

## **Facteurs de virulence de *Bacillus anthracis***

Flateau Clara, Klezovich Maria  
Tuteur : Dr Agnès Fouet

### Résumé (195 mots)

*Bacillus anthracis* est un bacille Gram positif, capable de persister durablement dans un environnement défavorable sous forme sporulée, qui est la forme infectante. Il est responsable de la maladie du charbon chez les mammifères, souvent mortelle en l'absence de traitement. Sa virulence est due à la production d'une toxine, et à la protection par une capsule. L'expression des gènes codant les facteurs de virulence (toxine et capsule) est sous la dépendance d'un régulateur appelé AtxA, lui-même contrôlé par deux promoteurs, P1 et P2. L'activité de la protéine AtxA dépend de sa phosphorylation sur deux résidus histidine localisés dans des domaines « PRD ».

Sous forme sporulée, *B. anthracis* est entouré d'une enveloppe externe appelée exosporium. La protéine BclB est présente dans la couche basale de l'exosporium, et est nécessaire à la synthèse normale et à la solidité de celui-ci. La protéine BclA constitue la couche externe. Ces deux protéines sont synthétisées dans la cellule mère, puis ciblées vers et ancrées dans l'exosporium grâce à leur extrémité N-terminale. Pour BclA, une séquence conservée (acides aminés 25 à 35) permet le ciblage correct des protéines, et les acides aminés 1 à 19 permettent leur ancrage dans l'exosporium.

Total : 1597 mots

## Références

- Bongiorni C, Fukushima T, Wilson AC, Chiang C, Mansilla MC, Hoch JA, Perego M. Dual promoters control expression of the *Bacillus anthracis* virulence factor AtxA. *J Bacteriol* 2008 190:6483-92.
- Dai Z, Sirard JC, Mock M, Koehler TM. The atxA gene product activates transcription of the anthrax toxin genes and is essential for virulence. *Mol Microbiol*. 1995, 16:1171-81.
- Fouet A, Mock M. Regulatory networks for virulence and persistence of *Bacillus anthracis*. *Curr Opin in microbiology* 2006, 9:160-166.
- Henriques AO, Moran CP Jr. Structure, assembly and functions of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol* 2007, 61: 555-88.
- Mock M, Fouet A. Anthrax. *Annu Rev Microbiol*. 2001;55:647-71
- Sylvestre P, Couture-Tosi E, Mock M. A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol Microbiol*. 2002 45: 169–178
- Thompson BM, Waller LN, Fox KF, Fox A, Stewart GC. The BclB glycoprotein of *Bacillus anthracis* is involved in exosporium integrity. *J Bacteriol* 2007 189: 6704-13.
- Thompson BM, Stewart GC. Targeting of the BclA and BclB proteins to the *Bacillus anthracis* spore surface. *Mol Microbiol*. Published ahead of print.
- Tsvetanova B, Wilson AC, Bongiorni C, Chiang C, Hoch JA, Perego M. Opposing effects of histidine phosphorylation regulate the AtxA virulence transcription factor in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol*. 2007, 63:644-55

## **Introduction**

*Bacillus anthracis* est une bactérie à Gram positif, responsable de la maladie du charbon chez les herbivores, et transmissible à l'homme. Sa virulence provient de la protection par une capsule, et de la production d'une toxine tripartite. L'expression de ces facteurs de virulence est sous la dépendance d'un régulateur transcriptionnel central appelé AtxA. *B. anthracis* existe sous forme sporulée, qui est la forme de persistance dans l'environnement et la forme infectante, et sous forme végétative dans l'hôte mammifère. La forme sporulée est entourée d'une couche externe protéique, ou exosporium, comportant les protéines BclA et BclB. Cet exosporium, présent chez *B. anthracis*, est absent dans certaines autres espèces, dont *B. subtilis* qui est le modèle le plus souvent utilisé pour l'étude des *Bacillus*. Nous récapitulerons les mécanismes de régulation d'AtxA, ainsi que les mécanismes d'ancrage dans l'exosporium de BclA et BclB.

## **I) Régulation d'AtxA**

AtxA est un régulateur transcriptionnel central de l'expression des gènes de virulence mais également de nombreux autres gènes situés sur les deux plasmides et sur le chromosome.

AtxA régule positivement la transcription des trois gènes de toxine (*pagA*, *lef* et *cya*). L'opéron *cap* est contrôlé par AtxA par l'intermédiaire des produits de deux gènes *acpA* et *acpB*. Il a été démontré par les études antérieures que le gène *atxA* peut être transcrit à partir d'un promoteur, appelé P1.

### **1) Régulation transcriptionnelle d'*atxA***

Afin de mieux comprendre la régulation de l'expression du gène *atxA*, la région en amont du P1 a été étudiée.

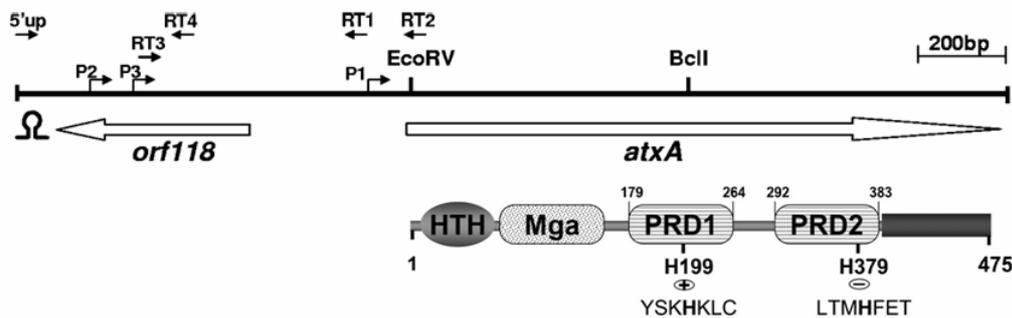
Le gène pXO1-118 se trouve 357pb en amont du gène *atxA*. Pour identifier le rôle de ce gène chez *B. anthracis*, une approche génétique par délétion du gène pXO1-118 a été utilisée. La délétion de la séquence contenant le gène pXO1-118 induit une diminution d'environ 50% de l'expression du gène *pagA*, qui est le rapporteur de l'activité d'AtxA.

La complémentation en *trans* par la protéine pXO1-118 ne restaure pas la production de PA, ce qui indique que c'est l'ADN du gène pXO1-118 en *cis* et non pas le produit de ce gène ou l'ADN en *trans* qui est nécessaire à l'expression complète du gène *pagA*.

Une série de différentes constructions plasmidiques contenant les fragments de taille variable en amont du gène *atxA* a été construite et le niveau d'expression du gène *atxA* a été mesuré.

Cette approche expérimentale a confirmé que la transcription complète du gène *atxA* nécessite la présence d'un fragment de 900pb en amont du codon de démarrage de traduction ATG. Par RT-PCR, il a été confirmé que l'ARNm du gène *atxA* s'étend en amont jusque dans la région correspondant au gène pXO1-118 (Figure 1). Il y a donc bien un promoteur à l'intérieur du gène pXO1-118 qui contribue à la transcription du gène *atxA* en complément du promoteur P1.

**Figure1** : Représentation schématique du gène *atxA* et de la structure de la protéine AtxA.



Il a ainsi été montré que le gène *atxA* peut être transcrit à partir de deux promoteurs indépendants : un promoteur P1, localisé 99 pb en amont d'ATG et un autre promoteur additionnel P2, localisé au sein de la séquence codante du gène pXO1-118, 744 pb en amont d'ATG.

## 2) Régulation post-traductionnelle de l'activité d'AtxA

L'analyse bioinformatique de la séquence peptidique d'AtxA a révélé son organisation structurale. La région centrale de la protéine AtxA contient deux domaines de régulation PTS (système de la phosphotransférase phosphoénolpyruvate-dépendante) (PRD). Les deux résidus histidines hautement conservés H199 et H379 se trouvent au sein de ces deux domaines régulateurs PTS: PRD1 et PRD2 respectivement. Ces résultats suggèrent que la protéine AtxA appartient à la famille des protéines contenant des PRD. Ce domaine PRD est phosphorylable sur les résidus histidine conservés et ceci intervient dans la régulation de l'activité de ces protéines.

Le PTS est un système enzymatique complexe permettant le transport et la phosphorylation concomitante de substrats carbonés appelés sucres-PTS.

La mutagenèse spécifique de ces sites dans la protéine AtxA a été utilisée afin de connaître le rôle de résidus histidine conservés au sein de domaines PRD1 et PRD2.

Le rôle de ces histidines a été étudié par des substitutions d'acides aminés. La substitution d'une histidine par un aspartate ou par une alanine bloque la protéine AtxA respectivement dans sa forme phosphorylée ou non-phosphorylée au site correspondant. Il a été établi que la phosphorylation sur le résidu H199 stimule l'activité d'AtxA, alors que la phosphorylation sur le résidu H379 résulte en l'absence de la transcription à partir du promoteur *pagA* dépendant d'AtxA.

Ainsi, la régulation de la production des facteurs de virulence chez *B.anthraxis* peut être liée au métabolisme des sucres. La délétion chez *B.subtilis* du gène *ptsHI* qui code les protéines générales du PTS, l'enzyme I (EI) et HPr (Histidin containing Protein), affecte positivement l'activité d'AtxA.

Les résultats obtenus donnent une première explication de la régulation post-traductionnelle de l'activité de la protéine AtxA par le système PTS via la phosphorylation/déphosphorylation sur les résidus histidines conservés du « domaine régulateur PTS ». De plus, un lien entre la production de facteurs de virulence et le métabolisme de sucres a été démontré chez *B. subtilis*.

## **II) Ancrage de BclA et BclB dans l'exosporium de *Bacillus anthracis***

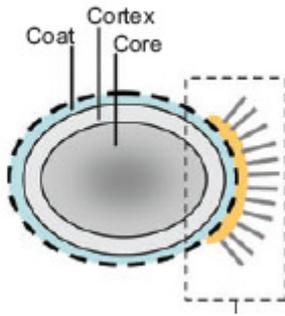
La spore est constituée d'un noyau (ou « core ») entouré de deux couches de peptidoglycane recouvertes d'un manteau protéique (ou « coat »). Chez *B. anthracis*, une enveloppe supplémentaire appelée exosporium entoure le manteau.

L'exosporium de *B. anthracis* comporte une couche interne formée d'une douzaine de composants protéiques dont la protéine BclB, et une couche externe formée de la protéine BclA [Sylvestre 2002]. Ces deux protéines présentent une parenté de structure : toutes deux sont des protéines collagen-like glycosylées, dont l'extrémité N-terminale comporte une séquence conservée.

La synthèse de l'exosporium commence à un pôle de la future spore, sous forme d'une petite zone recouvrant un tiers de la préspore, le « cap », puis s'étend de proche en proche, jusqu'à couvrir toute la surface (figure 2).

Figure 2 : Spore au début de la synthèse de l'exosporium

Dans le rectangle en pointillés sont schématisés les filaments de BclA.



### 1) Ancrage et fonction de BclB

BclB est présente dans la couche basale de l'exosporium et dans le manteau. L'étude de souches mutantes de *B. anthracis* dépourvues de BclB montre des modifications phénotypiques de la surface de la spore en microscopie à balayage. L'exosporium (identifié par des anticorps anti-BclA marqués à l'or) est présent, mais d'aspect modifié, et sur 40% des bacilles, il est soit absent à un pôle, soit très altéré. Il existe des débris d'exosporium dans le milieu après lyse de la cellule-mère. BclB est donc important pour la mise en place de l'exosporium. [Thompson 2007]. Le ciblage et l'ancrage de BclB ont été étudiés par des protéines de fusion comportant l'extrémité N-terminale de BclB (incluant la séquence conservée) associée au promoteur de BclA et au DS-Red, exprimées dans une souche parentale (Figure 3). L'exosporium est alors incomplet. Cette région N-terminale permet donc le ciblage mais est insuffisante pour l'ancrage de BclB [Thompson 2008].

Figure 3 : Schéma de la protéine chimère comportant l'extrémité N-terminale de BclB fusionnée au DsRed.

La séquence conservée est en violet.

Les signaux de démarrage de transcription et de traduction sont indiqués.



L'absence de BclB dans les souches mutantes ne modifie pas la résistance de la spore aux stress physico-chimiques, qui dépend du manteau. En revanche, ces souches sont plus sensibles à un stress de déshydratation-réhydratation. BclB confère probablement à la spore une « flexibilité », qui lui permet normalement de s'adapter aux changements d'hydratation [Thompson 2007].

## 2) BclA : ancrage

La couche externe de l'exosporium est constituée de trimères de protéine BclA [Sylvestre 2002]. BclA est synthétisée dans le cytoplasme de la cellule-mère, puis ciblée et ancrée tout autour de la spore tandis que la quantité de BclA dans le cytoplasme de la cellule-mère diminue. Enfin, BclA reste fixée à la surface de la spore lors de sa libération, témoignant que BclA a été intégrée de manière stable dans celui-ci [Thompson 2008].

La région C-terminale est responsable de la formation de trimères stables de BclA. Néanmoins, des protéines recombinantes dépourvues de cette région s'intègrent dans l'exosporium, montrant que cette trimérisation n'est pas indispensable [Thompson 2008].

La région centrale est une région « collagen-like » glycosylée.

Le rôle de la région N-terminale de BclA dans l'ancrage de celle-ci a été étudié à partir de spores de *B. anthracis* exprimant des protéines recombinantes avec différents marqueurs rapporteurs [Thompson 2008]. Cette région N-terminale comporte deux régions-clé : les acides aminés 1 à 19 (absents de BclA native intégrée dans l'exosporium), et une séquence conservée (acides aminés 25 à 35 : LGVPTLPPIPP) (Figure 4).

Figure 4 : Schéma de la structure de l'extrémité N-terminale de BclA



Promoteur/ Met /19 acides aminés N-term

La flèche rouge correspond au site de clivage entre les acides aminés 19 et 20

Les acides aminés en violet sont la séquence conservée

En l'absence des 19 acides aminés N-terminaux (Figure 5), le ciblage et l'intégration de BclA sont normaux: ce n'est donc pas l'« événement » clivage de cette séquence qui est nécessaire, mais la conformation qu'il donne à la protéine. Avec la séquence conservée seule (Figure 6), sans les acides aminés 1 à 24, le ciblage de BclA s'effectue correctement, mais BclA se détache lors de la libération de la spore. En revanche, la délétion de la séquence conservée (Figure 7) perturbe le ciblage de BclA. Le ciblage de la protéine est donc dépendant de la séquence conservée, et l'ancrage de celle des 24 premiers acides aminés, dont les 19 premiers seront clivés pour stabiliser cet ancrage. Ce clivage intervient lorsque la protéine BclA a été ciblée tout autour de la spore. Un modèle résumant les différentes étapes du ciblage et de l'intégration de BclA dans l'exosporium est proposé dans la figure 8.

Figure 5: Représentation schématique de la protéine-chimère comportant l'extrémité N-terminale de BclA sans les acides aminés 1 à 19 couplé au GFP.



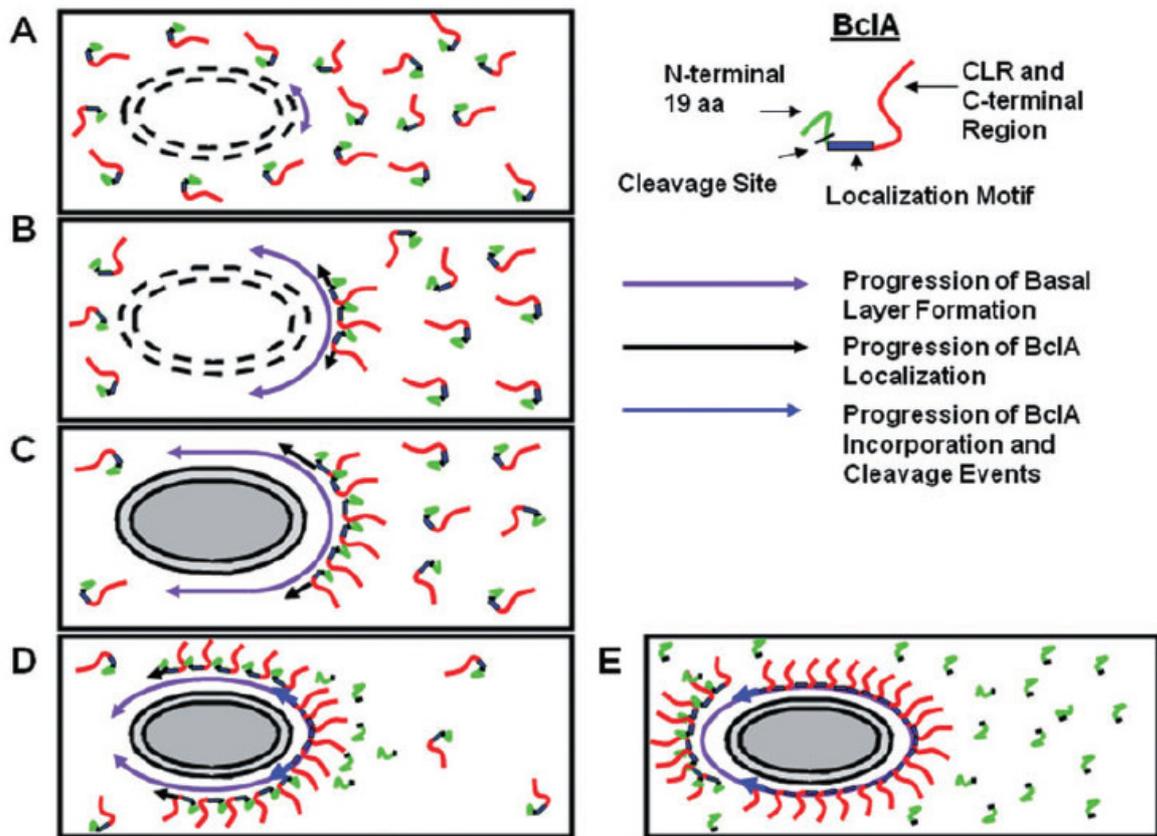
Figure 6: Représentation schématique de la protéine-chimère comportant la séquence conservée de BclA couplée au DsRed



Figure 7: Représentation schématique de la protéine-chimère comportant l'extrémité N-terminale de BclA sans la séquence conservée, couplée au DsRed.



Figure 8 :



**Fig. 9.** Model for BclA incorporation into the exosporium basal layer during sporulation in *B. anthracis*.  
 A. Production of BclA and appearance of fluorescence in the mother cell cytoplasm.  
 B. Localization of BclA to the pole of the spore (facing the mother cell compartment) following the progression of the basal layer around the spore.  
 C. Appearance of a visible spore, and continuation of BclA localization around the spore.  
 D. Progression of BclA localization across the spore, with a tailing cleavage event that incorporates the localized BclA into the basal layer. Free N-terminal residues are found in the mother cell cytoplasm.  
 E. Incorporation of the localized BclA proteins is almost complete, with subsequent increase in N-terminal peptides in the mother cell compartment. CLR is the collagen-like repeat domain of the BclA protein.

## Conclusion

Ces études démontrent deux nouveaux mécanismes de régulation d'AtxA : d'une part, au niveau transcriptionnel, l'existence d'un deuxième promoteur P2, en sus de P1 déjà identifié. D'autre part, la phosphorylation-déphosphorylation des histidines sur les sites PDR modifiant l'activité d'AtxA. Les études sur l'exosporium démontrent l'importance de l'extrémité N-terminale de BclA et BclB pour le ciblage et l'ancrage de ces protéines. Pour BclA, les rôles spécifiques de la séquence conservée et des 19 acides aminés N-terminaux ont été identifiés : respectivement le ciblage et l'ancrage dans l'exosporium.

