2 fold) in WT cells grown at $OD_{600}=0.2$ when compared to cells grown at $OD_{600}=1.0$. This suggests the importance of this gene during this stage of the kinetics of growth, and is in agreement with the growth defect observed with the 9H2 mutant during the lag phase.

Four other RNA helicase encoding genes are present in *B. cereus* ATCC 14579 genome and may have a role in cold adaptation. Yet, they did not totally counterpart the effect of mutation in BC0259 gene at 10°C. 9H2 mutant survived better than WT at a non-permissive growth temperature, suggesting that the lower amount of BC0259 in the mutant had a positive effect on survival. Survival was improved in presence of chloramphenicol for both the WT and the mutant showing that limited amount of protein synthesis was required for survival. Moreover, it has been shown that addition of chloramphenicol increases the level of *cspA* transcripts (Jiang *et al.*, 1993) which is also dramatically induced in an *E. coli* RNA-helicase *csdA* mutant (Yamanaka and Inouye, 2001). This may suggest interactions between Csp and RNA helicases in *B. cereus* as described in *B. subtilis* (Hunger *et al.*, 2006).

Our transpositional approach revealed several genes clearly involved in low temperature adaptation with some also implicated in pH or salt stresses, suggesting possible cross responses in the adaptive potential of *B. cereus* ATCC14579. This study also

emphasizes the important role played by a DEAD-box RNA helicase in the cold adaptive response of *B. cereus*, and further researches are now needed to define the molecular function of this protein.

Acknowledgements

The authors thank Laura Coisne, Stéphanie Gagnier, and Michel Jobin for helpful assistance in creation and screening of the transposon-mutant library and D. Lereclus for gift of the pIC333 plasmid. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (ANR) (France) under the ANR-05-PNRA-013 *B. cereus* contract.

References

1. **Ando Y & Nakamura K** (2006) *Bacillus subtilis* DEAD protein YdbR possesses ATPase, RNA binding, and RNA unwinding activities. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70**: 1606-1615.
2. **Arnesen LPS, Fagerlund A & Granum PE** (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 579-606.
3. **Bleichert F & Baserga SJ** (2007) The long unwinding road of RNA helicases. *Mol. Cell* **27**: 339-352.
4. **Brillard J, Susanna K, Michaud C, et al.** (2008) The YvfTU two-component system is involved in plcR expression in *Bacillus cereus*. *BMC Microbiol* **8**: 183.
5. **Chamot D, Magee WC, Yu E & Owtrim GW** (1999) A cold shock-induced cyanobacterial RNA helicase. *J. Bacteriol.* **181**: 1728-1732.
6. **Charollais J, Dreyfus M & Iost I** (2004) CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res.* **32**: 2751-2759.
7. **Charon MH, Volbeda A, Chabriere E, Pieulle L & Fontecilla-Camps JC** (1999) Structure and electron transfer mechanism of pyruvate : ferredoxin oxidoreductase. **9**: 663-669.

8. **Choma C, Clavel T, Dominguez H, Razafindramboa N, Soumille H, Nguyen-the C & Schmitt P** (2000) Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. *Int J Food Microbiol* **55**: 73-77.
9. **Cordin O, Banroques J, Tanner NK & Linder P** (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* **367**: 17-37.
10. **Corpet F** (1988) Multiple Sequence Alignment with Hierarchical-Clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**: 10881-10890.
11. **Duport C, Zigha A, Rosenfeld E & Schmitt P** (2006) Control of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus* F4430/73 Involves the Redox-Sensitive ResDE Signal Transduction System. *J. Bacteriol.* **188**: 6640-6651.
12. **Fang L, Jiang WN, Bae WH & Inouye M** (1997) Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization. *Mol Microbiol* **23**: 355-364.
13. **Francis KP, Mayr R, von Stetten F, Stewart G & Scherer S** (1998) Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3525-3529.
14. **Gominet M, Slamti L, Gilois N, Rose M & Lereclus D** (2001) Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis plcR* regulon and for virulence. **40**: 963-975.
15. **Gualerzi CO, Giuliodori AM & Pon CL** (2003) Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J. Mol. Biol.* **331**: 527-539.
16. **Guinebretiere MH & Nguyen-The C** (2003) Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* **43**: 207-215.
17. **Guinebretiere MH, Thompson FL, Sorokin A, et al.** (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol* **10**: 851-865.
18. **Haque MA & Russell NJ** (2004) Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiology-(UK)* **150**: 1397-1404.
19. **Hunger K, Beckering CL, Wiegeshoff F, Graumann PL & Marahiel MA** (2006) Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **188**: 240-248.

20. **Jiang WN, Jones P & Inouye M** (1993) Chloramphenicol Induces the Transcription of the Major Cold Shock Gene of *Escherishia-Coli*, Cspa. *J. Bacteriol.* **175**: 5824-5828.
21. **Jiang WN, Fang L & Inouye M** (1996) The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherishia coli*, in cold-shock adaptation. *J. Bacteriol.* **178**: 4919-4925.
22. **Jones PG, Mitta M, Kim Y, Jiang WN & Inouye M** (1996) Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherishia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 76-80.
23. **Lim J, Thomas T & Cavicchioli R** (2000) Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *J. Mol. Biol.* **297**: 553-567.
24. **Mahillon J & Lereclus D** (2000) Electroporation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Electrotransformation of Bacteria*, (Eynard N & Teissie J, eds.), pp. 242-252. Springer-Verlag Berlin, Heidelberger Platz 3/D-14197 Berlin/Germany.
25. **Mansilla MC, Cybulski LE, Albanesi D & de Mendoza D** (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* **186**: 6681-6688.
26. **Mayr B, Kaplan T, Lechner S & Scherer S** (1996) Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *J. Bacteriol.* **178**: 2916-2925.
27. **Mitta M, Fang L & Inouye M** (1997) Deletion analysis of cspA of *Escherishia coli*: requirement of the AT-rich UP element for cspA transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction. *Mol Microbiol* **26**: 321-335.
28. **Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
29. **Silverman E, Edwalds-Gilbert G & Lin RJ** (2003) DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* **312**: 1-16.
30. **Stenfors LP & Granum PE** (2001) Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiol Lett* **197**: 223-228.
31. **von Stetten F, Francis KP, Lechner S, Neuhaus K & Scherer S** (1998) Rapid discrimination of psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of 16S rDNA. *Int J Food Microbiol* **34**: 99-106.

32. **Yamanaka K & Inouye M** (2001) Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherishia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 2808-2816.

Chapitre 2 : Implication des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid de *B. cereus*

1. Introduction à l'étude

Le froid est un stress qui affecte principalement la fluidité membranaire, la synthèse protéique mais aussi la topologie des acides nucléiques (Rodrigues and Tiedje, 2008). A basse température, la synthèse des protéines de ménage est brutalement interrompue du fait de l'acquisition et de la stabilisation de structures secondaires au niveau des ARNm, empêchant l'initiation de la traduction (Herschlag, 1995; Jones *et al.*, 1996). En réponse, la cellule synthétise des protéines appelées hélicases à ARN, telles CsdA d'*E. coli* ou CshA de *B. subtilis* qui ont la capacité de dérouler les structures secondaires d'ARNm (Jones *et al.*, 1996; Ando and Nakamura, 2006). L'interaction des hélicases à ARN et le déroulement des structures secondaires ont également été étudiés chez d'autres organismes "non modèles". Ainsi, CrhR de *Synechocystis* serait capable de modifier la structure secondaire des ARNm (Chamot *et al.*, 2005). La délétion des gènes codant pour CsdA et SrmB induit chez *E. coli* l'apparition d'un phénotype froid se traduisant par un ralentissement de la croissance (Charollais *et al.*, 2003; Charollais *et al.*, 2004). Ces deux hélicases sont impliquées dans la biogenèse des ribosomes à 20°C. Les hélicases à ARN peuvent également être impliquées dans un complexe multienzymatique de dégradation des ARNm permettant l'action des RNases (Carpousis, 2007). Nous avons démontré que le gène *BC0259*, codant pour une hélicase à ARN, joue un rôle important dans l'adaptation au froid de *B. cereus* (Broussolle *et al.*, 2010)(Chapitre 1).

Nous avons réalisé une étude bioinformatique du génome de *B. cereus* ATCC 14579 qui a permis d'identifier l'existence de 5 gènes codant pour des hélicases à ARN putatives. Ces gènes ont été nommés *cshA* (*BC0259*), *cshB* (*BC4283*), *cshC* (*BC2103*), *cshD* (*BC5451*) et *cshE* (*BC2408*) et les protéines codées présentent de 50 à 76% d'identité avec les 4 hélicases à ARN présentes dans le génome de *B. subtilis*. Ce travail a eu pour but de caractériser l'implication de chacun de ces 5 gènes dans l'adaptation au froid de *B. cereus* afin de déterminer :

- **Quel est leur rôle respectif dans l'adaptation au froid de *B. cereus*?**

- Quelles sont les perturbations phénotypiques engendrées par la délétion de ces gènes?
- Les hélicases à ARN sont-elles impliquées dans un phénomène d'adaptation ou leur absence entraîne-t-elle une augmentation de la mortalité des cellules ?
- Ont-elles une spécificité d'action ou sont-elles interchangeables?

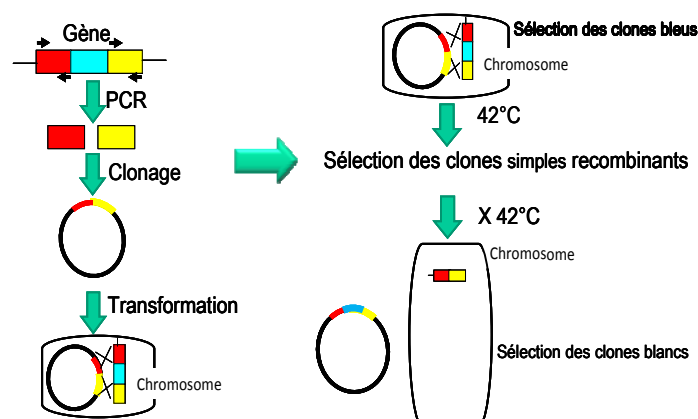
2. Stratégie envisagée

a. Quantification de l'expression des gènes codant pour les hélicases à ARN

L'expression des cinq gènes *csh*, codant pour les hélicases à ARN et identifiés dans la souche *B. cereus* ATCC 14579, a été étudiée par RT-PCRq sur des cellules cultivées à basse température et à température optimale de croissance. Pour cela, la souche sauvage a été cultivée en fermenteur à 10°C et à 37°C en conditions de croissance régulées (pH constant à 7,0, agitation à 200 rpm et pO₂ à 100%) afin de ne faire varier que le facteur température. Les cellules ont été récoltées à différents stades de croissance, représentant le début, le milieu et la fin de la phase exponentielle et le début de la phase stationnaire. Les ARN totaux ont été extraits et les transcrits des gènes *csh* quantifiés de façon relative comme précédemment décrit (Chapitre 1)

b. Délétion des gènes codant pour les hélicases à ARN

La caractérisation du rôle des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid de *B. cereus* a été réalisée par la construction de mutants de délétion de chacun des 5 gènes identifiés. Pour cela, une copie des gènes *csh*, délétée d'environ 1/3 de sa taille dans sa partie centrale, a été générée par PCR et clonée dans le vecteur plasmidique pMAD (Arnaud *et al.*, 2004). Après transformation par électroporation, la copie tronquée du gène s'intègre dans le génome de *B. cereus* par double recombinaison homologue induite par un choc thermique à 42°C, selon le schéma suivant:



Nous avons fait le choix de ne pas utiliser de marqueur de résistance aux antibiotiques pour interrompre le gène, afin d'éviter les éventuels effets polaires sur l'expression des gènes adjacents. Cette technique permet également de ne pas modifier trop fortement la taille de la région ciblée. La délétion des gènes a été vérifiée par PCR à l'aide de couples d'amorces spécifiques et séquençage du produit de PCR généré.

c. Caractérisation des mutants de délétion

Les mutants Δcsh ont été cultivés à des températures comprises entre 10°C à 42°C en milieu liquide et en milieu gélosé afin de déterminer la contribution respective des 5 hélicases à ARN dans l'adaptation au froid de *B. cereus*. La morphologie des cellules sauvages et mutantes issues de cultures à 30°C et à basse température a été observée en microscopie optique, mais aussi en microscopie électronique à transmission sur les coupes ultrafines, permettant de déterminer des modifications de structure plus fines.

L'effet de la délétion des gènes *csh* sur la viabilité des cellules à basse température a été étudié. La mortalité cellulaire se traduit par une perte d'intégrité membranaire associée à une modification de la perméabilité et de la répartition des charges. Ces modifications de propriétés membranaires peuvent être mises en évidence par la technique de coloration Live/Dead®. Cette technique utilise 2 colorants des acides nucléiques dont les propriétés de diffusion dépendent de l'état de la membrane. Ainsi, toutes les cellules laissant pénétrer le colorant SYTO9 sont vertes lors de l'observation en microscopie à épi fluorescence, alors que les cellules ayant perdu leur charge au niveau membranaire laissent pénétrer le colorant iodure de propidium qui fluoresce en rouge. La proportion de cellules vertes (cellules intactes) et rouges (cellules endommagées) a été établie par comptage sur au moins 10 champs observés au microscope.

d. Complémentation des mutants de délétion

La complémentation du mutant $\Delta cshA$ a été réalisée par apport en trans de différentes constructions plasmidiques: le gène *cshA* a été cloné i) dans le vecteur plasmidique pHT304 sous le contrôle de sa région promotrice native, ii) sous le contrôle de sa région promotrice tronquée de la "cold box" la plus distale, iii) sous la dépendance d'un promoteur inductible au xylose. La première construction a également été introduite dans les mutants $\Delta cshB$ et $\Delta cshC$,

afin de déterminer si la surexpression de CshA est capable de compenser l'absence de CshB ou CshC.

3. Résultats et discussion

Les cinq gènes codant pour des hélicases à ARN putatives sont tous exprimés 6 à 9 fois plus, à 10°C qu'à 37°C et cette surexpression est principalement observée au cours de la phase de latence, ce qui suggère que les cinq gènes puissent avoir un rôle dans l'adaptation au froid de *B. cereus*. A 30°C, la croissance des mutants Δcsh est identique à la souche sauvage, à l'exception du mutant $\Delta cshA$ qui présente un léger retard dans sa croissance. A 10°C, les souches $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ et $\Delta cshC$ ne présentent aucune croissance, alors que la souche sauvage est capable de croître après une phase de latence d'une centaine d'heures. Les mutants $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ et $\Delta cshC$ ont des limites inférieures de croissance différentes. Ainsi à 12°C, le mutant $\Delta cshB$ atteint une $DO_{600}=0.5$ en 54h contre 29h pour la souche sauvage, les mutants $\Delta cshA$ et $\Delta cshC$ nécessitent 56h pour atteindre une $DO_{600}=0.5$ à 15°C contre 7.5h pour le sauvage. La croissance des mutants $\Delta cshD$ et $\Delta cshE$ est comparable à la souche sauvage à basse température.

L'incapacité à se multiplier à basse température s'accompagne d'une forte modification morphologique de ces trois mutants, se traduisant par un allongement important des cellules et par un épaississement des membranes observé en microscopie électronique. Les plus fortes modifications sont observées pour le mutant $\Delta cshA$, qui présente une forte augmentation du volume cellulaire et la formation de septation incomplète (vérifiée par coloration spécifique de membrane), traduisant une multiplication mais une impossibilité à se diviser. Les expériences de viabilité cellulaire ne montrent pas d'augmentation significative de la mortalité de ces cellules modifiées: à 15°C, par exemple, 45% des cellules $\Delta cshA$ ont perdu leur intégrité membranaire contre 38% pour la souche sauvage, les mêmes proportions étant observées pour les autres mutants. La complémentation du mutant $\Delta cshA$ par apport d'une copie de *cshA* sous le contrôle de sa région promotrice native restaure un phénotype sauvage. L'apport de *cshA* en trans grâce à cette construction fonctionnelle dans les mutants $\Delta cshB$ et $\Delta cshC$ restaure une croissance comparable au sauvage pour $\Delta cshB$ uniquement.

Les hélicases à ARN CshA, CshB et CshC sont donc nécessaires pour permettre la croissance de *B. cereus* à basse température: le niveau d'expression maximal des gènes *csh* observé pendant la phase de latence, ainsi que l'incapacité des mutants $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ et $\Delta cshC$ à s'adapter et à se diviser à basse température indiquent que ces hélicases à ARN semblent agir au cours de la phase d'adaptation.

La présence de CshA en grande quantité est capable de suppléer l'absence de CshB mais pas celle de CshC. Ceci suggère que les hélicases CshA et CshB sont impliquées dans des mécanismes communs alors que CshA et CshC auraient des rôles différents. Le mutant $\Delta cshB$ possède une copie de *cshA* sur son chromosome mais une surexpression de *cshA* en trans peut restaurer le phénotype sauvage: il semble donc que ce soit le niveau d'expression de *cshA* qui permette la compensation de la délétion de *cshB*. La régulation de l'expression de *cshA* semble être sous la dépendance des "cold box" identifiées dans la région promotrice de ce gène. En effet, comme cela a été démontré dans le Chapitre 1, l'insertion du transposon dérégule l'expression de *cshA*. La présence des trois cold-box est indispensable pour permettre la fonctionnalité de la complémentation, indiquant ainsi l'importance de ces éléments dans la régulation de l'expression de *cshA* à basse température. L'hélicase CshA semble avoir un rôle prépondérant dans cette adaptation au froid, confirmant les résultats obtenus grâce à l'approche globale présentée dans le Chapitre 1.

Les hélicases à ARN CshA, CshB et CshC sont nécessaires pour permettre l'adaptation au froid de *B. cereus* au cours de la phase de latence

L'expression de *cshA* semble placée sous la dépendance de boîte de type cold-box

La fonction de CshC serait différente de celle(s) de CshA et CshB

**4. Differential Involvement of the Five RNA Helicases in the Adaptation of
Bacillus cereus ATCC14579 to Low Growth Temperatures**

Franck Pandiani^{1,2}, Julien Brillard^{1,2}, Isabelle Bornard³, Caroline Michaud^{1,2}, Stéphanie Chamot^{1,2}, Christophe Nguyen-the^{1,2} and Véronique Broussolle^{1,2*}

Revised version published in Appl Environ Microbiol (2010) **76 (19)**: 6692-6697.

¹INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

²Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

³INRA, UR407 Pathologie Végétale F-84140 Montfavet

* Corresponding author: INRA, UMR408, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France.

E-mail: veronique.broussolle@avignon.inra.fr. Tel: (33) (0) 432 72 25 18. Fax: (33) (0) 432 72 24 92

Running head: *B. cereus* low temperature-induced RNA helicases

Keywords: *B. cereus*, RNA helicase, low temperature, cold adaptation

Abstract

The foodborne pathogen *Bacillus cereus* ATCC 14579 possess five RNA helicase-encoding genes (*cshA* to *E*) overexpressed under cold growth conditions with differences depending on growth phase. Only $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ cells were cold-sensitive and showed altered morphology. Growth of $\Delta cshA$ was reduced at 30°C, but not at 37°C. Complementation of the cold-phenotype was obtained with the *cshA* gene for $\Delta cshA$ not for $\Delta cshC$, suggesting that these proteins may have different functions at low temperature.

Introduction

Bacillus cereus is a human pathogenic sporulated Gram-positive bacteria which is mostly associated with emetic and diarrhoeal types of foodborne illnesses (Arnesen *et al.*, 2008). *B. cereus* is widespread in the environment and in a wide range of foods. The growth domains of *B. cereus* strains range from psychrotrophic to nearly thermophilic and correlate with several phylogenetic clusters (Guinebretiere *et al.*, 2008), which presumably permits *B. cereus* to colonize many different habitats with different thermal regimes. *B. cereus* is usually present in small numbers in raw foods or in foods at processing. Food poisoning is due to growth of *B. cereus* in the food and production of toxin, in the case of the emetic syndrom, or growth and ingestion of high numbers of *B. cereus* cells, in the case of the diarrhoeal syndrom (Anonymous, 2005; Arnesen *et al.*, 2008). Many foods are stored refrigerated before consumption and in such cases *B. cereus* will have to adapt to low temperatures conditions.

B. cereus growth at low temperature takes place with a lag phase which may correspond to an adaptation phase (Choma *et al.*, 2000), described in *E. coli* as an acclimation phase (Panoff *et al.*, 1998). During this period, a transient response named cold shock response is triggered in order to obtain an efficient adaptation to low temperature (Bae *et al.*, 1997). Cold is a stress that dramatically modifies membrane fluidity, protein synthesis and also the topology of nucleic acids (Rodrigues and Tiedje, 2008). In cold conditions, *B. cereus* adapts its membrane fluidity by increasing the proportion of unsaturated fatty acids and increasing the proportion of branched chain fatty acids (Brillard *et al.*, 2010) (Haque and Russell, 2004). Stress arising from cold conditions consists in a reduction in molecular dynamics. As a consequence ribosomes assembly is affected (Jones and Inouye, 1996) and mRNAs tend to form secondary structures that prevent an efficient initiation of translation (Herschlag, 1995). The translation was shown to be a limiting factor of bacterial growth at

low temperature (Giuliodori *et al.*, 2004). To restore an efficient protein synthesis, organisms have to adapt their ribosomes to the cold conditions and must unwind double stranded mRNA and stabilize them under primary structure (Berthelot *et al.*, 2004). It was suggested that some proteins could prevent misfolding of RNA molecules by acting as RNA chaperones (Herschlag, 1995; Lorsch). Some Cold Shock Proteins (CSPs), synthesised in response to cold shock have been already identified as RNA chaperones (Phadtare *et al.*, 1999; Weber and Marahiel, 2002). One study showed that the *B. cereus* CspA is strongly induced during growth at 15°C and may act by stabilizing the RNA primary structure (Mayr *et al.*, 1996). In *E. coli* CSPs were found associated with ribosomes which are adapted for translation at low temperature. Some RNA helicases have been described to destabilize RNA duplexes at low temperature in presence of ATP such as CsdA of *E. coli* (Jones *et al.*, 1996), or CshA of *Bacillus subtilis* (Ando and Nakamura, 2006). These DEAD-box RNA helicases, conserved from bacteria to human, are involved in various cellular process affecting RNA pathways, such as ribosome assembly, initiation of translation and RNA turnover (Story *et al.*, 2001; Cordin *et al.*, 2006).

Involvement of RNA helicases in cold adaptation have been shown for many bacteria such as the cyanobacterium *Anabaena* (Chamot *et al.*, 1999), and the archaeon *Methanococcoides burtonii* (Lim *et al.*, 2000). Deleted mutants of *E. coli* RNA helicases CsdA and SrmB-encoding genes are impaired in growth at 20°C and these two helicases are involved in the biogenesis of the 50S subunit at this temperature (Charollais *et al.*, 2003; Charollais *et al.*, 2004). RNA helicases could be implicated in the degradation of mRNA by unwinding double stranded mRNA thereby allowing the action of RNase (Carpousis, 2007). A recent study in our laboratory showed that the deregulation of the expression of one RNA helicase of *B. cereus* ATCC 14579, by transposon insertion upstream the helicase gene, increased the lag phase of *B. cereus* at cold temperatures (Broussolle *et al.*, 2010). In this

study, we report the role of the five *B. cereus* ATCC 14579 RNA helicases during growth at low temperature.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

B. cereus ATCC 14579 cells (WT) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and *E. coli* cells were routinely grown either in Luria-Bertani broth (LB) medium or brain heart infusion broth (BHI) with vigorous agitation. *E. coli* top10 (Invitrogen) was used as transformation host for every plasmids construction and *E. coli* strain ET12567 (Table 1) was used to generate unmethylated plasmid DNA prior to *B. cereus* transformation. When required, the antibiotic concentrations used for bacterial selection were: ampicillin at 100 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ (for *E. coli*), spectinomycin at 275 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ (for *B. cereus*) and 70 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ (for *E. coli*), and erythromycin at 10 $\mu\text{g. ml}^{-1}$ for *B. cereus*. When necessary, X-gal was added to agar media at a final concentration of 50 $\mu\text{g. ml}^{-1}$. WT cells were also cultivated in regulated batch cultures in a 2-L bioreactor (Discovery 100MRU Inceltech) at 10°C and 37°C to study RNA helicase gene expression. pH was maintained constant at 7.0, stirring at 200 rpm and pO₂ at 100% during bacterial growth. Complementation of mutant strains was tested by serial dilutions, spotted on LB agar plates and incubated at 12°C.

Table 1: Strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant genotype ^a	Source or reference
Strains		
<i>B. cereus</i> ATCC14579		Laboratory collection
<i>B. cereus</i> $\Delta cshA$	ATCC14579 <i>BC0259</i> Δ452-993	This work
<i>B. cereus</i> $\Delta cshB$	ATCC14579 <i>BC4283</i> Δ398-897	This work
<i>B. cereus</i> $\Delta cshC$	ATCC14579 <i>BC2103</i> Δ259-896	This work
<i>B. cereus</i> $\Delta cshD$	ATCC14579 <i>BC5451</i> Δ410-1023	This work
<i>B. cereus</i> $\Delta cshE$	ATCC14579 <i>BC2408</i> Δ386-1030	This work
<i>E. coli</i> ET12567	<i>F dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM hsdR recF143 zjj-202::Tn10 galK2 galT22 ara14 pacY1 xyl-5 leuB6 thi-1</i>	Laboratory collection
Plasmids		
pMAD	Ap ^R and Em ^R shuttle vector	(Arnaud <i>et al.</i> , 2004)
pMAD- $\Delta cshA$	Recombinant pMAD harboring <i>BC0259</i> Δ452-993	This work
pMAD- $\Delta cshB$	Recombinant pMAD harboring <i>BC4283</i> Δ398-897	This work
pMAD- $\Delta cshC$	This work	This work
pMAD- $\Delta cshD$	Recombinant pMAD harboring <i>BC5451</i> Δ410-1023	This work
pMAD- $\Delta cshE$	Recombinant pMAD harboring <i>BC2408</i> Δ386-1030	This work
pHT304	Ap ^R and Em ^R cloning vector	(Arantes and Lereclus, 1991)
pHT304Ω <i>cshA</i>	<i>BC0259</i> (1602pb) and its promoter (364pb) cloned in <i>SacI</i> and <i>XbaI</i> sites in pHT304	This work
pHT304Ω <i>pcshA</i>	<i>BC0259</i> (1602pb) and a part of its promoter (197pb) cloned in <i>SalI</i> and <i>EcoRI</i> sites in pHT304	This work
pHTXyl	Ap ^R and Em ^R cloning vector	(Salamitou <i>et al.</i> , 1997)
pHTXylΩ <i>cshA</i>	<i>Bc0259</i> (1602pb) cloned under the <i>pxyl</i> promoter in <i>XbaI</i> and <i>SacI</i> in pHTxyl	This work

^a Ap, ampicillin; Em, erythromycin

DNA manipulations

Plasmid DNA was extracted from *B. cereus* and *E. coli* by a standard alkaline lysis procedure using the Wizard SV miniprep purification system (Promega), with an additional incubation at 37°C for 1 h with 5 mg of lysozyme (14,300 U. mg⁻¹) for lysis of *B. cereus* cells. Chromosomal DNA was extracted from *B. cereus* cells harvested in mid-log phase as previously described (Guinebretiere *et al.*, 2003). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were used as recommended by the manufacturer (Promega). Oligonucleotide primers were synthesized by Eurogentec. PCR was performed in a GeneAmp PCR system 2400 thermal cycler (Applied Science), using the Expand high fidelity DNA polymerase (Roche Applied Science). Amplified DNA fragments were purified by using the PCR purification Kit (Roche Applied Science) and separated on 0.7% agarose gels after digestion. Digested DNA fragments were extracted from agarose gels using the gel extraction kit Quiaex (Quiagen). All constructions were confirmed by DNA sequencing (Cogenix). Electroporation to transform *B. cereus* was used as previously described (Mahillon and Lereclus, 2000).

Mutant constructions

Genes encoding the RNA helicases of *B. cereus* ATCC 14579 were interrupted by allelic exchange as previously described (Arnaud *et al.*, 2004) without insertion of any antibiotic-resistance cassette to avoid polar effect on surrounding genes. Briefly, fragments corresponding to the first 600-bp and last 600-bp of BC0259, BC2103, BC2408, BC4283 and BC5451 genes were PCR amplified using primers indicated in Table 2. PCR fragments were digested with the appropriate enzymes, purified and cloned altogether in the *NcoI* and *BamHI* sites of the thermosensitive plasmid pMAD. Ten µg of the recombinant plasmid pMAD were used to transform *B. cereus* ATCC 14579, and subjected to the first allelic exchange at 42°C, as previously described (Arnaud *et al.*, 2004). Blue Em-resistant simple recombinant colonies on LB agar plates supplemented with X-gal were identified by PCR using appropriate

primers. They were subjected to the second allelic exchange. White Em-sensitive strains resulting from a double cross-over event, leading to truncated chromosomal RNA helicase gene mutants, were selected. The chromosomal allele exchange in the mutants was checked by DNA sequencing of PCR fragments amplified using appropriate primers couples (Table 2). For complementation of the mutant strains, 3 constructions were done: i) the 1,602 bp *csHA* gene was PCR amplified with XylFXba/XylRSac primers (Table 2) and cloned in the pHTxyl plasmid at the *Xba*I and *Sac*I sites to generate the plasmid pHTXylΩ*csHA* (Table 1) ii) the 1,602 bp *csHA* gene and 197 bp of the upstream region were amplified with the primers BC259F/BC259R subcloned in the TOPO-XL vector (Invitrogen) and finally cloned in the pHT 304 vector to obtain the plasmid pHT304Ω*pcshA* (Table 1) and iii) specific amplification corresponding to the 364 bp promoter region and the 1,602 bp BC0259 gene (*csHA*) was performed using the primers CompBC259F and CompBC259R (Table 2). The PCR amplified fragment was cloned at the *Xba*I and *Sac*I sites of pHT304 to obtain the plasmid pHT304Ω*csHA* (Table 1). The plasmids were introduced in *B. cereus* Δ*csHA*, Δ*csHB* and Δ*csHC* strains by electroporation.

Bacterial cell viability assays

Cell viability assay was performed with LIVE/DEAD® Bacterial Viability Kit (Invitrogen) in accordance with the manufacturer's instructions. Bacterial cells were grown at the appropriate temperature and were harvested during stationary phase by centrifugation at 4, 000 rpm for 15 min. Cells were washed twice with cold sterile H₂O and were concentrated four times. Cells were adjusted to a density of OD₆₇₀ = 0.2 and were stained with the two dye components in 1:1 ratio at the recommended concentration. After 15 min in the dark, at room temperature, stained cells were observed with an epifluorescence microscope with the appropriate filter. Pictures were taken with an Olympus camera at X1000 magnification. Red and green cells were counted in 10 random microscope fields.

Light and electron microscopy observations

Cells were observed in phase contrast at magnification X1000 with a light microscope Olympus BX50. WT and mutant cells were grown at the appropriate temperature (10°C, 12°C or 15°C) to obtain sufficient amount of cells and were harvested at OD₆₀₀=1.0 by centrifugation at 4,500g for 10 min. Pellets were washed twice with cold sterile H₂O. Transmission Electron microscopy was used to observe structures of WT and mutant cells, grown until late exponential phase washed and fixed 2 hours at room temperature in a solution containing 2.5 % gluteraldehyde and 0.1M cacodylate buffer pH 7.1. Cells were washed three times in 0.2 M cacodylate buffer and postfixed with 1.0 % osmium tetroxide. Then cells were dehydrated in a graded ethanol serie and enclosed in epoxy resin. Ultrathin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate. All observations were made with a FEI-Philips CM10 electron microscope at 80kV.

Real-time expression analysis

Total RNA was extracted from *B. cereus* WT cells grown in regulated batch cultures in LB medium at 37°C (sampled at OD₆₀₀=0.3, OD₆₀₀= 0.9, OD₆₀₀= 2, OD₆₀₀= 5.1) and 10°C (sampled at OD₆₀₀= 0.23, OD₆₀₀= 0.5, OD₆₀₀=1.22, OD₆₀₀= 2.0), using the Tri-reagent extraction method as recommended by the manufacturer (Ambion). Lack of contamination by genomic DNA was checked by PCR on 1 µg of total RNA. For each temperature, extraction was performed on two independent cultures. Real time RT-PCR was performed on a Light cycler instrument (Roche Applied Science). The Quantifast SYBR Green RT-PCR kit (Quiagen) was used according to the manufacturer's instructions. RT-PCR reaction was made with 5 ng of total RNA treated with the TURBO DNA-free™ RNase (Ambion). The reverse transcription step was performed at 50°C, and was followed by a PCR initial activation step at 95°C. The annealing temperature during the 40 cycles of amplification was 60°C for the primers: BC0259qR/F, BC2103qR/F, BC2408qR/F, BC4283qR/F, BC5451qR/F and for the

primers 16SR/F (Table 2) used for the amplification of BC0259, BC2103, BC2408, BC4283, BC5451 and *ssu* cDNA, respectively. The mRNA level changes for each gene were normalized to the RNA level of the *ssu* gene encoding 16S RNA and quantified as previously described (Pfaffl, 2001). Only ratios of ≤ 0.5 and ≥ 2 were considered to be significant (i.e., $P \leq 0.05$) according to the accuracy of the method.

RT-PCR experiments

RNA were extracted from WT cells grown at 10°C and from mutants $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ grown at 15°C until an $OD_{600}=1.2$. RT-PCR experiments were performed on 500 ng of total RNA by using the Titan One Tube RT-PCR System (Roche Applied Science) according to the instructions. Negative controls to check the lack of contamination by genomic DNA were always performed in parallel on 500 ng of total RNA, using a heat-inactivated reverse-transcriptase. Specific amplifications were performed with the primers ydbRF and ydbRR for the BC0259 gene, SP1 and murFF for a region overlapping BC0258 and BC0259 genes and mfep6F and ydcAR for a region overlapping BC0259 and BC0260. Specific amplifications were also performed with the primers BC2100RTF/RTR for the gene BC2100, BC2100-BC2101RTF/RTR for a region overlapping BC2100 and BC2101, BC2101RTF/RTR for the gene BC2101, BC2101-BC2102RTF/RTR for a region overlapping BC2101 and BC2102, BC2102RTF/RTR for the gene BC2102, BC2102-BC2103RTF/BC2103XbAR for a region overlapping BC2102 and BC2103, BC2103qR/F for the gene BC2103, BC2103-BC2104RTF/BC2103BamHIR for a region overlapping BC2103 and BC2104, BC2104RTF/RTR for the gene BC2104, BC2104-BC2105RTF/BC2105RTR for a region overlapping BC2104 and BC2105, BC2105RTF/RTR for the gene BC2105, BC4282RTF/RTR for the gene BC4282, BC4282-BC4283RTF/RTR for a region overlapping BC4282 and BC4283, and BC4283qR/F for the gene BC4283 (Table 2 and Fig 2)

Chapitre 2 : Implication des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid de *B. cereus*

Table 2. Oligonucleotides used in this study

Primers	5'-3' sequence (restriction sites are in bold)
BC259NcoF/BC259XbaR	GCGC CCATGG ATTGATAAAGTGTAAATAACG/GCGCT CTAGACA AGAACAACACTGTCTCTACG
BC259XbaF/BC259Bam	GCGCT CTAGAG GGTCGTGCAGGTAAAAAAGG/GCGC GGATCCC GGCTATGATGTTTTCTTTTC
BC4283NcoF/BC4283XbaR	GCGC CCATGG TGCAATAAAAGGGAAGAAGG/GCGCT CTAGAGT CCCCAACTACGATATGAGG
BC4283XbaF/BC4283BamHIR	GCGCT CTAGA AATTGTTGCGACTGATTTAGC/GCGC GGATCCC GATAATTTGTAGAAATATG
BC2103NcoF/BC2103XbaR	GCGC CCATGG CATTAATGCGTTCTATATGG/GCGCT CTAGAGA ACCTCTTCATGAATTTGC
BC2103XbaF/BC2103BamHI	GCGCT CTAGAT ATTGACGATTTAAACACACG/GCGC GGATCCC TAAAGTATTCCATTCTACC
BC5451NcoF/BC5451XbaR	GCGC CCATGG TTAATGCTAACAATACGAGC/GCGCT CTAGA ATATGATCCAACACACGACC
BC5451XbaF/BC5451BamHI	GCGCT CTAGAG CTATTACATTTATAACACC/GCGC GGATCCA AGTAAATGAGATTTCTTCC
BC259F/BC259R	GCGCGTCGACCGGCTATGATGTTTTCTTTTC/GCGCGAATTCAGAGGCTACACCAATTCAAG
mfep6F/ydcAR	GCGCCAATTGAGCATACTACAAGCGTATTGC/AATGCACACTCATCGCAACG
SP1/murFF	TGCCCAATAATATCTTTACC/AGATTTACAAGCAGTAGTGC
CompBC259F/CompBC259R	GT CGAGCTC TGAACGTGTAAAGGCGTATG/CG CTCTAGAAA ATGCACACTCATCGCAAC
BC0259qR/BC0259qF	TAGAAGTCTGAATGTTTGG/TTTACCGATTTATGGTGGTC
BC2103qF/BC2103qR	TTCTTAAACGACCCATTCCG/GTACGTCCTGAGCGGTGAAT
BC2408qF/BC2408qR	GATGAAGCGGATCAAATGCT/AAAACGAAGTGCATCTGGCT
BC4283qF/BC4283qR	AGCACGCATGCCTAAAAACT/AGCAACTTGGTCTGCCATCT
BC5451qF/BC5451qR	TACTGCAAGAACGGGACGAG/TCCCGCCATTAAAGTACAGC
16SF/16SR	GGTAGTCCACGCCGTAAACG/GACAACCATGCACCACCTG
BC2100RTF/BC2100RTR	ATAGTAGCGCAGAGTTTTGG/CACGCTTTATTTTCATTTAACG
BC2100-BC2101RTF/BC2100-BC2101RTR	TGGGAATTTGAACAGTTAGC/TCATACTCGCTTCTTGTGC
BC2101RTF/BC2101RTR	GGTTTTTTCACAAGTCGTACC/ACTACGATGCGAGATAGACG
BC2101-2102RTF/BC2101-2102RTR	GCTCAATATGAAGGAGAAGG/AAATTGTCAAAGCAGTTGG
BC2102RTF/BC2102RTR	GGATCTTGCTTCATTAAGTCG/CAACATGGTCTTCTGTAATCG
BC2102-BC2103RTF/BC2103 XbaR	TTTCATACGAATATAATAAGCAAGC/GCGCTCTAGAGAACCTCTTCATGAATTTGC
BC2103-BC2104RTF/BC2103 BamHI	ATTTACTGGGAAGAAAAAGC/GCGCGGATCCTTAAAGTATTCCATTCTACC
BC2104RTF/BC2104RTR	TTGGAGAAAATGGAATTATGG/GCTGGGTCAAAGTTAACAGC
BC2104-2105RTF/BC2105RTR	CCAACCTCAAAGGAATAACG/CATAACCGCAAATAATTCC
BC2105RTF/BC2105RTR	GAGGAAGATAACAAGCAAGG/CATAACCGCAAATAATTCC
BC4282RTF/BC4282RTR	TCTCATGTTTTCCATGAGTGC/CCGATGTTCTTTCAATTTCC
BC4282-BC4283RTR/BC4282-BC4283RTF	ACTCATGGAAACATGAGATCC/AACTTGATGTTATGGCAACG
XylFXba/XylRSac	CGG CTCTAG ATTGACATACATTTTCG/CG TCGAGCTC TTAAGCTTGTGGACG

Sequence analysis

Genome sequence of *B. cereus* ATCC 14579 is located at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> or <http://www.ergo-light.com/ERGO>. DNA and amino acid sequences were analyzed using ExPASy servers (<http://au.expasy.org/>). DNA and protein homology searches were carried out by performing BLAST analyses (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Multiple sequence alignments were performed using MultAlin program (Corpet, 1988). Synteny of the RNA helicase gene loci was studied using the MaGe program (<https://www.genoscope.cns.fr/aggc/mage/>)

Results

Identification of putative RNA helicases in *B. cereus* ATCC 14579 and transcriptional analysis.

In silico analysis of the *B. cereus* ATCC 14579 genome revealed the presence of five genes predicted to encode RNA helicases. These five open reading frames are BC0259, BC4283, BC2109, BC5451 and BC2408 (Table 3). BlastP search showed that these proteins exhibit from 50 to 76% identity with *B. subtilis* RNA helicases. The *B. cereus* ORFs were renamed CshA to CshE, following the nomenclature used for *Bacillus subtilis* whose genome encodes however only four RNA helicases. The protein sequences of *B. cereus* putative RNA helicases were aligned with that of yeast eIF4A, representative of the DEAD-box and DExD-box family (Cordin *et al.*, 2006): nine motifs highly conserved in eIF4A were also found in *B. cereus* proteins (Fig 1).



Fig.1: Amino acid sequence alignments of the *Bacillus cereus* ATCC 14579 RNA helicases with *Saccharomyces cerevisiae* eIF4A. Black boxes correspond to identical amino acids, grey boxes to homolog residues. Numbers in brackets correspond to amino acids between conserved motifs, defined according to Cordin 2006.

Table 3: Synthetic information about the five RNA helicases of *Bacillus cereus* ATCC 14579

ORF <i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i> RNA helicase name	Protein length (aa)	ORF <i>B. subtilis</i> ^a	Identity % ^b
BC0259	CshA	533	CshA	76
BC4283	CshB	436	CshB	62
BC2103	CshC	389	Yfml	50
BC5451	CshD	481	DeaD	74
BC2408	CshE	458	–	–

^a presenting the best % of identity with *B. cereus* protein

^b using the BLASTP search

The *cshA* to *cshE* genes are present in five loci dispersed on the *B. cereus* chromosome (Fig 2). If the opposite orientation of *cshD* and *cshE* with their neighbouring genes strongly suggested their monocistronic transcription, a possible co-transcription of genes with *cshA*, *cshB* and *cshC* had to be investigated. RT-PCR experiments were performed on RNA extracted from cells grown at 10°C. Results indicated that the *cshA* transcripts were monocistronic whereas *cshB* was co-transcribed with the gene located downstream, BC4282, encoding an endonuclease IV (data not shown). The *cshC* locus is composed by six genes that may be co-transcribed, possibly leading to a mRNA of about 6 kb. The presence of co-transcripts was tested by pairs as presented in Fig 2: each RT-PCR combination gave amplicons indicating that co-transcriptions occur in this locus and that *cshC* is at least co-transcribed in the tested conditions with BC2102 and BC2104, encoding two small hypothetical proteins.

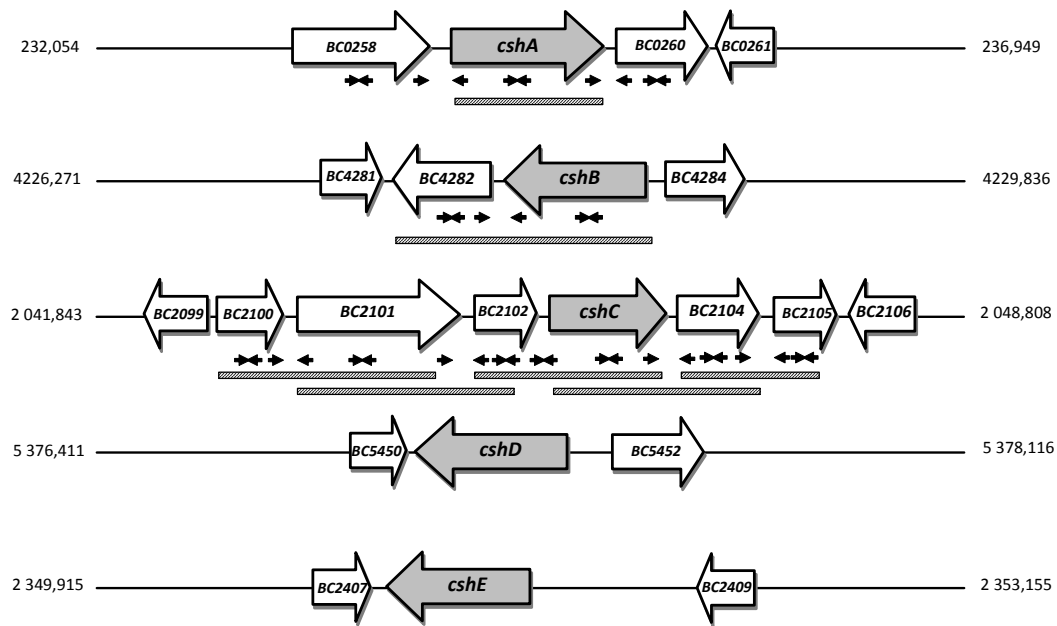


Fig. 2 : Schematic representation of *B. cereus* ATCC 14579 chromosomal regions containing the five RNA helicases. Numbers on the left and right sides represent the chromosomal location. Arrows represent ORFs. Putative function of gene products are : BC0258, UDP-N-acetylmuramoyl-tripeptide-D-alanyl-D-alanine ligase; BC0259 , ATP-dependent RNA helicase CshA; BC0260, UV-endonuclease and BC0261, hypothetical protein; BC4281 hypothetical protein; BC4282 endonuclease IV; BC4283, ATP-dependent RNA helicase CshB; BC4284, VrrA protein; BC2099, hypothetical protein; BC2100, Methyl-transferase; BC2101, Formate tetrahydrofolate ligase; BC2102, hypothetical protein, BC2103, ATP-dependent RNA helicase CshC; BC2104, hypothetical protein; BC2105, Lactoyl-glutathione lyase; BC2106, hypothetical protein; BC5450, cytoplasmic protein; BC5451, ATP-dependent RNA helicase CshD; BC5452, Guanosine 5'-monophosphate oxidoreductase; BC2407, hypothetical protein; BC2408, ATP-dependent RNA helicase CshE; BC2409, hypothetical protein. Small couple of arrows represent the location of the primer couples used for RT-PCR. Dashed bars represent mRNA fragments identified by RT-PCR.

The presence of cold-regulated elements was previously described in the upstream region of *cshA* (Broussolle *et al.*, 2010) but these cold-boxes are not present in the promoter regions of the four other *B. cereus* RNA helicases. The presence of the five loci encoding the putative RNA helicases was found in 9 out of the 10 *B. cereus* genomes (including *B. weihenstephanensis* KBAB4) completely sequenced and the synteny of these loci is conserved in all these strains. The *B. cereus* subsp. *cytotoxicus* 391-98 genome harbours only 4 RNA helicase genes, with the *cshD* gene missing.

Expression of RNA helicases genes at different temperatures

Using real-time RT-PCR, we investigated the expression of *cshA*, *cshB*, *cshC*, *cshD* and *cshE* in cells grown under batch regulated conditions at 10°C and 37°C. These growth conditions ensure to monitor only the effect of temperature as pH, shaking, oxygen are controlled and maintained constant all along the bacterial growth. Two independent growths at each temperature were performed (Fig 3). Samples were collected at four different times of growths, both at 37°C (Fig 3A) and at 10°C (Fig 3B).

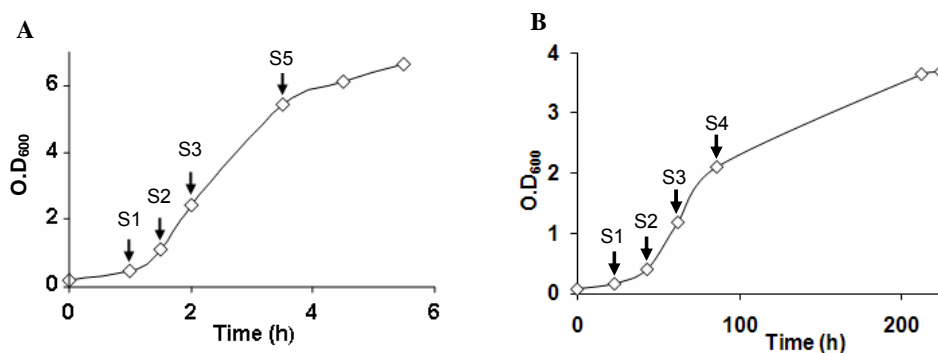


Fig. 3: Growth of *B. cereus* ATCC 14579 in batch regulated conditions at 37°C (A) and 10°C (B). S1 to S5 correspond to the sampling points for total RNA extractions and represent early, middle and late exponential phase and early stationary phase. Mean OD₆₀₀ values of two independent growths at each temperature are presented (coefficient of variation <18 %).

Among the five genes, *cshA* was the more expressed at 10°C, as the lowest the ΔC_t , the highest the gene is expressed in a given condition (Table 4). The five genes were overexpressed at 10°C compared to 37°C, *cshE* and *cshA* showed the highest mRNA level at low temperature compared to 37°C. When considering the kinetics of expression at low temperature, the genes were more expressed at the early growth phase (sample S1) than at other stages, except *cshC* whose expression was constant along time. These results suggest a possible role of the five *csh* genes in *B. cereus* growth at 10°C.

Chapitre 2 : Implication des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid de *B. cereus*

Table 4. Relative expression of *cshA*, *cshB*, *cshC*, *cshD* and *cshE* genes in *Bacillus cereus* ATCC 14579 at 10°C and 37°C

Gene		Relative expression in sample ^e				
		S1	S2	S3	S4	S5
<i>cshA</i>	ΔC_t^a at 37°C	7.94	7.8	8.83	ND	12.22
	ΔC_t^b at 10°C	5.22	5.81	6.3	7.12	ND
	Relative mRNA level at 10°C vs 37°C (n-fold) ^c	+6.6	+4.0	+5.7	ND	ND
	Relative mRNA level at 10°C (n-fold) ^d	1	-1.5	-2.1	-3.7	ND
<i>cshB</i>	ΔC_t at 37°C	10.11	11.19	10.22	ND	12.29
	ΔC_t at 10°C	8.1	9.77	8.48	8.83	ND
	Difference ^c in mRNA level at 10°C vs 37°C (n-fold)	+4.0	+2.7	+3.3	ND	ND
	Relative mRNA level at 10°C (n-fold) ^d	1	-3.2	-1.3	-1.6	ND
<i>cshC</i>	ΔC_t 37°C	11.02	10.53	10.82	ND	11.24
	ΔC_t 10°C	8.72	8.6	8.68	8.65	ND
	Difference ^c in mRNA level at 10°C vs 37°C (n-fold)	+4.9	+3.8	+4.4	ND	ND
	Relative mRNA level at 10°C (n-fold) ^d	1	+1.1	1	+1.1	ND
<i>cshD</i>	ΔC_t^a 37°C	11.63	11.11	11.28	ND	13.11
	ΔC_t 10°C	9.19	9.66	9.8	10.04	ND
	Difference ^c in mRNA level at 10°C vs 37°C (n-fold)	+5.4	+2.7	+2.8	ND	ND
	Relative mRNA level at 10°C (n-fold) ^d	1	-1.4	-1.5	-1.8	ND
<i>cshE</i>	ΔC_t^a 37°C	12.61	12.42	12.92	ND	13.69
	ΔC_t 10°C	9.41	9.46	9.99	10.46	ND
	Difference ^c in mRNA level at 10°C vs 37°C (n-fold)	+9.2	+7.8	+7.6	ND	ND
	Relative mRNA level at 10°C (n-fold) ^d	1	1	-1.5	-2.1	ND

The data are the mean of two replicates on mRNA samples extracted from two independent cultures at 37°C and two independent cultures at 10°C (with a coefficient of variation <12 %, except for *cshA* and *cshB* at S2 and 10°C which was respectively 13.4 and 22.4%) . + and - indicate respectively up-and down-regulated genes.

^a $\Delta C_{t37^\circ\text{C}} = C_{t \text{ helicase gene at } 37^\circ\text{C}} - C_{t \text{ endogenous control at } 37^\circ\text{C}}$, ^b $\Delta C_{t10^\circ\text{C}} = C_{t \text{ helicase gene at } 10^\circ\text{C}} - C_{t \text{ endogenous control at } 10^\circ\text{C}}$, ^c Variation of mRNA level was determined by this following formula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ with $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t10^\circ\text{C}} - \Delta C_{t37^\circ\text{C}}$, ^d Variation of mRNA level was determined by this following formula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$ with $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t10^\circ\text{C}} \text{ for } S_x - \Delta C_{t10^\circ\text{C}} \text{ for } S_1$, ^e Sampling times shown on Figure 3

Impact of RNA helicase gene deletions on *B. cereus* growth at low temperature

To study the role of the RNA helicase-genes in *B. cereus* cold adaptation, mutant strains were constructed for each *csh* genes and then grown at 30°C and 10°C in LB broth with shaking. Growth at 30°C of $\Delta cshB$, $\Delta cshC$, $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ strains was similar to that of the WT whereas growth of $\Delta cshA$ was slightly impaired (Fig 4A). Moreover, when grown at 30°C, colonies of $\Delta cshA$ were smaller than those of the WT on LB-agar plates (data not shown). Bacterial counts were in accordance with OD₆₀₀ values (Fig 4B). Growth of all five mutants,

including $\Delta cshA$ was similar to that of the WT at 37°C and 42°C (data not shown). At 10°C, $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ grew similarly to the WT (Fig 4 C and D) whereas loss of *cshA* or *cshB* or *cshC* genes led to impaired ($\Delta cshB$) or absence ($\Delta cshA$ and $\Delta cshC$) of cold growth (Fig 4E). Colony Forming Unit (CFU) data confirmed these observations and revealed that the number of $\Delta cshB$ cells remained constant at 10°C (Fig 4F), suggesting that the increase observed in OD₆₀₀ values was due to an increase in mutant cell length. UFC numbers of $\Delta cshA$ and $\Delta cshC$ decreased slightly at 10°C, whereas OD₆₀₀ remained constant. This could be due to a slight loss of viability at 10°C or to the formation of aggregates. However, when shifted to 37°C, growth of mutants cells was observed, suggesting that the absence of growth at low temperature of $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ strains was mainly due to their altered ability to adapt to cold conditions. The minimum growth limit was approximately 12°C for $\Delta cshB$ (with an OD₆₀₀=0.5 after a 54h incubation vs 29h for the WT strain) and was about 15°C for $\Delta cshA$ and $\Delta cshC$ (with an OD₆₀₀=0.5 after a 56h incubation vs 7.5h for the WT strain).

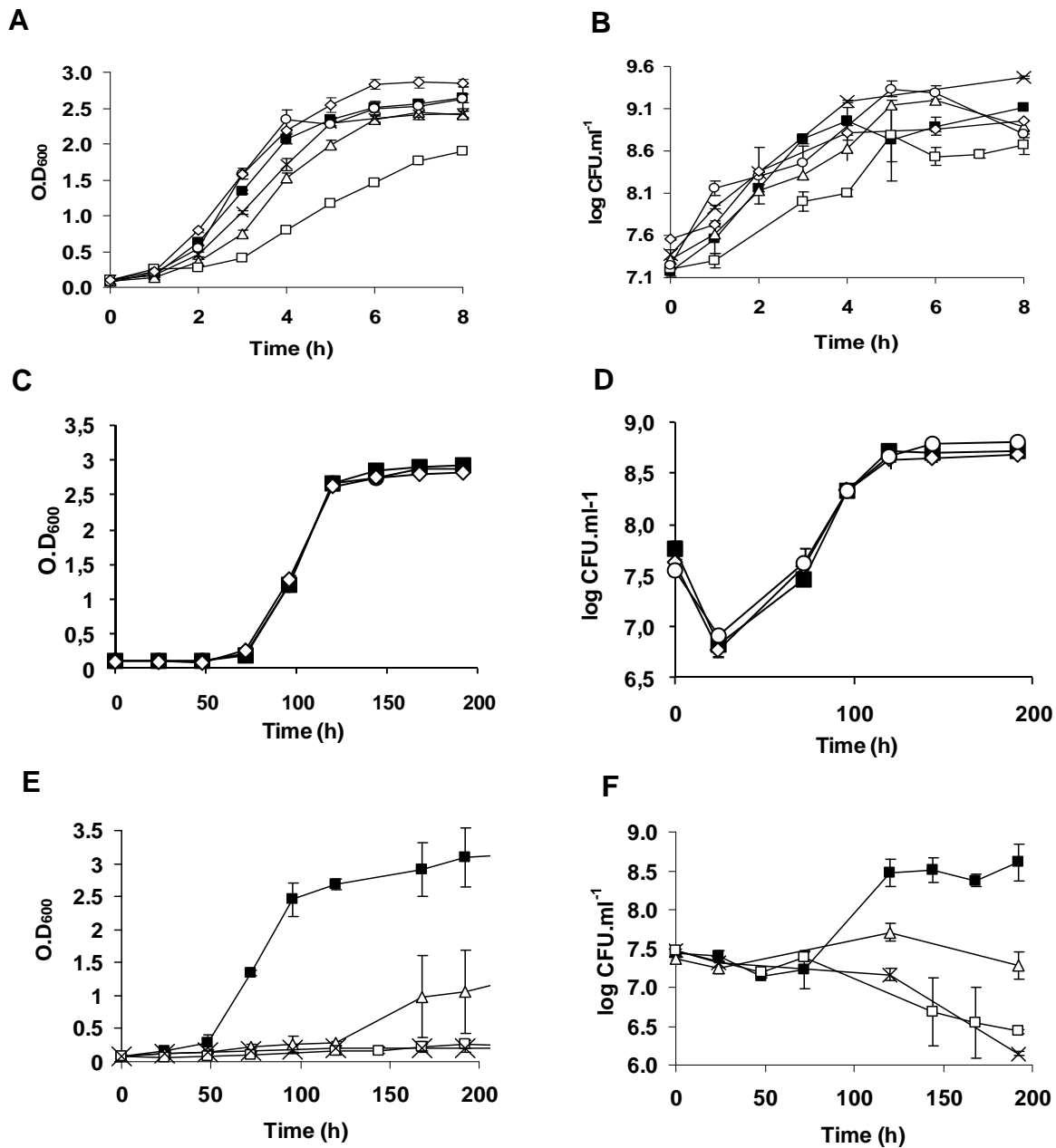


Fig. 4: Growth at 30°C (A and B) and 10°C (C, D, E and F) of *B. cereus* ATCC 14579 (■), $\Delta cshA$ (□), $\Delta cshB$ (Δ), $\Delta cshC$ (×), $\Delta cshD$ (○) and $\Delta cshE$ (◇) in LB broth. Changes in OD₆₀₀ (A, C and E) and numeration of bacterial cells in log CFU.ml⁻¹ (B, D and F) are presented. Independent cultures were performed in triplicate; error bars indicate sd.

Observations under phase-contrast microscope showed that after growth at low temperatures (i.e. close to their minimum growth temperature), morphologies of the three cold-sensitive mutants were differently affected compared to WT cells (Fig 5A): $\Delta cshA$ cells were long and curved at the poles and formed cells aggregates (Fig 5B), $\Delta cshB$ cells formed very long filaments (Fig 5C) while $\Delta cshC$ cells were short and stocky (Fig 5D). To more precisely determine cell structures modifications, *csh* mutants were observed under transmission electron microscopy (TEM). At 30°C, the cell structure of the three mutants were similar to that of the WT (data not shown). After growth at low temperature, cell structure of *cshA*, *cshB* and *cshC* deletion mutants were strongly modified compared to WT cells (Fig 6A): $\Delta cshA$ cells grown at 15°C were long and incompletely divided cells with thickened membranes (Fig 6B), which was also seen for $\Delta cshB$ cells (Fig 6C). Staining of $\Delta cshB$ cells with the membrane stain FM 4-64 revealed red fluorescent areas, confirming the presence of cell membrane septa within filamentous cells (data not shown). $\Delta cshC$ cells also exhibited a thicker membrane than WT cells on thin-section electron microscopy images but looked like ghosts with a scattered cytoplasm (Fig 6D).

Viability of mutants cells grown at 12°C or 15°C was tested using the LIVE/DEAD Bacterial Viability test and compared to that of the WT strain (Fig 5E to H): approximately 52% and 44.5% of cells stained red corresponding to bacteria which lost their membrane integrity, respectively for WT and $\Delta cshB$ strains grown at 12°C. At 15°C, 38% of red cells were counted for the WT strain and 45% for $\Delta cshA$ and $\Delta cshC$. These results showed that cell viability at a permissive low temperature was not affected in mutants compared to WT, in spite of the marked alteration in their morphology.

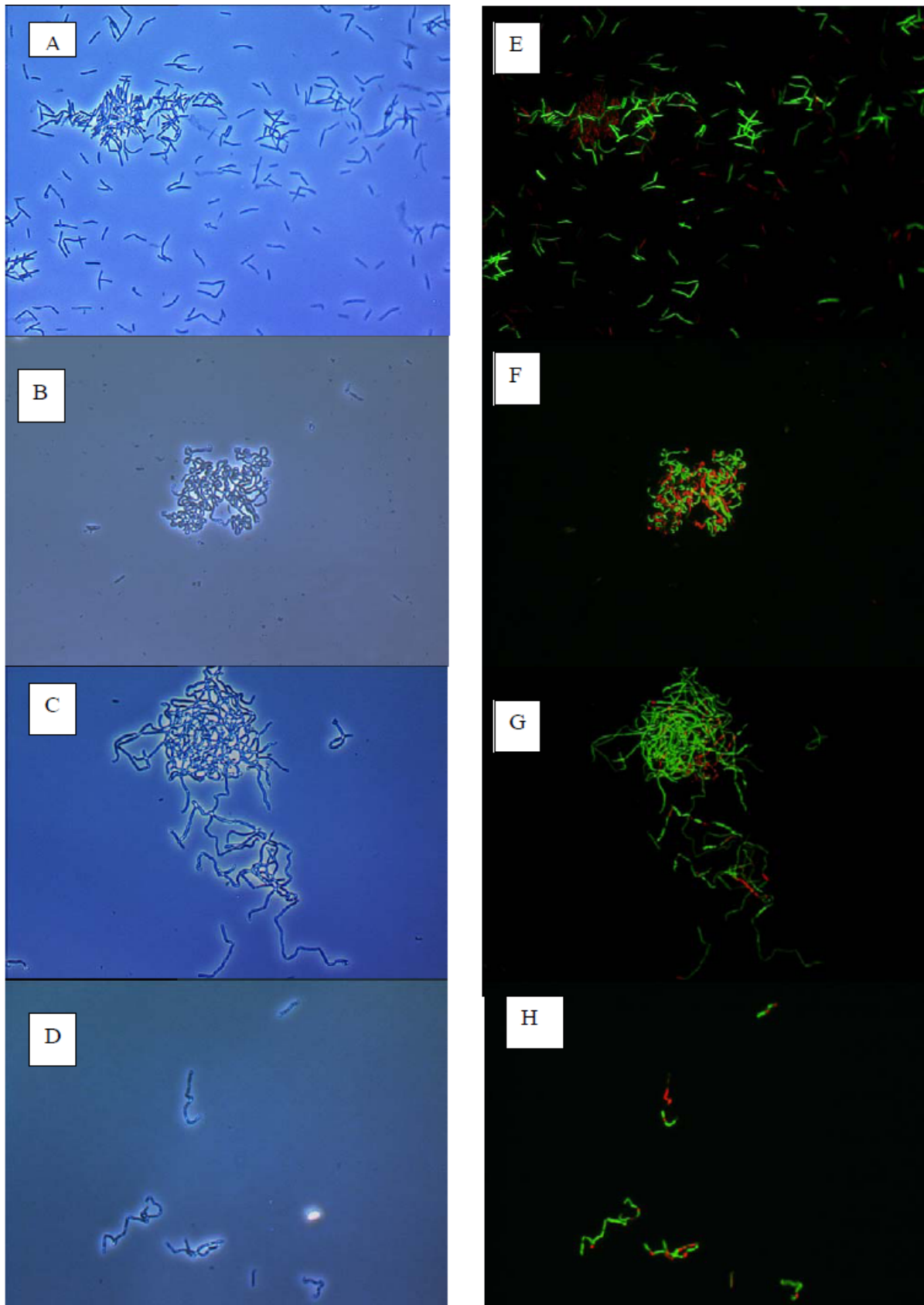


Fig. 5: Morphology of cells grown at low temperatures of *B. cereus* WT (A, E), $\Delta cshA$ (B, F), $\Delta cshB$ (C, G) and $\Delta cshC$ (D, H). Cells were observed under phase contrast microscopy (left-hand panel) and after staining with LIVE/DEAD® Bacterial Viability test (right-hand panel). Cells were grown at 12°C (WT, $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$) or 15°C ($\Delta cshA$) and prepared as described in Materials and Methods.

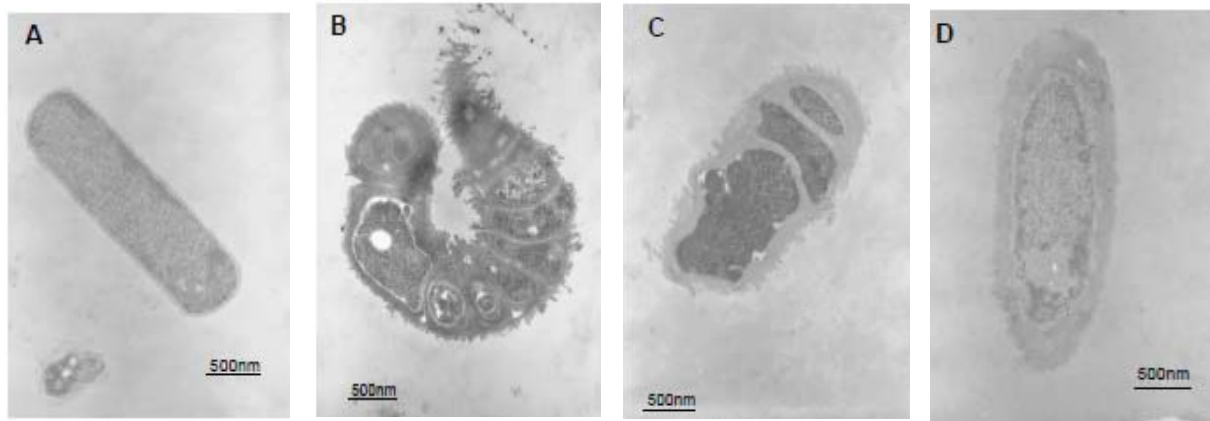


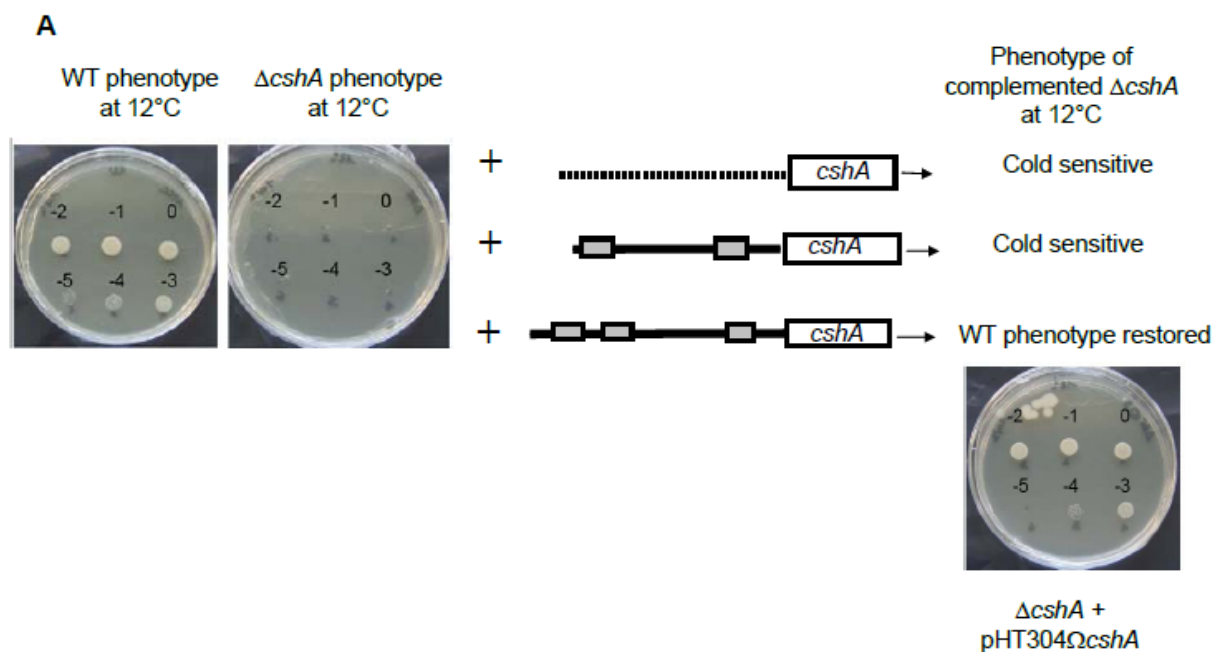
Fig. 6: Transmission electron micrographs of *B. cereus* WT(A), $\Delta cshA$ (B), $\Delta cshB$ (C) and $\Delta cshC$ (D) cells grown at low temperatures (10°C for WT, $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$, 15°C for $\Delta cshA$). Cells were prepared as described in Materials and Methods. Images are all at the same x 18, 000 magnification. Bars indicate 500nm. Cells on the presented pictures were representative of the majority of the observed cells.

Complementation of cold-sensitive phenotypes

The plasmid pHTXyl Ω *cshA*, in which the *cshA* open reading frame was placed under the control of a xylose-inducible promoter (Table 1), failed to complement the cold phenotype of $\Delta cshA$ at low temperature (Fig 7A), suggesting that the 5' non-coding region of *cshA* was necessary to an adequate regulation of expression in these conditions. Recently, three putative cold-boxes located at -69, -48 and +25 bp from the +1 *cshA* transcription point were identified (Broussolle *et al.*, 2010). The parental phenotype was not restored neither with the pHT304 Ω *pcshA*, in which *csdA* was placed under the control of its own promoter region of 204-bp from the start codon (ie lacking the distal cold-box) (Fig 7A). In contrast, complementation of *cshA* deletion by a *cshA*-plasmidic copy which was under the control of the entire 309 bp-promoter region (Fig 7A) fully restored the parental phenotype (i.e. growth at 12°C). This result demonstrated that the cold-sensitive phenotype of $\Delta cshA$ was only due to the absence of this RNA helicase encoding gene. In addition, it strongly suggested the implication of cold-box elements located in the 5' non-coding region of *cshA* on its transcription at low temperature.

Chapitre 2 : Implication des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid de *B. cereus*

Cross-complementation of $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ were performed with the *cshA*-plasmidic construction. As presented in Fig 7B, introduction of the copy of *cshA* complemented in part the cold-phenotype due to *cshB* deletion as colonies were observed at 12°C on LB plates at lower dilution than the $\Delta cshB$ + pHT304 Ω *cshA* strain than $\Delta cshB$ strain. This result was also confirmed by growth in LB at 12°C followed by OD₆₀₀ values and cfu counts: inoculum at OD₆₀₀ =0.1, OD₆₀₀=2.5 and 3.10⁸ cfu obtained after 175h. Morphology of $\Delta cshB$ + pHT304 Ω *cshA* cells was closer to the WT than to the $\Delta cshB$ cells. This additional copy of *cshA* did not alter the growth at 30°C. In contrast, the cold-phenotype due to the *cshC* deletion was not complemented at 12°C on LB agar-plates by the introduction *in trans* of *cshA* (Fig 7B) or in LB liquid medium. A possible polar effect of *cshC* mutation of the downstream genes BC2104 and BC2105 was unlikely because the corresponding mRNAs were detected by RT-PCR in $\Delta cshC$ (not shown).



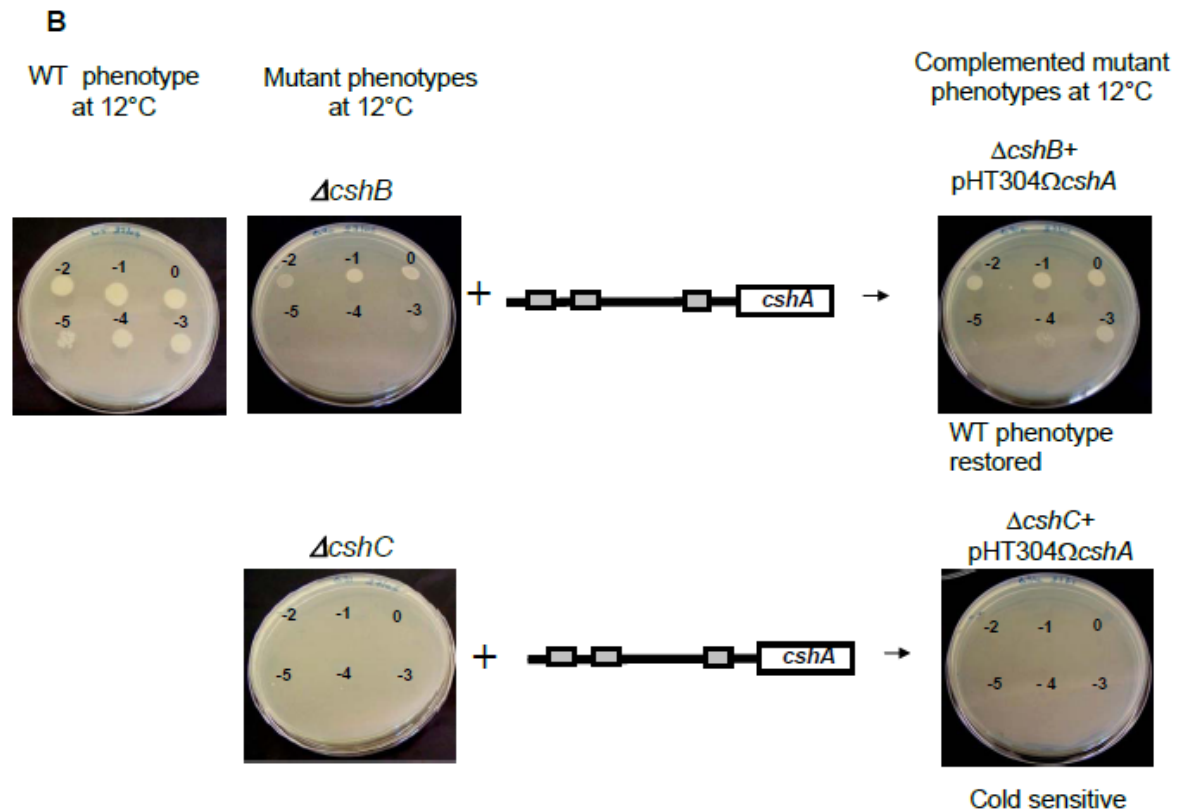


Fig. 7: Complementation assays with the *cshA* gene at 12°C of *B. cereus* $\Delta cshA$ strain (A) and $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ strains (B). On the (A) panel, horizontal lines represent the promoter region of *cshA* (full lines), or the PxyI promoter (dashed line), boxes are putative cold-boxes. Colonies on LB-agar plates were grown for 7 days at 12°C from 10-fold serially diluted bacterial suspensions as described in Materials and Methods.

Discussion

When exposed to low temperature, bacteria have to face a transient inhibition of protein synthesis mainly due to the presence of secondary structures in mRNA, stabilized by cold conditions. To overcome the translation interruption, cold-shocked cells synthesise cold-induced RNA helicases which remove secondary structures and protect RNA from RNase-mediated degradation. Our study investigate the possible role of the five putative RNA helicases present in the genome of *B. cereus* ATCC 14579 in its adaptation at low temperature, close to the growth limit.

The five genes named *cshA*, *cshB*, *cshC*, *cshD* and *cshE* encode proteins exhibiting nine domains highly conserved among the proteins belonging to the DEAD-box RNA

helicase family. These motifs were shown to be involved in the ATPase and helicase activity as well as RNA binding (Bleichert and Baserga, 2007). The DEAD-motif in particular has been demonstrated to be essential for ATP hydrolysis (Awano *et al.*, 2007). Similarly to *B. cereus* ATCC 14579, *E. coli* possesses five RNA helicases whose functions have recently been reviewed by Iost and Dreyfus (Iost and Dreyfus, 2006): DbpA was shown to be involved in ribosome biosynthesis, CsdA and SrmB as well as RhIE (Jain, 2008) participate to ribosome assembly, RhIB and CsdA to mRNA decay. Four RNA helicases have been found in *B. subtilis* genome and YxiN has been described as the functional homologue of *E. coli* DbpA (Kossen *et al.*, 2002). Those two proteins showed 73.6% identity for YxiN and 35.4% for DbpA with *B. cereus* CshD. The *B. cereus* CshA protein also showed high homology with CshA of *B. subtilis* (formerly named YdbR) and CsdA of *E. coli*. Those proteins all possess in addition to the already described conserved motifs, a C-terminal glycine-arginine rich domain thought to mediate the interaction of DEAD-box proteins with their specific partners or RNA binding (Silverman *et al.*, 2003). Moreover, this domain has been shown necessary for *E. coli* CsdA function at 15°C (Turner *et al.*, 2007). A phylogenetic study of eubacterial RNA helicase sequence conservation (Iost and Dreyfus, 2006) suggested the presence of *E. coli* CsdA and DbpA orthologues in Bacilli genomes which may be *B. cereus* CshA and CshD and *B. subtilis* CshA and YxiN. However, further functional analyses are required to confirm this hypothesis.

In *B. cereus* ATCC 14579, the *cshA* gene was transcribed as a monocistronic unit whereas *cshB* and *cshC* revealed operonic organizations. The *cshB* gene was cotranscribed with an endonuclease IV-encoding gene, similarly to *B. subtilis* genome where the *cshB* gene (*yqfR*) is located next to *yqfS* gene, coding for an endonuclease IV. This observation suggests a functional link between these two proteins that remains to be demonstrated. The *cshC* gene is part of an extended operonic structure of 6 genes, also containing two hypothetical proteins,

a methyltransferase and two enzymes of the glyoxylate metabolism. This operon is not conserved in *B. subtilis* genome.

Cold- induced expression of RNA helicase-encoding genes have been described in bacteria and archaeobacteria consequently to cold shock or low temperature adaptation (Chamot *et al.*, 1999). We analysed the expression of the five *B. cereus csh* genes at different times of the kinetics of growth at 37°C and at 10°C: transcripts were detected by qRT-PCR both at 37°C and 10°C for the five genes which were all overexpressed from 2.7 to 9.9-fold at 10°C compared to 37°C. The highest *csh* gene expression was observed for *cshA* when bacteria were grown at both 10°C and 37°C, suggesting an important role of this RNA helicase whatever the temperature. Higher expression at low temperature was observed mainly in the early phase of bacterial growth, except for *cshC* which was equally transcribed whatever the growth phase. These results suggest that the five genes are involved in low temperature adaptation of *B. cereus*.

When compared to the WT at 10°C, growth of *cshD* and *cshE* isogenic mutants was clearly not impaired whereas strains $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ exhibited a marked cold-sensitive phenotype. The minimum growth limit was 12°C for $\Delta cshB$ and was 15°C for $\Delta cshA$ and $\Delta cshC$. The $\Delta cshA$ growth was also slightly impaired at 30°C but was similar to that of the WT at 37°C. Different results were reported concerning the *B. subtilis cshA* homologue: Hunger *et al* reported that a single deletion of *cshA* or *cshB* gene did not result in a cold-specific growth defect and that a double deletion was lethal for *B. subtilis* (Hunger *et al.*, 2006). For *B. cereus*, deletion of *cshA*, *cshB* or *cshC* clearly led to growth defect at 10°C with a strong effect on cell morphology as revealed by both optical microscopic observations and analysis of bacterial structures on TEM. Cells of $\Delta cshA$ were long and formed large aggregates as previously described for *E. coli* $\Delta csdA$ (Jones *et al.*, 1996), and were curved at the pole. This striking feature was also described for the cold-induced RNA helicase ChrC

deletion mutant, from the cyanobacterium *Anabaena* which was shown to be associated to the plasma membrane at the cell pole during cell division (El-Fahmawi and Owttrim, 2003). Fluorescence microscopy analysis revealed that *B. subtilis* CshA and CshB RNA helicases localized predominantly to the cell poles (Hunger *et al.*, 2006). The *E. coli* RNA helicase RhlB was also membrane associated via a multiprotein complex called degradosome involved in mRNA decay (Taghbalout and Rothfield, 2007). The degradosomal proteins are organised as a cytoskeletal-like structure independently of the bacterial actin-like protein MreB and the cytoskeletal protein MinD (Taghbalout and Rothfield, 2008). A degradosome-like structure was recently found in *B. subtilis* however not including any RNA helicase (Commichau *et al.*, 2009). Existence of such a structure and its composition in *B. cereus* is still unknown.

TEM images of $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ and to a lesser extend $\Delta cshC$, revealed abnormal divisions with thicker membranes for cells grown at low temperature. Such aberrant membrane structures were observed when mutating the *tagO* gene involved in cell wall teichoic acid biosynthesis in *B. subtilis* (D'Elia *et al.*, 2006). Observation of the highly modified ultra structure of these three cold-sensitive *csh* mutant cells raised the question of the viability of such altered cells. Live-dead coloration revealed a viability of mutants similar to WT cells.

Specific involvement of CshA in the cold-sensitive phenotype of the corresponding deleted mutant was evidenced by complementation experiments. *In vivo* complementation of $\Delta cshA$ with a plasmidic copy of *cshA* fully restored the WT phenotype of growth at 10°C. Complementation of *cshA* mutation was not obtained if the *trans cshA*-copy was placed under the control of a truncated promoter region or an inducing xylose-promoter suggesting that the presence in its 5' non-coding region of three conserved motifs similar to cold-box elements described in many bacteria as modulators of cold-induced mRNA stability were essential (Gualerzi *et al.*, 2003).

In *B. cereus* ATCC 14579 the presence of four intact RNA helicase genes on the chromosome could not counterbalance the deletion of one of the three helicase-genes *cshA*, *cshB* and *cshC* for growth at low temperature. Cross-complementation of $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ was tested with a *trans* copy of *cshA*. The growth at 10°C of $\Delta cshB$ cells was restored by the presence of additional copies of *cshA* on a plasmid while growth at 10°C of $\Delta cshC$ cells was not. This strongly suggests that CshA and CshB could have similar function in *B. cereus* cold adaptation or that CshA could have multiple overlapping functions as described for *E. coli* CsdA which is mainly involved in mRNA decay via the cold-adapted degradosome but also in the biogenesis of the 50S ribosomal subunit (Iost and Dreyfus, 2006). The exact role of CshA, B and C during *B. cereus* growth at low temperature remains to be investigated. Two out of five RNA helicases CsdA and SrmB were shown to be involved in *E. coli* low temperature adaptation; however, *csdA* did not complement $\Delta srmB$ growth defect at 15°C and vice versa (Charollais *et al.*, 2004). Recently it was shown that the cold-sensitive phenotype of *E. coli* $\Delta csdA$ cells could be complemented by the RNA helicase RhIE, the cold-shock protein CspA and the exoribonuclease RNase R (Awano *et al.*, 2007).

In conclusion, this study demonstrated that the five RNA helicase encoding genes, present in *B. cereus* ATCC 14579 genome are up-regulated in response to low temperature conditions, and that only three had an essential role in growth at low temperature. Their deletion raised the minimum growth temperature threshold of *B. cereus*, and at low temperatures permissive for growth, caused strong modification on cells morphology. The CshA RNA helicase may have a stronger role in *B. cereus* temperature-adaptation as the *cshA* deletion impacted on a larger range of temperature than *cshB* and *cshC* deletions. These three RNA helicases may have different function as their deletion caused different modifications, with possible overlapping roles between CshA and CshB at low temperature. The exact

function of each RNA helicases in RNA metabolism in the cold adaptation of *B. cereus* needs further investigations.

Acknowledgments

Authors thank I. Iost and A. J. Carpoussis for helpful discussions and F. Carlin for critical reading of the manuscript. Thanks are also due to Fuping Song for help with the mutagenesis protocol, to G. Andre-Leroux and M.H Guinebretière for help in bioinformatics analysis. Financial support of FP PhD is from INRA and Regional Council *Provence Alpes Côte d'Azur*. FP thanks the French Academy of Agriculture for a Dufrenoy grant. This work was supported by *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) (France) under the ANR-05-PNRA-013 *B. cereus* contract.

References

1. **Ando, Y., and K. Nakamura.** 2006. *Bacillus subtilis* DEAD protein YdbR possesses ATPase, RNA binding, and RNA unwinding activities. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **70**:1606-1615.
2. **Anonymous.** 2005. Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. *The EFSA Journal* **175**:1-48.
3. **Arantes, O., and D. Lereclus.** 1991. Construction of Cloning Vectors for *Bacillus-Thuringiensis*. *Gene* **108**:115-119.
4. **Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille.** 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:6887-6891.
5. **Arnesen, L. P. S., A. Fagerlund, and P. E. Granum.** 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiology Reviews* **32**:579-606.
6. **Awano, N., C. Y. Xu, H. P. Ke, K. Inoue, M. Inouye, and S. Phadtare.** 2007. Complementation analysis of the cold-sensitive phenotype of the *Escherishia coli* *csdA* deletion strain. *Journal of Bacteriology* **189**:5808-5815.

7. **Bae, W., P. G. Jones, and M. Inouye.** 1997. CspA, the major cold shock protein of *Escherishia coli*, negatively regulates its own gene expression. *Journal of Bacteriology* **179**:7081-7088.
8. **Berthelot, K., M. Muldoon, L. Rajkowitsch, J. Hughes, and J. E. G. McCarthy.** 2004. Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. *Molecular Microbiology* **51**:987-1001.
9. **Bleichert, F., and S. J. Baserga.** 2007. The long unwinding road of RNA helicases. *Molecular Cell* **27**:339-352.
10. **Brillard, J., I. Jéhanno, C. Dargaignaratz, I. Barbosa, C. Ginies, C. Carlin, S. Fedhila, C. Nguyen-the, V. Broussolle, and V. sanchis.** 2010. Identification of genes specifically expressed during *Bacillus cereus* growth at low temperature. *Applied and Environmental Microbiology* **in press**.
11. **Broussolle, V., F. Pandiani, N. Haddad, C. Michaud, C. Carlin, C. NguyenThe, and J. Brillard.** 2010. Insertional mutagenesis reveals genes involved in *Bacillus cereus* ATCC 14579 growth at low temperature. *FEMS Microbiology Letters* **in press**.
12. **Carpousis, A. J.** 2007. The RNA degradosome of *Escherishia coli*: An mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annual Review of Microbiology* **61**:71-87.
13. **Chamot, D., W. C. Magee, E. Yu, and G. W. Owttrim.** 1999. A cold shock-induced cyanobacterial RNA helicase. *Journal of Bacteriology* **181**:1728-1732.
14. **Charollais, J., M. Dreyfus, and I. Iost.** 2004. CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherishia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research* **32**:2751-2759.
15. **Charollais, J., D. Pflieger, J. Vinh, M. Dreyfus, and I. Iost.** 2003. The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherishia coli*. *Molecular Microbiology* **48**:1253-1265.
16. **Choma, C., T. Clavel, H. Dominguez, N. Razafindramboa, H. Soumille, C. Nguyen-the, and P. Schmitt.** 2000. Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. *International Journal of Food Microbiology* **55**:73-77.
17. **Commichau, F. M., F. M. Rothe, C. Herzberg, E. Wagner, D. Hellwig, M. Lehnik-Habrink, E. Hammer, U. Volker, and J. Stulke.** 2009. Novel Activities of Glycolytic Enzymes in *Bacillus subtilis*. *Molecular & Cellular Proteomics* **8**:1350-1360.

18. **Cordin, O., J. Banroques, N. K. Tanner, and P. Linder.** 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* **367**:17-37.
19. **Corpet, F.** 1988. Multiple Sequence Alignment with Hierarchical-Clustering. *Nucleic Acids Research* **16**:10881-10890.
20. **D'Elia, M. A., K. E. Millar, T. J. Beveridge, and E. D. Brown.** 2006. Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **188**:8313-8316.
21. **El-Fahmawi, B., and G. W. Owttrim.** 2003. Polar-biased localization of the cold stress-induced RNA helicase, CrhC, in the Cyanobacterium *Anabaena* sp strain PCC 7120. *Molecular Microbiology* **50**:1439-1448.
22. **Giuliodori, A. M., A. Branki, C. O. Gualerzi, and C. L. Pon.** 2004. Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation. *Rna-a Publication of the Rna Society* **10**:265-276.
23. **Gualerzi, C. O., A. M. Giuliodori, and C. L. Pon.** 2003. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *Journal of Molecular Biology* **331**:527-539.
24. **Guinebretiere, M. H., and C. Nguyen-The.** 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *Fems Microbiology Ecology* **43**:207-215.
25. **Guinebretiere, M. H., F. L. Thompson, A. Sorokin, P. Normand, P. Dawyndt, M. Ehling-Schulz, B. Svensson, V. Sanchis, C. Nguyen-The, M. Heyndrickx, and P. De Vos.** 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* **10**:851-865.
26. **Haque, M. A., and N. J. Russell.** 2004. Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiology-Sgm* **150**:1397-1404.
27. **Herschlag, D.** 1995. RNA chaperones and the RNA folding problem. *Journal of Biological Chemistry* **270**:20871-20874.
28. **Hunger, K., C. L. Beckering, F. Wiegshoff, P. L. Graumann, and M. A. Marahiel.** 2006. Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **188**:240-248.
29. **Iost, I., and M. Dreyfus.** 2006. DEAD-box RNA helicases in *Escherishia coli*. *Nucleic Acids Research* **34**:4189-4197.

30. **Jain, C.** 2008. The *E-coli* RhIE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. *Rna-a Publication of the Rna Society* **14**:381-389.
31. **Jones, P. G., M. Mitta, Y. Kim, W. N. Jiang, and M. Inouye.** 1996. Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherishia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:76-80.
32. **Kossen, K., and O. C. Uhlenbeck.** 1999. Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. *Nucleic Acids Research* **27**:3811-3820.
33. **Lim, J., T. Thomas, and R. Cavicchioli.** 2000. Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *Journal of Molecular Biology* **297**:553-567.
34. **Lorsch, J. R.** 2002. RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life. *Cell* **109**:797-800.
35. **Mahillon, J., and D. Lereclus.** 2000. Electroporation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*, p. 242-252. In N. Eynard and J. Teissie (ed.), *Electrotransformation of Bacteria*. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg Platz 3/D-14197 Berlin/Germany.
36. **Mayr, B., T. Kaplan, S. Lechner, and S. Scherer.** 1996. Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *Journal of Bacteriology* **178**:2916-2925.
37. **Panoff, J. M., B. Thammavongs, M. Gueguen, and P. Boutibonnes.** 1998. Cold stress responses in mesophilic bacteria. *Cryobiology* **36**:75-83.
38. **Pfaffl, M. W.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**.
39. **Phadtare, S., J. Alsina, and M. Inouye.** 1999. Cold shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology* **2**:175-180.
40. **Rodrigues, D. F., and J. M. Tiedje.** 2008. Coping with our cold planet. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:1677-1686.
41. **Salamitou, S., H. Agaisse, and D. Lereclus.** 1997. A genetic system that reports transient activation of genes in *Bacillus*. *Gene* **202**:121-126.
42. **Silverman, E., G. Edwalds-Gilbert, and R. J. Lin.** 2003. DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* **312**:1-16.

43. **Story, R. M., H. Li, and J. N. Abelson.** 2001. Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii* (vol 98, pg 1465, 2001). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**:3624-3624.
44. **Taghbalout, A., and L. Rothfield.** 2008. New insights into the cellular organization of the RNA processing and degradation machinery of *Escherishia coli*. Molecular Microbiology **70**:780-782.
45. **Taghbalout, A., and L. Rothfield.** 2008. RNaseE and RNA helicase B play central roles in the cytoskeletal organization of the RNA degradosome. Journal of Biological Chemistry **283**:13850-13855.
46. **Taghbalout, A., and L. Rothfield.** 2007. RNaseE and the other constituents of the RNA degradosome are components of the bacterial cytoskeleton. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**:1667-1672.
47. **Turner, A. M. W., C. F. Love, R. W. Alexander, and P. G. Jones.** 2007. Mutational analysis of the *Escherishia coli* DEAD box protein CsdA. Journal of Bacteriology **189**:2769-2776.
48. **Weber, M. H. W., and M. A. Marahiel.** 2002. Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **357**:895-906.

Chapitre 3 : Implication des hélicases à ARN dans l'adaptation aux stress abiotiques de *B. cereus*

1. Introduction à l'étude

Les hélicases à ARN sont retrouvées aussi bien dans des génomes de virus, de procaryotes ou encore d'eucaryotes (Cordin *et al.*, 2006). Elles sont impliquées de manière générale dans tous les processus impliquant les ARN, tels que le transport, la dégradation, la conformation des ARN mais aussi l'initiation de la traduction et la biogenèse des ribosomes (Regonesi *et al.*, 2006; Carpousis, 2007; Worrall *et al.*, 2008). Ces protéines agiraient comme des moteurs moléculaires capables de dérouler les structures secondaires d'ARN (Story *et al.*, 2001; Cordin *et al.*, 2006). Les hélicases à ARN peuvent également être impliquées dans le réarrangement des protéines associées aux ARN, ainsi que dans l'association d'ARN simples brins complémentaires (Valdez *et al.*, 1997; Chamot *et al.*, 2005; Linder, 2006). Ces fonctionnalités confèrent aux hélicases à ARN un spectre d'action biologique extrêmement large.

Les variations de l'environnement peuvent entraîner une perte de fonction des ARN, perturbant la capacité d'adaptation et de croissance des bactéries. Pour s'adapter au nouvel environnement, la bactérie doit être capable de restaurer et de maintenir la fonctionnalité de ses ARN. La modification brutale des conditions de croissance entraîne la dégradation de la plupart des ARNm afin de permettre une adaptation rapide (Marcaida *et al.*, 2006). Les hélicases à ARN, de par leur implication dans le métabolisme des ARN, pourraient avoir un rôle important dans cette capacité à s'adapter à un environnement stressant.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'implication des hélicases à ARN dans les mécanismes d'adaptation des bactéries à leur environnement a surtout été rapportée pour des stress de température. Peu d'études ont été conduites pour déterminer leur rôle dans l'adaptation à d'autres stress abiotiques (Owtrim, 2006). L'expression de ChrC de *Synechocystis* est régulée par les variations de potentiel redox de la chaîne de transport des électrons (Kujat and Owtrim, 2000). Cette hélicase à ARN est également induite par les stress acide et salin et elle est capable de catalyser à la fois le déroulement des structures secondaires d'ARN et le réarrangement des complexes protéiques interagissant avec les ARN (Vinnemeier and Hagemann, 1999; Chamot *et al.*, 2005). L'interruption par un transposon du

gène codant pour une hélicase à ARN de *C. perfringens*, homologue à CshA de *B. subtilis*, entraîne une meilleure survie du mutant en condition de stress oxydatif (Briolat and Reysset, 2002). Etant une bactérie extrêmement répandue dans les aliments, le sol ou l'environnement, *B. cereus* subit de nombreuses variations environnementales, telles que des variations de températures, de potentiel redox ou de pH, auxquelles elle doit être capable de s'adapter. Nous avons démontré l'implication des hélicases à ARN CshA, CshB et CshC de *B. cereus* dans l'adaptation au froid (Broussolle *et al.*, 2010; Pandiani *et al.*, 2010), alors que CshD et CshE ne présentent pas de phénotype cryosensible. Les questionnements relatifs à ce chapitre sont:

-Peut-on définir plus précisément un domaine de température d'activité pour CshA, CshB et CshC de *B. cereus*?

-Ces hélicases à ARN, ainsi que CshD et CshE, sont elles impliquées dans l'adaptation à d'autres stress abiotiques que le froid ?

2. Stratégie envisagée

- a. Croissance de la souche sauvage et des mutants Δcsh en condition de stress abiotique

Les croissances des 5 mutants Δcsh et de la souche sauvage ont été réalisées en microplaques en milieu LB à partir de pré-cultures de cellules à $DO_{600nm} > 1.5$, et le suivi de la DO_{600nm} a été réalisé à l'aide d'un Bioscreen C. Le comportement de ces souches a été étudié pour trois familles de stress : basse et haute températures, stress oxydant, pH acide et basique. Ainsi, nous avons testé la croissance des souches mutantes en conditions de température sub-optimales à 12°C et 20°C, en conditions de températures optimales 30°C et 37°C, mais aussi au-delà de cet optimum de température à 42°C et à 45°C. L'effet d'un stress oxydant sur la croissance des souches mutantes et de la souche sauvage a été testé par ajout de peroxyde d'hydrogène ou de diamide. Ces deux composés ont des actions proches mais des cibles biologiques différentes. Nous avons testé deux concentrations 4.5mM et 8.1mM de H_2O_2 et 5 concentrations 0.5mM, 0.8 mM, 1.0 mM, 1.3mM et 1.5 mM de diamide, correspondant à des concentrations permettant la croissance de la souche sauvage. Enfin, l'effet d'un pH acide (pH 5.0), neutre (pH 7.0) et basique (pH 8.5) sur la croissance des 6 souches a été étudié.

i. Modélisation et comparaison des paramètres de croissance

Les courbes de croissances générées dans les différentes conditions de stress ont été modélisées afin de déterminer les paramètres de croissance associés. Nous avons utilisé pour cela, le modèle de Zwietering aussi appelé modèle de Gompertz modifié et qui a été décrit comme l'un des meilleurs modèles pour estimer les paramètres de croissance à partir de la mesure d'absorbance à 600nm (Zwietering *et al.*, 1990). Ce modèle permet de déterminer le taux de croissance spécifique, appelé μ_{max} , et qui correspond à la vitesse maximale de la croissance. Nous avons également estimé le temps de latence, qui est un paramètre important pour caractériser les croissances en conditions de stress. Pour cela, nous avons utilisé un paramètre d'approximation appelé « temps de détection »: ce paramètre correspond au temps nécessaire pour que l'absorbance initiale augmente de 0.05 unité. Les paramètres de croissance de la souche sauvage et des 5 mutants ont ainsi été comparés pour chaque condition de stress testée. La significativité des différences observées entre la souche sauvage et les mutants a été testée pour chaque paramètre à l'aide d'un test t de Student bilatéral pour échantillon apparié avec un risque de 5%. Les valeurs moyennes, ainsi que les écarts types et la significativité de ces paramètres de croissance, ont été représentés sous forme de graphique ou de tableau afin de permettre la détermination des conditions affectant la croissance des mutants par rapport à la souche sauvage.

3. Résultats et discussion

En dessous de l'optimum de température, le taux de croissance des mutants $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ et $\Delta cshC$ est diminué par rapport à la souche sauvage et le temps de détection est augmenté à l'exception du mutant $\Delta cshB$. Le mutant $\Delta cshA$ est le seul mutant dont les paramètres de croissance sont négativement affectés à 30°C. Le temps de détection de CshC est également augmenté de manière significative. Concernant les températures au-delà de la température optimale de croissance, les mutants $\Delta cshA$ et $\Delta cshB$ présentent un taux de croissance diminuée à 42°C et seul le μ_{max} du mutant $\Delta cshB$ est affecté à 45°C. Le temps de détection n'est affecté pour aucun des mutants à 42°C et il est significativement augmenté pour les mutants $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ et $\Delta cshC$ à 45°C. Concernant le stress oxydant, le mutant $\Delta cshA$ est le seul dont le taux de croissance est affecté en présence de 4.5 mM de H₂O₂ alors qu'à 8.1 mM celui de $\Delta cshB$ et $\Delta cshC$ sont également diminués. Le temps de détection de ces

trois mutants est sensiblement augmenté, quelle que soit la concentration utilisée. Le stress diamide entraîne la réduction du taux de croissance des mutants $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ et $\Delta cshC$, pour toutes les concentrations testées la concentration utilisée et une augmentation de temps de détection pour les concentrations les plus faibles. Ce même stress, testé à 37°C pour le mutant $\Delta cshA$, entraîne une restauration du taux de croissance de ce mutant à une valeur comparable au sauvage pour les concentrations les plus faibles. Enfin, le pH basique entraîne la réduction significative des taux de croissance des mutants $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ et $\Delta cshC$ mais pas l'augmentation du temps de détection. En revanche, la croissance à 37°C du mutant $\Delta cshA$ dans ces conditions de stress ne restaure pas une croissance comparable à la souche sauvage.

Les hélicases à ARN CshA, CshB et CshC sont nécessaires pour assurer une croissance comparable à la souche sauvage en dessous de la température optimale de croissance. CshA est également nécessaire pour permettre une croissance optimale de *B. cereus* à 30°C. Il semble donc que CshA ne soit pas seulement impliquée dans des fonctions d'adaptation au froid, mais elle pourrait également intervenir dans des fonctions cellulaires en conditions normales de croissance. CshA et CshB sont également requises pour assurer une croissance optimale en dessous de 45°C. L'hélicase CshC est impliquée dans l'adaptation thermique de *B. cereus*, uniquement à basse température puisque la croissance du mutant $\Delta cshC$ est affectée uniquement en dessous de 30°C. Ainsi, CshA et CshB partagent les mêmes domaines de température d'action, à l'exception de 30°C, alors que CshC ne semble avoir un rôle indispensable qu'à basse température. Ces observations sont corrélées par les expériences de complémentations présentées dans le Chapitre 2, qui montrent que la surexpression de CshA supplée uniquement l'absence de CshB. Il semble donc qu'il existe un lien entre les domaines de température auxquels agissent ces hélicases à ARN et leurs fonctions respectives. En d'autres termes, les hélicases agissant dans les mêmes domaines de températures posséderaient des fonctionnalités extrêmement proches, expliquant la complémentation de la souche $\Delta cshB$ par *cshA*.

Ces 3 hélicases à ARN sont également nécessaires, à différents degrés, pour permettre la croissance de *B. cereus* en condition de stress oxydant et à pH basique. Les hélicases CshA, CshB et CshC semblent jouer un rôle dans l'adaptation à certains stress abiotiques. Cependant, CshA semble avoir un rôle beaucoup plus marqué pour permettre l'adaptation aux

différentes températures de croissance et semble également avoir le rôle le plus important au niveau de l'adaptation global des cellules au stress.

Les hélicases à ARN CshA, CshB et CshC sont nécessaires pour la croissance en dessous de l'optimum de température et pour permettre l'adaptation à certains stress abiotiques.

En revanche, les hélicases à ARN CshD et CshE n'ont pas de rôle adaptatif en réponse aux stress testés

4. Implication of the five RNA helicases in *B. cereus* ATCC 14579 adaptation to abiotic stresses

Franck Pandiani^{1,2}, Stéphanie Chamot^{1,2}, Julien Brillard^{1,2}, Frédéric Carlin^{1,2}, Christophe Nguyen-the^{1,2} and Véronique Broussolle^{1,2*}

Article soumis à Applied and Environmental Microbiology

¹INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

²Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

* Corresponding author: INRA, UMR408, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France.

E-mail: broussol@avignon.inra.fr; Tel: (33) (0) 432 72 25 18. Fax: (33) (0) 432 72 24 92

Running title: RNA helicases and adaptative stress

Keywords: oxidative stress, temperature, pH

Abstract

The RNA helicase-encoding genes *cshA*, *cshB* and *cshC* were previously shown as essential for *Bacillus cereus* ATCC 14579 growth at low temperature. Here we compared the growth of the five RNA helicase deleted mutants to the wild-type strain under thermal, oxidative and pH stresses. Growth of the mutant strains $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ were clearly not affected by any of the tested conditions. The comparison of growth parameters of mutant strains with those of the WT lead to determine a specific and different thermal action range for CshA, CshB and CshC: CshA was required for optimal growth at all the tested temperature up to 45°C, while CshB was necessary except at 30°C and 37°C and CshC lead mainly to a cold-sensitive phenotype. The RNA helicases CshB and CshC were required during growth and adaptation in oxidative conditions while CshA was only required for the adaptation to H₂O₂ and during growth with the highest diamide concentration. Growth of $\Delta cshA$ was affected at a basic pH independently of the temperature while these conditions had a limited effect on $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ growth. These RNA helicases could participate in a general adaptation pathway to stressful conditions, with CshA playing the major role in thermal stress adaptation.

Material and Methods

Growth experiments

B. cereus ATCC 14579 strain (WT) and the five RNA helicase null-mutants (Pandiani *et al.*, 2010) were subcultured in LB-broth pH 6.6 during 16 h at 30°C and 200 rpm. All growth experiments were performed in microplates: each well was inoculated with the appropriate volume of the tested subculture to reach an initial OD_{600nm} of 0.09, in a final volume of 250 µl of LB-broth. Microplates were placed in the reading chamber of a Bioscreen C (Oy Growth Curves AB Ltd; Helsinki, Finland) where they were incubated at constant temperature in the range of 10°C to 45°C and continuously shaken at the highest intensity. Bioscreen C was pre-heated at the set point temperature for 2 h before starting growth experiments and OD_{600nm} was recorded every 15 min. Hydrogen peroxide and diamide concentrations were adjusted respectively to 4.5 mM and 8.1 mM and from 0.5m M to 1.5 mM after LB broth autoclaving. To test the effect of pH on *B. cereus* growth, pH of LB-broth was adjusted by the addition of HCl 1M or NaOH 1M to 5.0, 7.0 and 8.5 and adjusted again with sterile NaOH 1N, if necessary after sterilization. Three replicate growth kinetics were made for each condition with each of at least two independent inoculums.

Estimation of the growth rate from OD_{600nm} growth curves and of lag time

All wells were inoculated at an OD_{600nm} higher than the Bioscreen C's detection threshold. For all conditions tested, maximum specific growth rate was estimated from the OD_{600nm} curves, as a function of incubation time with the modified Gompertz equation (Zwietering *et al.*, 1990)

$$\ln\left(\frac{ABS_t}{ABS_{t_0}}\right) = A \cdot \exp\left\{-\exp\left[\left(\frac{\mu_{\max} \cdot e}{A}\right) \cdot (\lambda - t) + 1\right]\right\}$$

where $ABSt$ is the OD_{600nm} of the suspension at the tested time, ABS_{t0} is the OD_{600nm} of the suspension with initial OD_{600nm} above the detection threshold, A is the logarithmic increase of bacterial population and λ is the lag time determined by the model. The modified Gompertz equation was described as one of the most appropriate fitting model to determine the specific growth rate (μ_{max}) when the initial OD_{600nm} of the inoculums is above the Bioscreen C's detection threshold (Augustin *et al.*, 1999).

Lag time was estimated by the Time to detection (Ttd), corresponding to the abscissa of the point where the initial OD_{600nm} was increased of 0.05 unit. This point was determined by the equation

$$Ttd = \left(\frac{((ABS_{t0} + 0.05) - b)}{a} \right)$$

where (a) represents the slope of the line and (b) is the y-intercept after determining this equation of the curve by a linear regression between the point immediately before and the point immediately after the target $OD_{600nm} + 0.05$. The significance of the difference between the WT strain and the mutant strains growth parameters were statistically tested by a Student t-test with confidence of 95%.

Model fit and statistical analysis

Fits were performed by using the least squares criterion. The adjustment of the modelized was improved by minimizing the sum of the squared residual (SSR) values using the Microsoft Excel solver function between both the growth and the fitted curves where SSR is defined as follows:

$$SSR = \sum_{i=1}^n \left(value(i)_{observed} - value(i)_{fitted} \right)^2$$

Growth parameters μ_{\max} and lag of the five *csh* deleted mutants were determined for each stressful condition and were compared to the corresponding WT strain growth parameters in order to determine if the mutants were negatively, positively or not affected by the tested stress conditions when compared to the WT strain. The significance of this difference between the WT strain and the mutant growth parameters were statistically tested by a bilateral paired Student's t-test with confidence of 95%.

Results

Growth of RNA helicase mutants at different temperatures

Growth of the WT strain occurred at 12°C after a lag time (Ttd) of about 74h and a maximum growth rate (μ_{\max}) value of about 0.1 h⁻¹ (Table 1 and Fig. 1), while no growth was observed for $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ at this temperature even after a 5 days incubation (Table 1). Growth of $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ mutants were similar to the WT strain at 12°C. As expected, the lag time of the WT at 20°C was reduced and the μ_{\max} reached 0.4 h⁻¹. The Ttd of $\Delta cshA$ and $\Delta cshC$ was increased compared to the WT while that of $\Delta cshB$ was not (Table 1). $\Delta cshA$, $\Delta cshC$ and $\Delta cshB$ strains had a μ_{\max} value of respectively 0.1 h⁻¹, 0.2 h⁻¹ and 0.3 h⁻¹, all significantly lower than that of the WT (Fig. 1). $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ Ttd and μ_{\max} were similar to that of the WT (Table1, Fig.1 and not shown). At 30°C, $\Delta cshA$ was the only mutant with a lower μ_{\max} than the WT, with a mean value of 0.5 h⁻¹ vs 0.8 h⁻¹ for the WT (Fig 1). $\Delta cshA$ and $\Delta cshC$ had a lag phase of 1.1 h and 1.0 h, indicating that these mutant strains needed 0.4 h more than the WT to adapt and start to grow at this temperature (Table 1). When grown at 37°C, the Ttd (1.1 h) and the maximum growth rate (1.2 h⁻¹) of $\Delta cshA$ were still slightly lower than the WT (Fig 1 and Table 1).

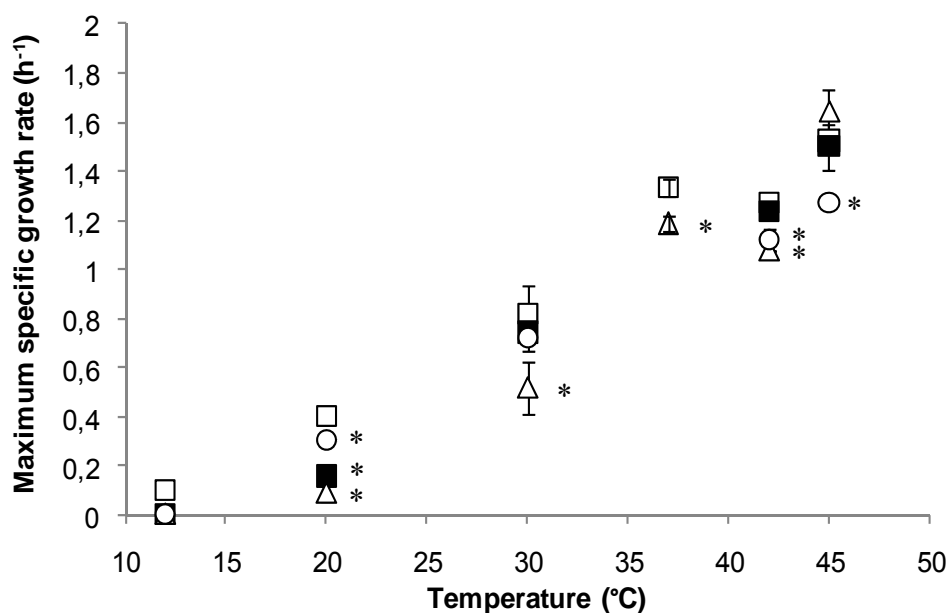


Fig.1. Effect of temperature on the growth rate of *B. cereus* ATCC 14579 (□), $\Delta cshA$ (Δ), $\Delta cshB$ (○), $\Delta cshC$ (■), mutant strains growing in LB broth. Values are the mean of nine values from three independent cultures; error bars indicate standard deviation (SD) and (*) indicates a significant variation of the μ_{max} value compare to WT. $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ μ_{max} values were not represented in this figure as they were never statistically different compared to the WT.

Table 1. Time to detection (Ttd) of *B. cereus* ATCC 14579 and of its RNA helicase isogenic mutants according to growth temperature

Ttd (h)	Temperature					
	12°C	20°C	30°C	37°C	42°C	45°C
WT	73.8 ^a ±3.3	3.3±0.6	0.7 ±0.3	0.8 ±0.1	0.8 ±0.0	0.5 ±0.0
ΔcshA	NGO ^b	4.2* ±0.8	1.0* ±0.1	1.1* ±0.1	0.8 ±0.1	0.8* ±0.1
ΔcshB	NGO	3.1 ±0.7	0.8 ±0.4	ND ^c	0.8 ±0.1	0.6* ±0.1
ΔcshC	NGO	5.5* ±0.8	1.0* ±0.1	ND	0.8 ±0.0	0.6* ±0.1
ΔcshD	70.5 ±6	2.5* ±0.3	0.8 ±0.3	ND	0.7 ±0.1	0.5 ±0.0

^a Values in hour were means of independent replicates with their SD values. The Ttd values of the mutant strains were compared to those of the WT. The difference between WT and mutant Ttd values were statistically tested by a paired Student's t-test with confidence of 95% and results were represented as follow: (*) significant differences observed between mutants and WT. ^b NGO: No growth observed after 125h, ^c ND: Not done. Ttd values of $\Delta cshE$ were not statistically different compared to that of the WT and were not listed in this table.

We also tested the growth capacity of the *csh* mutants beyond the optimal temperature, at 42°C and 45°C. At 42°C, the Ttd of the five *csh* mutants were similar to the WT (Table 1) but

the μ_{\max} of $\Delta cshA$ and $\Delta cshB$, respectively 1.1 h^{-1} and 1.1 h^{-1} , were lower than the 1.3 h^{-1} value observed for the WT (Fig 1). All mutants grew as the WT at 45°C , except $\Delta cshB$ (1.3 h^{-1}) which had a significantly lower μ_{\max} than the WT (1.5 h^{-1}). Compared to the WT, the Ttd of $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ were 10 to 50% higher (Table 1).

Growth of *csh* mutants under oxidative stressful conditions

Growth of the WT and the five *csh* mutant strains was tested at 30°C with 4.5 mM and 8.1 mM of hydrogen peroxide. The Ttd of the WT with 4.5 mM H_2O_2 (4.6 h) and with 8.5 mM H_2O_2 (13.2 h) (Table 2) was strongly increased compared to growth without H_2O_2 , where WT needed only 0.7 h to start growing (Table 1). However, these two concentrations of H_2O_2 did not affect the μ_{\max} of the WT (0.7 h^{-1} with 4.5 mM and 0.8 h^{-1} with 8.1 mM) which was approximately the same as in absence of H_2O_2 (0.8 h^{-1}) (Fig. 2).

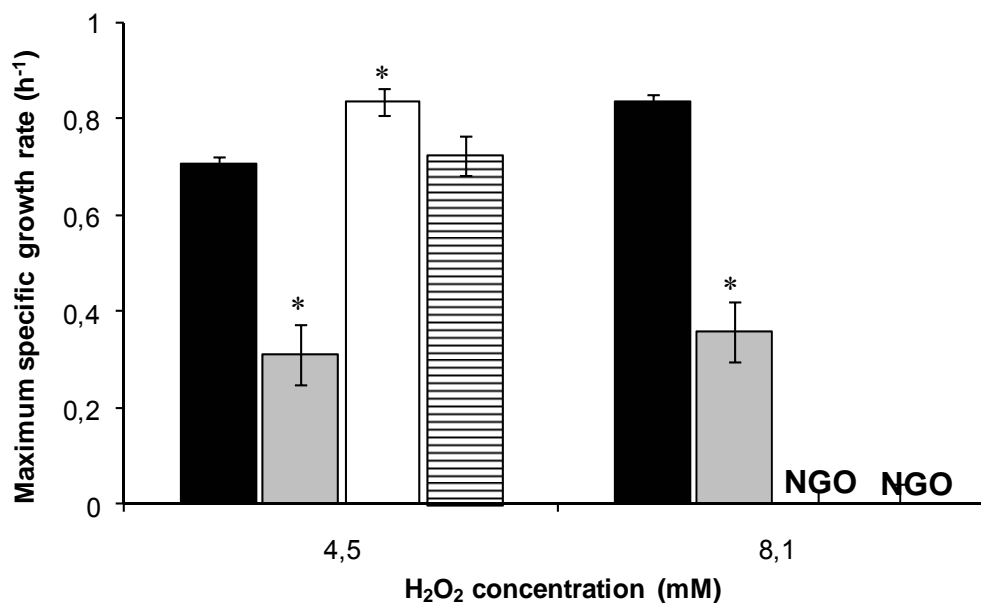


Fig.2. Effect of H_2O_2 concentration on the growth rate of *B. cereus* ATCC 14579 (black bars) $\Delta cshA$ (grey bars), $\Delta cshB$ (white bar), $\Delta cshC$ (horizontal lined bar) in LB broth at 30°C . Values are the mean of six values from two independent cultures, error bars indicate SD and (*) indicates a significant variation of the μ_{\max} value compare to WT, $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ μ_{\max} values were never statistically different compared to that of the WT and were not represented. NGO: No Growth Observed after 48 h.

Chapitre 3 : Implication des hélicases à ARN dans l'adaptation aux stress abiotiques de *B. cereus*

In presence of 4.5mM H₂O₂, the Ttd of $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ were 13.3 h, 9.8 h and 10.8 h respectively, that represents approximately a value two or three times higher than the WT strain (Table 2). The μ_{max} of $\Delta cshA$ (0.3 h⁻¹) was lower than that of the WT (0.7 h⁻¹) while the μ_{max} of the other mutants were similar to the WT. When increasing the concentration of H₂O₂ to 8.1 mM, the WT strain needed 13.2 h to start its growth and $\Delta cshA$ needed 22.5 h while no growth was observed for $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ strains in these conditions (Table 2). Growth of $\Delta cshA$ was impaired with a lower μ_{max} (0.3 h⁻¹) than the WT (0.7 h⁻¹) (Fig. 2). We tested the effect of H₂O₂ at 37°C, as $\Delta cshA$ growth was less affected at this temperature than at 30°C: $\Delta cshA$ exhibited a significant higher Ttd than the WT in presence of 4.5 mM H₂O₂ (Table 3). The μ_{max} and the Ttd of $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ were not different from the WT for the two concentrations of H₂O₂ at 30°C (data not shown)

Table 2. Time to detection (Ttd) of *B. cereus* ATCC 14579 and of its RNA helicase isogenic mutants according to hydrogen peroxide and diamide concentration at 30°C

Ttd (h)	H ₂ O ₂ concentration		Diamide concentration				
	4.5 mM	8.1 mM	0,5 mM	0,8 mM	1 mM	1,3 mM	1,5 mM
WT	4.6 ^a ±3.0	13.2 ±1.0	0.8 ±0.0	1.1 ±0.1	1.5 ±0.2	2.9 ±0.6	3.5 ±0.6
$\Delta cshA$	13.3* ±3.7	22.5* ±3.8	1.5* ±0.1	1.9* ±0.2	2.2* ±0.2	2.9 ±0.3	3.2 ±0.1
$\Delta cshB$	9.8* ±3.7	NGO ^b	1.0* ±0.0	1.5* ±0.2	1.6* ±0.1	1.7 ±1.1	3.5 ±0.6
$\Delta cshC$	10.8* ±2.9	NGO	1.2* ±0.1	1.6* ±0.1	2.0* ±0.1	3.3 ±0.3	3.5 ±0.7

^a see legend of Table 1, ^b NGO: No growth observed after 48h. Ttd values of $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ were not statistically different compared to that of the WT and were not listed in this table

Chapitre 3 : Implication des hélicases à ARN dans l'adaptation aux stress abiotiques de *B. cereus*

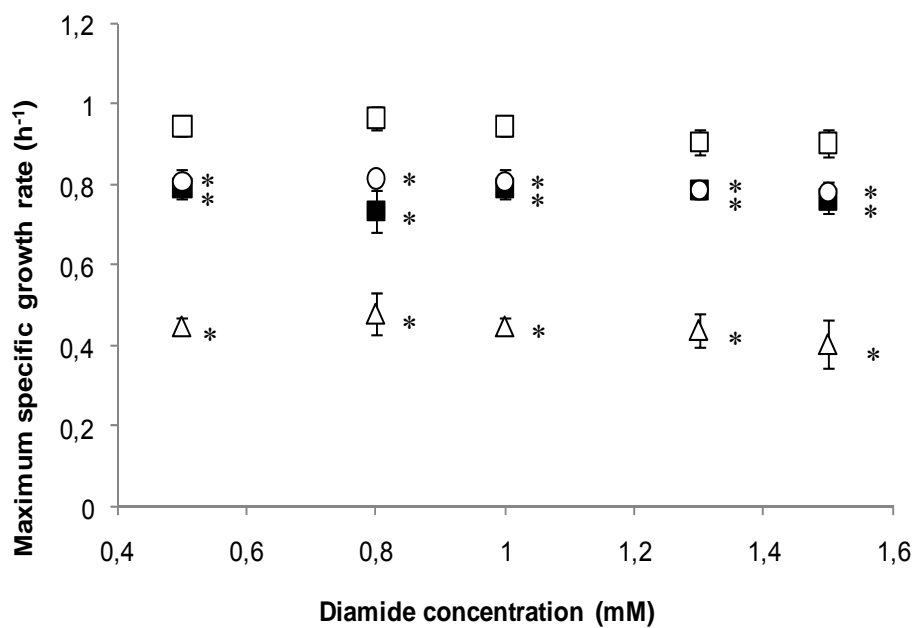
The effect of five concentrations, from 0.5 mM to 1.5 mM, of diamide was tested on growth of WT and mutant strains at 30°C. The increasing concentrations of diamide increased the lag time for WT growth but had no significant impact of the specific growth rate (Table 2 and Fig. 3A). The *ΔcshA*, *ΔcshB* and *ΔcshC* strains needed more time to start growing with the increase of diamide concentration (Table 2). The Ttd of *ΔcshA*, *ΔcshB* and *ΔcshC* were significantly higher than WT for 0.5, 0.8 and 1.0 mM diamide but not for higher concentrations (Table 2), while *ΔcshD* and *ΔcshE* Ttd values were not modified at all (not shown). Whatever the concentration of diamide, *ΔcshA*, *ΔcshB* and *ΔcshC* had a significantly lower μ_{max} than the WT (Fig. 3A) while *ΔcshD* and *ΔcshE* grew similarly as the WT. When tested at 37°C, the Ttd of *ΔcshA* was similar to that of the WT, except at the concentration of 0.8 mM (Table 3). The growth rate of *ΔcshA* was similar to that of the WT for 0.5 mM, 0.8 mM, 1.0 mM diamide but was significantly lower at 1.3 and 1.5 mM diamide (Fig. 3B).

Table 3. Time to detection (Ttd) of WT and *ΔcshA* according to diamide concentration at 37°C

Ttd (h)	H2O2 concentration		Diamide concentration				
	4.5 mM	8.1 mM	0,5 mM	0,8 mM	1 mM	1,3 mM	1,5 mM
WT	9.2±0.3	ND ^C	0.9 ^a ±0.2	1.6 ±0.4	2.7 ±0.2	4.4 ±0.6	5.9 ±0.3
<i>ΔcshA</i>	10.2 [*] ±0.7	ND ^C	1.2 ±0.4	2.1 [*] ±0.5	2.7 ±0.4	4.6 ±1.2	4.4 ±2.6

^a, see legend of Table 1

A



B

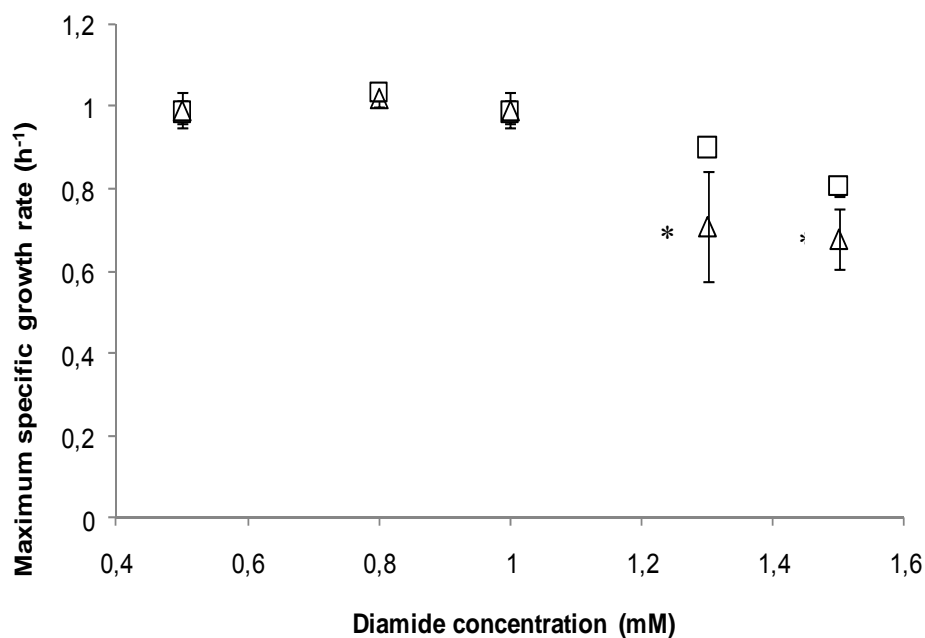


Fig. 3. Effect of diamide concentration on the growth rate of *B. cereus* ATCC 14579 (□), $\Delta cshA$ (△), $\Delta cshB$ (○), $\Delta cshC$ (■) mutant strains, in LB-broth at 30°C (A) and at 37°C (B) for WT strain (□) and $\Delta cshA$ (△). Values are the mean of six values from two independent cultures, error bars indicate SD (*) indicates a significant variation of the μ_{max} value compare to WT. μ_{max} of $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ were never statistically different compared to the WT μ_{max} and were not represented

Growth of *csh* mutants in acid or basic conditions

Growth of WT and the five *csh* mutant strains were studied at 30°C at pH 5.0, pH 7.0 and pH 8.5. Acid conditions increased the lag time of the WT, if compared to neutral pH and the Ttd of $\Delta cshA$ and $\Delta cshC$, respectively 4.1 h and 3.8 h, were twice higher than the WT (Table 4).

Table 4. Time to detection (Ttd) of *B. cereus* ATCC 14579 and of its RNA helicase isogenic mutants according to pH values at 30°C

Ttd (h)	pH		
	5.0	7.0	8.5
Strains			
WT	2.6 ^a ±0.4	0.7 ±0.3	1.0 ±0.1
$\Delta cshA$	4.1* ±0.4	0.9 ±0.4	1.2 ±0.1
$\Delta cshB$	2.2 ±0.3	0.8 ±0.4	1.0 ±0.1
$\Delta cshC$	3.8* ±0.5	0.8 ±0.3	1.3 ±0.1

^a see legend of Table 1. Ttd values of $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ were not statistically different compared to that of the WT and were not listed in this table

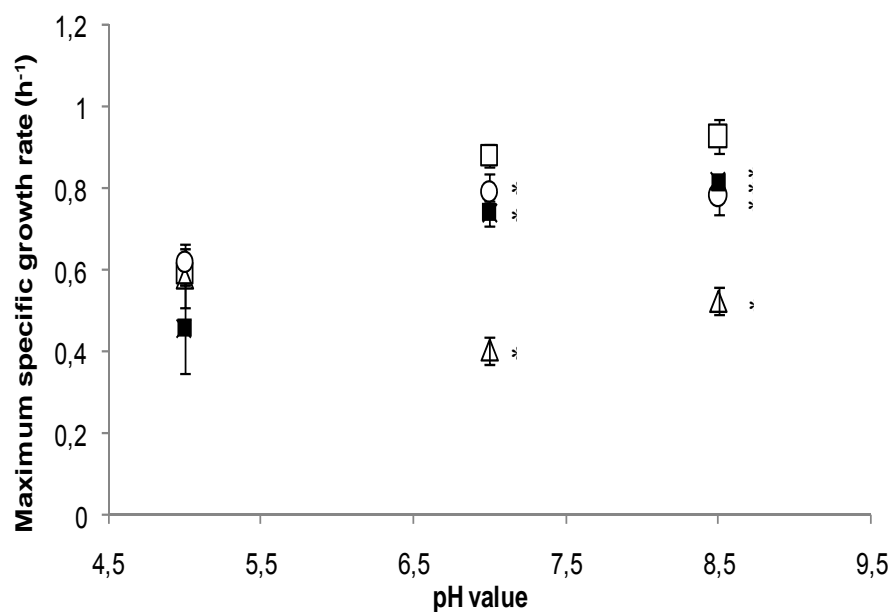
At pH 5.0, all the mutants exhibited a specific maximum growth rate between similar to that of the WT (Fig 4A). The Ttd of the five mutant strains were not affected compared to the WT at pH 8.5 (Table 4) but the μ_{max} of all mutants, except $\Delta cshE$, were negatively affected (Fig 4A). At 37°C, the negative effect of acid pH on $\Delta cshA$ lag time was still observed as well as an effect of basic pH, not observed at 30°C (Table 5). $\Delta cshA$ μ_{max} at 37°C was significantly lower than the WT, but the difference was reduced compared to 30°C (Fig 4B). Growth parameters of $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ mutants were not affected by any of the pH conditions tested (not shown).

Table 5. Time to detection (Ttd) of Time to detection (Ttd) of WT and $\Delta cshA$ according to pH values at 37°C

Ttd (h)	pH		
	5.0	7.0	8.5
Strains			
WT	1.7 ^a ±0.2	1.1 ±0.1	0.4 ±0.1
$\Delta cshA$	2.6* ±0.3	0.9* ±0.1	0.7* ±0.1

^a see legend of Table 1.

A



B

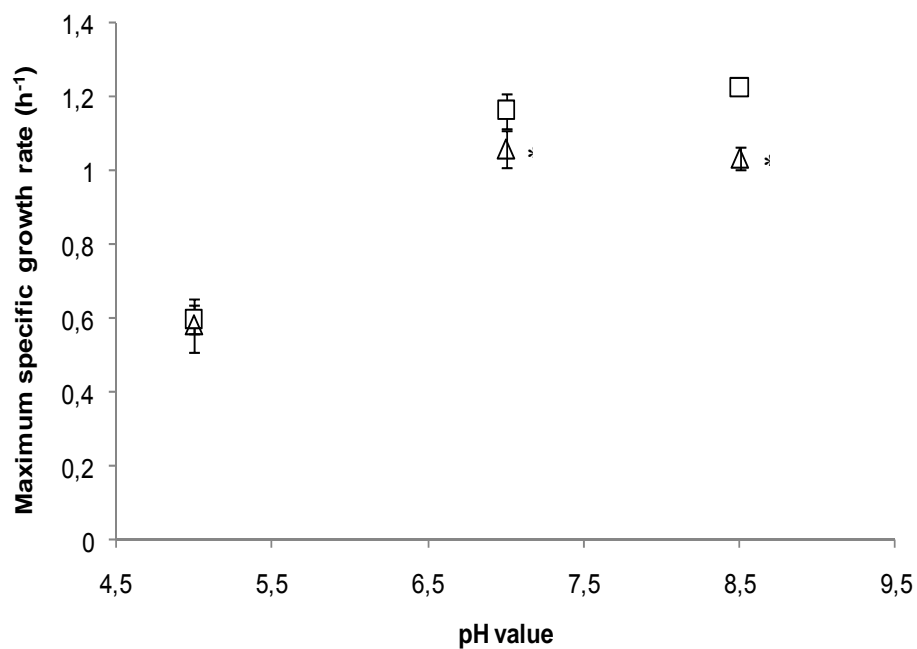


Fig. 4. Effect of pH on the growth rate of *B. cereus* ATCC 14579 (□), $\Delta cshA$ (Δ), $\Delta cshB$ (○), $\Delta cshC$ (■) mutant strains in LB-broth at 30°C (A) and at 37°C (B) for WT strain (□) and $\Delta cshA$ (Δ). Values are the mean of six values from two independent cultures, error bars indicate SD (*) indicates a significant variation of the μ_{max} value compare to WT. $\Delta cshD$ and $\Delta cshE$ μ_{max} were never statistically different compared to the WT μ_{max} and were not represented.

Discussion

Responses of *B. cereus* ATCC 14579 RNA helicase mutants strains exposed to temperature, oxidative and pH stress were compared to that of the wild-type. The RNA helicase CshA was involved in the capacity of *B. cereus* to grow at temperatures between 12°C to 42°C, as both μ_{max} and Ttd parameters were affected in $\Delta cshA$ strain. Growth parameters of $\Delta cshA$ were closer to that of the WT at 37°C than at 30°C and response of this strain to oxydative and pH stress conditions should be considered at 37°C, instead of 30°C as for the other mutant strains. CshA was presumably not involved in a specific response to diamide oxidative stress but was required for *B. cereus* adaptation to H₂O₂ stress. Growth in acid condition led to a serious decreased of the μ_{max} and the Ttd of the WT strain, suggesting a stress condition for *B. cereus* but no additional effect was observed on $\Delta cshA$ growth at 37°C. At pH 8.5, WT strain growth was similar to pH 7.0 and basic pH was not a stress condition for *B. cereus* while this condition significantly affected $\Delta cshA$ growth at 37°C. As a consequence, CshA was involved in temperature mainly and pH adaptation.

The absence of RNA helicase CshB impacted on the specific maximum growth rate at all the tested temperatures, except at 30°C, but Ttd of this mutant was only lower than WT at 45°C. This RNA helicase had a role at both sides of the optimal temperature. Actually, CshB was involved both in the adaptation and growth of *B. cereus* exposed to H₂O₂ and diamide stress and the absence of CshB impacted on the μ_{max} value at basic pH. CshB seems to be required for maintaining growth of *B. cereus* cells exposed to temperature, oxidative and pH stress. However, its involvement during the adaptation phase seems to be more specific to the oxidative and temperature stresses.

The RNA helicase CshC exhibited more specificity for cold growth and adaptation than CshA and CshB. However, it appeared that CshC was also involved in *B. cereus* adaptation and growth during H₂O₂ stress, especially at high concentration. CshC was

required during adaptation to acid conditions and also for maintaining an optimal growth rate during basic growth conditions.

In this study, we showed that the RNA helicases CshD and CshE played no significant role in the adaptation to low and high growth temperature, pH and oxidative stress conditions tested.

These stressful conditions revealed that CshA, CshB and CshC are all three required for *B. cereus* growth at low temperature, probably by different mechanisms. Indeed, previous experiments of cross complementation of $\Delta cshB$ and $\Delta cshC$ strains with a *cshA*-copy *in trans* showed that the overexpression of *cshA* was able to restore the WT phenotype in $\Delta cshB$ but not in $\Delta cshC$ at low temperature (Pandiani *et al.*, 2010). These experiments suggest that CshA and CshB could have overlapping functions and are consistent with a similar thermal requirement of CshA and CshB. CshC may have complementary functionalities of CshA. CshC is the only RNA helicase acting specifically during cold acclimation and may act differently. Because of its involvement whatever the tested temperature, CshA may have a major role in cold stress coping and an important role as an essential protein for *B. cereus* growth.

RNA helicase requirement for *B. cereus* growth at different temperatures contrasted with *B. subtilis* as the deletion of the *cshA* or *cshB* genes did not reduce growth rate of these bacteria at 15°C (Hunger *et al.*, 2006). In *E. coli*, the deletion of CsdA or SrmB RNA helicases led to a cold sensitive phenotype at 20°C (Charollais *et al.*, 2003; Charollais *et al.*, 2004). Some RNA helicases of *B. cereus* are required for adaptation (increase of Ttd in the mutant), and for maintaining of an optimal growth rate in the stressful conditions (lower μ_{max} in the mutant).

It seems that CshA, CshB and CshC could have distinct role during growth with H₂O₂. Hydrogen peroxide is known as an oxygen reactive molecule that could damaged biological

target by leading the rupture of molecular bound and then modifying their conformations and functions. Role of RNA helicases during H₂O₂ stress was not investigated so far but it has been shown that this compound leads to the dissociation of ribosomes in 30S and 50S subunits (Nakamura and Tamaoki, 1968). Modifications of ribosomes properties or ribosomes folding could explain why RNA helicases seem to be essential for the adaptation to hydrogen peroxide stress. Diamide is responsible of S-thiolation that could modify the activities of some proteins. Involvement of RNA helicases in this kind of stress could be due to the probable alteration of RNA by oxidative agents, as it was previously described for the probable alteration of proteins which belongs to ribosomes by disulphide stresses and also by the modification of the activities of many enzymes (Leichert *et al.*, 2003). In these cases, RNA helicases have a function of RNA chaperones in order to restore functionalities of RNA molecules. CshB and CshC are required for optimal growth in both oxidative and cold conditions. Oxidative compound could also prevent the action of enzymes which are involved in the modification of fatty acid. These modification are required during cold adaptation and that could partially explain the connection between this two stresses (Zuber, 2009).

It is known that in alkaline conditions, the 2'OH function could lose an H⁺ that leads to a nucleophilic attack of the 2'O⁻ on the phosphor bonds. This reaction gives a cyclic formation that could trigger RNA hydrolysis (Li and Breaker, 1999). Moreover, basic conditions could modify mRNA and rRNA conformations leading to a loss of functionality, consequently requiring the action of RNA helicases. In acid conditions, RNA are protected from degradation and RNA helicases are probably not required.

We studied for the first time the respective involvement of all the RNA helicases, present in *B. cereus* ATCC14579 genome, in the adaptation to abiotic stressful conditions. Contributions of CshA, CshB and CshC RNA helicases in growth of *B. cereus* in stress conditions are not equal and CshD and CshE are not involved in adaptation to the abiotic stress tested here. The

exact function of these two RNA helicases in *B. cereus* is still unknown. Actually, CshA acts mainly in temperature adaptation and its function is more and more important as the temperature decreased from 30°C to be essential at 12°C. CshA could also have a minor role during adaptation to oxidative and basic pH stress. CshB and CshC are clearly involved in growth and adaptation in stress conditions, including cold temperature and seem to be a part of a general stress pathway response.

Acknowledgements

We thank Isabelle Iost and A. J. Carpousis for helpful discussions. Financial support of FP PhD is from INRA and Regional Council *Provence Alpes Côte d'Azur*. This work was supported by *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) (France) under the ANR-05-PNRA-013 *B. cereus* contract.

References

1. **Augustin, J. C., L. Rosso & V. Carlier**, (1999) Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements. *Journal of Microbiological Methods* **38**: 137-146.
2. **Briolat, V. & G. Reysset**, (2002) Identification of the *Clostridium perfringens* genes involved in the adaptive response to oxidative stress. *Journal of Bacteriology* **184**: 2333-2343.
3. **Broussolle, V., F. Pandiani, N. Haddad, C. Michaud, C. Carlin, C. NguyenThe & J. Brillard**, (2010) Insertional mutagenesis reveals genes involved in *Bacillus cereus* ATCC 14579 growth at low temperature. *FEMS Microbiology Letters* **306**: 177-183.
4. **Carpousis, A. J.**, (2007) The RNA Degradosome of *Escherichia coli*: An mRNA-Degrading Machine Assembled on RNase E. *Annu Rev Microbiol* **61**: 71-87.
5. **Chamot, D., K. R. Colvin, S. L. Kujat-Choy & G. W. Owttrim**, (2005) RNA structural rearrangement via unwinding and annealing by the cyanobacterial RNA helicase, CrhR. *J. Biol. Chem.* **280**: 2036-2044.
6. **Charollais, J., M. Dreyfus & I. Iost**, (2004) CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Res* **32**: 2751-2759.

7. **Charollais, J., D. Pflieger, J. Vinh, M. Dreyfus & I. Iost**, (2003) The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherishia coli*. *Molecular Microbiology* **48**: 1253-1265.
8. **Cordin, O., J. Banroques, N. K. Tanner & P. Linder**, (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* **367**: 17-37.
9. **Hunger, K., C. L. Beckering, F. Wiegeshoff, P. L. Graumann & M. A. Marahiel**, (2006) Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **188**: 240-248.
10. **Jones, P. G., M. Mitta, Y. Kim, W. N. Jiang & M. Inouye**, (1996) Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherishia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 76-80.
11. **Kujat, S. L. & G. W. Owttrim**, (2000) Redox-regulated RNA helicase expression. *Plant Physiology* **124**: 703-713.
12. **Leichert, L. I. O., C. Scharf & M. Hecker**, (2003) Global characterization of disulfide stress in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **185**: 1967-1975.
13. **Li, Y. & R. R. Breaker**, (1999) Kinetics of RNA Degradation by Specific Base Catalysis of Transesterification Involving the 2'-Hydroxyl Group. *Journal of the American Chemical Society* **121**: 5364-5372.
14. **Linder, P.**, (2006) Dead-box proteins: a family affair - active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res* **34**: 4168-4180.
15. **Nakamura, K. & T. Tamaoki**, (1968) Reversible dissociation of *Escherishia coli* ribosomes by hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* **161**: 368-376.
16. **Owttrim, G. W.**, (2006) RNA helicases and abiotic stress. *Nucleic Acids Res* **34**: 3220-3230.
17. **Pandiani, F., J. Brillard, I. Bornard, C. Michaud, S. Chamot, C. Nguyen-the & V. Broussolle**, (2010) Differential Involvement of the Five RNA Helicases in Adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to Low Growth Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 6692-6697.
18. Regonesi, M. E., M. Del Favero, F. Basilico, F. Briani, L. Benazzi, P. Tortora, P. Mauri & G. Deho, (2006) Analysis of the *Escherishia coli* RNA degradosome composition by a proteomic approach. *Biochimie* **88**: 151-161.
19. **Story, R. M., H. Li & J. N. Abelson**, (2001) Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 1465-1470.
20. **Tanner, N. K. & P. Linder**, (2001) DExD/H box RNA helicases: From generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell* **8**: 251-262.

21. **Valdez, B. C., D. Henning, K. Perumal & H. Busch**, (1997) RNA-unwinding and RNA-folding activities of RNA helicase II Gu - Two activities in separate domains of the same protein. *European Journal of Biochemistry* **250**: 800-807.
22. **Vinnemeier, J. & M. Hagemann**, (1999) Identification of salt-regulated genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803 by subtractive RNA hybridization. *Archives of Microbiology* **172**: 377-386.
23. **Worrall, J. A. R., M. Gorna, N. T. Crump, L. G. Phillips, A. C. Tuck, A. J. Price, V. N. Bavro & B. F. Luisi**, (2008) Reconstitution and analysis of the multienzyme *Escherishia coli* RNA degradosome. *Journal of Molecular Biology* **382**: 870-883.
24. **Zuber, P.**, (2009) Management of Oxidative Stress in *Bacillus*. *Annual Review of Microbiology* **63**: 575-597.
25. **Zwietering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts & K. Vantriet**, (1990) Modeling of the bacterial-growth curve. *Appl Environ Microbiol.* **56**: 1875-1881.

Chapitre 4 : L'hélicase à ARN CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr à basse température.

1. Introduction à l'étude

La dynamique d'expression des gènes est l'un des paramètres les plus importants permettant l'adaptation des bactéries à des environnements stressants (Arraiano *et al.*, 2010). Les ARN sont traduits en protéines par un assemblage d'ARNr, les ribosomes. De plus, la plupart des ARNm est rapidement dégradée après leur synthèse pour permettre l'adaptation aux variations brutales d'environnements (Marcaida *et al.*, 2006). La fonctionnalité des ARN dépend principalement de leurs structures secondaires et tertiaires. Dans la nature, les bactéries sont soumises à de nombreux stress pouvant affecter les capacités de croissance des bactéries. Parmi ces stress, le froid est capable de modifier la structuration des ARN en stabilisant des structures secondaires inappropriées. Ces modifications pourront empêcher l'initiation de la traduction et donc entraîner une perte de fonctions de ces ARN (Owtrrim, 2006). Pour éviter cela, les bactéries possèdent un certain nombre de facteurs impliqués dans la restauration ou le maintien de la fonctionnalité des ARN, dont les hélicases à ARN semblent être l'un de ces facteurs principaux.

La plupart des hélicases à ARN appartient à la famille des protéines à boîte DEAD et sont regroupées au sein de la superfamille 2 des hélicases. Les gènes codant ces hélicases à ARN sont retrouvés au sein des génomes procaryotes, eucaryotes ou bien de virus (Cordin *et al.*, 2006). Ces hélicases semblent avoir un rôle important dans tous les processus impliquant les ARN, tels que la synthèse et la maturation des ARN mais aussi leur transport et leur dégradation (Regonesi *et al.*, 2006; Carpousis, 2007; Worrall *et al.*, 2008) ou bien encore l'initiation de la traduction (Hunger *et al.*, 2006) et la biogenèse des ribosomes (Tanner and Linder, 2001; Regonesi *et al.*, 2006). Il a été démontré *in vitro* que les hélicases à ARN sont capables de dérouler des ARN double brin de quelques nucléotides. Ces hélicases sont également capables de déplacer les protéines interagissant avec les ARN, appelées Ribonucleoprotein (RNP), ainsi que dans le repliement des ARN. *In vitro*, les hélicases à ARN sont capables de catalyser l'association d'ARN simples brin complémentaires (Story *et al.*, 2001; Cordin *et al.*, 2006).

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

In vivo, le rôle des hélicases à ARN a été principalement étudié pour leur implication durant la croissance à basse température. Le rôle des hélicases CsdA et SrmB d'*E. coli* dans la biogenèse de la sous-unité 50S des ribosomes a été démontré à 20°C. L'absence de ces 2 hélicases à ARN entraîne un ralentissement de la croissance de ces mutants à 20°C, mais elles ne sont pas indispensables pour permettre la croissance d'*E. coli* à basse température (Charollais *et al.*, 2003; Charollais *et al.*, 2004; Trubetskoy *et al.*, 2009). *B. subtilis* possède 4 hélicases à ARN, dont CshA (homologue de CsdA) qui est impliquée dans un complexe multienzymatique de dégradation des ARN (Lehnik-Habrink *et al.*, 2010). Bien que cette hélicase semble avoir un rôle important, la délétion du gène *cshA* n'altère pas la croissance de *B. subtilis* à 15°C (Hunger *et al.*, 2006). Nous avons démontré que les hélicases à ARN CshA, CshB et CshC de *B. cereus* sont impliquées dans la croissance de ce pathogène alimentaire à 10°C (Broussolle *et al.*, 2010; Pandiani *et al.*, 2010). Parmi ces 3 hélicases à ARN, CshA semble avoir le rôle le plus important dans la capacité d'adaptation thermique, avec un rôle d'autant plus important que la température diminue. CshA de *B. cereus* présente 75% d'identité de sa séquence protéique avec celle de CshA de *B. subtilis* mais semble avoir une fonction beaucoup plus importante à basse température.

Le mutant $\Delta cshA$ est incapable de se multiplier en dessous de 15°C et présente une morphologie d'autant plus modifiée que l'on s'éloigne de la température optimale de croissance. Ces cellules présentent un allongement important à basse température ainsi qu'une incapacité à se diviser. Le taux de croissance ralenti, associé à une incapacité du mutant $\Delta cshA$ à se diviser, pourraient indiquer un rôle de CshA dans le maintien d'une traduction efficace à basse température. Les travaux présentés dans ce chapitre ont eu pour but de répondre aux questions suivantes :

- **CshA participe-t-elle au maintien d'une traduction active à basse température ?**

- **Si oui, quel est son rôle exact ? Agit-elle au sein d'un interactome ?**

2. Stratégie envisagée

a. Analyse de profils ribosomiques et localisation de CshA

L'implication probable de CshA dans la traduction à basse température nous a conduit à étudier la composition des ribosomes des cellules de *B. cereus*. Ainsi, nous avons extrait, par une lyse ménagée, les acides nucléiques et les protéines de cellules de la souche sauvage, du mutant $\Delta cshA$ et du mutant complémenté $\Delta cshA\Omega cshA$ après croissance à 15°C. Ces extraits ont été fractionnés en fonction de leur densité sur des gradients continus de sucrose de 10% à 40% par centrifugation à 206 000g pendant 3 h. Le résultat de la séparation des différentes particules a été révélé par lecture continue à 254 nm des différentes zones du gradient avec un détecteur ISCO UA-6. Cette technique permet d'obtenir la séparation de chacune des sous unités ribosomales ainsi que des ribosomes et polysomes en fonction de leur densité. Des fractions correspondant à chaque particule ribosomale de la souche sauvage ont été recueillies et les protéines ont été précipitées au TCA. La présence de CshA au sein de ces fractions a été révélée par immuno-détection à l'aide d'anticorps dirigés contre CshA de *B. subtilis*.

b. Détermination de la qualité des ARN extraits

Pour déterminer si la délétion de *cshA* entraîne une dégradation des ARN, les cellules de la souche sauvage, du mutant $\Delta cshA$ et du mutant complémenté $\Delta cshA\Omega cshA$ après croissance à 15°C, ont été lysées selon le protocole utilisé pour l'obtention des profils ribosomiques. Ces extraits ont été analysés par migration électrophorétique sur puce RNA Nano Chip à l'aide d'un bio-analyser Agilent. Cette technique, qui repose sur une électrophorèse en capillaire et sur le temps de détection de fluorescence, permet de séparer les ARN en fonction de leur taille, de déterminer les quantités d'ARN déposés et leur qualité en déterminant un RIN (RNA Integrity Number). Cette valeur prend en compte la qualité des ARNr 16S et 23S, ainsi que leurs proportions respectives.

c. Identification des partenaires protéiques de CshA

Cette approche a été entreprise afin de pouvoir déterminer les mécanismes impliquant CshA par l'identification de ses partenaires directs et indirects. Pour cela, nous avons fusionné le gène *cshA* avec une étiquette placée en 3' et comprenant de 5' en 3' un motif de liaison à la calmoduline ou CBP, un site de clivage à la protéase TEV et enfin un motif protéine A de liaison aux IgG, puis cette construction a été insérée dans le vecteur plasmidique pHT304 et introduite dans le mutant $\Delta cshA$. La croissance de cette souche complémentée à basse température a été suivie, afin de vérifier que la complémentation était fonctionnelle et restaurait le phénotype de croissance sauvage. L'identification des partenaires protéiques de CshA s'est déroulée en deux étapes par Tandem Affinity purification Tag (TAP-Tag) (Puig *et al.*, 2001). Tout d'abord, les cellules cultivées à 20°C et 37°C ont été lysées puis ces extraits ont été incubés avec des billes liées à des anticorps anti IgG fixés sur une colonne de chromatographie et permettant une fixation à la protéine A. Ainsi, la protéine CshA taguée, ainsi que ses partenaires ont été spécifiquement retenus par la colonne alors que les protéines ne contenant pas le motif protéine A ont été éluées au cours des différents lavages. Le complexe contenant CshA a ensuite été clivé des IgG par une digestion à la protéase TEV et cet éluât incubé sur une colonne contenant des billes de sépharose associée à de la calmoduline. Les protéines, ne possédant pas le motif CBP et les protéines n'ayant pas d'interaction spécifique avec CshA ou l'un de ses partenaires, ont été éluées au cours des différents lavages tandis que CshA et ses partenaires étaient éluées par chélation des ions Mg^{2+} .

Les protéines éluées ont été séparées par migration électrophorétique en condition dénaturante sur gel de polyacrylamide. Après découpe des profils protéiques obtenus dans les deux conditions de température, les protéines ont été identifiées par analyse en spectrométrie de masse LC MS/MS. La souche sauvage cultivée aux mêmes températures a été utilisée afin de contrôler d'éventuelles interactions aspécifiques au cours des étapes de purification.

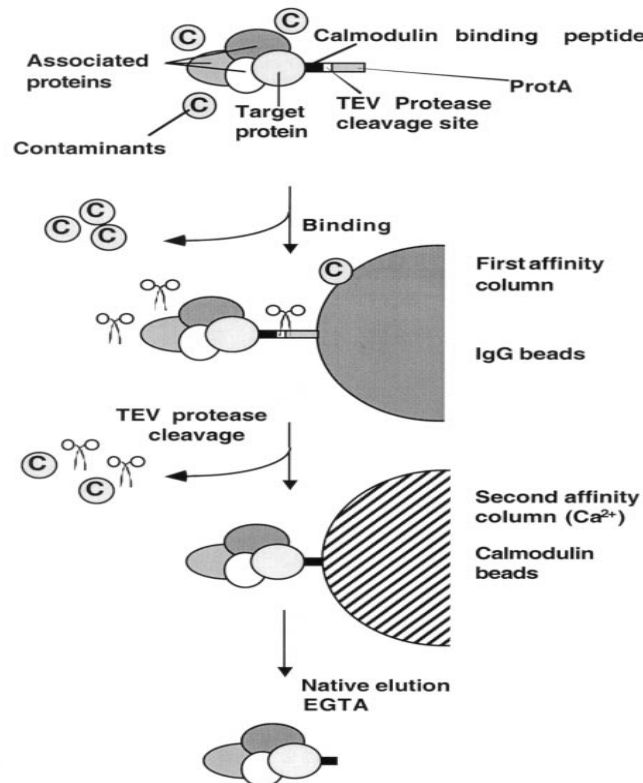


Schéma explicatif de la méthode de Tandem Affinity Purification (d'après (Puig *et al.*, 2001))

3. Résultats et discussion

A 15°C, les particules ribosomales de la souche sauvage sont majoritairement retrouvées sous la forme de ribosomes libres 70S et les particules 30S sont plus abondantes que les 50S. CshA colocalise avec la particule 30S. Dans les mêmes conditions expérimentales, nous n'avons pas obtenu de profil pour le mutant $\Delta cshA$, et un profil comparable à la souche sauvage pour le mutant $\Delta cshA$ complémenté mais avec une sédimentation de la particule 30S plus précoce, ce qui suggère une différence de taille de la particule. L'étude de la qualité des ARN a montré que les ARNr 16S en particulier du mutant $\Delta cshA$ étaient dégradés à 15°C, alors qu'ils étaient intacts à 37°C. Dans le mutant complémenté, il existe une dégradation de la particule 23S qui a une taille inférieure à celle de la souche sauvage, alors que la particule 16S est intacte à 15°C et que ces deux particules sont identiques à la souche sauvage à 37°C. L'identification des partenaires protéiques a montré que CshA interagit majoritairement avec des protéines ribosomales composant les sous unités 30S et 50S, avec les éléments constitutifs du ribosome, tels que les facteurs d'initiation de la traduction ou d'élongation.

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

CshA jouerait un rôle essentiel dans la biogenèse de la sous unité 30S et du ribosome plus globalement à basse température. Des travaux ont montré que CshA de *B. subtilis* est également colocalisée avec la sous unité 50S, et interagirait d'autre part avec certaines au sein d'un complexe multienzymatique de dégradation des ARN (Lehnik-Habrink *et al.*, 2010). L'identification des protéines partenaires de CshA de *B. cereus* confirme l'interaction de cette hélicase à ARN avec les ribosomes. CshA interagit également avec d'autres protéines n'interagissant pas a priori au sein des ribosomes. Parmi ces partenaires sont retrouvées des protéines telles que des enzymes glycolytiques, l'exoribonucléase II dont le rôle dans la dégradation des ARNm a été démontré (Carpousis, 2002), ainsi que l'hélicase à ARN CshB. L'identification de ces partenaires protéiques **suggère** un rôle supplémentaire pour CshA. En effet CshA pourrait en interagissant avec ses partenaires participer à la dégradation des ARNm comme cela a pu être montré pour CshA de *B. subtilis*. (Lehnik-Habrink *et al.*, 2010). Nous avons identifié les partenaires protéiques directs et/ ou indirects de CshA, mais ces interactions, qui doivent être confirmées, ne nous permettent pas encore d'affirmer l'existence d'un complexe de dégradation de ARN chez *B. cereus*, tel que décrit chez *B. subtilis* ou *E. coli* (Carpousis, 2007; Lehnik-Habrink *et al.*, 2010).

CshA est colocalisée dans le ribosome où elle jouerait un rôle essentiel dans sa biogenèse et dans la régulation de la maturation des précurseurs d'ARNr

CshA pourrait être impliquée dans une fonction supplémentaire de dégradation des ARNm.

4. The DEAD-box RNA helicase CshA of *Bacillus cereus* ATCC 14579 is associated to ribosomes and essential for RNA stability at low temperature

Franck Pandiani ^{1,2}, Isabelle Iost ³, Bénédicte Doublet ^{1,2}, Julien Brillard ^{1,2}, A. J. Carpousis ⁴, Christophe Nguyen-the ^{1,2} and Véronique Broussolle ^{1,2*}

Manuscrit en préparation

¹INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

²Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

³Université Victor Segalen Bordeaux II INSERM U869 146 Rue Léo Saignat 33076 Bordeaux Cedex, France

⁴Université Paul Sabatier, CNRS-LMGM 118, route de Narbonne 31062 Toulouse cedex 9, FRANCE

* Corresponding author: INRA, UMR408, site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France.

E-mail: broussol@avignon.inra.fr; Tel: (33) (0) 432 72 25 18. Fax: (33) (0) 432 72 24 92

Running title: DEAD-box RNA helicase CshA

keywords: *Bacillus cereus*, low temperature, ribosomes

Abstract

RNA helicase CshA is essential for growth of *B. cereus* ATCC 14579 at low temperature. Null mutant of *cshA* exhibits a slower growth than the wild-type at 15°C and an elongated shape associated with a division failure. Based on these data, we assumed the role of CshA during translation at low temperature and we showed that CshA is mostly associated with ribosomal particles and most specifically with the 30S small ribosomal particles and that the absence of CshA leads to a major modification of the polysome profile at 15°C. These modifications are the consequence of the huge 16S rRNA degradation observed in $\Delta cshA$ cells at low temperature. The overexpression of *cshA* in the complemented mutant had also a moderate negative effect on ribosome biogenesis and caused partial rRNA precursors accumulation and decay. Analysis of proteins interacting with CshA also revealed a major association with ribosomal proteins but also an association with non ribosomal particles, such as glycolytic enzymes, exoribonuclease II and with the RNA helicase CshB that could suggests another role of CshA probably in the regulation of the mRNA decay in association with its partners at low temperature.

Material and methods

Strains and growth conditions

B. cereus ATCC 14579 cells (WT) (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA), $\Delta cshA$, $\Delta cshA\Omega csh$, $\Delta cshA\Omega cshA$ -Tag mutant cells and *E. coli* cells (Table 1) were routinely grown in Luria-Bertani broth (LB) medium with vigorous agitation at the appropriate temperature. *E. coli* SCS110 (Invitrogen) was used as transformation host for all plasmidic constructions to generate unmethylated plasmid DNA prior to *B. cereus* transformation. When required, the antibiotic concentrations used for bacterial selection were: ampicillin at 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *E. coli* and erythromycin at 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for *B. cereus*.

Table 1: Strains used in this work

Strains	Relevant genotype	Source
<i>B. cereus</i> ATCC14579		Laboratory collection
<i>B. cereus</i> $\Delta cshA$	ATCC 14579 <i>BC0259</i> Δ <i>452-993</i>	(Pandiani <i>et al.</i> , 2010)
<i>B. cereus</i> $\Delta cshA\Omega cshA$	ATCC 14579 <i>BC0259</i> Δ <i>452-993</i> Ω <i>BC0259</i>	(Pandiani <i>et al.</i> , 2010)
<i>B. cereus</i> $\Delta cshA\Omega cshA$ -Tag	ATCC 14579 <i>BC0259</i> Δ <i>452-993</i> Ω <i>BC0259</i> -TAG	This work

DNA manipulation

Plasmid DNA was extracted from *B. cereus* and *E. coli* by a standard alkaline lysis procedure using the Wizard SV miniprep purification system (Promega), with an additional incubation at 37°C for 1 h with 5 mg of lysozyme (14, 300 U. mg^{-1}) for lysis of *B. cereus* cells. Chromosomal DNA was extracted from *B. cereus* cells harvested in mid-log phase as previously described (Guinebretiere *et al.*, 2003). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were used as recommended by the manufacturer (Promega). Oligonucleotide primers were synthesized by Eurogentec. PCR was performed in a GeneAmp PCR system 2400 thermal cycler (Applied Science), using the Expand high fidelity DNA polymerase (Roche Applied Science). Amplified DNA fragments were purified by using the PCR purification Kit (Roche

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

Applied Science) and separated on 0.7% agarose gels after digestion. Digested DNA fragments were extracted from agarose gels using the gel extraction kit Quiaex (Quiagen). All constructions were confirmed by DNA sequencing (Cogenix-Coulter Beckman Genomics). Electroporation to transform *B. cereus* was used as previously described (Mahillon and Lereclus, 2000).

Polysome profile analysis

WT, $\Delta cshA$ and $\Delta cshA\Omega cshA$ cells were grown at 15°C in LB-broth to an OD_{600nm} of 0.6-0.8 unit. Five minutes before harvesting, chloramphenicol was added to a final concentration of 100 mg ml⁻¹. Cells were rapidly cooled, collected by centrifugation at 5,000rpm for 10 min at 4°C and washed with 25ml of buffer A (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60 mM KCl, 10 mM MgCl₂). Cells were washed twice in the same conditions and then the pellets were dried on ice before freezing at - 80 °C. After being slowly thawed on ice, cells were lysed in freshly prepared buffer A with addition of 2 mg.ml⁻¹ lyzosome , 0.5% polyoxyethylene 20 cetyl ether, 0.5% deoxycholic acid and 0.1 unit ml⁻¹ RQ1RNase-free DNase (Promega). The mixture was incubated on ice for 20 min, and the lysate was clarified by centrifugation at 18,000 g for 10 min at 4°C. Analysis of polysome profiles were performed with 20 A_{600nm} units of lysate that were layered onto a 10–40% (w/v) sucrose gradient in buffer B [10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol (DTT)] and centrifuged at 206 000g for 3 h at 4°C in a Beckman SW41 rotor. Gradients were analyzed with an ISCO UA-6 detector with continuous monitoring at 254 nm.

Extraction of ribosomal protein and Western analysis

Fractions of 1.5 ml from sucrose gradients were collected, and proteins were precipitated by the addition of TCA to a final concentration of 12.5% and frozen at - 80°C until use. After thawing the samples on ice, the proteins were pelleted by centrifugation at 13,000 rpm for 45 min at 4°C. Pellets were washed twice with 1 ml of cold acetone and centrifuged at 13,000

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

rpm for 45 min at 4°C and re-suspended in 20 µl of SDS gel loading buffer. Aliquots of 10 ml were loaded on a 12% SDS-polyacrylamide gel and electro transferred onto nitrocellulose membranes using the iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen) according to standard procedure. Membranes were probed with a 1:1,000 dilution of polyclonal antibodies raised against *B. subtilis* CshA. The blotted membranes were developed with a 1:2,000 dilution of peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (Sigma) and an enhanced chemiluminescence substrate (Immobilon Western, Millipore).

Analysis of RNA integrity

Cells of WT, $\Delta cshA$, and $\Delta cshA\Omega cshA$ were grown at 15°C, 30°C and 37°C and lysed in buffer A as described above. The integrity of RNAs was determined by electrophoresis on an RNA 6000 nano Chip using an Agilent Bioanalyzer 2100, according to the manufacturer recommendations (Agilent). RNAs were separated on the basis of their size. Quality of RNAs was assessed by measuring the degradation of 23S and 16S and by quantifying short RNA fragments. The analysis of these parameters plus the relative amount of 23S and 16S gives a datum named RNA Integrity Number (RIN) which could take a value between 0 and 10, from the lowest to the highest quality of RNA, respectively (Schroeder *et al.*, 2006).

TAP-Tag construction

The *cshA*-Tag was constructed by the fusion of two independent PCR fragments carrying the *cshA* ORF plus 440 nt upstream sequences (CompXbaI CGCTCTAGATGAACGTGTAAAGGCGTATG / TapC2R CCATCTTCTCTTTTCCATGGAAGCTTGTGGACGGCTATGATGT) with the TAP tag (TAP5F CAAGCTTCCATGGAAAAGAGAAGATGG / TAP3RGTCGCATGCTCAGGTTGACTTCCCCGCGG). The fused PCR product was cloned into the pHT304 vector (Salamitou *et al.*, 1997) at the XbaI and SphI restriction sites. The pHT304-*cshA*-Tag construction introduced in *E. coli* SCS 110 was verified by sequencing

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

before transformation in *B. cereus*. The functionality of this pHT304-*cshA*-Tag construction was checked by growing at 20°C the $\Delta cshA$ strain transformed with the pHT304-*cshA*-Tag construction in LB- broth and by spotting serial dilutions on LB-agar plates then incubated at 20°C.

TAP Purification

The $\Delta cshA$ pHT304-*cshA*-Tag cells were grown in 2 l of LB broth at 20°C and 37°C until an $OD_{600nm} = 1.0$. Cells were rapidly cooled at 4°C and harvested by centrifugation 20 min at 1,800 g and then resuspended in disruption buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 100mM NaCl, 0.2mM EDTA, 10% glycerol, 0.5mM DTT) and broken with a Fast prep instrument. After clarification, the extract was subjected to the two affinity purification steps performed at 4°C, as described (Puig *et al.*, 2001).

Protein analysis

Proteins from the last TAP purifications were concentrated by TCA precipitation and separated on a 12% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie blue. Each gel sample was divided in 20 bands, cut out and protein contents were analyzed by mass spectrometry (LC-MSMS). Protein identification was performed using the Xtandem software.

Results

CshA is mostly associated to 30S ribosomal particles at low temperature

B. cereus WT and $\Delta cshA$ strains grew similarly on agar media at 37°C (Fig 1). At 15°C, after 4 days, the mutant strain did not form visible colonies, while the WT strain formed similar colonies than overnight at 37°C. Colonies for $\Delta cshA$ were visible only after 6 days. Complementation of the $\Delta cshA$ strain with the pHT304 Ω *cshA*, which carry *cshA* under the control of its own promoter, restored growth at 15°C (Fig 1).

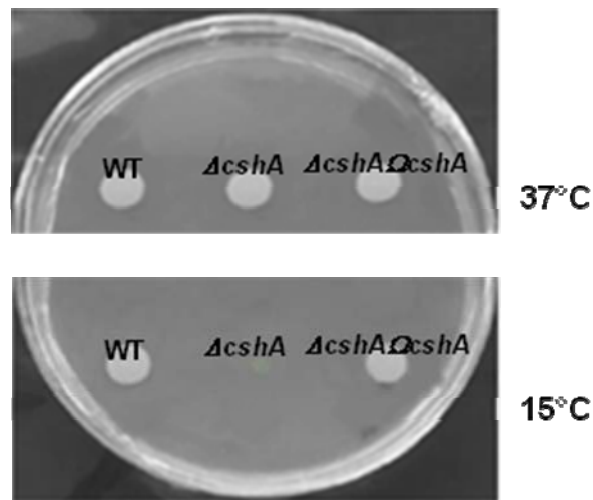


Fig. 1. Growth of *B. cereus* WT, $\Delta cshA$ and $\Delta cshA\Delta cshA$ strains on LB agar plates after overnight at 37°C or a 4 days incubation at 15°C.

Involvement of CshA in translation was investigated at low temperature by studying its possible association with ribosomes, which are one of the most important actors for this function. Polysome profile of the WT strain grown at 15°C revealed that the ribosomal particles were found mainly in 70S ribosomes which correspond to a mix of both free ribosomes or monosomes and polysomes (Fig. 2A). Moreover, free 30S particles were much more abundant than 50S particles. This profile was similar to the polysome profiles of *E. coli* at 20°C (Charollais *et al.*, 2004). CshA was not detected by Western blot in the fraction corresponding to the first peak of the sucrose gradient, which contains the small particles that were unable to sediment during fractionation (Fig. 2B). A signal revealed by anti CshA antibodies was obtained for the fractions corresponding to free 30S particles and to polysomes, and to a less extent to 70S ribosomes. CshA was undetectable in the 50S particle fraction and therefore the detection of CshA in 70S ribosomes and in polysomes was likely due to the concomitant presence of 30S subunits (Fig. 2B). Intensity of CshA detection was less efficient in 70S particles than in 30S and polysomes particles, although red Ponceau staining of total transferred proteins revealed that each fraction contained similar amount of proteins, except the 30S fraction which contains a higher quantity (Fig. 2C).

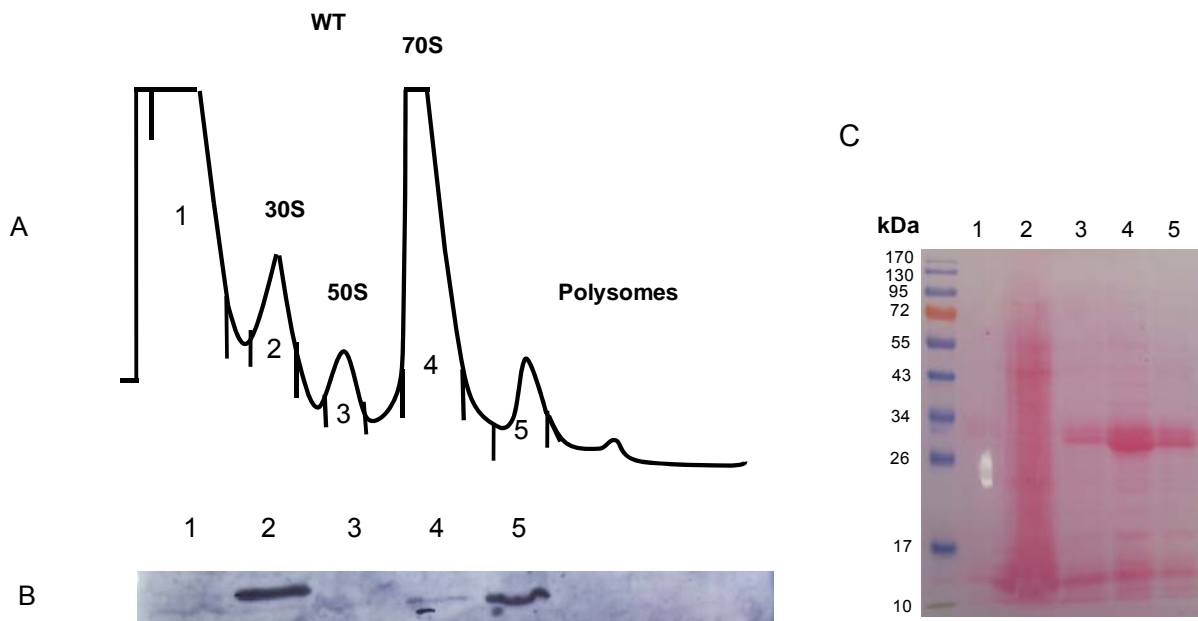


Fig. 2. CshA associates with 30S ribosomal particles in *B. cereus* WT cells. A: sedimentation profile showing the free subunits and 70S ribosomes from WT cells grown at 15°C, B: 10µl of each 1.5 ml- fraction 1 to 5 were subjected to Western-blot probing using *B. subtilis* anti-CshA antibodies, C: Red Ponceau staining of the same Western-blot membrane before probing.

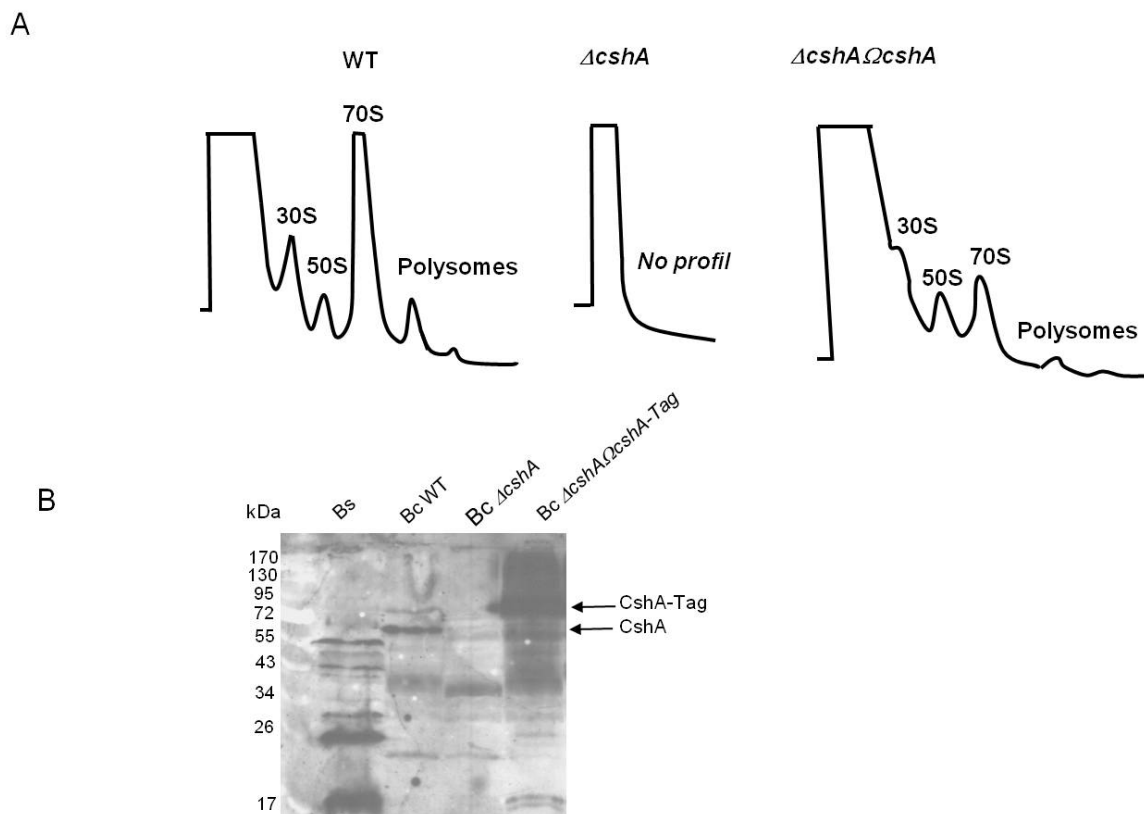
CshA is essential for ribosomes biogenesis at low temperature

We assumed that CshA could play a role in ribosome assembly as associated with 30S particles. To determine if CshA was essential for acquisition and maintain of ribosome conformation, we compared polysome profiles obtained by sucrose gradient sedimentation for the WT, $\Delta cshA$ and $\Delta cshA\Omega_{pHT304-cshA}$ strains grown at 15°C (Fig. 3A). In our conditions, we could not obtain any polysome profile for the $\Delta cshA$ strain despite several attempts, suggesting a strong instability of ribosomes. *In trans* expression of *cshA* in the complemented mutant strain allowed to restore a polysome profile. Yet, there was a significant difference in the sedimentation of the mutant 30S particles compared to the WT. Indeed these particles appeared to sediment at a lighter density than a normal 30S particle, presumably due to a modification of the subunit folding. The relative amount of the 70S ribosomes and polysomes versus 30S and 50S, was clearly lower than for the WT strain. Western blot detection using *B. subtilis* anti-CshA antibodies showed that CshA was produced in larger amount in the

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

complemented strain compared to the WT (due to the presence of *cshA* plasmidic copies), while not detected in $\Delta cshA$ cells (Fig. 3B). The higher amount of CshA in the complemented mutant strain presumably led to a modification of the 30S particle folding which could also explain the reduction in 70S and polysomes observed in Fig. 3A.

Fig. 3. Polysome profiles of total RNA extracted from WT, $\Delta cshA$ and $\Delta cshA\Omega cshA$ strains grown at 15°C and



layed onto 10%-40% sucrose gradients (A), Western-blot with anti-CshA antibodies of *B. subtilis*, *B. cereus* WT, $\Delta cshA$ and $\Delta cshA\Omega cshA$ -Tag extracts (B).

Absence of CshA leads to rRNA degradation at low temperature

Total RNAs were extracted from the WT, $\Delta cshA$ and $\Delta cshA\Omega pHT-cshA$ strains grown at 15°C. RNA integrity was checked by electrophoresis on RNA nano lab chips and RNA quality estimated by the RIN value (see Material and Methods). RNA extracted from WT was of high quality with a RIN of 9.1 (data not shown). Electrophoresis of RNA showed intact bands that corresponds to 23S, 16S and 5S rRNA (Fig. 4A). In contrast, there were no

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

detectable bands for the 16S rRNA after electrophoresis of RNA from $\Delta cshA$ grown at 15°C (Fig. 4A). An increase of small RNAs and a RIN number of 3.5 were observed, which means that RNAs were degraded in absence of CshA. Some bands that could correspond to 23S and 5S RNA precursors were observed for $\Delta cshA$, suggesting that maturation of rRNA could also be affected in absence of CshA (Fig. 4A). The profile corresponding to the rRNA of $\Delta cshA\Omega cshA$ resembled that of the WT except that most of the 23S rRNA was degraded and seems smaller, as shown by differences in bands migration (Fig. 4A). Absence of *cshA* caused an important degradation of RNA and more specifically of rRNA but the higher expression of *cshA* in the complemented mutant led also to modification of rRNA integrity.

Electrophoresis of RNA from $\Delta cshA$ cells grown at 37°C showed a profile similar to that of the WT with no detectable degradation (Fig. 4B) and its integrity was assessed by a RIN of 8.4 close to the value of the WT strain. It is consistent with the fact that $\Delta cshA$ and WT strains grew similarly at this temperature.

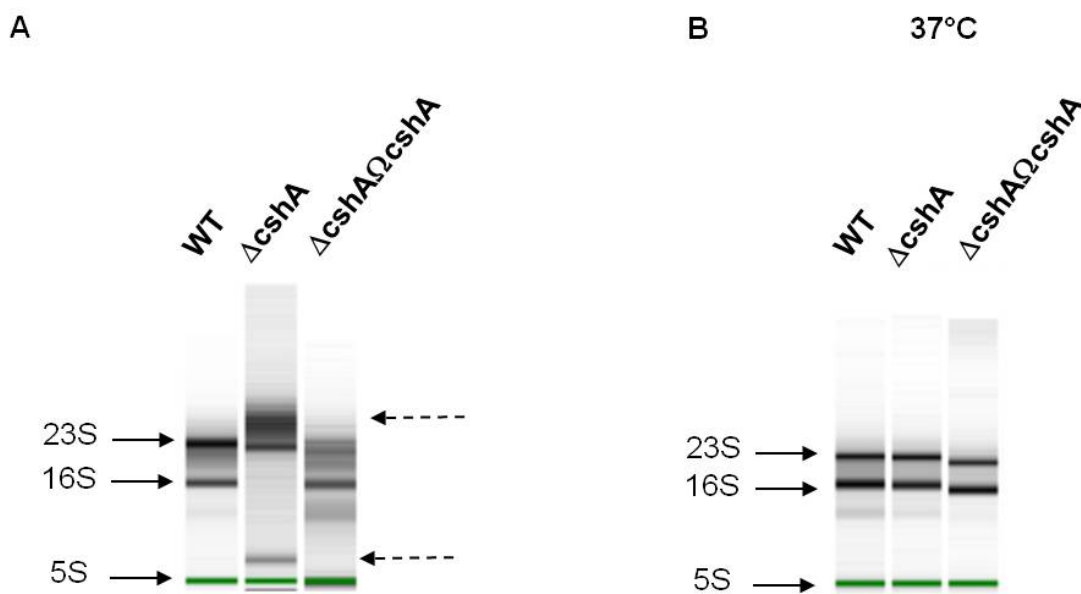


Fig. 4. Total RNA samples extracts from WT, $\Delta cshA$, $\Delta cshA\Omega cshA$ strains grown at 15°C (A) and 37°C (B), run on an Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano LabChip. Dashed arrows indicate rRNA precursors.
CshA potentially interacts mainly with ribosomal proteins.

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

To identify proteins that potentially interact with CshA, we used the TAP-Tag method which allows the purification of protein complexes in native conditions. The pHT304 plasmid, containing *cshA* and its promoter region fused to a calmodulin binding peptide (CBP) and the protein-A tag, was transformed into the $\Delta cshA$ strain. The CshA-TAP was expressed at a high level as confirmed by Western-blot analysis using anti CshA antibodies (Fig. 3B). This construction was functional since it fully corrected the growth defect of $\Delta cshA$ strain at 20°C, whereas the empty plasmid did not. TAP experiments yielded to a profile with 11 major protein bands, including CshA-Tag (72 kDa) which was the most abundant protein (Fig 5A, lane 3).

LC-MSMS performed on the 20 bands excised from the gel led to the identification of 48 proteins, with a number of spectra above 50 that putatively interacted with CshA (Table 2). Most of the bands contained several proteins. CshA interacted mainly with ribosomal proteins since we found 25 ribosomal proteins belonging to the 30S and 50S subunits (Table 2). Moreover, other translation proteins interacted with CshA, such as elongation and initiation factors, the trigger factor and other proteins potentially involved in nucleic acid pathway, such as RNA polymerase and DNA gyrase, as well as the exoribonuclease II, and the RNA helicase CshB (Table 2). We also found interaction of CshA with energetic metabolism enzymes such as aconitate hydratase, enolase, pyruvate dehydrogenase, NADH dehydrogenase and with protein metabolism enzyme, such as the protein translocase and the ClpX ATP dependent protease (Table 2).

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

Table 2. TAP Tag purified proteins identified by mass spectrometry

Prot ID ^a	Protein	Mw ^b (kDa)
Q81J47	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	134,1
Q81J48	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	131,6
Q81AF6	Aconitate hydratase	98,8
Q815L4	Exoribonuclease II	91,9*
Q81JD0	DNA gyrase subunit A	92,4
Q815G7	Protein translocase subunit secA	94,8
Q814C5	Elongation factor G	76,2
Q812X7	Translation initiation factor IF-2	75,6
Q81FE6	Flagellar M-ring protein flIF	58*
Q81IT9	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase CshA-Tag	59,3**
Q812Q9	Trigger factor	47,2
Q819K5	Dihydrolipoamide acetyltransferase	45,8*
Q818H2	ATP-dependent RNA helicase cshB	49,9
Q819K6	Dihydrolipoyl dehydrogenase	49,3
Q815K8	Enolase	46,3
Q81FE1	Flagellar hook protein flgE	46,1
Q817Q2	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpX	46,1
Q814C4	Elongation factor Tu	42,8
Q815S1	NADH dehydrogenase	41,5
Q812X3	Elongation factor Ts	32,4
Q81J39	50S ribosomal protein L2	30,2
Q81FD4	Flagellin	29,3
Q81FD5	Flagellin	29,2
Q819X9	30S ribosomal protein S2	26,5
Q81FD3	Flagellin	26,5
Q81J52	50S ribosomal protein L1	24,6
Q81J42	50S ribosomal protein L3	22,6*
Q81J36	30S ribosomal protein S3	24,2
Q817A4	30S ribosomal protein S4	22,9
Q81J41	50S ribosomal protein L4	22,4
Q81J30	50S ribosomal protein L5	20,1
Q81J27	50S ribosomal protein L6	19,4
Q81J44	30S ribosomal protein S7	17,8
Q81J25	30S ribosomal protein S5	17,6
Q81J13	50S ribosomal protein L13	16,3
Q81J35	50S ribosomal protein L16	16,1
Q81J45	30S ribosomal protein S12	15,4
Q81J23	50S ribosomal protein L15	15,4
Q81J28	30S ribosomal protein S8	14,8
Q81J12	30S ribosomal protein S9	14,4
Q817H7	50S ribosomal protein L20	13,5
Q819W6	50S ribosomal protein L19	13,1
Q81J19	30S ribosomal protein S11	13,7
P62175	30S ribosomal protein S13	13,7
Q81J17	50S ribosomal protein L17	13,4
Q81J32	50S ribosomal protein L14	13
Q81J37	50S ribosomal protein L22	12,5
Q817U2	50S ribosomal protein L21	11,1

*Proteins whose migration did not match with the expected molecular weight

** CshA molecular mass is 59.3 kDa without Tag and 72 kDa with the Tag

^aProt ID is the Swissprot identification number, ^bMW: Theoretical molecular weight

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

Several flagellin proteins with unknown function were also identified as putatively interacting for their interactions with CshA.

WT protein extract without any tagged protein was used as a control of the specific purification of CshA-TAP and its partners. The electrophoresis profile of the WT purification fractions was similar to the different bands obtained when running 100 units of TEV protease (Fig 5B, lane 4). This control indicated that the fixation of CshA-Tap to its partners was specific.

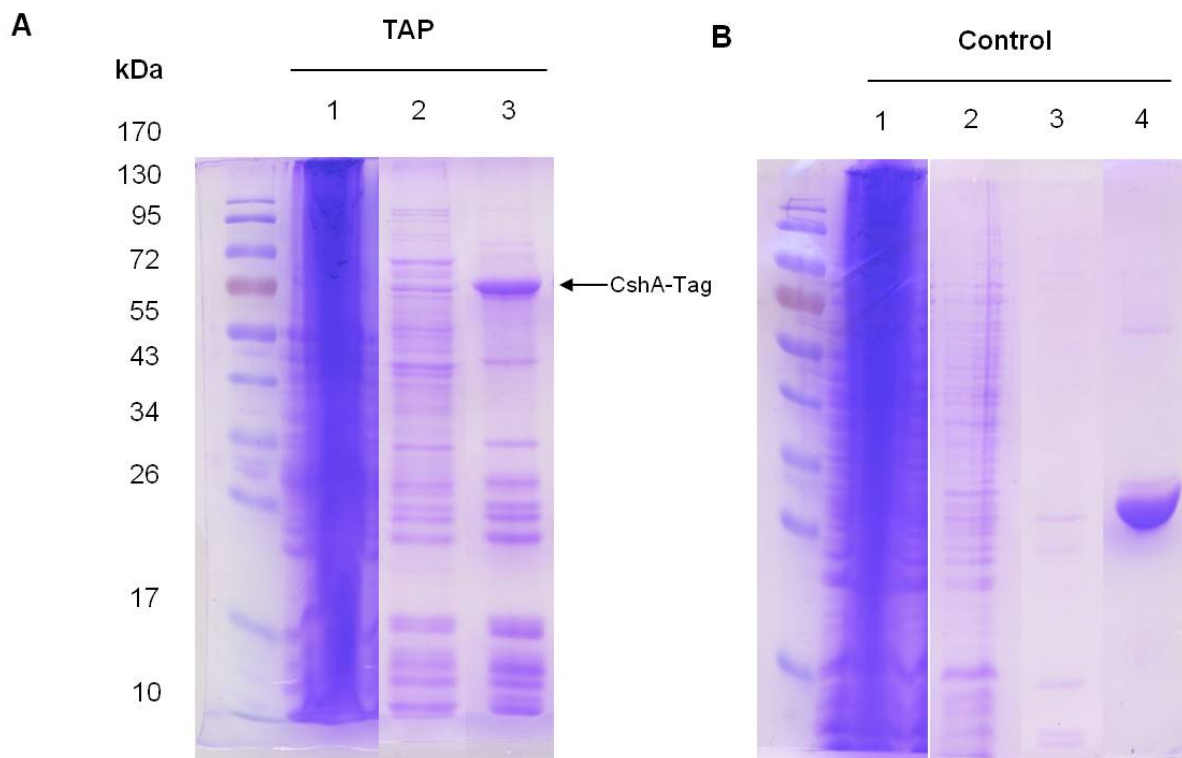


Fig. 5. Identification of CshA partners by TAP-Tag purification. (A) Proteins from crude extract of *B. cereus* $\Delta cshA\Omega pHT304-cshA$ -Tag grown at 20°C (lane 1), from eluate of the first IgG column (lane 2) and from eluate of the calmodulin column were resolved by 12 % SDS- PAGE. (B) Control experiments, WT strain without the pHT304-cshA-Tag plasmid was submitted to the same purification steps (lanes 1 to 3) and run together with 100 units of TEV protease (lane 4).

Discussion

Ribosome profile analysis indicated that CshA co sediment with the 30S particle in the WT. In addition, the identification of the CshA partners showed that CshA interacts at low temperature mainly with the proteins that constitute the ribosomes. In *B. subtilis* CshA (76% of identities with *B. cereus* CshA) was only located with the 50S particles (Ando and Nakamura, 2006) as well as CsdA of *E. coli* (Charollais *et al.*, 2003; Charollais *et al.*, 2004). The location of CsdA with the 50S particle was consistent with its role during ribosome biogenesis at low temperature (Jones *et al.*, 1996; Charollais *et al.*, 2004; Peil *et al.*, 2008). Nevertheless, some experiments showed that CsdA of *E. coli* could be associated with ribosomal proteins of the 30S particles (Moll *et al.*, 2002).

In *B. cereus* $\Delta cshA$ strain, absence of CshA is responsible to a loss of the ribosome stability and a default in rRNA maturation as showed by the impossibility to obtained a polysome profile but also by both the accumulation of rRNA precursor and 16S rRNA degradation. The involvement of RNA helicases in ribosomes biogenesis had already been shown for CsdA and SrmB of *E. coli* which act in the maturation of 50S particles. However, their deletion only caused a modification of the 50S particles and not an instability of the whole ribosome (Charollais *et al.*, 2003; Charollais *et al.*, 2004). In our work, the high expression level of *cshA* in $\Delta cshA\Omega cshA$ strain restored a polysome profile similar to that of the WT, supporting the assumption that ribosome instability was indeed due to the absence of CshA. In addition, the sedimentation coefficient of the 30S-like particles modified in the complemented strain while the 50S particle were not, is consistent with a role of CshA in the conformation of the 30S. Therefore, 50S particles were not detectable at low temperature in $\Delta cshA$ strain which could indicate an indirect involvement of CshA in 50S biogenesis or stability.

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

RNA integrity experiments suggested that the RNA helicase CshA has an additional role in ribosome assembly. Indeed, deletion of *cshA* led to a dramatic degradation of rRNA and particularly of 16S. Maturation of rRNA seems to be affected as precursors of 23S and 5S RNA were observed in the null-mutant strain. Moreover the high expression of *cshA* in the complemented mutant is responsible of an accumulation of rRNA precursors. *In vivo* the 16S rRNA is the precursor of the 30S particles in association with ribosomal proteins and may be the target of CshA, as SrmB specifically target the 23S precursor in *E. coli* (Trubetskoy *et al.*, 2009), explaining the maturation default observed in absence of CshA.

These results are in line with a specific involvement of CshA in 30S biogenesis probably by acting during pre rRNA maturation, and this default of maturation could be responsible for a defect in ribosome assembly that leads the observed instability in absence of CshA. The action of CshA seems to depend on its expression level since rRNA maturation and degradation were affected in $\Delta cshA$ and partially in the complemented strains. It was previously described that the over expression the *E. coli* CsdA led to an increased of RNA degradation (Iost and Dreyfus, 2006). Maturation of rRNA need the action of RNase which act on specific stem that were formed in the pre mRNA (Srivastava and Schlessinger, 1990). RNA helicases are known to modify pre mRNA structures that allow or not the action of RNase. In *E. coli*, the defection of RNase III lead to the absence of 30S particles but 50S particles were detectable (Srivastava and Schlessinger, 1990). In this point of view, CshA could play a major role in ribosome biogenesis by both acting as a RNA chaperon on pre rRNA particles, mainly 16S rRNA, for their maturation and also acting by establishing a functional conformation to ribosomal proteins. These hypothesis are consistent with the helicase and RNP removing activities that were previously described for RNA helicases (Cordin *et al.*, 2006)

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

The reason of the interaction of CshA with energetic metabolism enzymes such as enolase as identified in our experiments, is unknown. However, a recent study showed that the *B. subtilis* RNA helicase CshA could interact with glycolytic enzymes, enolase or phosphofructokinase, and with a ribonuclease in a RNA degradation complex. The ribonuclease II (RNase II) was previously shown as involved in RNA degradation (Cheng and Deutscher, 2002). RNase II is a hydrolytic enzyme producing nucleotide monophosphates and unable to degraded alone long RNA duplexes (Carpousis, 2002; Cheng and Deutscher, 2002). It is possible that this RNase could need the function of RNA helicases to achieve RNA degradation. The RNA helicase CshB was co-eluted with CshA. It was previously shown that the RNA helicases CsdA and RhlB could be co-localized in the *E. coli* degradosome specifically at low temperature (Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004). The interactions of all of these proteins could be argued for an additional role of CshA such as involvement in a RNA degradation pathway.

We showed that RNA helicase CshA participates in ribosome biogenesis and also regulates rRNA maturation and degradation during *B. cereus* growth in cold conditions. The control of ribosome biogenesis and of rRNA quality are both essential to allow cold adaptation of *B. cereus*. Regulation of RNA pathway is indispensable for this bacterium in such a stressful condition and CshA is really essential to ensure this ability to cold adaptation. These two functions seem to depend on the *cshA* expression level. Moreover, the identification of CshA partners suggests a possible involvement of CshA in the mRNA decay. However, these interactions could be direct or indirect and should be further investigated to precise the mechanism of CshA action.

Acknowledgments

Authors thanks Sebastien Catrux UMR DAP 1098 INRA Montpellier for its help in analysis of RNA integrity and Dr Kouji Nakamura from University of Tsukuba, Japan for the gift of *B. subtilis* anti-CshA antiserum. The Mass spectrometry experiments were performed by Céline Henry at PAPSSO INRA, Jouy-en-Josas. Financial support of FP PhD is from INRA and Regional Council *Provence Alpes Côte d'Azur*. This work was supported by *Agence Nationale de la Recherche* (ANR) (France) under the ANR-05-PNRA-013 *B. cereus* contract.

References

1. **Ando, Y. and K. Nakamura** (2006). "*Bacillus subtilis* DEAD protein YdbR possesses ATPase, RNA binding, and RNA unwinding activities." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **70**(7): 1606-1615.
2. **Arraiano, C. M., J. M. Andrade, et al.** (2010). "The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression." *Fems Microbiology Reviews* **34**(5): 883-923.
3. **Broussolle, V., F. Pandiani, et al.** (2010). "Insertional mutagenesis reveals genes involved in *Bacillus cereus* ATCC 14579 growth at low temperature." *FEMS Microbiology Letters* **306**: 177-183.
4. **Carpousis, A. J.** (2002). "The *Escherishia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship to other ribonucleolytic multienzyme complexes." *Biochemical Society Transactions* **30**: 150-155.
5. **Carpousis, A. J.** (2007). "The RNA Degradosome of *Escherishia coli*: An mRNA-Degrading Machine Assembled on RNase E." *Annu Rev Microbiol* **61**: 71-87.
6. **Charollais, J., M. Dreyfus, et al.** (2004). "CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherishia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit." *Nucleic Acids Research* **32**(9): 2751-2759.
7. **Charollais, J., D. Pflieger, et al.** (2003). "The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherishia coli*." *Molecular Microbiology* **48**(5): 1253-1265.
8. **Cheng, Z. F. and M. P. Deutscher** (2002). "Purification and characterization of the *Escherishia coli* exoribonuclease RNase R - Comparison with RNase II." *Journal of Biological Chemistry* **277**(24): 21624-21629.

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

9. **Cordin, O., J. Banroques, et al.** (2006). "The DEAD-box protein family of RNA helicases." Gene **367**: 17-37.
10. **Guinebretiere, M. H., H. Girardin, et al.** (2003). "Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line." International Journal of Food Microbiology **82**(3): 223-232.
11. **Hunger, K., C. L. Beckering, et al.** (2006). "Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*." Journal of Bacteriology **188**(1): 240-248.
12. **Iost, I. and M. Dreyfus** (2006). "DEAD-box RNA helicases in *Escherishia coli*." Nucleic Acids Research **34**(15): 4189-4197.
13. **Jagessar, K. L. and C. Jain** (2010). "Functional and molecular analysis of *Escherishia coli* strains lacking multiple DEAD-box helicases." Rna-a Publication of the Rna Society **16**(7): 1386-1392.
14. **Jones, P. G., M. Mitta, et al.** (1996). "Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherishia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(1): 76-80.
15. **Lehnik-Habrink, M., H. Pfortner, et al.** (2010). "The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex." Mol Microbiol **21**: 21.
16. **Mahillon, J. and D. Lereclus** (2000). Electroporation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. Electrotransformation of Bacteria. N. Eynard and J. Teissie. Heidelberger Platz 3/D-14197 Berlin/Germany, Springer-Verlag Berlin: 242-252.
17. **Marcaida, M. J., M. A. DePristo, et al.** (2006). "The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution." Trends in Biochemical Sciences **31**(7): 359-365.
18. **Moll, I., S. Grill, et al.** (2002). "Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherishia coli*." Molecular Microbiology **44**(5): 1387-1396.
19. **Owttrim, G. W.** (2006). "RNA helicases and abiotic stress." Nucleic Acids Research **34**(11): 3220-3230.
20. **Pandiani, F., J. Brillard, et al.** (2010). "Differential Involvement of the Five RNA Helicases in Adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to Low Growth Temperatures." Appl. Environ. Microbiol. **76**(19): 6692-6697.
21. **Peil, L., K. Virumae, et al.** (2008). "Ribosome assembly in *Escherishia coli* strains lacking the RNA helicase DeaD/CsdA or DbpA." Febs Journal **275**(15): 3772-3782.
22. **Prud'homme-Genereux, A., R. K. Beran, et al.** (2004). "Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock

Chapitre 4 : CshA est indispensable pour maintenir la stabilité des ribosomes et pour la maturation des ARNr basse température

- protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'." Molecular Microbiology **54**(5): 1409-1421.
23. **Puig, O., F. Caspary, et al.** (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification." Methods **24**(3): 218-229.
 24. **Regonesi, M. E., M. Del Favero, et al.** (2006). "Analysis of the *Escherishia coli* RNA degradosome composition by a proteomic approach." Biochimie **88**(2): 151-161.
 25. **Salamitou, S., H. Agaisse, et al.** (1997). "A genetic system that reports transient activation of genes in *Bacillus*." Gene **202**(1-2): 121-126.
 26. **Schroeder, A., O. Mueller, et al.** (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." Bmc Molecular Biology **7**.
 27. **Srivastava, A. K. and D. Schlessinger** (1990). "Mechanism and regulation of bacterial ribosomal-rna processing." Annual Review of Microbiology **44**: 105-129.
 28. **Story, R. M., H. Li, et al.** (2001). "Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(4): 1465-1470.
 29. **Tanner, N. K. and P. Linder** (2001). "DExD/H box RNA helicases: From generic motors to specific dissociation functions." Molecular Cell **8**(2): 251-262.
 30. **Trubetskoy, D., F. Proux, et al.** (2009). "SrmB, a DEAD-box helicase involved in *Escherishia coli* ribosome assembly, is specifically targeted to 23S rRNA in vivo." Nucleic Acids Research **37**(19): 6540-6549.
 31. **Worrall, J. A. R., M. Gorna, et al.** (2008). "Reconstitution and analysis of the multienzyme *Escherishia coli* RNA degradosome." Journal of Molecular Biology **382**(4): 870-883.

Expériences complémentaires

Le mutant $\Delta cshA$ présente une croissance altérée par rapport à la souche sauvage à basse température. L'identification des partenaires de CshA à 20°C semble confirmer son rôle dans l'adaptation à basse température de croissance. La question se pose quant à la spécificité d'interaction, en terme de température, de CshA avec ses partenaires. L'identification des partenaires protéiques de CshA à 37°C permet de déterminer l'existence potentielle d'interactions protéiques différentes entre une condition de stress froid (20°C) et une condition *à priori* optimale de croissance (37°C). La mise en place de ces interactions entre CshA et ses partenaires protéiques permettrait l'adaptation et la croissance au froid de *B. cereus*. La comparaison des protéines interagissant avec CshA à 20°C et à 37°C peut permettre de distinguer les fonctions mises en place lors d'une réponse aux stress et de celles qui pourraient être considérées comme constitutives pour une croissance normale de *B. cereus*. Une recherche des possibles partenaires protéiques de CshA à 37°C a été réalisée, par la technique de Tandem Affinity purification, comme cela est présenté pour la température 20°C dans la publication 4.

Identification des partenaires protéiques de CshA à 37°C

Les résultats des expériences de purification Tap-Tag à partir de cellules de *B. cereus* cultivées à 37°C sont présentés dans la Fig. 7 et les résultats pour les cellules cultivées à 20°C rappelés dans la Fig. 8.

La purification de protéines issues de la souche sauvage ne possédant aucune protéine taguée ne donne aucune bande visible (Fig. 7 contrôle piste 3) à l'exception de celles correspondant à la protéase TEV (Fig. 7 contrôle piste 4). La protéine majoritairement purifiée est la protéine CshA-Tag qui est fortement surexprimée, comme l'attestent les 1055 pics détectés en spectrométrie de masse (Tableau 3).

Les profils protéiques, obtenus après purifications TAP des protéines de cellules cultivées à 37°C et à 20°C, sont peu différents (Figures 7 et 8, panel A, pistes 3).

La protéine CshA-Tag se fixe spécifiquement aux résines de purification utilisées. En effet, CshA non taguée est indetectable, après élution de l'extrait protéique de la souche sauvage, sur Western blot révélé avec les anticorps anti-CshA (résultats non montrés)

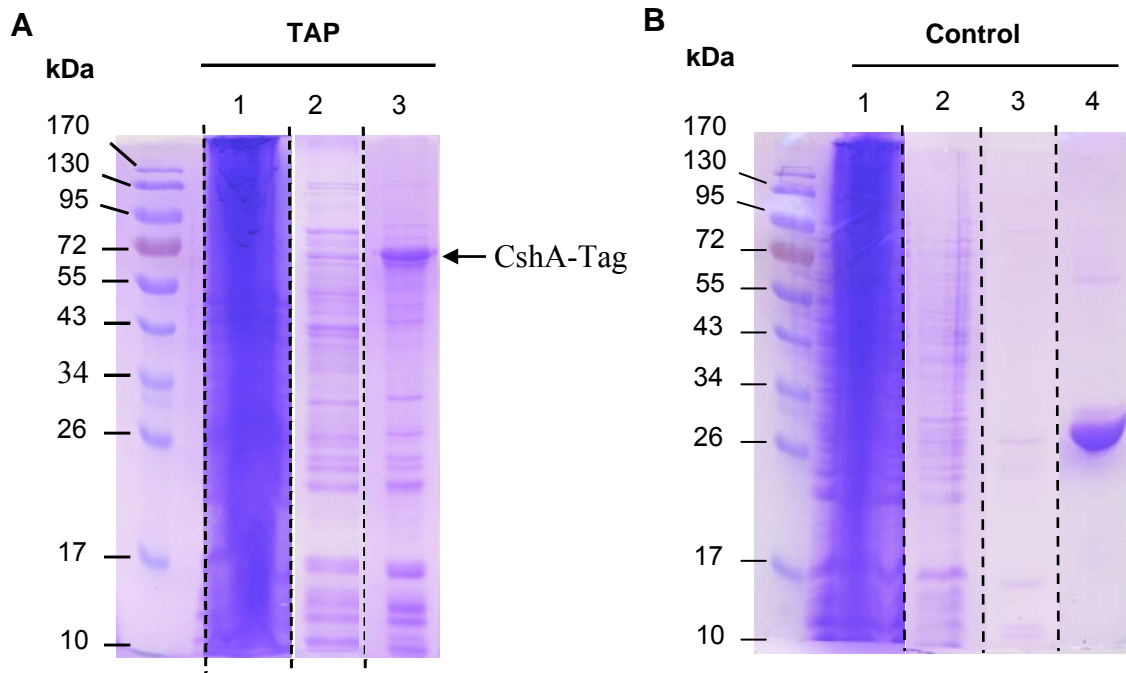


Figure 7 : Identification des partenaires de CshA à 37°C par TAP-Tag purification. (A) Les fractions issues (1) de l'extrait total des protéines de *B. cereus* $\Delta cshA\Omega pHT304-cshA-Tag$ cultivé à 37°C, (2) éluât de la première colonne IgG, (3) éluât de la colonne calmoduline, et (B) fractions issues (1) de l'extrait total de protéines de la souche WT cultivée à 37°C, (2) éluât de la première colonne IgG, (3) éluât de la colonne calmoduline et (4) migration de 100 unités de protéase TEV (contrôle) ont été analysées par SDS PAGE 12%. La souche sauvage sans le pHT304 *cshA-Tag* a été utilisée comme contrôle et soumise aux mêmes étapes de purification. CshA-Tag est indiquée par une flèche

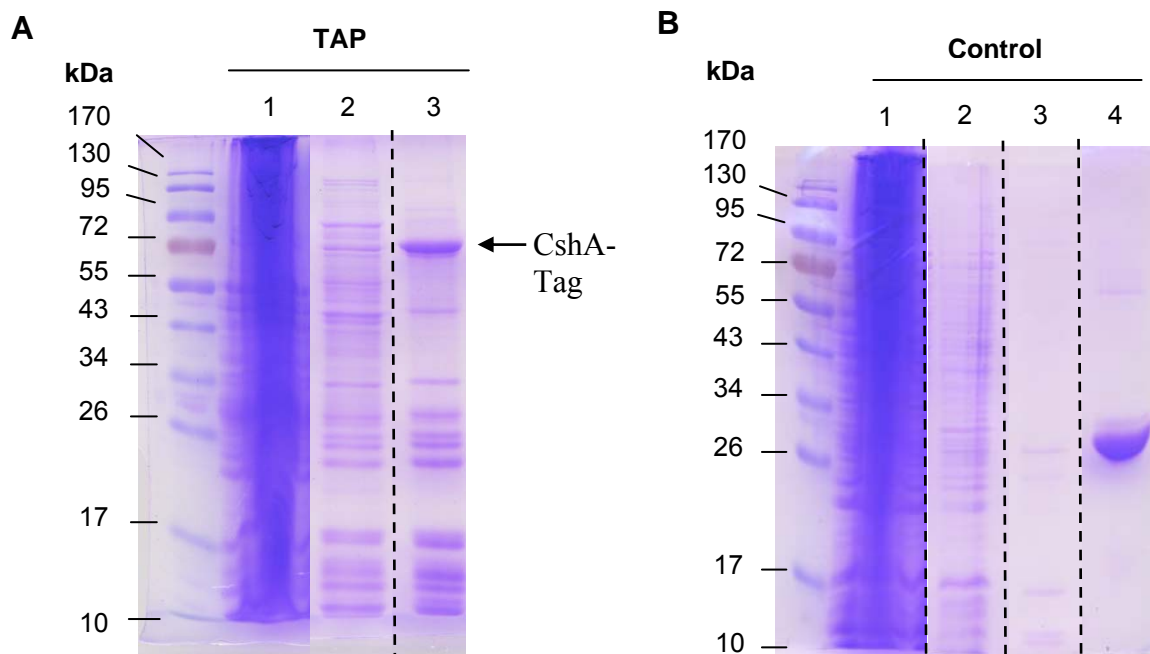


Figure 8 : Identification des partenaires de CshA à 20°C par TAP-Tag purification. (A) Les fractions issues (1) de l'extrait total des protéines de *B. cereus* $\Delta cshA\Omega pHT304-cshA-Tag$ cultivé à 20°C, (2) éluât de la première colonne IgG, (3) éluât de la colonne calmoduline, et (B) fractions issues (1) de l'extrait total de protéines de la souche WT cultivée à 37°C, (2) éluât de la première colonne IgG, (3) éluât de la colonne calmoduline et (4) migration de 100 unités de protéase TEV (contrôle) ont été analysées par SDS PAGE 12%. La souche sauvage sans le pHT304 *cshA-Tag* a été utilisée comme contrôle et soumise aux mêmes étapes de purification. CshA-Tag est indiquée par une flèche

Pour ces expériences, aussi bien à 37°C qu'à 20°C, nous avons considéré les protéines dont la présence a été révélée par plus de 50 spectres de masse: ainsi 23 protéines interagissent avec CshA à 37°C à 47 protéines à 20°C (Tableau 2 de l'article 4), un grand nombre de protéines sont communes aux 2 conditions (Tableau 3). Ainsi, à 37°C comme à 20°C, CshA interagit avec des facteurs d'élongation, ainsi qu'avec la sous unité RpoC de l'ARN polymérase, avec des protéines du métabolisme énergétique telles que l'énolase et la dihydrolipoyl déshydrogénase, qui participe au complexe de la pyruvate déshydrogénase. A 37°C, CshA interagit de manière directe ou indirecte avec 15 protéines ribosomales contre 24 retrouvées dans l'interactome à 20°C, (Tableau 3). Trois protéines interagissent avec CshA spécifiquement à 37°C: il s'agit de la formate acetyltransferase (métabolisme énergétique), de l'arginine deiminase (dégradation des acides aminés), et enfin d'une protéine chaperon GroEL (Tableau 4). CshA a donc peu de partenaires spécifiques à 37°C.

Table 3 : Partenaires protéiques interagissant avec CshA à 37°C et 20°C

Prot ID	Protein	Mw (kDa)	Peaks quantification
Q81J47	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	134,1	110
Q814C5	Elongation factor G	76,2	106
Q81IIT9	<i>DEAD-box ATP-dependent RNA helicase CshA</i>	59,3*	1055
Q819K6	Dihydrolipoyl dehydrogenase	49,3	60
Q815K8	Enolase	46,3	62
Q814C4	Elongation factor Tu	42,8	184
Q81J39	50S ribosomal protein L2	30,2	118
Q819X9	30S ribosomal protein S2	26,5	90
Q81J36	30S ribosomal protein S3	24,2	154
Q817A4	30S ribosomal protein S4	22,9	127
Q81J42	50S ribosomal protein L3	22,6	92
Q81J41	50S ribosomal protein L4	22,4	181
Q81J30	50S ribosomal protein L5	20,1	59
Q81J27	50S ribosomal protein L6	19,4	51
Q81J25	30S ribosomal protein S5	17,6	69
Q81J45	30S ribosomal protein S12	15,4	90
Q81J23	50S ribosomal protein L15	15,4	59
Q81J19	30S ribosomal protein S11	13,7	104
Q81J17	50S ribosomal protein L17	13,4	71
Q819W6	50S ribosomal protein L19	13,1	58
Q81J37	50S ribosomal protein L22	12,5	69

Prot ID: numéro d'identification Swissprot, Mw : Mass weight, Band number: correspond à la position de la protéine identifiée sur le gel SDS-PAGE

*La masse moléculaire de CshA est de 59.3kDa sans le TAG et de 72kDa avec le Tag

** Masse moléculaire théorique

Table 4 : Partenaires protéiques de CshA identifiés spécifiquement à 37°C

Prot ID	Protein	Mw (kDa)	Peaks quantification
Q81A3	Formate acetyltransferase	84,5**	67
Q814B0	60 kDa chaperonin GroEL	57,3	82
Q81I11	Arginine deiminase	46,8	54

Prot ID: numéro d'identification Swissprot, MW : Mass weight, Band number: correspond à la position de la protéine identifiée sur le gel SDS-PAGE, Peaks number

** masse moléculaire théorique

CshA est impliquée dans la biogénèse des ribosomes et pourrait être impliquée dans la dégradation des ARNm spécifiquement à basse température

Les partenaires principaux de CshA, identifiés à 20°C ou à 37°C, sont les protéines ribosomales, ce qui suggère que CshA joue un rôle important dans la biogénèse des ribosomes et que CshA pourrait être une protéine constitutive des ribosomes à 37°C. Les interactions protéiques pressenties devront être affinées en confirmant l'association des protéines deux à deux. Le nombre de spectres obtenus en LC MS-MS, présentés dans le Tableau 3 pour la condition 37°C, peut renseigner sur l'abondance des protéines à comparer avec la condition 20°C. Cependant, une quantification fiable des protéines en interaction nécessite des répétitions biologiques, qui seront réalisées ultérieurement pour la publication de ces résultats. Le plus grand nombre de protéines ribosomales associées à CshA à basse température, pourrait être dû à la modification de conformation du ribosome à basse température. La localisation de CshA au niveau des ribosomes a été démontrée chez *B. subtilis*, où celle-ci est majoritairement associée à la sous-unité ribosomale 50S à 37°C (Ando and Nakamura, 2006). CshA interagirait avec l'exoribonucléase II uniquement à 20°C et avec l'énolase (aussi retrouvée à 37°C avec d'autres protéines glycolytiques). Ceci suggère fortement l'existence d'un complexe protéique de dégradation des ARN impliquant CshA, qui reste cependant à démontrer. Ainsi CshA pourrait remplir une fonction semblable à celle de CsdA d'*E. coli*, qui est associée au dégradosome uniquement à basse température (Prud'homme-Genereux *et al.*, 2004) en association avec l'hélicase à ARN RhlB (Chandran *et al.*, 2007). Très récemment, une étude a montré que chez *B. subtilis* CshA est impliquée dans une structure de type dégradosome qui diffère de celle observée chez *E. coli* puisque basée sur la RNase Y et faisant intervenir les RNases J1 et J2 (Lehnik-Habrink *et al.*, 2010). Cependant, une étude récente a démontré l'existence d'interactions entre les RNases J1 et J2 de *Bacillus subtilis* sans identifier d'autres partenaires, remettant ainsi en cause l'existence d'un complexe de type dégradosome chez *B. subtilis* (Mathy *et al.*, 2010)

CshA pourrait donc être un composant permettant un repliement fonctionnel du ribosome quelle que soit la température, et son action serait d'autant plus importante que les conditions environnementales tendent à modifier la conformation du ribosome. Elle pourrait également participer à la dégradation des ARN, en régulant celle-ci de manière spécifique à basse température et ce probablement au sein d'un complexe de dégradation, dont l'existence reste à démontrer.

Conclusion générale et perspectives

Les bactéries ont la capacité à coloniser des environnements extrêmement divers au sein desquels les conditions environnementales peuvent être amenées à varier de manière brutale. En conséquence, elles doivent développer des réponses adaptatives à ces changements drastiques de conditions de croissance. *B. cereus* est un pathogène alimentaire de l'Homme extrêmement répandu dans la nature et qui possède une grande capacité d'adaptation aux nombreux stress qu'il rencontre au cours des différentes étapes de fabrication des aliments, et notamment la réfrigération.

Les travaux de recherche, exposés dans cette thèse, s'intègrent dans un projet de compréhension globale des mécanismes moléculaires permettant la survie et le développement de *B. cereus* à basse température, afin de mieux prédire l'émergence possible de souches productrices de toxines et capables de croître à basse température. Au début de ce projet, les connaissances sur ces mécanismes étaient principalement limitées à de rares études de la modification du métabolisme énergétique et lipidique en réponse à une baisse de température. La réponse moléculaire mise en place au cours de l'adaptation et de la croissance à basse température n'ayant pas été caractérisée, peu de gènes potentiellement impliqués dans cette phase d'adaptation avaient alors été identifiés (Mayr *et al.*, 1996).

Nous avons tout d'abord mis en évidence, par mutagenèse aléatoire, l'importance du gène *BC0259* codant pour l'hélicase à ARN CshA dans l'adaptation de *B. cereus* à basse température (Broussolle *et al.*, 2010). Nous avons ensuite démontré que trois des cinq hélicases à ARN présentes dans le génome de la souche ATCC 14579, CshA, CshB et CshC sont indispensables pour permettre son adaptation au froid (Pandiani *et al.*, 2010). Les hélicases CshB et C jouent également un rôle dans l'adaptation à d'autres stress, tels que le pH ou le stress oxydant. D'autre part, ces trois hélicases à ARN semblent avoir un domaine de température spécifique d'activité. Parmi ces trois hélicases à ARN, CshA semble avoir le rôle majeur dans l'adaptation au stress froid, elle est indispensable à l'adaptation dans un large domaine de température et son absence impacte le plus fortement sur la morphologie et la croissance de la souche, en particulier au froid.

Le gène *cshA* possède des éléments de régulation de type "cold box" dans la séquence de sa région promotrice (Hunger *et al.*, 2006). Ces éléments sont indispensables pour

permettre l'expression de *cshA* à basse température. Au sein des ribosomes, cette hélicase est majoritairement localisée avec la sous unité 30S, où elle interagit avec les protéines ribosomales. Elle assure donc un rôle important dans la biogenèse des ribosomes mais aussi dans le maintien ou la régulation de la stabilité des ARN spécifiquement à basse température. L'identification des partenaires protéiques de CshA montre que cette hélicase interagit avec les protéines ribosomales lorsque la bactérie est cultivée à 20°C et 37°C. A basse température, elle interagit également avec l'exoribonucléase II, CshB et une énalase, enzyme retrouvée dans le dégradosome de *B. subtilis*. L'action de CshA à basse température est donc indispensable pour permettre l'adaptation et la croissance de *B. cereus*, de part son rôle au niveau traductionnel en permettant la biogenèse correcte des ribosomes et en régulant la stabilité des ARN.

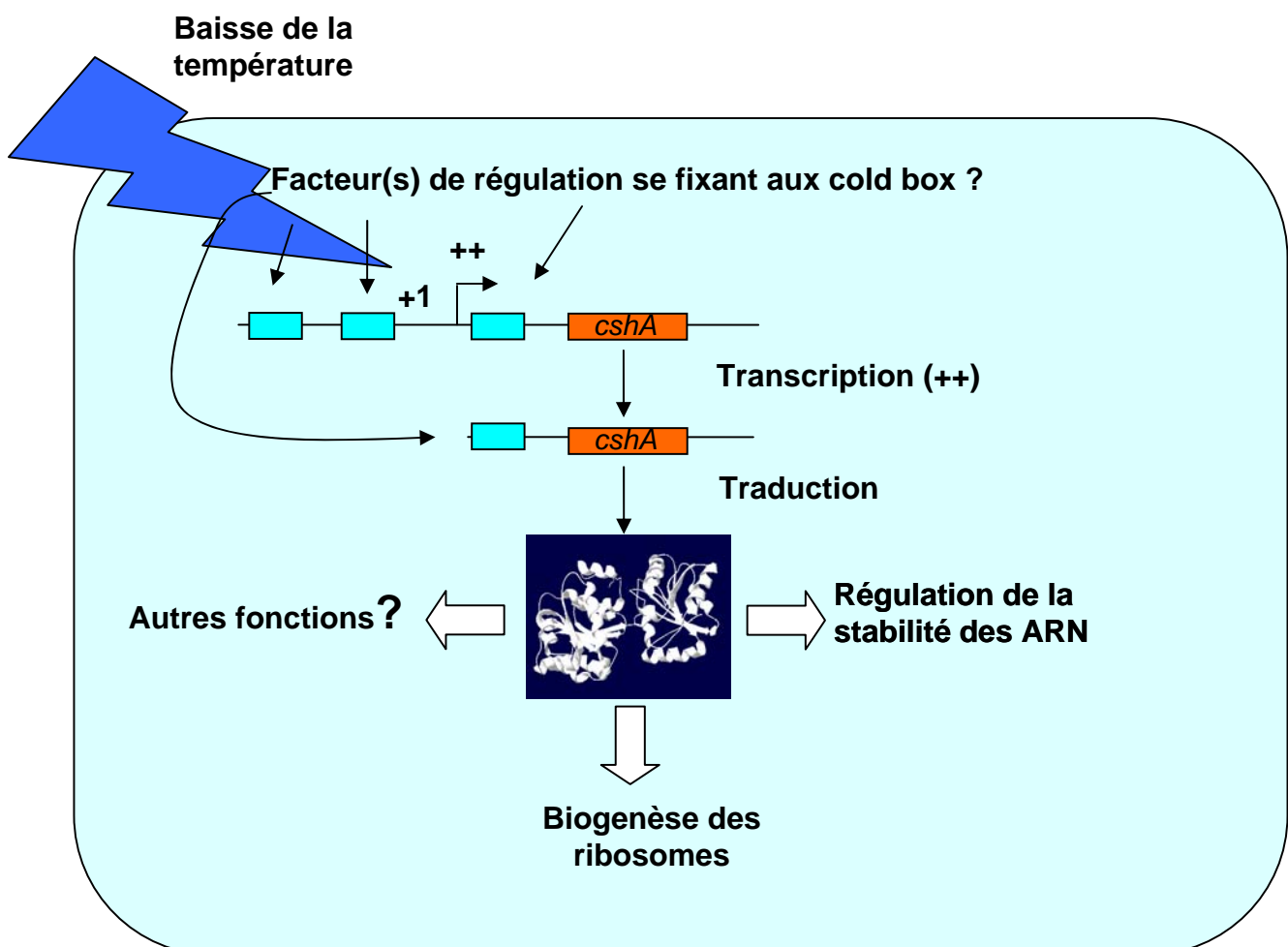


Schéma récapitulatif des fonctions connues de CshA et des éléments hypothétiques de régulation

tel-00765823, version 1 - 17 Dec 2012

Notre étude a ainsi permis de démontrer le caractère essentiel de trois hélicases à ARN, CshA, CshB et CshC, dans l'adaptation au froid de *B. cereus*. Nous avons pu également élucider en partie le rôle de l'hélicase à ARN majeure CshA. Les investigations à venir devront s'attacher à poursuivre la compréhension du rôle et des mécanismes impliquant CshA, mais aussi déterminer la fonction des hélicases CshB et CshC ainsi que les interactions possibles entre ces trois hélicases.

L'identification des fonctions impliquant CshA, ainsi que l'identification des partenaires protéiques de CshA ouvrent de nombreuses pistes à explorer:

L'étude du rôle de CshA dans la biogenèse du ribosome devra ainsi être poursuivie afin de déterminer avec quelle région ou quelle protéine CshA interagit au sein de la sous unité 30S. L'interaction de CshA avec l'exoribonuclease II et l'énolase à basse température reste à confirmer afin de déterminer si cette association présente une réalité biologique. Ainsi, cette fonction devra être explorée en étudiant si cette interaction est directe ou indirecte, mais aussi en recherchant l'existence éventuelle d'un complexe de dégradation des ARN impliquant CshA, comme cela a été démontré récemment chez *B. subtilis*. D'une manière générale, les interactions mises en évidence par la méthode du Tap-Tag devront être confirmées, deux à deux par d'autres techniques étudiant les interactions protéiques, telles que le système double-hybride, le Far-Western ou la co-immunoprécipitation.

La croissance à basse température de *B. cereus* entraîne une surexpression de *cshA* et la régulation de cette expression pourrait être sous la dépendance d'éléments putatifs de régulations de type cold-box, qui sont retrouvés dans la région promotrice. Néanmoins, la nature des éléments régulateurs qui se fixeraient sur ces boîtes reste à déterminer. La connaissance des partenaires, pouvant interagir avec ces régions et jouant soit un rôle d'activateur soit un rôle de répresseur en modifiant le taux de transcription du gène *cshA* ou bien modifiant la stabilité de l'ARNm codant pour CshA, pourrait permettre de déterminer le signal qui entraîne l'expression du gène *cshA* à basse température. Pour cela, il conviendra d'avoir une approche sans *a priori* pour pouvoir faire la recherche la plus large possible concernant les candidats potentiels: la méthode du simple hybride, qui repose sur le même principe que la technique plus connue du double hybride, permettrait de mettre en évidence l'interaction entre une protéine et une séquence d'ADN (Chen *et al.*, 2008). Les interactions mises en évidence devraient être confirmées ensuite par la technique de retard sur gel, par exemple.

CshA est capable d'interagir avec les ribosomes, quelle que soit la température testée et son absence entraîne une forte dégradation des ARN uniquement à basse température. La surexpression du gène *cshA* entraîne également, dans une moindre mesure, la dégradation des ARN. Le mutant $\Delta cshA$ présente un défaut de croissance par rapport à la souche sauvage particulièrement net au froid, mais aussi perceptible à 37°C, bien que cette température ne constitue pas un stress thermique pour *B. cereus*. CshA semble donc être une protéine constitutive du ribosome avec les protéines ribosomales et son absence entraînerait un défaut de repliement ou de stabilité d'autant plus important que la température diminue.

La spécificité d'interaction de CshA avec les ARN n'est pas connue: CshA est-elle capable d'interagir avec tous les ARN ou cible-t-elle des motifs particuliers au sein des ARN ou des régions 5' non traduites pour réguler leur stabilité? CshA pourrait-elle réguler sa propre expression comme cela a été démontré pour CspA d'*E. coli* (Bae *et al.*, 1997 ; Yamanaka *et al.*, 1999)?

Les hélicases à ARN jouent un rôle important dans le métabolisme des ARN et l'interaction de ces protéines avec les ARN a été démontré *in vitro* sur de petits ARN (Cordin *et al.*, 2006). Ces techniques n'ont pas permis d'établir si les hélicases à ARN interagissent indifféremment avec tous les types d'ARN, s'il existe des séquences consensus sur les ARN permettant leurs fixations ou bien si les hélicases à ARN reconnaissent certaines structures particulières. A basse température, les hélicases à ARN pourraient interagir avec des éléments de types cold-box qui peuvent être retrouvées au niveau de la séquence des ARNm codant pour des protéines de choc froid, régulant ainsi leur stabilité.

Une technique récente, nommée triple hybride, dérivée du double hybride permet la détection d'interaction protéine-ARN (Seay *et al.*, 2006). Cette technique permettra de déterminer si CshA est capable d'interagir de manière spécifique avec certains ARNm ou bien si cette interaction se fait avec tous les ARN. La détermination de cette spécificité pourra permettre une meilleure compréhension du rôle de CshA au cours de l'adaptation au froid. En effet, CshA peut avoir un rôle spécifique en stabilisant, par exemple, uniquement les ARNm nécessaires à l'adaptation de *B. cereus* à basse température, ou bien le rôle de CshA peut être plus général en interagissant indifféremment avec les ARN entraînant le déroulement des structures secondaires des ARNm qui peuvent alors, soit être traduits, soit être dégradés.

Cette étude pourrait également être menée pour CshB et CshC, afin de déterminer s'il existe une spécificité dans la reconnaissance des ARN entre ces trois hélicases, pouvant expliquer la redondance de gènes codant pour les hélicases à ARN au sein du génome de *B. cereus* tel que cela a pu être démontré pour les 5 hélicases de *E. coli* qui sont toutes capables d'interagir avec les ribosomes (Jagessar and Jain, 2010)

Les cinq hélicases à ARN de *B. cereus* possèdent toutes les motifs caractéristiques des hélicases à ARN dans le coeur de la protéine et des domaines plus ou moins grands, situés à l'extérieur du coeur. CshA possède la plus grande région C-terminale des hélicases de *B. cereus*. Ce domaine additionnel a été décrit chez d'autres bactéries comme étant un domaine de fixation aux ARN, et récemment, il a été montré que le domaine C-terminal de CshA de *B. subtilis* permet son interaction avec la ribonucléase Y (Lehnik-Habrink *et al.*, 2010). Le rôle de l'extrémité C-terminale de CshA de *B. cereus* est inconnu à ce jour; la suppression de ce domaine C-terminal de CshA et l'étude du phénotype résultant d'une part, et l'étude de l'interactome de la protéine tronquée d'autre part, permettrait de mieux comprendre le rôle de ce domaine dans l'activité de CshA et dans sa capacité à interagir avec ses partenaires.

Les hélicases CshB et CshC sont également indispensables pour permettre l'adaptation au froid de *B. cereus*. CshB semble avoir un rôle proche de celui de CshA puisque la surexpression de *cshA* entraîne la restauration d'un phénotype sauvage pour le mutant $\Delta cshB$. CshA et CshB ont des domaines de température d'action assez semblables, et les modifications morphologiques au niveau cellulaire sont assez comparables entre ces deux mutants. L'identification des partenaires protéiques de CshA indique que CshB interagirait avec elle à basse température, renforçant l'hypothèse que l'action de CshB est proche de celle de CshA. L'interaction potentielle CshA-CshB pourra être étudiée afin de déterminer si cette association est directe ou indirecte et cela notamment par la technique du Biacore. Cette étude permettrait de déterminer si ces deux hélicases sont capables de former des hétéro-dimères dans certaines conditions particulières.

Afin de déterminer le rôle de CshB deux approches complémentaires sont envisageables aux vues des données expérimentales précédemment décrites. CshB ayant potentiellement le même rôle que CshA il est probable que son action se situe au niveau de la biogenèse des ribosomes. Le fractionnement des particules ribosomales de la souche sauvage, et la recherche de CshB par immunodétection à l'aide d'un anticorps spécifique permettra de

déterminer si CshB est localisée avec le ribosome et avec quelle sous unité. Le même type d'expérience menée chez la souche mutante nous permettra déterminer si CshB est impliquée dans la biogenèse des ribosomes.

L'identification des partenaires protéiques de CshB est également envisageable afin de déterminer d'éventuelles autres fonctions impliquant cette hélicase à ARN, telles que la participation à un complexe de dégradation des messagers dans des conditions optimales. En effet, CshB pourrait se comporter comme l'hélicase à ARN RhlB de *E. coli* qui fait partie du dégradosome en condition optimale de croissance et qui est associée à CshA en conditions de stress froid.

L'hélicase à ARN CshC présente une spécificité d'action dans l'adaptation aux basses températures et son absence ne peut pas être compensée par la surexpression de CshA. Ceci suggère que CshC puisse remplir des fonctions différentes de CshA. Le gène *cshC* est situé au sein d'un locus de 5.7 kb, composé de gènes codant pour des protéines hypothétiques et pour des protéines du métabolisme des acides nucléiques. Cette structure opéronique est précédée d'une région inter-génique de 206 pb au sein de laquelle nous n'avons pas retrouvé de région conservée de type cold-box. L'identification du site d'initiation de la transcription du gène *cshC* permettrait de déterminer si ces gènes forment réellement un opéron, qui pourrait être transcrit différenciellement en fonction de la température, pouvant expliquer la surexpression de *cshC* à basse température.

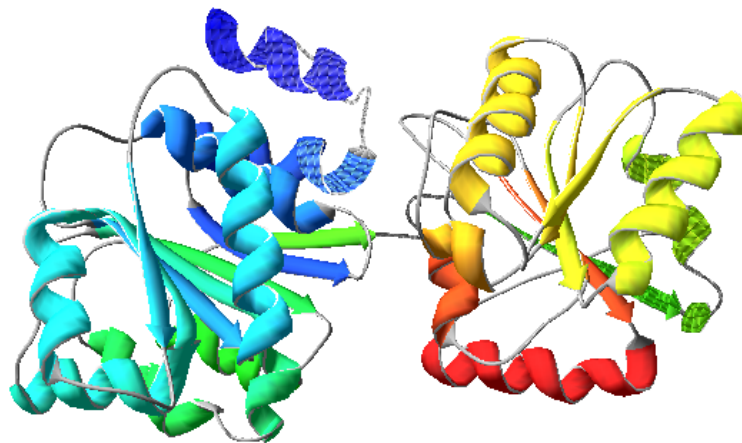
La fonction de CshC pourrait être appréhendée par la découverte d'éventuels partenaires protéiques. Pour utiliser la technique du Tap-Tag, comme cela a été fait pour CshA, la complémentation du mutant $\Delta cshC$ par apport d'une copie en trans devra être testée. Une solution alternative, du fait de la position de *cshC* au sein d'un opéron, serait d'insérer directement une étiquette dans le gène sur le chromosome de la souche sauvage.

Le groupe *B. cereus* regroupe à la fois des espèces psychrotrophes, mésophiles et thermophiles et aurait évolué des espèces les plus thermophiles vers l'acquisition d'une psychrotrophie marquée. Cette évolution nécessite la mise en place de caractères adaptatifs indispensables pour permettre la croissance de *B. cereus* au sein de nouvelles niches écologiques. Les hélicases à ARN CshA, CshB et CshC sont indispensables pour permettre l'adaptation au froid d'une souche mésophile de *B. cereus*. Il paraît légitime de s'interroger sur

la conservation de ces mécanismes au sein de souches plus adaptées au froid. Ces souches ont-elles également besoin des mêmes hélicases à ARN pour s'adapter à basse température ou bien ont-elles développé de nouveaux mécanismes ? Dans quels domaines de températures sont nécessaires les hélicases chez ces souches ? La délétion des gènes dans des souches psychrotrophes du groupe *B. cereus* et l'observation des phénotypes générés apporteraient les premières réponses à ces interrogations.

L'adaptation aux basses températures est probablement multifactorielle et ne dépend pas uniquement de la présence des hélicases à ARN. Nous avons cependant observé que le gène *csH* n'est pas retrouvé dans le génome de la souche *B. cereus* sp. *cytotoxicus*, qui appartient au groupe de souches les plus thermophiles. Une analyse de génomique comparative des génomes couvrant la diversité taxonomique du groupe *B. cereus* pourrait peut-être permettre d'établir certaines corrélations entre capacité de croissance au froid et présence de certains gènes.

Enfin, les séquences protéiques des hélicases à ARN de *B. cereus* sont assez conservées entre les groupes génétiques psychrotrophes, mésophiles et thermophiles. Toutefois, des modifications subtiles de séquence peuvent entraîner des modifications de la conformation, de la stabilité ou bien de la flexibilité de la protéine et modifier les paramètres catalytiques de ces enzymes. Nous avons entrepris par une étude bioinformatique, de modéliser la structure de CshA à partir de structures cristallines d'hélicases à ARN présentes dans les bases de données: sa structure est peu différente de celles décrites puisqu'elle est formée, à l'image des autres hélicases à ARN, de deux domaines entourant un sillon contenant le site catalytique.



Modélisation de l'hélicase à ARN CshA de la souche mésophile *B. cereus* ATCC 14579
(Gwaenaelle André-Leroux, Unité de Biochimie structurale, Institut Pasteur)

La modélisation de la structure des hélicases CshA des souches psychrotrophes, mésophiles, et thermophiles permettrait de simuler la variation de conformation et d'étudier leurs interactions potentielles avec les ARN en fonction de la température. Ces modélisations permettraient également de déterminer quels sont les motifs exposés et donc accessibles pour interagir éventuellement avec d'autres protéines.

Références bibliographiques

1. **Aguilar, P. S., A. M. Hernandez-Arriaga, et al.** (2001). "Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*." Embo Journal **20**(7): 1681-1691.
2. **Andersen, J. and N. Delihias** (1990). "*micF* Rna binds to the 5' end of *ompF* messenger-rna and to a protein from *Escherishia-coll*." Biochemistry **29**(39): 9249-9256.
3. **Ando, Y. and K. Nakamura** (2006). "*Bacillus subtilis* DEAD protein YdbR possesses ATPase, RNA binding, and RNA unwinding activities." Bioscience Biotechnology and Biochemistry **70**(7): 1606-1615.
4. **Anonymous** (2005). "Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs." The EFSA Journal **175**: 1-48.
5. **Araki, T.** (1991). "changes in rates of synthesis of individual proteins in a psychrophilic bacterium after a shift in temperature." Canadian Journal of Microbiology **37**(11): 840-847.
6. **Araki, T.** (1991). "the effect of temperature shifts on protein-synthesis by the psychrophilic bacterium *Vibrio sp* strain-ANT-300." Journal of General Microbiology **137**: 817-826.
7. **Arantes, O. and D. Lereclus** (1991). "construction of cloning vectors for *Bacillus-thuringiensis*." Gene **108**(1): 115-119.
8. **Arnaud, M., A. Chastanet, et al.** (2004). "New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria." Applied and Environmental Microbiology **70**(11): 6887-6891.
9. **Arnesen, L. P. S., A. Fagerlund, et al.** (2008). "From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins." Fems Microbiology Reviews **32**(4): 579-606.
10. **Aronson, A. I. and Y. Shai** (2001). "Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action." Fems Microbiology Letters **195**(1): 1-8.
11. **Arraiano, C. M., J. M. Andrade, et al.** (2010). "The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression." Fems Microbiology Reviews **34**(5): 883-923.
12. **Auger, S., N. Galleron, et al.** (2008). "The genetically remote pathogenic strain NVH391-98 of the *Bacillus cereus* group is representative of a cluster of thermophilic strains." Applied and Environmental Microbiology **74**(4): 1276-1280.
13. **Augustin, J. C., L. Rosso, et al.** (1999). "Estimation of temperature dependent growth rate and lag time of *Listeria monocytogenes* by optical density measurements." Journal of Microbiological Methods **38**(1-2): 137-146.

14. **Awano, N., C. Y. Xu, et al.** (2007). "Complementation analysis of the cold-sensitive phenotype of the *Escherishia coli* *csdA* deletion strain." Journal of Bacteriology **189**(16): 5808-5815.
15. **Bae, W., P. G. Jones, et al.** (1997). "CspA, the major cold shock protein of *Escherishia coli*, negatively regulates its own gene expression." Journal of Bacteriology **179**(22): 7081-7088.
16. **Banroques, J., M. Doere, et al.** (2010). "Motif III in Superfamily 2 "Helicases" Helps Convert the Binding Energy of ATP into a High-Affinity RNA Binding Site in the Yeast DEAD-Box Protein Ded1." Journal of Molecular Biology **396**(4): 949-966.
17. **Beckering, C. L., L. Steil, et al.** (2002). "Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*." Journal of Bacteriology **184**(22): 6395-6402.
18. **Benz, J., H. Trachsel, et al.** (1999). "Crystal structure of the ATPase domain of translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae* - the prototype of the DEAD box protein family." Structure with Folding & Design **7**(6): 671-679.
19. **Beranova, J., M. C. Mansilla, et al.** (2010). "Differences in cold adaptation of *Bacillus subtilis* under anaerobic and aerobic conditions." J Bacteriol **192**(16): 4164-4171.
20. **Berger, F., N. Morellet, et al.** (1996). "Cold shock and cold acclimation proteins in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter globiformis* SI55." Journal of Bacteriology **178**(11): 2999-3007.
21. **Berthelot, K., M. Muldoon, et al.** (2004). "Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast." Molecular Microbiology **51**(4): 987-1001.
22. **Bizebard, T., I. Ferlenghi, et al.** (2004). "Studies on three *E-coli* DEAD-box helicases point to an unwinding mechanism different from that of model DNA helicases." Biochemistry **43**(24): 7857-7866.
23. **Bjelic, S., B. O. Brandsdal, et al.** (2008). "Cold adaptation of enzyme reaction rates." Biochemistry **47**(38): 10049-10057.
24. **Bleichert, F. and S. J. Baserga** (2007). "The long unwinding road of RNA helicases." Molecular Cell **27**(3): 339-352.
25. **Boonyaratankornkit, B. B., A. J. Simpson, et al.** (2005). "Transcriptional profiling of the hyperthermophilic methanarchaeon *Methanococcus jannaschii* in response to lethal heat and non-lethal cold shock." Environmental Microbiology **7**(6): 789-797.
26. **Bottone, E. J.** (2010). "*Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen." Clinical Microbiology Reviews **23**(2): 382-+.
27. **Brigulla, M., T. Hoffmann, et al.** (2003). "Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation." Journal of Bacteriology **185**(15): 4305-4314.

28. **Brillard, J., I. Jéhanno, et al.** (2010). "Identification of genes specifically expressed during *Bacillus cereus* growth at low temperature." Applied and Environmental Microbiology **78**(8): 2562-2573.
29. **Brillard, J., K. Susanna, et al.** (2008). "The YvftU two-component system is involved in plcR expression in *Bacillus cereus*." BMC Microbiology **8**: 183.
30. **Briolat, V. and G. Reysset** (2002). "Identification of the *Clostridium perfringens* genes involved in the adaptive response to oxidative stress." Journal of Bacteriology **184**(9): 2333-2343.
31. **Broussolle, V., F. Pandiani, et al.** (2010). "Insertional mutagenesis reveals genes involved in *Bacillus cereus* ATCC 14579 growth at low temperature." FEMS Microbiology Letters **306**: 177-183.
32. **Cadot, C., S. L. Tran, et al.** (2010). "InhA1, NprA, and HlyII as Candidates for Markers To Differentiate Pathogenic from Nonpathogenic *Bacillus cereus* Strains." Journal of Clinical Microbiology **48**(4): 1358-1365.
33. **Carmel, A. B. and B. W. Matthews** (2004). "Crystal structure of the BstDEAD N-terminal domain: A novel DEAD protein from *Bacillus stearothermophilus*." Rna-a Publication of the Rna Society **10**(1): 66-74.
34. **Carpousis, A. J.** (2002). "The *Escherishia coli* RNA degradosome: structure, function and relationship to other ribonucleolytic multienzyme complexes." Biochemical Society Transactions **30**: 150-155.
35. **Carpousis, A. J.** (2007). "The RNA Degradosome of *Escherishia coli*: An mRNA-Degrading Machine Assembled on RNase E." Annu Rev Microbiol **61**: 71-87.
36. **Carpousis, A. J., B. F. Luisi, et al.** (2009). Endonucleolytic Initiation of mRNA Decay in *Escherishia coli*. Molecular Biology of Rna Processing and Decay in Prokaryotes. San Diego, Elsevier Academic Press Inc. **85**: 91-135.
37. **Caruthers, J. M., E. R. Johnson, et al.** (2000). "Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(24): 13080-13085.
38. **Chamot, D., K. R. Colvin, et al.** (2005). "RNA structural rearrangement via unwinding and annealing by the cyanobacterial RNA helicase, CrhR." Journal of Biological Chemistry **280**(3): 2036-2044.
39. **Chamot, D., W. C. Magee, et al.** (1999). "A cold shock-induced cyanobacterial RNA helicase." Journal of Bacteriology **181**(6): 1728-1732.
40. **Chan, Y. C., K. J. Boor, et al.** (2007). "sigma(B)-Dependent and sigma(B)-Independent mechanisms contribute to transcription of *listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth." Applied and Environmental Microbiology **73**(19): 6019-6029.

41. **Chan, Y. C., S. Raengpradub, et al.** (2007). "Microarray-Based characterization of the *Listeria monocytogenes* cold regulon in log- and stationary-phase cells." Applied and Environmental Microbiology **73**(20): 6484-6498.
42. **Chandran, V., L. Poljak, et al.** (2007). "Recognition and cooperation between the ATP-dependent RNA helicase RhlB and ribonuclease RNase e." Journal of Molecular Biology **367**(1): 113-132.
43. **Charollais, J., M. Dreyfus, et al.** (2004). "CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherishia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit." Nucleic Acids Research **32**(9): 2751-2759.
44. **Charollais, J., D. Pflieger, et al.** (2003). "The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherishia coli*." Molecular Microbiology **48**(5): 1253-1265.
45. **Charon, M. H., A. Volbeda, et al.** (1999). "Structure and electron transfer mechanism of pyruvate : ferredoxin oxidoreductase." Current Opinion in Structural Biology **9**(6): 663-669.
46. **Chen, G., L. M. DenBoer, et al.** (2008). "Design of a single plasmid-based modified yeast one-hybrid system for investigation of in vivo protein-protein and protein-DNA interactions." Biotechniques **45**(3): 295-+.
47. **Cheng, Z. F. and M. P. Deutscher** (2002). "Purification and characterization of the *Escherishia coli* exoribonuclease RNase R - Comparison with RNase II." Journal of Biological Chemistry **277**(24): 21624-21629.
48. **Choma, C., T. Clavel, et al.** (2000). "Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415." International Journal of Food Microbiology **55**(1-3): 73-77.
49. **Chung, B. H., R. Y. Cannon, et al.** (1975). "INFLUENCE OF GROWTH TEMPERATURE ON GLUCOSE-METABOLISM OF A PSYCHROTROPHIC STRAIN OF *BACILUS-CEREUS*." Journal of Dairy Science **58**(5): 785-785.
50. **Clavel, T., F. Carlin, et al.** (2007). "Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and Haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media." Journal of Applied Microbiology **103**(5): 1568-1575.
51. **Commichau, F. M., F. M. Rothe, et al.** (2009). "Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing." Molecular & Cellular Proteomics **8**(6): 1350-1360.
52. **Condon, C.** (2007). "Maturation and degradation of RNA in bacteria." Current Opinion in Microbiology **10**(3): 271-278.
53. **Cordin, O., J. Banroques, et al.** (2006). "The DEAD-box protein family of RNA helicases." Gene **367**: 17-37.

54. **Cordin, O., N. K. Tanner, et al.** (2004). "The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity." Embo Journal **23**(13): 2478-2487.
55. **Corpet, F.** (1988). "Multiple Sequence Alignment with Hierarchical-Clustering." Nucleic Acids Research **16**(22): 10881-10890.
56. **D'Elia, M. A., K. E. Millar, et al.** (2006). "Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*." Journal of Bacteriology **188**(23): 8313-8316.
57. **de la Cruz, J., D. Kressler, et al.** (1999). "Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families." Trends in Biochemical Sciences **24**(5): 192-198.
58. **De Wulf, P., B. J. Akerley, et al.** (2000). "Presence of the Cpx system in bacteria." Microbiology-Uk **146**: 247-248.
59. **den Besten, H. M. W., D. Garcia, et al.** (2010). "Direct-Imaging-Based Quantification of *Bacillus cereus* ATCC 14579 Population Heterogeneity at a Low Incubation Temperature." Applied and Environmental Microbiology **76**(3): 927-930.
60. **Dierick, K., E. Van Coillie, et al.** (2005). "Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning." Journal of Clinical Microbiology **43**(8): 4277-4279.
61. **Diges, C. M. and O. C. Uhlenbeck** (2005). "*Escherichia coli* DbPA is a 3' -> 5' RNA helicase." Biochemistry **44**(21): 7903-7911.
62. **Duport, C., A. Zigha, et al.** (2006). "Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system." Journal of Bacteriology **188**(18): 6640-6651.
63. **Ehling-Schulz, M., M. Fricker, et al.** (2004). "*Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness." Molecular Nutrition & Food Research **48**(7): 479-487.
64. **El-Fahmawi, B. and G. W. Owttrim** (2003). "Polar-biased localization of the cold stress-induced RNA helicase, CrhC, in the Cyanobacterium *Anabaena* sp strain PCC 7120." Molecular Microbiology **50**(4): 1439-1448.
65. **Eriksson, S., R. Hurme, et al.** (2002). "Low-temperature sensors in bacteria." Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **357**(1423): 887-893.
66. **Fairman-Williams, M. E., U.-P. Guenther, et al.** (2010). "SF1 and SF2 helicases: family matters." Current Opinion in Structural Biology **20**(3): 313-324.
67. **Falconi, M., B. Colonna, et al.** (1998). "Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of virF promoter to transcriptional repressor H-NS." Embo Journal **17**(23): 7033-7043.

68. **Francis, K. P., R. Mayr, et al.** (1998). "Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes." Applied and Environmental Microbiology **64**(9): 3525-3529.
69. **Francis, K. P. and G. Stewart** (1997). "Detection and speciation of bacteria through PCR using universal major cold-shock protein primer oligomers." Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology **19**(4): 286-293.
70. **Frankland, G. C. and P. F. Frankland** (1887). "Studies of Some New Micro-Organisms Obtained from Air. [Abstract]." Proceedings of the Royal Society of London **42**(ArticleType: primary_article / Full publication date: 1887 / Copyright © 1887 The Royal Society): 150-151.
71. **Fricker, M., R. Reissbrodt, et al.** (2008). "Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus*." International Journal of Food Microbiology **121**(1): 27-34.
72. **Georlette, D., V. Blaise, et al.** (2004). "Some like it cold: biocatalysis at low temperatures." Fems Microbiology Reviews **28**(1): 25-42.
73. **Giuliodori, A. M., A. Branki, et al.** (2004). "Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation." Rna-a Publication of the Rna Society **10**(2): 265-276.
74. **Gominet, M., L. Slamti, et al.** (2001). "Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis plcR* regulon and for virulence." Molecular Microbiology **40**(4): 963-975.
75. **Goodchild, A., N. F. W. Saunders, et al.** (2004). "A proteomic determination of cold adaptation in the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*." Molecular Microbiology **53**(1): 309-321.
76. **Gorbalenya, A. E. and E. V. Koonin** (1993). "helicases - amino-acid-sequence comparisons and structure-function-relationships." Current Opinion in Structural Biology **3**(3): 419-429.
77. **Granum, P. E., S. Brynstad, et al.** (1993). "Enterotoxin from *Bacillus-cereus* - production and biochemical-characterization." Netherlands Milk and Dairy Journal **47**(2): 63-70.
78. **Graumann, P. and M. A. Marahiel** (1996). "Some like it cold: Response of microorganisms to cold shock." Archives of Microbiology **166**(5): 293-300.
79. **Graumann, P., K. Schroder, et al.** (1996). "Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*." Journal of Bacteriology **178**(15): 4611-4619.
80. **Graumann, P. L. and M. A. Marahiel** (1998). "A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain." Trends in Biochemical Sciences **23**(8): 286-290.
81. **Graumann, P. L. and M. A. Marahiel** (1999). "Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*." Archives of Microbiology **171**(2): 135-138.

82. **Gualerzi, C. O., A. M. Giuliodori, et al.** (2003). "Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes." Journal of Molecular Biology **331**(3): 527-539.
83. **Gualerzi, C. O. and C. L. Pon** (1990). "initiation of messenger-rna translation in prokaryotes." Biochemistry **29**(25): 5881-5889.
84. **Guinebretiere, M. H., H. Girardin, et al.** (2003). "Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini puree processing line." International Journal of Food Microbiology **82**(3): 223-232.
85. **Guinebretiere, M. H. and V. Sanchis** (2003). "*Bacillus cereus sensu lato*." Bulletin de la société Française de Microbiologie **18**: 95-103.
86. **Guinebretiere, M. H., F. L. Thompson, et al.** (2008). "Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group." Environmental Microbiology **10**(4): 851-865.
87. **Han, M. J. and S. Y. Lee** (2006). "The *Escherichia coli* proteome: Past, present, and future prospects." Microbiology and Molecular Biology Reviews **70**(2): 362-+.
88. **Haque, M. A. and N. J. Russell** (2004). "Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch." Microbiology-Sgm **150**: 1397-1404.
89. **Hebraud, M., E. Dubois, et al.** (1994). "effect of growth temperatures on the protein-levels in a psychrotrophic bacterium, *Pseudomonas-fragi*." Journal of Bacteriology **176**(13): 4017-4024.
90. **Hebraud, M. and P. Potier** (1999). "Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria." J Mol Microbiol Biotechnol **1**(2): 211-219.
91. **Hecker, M. and U. Volker** (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. Advances in Microbial Physiology, Vol 44. London, Academic Press Ltd. **44**: 35-91.
92. **Herschlag, D.** (1995). "Rna Chaperones and the Rna Folding Problem." Journal of Biological Chemistry **270**(36): 20871-20874.
93. **Hill, K. K., L. O. Ticknor, et al.** (2004). "Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates." Applied and Environmental Microbiology **70**(2): 1068-1080.
94. **Hoe, N. P. and J. D. Goguen** (1993). "TEMPERATURE SENSING IN YERSINIA-PESTIS - TRANSLATION OF THE LCRF ACTIVATOR PROTEIN IS THERMALLY REGULATED." Journal of Bacteriology **175**(24): 7901-7909.
95. **Hunger, K., C. L. Beckering, et al.** (2006). "Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*." Journal of Bacteriology **188**(1): 240-248.

96. **Hurme, R., K. D. Berndt, et al.** (1996). "DNA binding exerted by a bacterial gene regulator with an extensive coiled-coil domain." Journal of Biological Chemistry **271**(21): 12626-12631.
97. **Hurme, R., K. D. Berndt, et al.** (1997). "A proteinaceous gene regulatory thermometer in Salmonella." Cell **90**(1): 55-64.
98. **Iggo, R. D. and D. P. Lane** (1989). "nuclear protein-p68 is an rna-dependent ATPase." Embo Journal **8**(6): 1827-1831.
99. **Inaba, M., S. Franceschelli, et al.** (2003). Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in Synechocystis. Dordrecht, Springer.
100. **INVS** (2009). "Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives Données de la déclaration obligatoire, 2008."
101. **Iost, I. and M. Dreyfus** (2006). "DEAD-box RNA helicases in *Escherishia coli*." Nucleic Acids Research **34**(15): 4189-4197.
102. **Iost, I., M. Dreyfus, et al.** (1999). "Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase." Journal of Biological Chemistry **274**(25): 17677-17683.
103. **Ivanova, N., A. Sorokin, et al.** (2003). "Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*." Nature **423**(6935): 87-91.
104. **Jagessar, K. L. and C. Jain** (2010). "Functional and molecular analysis of *Escherishia coli* strains lacking multiple DEAD-box helicases." Rna-a Publication of the Rna Society **16**(7): 1386-1392.
105. **Jain, C.** (2008). "The *E-coli* RhIE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly." Rna-a Publication of the Rna Society **14**(2): 381-389.
106. **Jiang, W. N., L. Fang, et al.** (1996). "The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherishia coli*, in cold-shock adaptation." Journal of Bacteriology **178**(16): 4919-4925.
107. **Jiang, W. N., P. Jones, et al.** (1993). "chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherishia-coli*, CspA." Journal of Bacteriology **175**(18): 5824-5828.
108. **Jiang, W. N., F. Li, et al.** (1996). "Complete growth inhibition of *Escherishia coli* by ribosome trapping with truncated cspA mRNA at low temperature." Genes to Cells **1**(11): 965-976.
109. **Johansson, J., P. Mandin, et al.** (2002). "An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*." Cell **110**(5): 551-561.

110. **Jones, P. G. and M. Inouye** (1996). "RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response." Molecular Microbiology **21**(6): 1207-1218.
111. **Jones, P. G., R. Krah, et al.** (1992). "DNA gyrase, CS7.4, and the cold Shock response in *Escherishia-coli*." Journal of Bacteriology **174**(18): 5798-5802.
112. **Jones, P. G., M. Mitta, et al.** (1996). "Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherishia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **93**(1): 76-80.
113. **Jones, P. G., R. A. Vanbogelen, et al.** (1987). "INDUCTION OF PROTEINS IN RESPONSE TO LOW-TEMPERATURE IN *ESCHERISHIA-COLI*." Journal of Bacteriology **169**(5): 2092-2095.
114. **Kaan, T., G. Homuth, et al.** (2002). "Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response." Microbiology-Sgm **148**: 3441-3455.
115. **Kandror, O., A. DeLeon, et al.** (2002). "Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherishia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(15): 9727-9732.
116. **Kandror, O. and A. L. Goldberg** (1997). "Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherishia coli* at low temperatures." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**(10): 4978-4981.
117. **Kaneda, T.** (1991). "iso-fatty and anteiso-fatty acids in bacteria - biosynthesis, function, and taxonomic significance." Microbiological Reviews **55**(2): 288-302.
118. **Karginov, F. V. and O. C. Uhlenbeck** (2004). "Interaction of *Escherishia coli* DbpA with 23S rRNA in different functional states of the enzyme." Nucleic Acids Research **32**(10): 3028-3032.
119. **Khemici, V., L. Poljak, et al.** (2008). "The RNase E of *Escherishia coli* is a membrane-binding protein." Molecular Microbiology **70**(4): 799-813.
120. **Khemici, V., L. Poljak, et al.** (2005). "Evidence in vivo that the DEAD-box RNA helicase RhIB facilitates the degradation of ribosome-free mRNA by RNase E." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(19): 6913-6918.
121. **Khemici, V., I. Toesca, et al.** (2004). "The RNase E of *Escherishia coli* has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases: functional replacement of RhIB by RhIE." Molecular Microbiology **54**(5): 1422-1430.
122. **Kiran, M. D., S. Annapoorni, et al.** (2005). "Cis-trans isomerase gene in psychrophilic *Pseudomonas syringae* is constitutively expressed during growth and under conditions of temperature and solvent stress." Extremophiles **9**(2): 117-125.

123. **Kiran, M. D., J. S. S. Prakash, et al.** (2004). "Psychrophilic *Pseudomonas syringae* requires trans-monounsaturated fatty acid for growth at higher temperature." Extremophiles **8**(5): 401-410.
124. **Kossen, K., F. V. Karginov, et al.** (2002). "The carboxy-terminal domain of the DExD/H protein YxiN is sufficient to confer specificity for 23 S rRNA." Journal of Molecular Biology **324**(4): 625-636.
125. **Kotiranta, A., K. Lounatmaa, et al.** (2000). "Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections." Microbes and Infection **2**(2): 189-198.
126. **Kramer, J. M. and R. J. Gilbert** (1989). "*Bacillus cereus* and other *Bacillus* species." Foodborne bacterial pathogens.: 21-70.
127. **Kujat, S. L. and G. W. Owtrim** (2000). "Redox-regulated RNA helicase expression." Plant Physiology **124**(2): 703-713.
128. **Lai, E. C.** (2003). "RNA sensors and riboswitches: Self-regulating messages." Current Biology **13**(7): R285-R291.
129. **Lamm, G. M., S. M. Nicol, et al.** (1996). "p72: A human nuclear DEAD box protein highly related to p68." Nucleic Acids Research **24**(19): 3739-3747.
130. **Lease, R. A. and M. Belfort** (2000). "A trans-acting RNA as a control switch in *Escherichia coli*: DsrA modulates function by forming alternative structures." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(18): 9919-9924.
131. **Lechner, S., R. Mayr, et al.** (1998). "*Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group." International Journal of Systematic Bacteriology **48**: 1373-1382.
132. **Lehnik-Habrink, M., H. Pfortner, et al.** (2010). "The RNA degradosome in *Bacillus subtilis*: identification of CshA as the major RNA helicase in the multiprotein complex." Mol Microbiol **21**: 21.
133. **Leichert, L. I. O., C. Scharf, et al.** (2003). "Global characterization of disulfide stress in *Bacillus subtilis*." Journal of Bacteriology **185**(6): 1967-1975.
134. **Lewis, R. and R. N. McElhaney** (1985). "Thermotropic phase-behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing iso-branched fatty-acids .1. differential scanning calorimetric studies." Biochemistry **24**(10): 2431-2439.
135. **Li, Y. and R. R. Breaker** (1999). "Kinetics of RNA Degradation by Specific Base Catalysis of Transesterification Involving the 2'-Hydroxyl Group." Journal of the American Chemical Society **121**(23): 5364-5372.
136. **Lim, J., T. Thomas, et al.** (2000). "Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*." Journal of Molecular Biology **297**(3): 553-567.

137. **Linder, P.** (2006). "Dead-box proteins: a family affair - active and passive players in RNP-remodeling." Nucleic Acids Research **34**(15): 4168-4180.
138. **Liu, C.-P., Q.-M. Zhou, et al.** (2010). "PPIase domain of trigger factor acts as auxiliary chaperone site to assist the folding of protein substrates bound to the crevice of trigger factor." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **42**(6): 890-901.
139. **Lorsch, J. R.** (2002). "RNA chaperones exist and DEAD box proteins get a life." Cell **109**(7): 797-800.
140. **Lorsch, J. R. and D. Herschlag** (1998). "The DEAD box protein eIF4A. 1. A minimal kinetic and thermodynamic framework reveals coupled binding of RNA and nucleotide." Biochemistry **37**(8): 2180-2193.
141. **Lund, T., M. L. De Buyser, et al.** (2000). "A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis." Molecular Microbiology **38**(2): 254-261.
142. **Mahillon, J. and D. Lereclus** (2000). Electroporation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. Electrotransformation of Bacteria. N. Eynard and J. Teissie. Heidelberger Platz 3/D-14197 Berlin/Germany, Springer-Verlag Berlin: 242-252.
143. **Mansilla, M. C., L. E. Cybulski, et al.** (2004). "Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors." Journal of Bacteriology **186**(20): 6681-6688.
144. **Mantsch, H. H., C. Madec, et al.** (1985). "Thermotropic phase-behavior of model membranes composed of phosphatidylcholines containing iso-branched fatty-acids .2. infrared and p 31 nmr spectroscopic studies." Biochemistry **24**(10): 2440-2446.
145. **Marcaida, M. J., M. A. DePristo, et al.** (2006). "The RNA degradosome: life in the fast lane of adaptive molecular evolution." Trends in Biochemical Sciences **31**(7): 359-365.
146. **Margulis, L., J. Z. Jorgensen, et al.** (1998). "The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: Intestinal symbionts of animals." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **95**(3): 1236-1241.
147. **Mathy, N., A. Hébert, et al.** (2010). "*Bacillus subtilis* ribonucleases J1 and J2 form a complex with altered enzyme behaviour." Molecular Microbiology **75**(2): 489-498.
148. **Max, K. E. A., M. Zeeb, et al.** (2007). "Common mode of DNA binding to cold shock domains - Crystal structure of hexathymidine bound to the domain-swapped form of a major cold shock protein from *Bacillus caldolyticus*." Febs Journal **274**(5): 1265-1279.
149. **Mayr, B., T. Kaplan, et al.** (1996). "Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201." Journal of Bacteriology **178**(10): 2916-2925.
150. **Mendez, M. B., L. M. Orsaria, et al.** (2004). "Novel roles of the master transcription factors Spo0A and sigma(B) for survival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature." Journal of Bacteriology **186**(4): 989-1000.

151. **Metpally, R. P. R. and B. V. B. Reddy** (2009). "Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins." Bmc Genomics **10**.
152. **Michel, V., I. Lehoux, et al.** (1997). "The cold shock response of the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi* involves four low-molecular-mass nucleic acid binding proteins." Journal of Bacteriology **179**(23): 7331-7342.
153. **Mitta, M., L. Fang, et al.** (1997). "Deletion analysis of *cspA* of *Escherishia coli*: requirement of the AT-rich UP element for *cspA* transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction." Molecular Microbiology **26**(2): 321-335.
154. **Mock, M. and A. Fouet** (2001). "Anthrax." Annual Review of Microbiology **55**: 647-671.
155. **Moll, I., S. Grill, et al.** (2002). "Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherishia coli*." Molecular Microbiology **44**(5): 1387-1396.
156. **Moll, I., M. Huber, et al.** (2001). "Evidence against an interaction between the mRNA downstream box and 16S rRNA in translation initiation." Journal of Bacteriology **183**(11): 3499-3505.
157. **Nakamura, K. and T. Tamaoki** (1968). "Reversible dissociation of *Escherishia coli* ribosomes by hydrogen peroxide." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis **161**(2): 368-376.
158. **Nakamura, L. K.** (1998). "*Bacillus pseudomycooides* sp. nov." International Journal of Systematic Bacteriology **48**: 1031-1035.
159. **Owtrim, G. W.** (2006). "RNA helicases and abiotic stress." Nucleic Acids Research **34**(11): 3220-3230.
160. **Pandiani, F., J. Brillard, et al.** (2010). "Differential Involvement of the Five RNA Helicases in Adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to Low Growth Temperatures." Appl. Environ. Microbiol. **76**(19): 6692-6697.
161. **Panoff, J. M., B. Thammavongs, et al.** (1998). "Cold stress responses in mesophilic bacteria." Cryobiology **36**(2): 75-83.
162. **Peck, M. L. and D. Herschlag** (2003). "Adenosine 5'-O-(3-thio)triphosphate (ATP-gamma S) is a substrate for the nucleotide hydrolysis and RNA unwinding activities of eukaryotic translation initiation factor eIF4A." Rna-a Publication of the Rna Society **9**(10): 1180-1187.
163. **Peil, L., K. Virumae, et al.** (2008). "Ribosome assembly in *Escherishia coli* strains lacking the RNA helicase DeaD/CsdA or DbpA." Febs Journal **275**(15): 3772-3782.
164. **Pfaffl, M. W.** (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

-
165. **Phadtare, S.** (2004). "Recent developments in bacterial cold-shock response." Current Issues in Molecular Biology **6**: 125-136.
166. Phadtare, S., J. Alsina, *et al.* (1999). "Cold shock response and cold-shock proteins." Current Opinion in Microbiology **2**(2): 175-180.
167. **Phadtare, S. and M. Inouye** (2004). "Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **186**(20): 7007-7014.
168. **Planchon, S., C. Dargaignaratz, et al.** (2010). "Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10°C and 30°C display variations in their properties." Food Microbiology **In Press, Accepted Manuscript**.
169. **Prakash, J. S. S., M. Sinetova, et al.** (2009). "DNA supercoiling regulates the stress-inducible expression of genes in the cyanobacterium *Synechocystis*." Molecular Biosystems **5**(12): 1904-1912.
170. **Prosseda, G., P. A. Fradiani, et al.** (1998). "A role for H-NS in the regulation of the virF gene of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli*." Research in Microbiology **149**(1): 15-25.
171. **Prud'homme-Genereux, A., R. K. Beran, et al.** (2004). "Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'." Molecular Microbiology **54**(5): 1409-1421.
172. **Pruss, B. M., K. P. Francis, et al.** (1999). "Correlation of 16S ribosomal DNA signature sequences with temperature-dependent growth rates of mesophilic and psychrotolerant strains of the *Bacillus cereus* group." Journal of Bacteriology **181**(8): 2624-2630.
173. **Puig, O., F. Caspary, et al.** (2001). "The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification." Methods **24**(3): 218-229.
174. **Ray, M.** (2006). Cold stress response of low temperature adapted bacteria, Research Signpost.
175. **Regnier, P. and C. M. Arraiano** (2000). "Degradation of mRNA in bacteria: emergence of ubiquitous features." Bioessays **22**(3): 235-244.
176. **Regonesi, M. E., M. Del Favero, et al.** (2006). "Analysis of the *Escherichia coli* RNA degradosome composition by a proteomic approach." Biochimie **88**(2): 151-161.
177. **Rocak, S. and P. Linder** (2004). "Dead-box proteins: The driving forces behind RNA metabolism." Nature Reviews Molecular Cell Biology **5**(3): 232-241.
178. **Rodrigues, D. F. and J. M. Tiedje** (2008). "Coping with our cold planet." Applied and Environmental Microbiology **74**(6): 1677-1686.
-

179. **Rogers, G. W., W. F. Lima, et al.** (2001). "Further characterization of the helicase activity of eIF4A - Substrate specificity." Journal of Biological Chemistry **276**(16): 12598-12608.
180. **Rogers, G. W., N. J. Richter, et al.** (1999). "Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A." Journal of Biological Chemistry **274**(18): 12236-12244.
181. **Rossler, O. G., A. Straka, et al.** (2001). "Rearrangement of structured RNA via branch migration structures catalysed by the highly related DEAD-box proteins p68 and p72." Nucleic Acids Research **29**(10): 2088-2096.
182. **Russell, N. J.** (1990). "COLD ADAPTATION OF MICROORGANISMS." Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **326**(1237): 595-611.
183. **Salamitou, S., H. Agaisse, et al.** (1997). "A genetic system that reports transient activation of genes in *Bacillus*." Gene **202**(1-2): 121-126.
184. **Schnepf, E., N. Crickmore, et al.** (1998). "*Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins." Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**(3): 775-+.
185. **Schroeder, A., O. Mueller, et al.** (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." Bmc Molecular Biology **7**.
186. **Seay, D., B. Hook, et al.** (2006). "A three-hybrid screen identifies mRNAs controlled by a regulatory protein." Rna-a Publication of the Rna Society **12**(8): 1594-1600.
187. **Shi, H., O. Cordin, et al.** (2004). "Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(51): 17628-17633.
188. **Shiratori, A., T. Shibata, et al.** (1999). "Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and northern analysis." Yeast **15**(3): 219-253.
189. **Shivaji, S. and J. S. S. Prakash** (2010). "How do bacteria sense and respond to low temperature?" Archives of Microbiology **192**(2): 85-95.
190. **Silverman, E., G. Edwalds-Gilbert, et al.** (2003). "DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind." Gene **312**: 1-16.
191. **Singh, A. K., Y. M. Zhang, et al.** (2009). "FabH selectivity for anteiso branched-chain fatty acid precursors in low-temperature adaptation in *Listeria monocytogenes*." Fems Microbiology Letters **301**(2): 188-192.
192. **Soultanas, P. and D. B. Wigley** (2001). "Unwinding the 'Gordian knot' of helicase action." Trends in Biochemical Sciences **26**(1): 47-54.
193. **Spiwok, V., P. Lipovova, et al.** (2007). "Cold-active enzymes studied by comparative molecular dynamics simulation." Journal of Molecular Modeling **13**(4): 485-497.

194. **Srivastava, A. K. and D. Schlessinger** (1990). "mechanism and regulation of bacterial ribosomal-rna processing." Annual Review of Microbiology **44**: 105-129.
195. **Stenfors, L. P. and P. E. Granum** (2001). "Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*." Fems Microbiology Letters **197**(2): 223-228.
196. **Story, R. M., H. Li, et al.** (2001). "Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(4): 1465-1470.
197. **Story, R. M. and T. A. Steitz** (1992). "structure of the RecA protein-ADP complex." Nature **355**(6358): 374-376.
198. **Strauch, M. A., D. Demendoza, et al.** (1992). "cis-unsaturated fatty-acids specifically inhibit a signal-transducing protein-kinase required for initiation of sporulation in *Bacillus-subtilis*." Molecular Microbiology **6**(20): 2909-2917.
199. **Suutari, M. and S. Laakso** (1992). "changes in fatty-acid branching and unsaturation of *Streptomyces-griseus* and *Brevibacterium-fermentans* As a response to growth temperature." Applied and Environmental Microbiology **58**(7): 2338-2340.
200. **Taghalout, A. and L. Rothfield** (2007). "RNaseE and the other constituents of the RNA degradosome are components of the bacterial cytoskeleton." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(5): 1667-1672.
201. **Taghalout, A. and L. Rothfield** (2008). "New insights into the cellular organization of the RNA processing and degradation machinery of *Escherishia coli*." Molecular Microbiology **70**(4): 780-782.
202. **Taghalout, A. and L. Rothfield** (2008). "RNaseE and RNA helicase B play central roles in the cytoskeletal organization of the RNA degradosome." Journal of Biological Chemistry **283**(20): 13850-13855.
203. **Taghalout, A. and Q. F. Yang** (2010). "Self-Assembly of the Bacterial Cytoskeleton-Associated RNA Helicase B Protein into Polymeric Filamentous Structures." Journal of Bacteriology **192**(12): 3222-3226.
204. **Tanner, N. K., O. Cordin, et al.** (2003). "The Q motif: A newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis." Molecular Cell **11**(1): 127-138.
205. **Tanner, N. K. and P. Linder** (2001). "DExD/H box RNA helicases: From generic motors to specific dissociation functions." Molecular Cell **8**(2): 251-262.
206. **Thieringer, H. A., P. G. Jones, et al.** (1998). "Cold shock and adaptation." Bioessays **20**(1): 49-57.
207. **Thorsen, L., B. M. Hansen, et al.** (2006). "Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium." Applied and Environmental Microbiology **72**(7): 5118-5121.

208. **Tobe, T., M. Yoshikawa, et al.** (1993). "Transcriptional control of the invasion regulatory gene *virB* of *Shigella-flexneri* - activation by VirR and repression by H-NS." Journal of Bacteriology **175**(19): 6142-6149.
209. **Trubetskoy, D., F. Proux, et al.** (2009). "SrmB, a DEAD-box helicase involved in *Escherishia coli* ribosome assembly, is specifically targeted to 23S rRNA in vivo." Nucleic Acids Research **37**(19): 6540-6549.
210. **Tsu, C. A., K. Kossen, et al.** (2001). "The *Escherishia coli* DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23S rRNA." Rna-a Publication of the Rna Society **7**(5): 702-709.
211. **Turner, A. M. W., C. F. Love, et al.** (2007). "Mutational analysis of the *Escherishia coli* DEAD box protein CsdA." Journal of Bacteriology **189**(7): 2769-2776.
212. **Tuteja, N. and R. Tuteja** (2004). "Unraveling DNA helicases - Motif, structure, mechanism and function." European Journal of Biochemistry **271**(10): 1849-1863.
213. **Valdez, B. C., D. Henning, et al.** (1997). "RNA-unwinding and RNA-folding activities of RNA helicase II Gu - Two activities in separate domains of the same protein." European Journal of Biochemistry **250**(3): 800-807.
214. **Vanbogelen, R. A. and F. C. Neidhardt** (1990). "ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherishia-coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **87**(15): 5589-5593.
215. **Vigh, L., D. A. Los, et al.** (1993). "The primary signal in the biological perception of temperature - pd-catalyzed hydrogenation of membrane-lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis*-PCC6803." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **90**(19): 9090-9094.
216. **Vilain, S., Y. Luo, et al.** (2006). "Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil." Applied and Environmental Microbiology **72**(7): 4970-4977.
217. **Vinnemeier, J. and M. Hagemann** (1999). "Identification of salt-regulated genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803 by subtractive RNA hybridization." Archives of Microbiology **172**(6): 377-386.
218. **von Stetten, F., K. P. Francis, et al.** (1998). "Rapid discrimination of psychrotolerant and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of 16S rDNA." Journal of Microbiological Methods **34**(2): 99-106.
219. **Waldminghaus, T., A. Fippinger, et al.** (2005). "RNA thermometers are common in alpha- and gamma-proteobacteria." Biological Chemistry **386**(12): 1279-1286.
220. **Walker, J. E., M. Saraste, et al.** (1982). "DISTANTLY RELATED SEQUENCES IN THE ALPHA-SUBUNITS AND BETA-SUBUNITS OF ATP SYNTHASE, MYOSIN, KINASES AND OTHER ATP-REQUIRING ENZYMES AND A COMMON NUCLEOTIDE BINDING FOLD." Embo Journal **1**(8): 945-951.

221. **Wang, S. Y., Y. X. Hu, et al.** (2006). "The domain of the *Bacillus subtilis* DEAD-box helicase YxiN that is responsible for specific binding of 23S rRNA has an RNA recognition motif fold." Rna-a Publication of the Rna Society **12**(6): 959-967.
222. **Weber, M. H. W., W. Klein, et al.** (2001). "Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock." Molecular Microbiology **39**(5): 1321-1329.
223. **Weber, M. H. W. and M. A. Marahiel** (2002). "Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*." Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences **357**(1423): 895-906.
224. **Weinberg, M. V., G. J. Schut, et al.** (2005). "Cold shock of a hyperthermophilic archaeon: *Pyrococcus furiosus* exhibits multiple responses to a suboptimal growth temperature with a key role for membrane-bound glycoproteins." Journal of Bacteriology **187**(1): 336-348.
225. **Whyte, L. G. and W. E. Inniss** (1992). "COLD SHOCK PROTEINS AND COLD-ACCLIMATION PROTEINS IN A PSYCHROTROPHIC BACTERIUM." Canadian Journal of Microbiology **38**(12): 1281-1285.
226. **Wiegeshoff, F., C. L. Beckering, et al.** (2006). "Sigma L is important for cold shock adaptation of *Bacillus subtilis*." Journal of Bacteriology **188**(8): 3130-3133.
227. **Worrall, J. A. R., M. Gorna, et al.** (2008). "Reconstitution and analysis of the multienzyme *Escherishia coli* RNA degradosome." Journal of Molecular Biology **382**(4): 870-883.
228. **Xia, B., H. P. Ke, et al.** (2002). "The cold box stem-loop proximal to the 5'-end of the *Escherishia coli* cspA gene stabilizes its mRNA at low temperature." Journal of Biological Chemistry **277**(8): 6005-6011.
229. **Yamanaka, K., L. Fang, et al.** (1998). "The CspA family in *Escherishia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation." Molecular Microbiology **27**(2): 247-255.
230. **Yamanaka, K. and M. Inouye** (2001). "Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherishia coli*." Journal of Bacteriology **183**(9): 2808-2816.
231. **Yamanaka, K., M. Mitta, et al.** (1999). "Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock cspA mRNA of *Escherishia coli*." Journal of Bacteriology **181**(20): 6284-6291.
232. **Yu, E. and G. W. Owttrim** (2000). "Characterization of the cold stress-induced cyanobacterial DEAD-box protein CrhC as an RNA helicase." Nucleic Acids Research **28**(20): 3926-3934.
233. **Zhu, K., X. Ding, et al.** (2005). "Exogenous isoleucine and fatty acid shortening ensure the high content of anteiso-C-15 : 0 fatty acid required for low-temperature

- growth of *Listeria monocytogenes*." Applied and Environmental Microbiology **71**(12): 8002-8007.
234. **Zuber, P.** (2009). "Management of Oxidative Stress in *Bacillus*." Annual Review of Microbiology **63**: 575-597.
235. **Zwietering, M. H., I. Jongenburger, et al.** (1990). "modeling of the bacterial-growth curve." Applied and Environmental Microbiology **56**(6): 1875-1881.

Valorisation du travail de thèse

Publications scientifiques

1. Broussolle, V., **F. Pandiani**, N. Haddad, C. Michaud, F. Carlin, C. Nguyen-the and J. Brillard (2010). "**Insertional mutagenesis reveals genes involved in *Bacillus cereus* ATCC 14579 growth at low temperature.** *FEMS Microbiology Letters* 306(2): 177-183.
2. **Pandiani, F.**, J. Brillard, I. Bornard, C. Michaud, S. Chamot, C. Nguyen-The and V. Broussolle (2010). "**Differential Involvement of the Five RNA Helicases of *Bacillus cereus* ATCC 15479 to Low Growth Temperatures.**" *Applied and Environmental Microbiology* 76: 6692-6697

Communications scientifiques

Communications orales

1. **Pandiani, F.**, J. Brillard, C. Michaud, C. Nguyen-the and V. Broussolle (2009). **Implication de 3 hélicases à ARN dans l'adaptation au froid de *Bacillus cereus* ATCC14579.** Réseau francophone *Bacillus cereus*. Avignon, France.
2. **Pandiani, F.**, J. Brillard, C. Michaud, S. Chamot, C. Nguyen-the and V. Broussolle (2010). **Role des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid de *Bacillus cereus* ATCC14579.** VIIIème congrès de la Société Française de Microbiologie. Marseille, France
3. **F. Pandiani**, I. Iost, J. Brillard, C. Michaud, S. Chamot, I. Bornard, C. Nguyen-the et V. Broussolle (2010). **Role des hélicases A ARN dans l'adaptation au froid de *Bacillus cereus* ATCC 14579.** Ecole chercheur de microbiologie moléculaire. Giens, France

Communications affichées

4. **Pandiani, F.**, J. Brillard, C. Michaud, C. Nguyen-the and V. Broussolle (2009). "**Maintien du fonctionnement cellulaire à basse température: implication des hélicases à ARN chez la bactérie pathogène de l'Homme *Bacillus cereus*".** 3eme journée de l'école doctorale Sciences des Procédés Sciences des aliments. Montpellier, France
5. **Pandiani, F.**, J. Brillard, C. Michaud, C. Nguyen-the and V. Broussolle (2009). **RNA helicases are involved in the cold adaptation of *Bacillus cereus* ATCC14579.** International *Bacillus anthracis, Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis* conference. Santa Fe, USA
6. **Pandiani, F.**, J. Brillard, M.-H. Guinebretière, F. Carlin, C. Nguyen-the and V. Broussolle (2010). **RNA helicases are involved in the cold adaptation of *Bacillus cereus* ATCC14579.** Journée des microbiologistes de l'INRA. Poitiers, France
7. **Pandiani, F.**, J. Brillard, I. Iost, C. Michaud, S. Chamot, C. Nguyen-the and V. Broussolle (2010). **RNA helicases are involved in the cold adaptation of *Bacillus cereus***

ATCC14579. VIIIème congrès de la Société Française de Microbiologie. Marseille, France

Expérience complémentaire

Monitorat conseil en entreprise au sein de la Société LDC, fabricant de plats prêts à consommer. Ce monitorat représente 32 jours de travail au sein de cette entreprise pour des missions de conseils concernant les problèmes microbiologiques identifiés sur site. Cette expérience m'a permis de mettre en oeuvre, sur des cas pratiques, les connaissances théoriques acquises au cours de mon cursus universitaire ainsi que de mes 3 années de travail de thèse.

Réseau francophone *Bacillus cereus*. Avignon, France (communication orale)

**Implication de 3 hélicases à ARN dans l'adaptation au froid
de *Bacillus cereus* ATCC14579**

F. Pandiani, J. Brillard, C. Michaud, C. Nguyen-the, V. Broussolle
UMR408 INRA-Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse,
Site Agroparc, F-84000 Avignon, France

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste, responsable de toxi-infections alimentaires, dont certaines souches mésophiles et productrices de toxines, peuvent se développer aux températures de réfrigération des aliments. Le froid est un paramètre qui perturbe les systèmes biologiques, tant sur le plan physiologique que métabolique. A basse température, les ARNm peuvent former des structures secondaires qui empêchent la phase de reconnaissance du site d'initiation de la traduction par les ribosomes. Le déroulement de ces structures stabilisées au froid est réalisé par certaines hélicases à ARN, permettant la reprise de la traduction. Certaines de ces enzymes permettent également la dégradation des ARNm, d'autres seraient impliquées dans la conformation de ribosomes adaptés pour la transcription à basse température.

L'analyse *in silico* du génome de la souche mésophile ATCC14579 a révélé la présence de 5 gènes codant pour des hélicases à ARN. Notre objectif est de déterminer l'implication possible de ces protéines dans l'adaptation à basse température de *B. cereus*. L'étude de l'expression de ces gènes a montré qu'ils sont fortement surexprimés à 10°C par rapport à 37°C et de manière variable au cours de la croissance. Quatre mutants de délétion ont été construits par échanges alléliques et caractérisés. Trois des ces mutants ne présentent plus de croissance à 10°C, et sont aussi plus sensibles à des stress acides et oxydants. Un mutant est non affecté à basse température et présente une résistance supérieure à celle de la souche sauvage aux stress acides et oxydants. Les limites de croissance à basse température diffèrent selon les mutants, suggérant un domaine de température d'intervention variable selon l'hélicase impliquée. La morphologie des cellules des mutants à basse température est affectée, ce qui pourrait être lié à un défaut de division. Il est probable que certaines grandes fonctions telles que la réplication, la transcription et la traduction soient affectées par la délétion de ces hélicases à ARN, ces hypothèses sont en cours de démonstration.

VIIIème congrès de la Société Française de Microbiologie. Marseille, France.
(communication orale et poster)

**Role des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid
de *Bacillus cereus* ATCC 14579**

F. Pandiani, J. Brillard, C. Michaud, C. Nguyen-the, V. Broussolle. UMR408 INRA-Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, Site Agroparc, F-84000 Avignon, France

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste, responsable de toxi-infections alimentaires, dont certaines souches mésophiles et productrices de toxines, peuvent se développer aux températures de réfrigération des aliments. Le froid est un paramètre qui perturbe les systèmes biologiques, tant sur le plan physiologique que métabolique. A basse température, les ARNm peuvent former des structures secondaires qui empêchent la phase de reconnaissance du site d'initiation de la traduction par les ribosomes. Le déroulement de ces structures stabilisées au froid est réalisé par certaines hélicases à ARN, permettant la reprise de la traduction. Certaines de ces enzymes permettent également la dégradation des ARNm, d'autres seraient impliquées dans la conformation de ribosomes adaptés pour la transcription à basse température.

L'analyse *in silico* du génome de la souche mésophile ATCC14579 a révélé la présence de 5 gènes codant pour des hélicases à ARN. Notre objectif est de déterminer l'implication possible de ces protéines dans l'adaptation à basse température de *B. cereus*. L'étude de l'expression de ces gènes a montré qu'ils sont fortement surexprimés à 10°C par rapport à 37°C et de manière variable au cours de la croissance. Cinq mutants de délétion ont été construits par échanges alléliques et caractérisés. Trois des ces mutants ne présentent plus de croissance à 10°C, et sont aussi plus sensibles à des stress acides et oxydants. Un mutant, non affecté à basse température présente une résistance supérieure à celle de la souche sauvage aux stress acides et oxydants. L'étude de l'intégrité membranaire des 3 mutants suggère que l'incapacité à croître à basse température, n'est pas due à une augmentation de la mortalité, mais à une incapacité à s'adapter au stress froid. Les limites de croissance à basse température diffèrent selon les mutants, suggérant un domaine de température d'intervention variable selon l'hélicase impliquée. La morphologie des cellules des mutants à basse température est affectée, ce qui pourrait être lié à un défaut de division. Il est probable que certaines grandes fonctions telles que la réplication, la transcription et la traduction soient affectées par la délétion de ces hélicases à ARN, ces hypothèses sont en cours de démonstration.

VIIIème congrès de la Société Française de Microbiologie. Marseille, France. (Communication orale et poster)



RNA helicases are involved in the cold adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579



F. Pandiani¹, J. Brillard¹, I. Iost², C. Michaud¹, S. Chamot¹, I. Bornard³, C. Nguyen-the¹, V. Broussolle¹

¹INRA, UMR408 Université d'Avignon, Site Agroparc, F-84000 Avignon, France - franc.pandiani@avignon.inra.fr
²Université Victor Segalen Bordeaux II, INSERM U869, F-33076 Bordeaux, France - ³Unité de pathologie végétale F84143 Montpellier, France

Bacillus cereus is a common cause of foodborne poisonings. A better control of *B. cereus* survival and growth during food storage is expected from a better understanding of adaptation at low temperature. Cold induces physiological and metabolic alterations of biological systems. At low temperature, mRNAs may form stable secondary structures that prevent the initiation of translation by ribosomes. The unwinding of mRNA secondary structures of some bacteria depends on RNA helicases that may allow the resumption of translation at low temperature.

Are RNA helicases implicated in *B. cereus* adaptation at low temperature?

1- Expression of RNA helicase genes at 10°C vs 37°C

Fig.2: Gene expression analysis by qRT-PCR. RNA were extracted at different times of regulated batch cultures of *B. cereus* grown at 10°C and 37°C. Mean fold change of two independent cultures.

- The 5 RNA helicase genes are overexpressed at 10°C, whatever the growth stage.
- The overexpression at 10°C is maximal during lag phase and at the beginning of stationary phase.

The expression profiles suggest the implication of RNA helicases in the early cold adaptation phase and at the beginning of stationary phase which could correspond to the end of the cold response.

2- Characterization of deletion mutants

Fig.2: Growth at 10°C of WT (red circles), mutant $\Delta cshA$ (blue squares), mutant $\Delta cshB$ (orange triangles), mutant $\Delta cshC$ (purple diamonds).

Fig.3: Transmission electron micrographs of *B. cereus* WT(A), $\Delta cshA$ (B), $\Delta cshB$ (C) and $\Delta cshC$ (D) cells grown at low temperature.

- At 10°C, 3 of the 5 mutants, obtained by allelic exchange in ATCC 14579, have no more, or very impaired growth in comparison with WT strain (Fig 2), while the mutants grow as the WT at 30°C.
- These 3 mutants are not so affected by pH, aw, oxydant stresses.
- The shape and division of the mutant cells are affected compared to WT at low temperature only (Fig.3).
- However, for the 3 mutants the amount of viable cells is similar to the WT and at 30°C the shape of the mutant cells is the same as for WT.

The 3 RNA helicases are specifically implicated in the cold adaptation.

3- RNA stability

Fig.4: Total RNA samples extracted from WT, $\Delta cshA$, $\Delta cshA\Delta cshA$ at 15°C, 30°C and 37°C run on an Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 Nano LabChip.

- There is no difference in total RNA stability of the WT whatever the temperature.
- rRNA and rRNA are totally degraded in $\Delta cshA$ at 15°C.
- However, the stability of total RNA in $\Delta cshA$, is raised with the increase of the temperature. Indeed, at 37°C the RNA stability is the same between WT and $\Delta cshA$.
- The RNA stability of the complemented mutant $\Delta cshA\Delta cshA$ is close to the WT.

The RNA helicase CshA is essential for the maintain of RNA stability at low temperature

4- Ribosomal conformation

Fig.5: Polysome profile analysis: total RNA extracted from WT, $\Delta cshA$ and $\Delta cshA\Delta cshA$ strains grown at 15°C were layered onto 10%-40% sucrose gradients.

- No profil was obtained for the $\Delta cshA$ probably due to the RNA instability 15°C (Fig.4 and 5), or polysomes could also be less stable and more sensible to the degradation.
- In the complemented mutant $\Delta cshA\Delta cshA$ the 30S particle replient seems to be modified because it did not sedimentate like the 30S WT particle.

The RNA helicase CshA is implicated in the ribosome conformation and in the maintain stability of polysome stability at low temperature

Conclusion / Perspectives

Our results show that:

- B. cereus* possess 5 RNA helicase genes which are overexpressed at low temperature, indicating a possible recruitment in cold adaptation.
- 3 RNA helicases are necessary and specifically involved in growth at low temperature and seem necessary for normal cell shape and division at low temperature. This could indicate an impaired protein synthesis in the RNA helicase mutants.
- Indeed, at low temperature, CshA is essential for the maintain of RNA stability, in the conformation and in the stability of polysomes
- We will now focus on the identification of RNA helicase partners to determine wich could interact with cshA in its functions

The authors thank Frédéric Carlin for helpful discussions. These results are part of PhD of F. Pandiani supported by a grant of INRA and Regional Council PACA and was submitted in Applied environmental microbiology : F. Pandiani et al. The five RNA helicases are differentially involved in the cold adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579

tel-00765823, version 1 - 17 Dec 2012

Ecole chercheur de microbiologie moléculaire. Giens, France (communication orale)

**Rôle des hélicases à ARN dans l'adaptation au froid
de *Bacillus cereus* ATCC 14579**

**F. Pandiani¹, I. Iost², J. Brillard¹, C. Michaud¹, S. Chamot¹, I. Bornard³,
C. Nguyen-the¹ et V. Broussolle¹**

¹INRA, UMR408 Université d'Avignon, Site Agroparc, F-84000 Avignon, France

²UNIVERSITE VICTOR SEGALEN BORDEAUX II, INSERM U869, F-33076 BORDEAUX, FRANCE

³UNITE DE PATHOLOGIE VEGETALE F-84143 MONTFAVET, FRANCE

Bacillus cereus est un pathogène opportuniste, responsable de toxi-infections alimentaires, dont certaines souches peuvent se développer aux températures de réfrigération des aliments. Le froid perturbe les systèmes en modifiant notamment la conformation des ribosomes ou en stabilisant des structures secondaires d'ARNm, empêchant l'initiation de la traduction. Certaines enzymes, nommées ARN hélicases, seraient capables de restaurer une traduction fonctionnelle à basse température.

Le génome de *b. cereus* contient 5 gènes *csh* (*cold shock helicase*) codant pour des ARN hélicases (*cshA* à *cshE*), qui sont fortement surexprimées à 10°C par rapport à 37°C et de manière variable au cours de la croissance bactérienne. Trois des cinq mutants de délétion construits, ne présentent plus de croissance à 10°C, les cellules présentant néanmoins une intégrité membranaire intacte. Les limites de croissance basse du mutant différent suggérant ainsi un rôle ou une importance variable pour chacune des ARN hélicases. Le mutant $\Delta cshA$ présente le phénotype de sensibilité au froid le plus marqué et sa morphologie est très affectée à basse température. En outre, le gène *cshA* peut restaurer le phénotype sauvage du mutant cryosensible $\Delta cshB$. CshA aurait donc un rôle dominant dans l'adaptation au froid. La stabilité des ARN extraits des cellules $\Delta cshA$ est fortement réduite par rapport à la souche sauvage lors d'une baisse de température. L'absence de l'ARN hélicase CshA, qui est localisée préférentiellement avec la sous-unité ribosomale 30s, conduit également à un mauvais repliement du ribosome qui pourrait expliquer le défaut de croissance de ces cellules à basse température.

3eme journée de l'école doctorale Sciences des Procédés Sciences des aliments. Montpellier, France



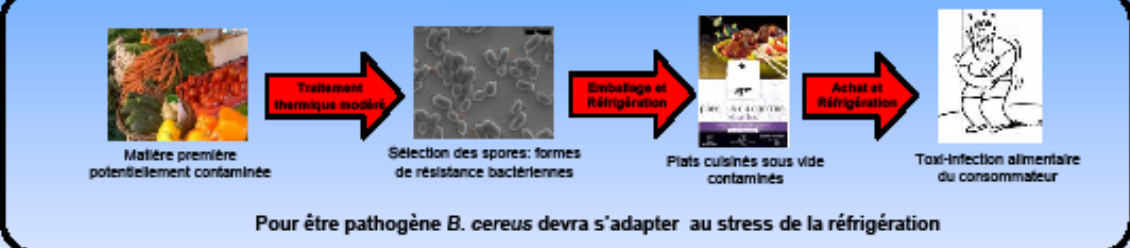
Maintien du fonctionnement cellulaire à basse température: implication des hélicases à ARN chez la bactérie pathogène de l'Homme *Bacillus cereus*



Franck Pandiani

Encadrement : V. Broussolle et C. Nguyen-the - UMR 408 (SQPOV) INRA-UAPV, Avignon – franck.pandiani@avignon.inra.fr

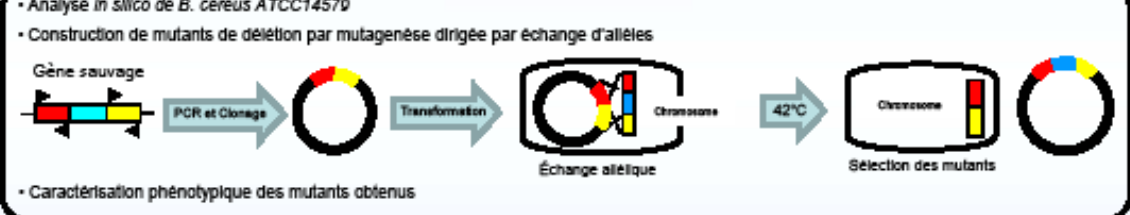
Introduction



Objectifs



Méthode



Résultat 1: Analyse in silico

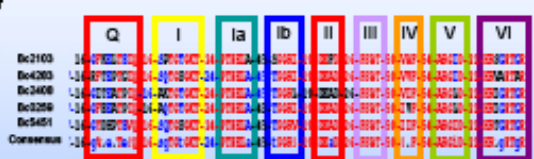


Figure1: Alignement des séquences protéiques des hélicases à ARN de *B. cereus* ATCC14579

- 5 gènes codant pour des hélicases à ARN identifiées dans le génome de *B. cereus* ATCC 14579 grâce à la conservation des 9 motifs caractéristiques de ces protéines
- Au sein des espèces appartenant au groupe *B. cereus*:
 - Le nombre de gènes d'hélicases est conservé
 - Les séquences de ces gènes sont extrêmement proches

Résultat 2: Caractérisation

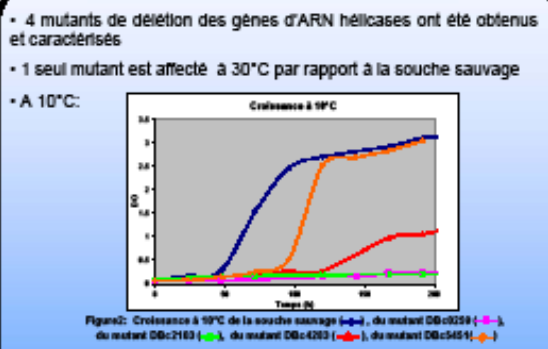


Figure2: Croissance à 10°C de la souche sauvage (□), du mutant DBc0259 (○), du mutant DBc2103 (◇), du mutant DBc4203 (▲), du mutant DBc5451 (△)

3 mutants de délétion ne présentent plus aucune croissance à basse température et sont fortement affectés dans leurs morphologies

Conclusions

- 5 hélicases à ARN ont été mises en évidence dans le génome de *B. cereus* ATCC 14579, possédant tous les motifs caractéristiques de ces protéines.
 - Ces hélicases sont fortement conservées au sein du groupe *B. cereus*
 - 3 hélicases sur les 4 étudiées sont clairement impliquées dans l'adaptation au froid:
 - Absence de croissance pour les 3 mutants
 - Fortes modifications au niveau du phénotype

Remerciements à la Région PACA et au Département MCA pour le financement de ces travaux, à la société AGIC partenaire Socio-économique ainsi qu'à toute l'équipe microbiologie de l'unité 408 INRA d'Avignon

tel-00765823, version 1 - 17 Dec 2012

International *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* conference. Santa Fe, USA (Poster)

**RNA helicases are involved in the cold adaptation of
Bacillus cereus ATCC14579**

F. Pandiani, J. Brillard, C. Michaud, C. Nguyen-the, V. Broussolle. UMR408 INRA Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse, Site Agroparc, F-84000, Avignon, France

Bacillus cereus is a common cause of food borne diseases. To prevent its survival and growth during food processing and storage, it is relevant to study the mechanisms of its adaptation to stress conditions such as low temperatures. Cold induces physiological and metabolic alterations to biological systems. At low temperature, mRNAs usually form stabilised secondary structures that prevent the initiation of translation by ribosomes. RNA helicases have been described in the unwinding of mRNA secondary structures of some bacteria, allowing the resumption of translation at low temperature.

The aim of this study is to determine the role of RNA helicases in the cold adaptation of *B. cereus*. *In silico* analysis of the ATCC 14579 genome revealed the presence of 5 genes encoding RNA helicases. These genes are more expressed at 10°C than 37°C and expression varies during bacterial growth. Four mutants deleted for the RNA-helicase encoding genes were constructed and characterised. Three mutants do not grow any more at 10°C and are affected by acids and oxidative stress. The fourth mutant grow as well as the wild-type strain at low temperature and is more resistant to acids and oxidative stress than the WT. Each mutant has specific limits for minimum growth temperatures. Hence, it seems that each RNA helicase acts in a specific range of temperature. The shape of the mutant cells is affected when compared to the WT, which may be due to a default in cell division. Important functions such as replication, transcription, and translation are probably affected by RNA helicase deletions. Investigations to elucidate the implication of RNA helicase in these major functions are currently underway

International *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* conference. Santa Fe, USA (Poster)

Journée des microbiologistes de l'INRA. Poitier, France (Poster)



RNA helicases are involved in the cold adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579



F. Pandiani, J. Brillard, C. Michaud, C. Nguyen-the, V. Broussolle

INRA, UMR408 Université d'Avignon, Site Agroparc, F-84000 Avignon, France - franck.pandiani@avignon.inra.fr

Bacillus cereus is a common cause of foodborne poisonings. A better control of *B. cereus* survival and growth during food storage is expected from a better understanding of adaptation at low temperature. Cold induces physiological and metabolic alterations of biological systems. At low temperature, miRNAs may form stable secondary structures that prevent the initiation of translation by ribosomes. The unwinding of mRNA secondary structures of some bacteria depends on RNA helicases that may allow the resumption of translation at low temperature.

Are RNA helicases implicated in *Bacillus cereus* adaptation at low temperature ?

1- In silico analysis



Fig. 1: Schematic representation of AA sequence alignment of the five *B. cereus* RNA helicases.

- The *B. cereus* ATCC 14579 genome contains five RNA helicases which are members of DEAD box helicase family based on the presence of the nine specific conserved motifs involved in ATP hydrolysis activities (motifs Q, I, II, and III), RNA binding and unwinding activities (motifs Ia, Ib, IV, V, VI).

- These RNA helicases exhibit 99% identities within the *B. cereus* Group and less than 60% with the 5 *E. coli* RNA helicases and less than 75% with the 4 *B. subtilis* RNA helicases.

➔ *B. cereus* helicases seem to be original compared to the helicases from *E. coli* and *B. subtilis*.

2- Expression of RNA helicase genes at 10°C vs 37°C

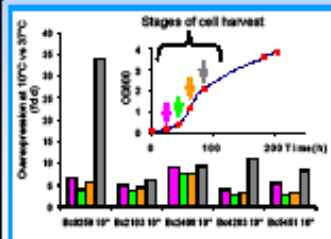


Fig. 2: Gene expression analysis by qRT-PCR. RNA were extracted at different times of regulated batch cultures of *B. cereus* grown at 10°C and 37°C. Mean fold change of two independent cultures.

- The 5 RNA helicase genes are overexpressed at 10°C, whatever the growth stage
- The overexpression at 10°C is maximal during lag phase and at the beginning of stationary phase.

➔ The expression profiles suggest the implication of RNA helicases in early stage which corresponds to a cold adaption phase and in the beginning of stationary phase which could correspond to the end of the cold response.

3- Characterisation of deletion mutants

- 3 mutants were obtained by allelic exchange (BC0259, BC2103, BC4283) in ATCC 14579

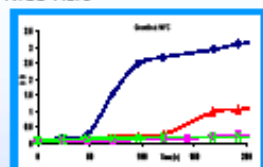


Fig. 3: Growth at 10°C of WT (red), mutant ΔBC0259 (blue), mutant ΔBC2103 (green), mutant ΔBC4283 (orange).

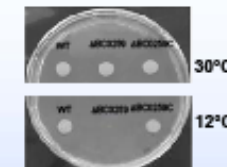


Fig. 4: Growth at 30°C and 12°C on LB agar of WT strain, ΔBC0259 and ΔBC0259 (complemented mutant).

- At 10°C, the 3 mutants have no more, or very impaired growth in comparison with WT strain (Fig 3), while the mutants grow as the WT at 30°C. These phenotypes are more pronounced than *E. coli* helicase mutants.

- Complementation of ΔBC0259 restores the WT phenotype (Fig 4).

- Mutants which have not grown at 10°C, are able to grow when transferred to 30°C (not shown). Helicase deletions are non lethal.

➔ The 3 RNA helicases are specifically implicated in the cold adaptation.

4- Mutants morphology

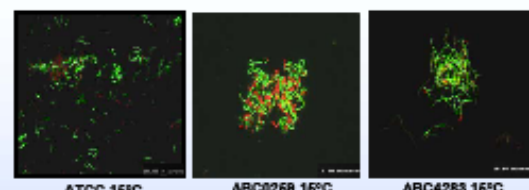


Fig. 5: Fluorescence microscopy observation of viability of WT strain, ΔBC0259 and ΔBC4283. Live bacteria are stained fluorescent green by SYTO9 6 stain, and dead bacteria are stained fluorescent red by propidium iodide.

- The shape and division of the mutant cells are affected compared to WT: ΔBC0259 cells are organized in long and large filamentous cells; ΔBC4283 cells are longer than WT cells and form chains.

- However, for both mutants the amount of viable cells is similar to the WT and at 30°C the shape of the mutant cells is the same as for WT.

➔ The modification of cell shape in cold conditions, without an increased cell death, means that RNA helicases might have a role in a cold-specific mechanism involved in cell division.

Conclusion / Perspectives

Our results show that:

- B. cereus* possess 5 RNA helicase genes which are overexpressed at low temperature, indicating a possible recruitment in these conditions.
- 3 RNA helicases are necessary and specifically involved in the ability of growth at low temperature. In addition they seem necessary for normal cell shape and division at low temperature. This could indicate a dysfunction in protein synthesis in the helicase mutants.
- We will focus on the identification of RNA helicase partners to determine the mechanisms in which these RNA helicases could be implicated, such as ribosomes conformation, and global stability level of mRNA. We will also study the possible specific regulation at low temperature of these RNA helicase genes.

Acknowledgements

The authors thank Stephanie Chamot and Isabelle Bonard for fluorescence microscopy, and Frédéric Carlin for helpful discussions. These results are part of PhD of F. Pandiani supported by a grant of INRA and Regional Council PACA. We thank the « Académie d'Agriculture Française » for the attribution of a research grant.

Résumé

Bacillus cereus est une bactérie largement disséminée dans la nature, contaminant ainsi les aliments en contact avec le sol. En France, cette bactérie est considérée comme le quatrième agent de toxi infection alimentaire collective. Pour être pathogène, *B. cereus* doit être capable de se multiplier lors des différentes étapes de transformation et notamment au cours de la réfrigération. Le but de cette étude a été d'étudier les mécanismes moléculaires de la réponse adaptative au froid et en particulier le rôle des hélicases à ARN de *B. cereus* ATCC 14579. Le gène *cshA*, codant pour une hélicase à ARN putative, a été identifié par une approche de mutagenèse aléatoire, comme jouant un important dans l'adaptation au froid de *B. cereus*. La souche ATCC 14579 possède 5 gènes codant pour des hélicases à ARN, *cshA* à *cshE* qui sont tous fortement surexprimés à 10°C par rapport à 37°C et quel que soit le stade de croissance considéré. La délétion simple des gènes *cshA*, *cshB* et *cshC* conduit à l'apparition de phénotypes cryosensibles, se traduisant par une incapacité d'adaptation au froid par rapport à la souche sauvage, associée à une modification de la morphologie cellulaire. De plus, CshA, CshB et CshC possèdent chacune un domaine de température où leur action est prépondérante. Elles semblent également être impliquées dans l'adaptation au stress oxydant et au stress basique, alors que CshD et E n'ont pas de rôle dans l'adaptation aux stress testés. Nous avons montré que CshA est indispensable à basse température, pour permettre le maintien de la stabilité des ribosomes avec lesquels elle interagit directement, mais aussi pour réguler la dégradation des ARNr. L'identification des partenaires protéiques interagissant avec CshA suggèrent qu'elle puisse être également impliquée dans un complexe de dégradation des ARN.

Abstract

Bacillus cereus is a widespread bacteria, thus contaminating all raw materials in contact with soil. In France, *B. cereus* is considered as the fourth causative agent of foodborne illness. To be pathogenic, *B. cereus* should multiply during the various stages of food processing and particularly during preservation at low temperature. The aim of this study was to study molecular mechanisms of the adaptive response at low temperature and more precisely the involvement of the *B. cereus* ATCC 14579 RNA helicases. The *cshA* gene encoding a putative RNA helicase was identified by a random mutagenesis approach, as playing a major role in cold adaptation of *B. cereus*. The ATCC 14579 strain possesses 5 genes encoding putative RNA helicases, *cshA* to *cshE*, which were all strongly overexpressed at 10°C versus 37°C, whatever the growth stage. The simple deletion of *cshA*, *cshB*, and Δ *cshC* lead to a cold-sensitive phenotype, resulting in an inability to adapt at 10 °C compared to the wild type strain, associated to a huge modification of cell morphology. In addition, CshA, CshB and CshC have a temperature range where their action is decisive. The role of these three RNA helicases also appears to be important in adaptation to oxidative and basic stresses while CshD and E did not appear to be involved in the adaptation to the tested stresses. The RNA helicase CshA has the most important role in adaptation to cold. We demonstrated that CshA is essential at low temperature to allow the maintenance of ribosome stability. CshA interacts directly with ribosomes, and also regulate rRNA degradation. The identification of protein partners that interact with CshA suggests that it could be involve in a complex of RNA decay

Discipline: Biotechnologie, Microbiologie

Mots clés: *Bacillus cereus*, hélicase à ARN, froid, stress, adaptation

