



**HAL**  
open science

# Understanding heme stress sensing systems by pathogens, to design new antibiotics

Delphine Lechardeur

► **To cite this version:**

Delphine Lechardeur. Understanding heme stress sensing systems by pathogens, to design new antibiotics. Bactériologie. Paris-Saclay, 2021. Français. NNT: . tel-03352425

**HAL Id: tel-03352425**

**<https://hal.inrae.fr/tel-03352425>**

Submitted on 23 Sep 2021

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

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

# Comprendre le mécanisme du système senseur d'hème des bactéries pathogènes, une cible antibiotique innovante

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 581, Agriculture, Alimentation, Biologie,  
Environnement et Santé (ABIES)  
Spécialité de doctorat: Microbiologie  
Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, 78350, Jouy-en-Josas,  
France.  
Faculté des Sciences

Thèse présentée et soutenue à Jouy-en-Josas, le  
18/11/2020, par

**Vincent SAILLANT**

### Composition du Jury

**Prénom NOM**

Titre, Affiliation

**Sarah DUBRAC**

Chargée de recherche (HDR), Institut Pasteur

**Axel HARTKE**

Professeur, Université de Caen

**Aurélié BALIARDA**

Maîtresse de conférence, AgroParisTech

**Philippe DELEPELAIRE**

Directeur de recherche, Université Paris Diderot

**Ursula LIEBL**

Directrice de recherche, Ecole Polytechnique

Président ou Présidente

Rapporteur & Examinatrice

Rapporteur & Examineur

Examinatrice

Examineur

Examinatrice

**Delphine LECHARDEUR**

Chargée de recherche (HDR), INRAE

Directrice de thèse



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Axel HARTKE et Sarah DUBRAC d'avoir accepté d'être mes rapporteurs de thèse. Je remercie également Aurélie BALIARDA, Philippe DELEPELAIRE et Ursula LIEBL d'avoir eu la gentillesse d'accepter de faire partie de mon jury de thèse.

De même un grand merci à Nadia IZADI-PRUNEYRE et à Patrick TRIEU-CUOT qui ont bien voulu participer à mon comité de thèse. Leurs questions et leurs remarques ont grandement fait avancer ce sujet.

Merci également à Stéphane AYMERICH de m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'institut MICALIS et ainsi que Alexandra GRUSS et Philippe GAUDU au sein de l'équipe MicrobAdapt. Merci à toute l'équipe MicrobAdapt pour votre aide et tous les conseils que vous m'avez apportés au cours de ces années passées ici. Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui ont pu participer à ce projet, Pascal ARNOUX, Géraldine BRANDELET, Alain BOUSSAC, Marten VOS, Arnaud FIRON et Odile SISMEIRO.

Delphine, notre première rencontre remonte à 5 ans pour ma première expérience en laboratoire, mon stage de M1. Première expérience, où construire un plasmide relevait du miracle... Depuis de l'eau a coulé sous les ponts avec de nombreux plasmides, mutants, prep de protéines à la clé. Tu m'as fait découvrir le monde de la science et tout appris de la vie de laboratoire. Je te remercie aussi pour toutes les opportunités que tu m'as données : les congrès à Boston et Lund, les expériences à Cadarache et les différentes collaborations que tu m'as proposées. Au cours de toutes ces années, tu as toujours été présente pour moi alors que je ne t'ai pas épargné surtout pendant cette dernière année. Je te remercie pour tous les efforts que tu as fournis pour moi jusqu'à la dernière ligne de ce manuscrit ! Merci Delphine pour tout !

Merci à toi Damien pour ces deux années passées avec moi dans le groupe hème, pour toute ton aide apportée sur le projet et les différentes expériences. Je ne pensais pas me faire un tel ami pendant cette thèse, merci de m'avoir soutenu et écouté. Je ne suis pas prêt d'oublier nos différentes soirées et notre escapade en Suède !

Je tiens aussi à remercier les deux stagiaires de M2 que j'ai eu la chance d'encadrer. Tout d'abord Hugo, alias Jesus, merci pour toutes ces péripéties en clonage et au volley, on aura bien rigolé pendant ces 6 mois ! Merci aussi à Emeline pour toute ton aide apportée sur la fin du projet et la révision du papier ! Bonne chance à tous les deux dans vos thèses respectives !

Au sein de l'équipe, je tiens à remercier plus particulièrement ma voisine de bureau Bénédicte avec laquelle j'aurais passé 3 années formidables remplies de fou rire, de conseils de « grand-mère »,

d'histoires sur Suli et on ne parlera pas des histoires de son fils ! Merci pour tous les conseils de clonage, les carrés de chocolat, les gâteaux et les corrections apportées à cette thèse. Je te souhaite une heureuse retraite ! Je tiens aussi à remercier Elise pour tous les conseils que tu m'as donnés que ce soit sur le travail ou la vie en générale. Merci pour toutes les pauses cafés et les after works qui m'ont permis de souffler pendant cette thèse ! J'espère que tous tes projets aboutiront ! Je remercie aussi Thierry, alias « sandalette chaussettes », pour tous ces passages impromptus avec de nombreuses blagues et contre pétris.

Merci à tous les membres du groupe « Beer team » : Elise, Damien, Julien, Laura, Olivier, Constance, Rym, Clémentine, Marina, les deux Laetitia pour tous les after works, on aura passé de super moments !

Merci à la team volley : Christelle, Damien, Hugo, Kim, Sébastien, Mathieu, Stéphane. Ce sport aura été mon défouloir durant toute cette thèse. Remerciement spécial pour Christelle qui aura été la seule à braver le Covid en continuant de jouer ces derniers mois. Merci pour ton soutien et ton écoute au cours de cette dernière ligne droite.

Merci à tous les membres du « repas jeunes », Renaud, Mounia, Pauline, Maude, Abarna, Romain, Simon, Marine, Lucie, Nay, Hasna, Delphine. Merci pour ces repas et ces discussions autour de la vie de thésard !

Merci à l'ensemble de la Boulangerie, depuis la première année d'agro vous êtes une seconde famille toujours là pour moi. De nombreux évènements festifs avec vous auront jalonné cette thèse me permettant de souffler et de penser à autre chose.

Merci à tous les Bisounours, car depuis le collège/lycée, nous ne nous sommes pas quittés et les retrouvailles sont à chaque fois de grands moments inoubliables.

Une pensée pour Eléonore, même si nous nous sommes éloignés, tu as été présente pour moi et m'a soutenu pendant ces deux ans. Tu as dû supporter tous mes sauts d'humeurs et me reconforter, et pour tout cela je tiens à te remercier. Bon courage à toi dans ta fin de thèse.

Enfin je voulais finir ces remerciements par les personnes auxquelles je tiens le plus. Sans vous je ne serais pas arrivé là où je suis. Noa, Evan, Lilou, Amandine, Karl et Fred vous êtes toujours là pour moi quand je redescends dans ma patrie Vertavienne. Et je voudrais finir par les deux femmes qui comptent le plus pour moi, Chrystelle et Stéphanie, mes deux sœurs à qui je dois tout. Vous avez toujours été là, à me pousser à réaliser mes rêves et si je suis là maintenant à soutenir cette thèse c'est grâce à vous. Malgré toutes les épreuves que nous avons eu à affronter, nous avons toujours été là les uns pour les autres et je suis sûre que même si elles ne sont plus là, il y a deux personnes qui doivent être fières de nous.

“All things are poison, and nothing is  
without poison, the dosage alone  
makes it so a thing is not a poison”  
Paracelsus (1493–1541)



# Table des matières

Liste des figures.....	7
Liste des tableaux .....	11
Liste des abréviations.....	13
Synthèse bibliographique .....	17
<b>A. Les systèmes bactériens de perception de l'environnement.....</b>	<b>17</b>
<b>A.1. Les systèmes à un composant, la voie de signalisation principale des bactéries.....</b>	<b>19</b>
<b>A.1.1. Qu'est-ce qu'un système à un composant (1-CS) ?.....</b>	<b>19</b>
A.1.1.1. Caractéristiques générales.....	19
A.1.1.2. Fonction des 1-CS.....	21
A.1.1.3. Mécanisme de perception des stimuli .....	23
A.1.1.1. La régulation transcriptionnelle, principale fonction effectrice des 1-CS.....	23
<b>A.1.1. Les 1-CS de la famille TetR .....</b>	<b>27</b>
A.1.1.1. Caractéristiques générales.....	27
A.1.1.2. Mécanisme de régulation transcriptionnelle.....	29
A.1.1.3. Un domaine senseur non conservé.....	31
<b>A.2. Les systèmes à deux composants .....</b>	<b>33</b>
<b>A.2.1. Organisation et fonctionnement des systèmes à deux composants.....</b>	<b>33</b>
<b>A.2.2. L'histidine kinase permet la perception des stimuli .....</b>	<b>35</b>
<b>A.2.3. Les protéines régulatrices permettent la réponse cellulaire .....</b>	<b>41</b>
<b>B. L'hème et les bactéries.....</b>	<b>45</b>
<b>B.1. Le paradoxe de l'hème.....</b>	<b>45</b>
<b>B.1.1. L'hème, une molécule ubiquitaire indispensable à la vie.....</b>	<b>45</b>
<b>B.1.2. La biosynthèse de l'hème.....</b>	<b>45</b>
<b>B.1.3. Toxicité de l'hème .....</b>	<b>49</b>
<b>B.1.4. Liaison entre l'hème et les protéines.....</b>	<b>49</b>
<b>B.2. Les principales utilisations métaboliques de l'hème chez les bactéries.....</b>	<b>53</b>
<b>B.2.1. Métabolisme respiratoire chez les bactéries à Gram positif .....</b>	<b>53</b>

B.2.1.1. Fonctionnement général de la chaîne respiratoire .....	53
B.2.1.2. Le cytochrome <i>bd</i> , une hémoprotéine aux multiples fonctions.....	57
<b>B.2.2. Les catalases à hème.....</b>	<b>59</b>
<b>B.2.3. Les oxygénases d'hème.....</b>	<b>61</b>
<b>B.3. Les sources d'hème dans l'hôte et les mécanismes d'acquisition par les bactéries à Gram positif.....</b>	<b>61</b>
<b>B.3.1. Les hémoprotéines du sang.....</b>	<b>63</b>
<b>B.3.2. L'hème dans le tractus digestif .....</b>	<b>67</b>
<b>B.3.3. Autres sources d'hème et de porphyrines .....</b>	<b>69</b>
<b>B.3.4. Les mécanismes d'acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram positif.....</b>	<b>71</b>
B.3.4.1. Acquisition de l'hème chez <i>Staphylococcus aureus</i> grâce au système Isd... 71	
B.3.4.2. Stratégie d'acquisition de l'hème chez <i>Corynebacterium diphtheriae</i> ..... 73	
<b>B.4. Contrôle de la toxicité de l'hème chez les bactéries à Gram positif .....</b>	<b>75</b>
<b>B.4.1. Séquestration de l'hème par des protéines chaperonnes .....</b>	<b>75</b>
B.4.1.1. L'alkylhydroperoxyde reductase (AhpC)..... 77	
B.4.1.2. Le système HsmRA de <i>Clostridium difficile</i> ..... 77	
B.4.1.3. Des chaperonnes potentielles .....	79
<b>B.4.2. Les systèmes d'efflux de l'hème.....</b>	<b>79</b>
B.4.2.1. Le système d'efflux HAT .....	79
B.4.2.2. Le système d'efflux de porphyrines Pef..... 81	
B.4.2.3. Le transporteur d'efflux HrtBA .....	83
<b>B.4.3. La régulation transcriptionnelle du transporteur d'efflux HrtBA .....</b>	<b>85</b>
B.4.3.1. La régulation par le régulateur transcriptionnel HrtR..... 85	
B.4.3.2. Les systèmes à deux composants ChrSA et HrrSA, régulateurs de l'expression de HrtBA chez les <i>Corynebacteriaceae</i> ..... 85	
B.4.3.3. Le système à deux composants HssRS .....	87
<b>C. <i>Enterococcus faecalis</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> sont deux pathogènes à Gram positif appartenant au phylum des firmicutes .89</b>	
<b>C.1. <i>Enterococcus faecalis</i>, une bactérie commensale du tube digestif et pathogène opportuniste.....</b>	<b>89</b>
<b>C.1.1. Caractéristiques générales.....</b>	<b>89</b>

<b>C.1.2. <i>Enterococcus faecalis</i> : pathogénèse .....</b>	<b>91</b>
C.1.2.1. Un impact sociétal important.....	91
C.1.2.2. Adaptabilité d' <i>E. faecalis</i> et stratégie de virulence.....	92
C.1.2.3. Emergence de résistance aux antibiotiques.....	93
<b>C.1.3. <i>Enterococcus faecalis</i> et l'hème .....</b>	<b>94</b>
<b>C.2. <i>Staphylococcus aureus</i> : une bactérie pathogène opportuniste .....</b>	<b>95</b>
<b>C.2.1. Caractéristiques générales.....</b>	<b>95</b>
<b>C.2.2. Pathogénèse.....</b>	<b>97</b>
C.2.2.1. Un problème de santé mondial.....	97
C.2.2.2. Un arsenal de facteurs de virulence.....	97
C.2.2.3. De nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	99
<b>C.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> et l'hème.....</b>	<b>101</b>
Objectifs de la thèse .....	105
Projet 1 : Caractérisation du contrôle de la toxicité de l'hème chez <i>Enterococcus faecalis</i> .....	109
<b>A. Résultats .....</b>	<b>109</b>
<b>A.1. Contexte .....</b>	<b>109</b>
<b>A.2. Publication 1 : Un nouveau régulateur de l'efflux de l'hème chez <i>Enterococcus faecalis</i> est un senseur d'hème dans le tractus digestif.....</b>	<b>110</b>
<b>A.2.1. Résumé .....</b>	<b>110</b>
<b>A.2.2. Manuscrit.....</b>	<b>111</b>
<b>A.2.3. Principales conclusions .....</b>	<b>177</b>
A.2.3.1. Identification et caractérisation de la régulation du transporteur d'efflux HrtBA <sub>Ef</sub> chez <i>E. faecalis</i> .....	177
A.2.3.2. FhtR contrôle la disponibilité de l'hème intracellulaire dans le tractus intestinal.....	179
<b>A.3. Caractérisation biochimique de FhtR .....</b>	<b>180</b>
<b>A.3.1. Caractérisation de la liaison de l'hème à FhtR.....</b>	<b>180</b>
<b>A.3.2. Détermination du ligand permettant la liaison de l'hème à FhtR.....</b>	<b>183</b>
<b>A.3.3. Détermination de la structure tridimensionnelle de FhtR par cristallographie (en collaboration avec P. ARNOUX, CEA, Cadarache) .....</b>	<b>186</b>

A.3.3.1. Production et purification de la protéine FhtR clivée .....	186
A.3.3.2. Obtention des cristaux.....	188
<b>A.4. Etude de la réponse à l'hème d'<i>Enterococcus faecalis</i> par une étude transcriptomique .....</b>	<b>190</b>
A.4.1. Réalisation de l'étude transcriptomique comparative entre <i>E. faecalis</i> OG1RF WT et $\Delta fhtR$ en présence ou non d'hème .....	190
A.4.2. FhtR un régulateur spécifique de HrtBA.....	191
A.4.3. D'autres systèmes d'efflux en réponse à l'hème.....	191
<b>B. Discussions et perspectives .....</b>	<b>193</b>
B.1. FhtR, un nouveau régulateur de l'opéron <i>hrtBA</i> chez <i>E. faecalis</i> .....	193
B.1.1. FhtR et l'hème.....	194
B.1.2. FhtR dans le monde bactérien.....	196
B.2. Impact du système de détoxification de l'hème FhtR/HrtBA sur le « fitness » et le métabolisme d' <i>Enterococcus faecalis</i> chez l'hôte.....	198
B.3. Autres gènes impliqués dans la résistance à l'hème chez <i>E. faecalis</i> .....	199
Projet 2 : Mécanisme du sensing de l'hème par HssS.....	201
<b>A. Résultats .....</b>	<b>201</b>
A.1. Contexte .....	201
A.2. Publication 2 : L'hème intracellulaire contrôle l'activité de l'histidine kinase HssS de <i>S. aureus</i> .....	202
A.2.1. Résumé .....	202
A.2.2. Manuscrit.....	202
A.2.3. Principales conclusions .....	262
<b>B. Discussions et perspectives .....</b>	<b>263</b>
B.1. HssS, une histidine kinase à senseur cytoplasmique .....	263
B.2. L'hème, une molécule essentielle pour <i>S. aureus</i> durant les infections ?..	265
Discussion générale .....	269
<b>A. La régulation de <i>hrtBA</i>.....</b>	<b>269</b>
<b>B. Mécanisme d'export de l'hème par HrtBA.....</b>	<b>273</b>
<b>C. Import de l'hème .....</b>	<b>274</b>

<b>D. Les systèmes senseur d'hème des bactéries pathogènes à Gram positif, des cibles antibiotiques innovantes .....</b>	<b>276</b>
Bibliographie.....	281
Annexes.....	303



## Liste des figures

<b>Figure 1 : Schéma général des principales voies de signalisation de l'adaptation bactérienne.</b> .....	16
<b>Figure 2 : Les trois voies de signalisation principales des procaryotes.</b> .....	18
<b>Figure 3: Diversité structurale des domaines senseurs et effecteurs des 1-CS.</b> .....	22
<b>Figure 4: Mécanismes d'activation et de répression transcriptionnels.</b> .....	25
<b>Figure 5: Le facteur de transcription TetR.</b> .....	26
<b>Figure 6: Classification des facteurs de transcription de la famille TetR (TFR) selon l'orientation et la proximité entre le gène codant le TFR et les gènes adjacents.</b> .....	29
<b>Figure 7: Exemple d'interaction d'un TetR, QacR, avec l'ADN.</b> .....	30
<b>Figure 8: Les trois étapes enzymatiques de phosphorylation des systèmes à deux composants.</b> .....	34
<b>Figure 9: Représentation schématique de trois différents mécanismes de perception des stimuli par les histidine kinases (HK).</b> .....	36
<b>Figure 10: Architecture d'une histidine kinase (HK) à senseur extracellulaire.</b> .....	38
<b>Figure 11: Classification des protéines régulatrices (RR).</b> .....	40
<b>Figure 12: L'hème (type <i>b</i>).</b> .....	44
<b>Figure 13: Représentation schématique des voies de biosynthèse de l'hème <i>b</i>.</b> .....	46
<b>Figure 14: Différentes interactions possibles de l'hème (type <i>b</i>).</b> .....	48
<b>Figure 15 : Exemples d'interaction d'hémoprotéines de bactéries avec l'atome de fer de l'hème (type <i>b</i>)</b> .....	50
<b>Figure 16: .Structure cristallographique de la protéine à domaine NEAT IsdC complexée à l'hème.</b> .....	50
<b>Figure 17 : Représentation schématique d'une chaîne respiratoire aérobie minimale (exemple de la chaîne respiratoire des bactéries lactiques).</b> .....	54
<b>Figure 18 : Représentation schématique du cytochrome <i>bd</i>.</b> .....	56
<b>Figure 19 : Principales fonctions cellulaires associées au cytochrome <i>bd</i>.</b> .....	56
<b>Figure 20 : Structure cristallographique de la catalase katA d' <i>Enterococcus faecalis</i>.</b> .....	58
<b>Figure 21 : Les différentes oxygénases d'hème.</b> .....	60
<b>Figure 22 : Mécanismes de séquestration de l'hème (chez les mammifères).</b> .....	64
<b>Figure 23 : Les systèmes d'acquisition de l'hème chez <i>Staphylococcus aureus</i>.</b> .....	70

Figure 24 : Les systèmes d'acquisition de l'hème chez <i>C. diphtheriae</i> .....	72
Figure 25 : Schéma récapitulatif des différentes stratégies de contrôle de l'homéostasie de l'hème chez les bactéries à Gram positif. ....	74
Figure 26 :Schéma du fonctionnement du système HatRT de <i>Clostridium difficile</i> .....	78
Figure 27 :Les systèmes de transport Pef de <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	80
Figure 28 : Structure cristallographique de la pompe d'efflux MacAB like de <i>Streptococcus pneumoniae</i> . ....	82
Figure 29 : Schéma des différents systèmes connus de régulation du transporteur HrtBA. ....	84
Figure 30 : Structure schématique de la protéine HssS chez <i>S. aureus</i> . ....	86
Figure 31 : Conservation de la séquence répétée de fixation de HssR dans la zone promotrice de <i>hrtBA</i> . ....	86
Figure 32 : Arbre phylogénétique des Firmicutes basé sur des séquences concaténées de sous-unités de polymérase ARN Rpoa, RpoB et RpoC.....	88
Figure 33 : Arbre phylogénétique des Entérocoques basé sur l'alignement de 526 copies de gènes de ménage.....	90
Figure 34 : Ensemble des facteurs de virulence contribuant à la pathogénèse et à la virulence de <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	96
Figure 35 : Représentation schématique des stratégies de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. ....	98
Figure 36 : Modèle du métabolisme de l'hème chez <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	100
Figure 37 : Impact de la réduction de l'hème sur la liaison FhtR-Hème. ....	181
Figure 38 : Etude de l'impact de la mutation Y61A sur la liaison de l'hème à FhtR.....	182
Figure 39 : Détermination du ligand permettant la liaison de l'hème à FhtR.....	184
Figure 40 : Etude de l'impact de la mutation Y176F sur la liaison de l'hème à FhtR.....	185
Figure 41 : Production et purification de la protéine FhtR clivée. ....	186
Figure 42 : Etude de l'état d'oligomérisation de la protéine FhtR clivée sous forme holo par chromatographie d'exclusion stérique.....	187
Figure 43 : Photographie d'un cristal de FhtR sous forme apo. ....	188
Figure 44 : Présence des gènes de dehydrosqualène synthétase (CrtM) et désaturase (CrtN) dans l'opéron <i>hrtBA</i> chez différents entérocoques. ....	197

<b>Figure 45 : Structure schématique de la protéine HssS chez <i>S. aureus</i> et chez <i>S. agalactiae</i>.</b>	
.....	264
<b>Figure 46 : Schéma récapitulatif des différents systèmes connus de régulation du transporteur HrtBA.</b>	
.....	270
<b>Figure 47 : Organisation génétique de l'opéron <i>hrtBA</i> et de ses différents systèmes de régulation chez différentes bactéries.</b>	
.....	272



## Liste des tableaux

<b>Tableau I: Les différentes classes de systèmes à un composant chez <i>E. coli</i> K12.....</b>	<b>20</b>
<b>Tableau II: Les principales familles de facteurs de transcription chez les procaryotes...24</b>	<b>24</b>
<b>Tableau III: Exemple de facteurs de transcription de la famille TetR.....28</b>	<b>28</b>
<b>Tableau IV: Les différentes classes de systèmes à deux composants chez <i>E. coli</i> K12.....</b>	<b>32</b>
<b>Tableau V: Les différentes formes d'hème.....</b>	<b>48</b>
<b>Tableau VI : Gènes contrôlés par FhtR. ....</b>	<b>191</b>
<b>Tableau VII : Gènes impactés par l'ajout d'hème dans le milieu. ....</b>	<b>192</b>
<b>Tableau VIII : La présence ou l'absence d'hémoprotéines connues chez différentes espèces et genre bactériens possédant un orthologue de FhtR. ....</b>	<b>196</b>
<b>Tableau IX : Liste des oligonucléotides utilisés au cours de cette thèse.....</b>	<b>303</b>

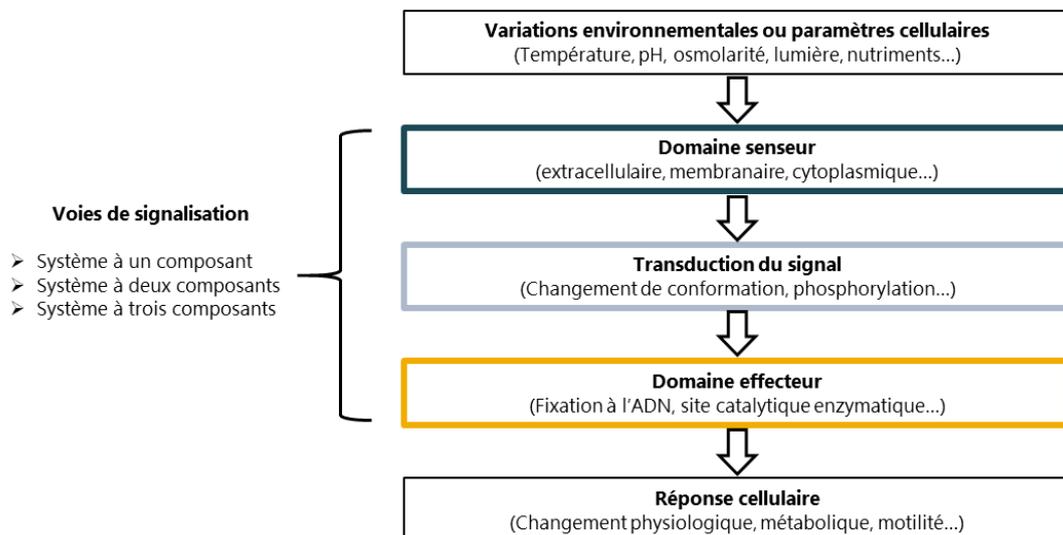


## Liste des abréviations

1-CS	Système à un composant (one-component system)
2-CS	Système à deux composants (two-component system)
3-CS	Système à trois composants (three-component system)
AA	Acide <b>A</b> miné
ABC	<b>A</b> TP <b>B</b> inding <b>C</b> assette
AhpC	<b>A</b> lky <b>h</b> ydroperoxide <b>p</b> eroxidase <b>C</b>
ALA	acide $\delta$ -aminolévulinique
Alb	Albumine sérique
AMP	<b>A</b> dénosine <b>M</b> ono <b>P</b> hosphate
ATP	<b>A</b> dénosine <b>T</b> ri <b>P</b> hosphate
CA	Site catalytique des histidines kinases
CACHE	<b>C</b> Alcium channels and <b>C</b> HEmotaxis
CHASE	Cyclases/Histidine kinases <b>A</b> ssociated <b>S</b> ensory <b>E</b> xtracellular
cyd	<b>c</b> ytochrome <b>d</b> oxidase
DHp	<b>D</b> imerization <b>H</b> istidine <b>p</b> hosphotransfer
Fe-PPIX	Hème
FhtR	Faecalis <b>h</b> eme <b>t</b> ransport <b>R</b> egulator
GAF	c <b>G</b> MP-specific phosphodiesterases, <b>a</b> denylyl cyclases and <b>F</b> hIA
GMP	<b>G</b> uanosine <b>M</b> ono <b>P</b> hosphate
HAMP	Histidine kinase, <b>A</b> dénylate cyclase, <b>M</b> ethyl accepting protein et <b>P</b> hosphatase
Hat	<b>H</b> eme <b>a</b> ctivated <b>t</b> ransporter
Hb	Hémoglobine
HK	<b>H</b> istidine <b>K</b> inase
Hp	Haptoglobine
HO	<b>H</b> ème <b>O</b> xygénase
HRM	<b>H</b> eme <b>R</b> egulatory <b>M</b> otif
Hrt	<b>H</b> eme-regulated <b>t</b> ransporter
HrtA	<b>H</b> eme-regulated <b>t</b> ransporter <b>A</b> TPase
HrtB	<b>H</b> eme-regulated <b>t</b> ransporter permease
HrtR	<b>H</b> eme-regulated <b>t</b> ransporter <b>R</b> egulator
HsmRA	<b>H</b> eme <b>s</b> ensing <b>m</b> embrane protein system
HssR	<b>H</b> eme <b>s</b> ensor <b>s</b> ystem <b>R</b> egulator
HssS	<b>H</b> eme <b>s</b> ensor <b>s</b> ystem <b>S</b> ensor
HTH	<b>H</b> élice- <b>T</b> our- <b>H</b> élice
IPTG	<b>I</b> so <b>P</b> ropyl $\beta$ -D-1- <b>T</b> hio <b>G</b> alactopyranoside
Isd	<b>I</b> ron-regulated <b>s</b> urface <b>d</b> eterminant
katA	catalase A
MacAB	<b>M</b> acrolide-specific <b>A</b> BC-type efflux carrier
MBP	<b>M</b> altose <b>B</b> inding <b>P</b> rotein
MFS	<b>M</b> ajor <b>F</b> acilitator <b>S</b> uperfamily
NEAT	<b>N</b> EAr-iron <b>T</b> ransporter
NIT	<b>N</b> ITrate and nitrite-sensing domain
PAS	<b>P</b> eriod clock protein, <b>A</b> ryl hydrocarbon receptor, and <b>S</b> ingle-minded protein
Pef	<b>P</b> orphyrin <b>e</b> fflux

<b>PBG</b>	porphobilinogène
<b>REC</b>	Domaine receveur des proteins régulatrices des 2-CS
<b>ROS</b>	<b>R</b> eactive <b>O</b> xygen <b>S</b> pecies
<b>RR</b>	<b>R</b> egulateur de <b>R</b> éponse
<b>TD</b>	<b>T</b> ractus <b>D</b> igestif
<b>TetA</b>	<b>T</b> etracycline <b>A</b> ntiporter
<b>TetR</b>	<b>T</b> etracycline <b>R</b> epressor
<b>TFR</b>	<b>T</b> etR <b>F</b> amily of <b>R</b> egulators

# Synthèse Bibliographique



**Figure 1 : Schéma général des principales voies de signalisation de l'adaptation bactérienne.** Les étapes des mécanismes de détection d'un signal, de sa transduction et de la réponse cellulaire constituant les principales voies de signalisation chez les bactéries sont représentées. D'après (Galperin 2018; 2005; 2004).

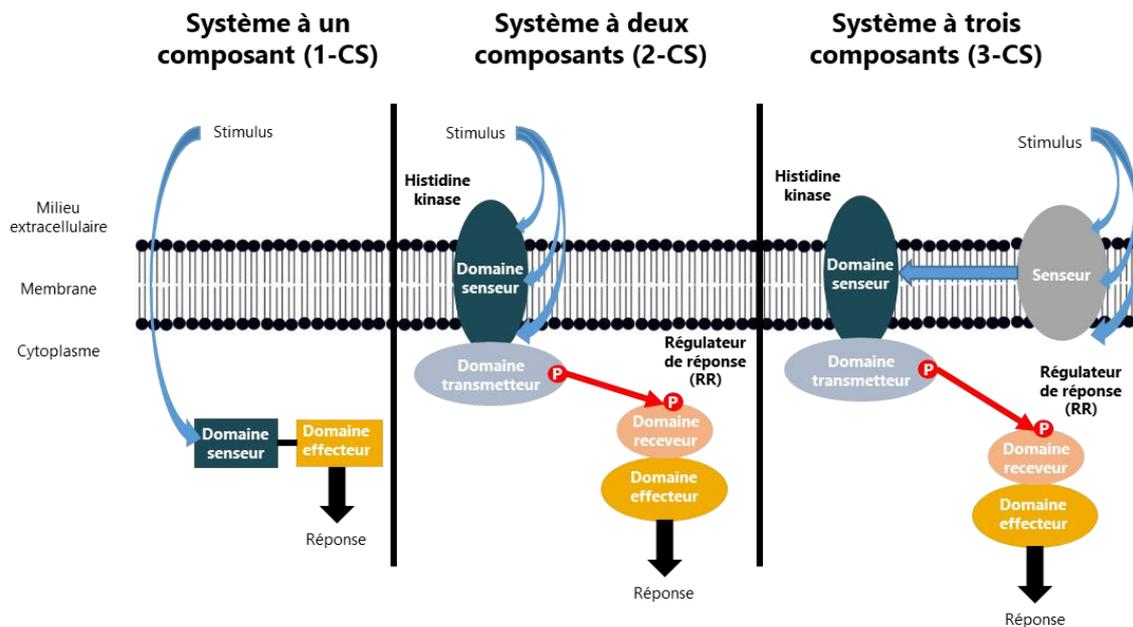
# Synthèse bibliographique

## A. Les systèmes bactériens de perception de l'environnement

Les bactéries sont présentes dans quasiment tous les environnements terrestres naturels ou artificiels (par exemple, les sols, l'air, l'eau douce ou salée ; les aliments ; les objets ...) et colonisent tous les êtres vivants (plantes et animaux). Parce qu'elle est unicellulaire, chaque bactérie est en contact direct avec son environnement qui est soumis à des variations plus ou moins importantes. Ces variations sont de différentes natures, que ce soit le changement de température, de pH, de lumière ou de composition (nutriments, molécules toxiques...). La survie d'une bactérie dépend donc de sa capacité à répondre aux changements de son environnement pour s'y adapter (Galperin, 2004, 2005, 2018).

Les mécanismes adaptatifs de réponse aux changements de l'environnement sont multiples. Dans la majorité des cas, une réponse transcriptionnelle permet, par le contrôle de l'expression d'un ou de plusieurs gènes, d'aboutir à une grande variété de réponses cellulaires à l'origine de changements métaboliques, physiologiques, ou structuraux (Galperin, 2004). Dans d'autres situations, la réponse adaptative est assurée par une réponse post-traductionnelle telle que la régulation d'une activité enzymatique (comme la phosphorylation d'une protéine) ou d'un messager secondaire (AMP cyclique ou di-GMP cyclique) (Hengge et al., 2016)).

La réponse adaptative des bactéries, repose sur des systèmes de perception (« sensing ») de l'environnement couplés à l'activation ou l'inhibition de voies de transduction du signal détecté. Une grande diversité de ces systèmes existe, permettant une réponse efficace à la grande variété de stimuli. Malgré leur grande diversité, le mécanisme général de ces systèmes peut être décomposé en trois étapes : i) la détection du changement environnemental par le senseur ; ii) la transduction du signal qui permet la transition entre le senseur et iii) la réponse cellulaire (**Figure 1**)(Galperin, 2004).



**Figure 2 : Les trois voies de signalisation principales des procaryotes.** A gauche, les systèmes à un composant (1-CS). La signalisation est assurée par une protéine qui comprend un domaine senseur et un domaine effecteur permettant à la fois la détection du stimulus et la réponse cellulaire. Au centre, les systèmes à deux composants (2-CS). Une première protéine, l'histidine kinase (HK), détecte un signal (domaine senseur) qui induit l'autophosphorylation du domaine transmetteur. Un mécanisme de transfert de phosphorylation (phosphorelay), active le domaine receveur d'une seconde protéine régulatrice (RR). La phosphorylation du RR entraîne l'activation du domaine effecteur du RR et la réponse cellulaire. A droite, un exemple de système à trois composants (3-CS) comprenant un senseur membranaire, responsable de la détection d'un stimulus et de l'activation d'une histidine kinase. Le mécanisme de transduction du signal est similaire à celui des 2-CS. Le troisième composant peut aussi être une protéine intermédiaire entre l'histidine kinase et le régulateur (non-représenté). D'après (Marijuán, Navarro, et del Moral 2010).

Les systèmes senseurs sont multiples et adaptés à la variété des stimuli détectés. Des études cristallographiques récentes ont permis d'élucider leur fonctionnement général (Zschiedrich et al., 2016). Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels ils détectent et transduisent le signal restent souvent peu connus. Parmi les systèmes de « sensing » les plus répandus, on distingue : i) les systèmes à un composant (« one-component system », 1-CS) qui mettent en jeu une protéine qui va à la fois détecter le stimulus mais aussi permettre la réponse cellulaire, ii) les systèmes à deux composants (« two-component system », 2-CS) qui sont composés de deux protéines distinctes, un senseur qui va percevoir et transduire le signal vers une protéine receveuse responsable de la réponse cellulaire (Galperin, 2018; Marijuán et al., 2018). Il existe aussi des systèmes minoritaires à trois composants (three-component systems, 3-CS) pour lesquels intervient une troisième protéine intermédiaire entre le senseur et le régulateur (**Figure 1 et 2**)(Marijuán et al., 2010). Dans les chapitres suivants, seuls les systèmes 1-CS et 2-CS sont décrits.

## **A.1. Les systèmes à un composant, la voie de signalisation principale des bactéries**

### **A.1.1. Qu'est-ce qu'un système à un composant ?**

#### A.1.1.1. Caractéristiques générales

Les systèmes à un composant (one-component system ; 1-CS) constituent la voie de signalisation dont le mécanisme est le plus simple chez les bactéries. Les trois étapes de détection du stimulus, de transduction du signal et de réponse adaptée sont regroupées en une seule protéine (**Figure 2**). On distingue dans les 1-CS, les domaines senseurs et les domaines effecteurs, l'étape de transduction se résumant à un changement de conformation ou d'oligomérisation de la protéine (Ulrich et al., 2005). Le domaine protéique « senseur », est le domaine de la protéine qui va permettre la détection du stimulus (**voir A.1.1.2**), alors que le domaine « effecteur » est responsable de la réponse cellulaire, le plus souvent une régulation transcriptionnelle (**voir A.1.1.3**).

## Synthèse bibliographique

Catégorie	Signal	Nom	Transporteurs	Enzymes
<b>Externes</b>	N-acétylgalactosamine ou galactosamine	AgaR	agaWDVBC	
	Allantoïne	AllR	YbbW	
	Arsenic ou Cadmium (II)	ArsR	ArsAB	
	Arbutine, salicine ou cellobiose	AscG	AscF	
	Choline	BetI	BetT	
	B-glucosides	BglJ	BglF, AscF, BglH	
	Carnitine	CaiF	CaiT, YeaV	
<b>Hybride</b>	Glyoxylate	AllS	MenD	malate synthase, glyoxylate reductase, isocitrate lyase, ureidoglycolate hydrolase, glycolate déhydrogénase, 2-hydroxyglutarate synthase
	Arabinose	AraC	AraEFGH, YdeA, YjJK	L-arabinose isomerase
	Arginine	ArgR	AniC, HisQPMT, ArtIJMQP	Argininosuccinate lyase
	Asparagine	AsnC	AsnP	Asparagine synthase B, aspartate-ammonia-ligase
	Thiosulfate	CysB	Sbp, CysAUWPT	Thiosulfate sulfurtransferase
	Cytidine	CytR	NupCG	Cytidine kinase, cytidine deaminase
	Serine	DsdC	CycA, SdaC, TdcC	Phosphoserine phosphatase, cysteine synthase
<b>Internes</b>	Biotine 5P	BirA		Dethiobiotine synthase, biotine synthase
	Adenosine 5PS	Cbl		3'-phospho-adenylsulfate reductase
	cAMP	CRP		Adenylate cyclase
	Deoxyribose 5P	DeoR		Deoxyribose-phosphate aldolase
	ATP	DnaA		Pyruvate kinase, ATP synthase, succinate dehydrogenase
	Acyl-COA	FadR		Complexe d'oxydation des acides gras, acyl-COA synthetase
	Acyl-COA	FarR		Complexe d'oxydation des acides gras, acyl-COA synthetase

**Tableau I: Les différentes classes de systèmes à un composant chez *E. coli* K12.** Les systèmes à un composant peuvent être classés en trois catégories selon l'origine externe (signaux exogènes), interne (métabolites issus de la biosynthèse endogène) ou hybride (signaux dont l'origine peut être exogène ou endogène). Sur les 92 1-CS recensés chez *E. coli* K12, 7 exemples par catégorie ont été listés dans ce tableau. D'après (Marijuán, Navarro, et del Moral, 2018).

Les 1-CS représentent la voie de signalisation la plus représentée et la plus diversifiée dans le monde procaryote selon une étude de 145 génomes (Ulrich et al., 2005). De plus, parmi les 17 000 1-CS répertoriés dans cette étude, 97 % sont des senseurs cytoplasmiques ne possédant pas de domaine transmembranaire (Ulrich et al., 2005). La diversité des domaines senseurs et effecteurs des 1-CS explique la capacité des bactéries à s'adapter à de nombreux stimuli.

#### A.1.1.2. Fonction des 1-CS

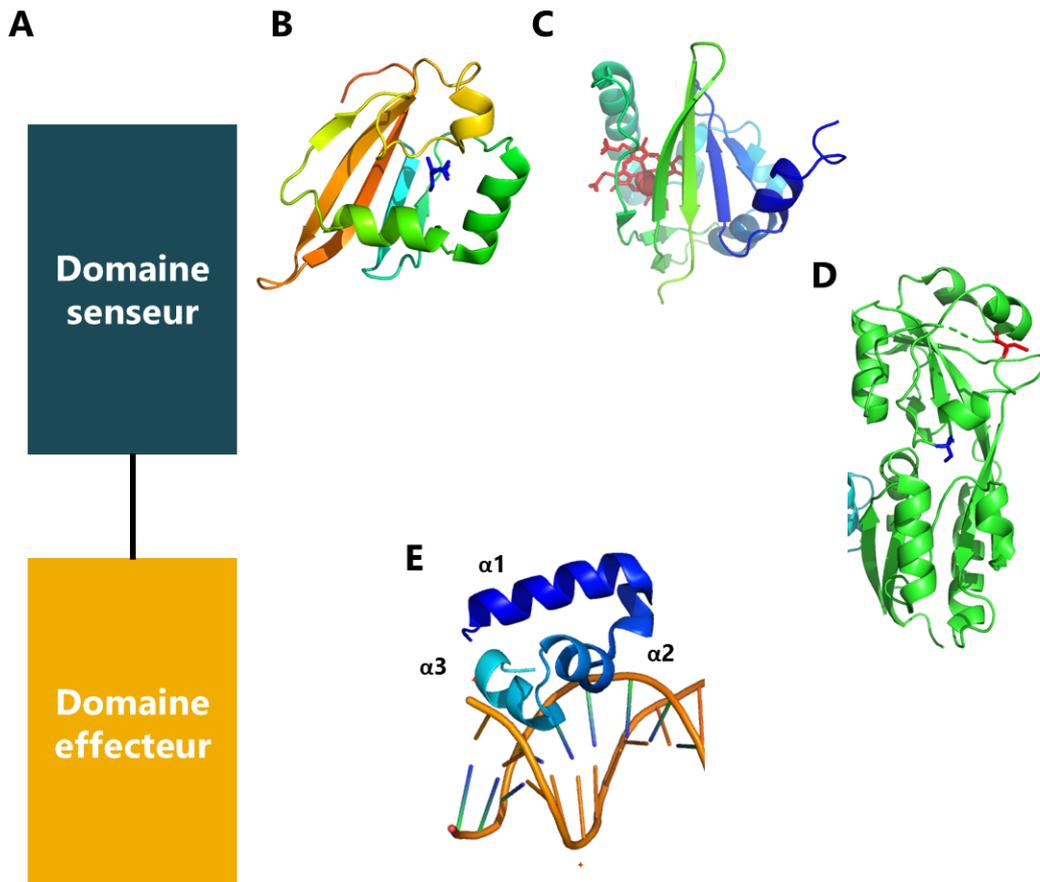
Les 1-CS par leur localisation intracellulaire (**Figure 2**) détectent des stimuli présents dans le cytosol. Le **tableau I** regroupe un aperçu de la variété de stimuli détectée par les différentes catégories de 1-CS chez *Escherichia coli K-12* (Gama-Castro et al., 2016; Marijuán et al., 2018).

L'origine des stimuli reconnus dans le cytoplasme permet de classer les 1-CS en trois catégories (**Tableau I**) :

- « externes » quand le composé reconnu doit d'abord être importé dans la bactérie car non synthétisé par elle (**Tableau I**). La réponse cellulaire est la régulation de l'import ou l'export des composés détectés. On peut citer le cas des métaux (CueR et le cuivre, par exemple (Stoyanov et al., 2001)) ou de certaines vitamines (BetI et la choline, par exemple (Rkenes et al., 1996)) .

- « internes » qui ne concernent que les composés issus du métabolisme bactérien (**Tableau I**). Les 1-CS « internes » sont impliqués dans la régulation de la synthèse, la transformation ou la dégradation des stimuli reconnus, le plus souvent des métabolites (FarR et l'acyl-coenzyme A, par exemple (Quail et al., 1994)). Ces 1-CS activent ou répriment des gènes afin de maintenir une concentration et une activité métabolique adéquates à la survie bactérienne.

- « hybrides », dans le cas de stimuli qui sont synthétisés par la bactérie mais qui peuvent aussi être importés (**Tableau I**). Les réponses cellulaires impliquées regroupent alors des activités de transport et/ou de métabolisme de ces composés (LacI et le lactose par exemple (Lewis et al., 1996; Marijuán et al., 2018)).



**Figure 3: Diversité structurale des domaines senseurs et effecteurs des 1-CS.** (A) Organisation structurale d'un système à un composant. Les 1-CS sont composés de deux domaines structuraux; un domaine senseur de reconnaissance du signal et un domaine effecteur responsable de la réponse cellulaire. (B, C) **Exemples de domaines structuraux senseurs conservés dans de nombreux 1-CS.** (B) Domaine GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhIA) du régulateur CodY (D'après la structure 2B18 dans Protein Data Bank (PDB)). Le domaine GAF fixe une isoleucine comme ligand représentée en bleu. (C) Le domaine PAS (Period clock protein, Aryl hydrocarbon receptor, and Single-minded protein) du régulateur DosH (1S67 dans PDB)). Le domaine PAS contient une molécule d'hème (en rouge) permettant la fixation de l'O<sub>2</sub> ou d'autres gaz diatomiques. (D,E) **Exemples de domaines structuraux effecteurs conservés dans de nombreux 1-CS.** (D) Le domaine LysR\_substrate du régulateur OxyR. Un monomère réduit est représenté en vert avec les cystéines 199 et 208 en bleu et rouge respectivement. Sous forme oxydée un pont disulfure se forme entre ces deux cystéines. (1I69 dans PDB). (E) Domaine HTH (hélice-tour-hélice) du régulateur TetR. Le domaine HTH (en bleu) se fixe à l'ADN grâce aux hélices 2 et 3 (1IQPI dans PDB).

### A.1.1.3. Mécanisme de perception des stimuli

Le principal mécanisme de perception des stimuli est la liaison du 1-CS à de petites molécules de natures très variées (**Tableau I**). La reconnaissance du stimulus par les 1-CS implique des domaines structuraux (« sensing domain ») spécifiques. Dans l'étude de Ulrich, Koonin, et Zhulin en 2005, 96 % des domaines senseurs des 17 000 1-CS répertoriés chez les procaryotes sont des domaines structuraux permettant la liaison de molécules, avec le groupe le plus important appartenant au domaine structural « LysR\_substrate » (PF03466 dans la base de données PFAM (Tyrrell et al. 1997)). Parmi les domaines de reconnaissance des stimuli certains sont très spécifiques comme le domaine NIT (« **NIT**rate and nitrite-sensing domain ») qui permet la détection du nitrate (Shu et al., 2003). D'autres, comme les domaines GAF (cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases and FhlA) (**Figure 3B**) et PAS (Period clock protein, Aryl hydrocarbon receptor, and Single-minded protein) (**Figure 3C**) qui sont très répandus parmi les domaines senseurs des 1-CS, ont un spectre de détection beaucoup plus large. Ils se caractérisent par une poche permettant la liaison de diverses petites molécules comme l'hème ou la flavine, par exemple (Delgado-Nixon et al., 2000; Hurley, 2003; Levdikov et al., 2009; Taylor and Zhulin, 1999). Les autres catégories de domaines senseurs sont soit des sites enzymatiques (OxyR possède une cystéine dans le domaine senseur dont l'état d'oxydo-réduction constitue le stimulus (Choi et al., 2001)(**Figure 3D**)), soit contiennent des sites d'interaction protéine-protéine. Avec les progrès de la biologie structurale, le nombre de structures de domaines senseurs ne cesse d'augmenter bien que la nature du stimulus reste souvent inconnue.

#### A.1.1.1. La régulation transcriptionnelle, principale fonction effectrice des 1-CS

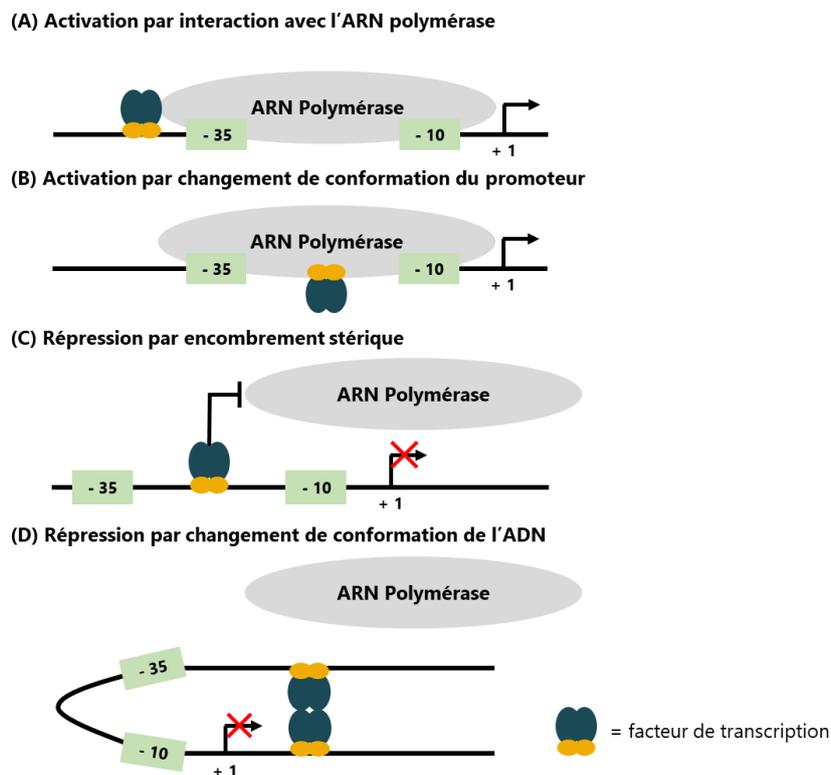
Plus de 84 % des domaines effecteurs des 1-CS, répertoriés dans 145 génomes complets de procaryotes, contiennent un domaine de fixation à l'ADN de type HTH (hélice-tour-hélice) (Ulrich et al., 2005) (**Figure 3E**). Ce type de structure est associé à la régulation de l'expression de gènes et caractérise la principale fonction effectrice des 1-CS : la régulation transcriptionnelle. On dénombre plus de 20 familles différentes de facteurs de transcription parmi les 1-CS, selon la conservation du domaine HTH de liaison à l'ADN (Cuthbertson and Nodwell, 2013; Ramos et al., 2005; Ulrich et al., 2005). Ces facteurs de transcription peuvent réprimer ou activer l'expression de gènes cibles appartenant à un large éventail de fonctions (**voir A.1.1.2 et Tableaux I et II (page suivante)**).

## Synthèse bibliographique

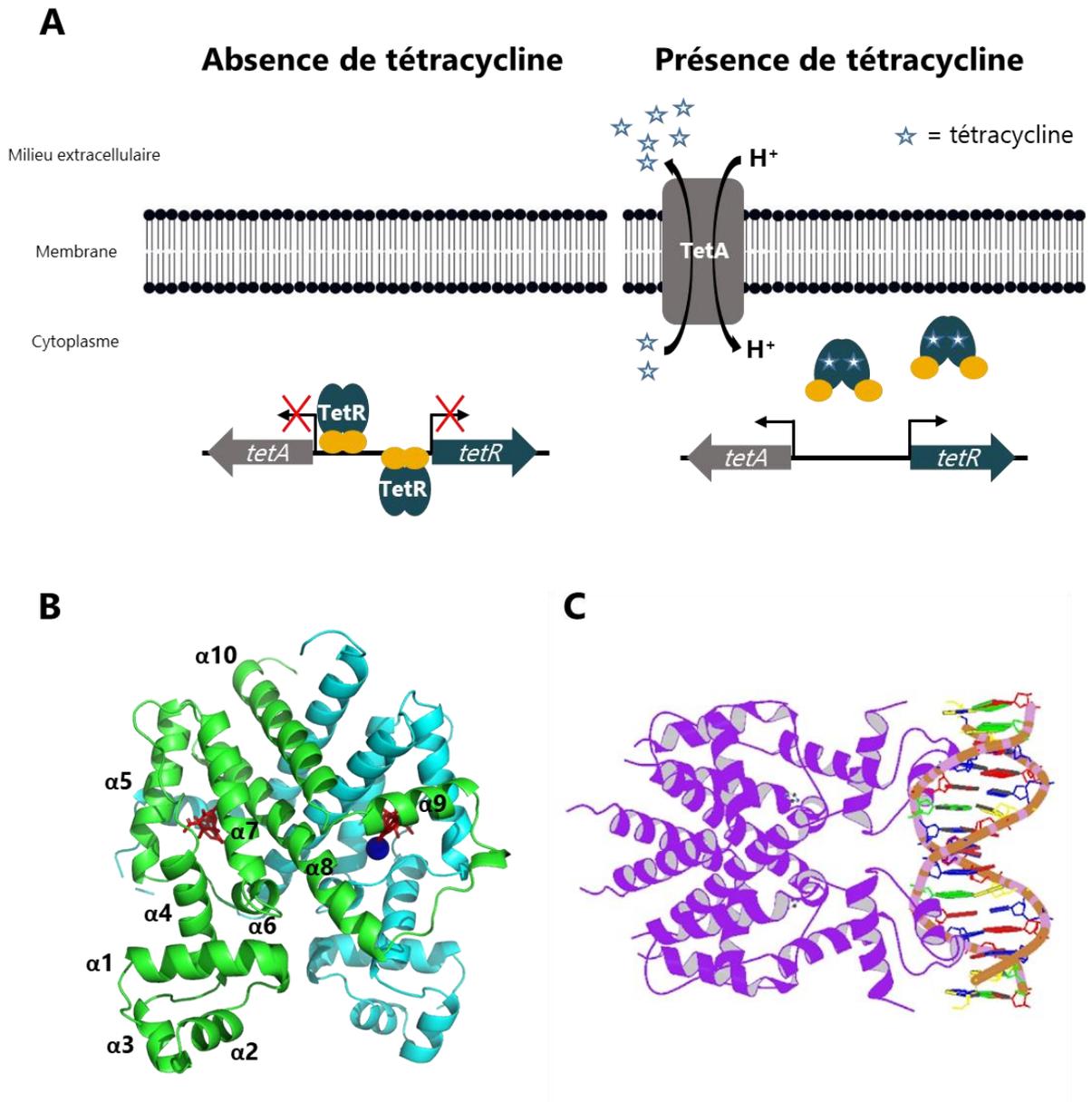
<b>Famille</b>	<b>Action</b>	<b>Fonctions principales contrôlées</b>	<b>Position du domaine de fixation à l'ADN</b>
AraC/XlyS	Activateur	Catabolisme des sucres	C-terminale
ArgR	Répresseur	Métabolisme des acides aminés	N-terminale
ArsR/SmtB	Répresseur	Homéostasie des métaux	Centre de la protéine
AsnC/Lrp	Activateur/ Répresseur	Métabolisme des acides aminés	N-terminale
Crp/Fnr	Activateur/ Répresseur	Fonctions cellulaires variées	C-terminale
DeoR	Répresseur	Métabolisme des sucres	N-terminale
DtxR	Répresseur	Homéostasie des métaux	N-terminale
Fur	Répresseur	Homéostasie des métaux	N-terminale
GntR	Répresseur	Fonctions cellulaires variées	N-terminale
IclR	Activateur/ Répresseur	Métabolisme du carbone	N-terminale
Lacl	Répresseur	Métabolisme du carbone	N-terminale
LuxR	Activateur	Quorum sensing	C-terminale
LysR	Activateur/ Répresseur	Fonctions cellulaires variées	N-terminale
MarR	Répresseur	Résistance aux antibiotiques	Centre de la protéine
MerR	Répresseur	Homéostasie des métaux	N-terminale
MetJ	Répresseur	Fonctions cellulaires variées	N-terminale
ModE	Activateur/ Répresseur	Homéostasie des métaux	N-terminale
PadR	Peu caractérisé	Peu caractérisé	N-terminale
TetR	Répresseur	Résistance aux antibiotiques	N-terminale
Xre	Répresseur	Fonctions cellulaires variées	N-terminale

**Tableau II: Les principales familles de facteurs de transcription chez les procaryotes.**  
D'après (Cuthbertson et Nodwell 2013).

Certains 1-CS comme les régulateurs de la famille LysR décrite comme la plus abondante dans le monde procaryote, sont à la fois activateurs de leur(s) gène(s) cible(s) et répresseurs de leur propre expression (Maddocks and Oyston, 2008; Schell, 1993). On distingue ainsi les 1-CS, inhibiteurs transcriptionnels, qui généralement se lient à la zone promotrice de l'ADN du gène cible, provoquant un encombrement stérique et ainsi empêchant l'interaction de l'ARN polymérase donc la transcription (Browning and Busby, 2004) (**Figure 4C**). D'autres, en se liant à la région promotrice, perturbent sa conformation qui n'est plus reconnue par l'ARN polymérase (Semsey et al., 2002) (**Figure 4D**). Au contraire, les 1-CS, activateurs transcriptionnels, entraînent un changement conformationnel favorisant l'interaction de l'ARN polymérase pour le promoteur, et donc le taux de transcription de ce gène (Browning and Busby, 2004) (**Figure 4A et 4B**).



**Figure 4: Mécanismes d'activation et de répression transcriptionnels. (A, B) Activation transcriptionnelle. (A)** Activation par interaction avec l'ARN polymérase. Le facteur de transcription est lié à l'ADN en amont du promoteur; un contact avec une sous-unité de l'ARN polymérase permet son recrutement et sa fixation sur le promoteur. **(B)** Activation par changement de conformation du promoteur. La fixation du facteur de transcription sur le promoteur entraîne un changement de conformation de l'ADN permettant la fixation de l'ARN polymérase (la famille de facteur de transcription MerR). **(C, D) Répression transcriptionnelle. (C)** Répression par encombrement stérique. Le répresseur se fixe sur le promoteur empêchant la fixation de l'ARN polymérase. **(D)** Répression par changement de conformation de l'ADN. La fixation à l'ADN des répresseurs entraîne la formation d'une boucle bloquant l'accès au promoteur (exemple du facteur de transcription GalR). D'après (Browning et Busby 2004).



**Figure 5: Le facteur de transcription TetR. (A)** Le dimère de TetR reconnaît deux séquences palindromiques dans la région intergénique et réprime *tetR* et *tetA* en absence de tétracycline. La liaison du complexe tétracycline- $Mg^{2+}$  avec TetR provoque son détachement de l'ADN permettant la transcription des gènes et la biosynthèse du transporteur d'efflux TetA (tétracycline/ $H^+$ ). D'après (Cuthbertson et Nodwell 2013). **(B)** Structure du complexe TetR-tétracycline. Un monomère est représenté en vert et l'autre en bleu; les deux molécules de tétracycline sont représentées en rouge et l'atome de  $Mg^{2+}$  en bleu foncé. D'après la structure 1BJY dans Protein Data Bank (PDB). **(C) Le complexe TetR-ADN** (1QPI dans PDB). Les domaines effecteurs Nt des deux TetR formant le dimère de TetR représenté en violet se lient perpendiculairement aux acides nucléiques du palindrome cible.

Les autres types de fonctions effectrices des 1-CS connues sont des régulations enzymatiques impliquées dans la régulation de la concentration des acides nucléiques cycliques (adénylates cyclases, diguanylate cyclases et phosphodiesterases) et dans la phosphorylation ou déphosphorylation de protéines (Hengge et al., 2016; Ulrich et al., 2005).

L'association de différents domaines senseurs et réponses entraîne une grande diversité de 1-CS qui sont réparties en différentes classes selon leur fonction (**Tableau II**). Nous allons par la suite décrire plus précisément les facteurs de transcription de la famille TetR (Cuthbertson and Nodwell, 2013).

### **A.1.1. Les 1-CS de la famille TetR**

#### A.1.1.1. Caractéristiques générales

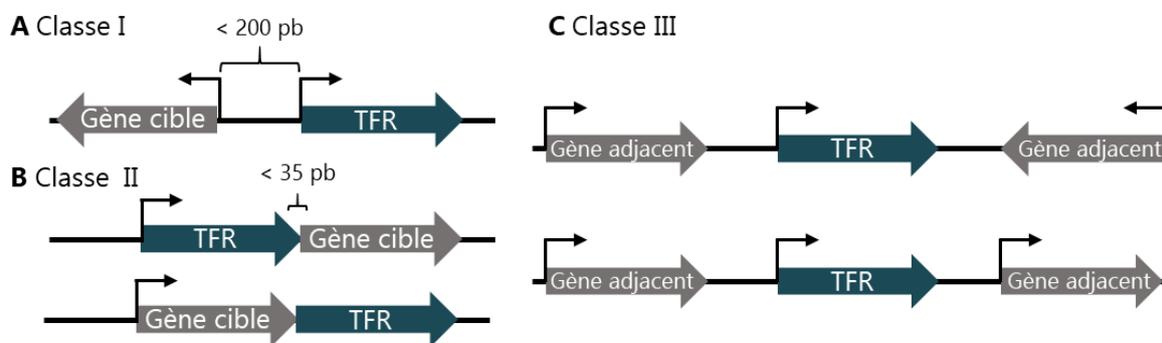
La famille des 1-CS, TetR (Tétracycline Régulateur) a été nommée en référence au régulateur TetR qui contrôle l'expression du gène *tetA* codant pour le transporteur d'efflux TetA (Orth et al., 2000; Postle et al., 1984; Yang et al., 1976). L'export de la tétracycline toxique permet la résistance de la bactérie pour cet antibiotique (Cuthbertson and Nodwell, 2013; Ramos et al., 2005) (**Figure 5**). Les régulateurs de cette famille (TFR pour « **TetR Family of Regulators** ») se caractérisent par un domaine de fixation à l'ADN de type HTH en position N-terminale et un domaine senseur permettant la fixation d'un ou plusieurs ligands dans la partie C-terminale (Cuthbertson and Nodwell, 2013; Ramos et al., 2005)(**Figure 3E, 5B et 5C**). L'homologie de séquence des AA (**Acides Aminés**) des membres de la famille TetR est présente exclusivement sur le domaine de fixation à l'ADN, il a été caractérisé et classifié en motif ou profil disponible dans les bases de données publiques (IPR001647, PS50977, and pfam00440) (**Figure 3E, 5B et 5C**). A ce jour, basé sur ce critère, on compte plus de 200 000 séquences de 1-CS de la famille TetR répertoriées (Cuthbertson and Nodwell, 2013). Quelques exemples de 1-CS de la famille TetR sont montrés dans le **Tableau III** (page suivante). Parmi les TFR, seulement une dizaine de structures ont été obtenues montrant que cette famille est constituée de dimères et d'une structure similaire composée de 9 hélices  $\alpha$ ; les hélices 1 à 3 correspondant au domaine de fixation à l'ADN et les hélices 4 à 9 aux domaines senseur et de dimérisation (**Figure 5B**) (Cuthbertson and Nodwell, 2013; Werten et al., 2014).

## Synthèse bibliographique

TFR	Organisme	Description	Ligand
AcrR	<i>E. coli</i>	Régulateur de la pompe d'efflux AcrAB	Rhodamine 6G, ethidium, proflavine
BetI	<i>E. coli</i>	Régulateur des gènes permettant la synthèse de la glycine bêtaïne	Choline
BreR	<i>V. cholerae</i>	Régulateur de la pompe d'efflux BreAB	Deoxycholate
BrtA	<i>L. monocytogenes</i>	Régulateur de la pompe MdrT	Cholate
CifR	<i>P. aeruginosa</i>	Régulateur de la toxine Cif	Epibromohydrin
ComR	<i>E. coli</i>	Régulateur de ComC impliqué dans la perméabilité au cuivre	Cuivre
DesT	<i>P. aeruginosa</i>	Régulateur de l'opéron DesCB acyl-COA desaturase	Oleate (corepresseur), stearate (activateur)
FabR	<i>E. coli</i>	Régulateur des gènes nécessaires à la synthèse des acides gras insaturés	Thioesters insaturés
FadR	<i>B. subtilis</i>	Régulateur du catabolisme des acides gras	Acyl-COA à longue chaîne
HrtR	<i>L. lactis</i>	Régulateur de la pompe d'efflux HrtBA	Hème
LmrA	<i>B. subtilis</i>	Régulateur de la pompe d'efflux LmrB	Flavonoïdes
MphR	<i>E. coli</i>	Régulateur de la résistance aux macrolides	Macrolides
QacR	<i>S. aureus</i>	Régulateur de la pompe d'efflux QacA	Rhodamine 6G, nitidine etc...
RutR	<i>E. coli</i>	Régulateur de la synthèse des pyrimidines	Uracil
TetR	<i>E. coli</i>	Régulateur de la résistance à la tétracycline	Tétracycline

**Tableau III: Exemple de facteurs de transcription de la famille TetR.** D'après (Cuthbertson et Nodwell 2013).

Les TFR sont répartis en trois classes selon l'orientation et la proximité entre le gène codant le TFR et les gènes cibles. La classe I, correspondant à la majorité des TFR dans laquelle gène cible et gène du TFR sont divergents et séparés par moins de 200 pb. C'est le cas pour le régulateur TetR et le gène *tetA* (**Figure 6A**). La classe II regroupe les TFR pour lesquels le(s) gène(s) cible(s) et celui du régulateur sont orientés dans le même sens et séparés par moins de 35 bp (**Figure 6B**). Par conséquent, ces TFR sont co-transcrits avec leur(s) gène(s) cible(s) et s'autorégulent. Ce type d'organisation ne concerne que des TFR inhibiteurs transcriptionnels. Enfin, une troisième classe (classe III) regroupe des TFR dont l'organisation génétique se distingue de celle des TFR de classe I ou II (**Figure 6C**) (Cuthbertson and Nodwell, 2013; Ramos et al., 2005).



**Figure 6: Classification des facteurs de transcription de la famille TetR (TFR) selon l'orientation et la proximité entre le gène codant le TFR et les gènes adjacents. (A) Classe I;** TFR et gène cible sont séparés par moins de 200 pb et sont transcrits de façon divergente. **(B) Classe II,** TFR et gène cible sont adjacents (séparés par moins de 35 pb) et co-transcrits. Le TFR s'autorégule **(C) Classe III;** cette classe regroupe les TFRs dont l'organisation génétique avec les gènes adjacents est différente des Types I et II. Des exemples sont présentés. D'après (Cuthbertson et Nodwell 2013; Ramos et al. 2005).

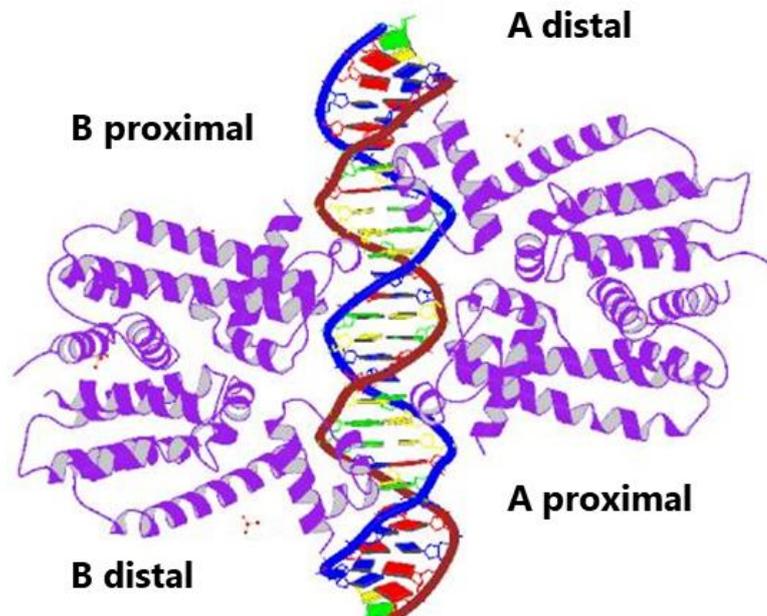
#### A.1.1.2. Mécanisme de régulation transcriptionnelle

Comme indiqué sur les **Figures 3E et 5C**, le domaine HTH des TFR est constitué des hélices 2 et 3, avec une plus grande importance de l'hélice 3 pour le contact entre la protéine et le sillon de l'ADN. Malgré une forte homologie de séquence et de structure, le mécanisme de liaison à l'ADN peut varier. Certains TFR vont se lier spécifiquement sur les bases (TetR (Orth et al., 2000) ou QacR par exemple (Schumacher et al., 2002)) alors que d'autres vont se fixer sur le squelette phosphate de l'ADN (CgmR (Itou et al., 2010) et HrtR, par exemple (Sawai et al., 2012)).

**A**

5' CTTATAGACCGATCGATCGGTCTATAAG 3'  
3' GAATATCTGGCTAGCTAGCCAGATATTC 5'

**B**



**Figure 7: Exemple d'interaction d'un TetR, QacR, avec l'ADN.** (A) Séquence de nt à répétition palindromique sur laquelle deux dimères de QacR se fixent à deux endroits (indiqués par les traits bleu et rouge). (B) Deux homodimères de QacR (A et B) interagissent avec l'ADN (D'après 1JT0 dans PDB). Chaque monomère est désigné distal ou proximal selon sa position sur le palindrome. D'après (Schumacher et al. 2002).

La séquence d'ADN reconnue par les TFR est souvent une ou deux séquences de nucléotides de type palindromique (entre 10 et 30 pb) (un dimère par palindrome). Dans certains cas néanmoins, (régulateur QacR, par exemple), deux dimères se fixent à l'ADN de façon coopérative sur un seul palindrome (**Figure 7**)(Schumacher et al., 2002). Dans la majorité des cas, la fixation à l'ADN des TFR entraîne une répression du gène cible (voir A.1.1.4).

#### A.1.1.3. Un domaine senseur non conservé

Parmi les TFR, 25 % ont un rôle dans le contrôle de la transcription de transporteurs d'efflux d'antibiotiques (AcrR, MphR, QacR, par exemple, voir **Tableau III**)(Cuthbertson and Nodwell, 2013; Ramos et al., 2005). Les autres sont impliqués dans quasiment toutes les fonctions cellulaires telles que la division cellulaire, le métabolisme du carbone, des lipides et de cofacteurs (**Tableau III**). Cette variété est expliquée par la diversité structurale du domaine de « sensing » en position C-terminale qui permet sa liaison à des ligands de natures variées incluant des antibiotiques, des lipides, des cofacteurs ou des métabolites (**Tableau III**). La structure tertiaire est souvent conservée comprenant les hélices 4 et 6, transmettant le changement de structure au domaine de fixation à l'ADN (**Figure 5B et 5C**); une structure triangulaire formée par les hélices 5 à 7 permettant la fixation des ligands et enfin les hélices 8 et 9 impliquées dans la dimérisation du régulateur (**Figure 5B et 5C**)(Cuthbertson and Nodwell, 2013; Orth et al., 2000; Ramos et al., 2005).

C'est cette variabilité, que ce soit de la fixation à l'ADN ou du domaine senseur, qui explique que la famille des TetR est très largement représentée dans les mécanismes d'adaptation des bactéries. Les systèmes à deux composants, une autre grande voie de transduction de signal jouant un rôle dans l'adaptation est le sujet de la prochaine partie.

## Synthèse bibliographique

Catégorie	Signal	HK	RR	Fonction putative
<b>Métabolisme</b>	Quinone membranaire	ArcA	ArcB	Senseur des conditions d'aérobic/anérobic
	Acetoacetate	AtoC	AtoS	Régulation du métabolisme de l'acetoacetate
	Fumarate – Succinate?	DcuR	DcuS	Activation de l'export du fumarate/succinate
	Nitrate or nitrite	NarL	NarX	Métabolisme de l'azote : respiration anérobic
	Nitrate or nitrite	NarP	NarQ	Métabolisme de l'azote : respiration anérobic
	Triméthylamine N-oxide	TorR	TorS	Métabolisme du triméthylamine (respiration anérobic)
	Zn <sup>2+</sup> or Pb <sup>2+</sup> ?	ZraR	ZraS	Métabolisme énergétique : fermentation
	Inconnu	CreB	CreC	Régulation du catabolisme
	Citrate ?	DpiA	DipB	Utilisation du citrate
	Citrate ?	CitB	CitA	Régulation de l'import du citrate
	G6P ou 2-deoxyglucose-6P	UhpA	UhpB	Régulation de l'import de l'hexose
	Inconnu	YgiX	YgiY	Métabolisme de l'azote : respiration anérobic
	Phosphate extérieur	PhoB	PhoR	Régulation de l'import du phosphate
<b>Ions Métaux</b>	Pression de turgescence	KdpE	KdpD	Transport du K <sup>+</sup>
	Cuivre ?	CusR	CusS	Régulation de l'efflux du cuivre
	Mg <sup>2+</sup> et les ions divalents	PhoP	PhoQ	Synthèse de l'acide phosphatase
	Fe <sup>3+</sup> ?	BasR	BasS	Réponse au fer
<b>Stress Communication inconnu</b>	Peroxyde d'hydrogène	UvrY	BarA	Résistance au stress oxydant
	Structure de l'enveloppe cellulaire	CpxR	CpxA	Réponse au stress/ biofilm/ motilité/ chimiotaxie
	Inconnu	EvgA	EvgS	Résistance aux antibiotiques
	Inconnu	BaeR	BaeS	Régulation de pompe d'efflux
	Osmolarité extracellulaire	OmpR	EnvZ	Réponse à la pression osmotique
	Furanones ?	QseB	QseC	Quorum sensing
	Choc osmotique	RcsB	RcsC	Synthèse de la capsule
	Inconnu	RstA	RstB	Résistance aux antibiotiques
	Inconnu	YedW	YedV	Résistance aux antibiotiques
	Potassium ?	YehT	YehU	Transport du potassium
	Potassium ?	YfhK	YfhA	Transport du potassium
	Inconnu	YpdB	YpdA	Inconnu

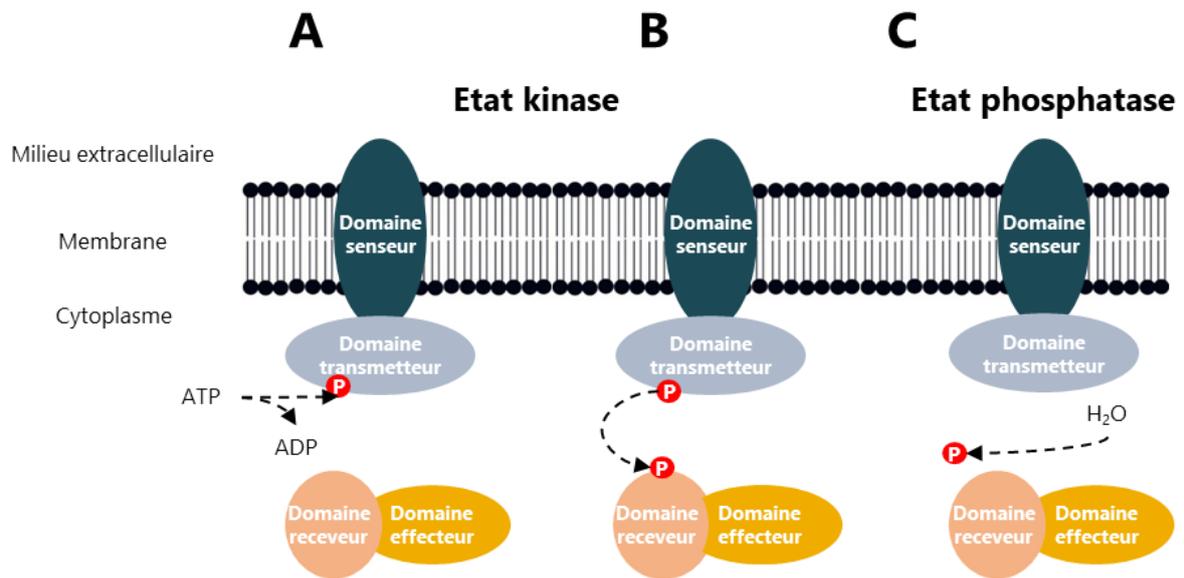
**Tableau IV: Les différentes classes de systèmes à deux composants chez *E. coli* K12.** Les 29 2-CS identifiés sont classés en trois grandes catégories selon la nature du signal reconnu : métabolisme, ions/métaux et stress/communication/inconnu (en relation avec l'antibiorésistance). D'après (Marijuán, Navarro, and del Moral 2018).

## A.2. Les systèmes à deux composants

### A.2.1. Organisation et fonctionnement des systèmes à deux composants

La première description d'un système à deux composants (two-component system, 2-CS) a été faite par Ninfa and Magasanik en 1986, décrivant un transfert de groupement phosphate entre NarX et NarL permettant l'activation de ce dernier (**Tableau IV**) (Marijuán et al., 2018). Le nom de 2-CS apparaît pour la première fois la même année dans l'article de Nixon et al., (1986) avec la découverte du 2-CS NarQ/NarP (**Tableau IV**). Ces deux 2-CS sont impliqués dans le métabolisme de l'azote et régulent de nombreux gènes permettant la respiration anaérobie et la fermentation (Lee et al., 1999). Les 2-CS, identifiés dans un premier temps uniquement chez les procaryotes, ont été aussi découverts chez les eucaryotes, en particulier, les plantes et les champignons (West and Stock, 2001). Ces systèmes omniprésents chez les procaryotes (exception faite de certaines espèces de *Mycoplasma*) sont nombreux et variés, jouant des rôles essentiels dans la communication entre bactéries, l'adaptation à l'environnement et la virulence dans le cas des pathogènes (**Tableau IV**) (Alm et al., 2006; Ann M. Stock et al., 2000; Wang, 2012; Zschiedrich et al., 2016).

Les 2-CS sont classiquement composés de deux protéines distinctes : i) la première est une protéine senseur ; ii) la seconde, une protéine régulatrice d'une ou plusieurs réponse(s) cellulaire(s) (**Figure 2**) (Stock et al., 2000; Mascher et al., 2006). La protéine senseur est une histidine kinase membranaire (HK) qui, en détectant le stimulus, va induire son autophosphorylation (**Figure 2**). Un transfert du groupement phosphate sur la protéine régulatrice cytoplasmique (response regulateur; **RR**) entraîne son activation et initie une réponse cellulaire adaptée (**Figure 2 et Figure 8**). Il existe une grande diversité de RR permettant un large éventail de réponses, certains sont des facteurs de transcription permettant la régulation de gène(s) cible(s) ; d'autres ont une activité enzymatique ; enfin certains se lient à des protéines cibles induisant une régulation de leur activité (Stock et al., 2000; Mascher et al., 2006).



**Figure 8: Les trois étapes enzymatiques de phosphorylation des systèmes à deux composants. (A)** L'activité autokinase de la HK utilise l'ATP pour phosphoryler une histidine conservée. **(B)** Le transfert du groupement phosphate de l'histidine de la HK à une aspartate conservée du RR. **(C)** La déphosphorylation du RR est réalisée par l'hydrolyse du groupement phosphate par une activité phosphatase. D'après (Jacob-Dubuisson et al. 2018).

Le mécanisme le plus répandu des 2-CS fait intervenir trois étapes enzymatiques de phosphorylation (phosphorelay) (**Figure 8**) (Jacob-Dubuisson et al., 2018; Mascher et al., 2006) :

- 1. L'autophosphorylation de la HK sur une histidine conservée en réponse à la détection du stimulus → activité autokinase du senseur (**Figure 8A**).
- 2. Le transfert du groupement phosphate de l'histidine de la HK à une aspartate conservée du RR → activité kinase (**Figure 8B**).
- 3. La déphosphorylation du RR permettant sa désactivation. Cette dernière étape est réalisée soit par une auto-déphosphorylation par le RR lui-même, soit par une activité phosphatase de la HK, soit par une phosphatase extérieure au 2-CS (**Figure 8C**).

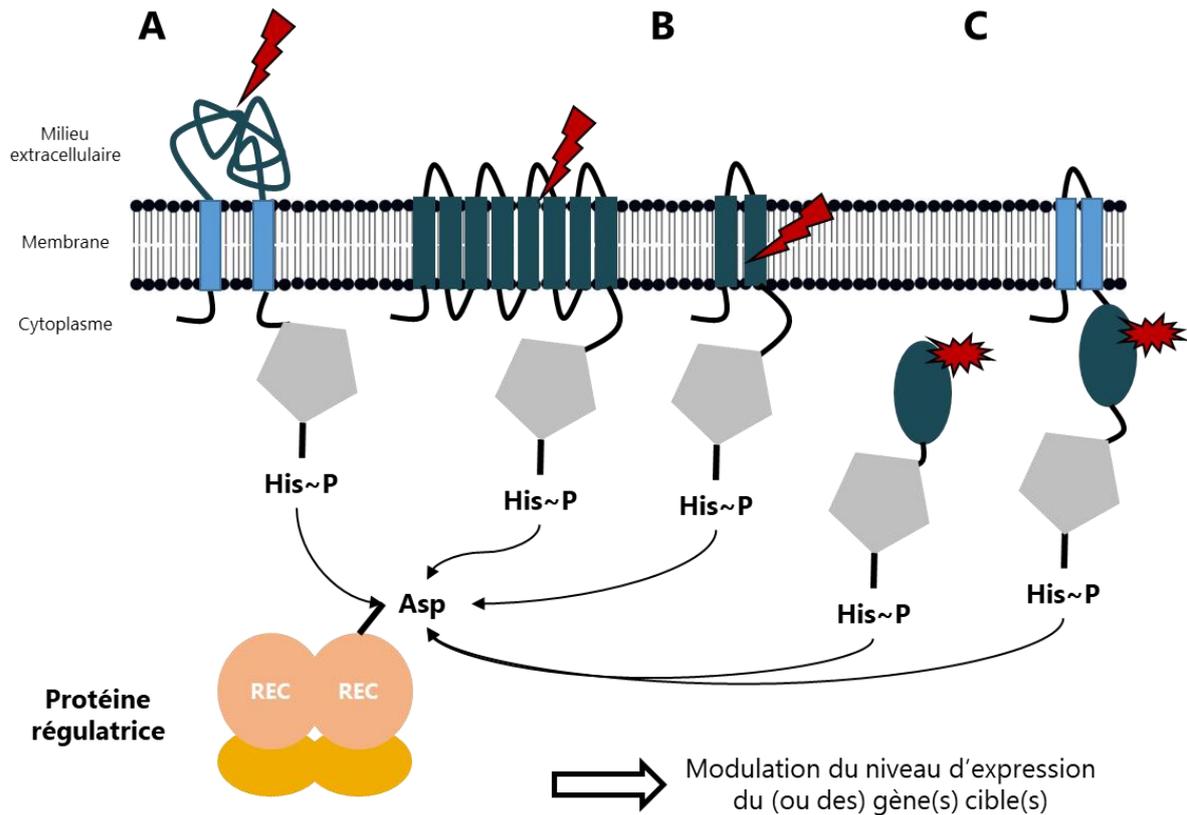
Cet équilibre dans l'état de phosphorylation des 2-CS permet à la bactérie de s'adapter rapidement et de façon transitoire à un changement environnemental. Dans la suite nous allons détailler les HK, représentants majoritaires des 2-CS.

### **A.2.2. L'histidine kinase permet la perception des stimuli**

Les 2-CS permettent aux bactéries de s'adapter à une grande variété de signaux très variés (métaboliques, chimiques, physiques, lumineux, etc). Pour la plupart des 2-CS, le premier composant est une histidine kinase qui en présence d'un signal spécifique va s'autophosphoryler (voir ci-dessus A.2.1.). Les HK jouent donc un rôle de senseur et de transducteur de signal. Les HK les mieux décrites dans la littérature sont des protéines transmembranaires avec un seul domaine extracellulaire, un court domaine cytoplasmique Nt et un domaine cytoplasmique Ct divisé en domaines très conservés (Zschiedrich et al., 2016). Il existe néanmoins une grande variété de HK, en particulier, provenant du nombre et de la longueur des domaines extracellulaires (et donc du nombre de domaines transmembranaires).

#### **i) Le domaine extracellulaire des HK**

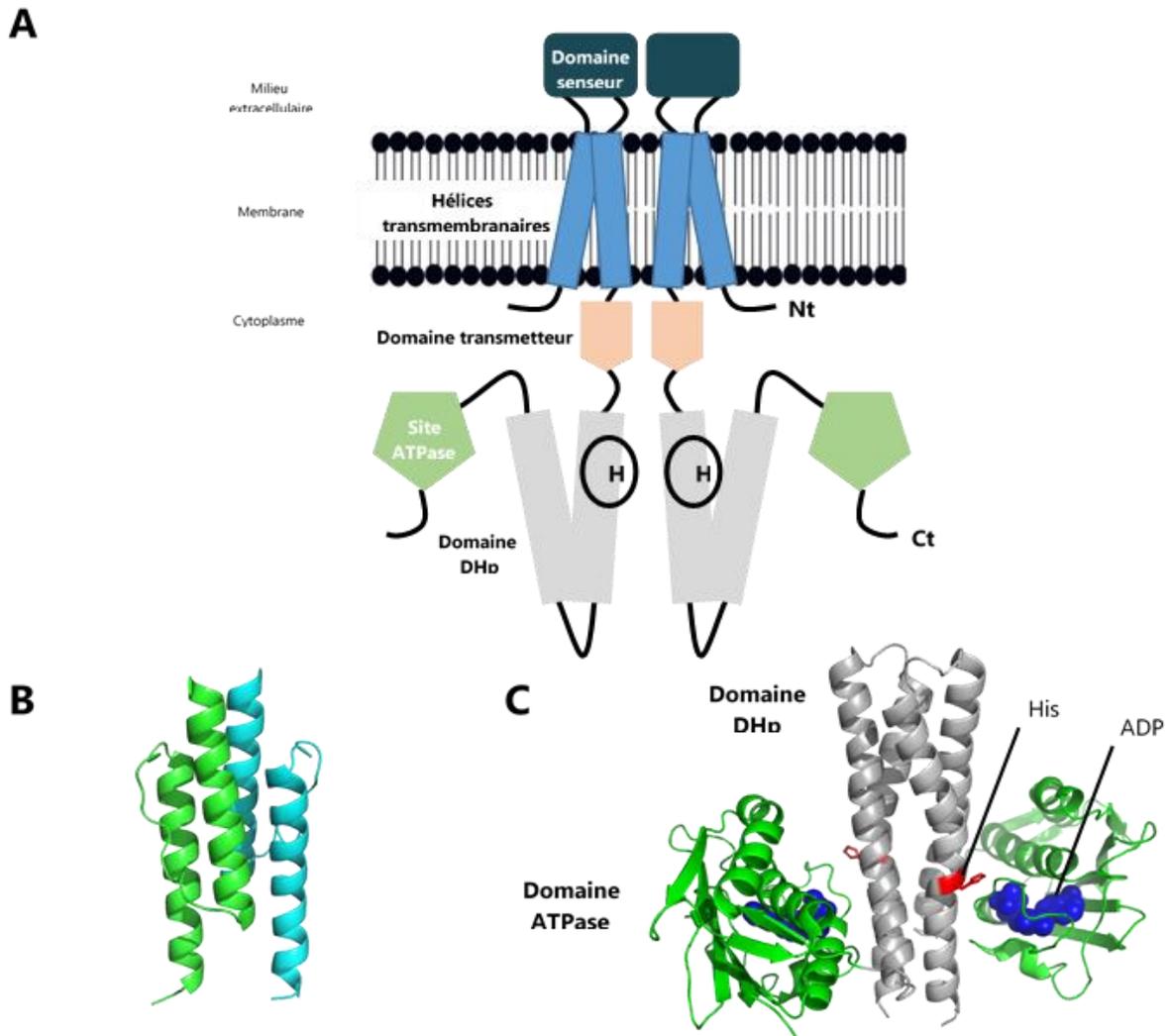
La partie N-terminale correspond à la partie extracellulaire (avec les domaines transmembranaires). Ce domaine est appelé domaine senseur car classiquement associé à la détection du signal dans les 2-CS qui répondent à des stimuli extracellulaires.



**Figure 9: Représentation schématique de trois différents mécanismes de perception des stimuli par les histidine kinases (HK).** (A) Les HK à senseurs extracellulaires détectent un signal extracellulaire (B) Les HK à senseur intramembranaire sont caractérisés par un ou plusieurs domaines extracellulaires très courts. (C) Les HK à senseur cytoplasmique peuvent être des protéines cytoplasmiques ou bien sont ancrées à la membrane. D'après (Mascher, Helmann, et Uden 2006).

Cependant, une classification des HK basée sur ce domaine a été proposée par Mascher (Mascher et al., 2006). Selon cette classification trois grandes familles de HK basées sur le mode de perception des 2-CS ont été proposées (**Figure 9**) :

- HK à senseurs extracellulaires. Cette famille regroupe le plus grand nombre de HK, elle correspond aux HK à perception extracellulaire (**Figure 9A**). Leur domaine Nt est le plus souvent organisé avec 2 hélices transmembranaires et un domaine extracellulaire (entre 50 et 300 AA) qui permet la perception du stimulus. Cette détection extracellulaire concerne dans la majorité des cas des solutés ou des nutriments dans le milieu extracellulaire. Il existe plusieurs types de domaines structuraux extracellulaires conservés tels que le domaine PAS, le domaine CHASE (**C**yclases/**H**istidine kinases **A**ssociated **S**ensory **E**xtracellular) ou le domaine CACHE (**C**alcium channels and **CHE**motaxis) (**Figure 9A**) (Anantharaman and Aravind, 2000; Mascher et al., 2006; Pas et al., 2004; Taylor and Zhulin, 1999)
- Senseurs intramembranaires. Ces HK ont pour caractéristique d'avoir un domaine extracellulaire quasi inexistant (boucle d'environ 20 acides aminés reliant les hélices transmembranaires). Ces senseurs dits intramembranaires sont décrits pour détecter des gradients électrochimiques, des processus de transport ou la présence de composés pouvant affecter l'intégrité de l'enveloppe cellulaire. Ils sont souvent associés à la régulation de transporteurs d'efflux (**Figure 9B**) (Mascher et al., 2006). Néanmoins, les mécanismes qui valideraient ce type de sensing sont très peu connus.
- Senseurs cytoplasmiques. Dans ce cas, la HK reconnaît des signaux cytoplasmiques. Cette famille peut être divisée en trois sous-groupes selon la topologie de la HK. Tout d'abord des HK ancrées à la membrane par l'intermédiaire d'un domaine transmembranaire. Deuxièmement des HK attachées à la membrane grâce à une interaction avec une protéine membranaire. Et enfin les HK purement cytoplasmiques sans ancrage à la membrane (**Figure 9C**) (Mascher et al., 2006). Il existe différents types de domaine senseurs cytoplasmiques avec une grande proportion de domaines PAS et GAF. Ces senseurs cytoplasmiques détectent le plus fréquemment la présence de métabolites synthétisés par la bactérie ou de protéines renseignant sur l'état de la bactérie, son métabolisme ou son stade de développement.



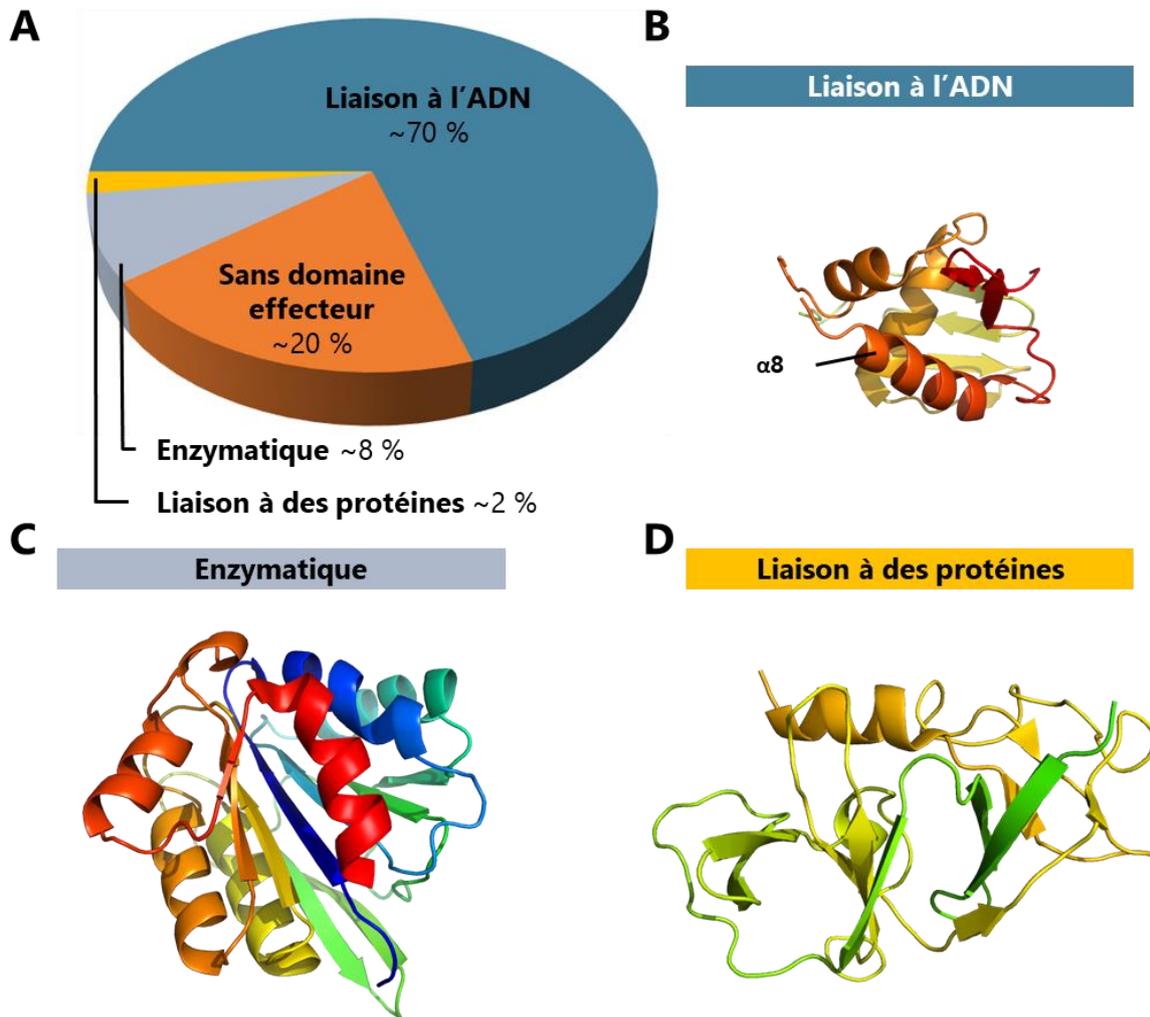
**Figure 10: Architecture d'une histidine kinase (HK) à senseur extracellulaire.** Représentation schématique des différents domaines fonctionnels d'une HK ainsi que de leur positionnement par rapport à la membrane. Les HK sont des dimères. Le domaine extracellulaire (bleu foncé) est très variable (structure et longueur) selon les stimuli détectés. Il est relié aux domaines cytoplasmiques par un domaine transmembranaire (bleu) qui participe à la transduction du signal. Le domaine cytoplasmique est constitué de sous-domaines structuraux conservés; le domaine transmetteur (saumon) qui conduit le signal extracellulaire vers les domaines catalytiques (vert), permettant l'autophosphorylation de l'histidine conservée (représentée par un H entouré) dans le domaine DHp (**D**imerization **H**istidine **p**hosphotransfer) (gris) participant aussi à la dimérisation. **(B)** Exemple de structure d'un domaine transmetteur, le domaine HAMP de Af1503 (D'après 2L7H dans PDB) La transduction du signal extracellulaire au domaine cytoplasmique est assurée par le domaine

En conclusion, si pour beaucoup de HK, la nature des stimuli d'activation sont connus, les mécanismes moléculaires de détection sont très mal connus. La détection d'un stimulus peut être médiée par une interaction directe mais aussi par des modifications structurales induites par un changement de température, de pH ou un choc osmotique, par exemple (Mascher et al., 2006). Les avancées de la biologie structurale ont permis d'élucider la structure de nombreux domaines cytoplasmiques de HK, mais ce n'est que récemment qu'une structure de la partie transmembranaire de HK a été obtenue (NarQ senseur de nitrate/nitrite de *E. coli* (Gushchin et al., 2017) permettant une avancée dans la compréhension du mécanisme de transduction du signal entre la partie membranaire et cytoplasmique.

## ii) Le domaine intracellulaire des HKs.

Il est responsable de l'autophosphorylation, du transfert du groupement phosphate au RR (activité kinase) et parfois de l'activité phosphatase (**Figure 2**). Il est organisé en trois sous-domaines structurellement très conservés :

- Un domaine « transmetteur » localisé directement sous la membrane après le domaine transmembranaire (**Figure 10**). Ce domaine est appelé transmetteur car il conduit, par des changements conformationnels, le signal reconnu par le domaine senseur vers le domaine catalytique Ct de la HK (**Figure 10A et 10B**)(Mascher et al., 2006; Zschiedrich et al., 2016). Ce domaine transmetteur ou « linker » correspond, dans la majorité des cas au domaine HAMP (présent dans **H**istidine kinase, **A**dénylate cyclase, **M**ethyl accepting protein et **P**hosphatase) que l'on retrouve dans 31 % des HK (Mascher, Helmann, et Uden 2006). Ce domaine formé de 2 hélices  $\alpha$  d'environ 50 AA permet lorsqu'il est assemblé en dimère, de transmettre le changement de conformation grâce à une rotation de ses 4 hélices (**Figure 10B**) (Ferris et al., 2011; Hulko et al., 2006; Mascher et al., 2006). Il existe néanmoins une grande variabilité structurale de ce domaine avec par exemple, la présence d'un domaine PAS ou GAF (**voir A.1.1.3 et figure 10C**) qui permet la détection de stimuli au niveau du linker (Hurley, 2003; Mascher et al., 2006; Taylor and Zhulin, 1999; Zschiedrich et al., 2016).
- Un domaine de dimérisation et de phosphorylation d'une histidine (**D**imerization **H**istidine **p**hosphotransfer, DHp) (**Figure 10A et 10C**). Dans la plupart des cas, la dimérisation est nécessaire pour l'activité des HK. Cette dimérisation s'effectue au



**Figure 11: Classification des protéines régulatrices (RR).** (A) Répartition des différents RR selon la variabilité du domaine effecteur. (B) Exemple de structure d'un domaine de liaison à l'ADN HTH appartenant à la famille OmpR/PhoB. Le domaine de liaison à l'ADN de MtrA se faisant par l'intermédiaire de l'hélice  $\alpha 8$  représentée en orange (D'après 2GWR dans PDB). (C) Exemple de structure d'un RR enzymatique. Représentation du domaine catalytique de type méthylestérase de la protéine CheB (D'après 3SFT dans PDB). (D) Exemple de structure d'un domaine de liaison à des protéines. Le domaine de liaison à des protéines de Chev permettant son interaction avec les protéines de chimiotaxie (D'après 3UR1 dans PDB). D'après (Zschiedrich et al., 2016).

niveau du domaine DHp formant un « paquet » de quatre hélices  $\alpha$  (2 hélices par monomère) (**Figure 9C**) (Casino et al., 2009). Au niveau de la première hélice, on retrouve une histidine très conservée, site de l'autophosphorylation de la HK.

- le site catalytique (CA) correspondant à une ATPase (*HATPase\_c* (PF02518)) (**Figure 10A et 10C**) (Casino et al., 2009). Le CA est le lieu de fixation de l'ATP permettant l'autophosphorylation de la DHp et assurant ensuite le transfert du groupe phosphate à la protéine « régulateur ».

### A.2.3. Les protéines régulatrices permettent la réponse cellulaire

Les protéines régulatrices (RR) (en majorité des activateurs transcriptionnels) sont les deuxièmes composants des 2-CS et permettent la réponse cellulaire adaptée au signal détecté. Elles se composent de deux domaines, un domaine receveur (REC) conservé en Nt et un domaine effecteur variable en Ct (correspondant au domaine d'interaction à l'ADN) (Mascher et al., 2006; Zschiedrich et al., 2016).

La principale fonction du domaine REC est de catalyser le transfert du groupement phosphate de l'histidine conservée du DHp à une aspartate conservée du domaine REC (**Figure 8**). Ce domaine permet aussi l'interaction avec la HK et dans certains cas, la déphosphorylation du REC par une activité phosphatase. D'une manière générale, la phosphorylation entraîne un changement de conformation du domaine effecteur permettant l'activation du RR. Certains RR, souvent associés avec la chimiotaxie (environ 20 % des RR (Stock et al., 2000)), ne possèdent que le domaine REC (**Figure 11A**). Le RR phosphorylé permet alors, soit une interaction avec les protéines motrices afin de les activer, soit fait fonction d'intermédiaire de phosphorylation.

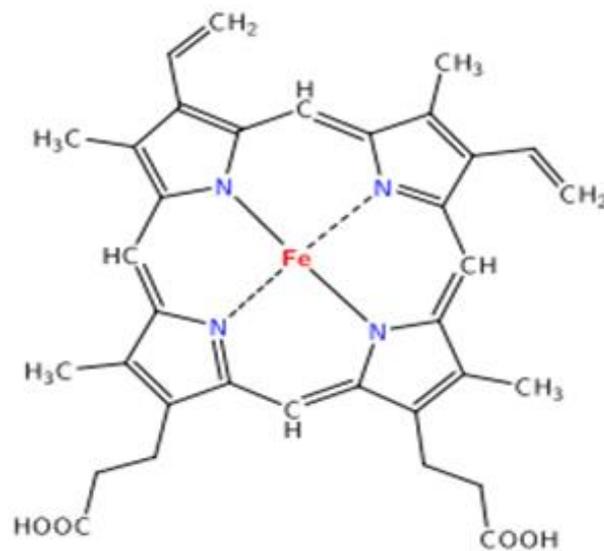
La diversité des RR est due à la variabilité de structure du domaine effecteur pouvant appartenir à différentes familles :

- Les domaines effecteurs de liaison aux acides nucléiques (environ 70 % des RR) (**Figure 11A**) permettent aux RR concernés de réguler la transcription de certains gènes. Ces domaines peuvent être divisés en deux sous-familles selon que le RR lie



- l'ADN ou l'ARN. Dans ces 70 %, seulement environ 1 % sont des domaines effecteurs de liaison à l'ARN comme la famille AmlR. La grande majorité des domaines de liaison à l'ADN ont un domaine de type HTH (exemple de la protéine MrtA impliquée dans la synthèse de la paroi et de la division cellulaire appartenant à la famille des RR OmpR/PhoB (**Figure 11B**)(Friedland et al., 2007).
- Les domaines effecteurs à activité enzymatique (environ 8 % des RR) regroupent la deuxième plus importante famille de RR. Il existe une grande variété de réactions enzymatiques catalysées par les RR : méthylestérases (CheB, par exemple (**Figure 11C**)(Cho et al., 2011)) ; diguanylate cyclases (PleD, par exemple (Vorobiev et al., 2012)) ; sérine/thréonine kinases et phosphatases (les familles RsbU et CheC, par exemple (Hardwick et al., 2007; Park et al., 2004)).
- Les domaines effecteurs de liaison à des protéines ; beaucoup plus rares (seulement 2 % des RR). Ils sont impliqués dans les voies de signalisation de la chimiotaxie (CheV par exemple (**Figure 11D**)(Karatan et al., 2001)).

En dehors de ces deux composants essentiels, des mécanismes additionnels de régulation des 2-CS ont été décrits dans la littérature. Ainsi des phosphatases permettent de réguler le niveau de phosphorylation du RR (CheZ déphosphorylant CheY par exemple (Hess et al., 1988)). Des protéines membranaires ont été identifiées qui en interagissant physiquement avec la partie membranaire de certaines HK inhibent leur activité. C'est le cas de Abx1 qui interagit avec la HK CovS (Firon et al., 2013) ou de SpdC qui contrôle négativement WalkR (Poupel et al., 2018). Enfin l'association à la perméase membranaire (induite par le 2-CS), semble nécessaire à l'activité de certaines HK, senseurs de flux comme par exemple les HK BraS et GraS (Falord et al., 2012; Hiron et al., 2011).



**Figure 12: L'hème (type *b*).** L'atome de fer (en rouge) au centre de la molécule est lié aux 4 atomes d'azote (en bleu) de la porphyrine. La porphyrine est constituée de 4 anneaux pyrroles liés par des ponts méthènes pour former l'anneau tétrapyrrole en noir.

## **B. L'hème et les bactéries**

### **B.1. Le paradoxe de l'hème**

#### **B.1.1. L'hème, une molécule ubiquitaire indispensable à la vie**

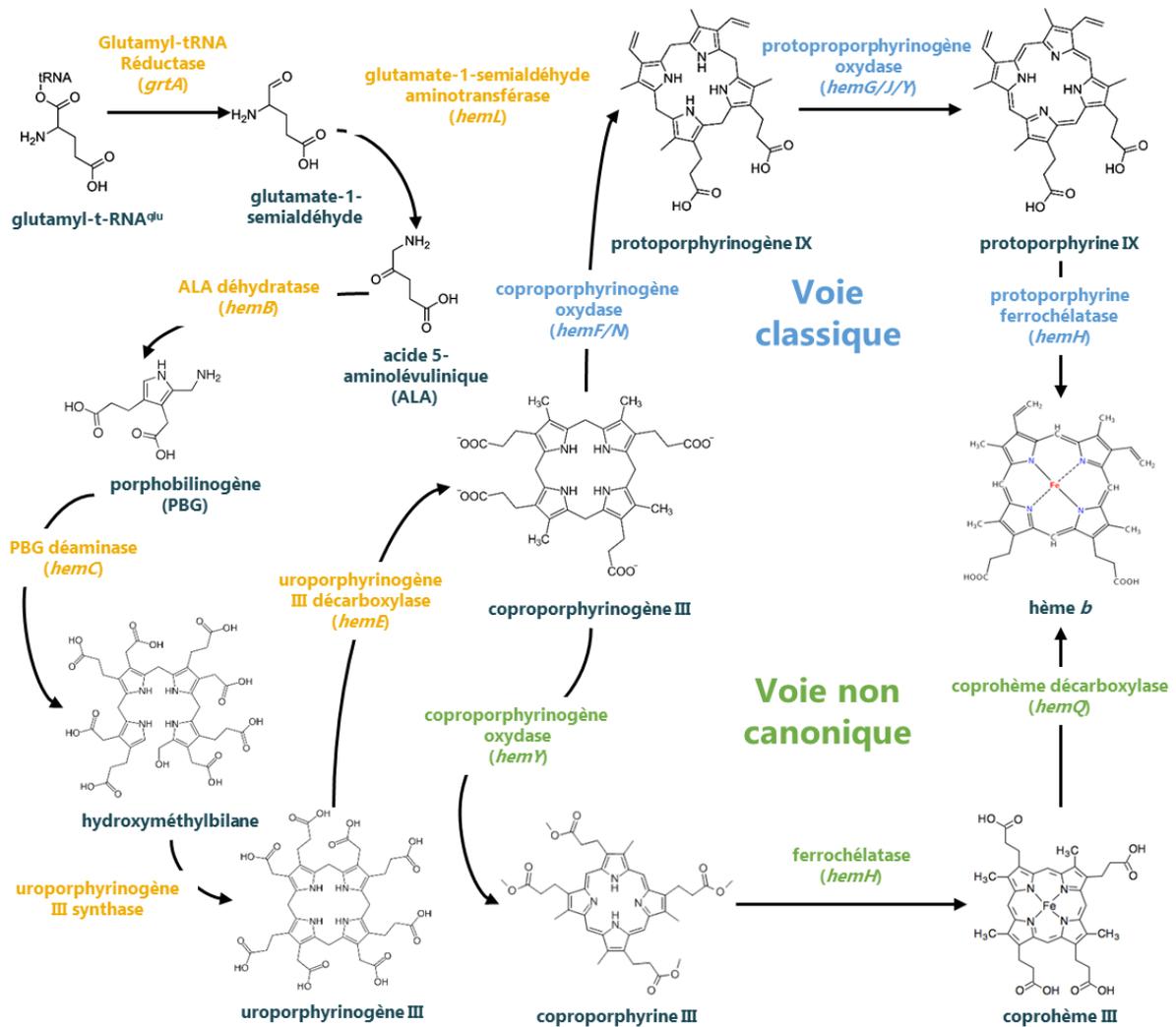
L'hème (Fe-PPIX), un atome de fer coordonné à un noyau porphyrinique composé de 4 anneaux pyrroles (tétrapyrrole) liés par des ponts méthènes (**Figure 12**), est le groupement prosthétique de nombreuses protéines impliquées dans des fonctions cellulaires variées aussi bien chez les procaryotes que les eucaryotes (Choby and Skaar, 2016; Wandersman and Delepelaire, 2012). Grâce à la capacité d'oxydo-réduction de son atome de fer, l'hème existe soit sous une forme réduite ( $Fe^{2+}$ ), soit sous une forme oxydée ( $Fe^{3+}$ ). En condition aérobie, le fer est très peu soluble. Son incorporation dans le noyau porphyrinique permet une augmentation de sa solubilité et de son activité catalytique de 5 à 10 fois (Anzaldi and Skaar, 2010; Stojiljkovic et al., 2001).

L'hème est la forme du fer la plus abondante chez les vertébrés. Chez l'homme par exemple, l'hème de l'hémoglobine représente environ 2/3 du stock de fer total. Les hémoprotéines sont impliquées dans de multiples fonctions telles que des réactions d'oxydoréduction (peroxydases, catalases, cytochromes...) ou le transport de gaz diatomiques (hémoglobines, myoglobines, ...). Il a aussi été montré que l'hème, en se liant à des protéines senseurs, peut avoir une fonction de molécule signal régulant des fonctions diverses (réponses cellulaires à l' $O_2$  ou le CO ; régulation de facteurs de transcription...) (Faller et al., 2007; Mense and Zhang, 2006; Weitz et al., 2014).

#### **B.1.2. La biosynthèse de l'hème**

Les principales étapes de la voie de biosynthèse de l'hème nommée voie de Shemin, sont très conservées que ce soit chez les procaryotes ou les eucaryotes (Hamza and Dailey, 2012; Kikuchi et al., 1958; Wriston et al., 1955). Elle débute par la synthèse du précurseur acide 5-aminolévulinique (ALA) produit de deux manières différentes. Chez l'homme et autres métazoaires, la synthèse de l'ALA se fait par l'association de la succinyl-CoA et de la glycine par l'ALA synthase (gène *hemA*)(Kikuchi et al., 1958; Wriston et al., 1955).

## Synthèse bibliographique



**Figure 13: Représentation schématique des voies de biosynthèse de l'hème *b*.** En jaune sont indiquées les enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse conservée du coproporphyrinogène III. La voie classique (en bleu) génère de la protoporphyrine IX dans laquelle est inséré le fer. La voie non canonique (en vert) génère la coproporphyrine III dans laquelle est inséré le fer. D'après (Choby and Skaar, 2016).

Chez les archées, les plantes et la plupart des bactéries (sauf  $\alpha$ -protéobactéries), l'ALA est obtenu à partir du glutamyl-t-RNA<sup>glu</sup> qui est transformé par la glutamyl-tRNA réductase (gène *grtA*) en glutamate-1-semialdéhyde (Beale et al., 1975; Gamini Kannangara et al., 1988). L'ensemble des étapes de la biosynthèse de l'hème chez ces organismes est présenté dans la **Figure 13**. Ce composé hautement réactif est converti en ALA par la glutamate-1-semialdéhyde aminotransférase (gène *hemL*) (Hoover et al., 1988).

Les 3 étapes enzymatiques aboutissent à la synthèse du premier cycle tétrapyrrole, l'uroporphyrinogène III (**Figure 13**). Ce composé peut être utilisé dans la synthèse de nombreux cofacteurs à base de tétrapyrroles tels que : les porphyrines, les chlorines (exemple de la chlorophylle a) ou les corrinoïdes (exemple de la vitamine B12) (Battersby, 2000). L'ALA déshydratase (gène *hemB*) transforme 2 molécules d'ALA en porphobilinogène (PBG) (Hansson et al., 1991) qui est ensuite pris en charge par la PBG déaminase (gène *hemC*) permettant la production du tétrapyrrole hydroxyméthylbilane (Bung et al., 2014). Ce dernier est cyclisé par l'uroporphyrinogène III synthase (gène *hemD*) et permet la synthèse de l'uroporphyrinogène III. Une décarboxylation des 4 chaînes acétate par l'uroporphyrinogène III décarboxylase (gène *hemE*) permet la production du coproporphyrinogène III (**Figure 13, en jaune**). Chez les eucaryotes et les bactéries à Gram négatif, les 3 étapes enzymatiques suivantes permettent la production de la protoporphyrine IX, à laquelle est incorporé un atome de fer par une ferrochélatase (gène *hemH*) lors de la dernière étape afin de former une molécule d'hème *b* (**Figure 13, voie classique, en bleu**) (Choby and Skaar, 2016).

Ces dernières étapes longtemps considérées universelles car présentes chez les bactéries à Gram négatif et les eucaryotes, sont distinctes chez les phylums firmicutes et actinobactéries (**Figure 13, voie non-canonique, en vert**) (Dailey et al., 2015). Dans cette voie, une coproporphyrinogène oxydase (gène *hemY*) oxyde la coproporphyrinogène III et produit de la coproporphyrine III. Une ferrochélatase (*hemH*) y incorpore le fer et forme le coprohème qui est ensuite décarboxylé par HemQ afin de produire du protohème (Choby and Skaar, 2016; Lobo et al., 2015).

## Synthèse bibliographique

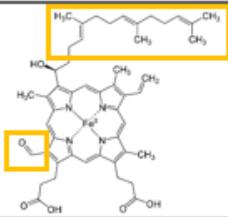
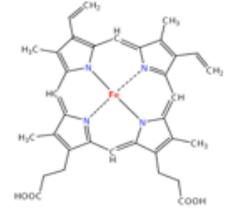
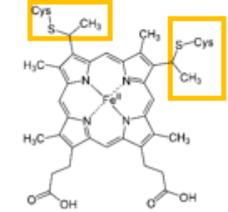
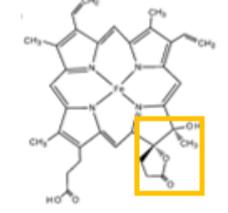
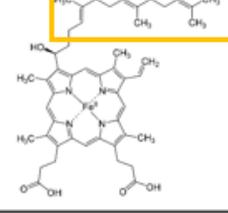
Nom	Fonction	Ramification	Représentation
<b>Hème a</b>	Cofacteur du cytochrome <i>c</i> chez <i>E. coli</i>	Chaîne <u>terpénoïde</u> en position C3 Groupement <u>aldéhyde</u> en position C18	
<b>Hème b</b>	Voir B.2		
<b>Hème c</b>	Cofacteur de la cytochrome <i>c</i> oxydase Liaison covalente avec la protéine	Liaisons <u>thioesters</u> avec des cystéines en C3 et C8	
<b>Hème d</b>	Cofacteur de la cytochrome <i>bd</i> oxydase	Groupement <u>hydroxyle</u> en C12 et C13 Cyclisation possible du groupement en C13 en lactone	
<b>Hème o</b>	Cofacteur de la cytochrome <i>c</i> oxydase	Chaîne <u>terpénoïde</u> en position C3	

Tableau V: Les différentes formes d'hème.

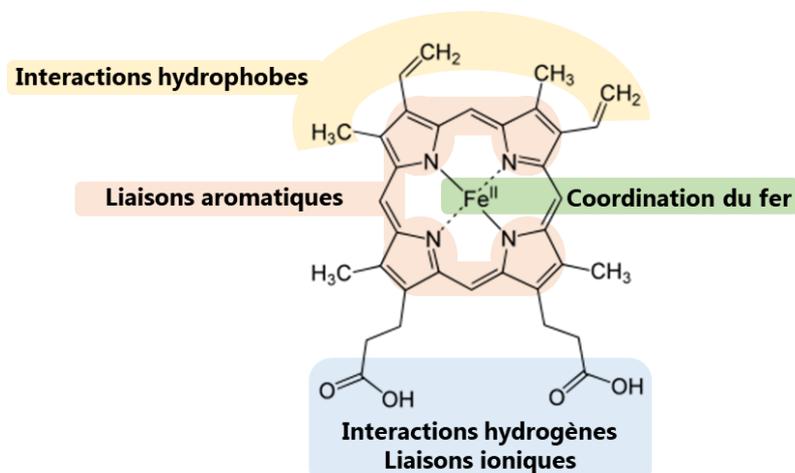


Figure 14: Différentes interactions possibles de l'hème (type *b*). D'après (Brewitz et al., 2017).

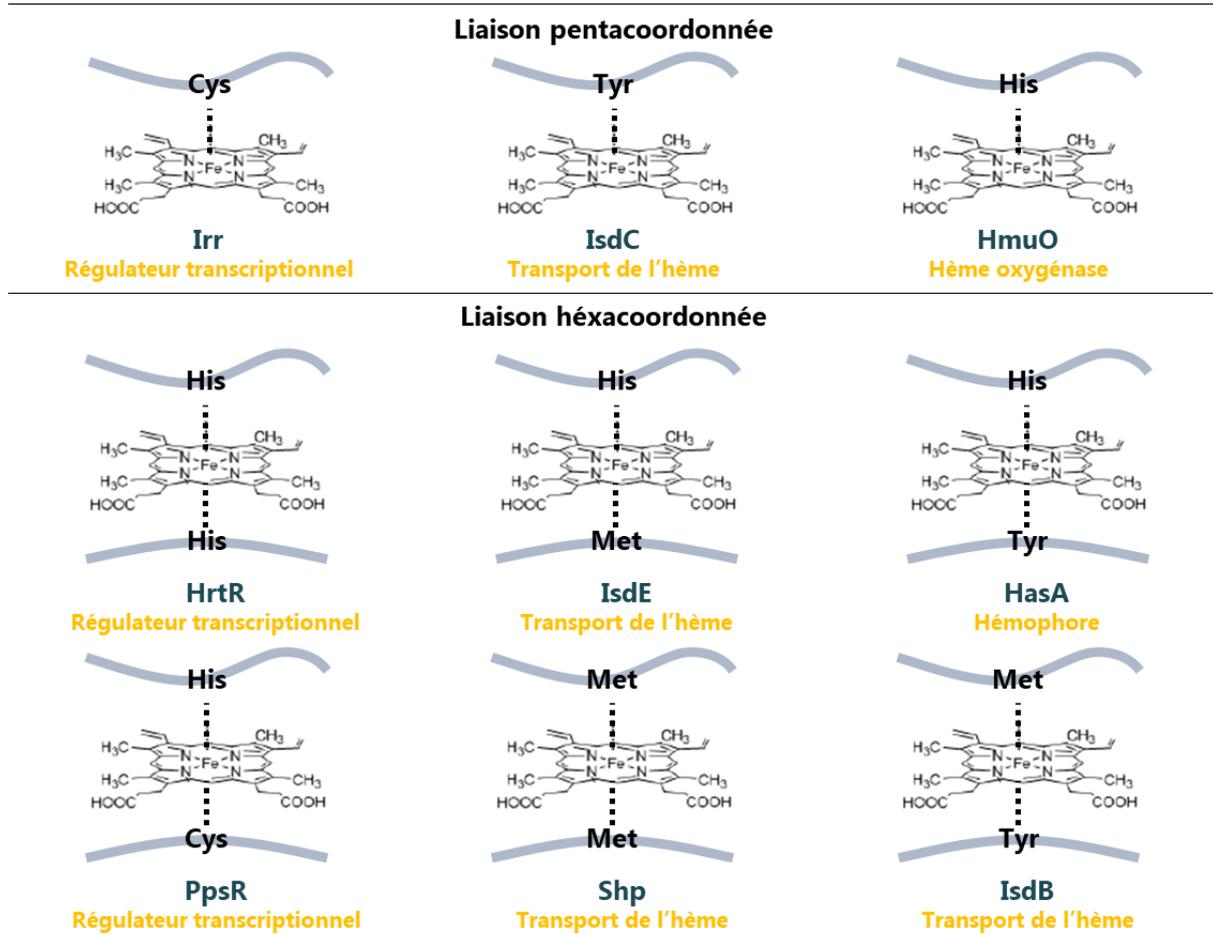
L'hème *b* (le terme générique hème fera référence à cette forme dans la suite du document) est la forme la plus abondante dans le monde du vivant mais il existe d'autres formes d'hème différant de l'hème *b* par des modifications du noyau porphyrique (**Tableau V**) (Bryant et al., 2020; Hederstedt, 2012; Kleingardner and Bren, 2015). Le **Tableau V** récapitule les différents types d'hèmes, leurs caractéristiques et leurs fonctions.

### **B.1.3. Toxicité de l'hème**

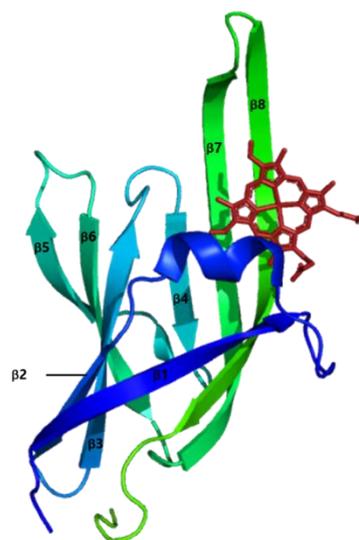
L'hème libre est bactéricide pour les bactéries à Gram positif à des concentrations de l'ordre du  $\mu\text{M}$  (Fernandez et al., 2010; Stauff et al., 2007). L'hème est toxique car sa forme réduite ( $\text{Fe}^{2+}$ ) est très réactive, en particulier avec l'oxygène. Il peut y avoir production de radicaux libres via la réaction de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{HO}^\bullet$ ). La molécule hydroxyle est un oxydant très puissant entraînant un stress oxydatif (dégradation de l'ADN, des lipides et protéines) néfaste pour la survie cellulaire (Anzaldi and Skaar, 2010; Kumar and Bandyopadhyay, 2005). De plus, l'hème étant lipophile, il s'accumule dans les membranes entraînant préférentiellement des dommages aux lipides et protéines de la membrane (Skaar et al., 2004).

### **B.1.4. Liaison entre l'hème et les protéines**

L'hème peut interagir avec d'autres molécules, en particulier des protéines par différents types de liaisons et/ou non-covalentes (Brewitz et al., 2017). L'anneau porphyrique cyclique de l'hème permet des interactions aromatiques avec des AA aromatiques cycliques tels que les phénylalanines, les tyrosines ou encore les tryptophanes (Schneider et al., 2007) (**Figure 14**). La nature hydrophobe des groupements vinyles et méthyles du noyau porphyrique favorise des interactions hydrophobes de type Van der Waals avec des AA hydrophobes tels que les leucines, isoleucines ou les valines (Schneider et al., 2007) (**Figure 14**). Enfin des liaisons ioniques et hydrogènes peuvent exister entre les groupements propionates de l'hème et des AA chargés positivement comme les arginines, les histidines ou les lysines (Schneider et al., 2007) (**Figure 14**).



**Figure 16: Exemples d'interaction d'hémoprotéines de bactéries avec l'atome de fer de l'hème (type b).** Différents ligands axiaux (AA) dans des hémoprotéines (en vert) aux fonctions variées (en jaune). D'après (Brewitz et al., 2017).



**Figure 15 :Structure cristallographique de la protéine à domaine NEAT IsdC complexée à l'hème.** Le domaine NEAT de IsdC est composé de 8 feuillets  $\beta$  (annotés sur la structure), l'hème est représenté en rouge. D'après 2O6P dans PDB.

Ces liaisons faibles permettent de stabiliser l'interaction de l'hème avec la protéine qui généralement est essentiellement assurée par la coordination de l'atome de fer à des AA de l'hémoprotéine. L'atome de fer de l'hème coordonné au noyau porphyrinique par 4 liaisons avec 4 atomes d'azote (**Figures 12 et 14**), peut se lier à un ou deux autres ligands : on parle de liaison pentacoordonnée ou hexacoordonnée du fer (**Figure 15**). De plus lorsque l'hème est lié de façon pentacoordonnée à la protéine, la sixième liaison peut servir à la fixation d'une molécule non-protéique telle qu'un solvant (H<sub>2</sub>O par exemple) ou de gaz diatomique (O<sub>2</sub>, CO ou NO, par exemple)(Farhana et al., 2012; Rinaldo et al., 2012; Salman et al., 2019). Les AA contenant des atomes comme le soufre, l'azote ou l'oxygène dans leurs chaînes latérales peuvent être des ligands axiaux. Parmi les plus répandus dans les hémoprotéines, il y a les histidines, cystéines, tyrosines et méthionines (**Figure 15**)(Brewitz et al., 2017). Cette interaction par l'intermédiaire du fer ne fait pas intervenir de réaction enzymatique car elle n'est pas covalente, elle est donc labile et transitoire.

Le domaine protéique responsable de la liaison de l'hème contient souvent une poche hydrophobe autour de l'AA coordonnant le fer. Cette poche interagit avec le noyau porphyrine. Malgré une structure proche, les domaines de fixation à l'hème sont peu conservés en dehors de quelques exceptions dont les « heme regulatory motif » (HRM) contenant une cystéine comme ligand axial et présents chez certaines hémoprotéines eucaryotes (Ishikawa et al., 2005; Wißbrock et al., 2019). Chez les bactéries à Gram positif, le domaine NEAT (NEAr-iron Transporter) (**Figure 16**) est décrit comme liant l'hème. C'est un domaine d'environ 120 à 125 AA caractérisé par une poche hydrophobe composé de 8 feuillets  $\beta$  où la liaison à l'hème se fait intervenir une tyrosine (Grigg et al., 2007, 2011; Sharp et al., 2007). D'autres domaines comme les domaines PAS et GAF peuvent avoir un rôle dans la liaison d'une molécule d'hème (**Figure 3C**). Enfin, certains types d'hème, peuvent se lier de façon covalente aux protéines par les chaînes latérales du noyau porphyrinique. C'est le cas de l'hème *c* qui peut former des liaisons thioesters avec des cystéines (**Tableau V**). Ces différents types de liaisons permettent à l'hème de se lier à de nombreux domaines protéiques. En dehors de quelques domaines conservés, en particulier chez les eucaryotes, il est difficile de prédire les domaines de liaison à l'hème dans les hémoprotéines.



## B.2. Les principales utilisations métaboliques de l'hème chez les bactéries

### B.2.1. Métabolisme respiratoire chez les bactéries à Gram positif

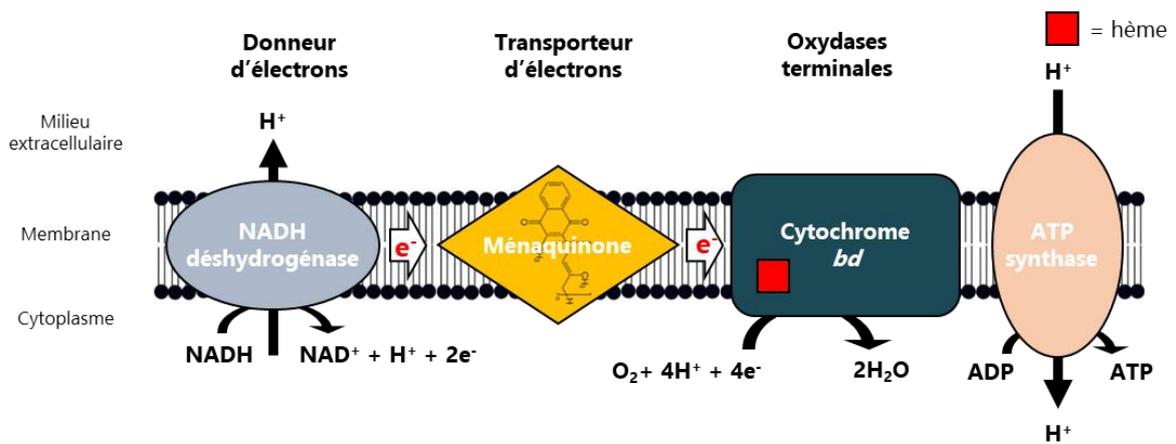
L'hème, par sa fonction oxydoréductrice permet les échanges d'électrons entre différentes molécules. On retrouve ce rôle de navette d'électrons dans les différentes chaînes respiratoires du monde du vivant. Dans la suite, nous allons nous focaliser sur la chaîne respiratoire des procaryotes et plus précisément sur la cytochrome *bd* oxydase (aussi appelé complexe III).

#### B.2.1.1. Fonctionnement général de la chaîne respiratoire

Pour leur croissance, les procaryotes ont besoin d'énergie sous forme d'ATP, synthétisé par deux voies métaboliques distinctes : la fermentation ou la respiration (Pedersen et al., 2012). Ces deux voies ont, pour substrat initial, le pyruvate généré le plus souvent par la glycolyse au cours de laquelle le glucose est dégradé en NADH et pyruvate (équation simplifiée de la glycolyse :  $1 \text{ glucose} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ Pi} + 2 \text{ NAD}^+ \rightarrow 2 \text{ ATP} + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ pyruvates}$ ) (Richardson et al., 2015). Les molécules de pyruvate sont ensuite transformées au cours du cycle de Krebs en acétyl-coenzyme A constituant un carrefour métabolique pour la synthèse de molécules variées. Les molécules de NADH produites pendant la glycolyse (2 molécules produites) et le cycle de Krebs (6 molécules produites) constituent le donneur d'électrons pour la NADH déshydrogénase (aussi appelé complexe I) de la chaîne respiratoire (Richardson et al., 2015).

La chaîne respiratoire est constituée de plusieurs complexes distincts situés au niveau de la membrane bactérienne (**Figure 17**) (Lechardeur et al., 2011):

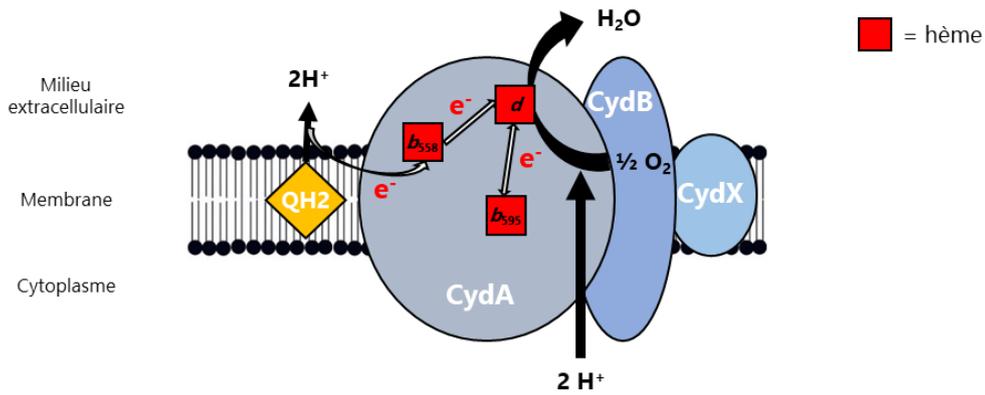
- La NADH déshydrogénase (ou complexe I) permet le recyclage du  $\text{NAD}^+$  en oxydant le NADH (**Figure 17**). La réaction libère du  $\text{NAD}^+$ , un proton  $\text{H}^+$  et deux électrons; elle permet donc de libérer des électrons et de créer un gradient électrochimique utilisé dans la chaîne respiratoire (Sone et al., 2004).



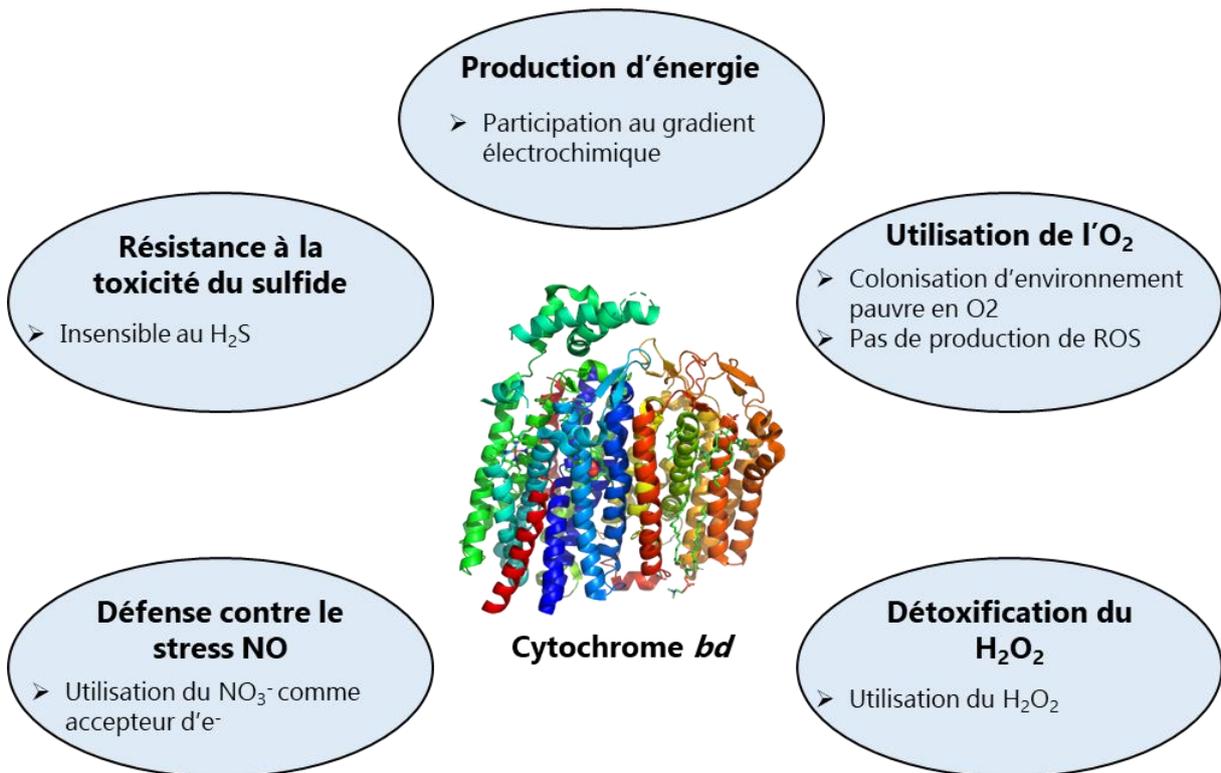
**Figure 17 : Représentation schématique d'une chaîne respiratoire aérobie minimale (exemple de la chaîne respiratoire des bactéries lactiques).** Une chaîne respiratoire minimale est composée d'un donneur d' $e^-$  (NADH déshydrogénase), d'un transporteur d' $e^-$  (ménaquinones) et d'une oxydase terminale (cytochrome *bd*). L'oxygène est l'accepteur terminal de 4 électrons pour former 2 molécules d'eau. Le gradient électrochimique formé au cours de la chaîne respiratoire est utilisé par l'ATP synthase afin de générer de l'énergie sous forme d'ATP. D'après (Lechardeur et al., 2011).

- Les quinones (ou complexe II) assurant le rôle de navette d'électrons entre les complexes I et III (**Figure 17**). Les quinones sont réduites en quinols par les électrons issus de l'oxydation du NADH par le complexe I, puis ré-oxydées par le complexe III. Ce sont des dérivés benzéniques avec différentes familles existantes dont les ménaquinones (MK) qui sont les quinones utilisées par les bactéries à Gram positif (Meganathan, 2001). Cette famille se caractérise par un noyau naphthalène et une chaîne latérale isoprénoïde dont le nombre de carbones peut varier entre 7 et 9 selon les espèces (**Figure 17**). La voie de synthèse de ces composés est conservée chez les bactéries à Gram positif et comprend plusieurs enzymes codées par les gènes *men* (Meganathan, 2001). Certaines espèces sont auxotrophes vis-à-vis des ménaquinones et doivent donc être supplémentées par une source extérieure comme *Streptococcus agalactiae* (Yamamoto et al., 2006).
- Les cytochromes oxydases (ou complexe III) sont des hémoprotéines permettant l'oxydation des quinols en quinones et le transfert d'électrons à l'oxygène (en condition aérobie) en présence de H<sup>+</sup> afin de produire de l'eau (**Figure 17**) (Lechardeur et al., 2011). Il existe différentes familles de cytochromes oxydases selon le type d'hème utilisé (Sone et al., 2004) (**Tableau V**).
- L'ATP synthase produit de l'énergie sous forme d'ATP (**Figure 17**). Le gradient électrochimique créé au cours de l'oxydation du NADH, des quinols et de la réduction de l'oxygène en H<sub>2</sub>O entraîne un flux de protons du milieu extracellulaire vers le cytoplasme par l'ATP synthase membranaire. Ce passage transmembranaire des protons génère assez d'énergie pour convertir l'ADP en ATP (Deckers-Hebestreit and Altendorf, 1996).

Dans le prochain paragraphe, nous allons détailler le cytochrome *bd* présent uniquement chez les procaryotes.



**Figure 18 : Représentation schématique du cytochrome *bd*.** Le cytochrome *bd* est composé de 3 sous-unités : CydA, CydB et CydX. L'enzyme catalyse la réduction de l' $O_2$  en  $H_2O$  au niveau de l'hème *d* avec des protons venant du cytoplasme. Les  $e^-$  des quinols (QH2) réduisent l'hème  $b_{558}$  qui est réoxydé lors du transfert des  $e^-$  à l'hème *d*, étant en équilibre redox avec l'hème  $b_{595}$ . (les valeurs 558 et 595 indiquent les valeurs en nm de pics caractéristiques du spectre UV-visible de l'hème associé dans CydA). D'après (Forte et al., 2017).



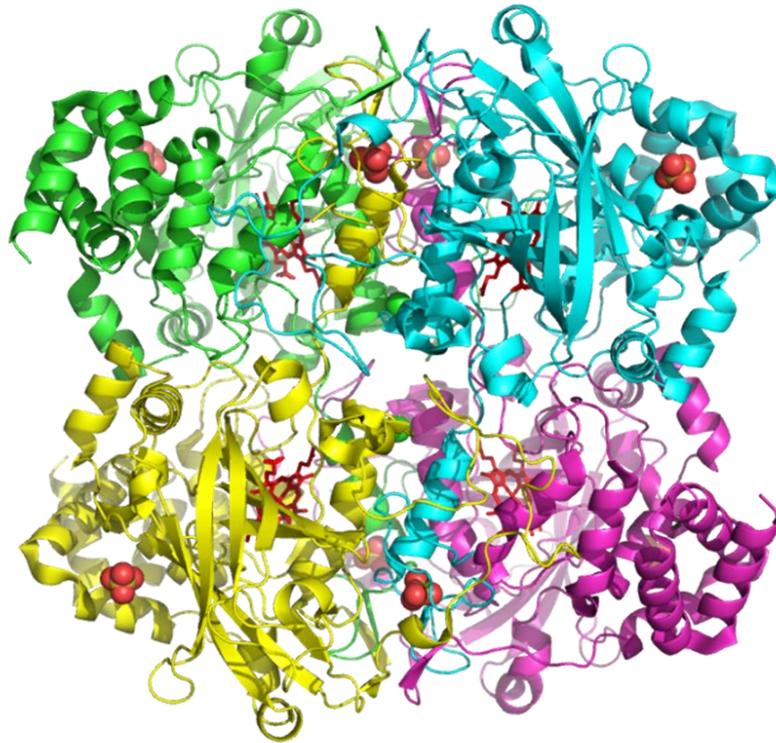
**Figure 19 : Principales fonctions cellulaires associées au cytochrome *bd*.** Structure cristallographique du cytochrome *bd* issu du fichier 6RKO dans PDB. D'après (Forte et al., 2017).

### B.2.1.2. Le cytochrome *bd*, une hémoprotéine aux multiples fonctions

Le cytochrome *bd*, est une oxydoréductase de la chaîne respiratoire des procaryotes. Elle se compose de trois sous-unités codées par les gènes *cydA*, *cydB* et un gène de la famille *cydX* (nommé *cydY*, *cydZ* ou *cydS* selon les espèces) (**Figure 18**)(Forte et al., 2017).

La sous-unité *cydA* comprend les 3 molécules d'hème (2 hèmes *b* et 1 hème *d*) et constitue le domaine catalytique de la protéine (**Figure 18**)(Safarian et al., 2016). Les deux autres sous unités sont indispensables au fonctionnement du cytochrome même si leur rôle reste incertain. Elles sembleraient avoir une fonction dans l'assemblage et la stabilité du complexe (Forte et al., 2017). Cette enzyme catalyse à la fois l'oxydation de 2 électrons des quinols et la réduction de 4 électrons de l'oxygène pour produire 2 molécules de H<sub>2</sub>O (**Figure 18**). Ces deux réactions sont permises par un transfert d'électrons entre les 3 molécules d'hème (**Figure 18**). Ce cytochrome n'a pas de fonction de pompe à protons mais participe à la création du gradient électrochimique en libérant à la fois des protons dans le milieu extracellulaire lors de l'oxydation des quinols mais aussi en consommant des protons lors de la production de l'eau (Giuffrè et al., 2014).

En résumé, le cytochrome *bd* permet l'établissement du gradient électrochimique utilisé par l'ATP synthase pour produire de l'ATP (**Figure 19**)(Forte et al., 2017). Le rendement de la production d'ATP au cours de la respiration est supérieure à celle de la fermentation et permet une meilleure croissance bactérienne (Duwat et al., 2001). De plus en consommant de l'oxygène, le métabolisme respiratoire diminue le stress oxydant en prévenant la formation de radicaux libres à partir de l'oxygène (Gaudu et al., 2002; Lechardeur et al., 2011). Le cytochrome *bd* est aussi capable d'utiliser d'autres substrats, comme accepteurs d'électrons comme le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Chang et al., 2006) ou le NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en condition anaérobie (Borisov et al., 2015), participant à la résistance au stress oxydant généré par ces deux molécules et permettant une respiration anaérobie (**Figure 19**). Enfin contrairement à d'autres cytochromes, il a été montré que le cytochrome *bd* est résistant au H<sub>2</sub>S permettant la respiration dans de tels environnements (**Figure 19**)(Korshunov et al., 2016). Toutes ces fonctions ont aussi un rôle dans la virulence et la résistance au système immunitaire de l'hôte (**Figure 19**).

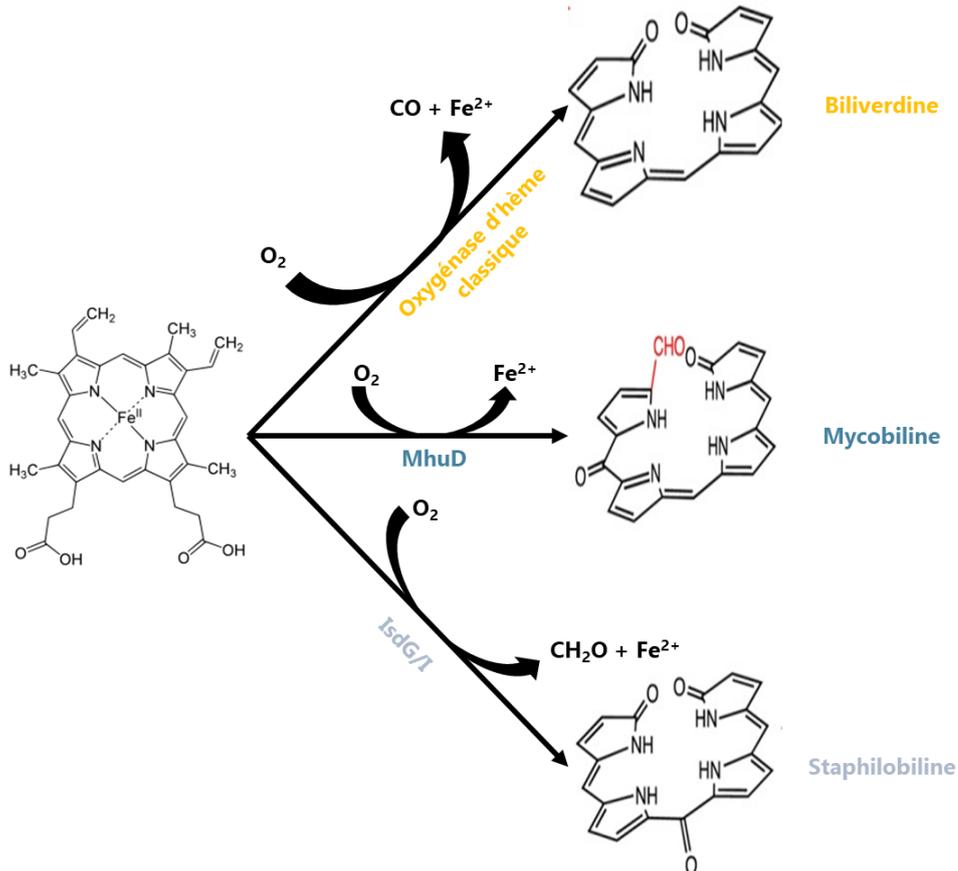


**Figure 20 : Structure cristallographique de la catalase KatA d'*Enterococcus faecalis*.** La catalase a une structure d'homotétramère (une couleur par monomère) avec une molécule d'hème (en rouge) par monomère liée de façon non-covalente. D'après 1S18 dans PDB et (Hakansson et al., 2004).

### B.2.2. Les catalases à hème

La résistance au stress oxydant provoqué par la production des espèces réactives de l'oxygène et d'autres molécules oxydantes (reactive oxygen species ; ROS) est un enjeu majeur pour la survie bactérienne. Pour cela, les bactéries possèdent un arsenal d'enzymes capables de détoxifier les différentes espèces de ROS. On peut citer les superoxydes dismutases prenant en charge les ions superoxyde ( $O_2^-$ , etc), les NADH peroxydases, les glutathions peroxydases ou les catalases prenant en charge le peroxyde d'hydrogène (Carbona et al., 2007). Dans la suite de ce paragraphe, nous allons nous focaliser sur les catalases et plus particulièrement l'exemple de la catalase A d'*Enterococcus faecalis* (KatA) qui a été étudiée au cours de cette thèse.

Les catalases ont pour fonction de détoxifier le  $H_2O_2$  en le transformant en  $H_2O$  et  $O_2$ . Les catalases sont classées en trois catégories : les catalases strictes, les catalases-peroxydases et les catalases peroxydases à manganèse (Zamocky and Koller, 1999). L'hème est le groupement prosthétique des catalases strictes et des catalases-peroxydases. La catalase A (KatA) d'*E. faecalis* appartient à la catégorie des catalases strictes (EC 1.11.1.6) et sa séquence d'AA a une grande homologie de séquence d'AA avec des catalases des mammifères (Baureder et al., 2014; Díaz et al., 2012). La structure 3D de l'enzyme (Hakansson et al., 2004) montre une conformation d'homotétramère avec une molécule d'hème par monomère liée de façon non covalente (**Figure 20**). *E. faecalis* est auxotrophe pour l'hème, un import d'hème exogène est donc nécessaire à la synthèse de la protéine (Frankenberg et al., 2002). Le gène *katA* est exprimé en présence ou non d'hème, mais la forme apo de la protéine n'est pas détectable laissant supposer une instabilité et une dégradation de la protéine sans hème lors de sa biosynthèse (Frankenberg et al., 2002). L'hème est donc ajouté au cours de la biosynthèse de KatA et permet la production de l'enzyme fonctionnelle (Baureder et al., 2014). Par conséquent KatA qui a une fonction dans la résistance au  $H_2O_2$  (Baureder et al., 2012) n'est fonctionnelle qu'en présence d'hème exogène.



**Figure 21 : Les différentes oxygénases d'hème.** Il existe 3 types d'oxygénases d'hème (HO). Les HO « classiques » (en jaune) dégradent l'hème en présence d' $O_2$  en biliverdine et CO. MhuD (en bleu) dégrade l'hème en mycobiline sans générer de CO. Les IsdG/I (en gris) dégradent l'hème en staphylobiline avec libération de méthanal et du fer. D'après (Nambu et al., 2013).

### B.2.3. Les oxygénases d'hème

L'hème peut être utilisé directement en tant que cofacteur dans les hémoprotéines mais il peut être aussi une source de fer pour les bactéries. La dégradation de l'hème permettant la libération du fer est effectuée par une classe d'enzymes : les oxygénases d'hème (**Heme Oxygenase** ; HO). La voie la plus classique est la dégradation de l'hème en biliverdine et monoxyde de carbone (CO) en présence d'oxygène (**Figure 21**). Il existe de nombreuses isoformes de HO capables de catalyser cette réaction que ce soit chez les eucaryotes ou les procaryotes (Li and Stocker, 2009). On peut citer, par exemple, HmuO (Schmitt, 1997), HemO (Zhu et al., 2000) et PigA (Ratliff et al., 2001) que l'on retrouve respectivement chez *Corynebacterium diphtheriae*, *Neisseria meningitides* et *Pseudomonas aeruginosa*.

D'autres HO vont permettre l'ouverture du noyau porphyrine par une réaction d'oxygénation différente comme les IsdG chez *S. aureus* et les IsdG-like chez *B. anthracis* ou *M. tuberculosis* (MhuD). Le produit de dégradation n'est pas de la biliverdine mais de la staphilobiline (15-oxobilirubine) (Reniere et al., 2010) ou de la mycobiline (**Figure 21**) (Nambu et al., 2013).

Toutes ces HO permettent de libérer le fer du noyau porphyrine, utilisé ensuite au sein du métabolisme bactérien. Des études ont montré qu'au cours de l'infection, l'hème était la source de fer privilégiée pour les bactéries (Skaar et al., 2004), ce qui nous amène au chapitre suivant qui porte sur les sources d'hème dans l'hôte et les différents mécanismes d'acquisition des bactéries à Gram positif.

### B.3. Les sources d'hème dans l'hôte et les mécanismes d'acquisition par les bactéries à Gram positif

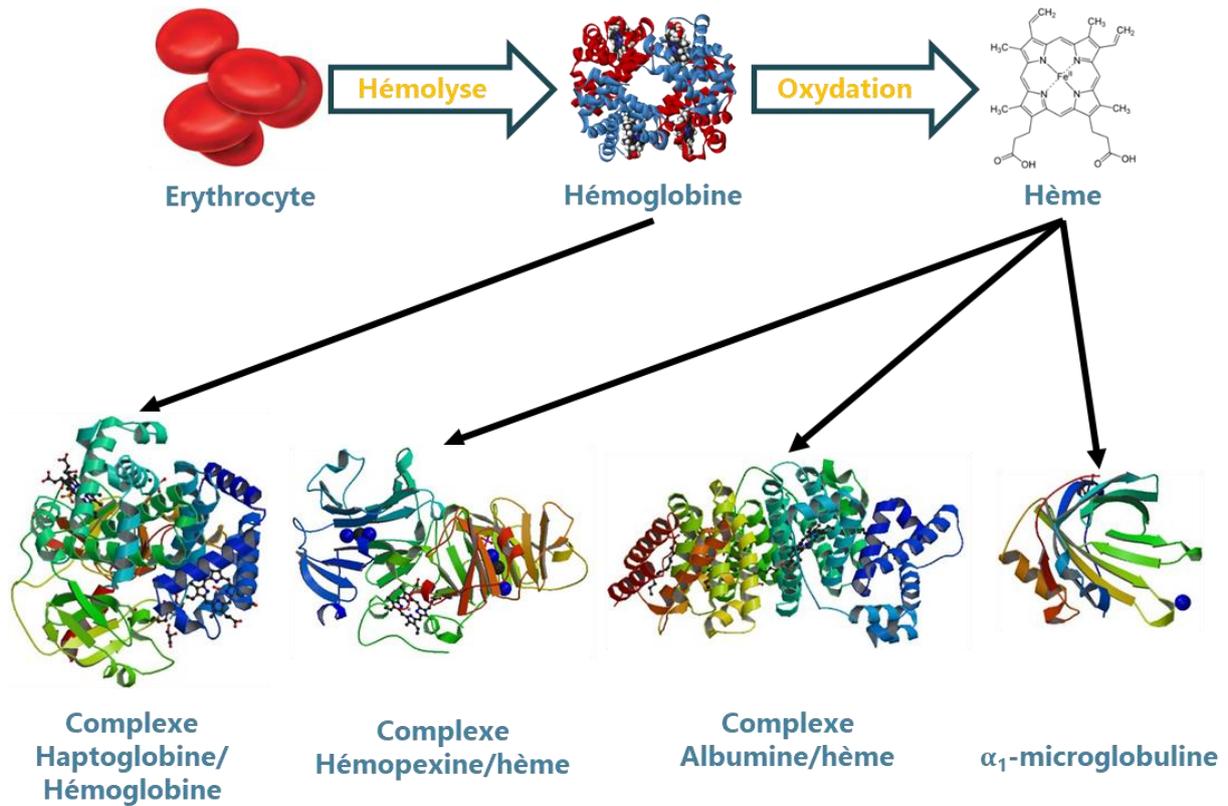
L'hème, en tant que cofacteur ou source de fer, est essentiel à de nombreuses fonctions cellulaires aussi bien pour les procaryotes que pour les eucaryotes. La plupart des procaryotes possède la voie de biosynthèse de l'hème présentée précédemment (voir **B1.2.**); un grand nombre pourtant ne le synthétise pas, car ils ne possèdent aucune ou seulement certaines des



enzymes de la voie de synthèse de l'hème (Gruss et al., 2012). D'un point de vue évolutif, les bactéries qui ne synthétisent pas l'hème, auraient perdu cette fonction. Elles sont remarquablement dispersées dans la phylogénie que ce soit chez les bactéries à Gram positif ou négatif (Pedersen et al., 2012). Certaines sont pathogènes comme *Haemophilus*, *Mycoplasma* ou *Bartonella*; d'autres non, comme les bactéries lactiques (Lactocoques, *Leuconostoc*, une partie des *Lactobacilles* et certains *Streptocoques*) ainsi que les bactéries de la flore intestinale (*Bifidobacterium*, *Bacteroides* ou *Clostridia*). Elles sont donc dépendantes de l'hème exogène pour subvenir à leurs besoins. De plus, comme indiqué précédemment, l'hème est la source de fer privilégiée et la plus abondante chez l'hôte. Synthétisant l'hème ou non, les bactéries à Gram positif sont capables d'internaliser l'hème exogène. Les mécanismes d'acquisition de l'hème sont néanmoins encore mal connus pour la plupart des bactéries à Gram positif. Dans l'hôte, bien que présent en grande quantité, la concentration de la forme libre de l'hème est très faible. En effet, l'hème est majoritairement associé à l'hémoglobine dans les érythrocytes. En tant que molécule très toxique, l'hème libre est pris en charge par des protéines spécifiques qui vont neutraliser sa toxicité et limiter sa disponibilité pour les pathogènes (principe d'immunité nutritionnelle)(Choby and Skaar, 2016). Les bactéries ont développé des mécanismes leur permettant de récupérer l'hème libre ou associé aux différentes hémoprotéines de l'hôte et de l'internaliser.

### **B.3.1. Les hémoprotéines du sang**

Le sang et plus particulièrement l'hémoglobine (Hb) représente la plus grande réserve d'hème et de fer de l'hôte (environ les 2/3)(Cassat and Skaar, 2013; Choby and Skaar, 2016). L'Hb est une protéine essentielle chez les vertébrés permettant le transport de l'oxygène (Bellelli and Brunori, 2011). L'Hb est un tétramère composé de 2 sous-unités  $\alpha$  et de 2 sous-unités  $\beta$  comprenant chacune une molécule d'hème. L'hème est maintenu sous forme  $Fe^{2+}$  dans les érythrocytes par des réductases afin de permettre la liaison à l' $O_2$ . Dans un érythrocyte, on compte environ 280 millions de molécules d'Hb représentant une source d'hème et de fer pour les bactéries pathogènes (Choby and Skaar, 2016). Lorsque les érythrocytes sont lysés,



**Figure 22 : Mécanismes de séquestration de l'hème (chez les mammifères).** Lors de l'hémolyse des érythrocytes, l'hémoglobine est libérée dans le sang où elle peut être piégée par l'haptoglobuline (Hp)(complexe d'après la structure 4X0L dans PDB), évitant ainsi son oxydation et la libération de l'hème. Si de l'hème parvient à être libéré, il va être reconnu par l'hémopexine (Hx) (complexe d'après la structure 1QJS dans PDB). D'autres protéines peuvent neutraliser l'hème en s'y liant, telles que l'albumine (complexe d'après la structure 1N5U dans PDB) et l' $\alpha_1$ -microglobuline (d'après la structure 3QKG dans PDB) dans le sérum.

l'hème de l'hémoglobine est oxydé (methémoglobine), ce qui diminue son affinité pour la globine et facilite sa libération. L'hème libre est pris en charge par des protéines comme l'hémopexine ou l'albumine sérique (Alb) alors que l'Hb est séquestrée par l'haptoglobine (Hp) afin de limiter sa toxicité (**Figure 22**). Les hémoprotéines sont ensuite dégradées ou recyclées dans le foie ou les macrophages (Gruss et al., 2012).

L'haptoglobine (Hp) (**Figure 22**) est une glycoprotéine synthétisée dans le foie et dont la production est induite par des cytokines durant les processus inflammatoires. Elle a une forte affinité pour l'Hb et le complexe Hp-Hb est pris en charge par les macrophages afin d'être dégradé (Andersen et al., 2012). Cependant, il peut être une source d'hème pour certaines bactéries Gram négatives comme *H. influenzae* (Seale et al., 2006) ou *P. gingivalis* qui possèdent des systèmes d'acquisition du complexe Hp-Hb (Smalley and Olczak, 2017). L'hémopexine (**Figure 22**) est une glycoprotéine synthétisée par le foie, présente dans l'ensemble des fluides biologiques. Elle possède une très forte affinité pour l'hème ( $K_d < 1\text{pM}$  (Shipulina et al., 2000)). Le complexe hémopexine-hème est transporté jusqu'au foie, organe de recyclage du fer de l'hème alors que l'hémopexine retourne dans la circulation (Ascenzi et al., 2005; Delanghe and Langlois, 2001). *H. influenzae* est capable d'utiliser ce complexe comme source d'hème (Cope et al., 1998; Fournier et al., 2011). L'albumine sérique (Alb) (**Figure 22**) produite dans le foie est la protéine la plus abondante dans le plasma. Elle possède un spectre large de ligands dont l'hème mais aussi la bilirubine, les acides gras, les acides biliaires ou les stéroïdes (Fasano et al., 2005). Suite à l'hémolyse, l'hème est pris en charge par l'Alb (avec une affinité de l'ordre du  $\mu\text{M}$ ) et est ensuite transféré graduellement à l'hémopexine, qui a une affinité plus grande pour l'hème (voir ci-dessus). Certaines bactéries possèdent des récepteurs à albumine comme *Streptococcus dysgalactiae* (Egsten et al., 2011) et *Finnegoldia magna* (de Chateau and Bjorck, 1994) permettant l'acquisition de l'hème à partir du complexe albumine-hème. Une dernière protéine synthétisée par le foie est capable de capturer l'hème et de le dégrader une fois activée : l' $\alpha$ 1-microglobuline (**Figure 22**) a la capacité de fixer 2 molécules d'hème (Rutardottir et al., 2016). Cette fixation entraîne le clivage des 4 AA de la partie C-terminale de l' $\alpha$ 1-microglobuline par une myeloperoxydase. Ce clivage a pour conséquence l'activation de la protéine et la dégradation de l'hème (Cederlund et al., 2015).



### B.3.2. L'hème dans le tractus digestif

Le microbiote intestinal situé dans le tractus digestif (TD) est composé majoritairement de bactéries auxotrophes pour l'hème. Ainsi, les 2 principaux phyla, les *Bacteroidetes* et les *Clostridia*, ne synthétisent pas l'hème mais en ont un besoin strict (Halpern and Gruss, 2015). On peut aussi citer d'autres phyla comme les *Lactobacilli*, *Enterococci* ou les *Streptococci* tous auxotrophes pour l'hème. Il existe plusieurs sources d'hème dans le TD qui sont supposées compenser l'auxotrophie.

L'hème alimentaire d'origine animale (sang) ou végétal (présent dans les mitochondries ou les nodules des légumineuses) sont des sources d'hème importantes. L'absorption intestinale de l'hème est plus efficace que celle du fer libre (Bezwooda et al., 1983; West and Oates, 2008). Durant la digestion, les enzymes protéolytiques du TD libèrent l'hème des hémoprotéines comme l'hémoglobine. L'hème intestinal, est ensuite internalisé par les cellules épithéliales du duodénum permettant son utilisation par l'hôte. L'apport en hème par le régime alimentaire a un impact sur la composition du microbiote. Par exemple, une alimentation riche en viande rouge et donc riche en hème (Geissler and Singh, 2011) favorise les bactéries à GRAM négatif telles que *Bacteroides thetaiotaomicron* (Ijssennagger et al., 2012) qui ont un besoin vital d'hème pour leur croissance. A l'inverse, chez les végétariens, *Bacteroidetes* constitue une proportion moindre du microbiote (Zimmer et al., 2012).

Vient s'ajouter à l'alimentation, des micro-saignements (ou pertes de sang occultes) ayant lieu dans le TD. Chez un individu sain, ces saignements peuvent représenter 0.5 à 1.5 ml de sang par jour (Ahlquist et al., 1985). Dans certains cas de pathologies comme les cancers colorectaux ou des inflammations intestinales (maladie de Crohn), ces saignements peuvent devenir abondants au point d'être détectables dans les selles (Halpern and Gruss, 2015; Park et al., 2010).

Enfin, une dernière hypothèse envisage les  $\gamma$ -protéobactéries, en particulier, les entérobactéries comme *E. coli* comme source d'hème potentielle. Ils constituent le seul groupe du microbiote intestinal synthétisant l'hème. Des expérimentations *in vitro* ont montré qu'*E. coli* seul pouvait apporter l'hème nécessaire à la survie de *B. thetaiotaomicron in vitro* en



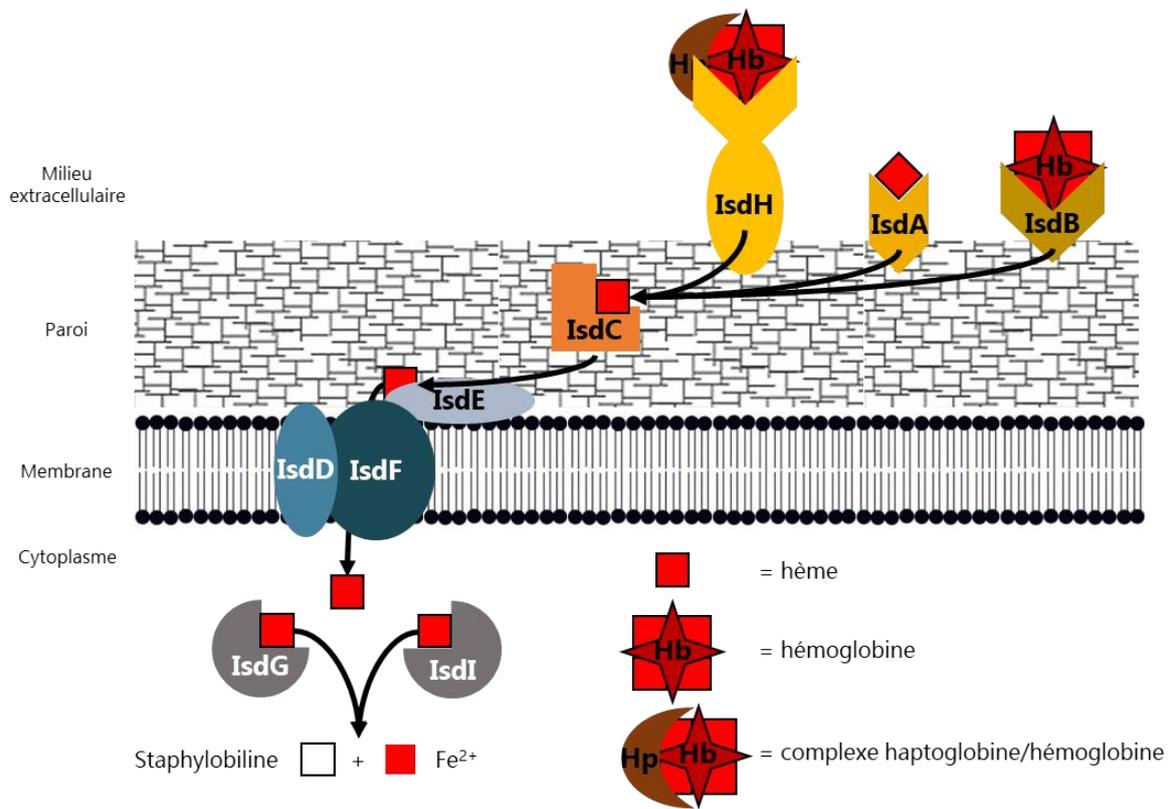
coculture (Halpern and Gruss, 2015). De plus, même si ce groupe est une sous population de la flore intestinale chez un individu adulte, il constituerait la première population bactérienne colonisant le TD de nouveau-né (Fanaro et al., 2003). Cela laisse supposer que, dans le TD, la biosynthèse d'hème par *E. coli* peut être une source d'hème pour permettre à *B. thetaiotaomicron* de s'établir. Cette hypothèse rentre dans le concept de « cross feeding » entre bactéries et pourrait expliquer pourquoi certaines bactéries ont perdu la capacité de synthétiser l'hème.

Ainsi, bien que les sources d'hèmes soient nombreuses, il est majoritairement complexé à des protéines afin de limiter son accès et sa toxicité. Pour surmonter cet obstacle, les bactéries ont développé des systèmes d'acquisition capable de récupérer l'hème complexé (**voir B.3.4.**).

### **B.3.3. Autres sources d'hème et de porphyrines**

Les plantes peuvent aussi être une source d'hème. En particulier, les plantes légumineuses sont riches en hème. Ces plantes produisent des nodules sur leurs racines, qui contiennent la bactérie endosymbiote rhizobium. Ces structures contribuent au transport de l'oxygène et la fixation des nitrates (Kundu and Hargrove, 2003). La leghémoglobine présente dans les nodules lie l'hème et transporte l'oxygène. Ces nodules constituent une source d'hème démontrée pour des bactéries telles que *Lactococcus lactis* (Résultats non-publiés du laboratoire). Bien que connues principalement pour leur utilisation dans les fermentations alimentaires, certaines bactéries lactiques comme *L. lactis* sont des résidents naturels des plantes et des animaux, écosystèmes où l'hème est présent.

Certaines bactéries auxotrophes pour l'hème ont une voie de biosynthèse incomplète et possèdent une ferrochélatase permettant l'incorporation du fer dans la protoporphyrine. Ce précurseur de l'hème est présent dans le sang à une concentration autour de 50-100 nM et peut atteindre jusqu'à 20 µM dans les fèces (Chen and Hirsch, 2006; Nakamura et al., 2011). La protoporphyrine pourrait donc constituer une source d'hème importante chez les bactéries qui expriment une ferrochélatase.



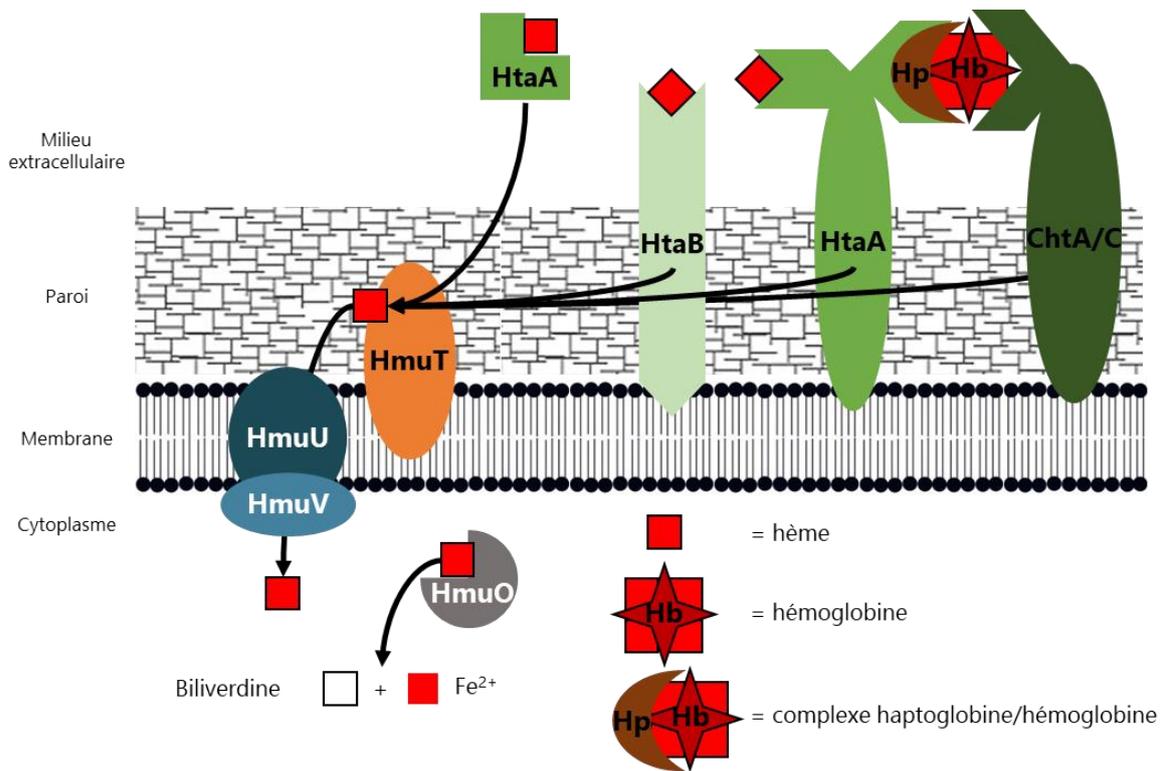
**Figure 23 : Les systèmes d'acquisition de l'hème chez *Staphylococcus aureus*.** IsdB, H et A sont ancrées à la paroi et possèdent respectivement 2, 3 et 1 domaines NEAT qui permettent la liaison à l'hème libre ou associé à l'hémoglobine, et à l'haptoglobine (Hp en marron). L'hème est ensuite transféré à IsdC (en orange) puis internalisé à travers le système le transport IsdDEF. Une fois dans le cytoplasme, l'hème est dégradé par les oxygénases d'hème IsdG et I (en gris) afin de libérer le fer. D'après (Choby and Skaar, 2016).

### B.3.4. Les mécanismes d'acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram positif

Les mécanismes permettant la capture et l'acquisition de l'hème par les bactéries à Gram positif sont encore peu connus et mal caractérisés, à l'exception de quelques pathogènes comme *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* et *Corynebacterium diphtheriae*. Les systèmes d'acquisition de l'hème connus ne sont en général pas conservés. Ils sont constitués d'une part, de protéines de surface qui vont reconnaître l'hème ou des protéines liant l'hème (voir chapitre précédent) et d'autre part, un système de transport transmembranaire de l'hème libre. En ce qui concerne les bactéries à Gram négatif, pour lesquelles de nombreux systèmes d'acquisition de l'hème ont été décrits, la membrane extérieure représente un obstacle supplémentaire à l'acquisition de l'hème exogène. Leurs systèmes d'acquisition diffèrent et se composent de protéines de surface sur la membrane externe, pouvant lier directement l'hème libre et des hémoprotéines ou fixer l'hème lié à des hémophores sécrétés. L'hème transite ensuite à travers le périplasme et est internalisé par le biais de transporteur ABC au niveau de la membrane interne (Richard et al., 2019; Wilks and Burkhard, 2007). Nous allons donner un aperçu global des systèmes d'acquisition de l'hème chez les bactéries à Gram positif en décrivant les systèmes Isd de *S. aureus* et les systèmes de *C. diphtheriae*.

#### B.3.4.1. Acquisition de l'hème chez *Staphylococcus aureus* grâce au système Isd

Le système de capture de l'hème Isd pour « Iron-regulated surface determinant » est un des deux modèles connus de mécanismes d'acquisition par les bactéries à Gram positif (Mazmanian et al., 2003). *S. aureus* est capable d'hémolyser les érythrocytes avec les leucocidines HlgAB et LukED afin de libérer l'Hb dans le système sanguin (Spaan et al., 2015). Suite à l'hémolyse, l'hème libre ou l'hémoglobine sont pris en charge par différentes protéines (**voir B.3.1.**). Le système Isd est capable de capter l'hème libre, l'hème fixé à l'Hb ainsi que le complexe Hp-Hb (**voir B.3.1.**). Ces différentes formes d'hème sont capturées par des protéines localisées sur la face externe de la paroi (IsdB, IsdH et IsdA ;**Figure 23**). Ces protéines possèdent des domaines structuraux NEAT responsables de la liaison à l'hème (**Figure 16**).



**Figure 24 : Les systèmes d'acquisition de l'hème chez *C. diphtheriae*.** HtaA est soit ancré à la membrane ou sécrété en tant qu'hémophore. Ancré à la membrane il peut alors se lier au complexe hémoglobine/haptoglobine (Hp en marron) en coordination avec ChtA/C. HtaB est ancré à la membrane et peut lier l'hème libre. L'hème est ensuite transféré à HmuT (en orange) puis internalisé par le système le transport HmuUV. Une fois dans le cytoplasme, l'hème est dégradé par l'oxygénase d'hème HmuO (en gris). D'après (Choby and Skaar, 2016).

Au niveau de la paroi, IsdB et IsdH sont capables de lier l'hème libre associé à l'hémoglobine ou au complexe Hp-Hb (Dryla et al., 2003; Pishchany et al., 2014). Ces 2 protéines peuvent extraire l'hème de ces hémoprotéines via un de leur domaine NEAT par transfert d'affinité et le transporter soit à IsdA ou directement à IsdC (**Figure 23**) (Zhu et al., 2008). Une lipoprotéine membranaire IsdE, constitue le récepteur final de l'hème avant son passage transmembranaire par le transporteur ABC, IsdDF (**Figure 23**). L'hème est internalisé grâce à l'énergie apportée par l'ATPase de IsdD. Une fois dans le compartiment cellulaire, l'hème est soit incorporé directement à des hémoprotéines, soit dégradé par les hèmes oxygénases IsdG et IsdI afin de libérer le fer (**voir B.2.4. et Figure 23**)(Skaar et al., 2004).

L'ensemble des gènes de ces protéines est organisé en trois opérons dont la transcription est régulée par le facteur de transcription dépendant du fer, Fur. Ce système d'acquisition est donc fonctionnel dans les milieux carencés en fer (Mazmanian et al., 2003). Il a cependant été montré que la délétion des gènes du système Isd n'empêche pas l'utilisation de l'hème libre ou associé à l'hémoglobine chez *S. aureus* (Wright and Nair, 2012). Ce résultat suggère l'existence d'autres mécanismes de transport de l'hème. On retrouve un mécanisme similaire chez *B. anthracis* (Balderas et al., 2012; Gat et al., 2008; Maresso et al., 2008) et *Bacillus cereus* (Daou et al., 2009).

#### B.3.4.2. Stratégie d'acquisition de l'hème chez *Corynebacterium diphtheriae*

*C. diphtheriae* utilise un ensemble unique de protéines ne possédant pas de domaines NEAT pour l'acquisition de l'hème. Cette stratégie d'acquisition met en jeu 3 opérons de gènes : *HmuTUV*, *HtaABC*, *ChtABC/CirA* dont la transcription est régulée par le facteur de transcription DtxR réprimé par le fer (**Figure 24**)(Kunkle and Schmitt, 2005). Ces deux groupes de gènes codant pour des protéines de surface affines pour l'hème ou des protéines liant l'hème (*HtaABC* et *ChtABC/CirA*) ont une fonction redondante; *ChtAB* et *ChtC* étant des duplications de *HtaAB*. HtaA (heme-transport associated ; hta) a la particularité d'être soit une lipoprotéine ancrée à la membrane qui peut acquérir l'hème libre ou l'hème du complexe Hp-Hb en coordination avec ChtA ou ChtC, soit d'être un hémophore sécrété dans le milieu extracellulaire. HtaB peut fixer l'hème libre ou l'hème provenant de HtaA afin de le transférer à la lipoprotéine HmuT (hemin uptake ; Hmu)(**Figure 24**)(Allen and Schmitt, 2009, 2011).

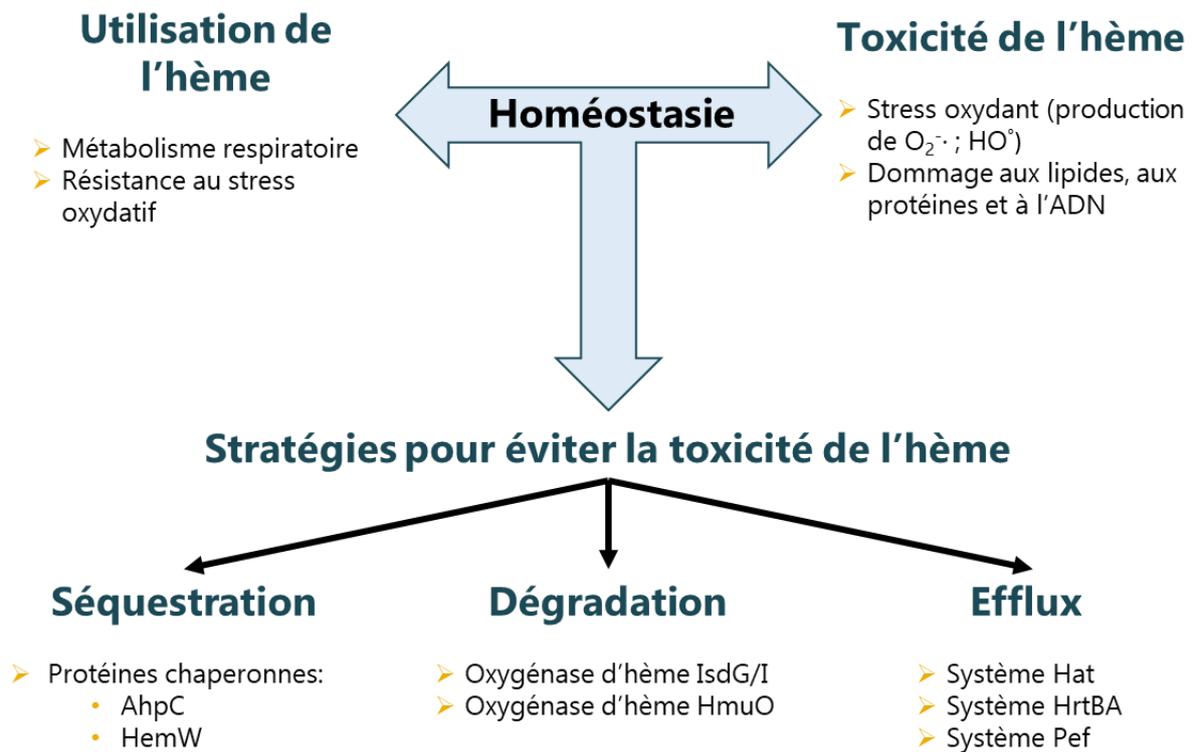


Figure 25 : Schéma récapitulatif des différentes stratégies de contrôle de l'homéostasie de l'hème chez les bactéries à Gram positif.

L'hème est ensuite internalisé grâce au transporteur ABC membranaire HmuUV (Drazek et al., 2000). Dans le cytoplasme l'hème peut être dégradé par l'hème oxygénase HmuO (**voir B.2.4. et Figure 24**) (Schmitt, 1997) afin de libérer le fer ou peut être utilisé directement en tant que cofacteur des hémoprotéines.

L'hème est à la fois une molécule indispensable pour de nombreuses bactéries mais paradoxalement, c'est aussi une molécule très toxique. Parallèlement à des systèmes d'acquisition, les bactéries expriment des systèmes de défense contre l'hème pour assurer leurs besoins tout en limitant sa toxicité.

#### **B.4. Contrôle de la toxicité de l'hème chez les bactéries à Gram positif**

Le contrôle de l'homéostasie de l'hème est crucial pour la survie de la bactérie afin de permettre l'utilisation de l'hème tout en limitant sa toxicité (**Figure 25**). Il a été néanmoins démontré que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles à l'hème que les bactéries à Gram négatif (Nitzan et al., 1994). Au cours de l'évolution, les bactéries ont développé différentes stratégies afin de contrôler la toxicité de l'hème dont les deux principales sont l'efflux et la séquestration (Choby and Skaar, 2016). A noter que la dégradation de l'hème par les oxygénases d'hème (**voir B.2.4.**) contribue à la réduction de la toxicité de l'hème en clivant le noyau porphyrine et en permettant le recyclage du fer (**Figure 25**).

##### **B.4.1. Séquestration de l'hème par des protéines chaperonnes**

La toxicité et l'hydrophobicité de l'hème libre permet de penser qu'une fois internalisé, il va être associé à des protéines chaperonnes qui vont lui permettre d'atteindre ses cibles intracellulaires tout en limitant ses effets délétères. Certaines protéines intracellulaires ou membranaires ont été décrites chez les bactéries à Gram positif pouvant jouer ce rôle. A noter que des protéines chaperonnes de l'hème ont aussi été mises en évidence chez les bactéries à Gram négatif et chez les eucaryotes.



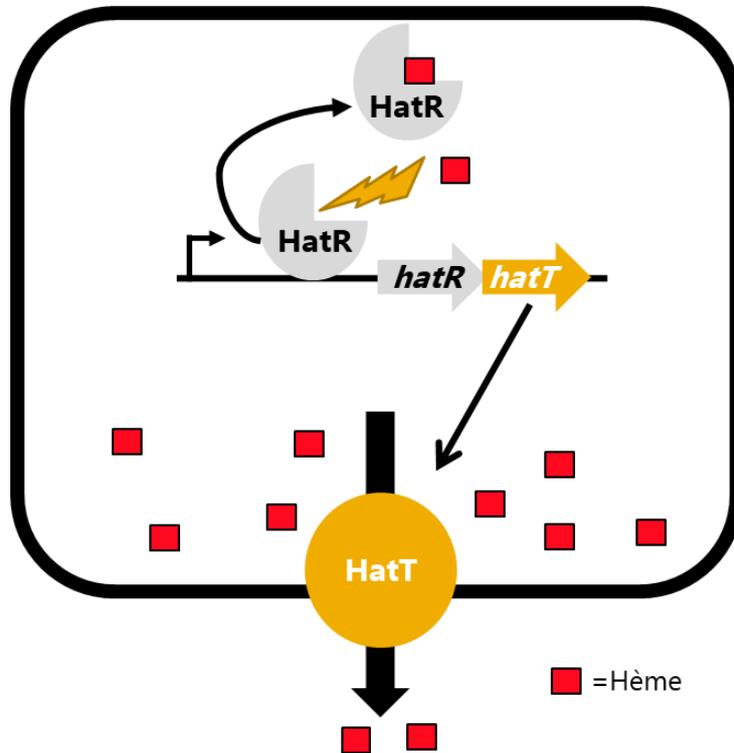
On peut citer les protéines de la famille HemS décrites chez *Yersinia enterocolitica*, *P. aeruginosa* et *E. coli* (Kaur et al., 2008; Ouellet et al., 2016; Stojiljkovic and Hantke, 1994) ou la protéine E de *H. influenzae* (Al Jubair et al., 2014).

#### B.4.1.1. L'alkylhydroperoxyde reductase (AhpC)

L'alkylhydroperoxyde reductase 2-Cys peroxiredoxine C (AhpC) appartient à une famille de peroxydases très conservées (les peroxyredoxines) connues pour être impliquées dans la résistance au stress oxydant sans cofacteur hème (Rhee, 2016). Il a été montré que, chez *L. lactis* et *S. agalactiae*, AhpC lie l'hème sans impact sur sa fonction peroxydase (Lechardeur et al., 2010). L'absence de AhpC provoque une diminution des capacités de la bactérie à utiliser l'hème pour la respiration, suggérant que AhpC peut jouer un rôle de chaperonne intracellulaire (Lechardeur et al., 2010). Enfin des expériences *in vitro* ont montré que l'hème, dans le complexe AhpC-hème, est protégé des dégradations oxydatives. L'ensemble de ces résultats suggèrent que AhpC participe à la biodisponibilité intracellulaire de l'hème chez *S. agalactiae* (Lechardeur et al., 2010).

#### B.4.1.2. Le système HsmRA de *Clostridium difficile*

Ce système de protection contre la toxicité de l'hème appelé HsmRA (**H**eme-**s**ensing **m**embrane protein [R, regulator ; A, membrane protein]) est composé d'un facteur de transcription de la famille MarR (HsmR) et d'une protéine membranaire capable de séquestrer l'hème (HsmA)(Knippel et al., 2020). HsmR est un facteur de transcription, qui une fois lié à l'hème, va activer la transcription de l'opéron *hsmRA*. La séquestration de l'hème par HsmA a deux fonctions identifiées, tout d'abord réduire la toxicité de l'hème en diminuant sa concentration et augmenter la résistance à des composés qui génèrent un stress oxydant comme la vancomycine ou le métronidazole. Le mécanisme de détoxification du stress oxydant et des antibiotiques reste à être élucidé (Knippel et al., 2020).



**Figure 26** :Schéma du fonctionnement du système HatRT de *Clostridium difficile*. L'hème fixe HatR induisant la levée de la répression de la transcription de l'opéron *hatRT*. HatT exporte l'hème dans le milieu extracellulaire. D'après (Knippel et al., 2018).

#### B.4.1.3. Des chaperonnes potentielles

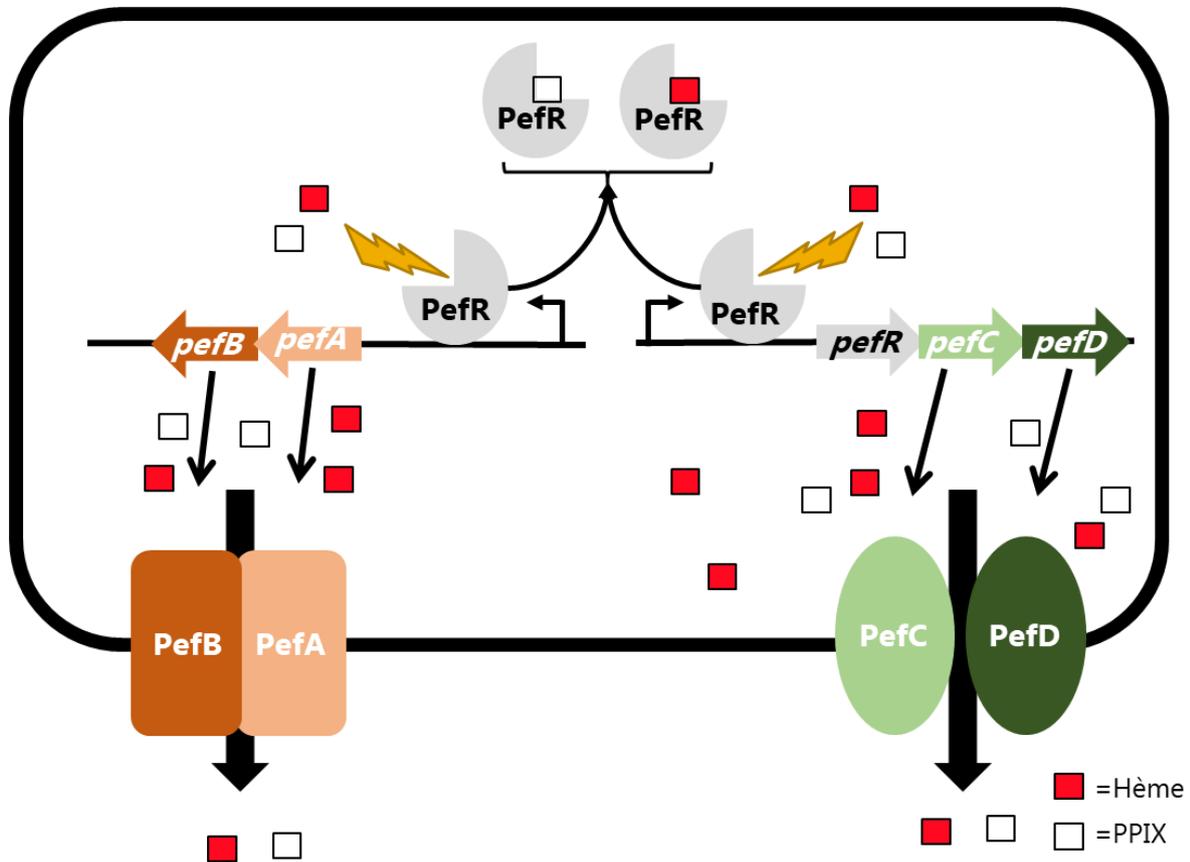
En dehors d'AhpC et HsmA, d'autres protéines ont été proposées pour avoir une fonction chaperonne mais leur fonction exacte reste à être démontrée. On peut citer l'exemple du gène *hemW* chez *L. lactis* codant pour une protéine qui possède 50 % d'identité avec *HemN*, une déshydrogénase du coproporphyrinogène III intervenant dans la synthèse de l'hème. Or chez *L. lactis*, HemW n'a pas le site catalytique de la déshydrogénase (Layer et al., 2002) mais lie l'hème dans la membrane suggérant un rôle de chaperonne. HemW permettrait le transport de l'hème à la chaîne respiratoire est envisageable de manière similaire aux protéines Ccm chez *E. coli* (Abicht et al., 2012; Throne-Holst et al., 1997). HatR, un facteur de transcription chez *Clostridium difficile*, aurait en plus de son rôle de régulation transcriptionnelle, une fonction de séquestration de l'hème permettant une diminution de sa toxicité (Knippel et al., 2018).

### B.4.2. Les systèmes d'efflux de l'hème

Effluer l'excès d'hème semble être une stratégie commune chez de nombreuses bactéries pour limiter sa toxicité. Plusieurs mécanismes ont été décrits chez les bactéries à Gram positif.

#### B.4.2.1. Le système d'efflux Hat

Le système d'efflux d'hème *Hat* (heme activated transporter ; Hat) dont l'expression est fortement induite en présence d'hème a été mis en évidence au cours d'une analyse transcriptomique chez *Clostridium difficile* cultivé en présence d'hème (Knippel et al., 2018). Le système est constitué d'un opéron de deux gènes *hatRT* comprenant un régulateur transcriptionnel, HatR de la famille TetR (**voir A.1.2.**) et un transporteur de la famille des « Major Facilitator Superfamily transporter » (MFS), HatT (**Figure 26**). Ces familles de perméases membranaires sont connues pour transporter un large éventail de composés comme des sucres, des AA, des nucléosides, des antibiotiques, etc...(Pao et al., 1998). HatR agit en tant que répresseur transcriptionnel de l'opéron *hatRT* en absence d'hème. En présence d'hème, HatR lie l'hème et le complexe HatR-hème se détache de l'ADN permettant la transcription de l'opéron.

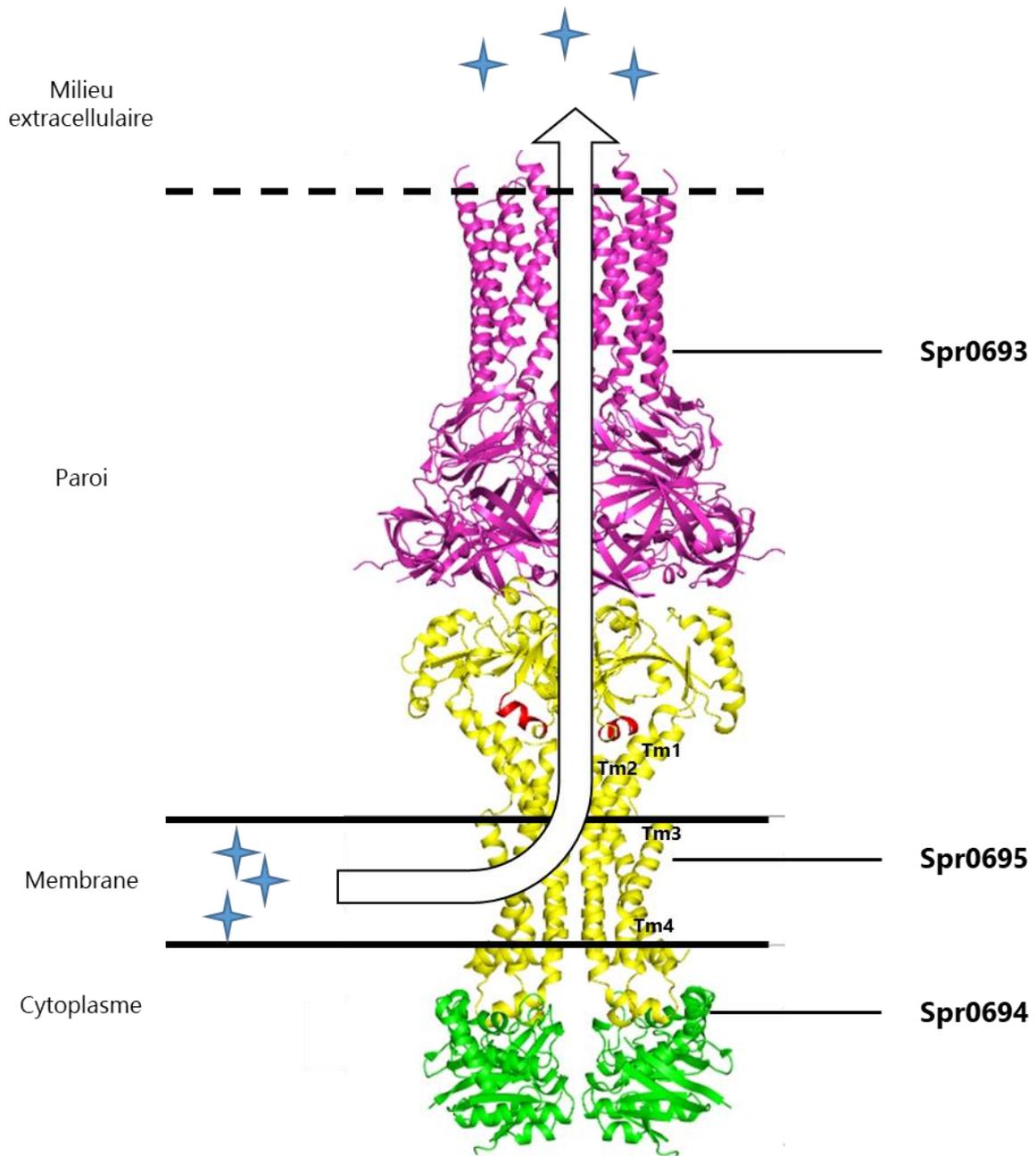


**Figure 27 :Les systèmes de transport Pef (Porphyrin efflux) de *Streptococcus agalactiae*.** L'hème et la porphyrine IX (PPIX) fixent PefR induisant la levée de la répression de la transcription des différents gènes codant pour les sous-unités des transporteurs Pef. PefAB et PefCD exportent l'hème ou la PPIX dans le milieu extracellulaire. D'après (Fernandez et al., 2010).

L'expression de HatT limite la toxicité de l'hème suggérant que ce transporteur joue un rôle de pompe d'efflux et exporte l'hème en excès dans le milieu extracellulaire (Knippel et al., 2018) (**Figure 26**). De plus, l'impact de ce système dans l'hôte a été montré dans un modèle d'infection intestinale murin où une souche mutante du gène *hatT* est moins virulente que la souche WT (Knippel et al., 2018). Ce système HatRT est le premier système d'efflux décrit chez une bactérie à Gram positif anaérobie stricte.

#### B.4.2.2. Le système d'efflux de porphyrines Pef

Le système de transporteurs Pef (Porphyrin efflux) a été décrit pour la première fois chez *Streptococcus agalactiae* dans une étude transcriptomique dans laquelle 2 opérons, *pefAB* et *pefRCD* étaient fortement induits en présence d'hème (Fernandez et al., 2010). Ce système comprend un régulateur transcriptionnel PefR de la famille des répresseurs MarR (multiple antibiotic resistance regulator) (**Tableau II**) régulant les deux opérons et deux transporteurs de la famille MFS (**Major Facilitator Superfamily**) PefAB et PefCD (**Figure 27**) (Fernandez et al., 2010). Les régulateurs de la famille MarR sont impliqués dans la réponse au stress, la virulence ou l'export de produits toxiques comme les antibiotiques (Wilkinson and Grove, 2006). En absence d'hème, PefR est fixé sur les promoteurs des 2 opérons *pefAB* et *pefRCD* empêchant leur transcription. La fixation d'hème mais aussi de protoporphyrine IX à PefR lève l'inhibition de la transcription des 2 opérons en libérant les complexes PefR-hème ou PefR-PPIX de l'ADN (Fernandez et al., 2010). La production des transporteurs membranaires PefAB et PefCD permet l'efflux de l'hème et de la PPIX (**Figure 27**) (Fernandez et al., 2010). Enfin chez *Streptococcus pyogenes* (Streptocoque du groupe A), il a été montré que le transporteur PefCD proche des transporteurs multidrogues SatAB et LmrCD de *Streptococcus suis* (Escudero et al., 2011) et *Lactococcus lactis* (Lubelski et al., 2006) respectivement, n'était pas spécifique de l'hème et de ses dérivés mais capable d'effluer de nombreuses molécules hydrophobes tels que des antibiotiques (ampicilline, erythromycine, norfloxacin), des anticancéreux comme la doxorubine ou des agents toxiques comme l'intercalant de l'ADN, bromure d'éthidium (Zehava, 2016). Le système Pef serait donc impliqué dans la résistance générale de la bactérie et pas seulement dans l'homéostasie de l'hème.



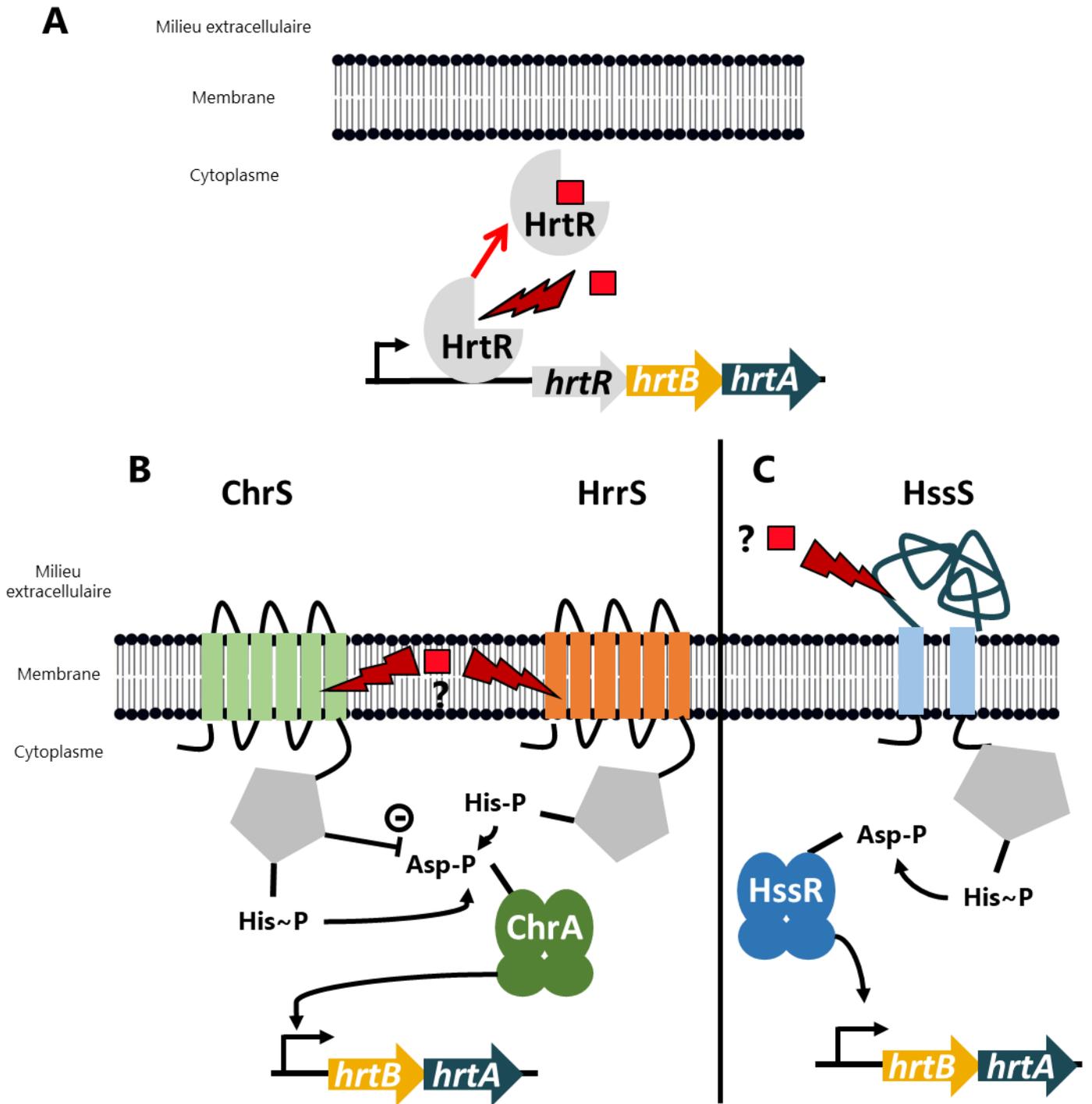
**Figure 28 : Structure cristallographique de la pompe d'efflux MacAB like de *Streptococcus pneumoniae* [Spr0693-0695].** Ce transporteur est constitué de trois sous-unités : Spr0693 (en violet), Spr0694 (en vert), Spr0695 (en jaune). Le complexe Spr0694-0695 est la perméase MacB-like et Spr0693 correspond à MacA. L'empilement des trois sous-unités permet de créer un passage traversant la membrane et la paroi bactérienne. Un modèle a été proposé dans lequel les substrats de la pompe sont pris en charge au niveau de la membrane similairement aux pompes MDR. D'après (Yang et al., 2018).

Des orthologues du système Pef sont présents chez d'autres bactéries à Gram positif comme chez *Enterococcus faecalis* (*PefAB*) (Fernandez et al., 2010), *Streptococcus pyogenes* (*PefCD*) (Zehava, 2016) ou *Streptococcus uberis* (*PefAB* et *PefCD*) (Fernandez et al., 2010b).

#### B.4.2.3. Le transporteur d'efflux HrtBA

Le système Hrt (heme-regulated transporter) a été décrit pour la première fois chez *S. aureus*. Une étude protéomique de l'impact de l'hème chez *S. aureus* a montré que l'opéron *hrtBA* était fortement induit en présence d'hème (Friedman et al., 2006). Cet opéron est composé de deux gènes : i- *hrtA* codant pour une ATPase ; ii- *hrtB* codant pour une perméase transmembranaire, l'ensemble formant un transporteur ABC (Stauff et al., 2008; Torres et al., 2007). Deux protéines homologues (49 % d'identité avec la séquence d'AA d'HrtB et 29 % avec celle de HrtA) ont ensuite été décrites chez *L. lactis*, mais contrairement à *S. aureus*, un troisième gène (*hrtR*) complétait l'opéron (Lechardeur et al., 2012). Ce gène supplémentaire est impliqué dans la régulation de la transcription du transporteur (**voir B.4.3.1.**). En dehors de ces deux espèces, le transporteur a été décrit chez différentes bactéries à Gram positif comme *Staphylococcus epidermidis* (Juárez-Verdayes et al., 2012), *Bacillus anthracis* (Stauff and Skaar, 2009b), *Streptococcus agalactiae* (Joubert et al., 2017), *Corynebacterium diphtheriae* et *glutamicum* (Burgos and Schmitt, 2012; Heyer et al., 2012).

HrtBA est un transporteur d'efflux spécifique de l'hème mais le mécanisme par lequel l'hème est efflué reste encore inconnu (Lechardeur et al., 2012). Cependant, HrtBA appartient à la famille des transporteurs ABC MacAB impliqués dans l'export de petites molécules dont la PPIX (Kobayashi et al., 2001; Turlin et al., 2014). Les perméases (MacB; Spr0694-0695) de cette famille possèdent 4 domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires (**Figure 28**). Une structure cristallographique récente d'un transporteur de cette famille chez *Streptococcus pneumoniae* (Spr0693-0694-0695) propose une entrée du substrat par la membrane sur le côté de la perméase (**Figure 28**) (Yang et al., 2018) lui conférant plutôt un rôle de barrière au passage du substrat dans l'espace intracellulaire au travers de la membrane plutôt que celui de transporteur d'efflux de l'espace intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Ce mécanisme serait compatible avec la nature lipophile de l'hème.



**Figure 29 : Schéma des différents systèmes connus de régulation de la transcription de *hrtBA*.** (A) L'hème fixe HrtR induisant la levée de la répression de la transcription de l'opéron *hrtBA*. D'après (Lechardeur et al., 2012). (B) ChrS et HrrS, deux histidines kinases avec 6 domaines transmembranaires détectent l'hème induisant l'autophosphorylation de leurs domaines transmetteurs. Un mécanisme de transfert de phosphorylation active ChrA qui va alors se fixer sur le promoteur de l'opéron *hrtBA* entraînant sa transcription. Le système est inactivé par l'activité phosphatase de ChrS sur le régulateur ChrA. D'après (Keppel et al., 2019). (C) HssS, une histidine kinase de type à senseur extracellulaire, détecte l'hème (domaine senseur inconnu) induisant l'autophosphorylation de son domaine transmetteur. Un mécanisme de transfert de phosphorylation active HssR qui va alors se fixer sur le promoteur de l'opéron *hrtBA* et entrainer sa transcription. D'après (Stauff et al., 2007).

Bien que ce transporteur soit conservé chez de nombreuses bactéries à Gram positif, plusieurs systèmes de régulation de la transcription de *hrtBA*: deux systèmes à deux composants et un système à un composant ont été décrits.

### **B.4.3. La régulation transcriptionnelle du transporteur d'efflux HrtBA**

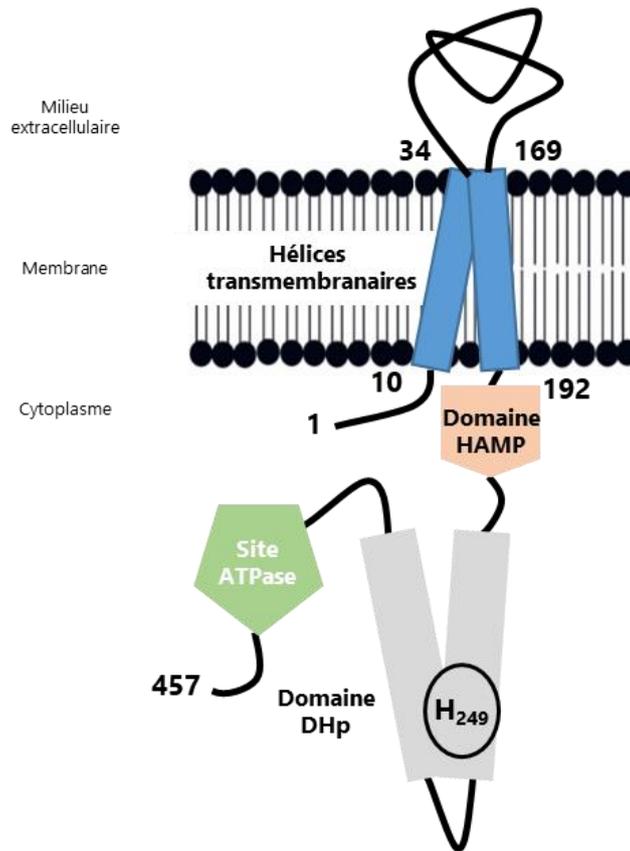
#### B.4.3.1. La régulation par le régulateur transcriptionnel HrtR

HrtR est un régulateur transcriptionnel appartenant à la famille des TetR (**voir A.1.2.**) impliqué dans la régulation de la transcription de *hrtBA* chez *Lactococcus lactis*. Le gène *hrtR* est intégré à l'opéron *hrtRBA* qui est fortement induit en présence d'hème (Pedersen et al., 2008). Sa délétion entraîne une hypersensibilité de la souche vis-à-vis de la toxicité de l'hème (Lechardeur et al., 2012). En absence d'hème, HrtR réprime la transcription de l'opéron *hrtRBA* en se fixant à une séquence palindromique de 15 nt par l'intermédiaire d'une arginine (Arg46) et d'une tyrosine (Tyr50) (**Figure 29A**). L'hème se lie à HrtR de façon hexacoordonnée avec les histidines 72 et 149 (Lechardeur et al., 2012). La structure cristallographique du complexe HrtR-hème a permis d'observer un changement de conformation provoqué par la fixation de l'hème ce qui induit la libération du complexe HrtR-hème de l'ADN (**Figure 29A**) (Sawai et al., 2012).

#### B.4.3.2. Les systèmes à deux composants ChrSA et HrrS, régulateurs de l'expression de HrtBA chez les Corynebacteriaceae

Il a été montré chez *Corynebacterium diphtheriae* et *Corynebacterium glutamicum* que deux 2-CS (ChrSA et HrrSA) étaient essentiels pour l'utilisation et la détoxification de l'hème (Bibb and Schmitt, 2010; Frunzke et al., 2011; Heyer et al., 2012; Keppel et al., 2019, 2020). C'est le seul cas décrit de deux 2-CS distincts, induits par le même activateur, l'hème dans ce cas précis. Le RR ChrA contrôle l'expression de l'opéron *hrtBA* mais des phosphorylations entrecroisées ont été démontrées entre les 2-CS, seule l'activité phosphatase de la HK ChrS envers son RR ChrA semble quant à elle spécifique (Keppel et al., 2019). C'est-à-dire que les HK HrrS et ChrS ont la capacité de phosphoryler le régulateur ChrA mais seule ChrS est capable de le déphosphoryler (**Figure 29B**). La phosphorylation de ChrA par HrrS permet une réponse plus rapide et plus importante que dans le cas où seulement ChrS phosphoryle ChrA (Keppel et al., 2019).

## Synthèse bibliographique



**Figure 30 : Structure schématique de la protéine HssS chez *S. aureus*.** HssS est une histidine kinase de la famille des HK décrite comme senseur extracellulaire d'hème. Elle est composée d'une courte boucle extracellulaire de 135 AA (en noir), flanquée de deux domaines transmembranaires (en bleu) prolongés par une région intracytoplasmique. L'histidine 249 s'autophosphoryle à partir d'une molécule d'ATP lorsque le senseur est activé. D'après (Stauff and Skaar, 2009).

		**** *		*** * *	
<i>S. aureus</i>	AAACAATT	<b>GTT</b> CATATT	GA	<b>GTT</b> CATATT	TCAACCTT
<i>S. epidermidis</i>	TCACACTT	<b>GTT</b> CATATT	AG	<b>GTT</b> CATATT	TTCCTCTT
<i>S. haemolyticus</i>	TTCTTAAA	<b>GTT</b> CATATT	CA	<b>GTT</b> CATAAT	GTGTCATT
<i>S. saprophyticus</i>	TTAGATGC	<b>GTT</b> CATATT	GA	<b>GTT</b> CACATT	GATAGCAT
<i>B. cereus</i>	AATCTTCT	<b>GTT</b> CATATT	CC	<b>GTT</b> CATATT	TCTTTTTT
<i>B. anthracis</i>	AATCTTCT	<b>GTT</b> CATATT	CC	<b>GTT</b> CATATT	TCTTTTTT
<i>L. monocytogenes</i>	AAAATCCG	<b>ATT</b> CACATT	CC	<b>GTT</b> TACAAC	ACTTCTTT
<i>L. innocua</i>	AAAATCCG	<b>ATT</b> CACATT	CC	<b>GTT</b> TACAAA	ACTTCTTT

**Figure 31 : Conservation de la séquence répétée de fixation de HssR dans la zone promotrice de *hrtBA*.** Une séquence répétée en tandem (en gras) a été identifiée dans la région promotrice de l'opéron *hrtAB* comme site de fixation de HssR. Les bases en bleu marquées par une étoile sont conservées dans les différentes espèces citées. D'après (Stauff et al., 2007).

ChrS reste la HK principale car elle est responsable de l'activation mais aussi de l'inactivation du 2-CS qui est essentielle pour avoir une réponse transitoire. Il a été montré que ChrS lie l'hème avec un ratio stœchiométrique de 1/1 par monomère au niveau de la partie N-terminale de la protéine. Ce domaine Nt est composé de 6 hélices transmembranaires reliées entre elles par de petites boucles (**Figure 29B**)(Keppel et al., 2018). L'activation de ChrS par l'hème entraîne son autophosphorylation au niveau de l'histidine 215. ChrS phosphorylée va ensuite activer le domaine effecteur de ChrA par transfert de phosphorylation. La phosphorylation de ChrA entraîne un changement de conformation du régulateur qui peut alors se fixer sur le promoteur de *hrtBA* et activer sa transcription (Bibb and Schmitt, 2010).

#### B.4.3.3. Le système à deux composants HssRS

Chez *S. aureus*, le système impliqué dans la régulation de *hrtBA* a été nommé HssRS (heme sensor system) et code pour les deux protéines d'un 2-CS : HssS, une histidine kinase et HssR, un régulateur de réponse (**Figure 29C**) (Stauff et al., 2007).

HssS est une protéine membranaire de 457 AA et a une topologie modèle de HK à senseur extracellulaire (**voir A.2.2**), c'est-à-dire 2 domaines transmembranaires reliés entre eux par une courte boucle extracellulaire (135 AA) et une partie cytoplasmique composée de domaines conservés avec un domaine HAMP, un DHp et un CA (**Figure 30**). L'histidine 249 du DHp est l'AA autophosphorylé par l'activité autokinase de HssS (Stauff and Skaar, 2009). Le transfert de phosphorylation à l'acide aspartique 52 de HssR, permet l'activation du régulateur. HssR phosphorylé se fixe alors sur une séquence d'ADN répétée en amont de la TATA box et du site de fixation de l'ARN polymérase. Cette séquence est conservée chez les bactéries possédant le système HssRS comme *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* (**Figure 31**)(Stauff et al., 2007b). La fixation de HssR active la transcription des gènes *hrtBA* et la production du transporteur. Les 2 AA (His 249 de HssS et Asp 52 de HssR) sont essentiels au fonctionnement du 2-CS, une mutation de l'un ou l'autre empêchant la transduction du signal (Stauff et al., 2007).

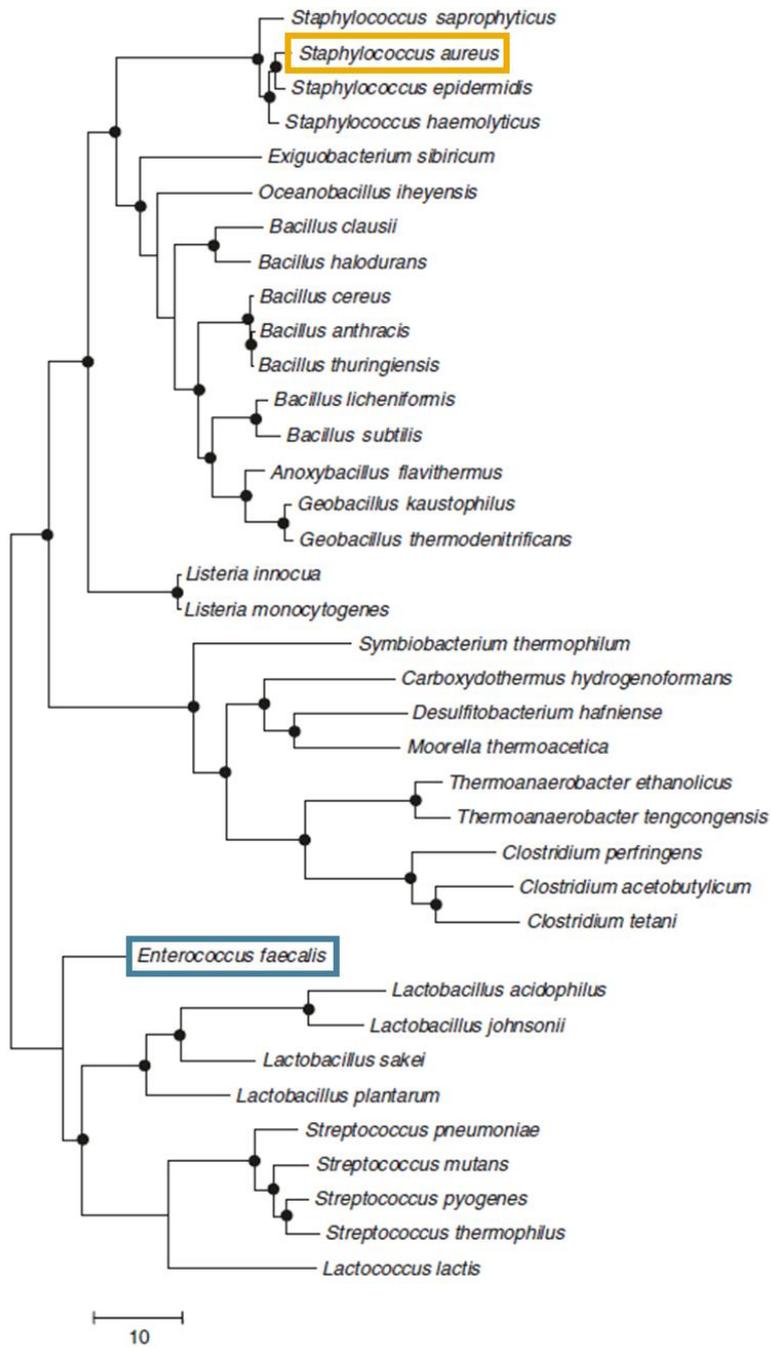


Figure 32 : Arbre phylogénétique des Firmicutes basé sur des séquences concaténées de sous-unités de polymérase ARN Rpoa, RpoB et RpoC. On retrouve les espèces étudiées au cours de cette thèse *Staphylococcus aureus* (en jaune) et *Enterococcus faecalis* (en bleu). D'après (Saw et al., 2008).

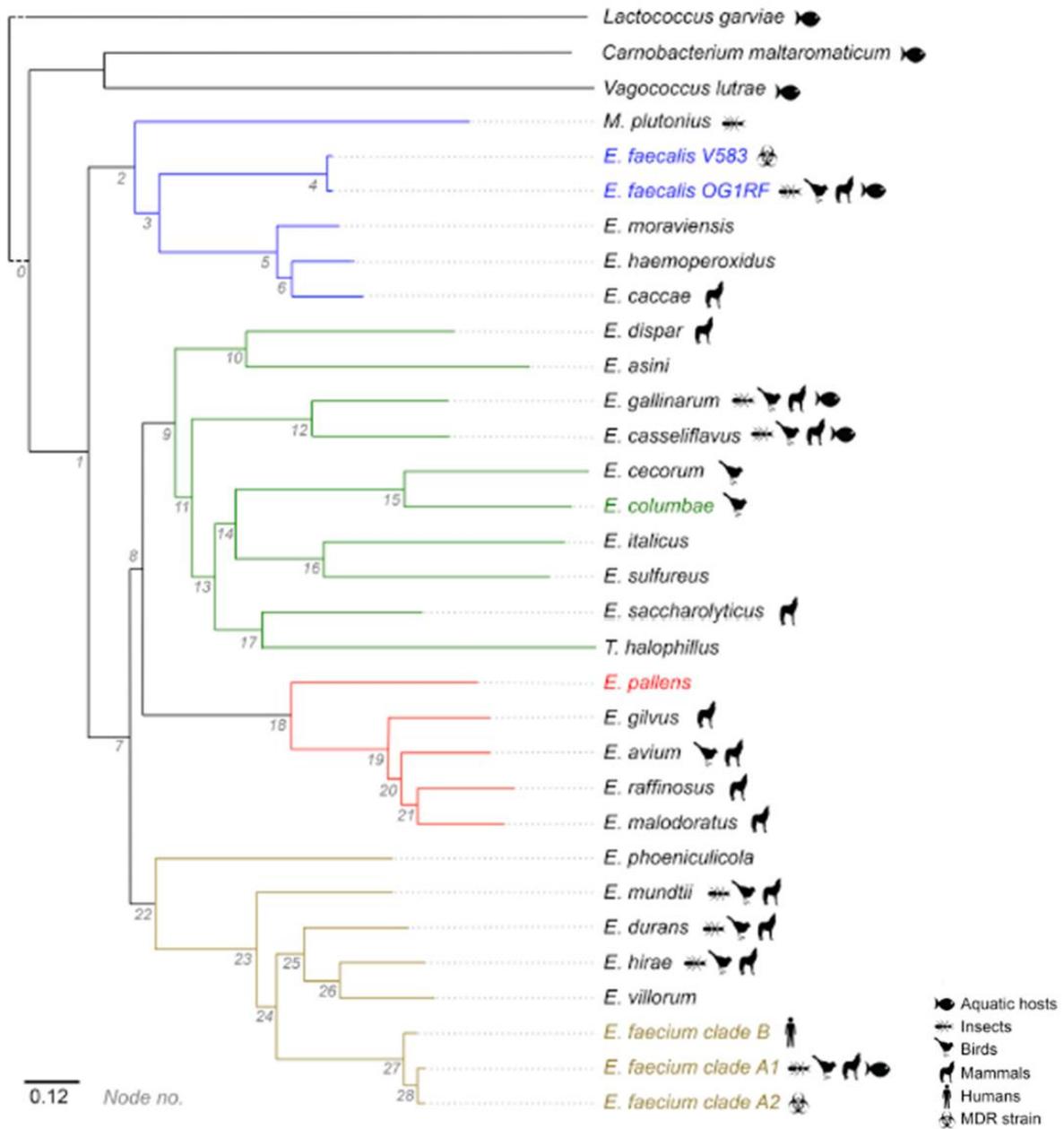
HssS est décrit comme une HK à senseur extracellulaire capable de détecter l'hème exogène. Le domaine extracellulaire semble avoir un rôle dans l'activation de HssS car la mutation de certains AA inhibe le fonctionnement du 2-CS HssRS (Mike et al., 2013). En conclusion, les mécanismes de phosphorylation et d'activation transcriptionnelle sont bien décrits dans la littérature mais le mécanisme moléculaire de l'activation de HssS par l'hème reste encore inconnu. La caractérisation de ce mécanisme moléculaire est un des projets de cette thèse.

## **C. *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus* sont deux pathogènes à Gram positif appartenant au phylum des firmicutes**

### **C.1. *Enterococcus faecalis*, une bactérie commensale du tube digestif et pathogène opportuniste**

#### **C.1.1. Caractéristiques générales**

*Enterococcus faecalis* est une bactérie appartenant au phylum des Firmicutes (**Figure 32**) qui a été pour la première fois décrite par Thiercelin en 1899 comme une bactérie commensale de l'intestin ayant un pouvoir pathogène (Thiercelin, 1899). Elle fut ensuite nommée *Micrococcus zymogenes* (MacCallum and Hastings, 1899) puis *Streptococcus faecalis* (Andrewes and Horder, 1906) jusque dans les années 1980 où la bactérie sera transférée dans le genre *Enterococcus* (Schleifer and Kilpper-Bälz, 1984). Ce genre *Enterococcus* comprend 49 espèces connues omniprésentes dans tous les environnements et composantes de la flore commensale de l'intestin que ce soit les oiseaux, les insectes ou les mammifères (**Figure 33**, page suivante)(Lebreton et al., 2017). *E. faecalis* est un coque non mobile, non sporulant, hémolytique et anaérobie facultatif capable de croître dans une large gamme de température (de 10 à 45°C (Sherman, 1937)), de pH (4.6 à 9.6 ) et d'osmolarité (jusqu'à 6.5 % de NaCl et jusqu'à 40 % de sels biliaires (Facklam et al., 2014)).



**Figure 33 : Arbre phylogénétique des Entérocoques basé sur l’alignement de 526 copies de gènes de ménage.** On retrouve les groupes *Enterococcus faecalis* (en bleu), *Enterococcus columbae* (en vert), *Enterococcus pallens* (en rouge) et *Enterococcus faecium* (en jaune). Les icônes représentent les hôtes. De (Lebreton et al., 2017).

*Enterococcus faecalis* est une des premières bactéries à coloniser le tractus digestif (TD) du nouveau-né, même si chez l'adulte, elle représente moins de 1 % du microbiote (Fanaro et al., 2003). Tout comme *E. coli*, *E. faecalis* participerait à la consommation de l'O<sub>2</sub> résiduel dans l'intestin durant les premiers jours après la naissance. Cette diminution de la concentration en O<sub>2</sub> crée un environnement propice à la colonisation par les bactéries anaérobies strictes comme les *Bacteroidetes* et les *Bifidobacteria* (Mackie et al., 1999). Malgré une faible représentation dans l'ensemble du microbiote, *E. faecalis* est l'un des entérocoques principaux du microbiote humain (Gilmore et al., 2013; Rossi et al., 2016). Chez l'adulte, les niches principales sont l'intestin grêle et le colon (Lebreton et al., 2014) mais elle est aussi retrouvée dans les fèces (présents dans 78 % des prélèvements de fèces chez l'homme (Tedim et al., 2015)).

*E. faecalis* est aussi présente dans des produits alimentaires comme le fromage, la viande ou le poisson (Devriese et al., 1995). Elle est ainsi utilisée dans l'industrie alimentaire dans des processus de fermentation et en tant que probiotique (Lebreton et al., 2014). Cependant, avec l'augmentation du nombre d'infections causées par *E. faecalis* et l'acquisition de résistances aux antibiotiques, la sécurité sanitaire autour de l'utilisation de *E. faecalis* dans l'industrie alimentaire est remise en question.

### **C.1.2. *Enterococcus faecalis* : pathogénèse**

#### C.1.2.1. Un impact sociétal important

Malgré son caractère commensal, *E. faecalis* est aussi un pathogène opportuniste pouvant provoquer des infections urinaires, intra-abdominales, des endocardites et des bactériémies (Agudelo Higuera and Huycke, 2014; Andersen et al., 2020; Dahl et al., 2019; Selleck et al., 2019). Le risque d'infection est augmenté suite à la pose de cathéter urinaire ou vasculaire, par exemple, mais aussi suite à un traitement antibiotique entraînant une dysbiose intestinale qui permet l'émergence d'*E. faecalis* (Tyne and Gilmore, 2017).

En termes d'épidémiologie, *E. faecalis* représente, dans le monde, le troisième agent responsable d'infection nosocomiale derrière *S. aureus* et *E. coli* (Guzman Prieto et al., 2016; Werner et al., 2013). En 2016, les entérocoques étaient responsables de plus de 14 % des infections contractées à l'hôpital aux Etats-Unis; un chiffre en hausse. De plus, *E. faecalis* est responsable à lui seul de plus de 60 % des infections à entérocoques (Sievert et al., 2013;

## Synthèse bibliographique

Weiner et al., 2016). Une grande partie de ces infections concernent des infections urinaires qui peuvent aller de la simple cystite jusqu'à la bactériémie (Lo et al., 2014). *E. faecalis* est aussi la deuxième cause de septicémie dans le monde derrière *S. aureus* (Hidron et al., 2008).

Cette prévalence dans le milieu hospitalier est la conséquence de la capacité de survie de cette bactérie qui peut survivre 1 heure sur une main et jusqu'à 4 mois sur une surface inerte (Agudelo Higuera and Huycke, 2014). Une étude a montré que 10 % des chambres d'hôpitaux aux Etats-Unis contenaient des entérocoques même après un nettoyage (Ford et al., 2016).

### C.1.2.2. Adaptabilité d'*E. faecalis* et stratégie de virulence

*E. faecalis* exprime de nombreux facteurs permettant la colonisation de l'hôte (Selleck et al., 2019). Certains facteurs sont par exemple impliqués dans la survie dans le tractus digestif comme la résistance au pH acide gastrique (Teng et al., 2002).

En dehors des contaminations lors de procédures chirurgicales par exemple, le passage de l'état commensal à l'état pathogène implique le franchissement de la barrière intestinale et la translocation dans la circulation sanguine (Wells et al., 1990). Ce franchissement de l'épithélium de l'intestin s'effectue en plusieurs étapes avec, tout d'abord, une adhésion aux cellules épithéliales puis un passage de la barrière et enfin une dissémination dans l'hôte. Différents types d'adhésines bactériennes appelées MSCRAMM (**M**icrobial **S**urface **C**omponent **R**ecognizing **A**dhesive **M**atrix **M**olecules)(Sillanpää et al., 2004) et de pilis (Handley and Jacob, 1981) permettent l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales. Puis, *E. faecalis* franchit la barrière épithéliale soit par transcytose, soit par un passage paracellulaire. Pour ce dernier, *E. faecalis* fragilise la barrière épithéliale en dégradant les E-cadherines présentes dans les jonctions serrées entre les cellules (Steck et al., 2011). Pour la transcytose, *E. faecalis* exprime des hémolysines, des cytolysines et des gélatinases capables de fragiliser les cellules eucaryotes (Haas et al., 2002; Sifri et al., 2002).

Une autre caractéristique d'*E. faecalis* est sa capacité de résistance au stress oxydant permise par l'existence de plusieurs enzymes responsables de la détoxification des ROS. On trouve dans le génome d'*E. faecalis* trois gènes codant pour des peroxydases : une NADH peroxydase, une alkyle hydroperoxyde réductase (Ahp) et une thiol peroxydase (Tpx). Une

étude a montré que ces trois gènes participent à la virulence d'*E. faecalis* dans un modèle de péritonite chez la souris et que la thiol peroxydase a l'activité antioxydante la plus importante dans la survie dans des macrophages (Carbona et al., 2007). *E. faecalis* possède aussi une superoxyde dismutase dont l'activité a un rôle elle aussi dans la survie dans les macrophages (Verneuil et al., 2006). Il a aussi été montré que cette enzyme participe à la résistance à certains antibiotiques comme la vancomycine et la pénicilline (Bizzini et al., 2009; Ladjouzi et al., 2013; Léger et al., 2019). Enfin, à ces 4 enzymes il faut rajouter la catalase KatA hème dépendante (**voir B.2.2**) qui en présence d'hème permet une protection contre le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Frankenberg et al., 2002).

#### C.1.2.3. Emergence de résistances aux antibiotiques

*E. faecalis* possède une capacité d'adaptation aux antibiotiques remarquable (García-Solache and Rice, 2019; Rao et al., 2020). Tout d'abord cette bactérie a naturellement une certaine tolérance à de nombreux antibiotiques comme les β-lactamines (ampicilline et pénicilline, par exemple (**voir C.1.2.2.**)), les aminosides (gentamycine et kanamycine, par exemple), lincosamides (clindamycine et lincomycine, par exemple) et les céphalosporines (ceftaroline, par exemple)(Hollenbeck and Rice, 2012). La sensibilité moindre aux aminosides et lincosamides est plus faible que chez d'autres bactéries est due à l'imperméabilité de sa membrane et de sa paroi pour ces antibiotiques (Zimmermann et al., 1971).

En plus de ces résistances innées, la plasticité du génome d'*E. faecalis* lui permet d'acquérir facilement de nouvelles résistances, soit par mutation spontanée, soit par transfert horizontal de gènes (García-Solache and Rice, 2019). Ces résistances élevées concernent les aminosides, mais la plus problématique reste celle à la vancomycine (Armin et al., 2017; García-Solache and Rice, 2019; McKessar et al., 2000; Piezzi et al., 2020). Cet antibiotique qui se fixe aux précurseurs du peptidoglycane, inhibant la synthèse de la paroi, est l'un des derniers recours contre les *S. aureus* multi-résistants. Cependant les entérocoques ont développé plusieurs mécanismes permettant la modification de leur peptidoglycane empêchant la fixation de la vancomycine (García-Solache and Rice, 2019; Hollenbeck and Rice, 2012). Cette résistance à la vancomycine représente un problème pour lutter contre les entérocoques mais une plus

## Synthèse bibliographique

grosse menace encore est le transfert de ces gènes de résistance à des espèces comme *S. aureus* (Palmer et al., 2010).

### **C.1.3. *Enterococcus faecalis* et l'hème**

*Enterococcus faecalis* appartient aux bactéries qui ne synthétisent pas l'hème car ils ont perdu les gènes la voie de sa biosynthèse. Cette absence peut s'expliquer par une perte de la pression de sélection du milieu avec une croissance dans un environnement contenant une source d'hème (hôte eucaryote ou bactérie synthétisant l'hème, par exemple)(Panek and O'Brian, 2002)(**voir B.3.**). Contrairement aux bactéries à Gram négatif où l'apport d'hème est indispensable (auxotrophie obligatoire), on parle d'auxotrophie facultative pour les bactéries à Gram positif comme *E. faecalis*. En effet, ces dernières ont la faculté de passer d'un métabolisme fermentaire en absence d'hème à un métabolisme respiratoire en présence d'hème et d'oxygène. Le besoin en hème est donc facultatif car ces bactéries sont capables de produire l'énergie nécessaire à leur croissance en son absence.

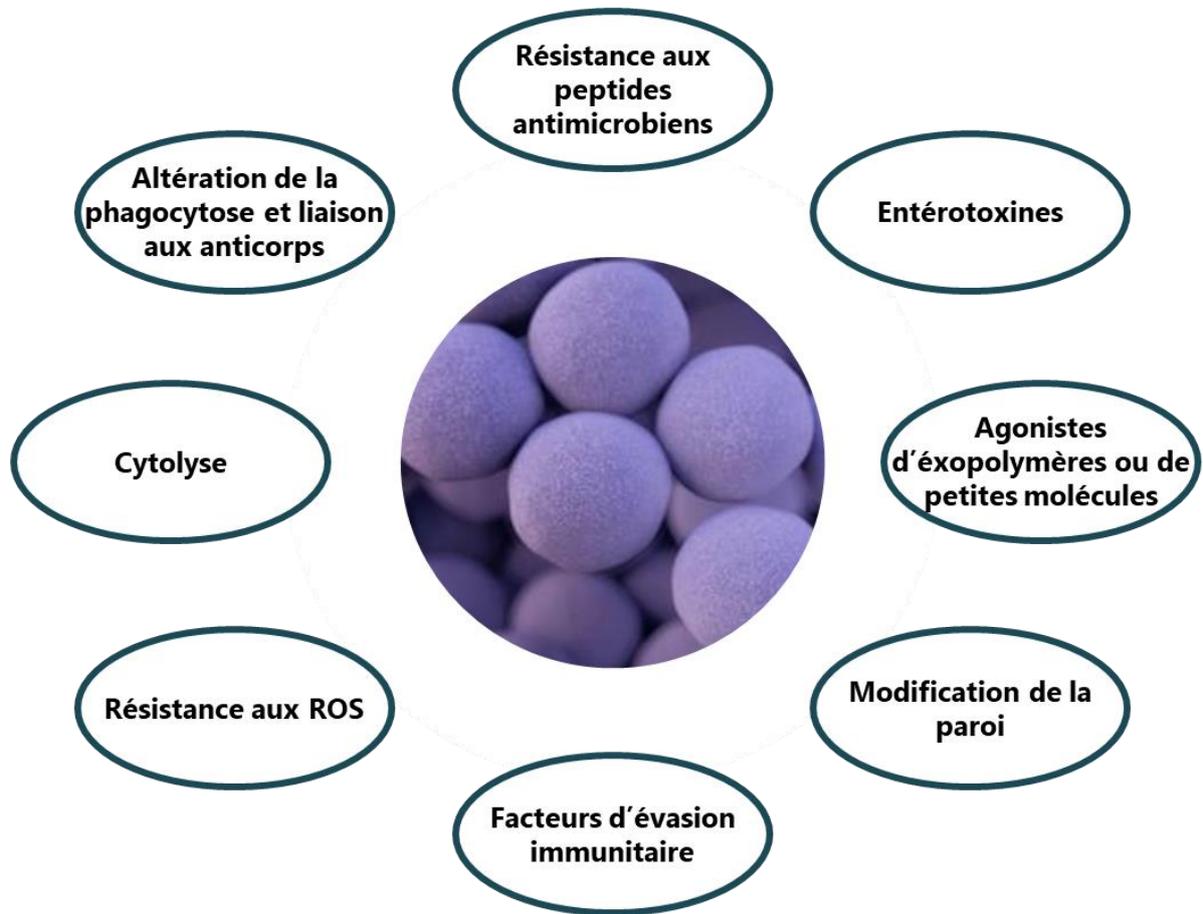
*E. faecalis* est capable d'utiliser l'hème exogène pour compléter 2 mécanismes dépendants de l'hème : i- le cytochrome *bd* (**voir B.2.1.2.**) permettant un métabolisme respiratoire (Winstedt et al., 2000), ii- la catalase (KatA) (**voir B.2.2.**) permettant une résistance au stress oxydant généré par le peroxyde d'hydrogène (Baureder et al., 2012; Frankenberg et al., 2002; Hakansson et al., 2004). *E. faecalis* possède un gène *hemH* (ferrochélatase) de la voie de la biosynthèse de l'hème (**Figure 13**) mais il ne semble pas actif car l'addition de PPIX ne restaure pas l'activité de la catalase, laissant penser que la PPIX n'est pas transformée en hème (Brugna et al., 2010). Pour ce qui est de l'import et du contrôle de la toxicité de l'hème chez *E. faecalis*, aucun système identifié pour l'instant.

## C.2. *Staphylococcus aureus* : une bactérie pathogène opportuniste

### C.2.1. Caractéristiques générales

*Staphylococcus aureus* (aussi appelé staphylocoque doré) est une bactérie appartenant au phylum des Firmicutes qui a été pour la première fois observée par Robert Koch en 1878 (Collectif et al., 2009)(**Figure 32**). C'est un coque à Gram positif, non sporulant, catalase positif et non motile que l'on retrouve de façon ubiquitaire chez les animaux à sang chaud et dans leur environnement. Chez l'homme, elle fait partie de la flore commensale des muqueuses et de la peau, avec les fosses nasales comme site de colonisation principale. On estime que 30 % de la population mondiale est porteur sain et que 60 % de la population est colonisée de façon intermittente (Tong et al., 2012). Mais *S. aureus* est ainsi capable de coloniser l'ensemble de l'hôte de la peau jusqu'au compartiment cellulaire. C'est aussi un pathogène provoquant des infections variées allant de la simple infection superficielle (abcès, conjonctivites, otites...), des infections cardiaques, rénales, des ostéomyélites jusqu'à des septicémies (Andersen et al., 2020; Tong et al., 2015).

Cette colonisation de niches variées montre la grande faculté d'adaptation et de robustesse de *S. aureus*. Elle peut ainsi survivre à une large gamme de pH (4 à 8) et de températures (10 à 45 °C)(Collectif et al., 2009), à des conditions de sécheresse et de pression osmotique extrêmes (Iwasawa and Ishihara, 1967; Parfentjev and Catelli, 1964). Sa flexibilité s'observe aussi par son mode de vie, elle est capable de passer d'une forme planctonique, à une forme communautaire jusqu'à former des biofilms (Archer et al., 2011; Lister and Horswill, 2014). Au cours des infections, *S. aureus* peut former des micro-colonies SCV (**S**mall **C**olony **V**ariants)(Andreini et al., 2020; Melter and Radojevic, 2010), constituées de cellules dont le métabolisme est ralenti permettant à ces bactéries, lors de traitements antibiotiques, de persister. *S. aureus* peut aussi échapper au système immunitaire en se cachant à l'intérieur de cellules eucaryotes telles que les ostéoblastes (Peyrusson et al., 2020; Testoni et al., 2011). De plus cette bactérie exprime un arsenal de facteurs de virulence permettant sa survie et sa multiplication dans l'ensemble de l'hôte.



**Figure 34 : Ensemble des facteurs de virulence contribuant à la pathogénèse et à la virulence de *Staphylococcus aureus*. D'après (Kobayashi et al., 2015).**

## C.2.2. Pathogénèse

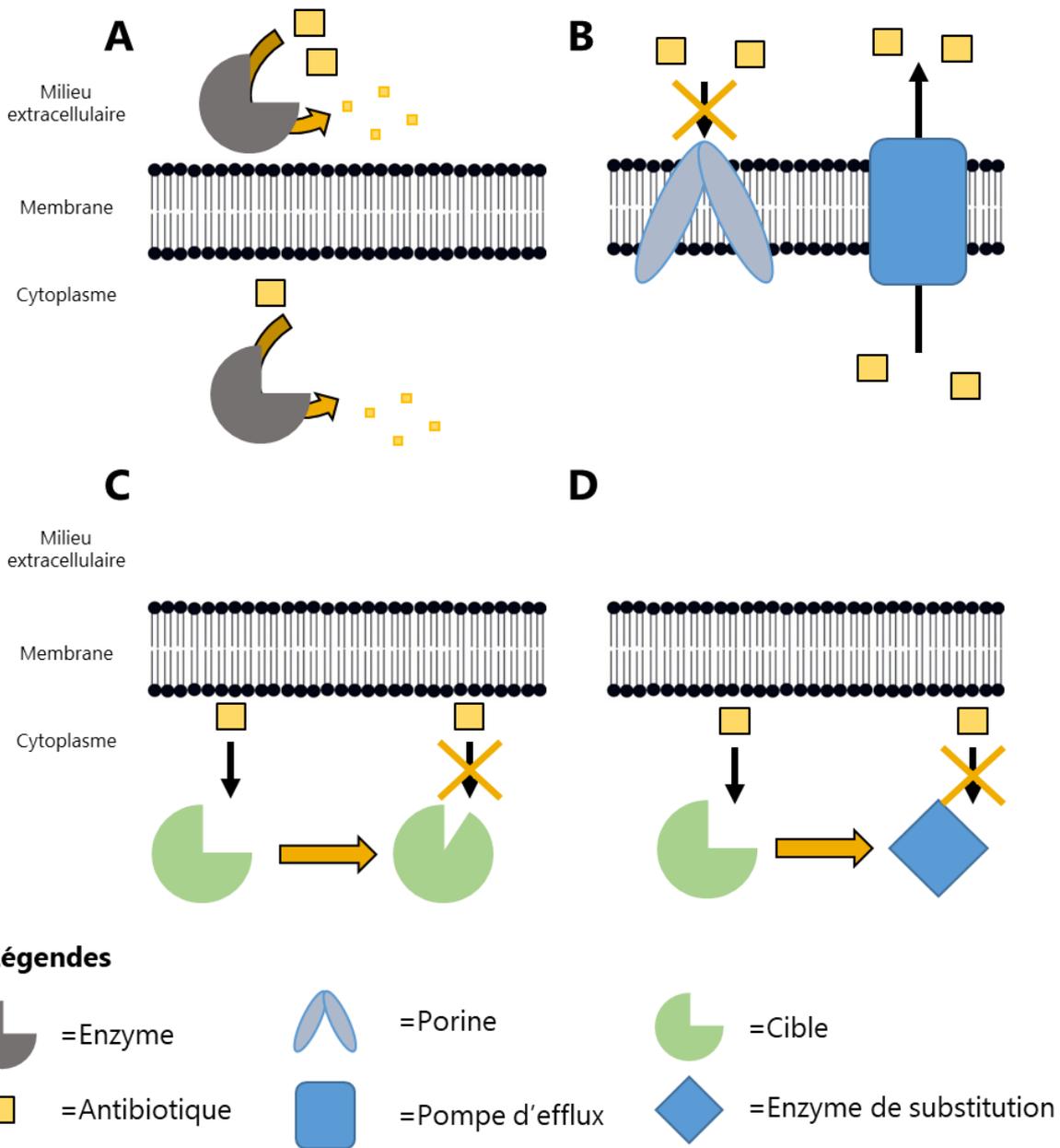
### C.2.2.1. Un problème de santé mondial

Les personnes immunodéprimées comme les personnes âgées mais aussi la multiplication des procédures invasives altérant la barrière cutané-muqueuse, favorisent les infections par *S. aureus*. Cette bactérie est responsable de maladies communautaires et nosocomiales conduisant dans certains cas à des septicémies mortelles. On compte dans les pays industrialisés de 10 à 30 cas de septicémies dues à *S. aureus* pour 100 000 personnes par an (Tong et al., 2015). En ce qui concerne les pays en développement, peu de données sont disponibles et elles sont souvent peu représentatives de l'ensemble de la population. Ces 20 dernières années, ces chiffres se sont stabilisés grâce à de meilleures mesures de prise en charge des infections (Tong et al., 2015). On observe ces améliorations dans les hôpitaux même si *S. aureus* reste le deuxième pathogène le plus fréquemment rencontré parmi les infections nosocomiales. Si par exemple en France, on ne voit plus d'augmentation du nombre d'infections causées par *S. aureus* dans les hôpitaux entre 2012 et 2016 (Subiros et al., 2017), ce pathogène n'en reste pas moins un problème de santé public majeur.

En dehors du milieu hospitalier, *S. aureus* peut aussi contaminer les aliments et peut être responsable d'intoxications alimentaires dues aux entérotoxines (toxines provoquant des troubles intestinaux) produites par la bactérie (Bastos et al., 2017; Hennekinne, 2018).

### C.2.2.2. Un arsenal de facteurs de virulence

*S. aureus* produit de nombreux facteurs de virulence (**Figure 34**). Ces facteurs de virulence au sens large comprennent à la fois des mécanismes d'adaptation à l'hôte (facteurs de « fitness ») (exemple du système Isd afin de récupérer le fer ; voir **B.3.3.1.**) et la sécrétion de molécules ciblant le système immunitaire (exemple des entérotoxines au cours des intoxications alimentaires ; voir **C.2.2.1**) (Kobayashi et al., 2015). L'ensemble de ces facteurs est finement régulé en fonction de la niche infectée et permet à *S. aureus* d'échapper au système immunitaire et de s'adapter à des environnements peu favorables à son développement (Jenul and Horswill, 2019).



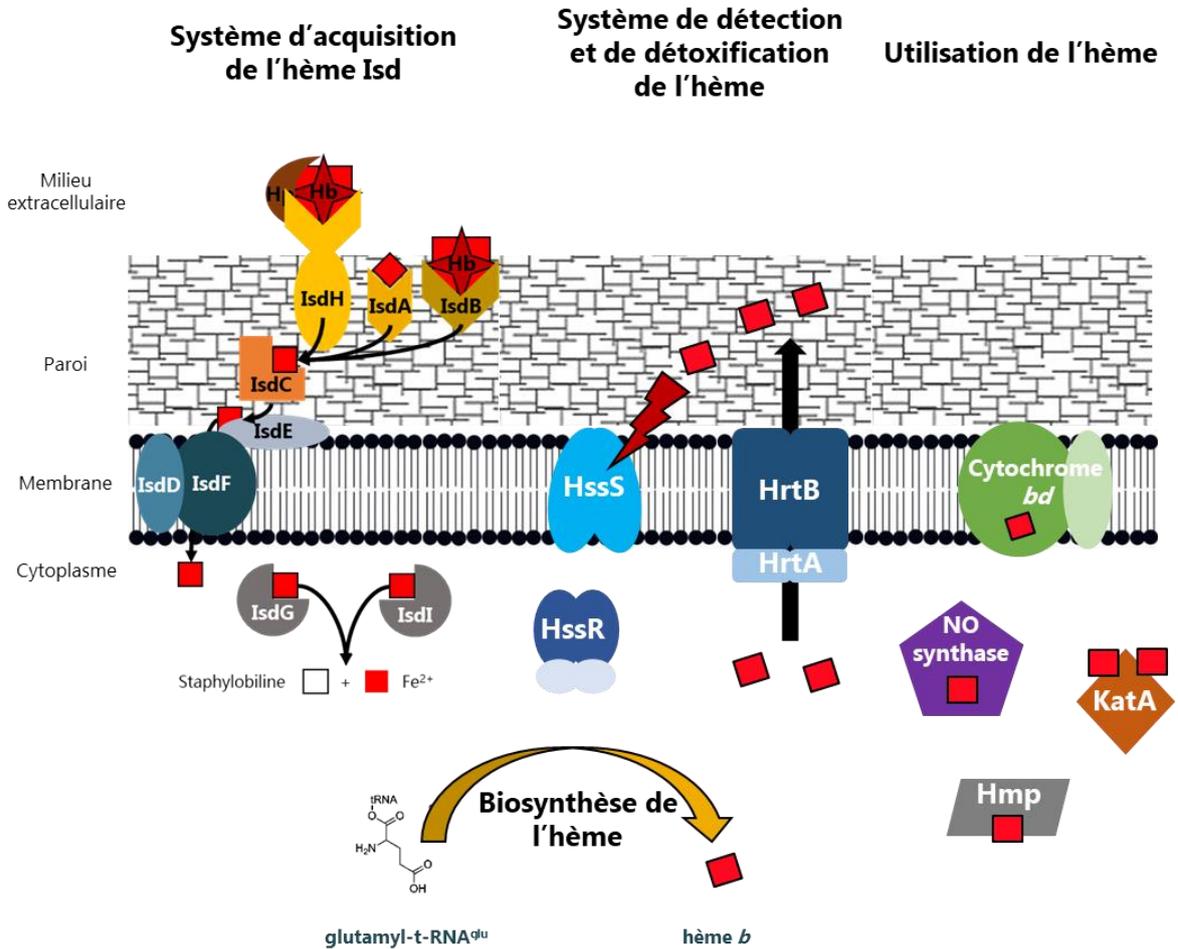
**Figure 35 : Représentation schématique des stratégies de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. (A) Brouillage** : inactiver l'antibiotique et le rendre inoffensif. **(B) Blindage** : empêcher l'accès de l'antibiotique à sa cible. **(C) Camouflage** : modifier la cible de l'antibiotique et la rendre insensible à son action. **(D) Esquive** : substituer à la cible une autre molécule non vulnérable. D'après (« La Recherche' N°314, p.63 »).

Ces facteurs de virulence ont des fonctions variées : si on prend l'exemple d'une infection à *S. aureus* dans un abcès, ces facteurs peuvent être divisés en 4 catégories fonctionnelles : i- affectent le recrutement des polynucléaires neutrophiles ; ii- atténuent l'effet des agents antibactériens du système immunitaire ; iii- altèrent la phagocytose ; iv- provoquent la lyse des cellules de l'hôte (**Figure 34**)(Kobayashi et al., 2015). En plus de toutes ces défenses contre le système immunitaire, *S. aureus* possède des mécanismes de résistance aux antibiotiques auxquels est consacré le prochain chapitre.

#### C.2.2.3. De nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques

*Staphylococcus aureus* est une bactérie qui s'adapte de façon remarquable aux changements de son environnement (**voir C.1.1.**) dont à la présence d'antimicrobiens. Ces souches résistantes comme les SARM (*Staphylococcus aureus*, résistant à la méthicilline) ont un pouvoir pathogène accru et une facilité à se disséminer parmi de nouvelles populations vulnérables (Chalmers and Wylam, 2020). À l'heure actuelle, les SARM sont responsables de 10 fois plus d'infections que tous les pathogènes Gram négatifs multirésistants (MDR) combinés. L'Organisation Mondiale de la Santé a récemment désigné *S. aureus* comme l'un des 12 pathogènes prioritaires menaçant la santé humaine (Craft et al., 2019).

La majorité des antibiotiques sur le marché ciblent des voies métaboliques essentielles telles que la synthèse de l'ADN/ARN, des protéines, ou encore de la membrane, contre lesquelles cette bactérie a et continue de développer de nouveaux mécanismes de résistance. De plus, l'adaptation est très rapide car des souches résistantes peuvent apparaître seulement 5 ans après la première utilisation de l'antibiotique comme observé avec les B-lactamines (pénicilline, vancomycine...)(Pantosti et al., 2007). Quatre types de mécanismes de résistance aux antibiotiques sont répertoriés (Blair et al., 2015; Pantosti et al., 2007) (**Figure 35**). Le premier (Brouillage, **Figure 35A**) est la production d'enzymes inactivant les antibiotiques (ex: les pénicillinases qui permettent l'inactivation des pénicillines ou encore les enzymes modificateuses d'aminoglycosides)(Pantosti et al., 2007). Le deuxième mécanisme (Blindage, **Figure 35B**) consiste à empêcher l'entrée des molécules avec une modification des propriétés d'imperméabilité de la membrane ou de la paroi (ex : vancomycine piégée au niveau de la paroi l'empêchant d'atteindre sa cible) et/ou à un transport actif vers l'extérieur de la



**Figure 36 : Modèle du métabolisme de l'hème chez *Staphylococcus aureus*.** *S. aureus* a deux sources d'hème décrites, le système d'acquisition Isd (voir Figure 23) et la biosynthèse de l'hème à partir du glutamyl-t-RNA<sup>glu</sup> (voir Figure 13). *S. aureus* possède un système de détoxification de l'hème composé d'un 2-CS HssRS qui permet l'induction de la transcription du transporteur ABC d'efflux HrtBA suite à la détection de l'hème (voir Figure 29C). Plusieurs exemples d'utilisation de l'hème sont décrits chez *S. aureus* comme un cytochrome *bd* (voir Figure 18) et une NO synthase impliqués dans le métabolisme respiratoire. *S. aureus* possède des hémoprotéines impliquées dans la résistance à différents stress comme la catalase *KatA* (voir Figure 20) contre le stress oxydant et la protéine *Hmp* contre le stress nitrosatif.

cellule *via* des transporteurs membranaires d'efflux (ex : pompe d'efflux NorA pour évacuer les fluoroquinolones)(Blair et al., 2015; Pantosti et al., 2007). Le troisième (Camouflage, **Figure 35C**) consiste à modifier les cibles des antibiotiques diminuant ainsi leur affinité (ex: résistance aux  $\beta$ -lactamines avec la modification de la protéine PBP en PBP2a qui a une très faible affinité pour ces antibiotiques)(Pantosti et al., 2007). Enfin le quatrième mécanisme (Esquive, **Figure 35D**) consiste à produire une enzyme de substitution à l'enzyme cible de l'antibiotique permettant ainsi le maintien de la fonction biologique.

Ainsi, le staphylocoque doré reste un problème de santé majeur à cause de son pouvoir pathogène et de son habilité à s'adapter aux changements de son environnement. Il est donc crucial de comprendre comment il s'adapte à notre organisme pour trouver de nouveaux traitements alternatifs.

### C.2.3. *Staphylococcus aureus* et l'hème

Plusieurs hémoprotéines ont été identifiées chez *S. aureus*, qui sont impliquées dans différentes fonctions comme le métabolisme respiratoire, la résistance au stress oxydant et nitrique (**Figure 36**). On peut citer les oxydases terminales (QoxABCDE, CydAB (Hammer et al., 2016) pour les chaînes respiratoires et une NO synthase impliquée dans la régulation du transfert d'électrons de la chaîne respiratoire en condition de microaérobie (**Figure 36**)(Kinkel et al., 2016). De plus, il a été montré que *S. aureus* possède une catalase à hème (KatA) (**Figure 36**) (Cosgrove et al., 2007)) et une coprohème décarboxylase (HemQ) (Celis et al., 2017)) impliquées dans la résistance au stress oxydant. Enfin, des flavohémoprotéines complètent cette liste avec le régulateur SbnI régulant la synthèse de sidérophore (Laakso et al., 2016) et Hmp une protéine ayant un rôle dans la protection contre le stress nitrosatif (**Figure 36**)(Gonçalves et al., 2006; Kinkel et al., 2013).

La biosynthèse endogène de l'hème à partir du glutamyl-t-RNA<sup>glu</sup> (**voir B.1.2. et Figure 13**) permet à *S. aureus* d'assurer ses besoins en hème. Des résultats récents ont montré que la biosynthèse de l'hème pouvait être contrôlée par l'abondance de la glutamyl-t-RNA réductase qui était elle-même modulée par une autre enzyme, HemX (**Figure 13**). *S. aureus* est

## Synthèse bibliographique

néanmoins capable d'acquérir de l'hème de son environnement via le système d'acquisition Isd (**voir B.3.3.1. et Figure 23 et 36**). Cependant la régulation entre l'import et la biosynthèse reste à être élucidée. Enfin *S. aureus* possède un système de détoxification de l'hème composé du transporteur ABC HrtBA (**voir B.4.2.3.**) contrôlé par un système à deux composants HssRS (**voir B.4.3.3.**)(**Figure 36**).

Malgré une description assez détaillée des mécanismes de l'homéostasie de l'hème, la régulation entre la biosynthèse, l'import et l'export de l'hème reste mal connue.

# Objectifs de la thèse



## Objectifs de la thèse

Les bactéries ont un besoin constant de détecter et de répondre aux changements de leur environnement. C'est particulièrement le cas pour les bactéries pathogènes opportunistes, telles que les bactéries étudiées dans cette thèse, pour qui, l'évolution d'un état commensal à un état pathogène s'accompagne de changements drastiques de leur environnement. Ainsi *Staphylococcus aureus*, une bactérie commensale de la peau et des voies nasales et *Enterococcus faecalis*, une bactérie commensale de l'intestin, deviennent pathogènes lorsqu'elles pénètrent dans l'organisme de leur hôte dans lequel elles doivent survivre pour développer une infection.

Parmi les nombreux facteurs que rencontre une bactérie pathogène dans un hôte vertébré, l'hème est une molécule très abondante, en particulier dans le sang. L'hème est un cofacteur essentiel de nombreuses protéines et une source de fer pour les procaryotes. Une grande majorité de bactéries synthétisent cette molécule mais elles sont aussi capables d'internaliser l'hème de l'hôte et de l'utiliser intact ou comme source de fer. Cependant le paradoxe de cette molécule est que la grande réactivité du fer la rend toxique pour ces mêmes organismes.

Afin de contrôler cette toxicité, les bactéries expriment différents systèmes de protection. Chez les bactéries à Gram positif, le principal mécanisme de défense identifié est le contrôle de l'efflux de l'hème vers le milieu extracellulaire. Le transporteur d'efflux spécifique de l'hème, HrtBA joue un rôle majeur dans la détoxification de l'hème. Il appartient à la famille de transporteurs ABC et est conservé dans de nombreuses bactéries à Gram positif. Son expression induite par l'hème présent dans le milieu extracellulaire permet le maintien de la concentration de l'hème cellulaire à une concentration subtoxique. Néanmoins, la régulation de l'expression de ce transporteur est différente selon les espèces bactériennes avec trois systèmes de régulation distincts identifiés au début de cette thèse : un système à un composant appartenant à la famille des TetR, HrtR, mis en évidence chez *Lactococcus lactis*, est présent dans des bactéries alimentaires ou commensales. Deux systèmes à deux composants ont été décrits, HssRS présent chez des espèces pathogènes comme *S. aureus* et ChrSA, présent chez *C. diphtheriae*. Si le mécanisme de détection de l'hème intracellulaire par

## Objectifs de la thèse

HrtR a été élucidé chez *Lactococcus lactis*, celui du senseur HssS chez *Staphylococcus aureus* restait inconnu. De plus, chez certaines espèces comme *Enterococcus faecalis*, où des homologues de HrtBA semblent présents, aucun système de régulation de type HrtR ou HssRS n'avait pu être retrouvé sur le génome.

Ces deux dernières observations nous amènent aux deux projets de recherche de ma thèse : « Comprendre le mécanisme du système senseur d'hème des bactéries pathogènes ». Je me suis principalement intéressé à comprendre comment deux bactéries *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* détectent et régulent l'expression du transporteur d'efflux HrtBA. Les résultats seront donc divisés en deux projets : i) Une première partie sur la découverte et la caractérisation d'un nouveau système senseur contrôlant l'expression de HrtBA chez *E. faecalis* ; ii) une deuxième partie concernant la caractérisation du « sensing » de l'hème par le système HssRS de *S. aureus*.

Au cours du premier projet, j'ai d'abord caractérisé un homologue de HrtBA de *S. aureus* chez *E. faecalis*, HrtBA<sub>EF</sub>. J'ai montré que HrtBA<sub>EF</sub> avait un rôle majeur dans la résistance exceptionnellement élevée à l'hème d'*E. faecalis*. J'ai identifié et caractérisé un nouveau senseur d'hème, FhtR, qui contrôle HrtBA<sub>EF</sub>. Enfin, j'ai montré que ce système était exprimé dans le tube digestif de la souris, suggérant un rôle de HrtBA<sub>EF</sub> dans le contrôle de l'homéostasie de l'hème intestinal chez *E. faecalis*. Cette étude a été complétée par une étude cristallographique de la protéine senseur FhtR et une étude transcriptomique afin d'identifier d'autres mécanismes impliqués dans la réponse à l'hème d'*E. faecalis*.

Au cours du second projet de recherche, mon travail était centré sur la compréhension au niveau moléculaire de la détection de l'hème par le senseur HssS. HssS, par analogie avec la plupart des HK, est classée parmi les senseurs d'hème exogène par l'intermédiaire de sa boucle extracellulaire. J'ai, par différentes approches expérimentales *in vitro* et *in vivo*, montré que ce n'est pas l'hème extracellulaire mais l'hème intracellulaire qui est détecté par HssS. Ces données élargissent la complexité et la multiplicité des mécanismes de reconnaissance des molécules activatrices des systèmes à deux composants.

Enfin, en prenant en compte de l'impact sociétal de ces bactéries, responsables d'un nombre croissant d'infections nosocomiales et de l'émergence de résistance aux antibiotiques, les résultats de cette thèse permettent d'envisager certains de ces senseurs d'hème comme « cibles antibiotiques innovantes ».

# Résultats



# Projet 1 : Caractérisation du contrôle de la toxicité de l'hème chez *Enterococcus faecalis*

## A. Résultats

### A.1. Contexte

*Enterococcus faecalis* est une bactérie commensale du tube digestif que l'on retrouve majoritairement dans l'intestin grêle, le colon et les fèces. Cette bactérie est aussi un pathogène opportuniste avec un impact sociétal important car elle est la troisième bactérie responsable d'infections nosocomiales dans le monde (Guzman Prieto et al., 2016). Cette prévalence dans le milieu hospitalier reflète la grande capacité d'adaptation d'*E. faecalis*. Elle est, par exemple, résistante à de nombreux composés, que ce soit des antibiotiques, des sels biliaires, des détergents ainsi que des conditions de températures, de pH, ou de sels très étendus (**voir Synthèse bibliographique C.1.1.**). L'hème fait aussi partie des molécules toxiques pour lesquelles *E. faecalis* montre une grande tolérance ; *E. faecalis* peut survivre à des concentrations en hème très importantes ( $> 150 \mu\text{M}$ ) (Brugna et al., 2010).

*E. faecalis* est une bactérie auxotrophe facultative pour l'hème, c'est-à-dire qu'elle est capable de croître en son absence (fermentation) et peut aussi le capturer et l'internaliser lorsqu'il est présent dans le milieu extracellulaire pour l'incorporer à certaines fonctions cellulaires. L'hème est ainsi le facteur prosthétique d'un cytochrome *bd* permettant l'activation d'une chaîne respiratoire (en présence d'oxygène) et d'une catalase (KatA) participant à la résistance au stress oxydant (Baureder et al., 2012). Si l'utilisation de l'hème par *E. faecalis* a été démontrée dans ces deux fonctions ; les mécanismes permettant à *E. faecalis* de capturer, d'internaliser et de réguler l'homéostasie de l'hème restent inconnus.

Dans le but de mieux comprendre l'impact de l'hème dans les capacités de colonisation et de virulence d'*Enterococcus faecalis* ; j'ai mis en évidence un mécanisme de détoxification de l'hème de type HrtBA chez *E. faecalis* dont l'expression est induite par l'hème. Une étude

## Projet 1

bioinformatique ne m'a pas permis d'identifier de senseur de type HrtR ou de système à deux composants de type HssRS chez *Enterococcus faecalis*. Néanmoins, un gène codant pour un régulateur de la famille TetR est adjacent à l'opéron *hrtBA<sub>Ef</sub>*. Les résultats de l'étude de cet inhibiteur transcriptionnel appelé FhtR (**F**aecalis **h**eme **t**ransport **R**egulator) et son importance dans le contrôle de l'homéostasie de l'hème dans le tractus intestinal constitue le thème de la première publication de ma thèse « A novel *Enterococcus faecalis* heme transport regulator (FhtR) is a heme sensor in the gastrointestinal tract ». En plus du travail présenté dans cet article, j'ai participé à une étude cristallographique en cours (en collaboration avec P. Arnoux ; CEA Cadarache) qui permettra de caractériser la relation structure/fonction du senseur FhtR en présence d'hème et d'identifier son mode de liaison à l'hème. Je présente ci-après certains résultats préliminaires de cette étude. J'ai aussi mené une étude transcriptomique d'*E. faecalis* en présence ou non d'hème afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la réponse à l'hème chez *E. faecalis*. Une analyse des résultats est présentée avec l'identification de plusieurs gènes spécifiquement induits par l'hème.

### **A.2. Publication 1 : Un nouveau régulateur de l'efflux de l'hème chez *Enterococcus faecalis* est un senseur d'hème dans le tractus digestif**

#### **A.2.1. Résumé**

L'objectif de ce travail était l'étude de la régulation d'un système homologue du système HrtBA chez *Enterococcus faecalis* et de comprendre son fonctionnement et son impact sur l'homéostasie de l'hème chez cette bactérie. Nous avons étudié l'expression de ce système dans le biotope principal d'*E. faecalis* : le tube digestif.

La construction de mutants et la production *in vitro* de protéines ont permis d'identifier deux gènes produisant un homologue du transporteur ABC d'efflux d'hème HrtBA (HrtBA<sub>Ef</sub>) et un nouveau régulateur TetR induisant l'expression de ce transporteur. Les propriétés biochimiques de fixation de l'hème et à l'ADN de ce nouveau régulateur FhtR ont été caractérisées grâce à des expériences de tests de liaisons à l'hème et de gel retard. J'ai pu

démontrer que la fixation de l'hème permet la dé-répression et l'induction de la transcription de *hrtBA<sub>EF</sub>*. De plus, j'ai pu montrer que la fonction de FhtR ne se limite pas dans le contrôle de la toxicité de l'hème mais qu'indirectement, en régulant l'expression de HrtBA, ce senseur est le régulateur de l'homéostasie de l'hème intracellulaire. Des expériences menées pour évaluer l'expression de la catalase dépendante de l'hème KatA, ont prouvé un rôle de FhtR dans la biodisponibilité intracellulaire de l'hème par l'intermédiaire de l'expression de HrtBA<sub>EF</sub>. Enfin des expériences *in vivo* ont permis d'observer une activation du système HrtBA<sub>EF</sub> dans le tractus intestinal suggérant une importance de ce système dans la colonisation de l'intestin par *E. faecalis*.

### **A.2.2.      Manuscrit**

**A novel *Enterococcus faecalis* heme transport regulator (FhtR) is a heme sensor in the gastrointestinal tract.**

Vincent Saillant<sup>a</sup>, Damien Lipuma<sup>a</sup>, Emeline Ostyn<sup>a</sup>, Laetitia Joubert<sup>a,\*</sup>, Alain Boussac<sup>b</sup>,  
Hugo Guerin<sup>a</sup>, G. Brandelet<sup>c</sup>, P. Arnoux<sup>c</sup> and Delphine Lechardeur<sup>a,‡</sup>

<sup>a</sup>Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

<sup>b</sup>I2BC, CNRS UMR 9198, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

<sup>c</sup>Aix Marseille Université, CEA, CNRS, BIAM, F-13108 Saint Paul-Lez-Durance, France.

<sup>‡</sup>Address correspondence: delphine.lechardeur@inrae.fr

\*Present address: Abolis Biotechnologies, Génopole Campus 1, 5 Rue Henri Desbruères, 91030 Evry Cedex France

Running Head: an intracellular heme sensor in *E. faecalis*

<sup>1</sup> In this report, heme refers to iron protoporphyrin IX regardless of the iron redox state, whereas hemin refers to ferric iron protoporphyrin IX.

**Abbreviations:**

Bgal: B-galactosidase

ECL: enhanced chemiluminescence

EMSA: electromobility shift assay

EPR: electron paramagnetic resonance

FhtR: Faecalis heme transport regulator

GIT: gastrointestinal tract

Hb: hemoglobin

HrtA: heme regulated transport A

HrtB: heme regulated transport B

HrtR: heme regulated transport R

IPTG: isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

KatA: catalase A

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

ROS: reactive oxygen species

Xgal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside

WB: Western blot

## Abstract

*Enterococcus faecalis* is a commensal Gram-positive pathogen found in the intestines of mammals and is also a leading cause of severe infections occurring mainly among antibiotic-treated dysbiotic hospitalized patients. Like most intestinal bacteria, *E. faecalis* does not synthesize heme. Nevertheless, environmental heme can improve *E. faecalis* fitness by activating respiration metabolism and a catalase that limits hydrogen peroxide stress. Since free heme also generates toxicity, its intracellular levels need to be strictly controlled. Here, we describe a unique transcriptional regulator, FhtR, (Faecalis heme transport Regulator), which manages heme homeostasis by controlling an HrtBA-like efflux pump (named HrtBA<sub>Ef</sub>). We show that FhtR, by managing intracellular heme concentration, regulates the functional expression of the heme dependent catalase A (KatA), thus participating in heme detoxification. The biochemical features of FhtR binding to DNA, and its interactions with heme that induce efflux, are characterized. The FhtR-HrtBA<sub>Ef</sub> system is shown to be relevant in a mouse intestinal model. We further show that FhtR senses heme from blood and hemoglobin but also from crossfeeding by *Escherichia coli*. These findings bring to light the central role of heme sensing by FhtR in response to heme fluctuations within the gastrointestinal tract, which allow this pathogen to limit heme toxicity while ensuring expression of an oxidative defense system.

## Importance

*Enterococcus faecalis*, a normal and harmless colonizer of the human intestinal flora can cause severe infectious diseases in immunocompromised patients, particularly those that have been heavily treated with antibiotics. Therefore, it is important to understand the factors that promote its resistance and its virulence. *E. faecalis*, that cannot synthesize heme, an essential but toxic metabolite, needs to scavenge this molecule from the host to respire and fight stress generated by oxydants. Here, we report a new mechanism used by *E. faecalis* to sense heme and trigger the synthesis of a heme efflux pump that balances the amount of heme inside

the bacteria. We show in a mouse model that *E. faecalis* uses this mechanisms within the gastrointestinal tract.

## Introduction

*Enterococcus faecalis* is a commensal inhabitant of the gastrointestinal tract (GIT) and a subdominant species in the core intestinal microbiota of healthy humans and other mammals (1). This lactic acid bacterium is also a major opportunistic pathogen that causes a large number of nosocomial infections such as endocarditis, bacteremia, urinary tract infections or meningitis (2). In recent decades, *E. faecalis* has emerged as a leading cause of enterococcal infections (70%), and is the third most frequent source of hospital-acquired nosocomial infections (3). *E. faecalis* is thus considered as a major public health threat due to its intrinsic resistance to antibiotics and the emergence of multidrug-resistant isolates (3). Selective outgrowth of enterococci following intestinal dysbiosis is frequent, regardless of whether dysbiosis results from antibiotic treatment, intestinal inflammation, or infection (4). In addition to intrinsic and acquired antibiotic resistances, *E. faecalis* is resistant to other antimicrobial factors, such as bile, and tolerates a wide variety of stress factors such as temperature, pH, oxygen tension, or oxidation (1).

For most living organisms, heme<sup>1</sup> (iron porphyrin) is an essential cofactor of enzymes such as cytochromes, catalases or peroxidases (5). The importance of heme resides in the unique properties of its iron center, including the capacity to undergo electron transfer, perform acid-base reactions and interact with various coordinating ligands (6). Paradoxically, the high potential redox of heme together with its accumulation in membranes explains its toxicity (7, 8). Most bacteria carry the enzymatic machinery for endogenous heme synthesis. However, numerous bacteria, designated as heme-auxotrophs, lack some or all the enzymes needed for autosynthesis, but still require this molecule for their metabolism (5). Interestingly, *E. faecalis* is a heme-auxotroph, like the majority of species constituting the gastrointestinal microbiota (9, 10). When heme is added to an aerated culture, *E. faecalis* activates a terminal cytochrome *bd* oxidase, causing a shift from fermentation to an energetically favorable respiratory metabolism

(10, 11). *E. faecalis*, unlike other heme-auxotrophic Firmicutes, also encodes a heme catalase, (KatA; EC 1.11.1.6), limiting hydrogen peroxide stress when heme is available (9). Both functions contribute to the virulence of several Gram positive pathogens (12, 13). Although the importance of heme as a cofactor for numerous cellular functions is established (5, 14), the mechanisms governing exogenous heme internalization and secretion which contribute to heme homeostasis, vary among bacteria and are poorly understood. However, heme homeostasis must be strictly regulated in all bacteria to avoid toxicity (6, 8). Heme efflux is a documented defence mechanism against heme toxicity in some Firmicutes: i) the Pef regulon comprises 2 multi-drug resistance efflux pumps and a MarR-type heme-responsive regulator in *Streptococcus agalactiae* (15); ii) the HatRT system comprises a TetR family heme binding transcriptional regulator (*hatR*) and a major facilitator superfamily heme transporter (*hatT*) in *Clostridium difficile* (16); iii) heme homeostasis in several Gram positive bacteria relies on HrtBA (heme-regulated transport) proteins, an ABC transporter, which promote heme efflux (13, 17-19). Expression of *hrtBA* is controlled by *hssRS* genes, encoding a two-component heme sensor and response regulator in numerous Gram positive pathogens including *S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus anthracis* (13, 18-21). In contrast, the food bacterium *Lactococcus lactis* regulates HrtBA expression via the TetR family heme sensor (HrtR) (18). To date, the mechanisms involved in *E. faecalis* management of environmental heme are unknown.

In this work, we describe the mechanism by which a novel *E. faecalis* TetR regulator, called FhtR (Faecalis heme transporter Regulator), induces expression of HrtBA<sub>Ef</sub>, a conserved heme efflux transporter. We show that FhtR binds intracellular heme resulting in de-repression and increased transcription of *hrtBA*<sub>Ef</sub>. Heme iron coordination specifies FhtR as a heme sensor and we defined a critical role for the tyrosine 132. Our results also establish this system as a master mechanism of control of intracellular heme availability as shown by its requirement for

### **An intracellular heme sensor in *E. faecalis***

the expression of the heme dependent *E. faecalis* KatA. Finally, the relevance of the FhtR system to *E. faecalis* is shown in a mouse intestine model, suggesting the importance of FhtR for gastrointestinal lumen heme homeostasis. Our conclusions lead to a new picture of heme homeostasis in *E. faecalis*.

## Results

**The conserved heme efflux transporter, HrtBA<sub>Ef</sub>, is functional in *E. faecalis*.** *E. faecalis* OG1RF genome encodes two adjacent ORFs, OG1RF\_RS02770 and OG1RF\_RS02775 sharing respectively 24 % and 45 % amino-acid (AA) sequence identity with HrtB and HrtA from *Staphylococcus aureus* (17) (Fig. S1A). We thus verified the role of these ORFs, referred to as HrtB<sub>Ef</sub> and HrtA<sub>Ef</sub>, in *E. faecalis* heme efflux. Growth of an in-frame  $\Delta hrtBA_{Ef}$  deletion mutant was severely impaired at hemin concentrations  $\geq 25 \mu\text{M}$  compared to the wild type (WT) OG1RF strain (Fig. 1A). However, WT OG1RF could overcome up to 500  $\mu\text{M}$  hemin highlighting the involvement of HrtBA<sub>Ef</sub> in limiting heme toxicity in *E. faecalis* (Fig. S1C). The  $\Delta hrtBA_{Ef}$  mutant grown in 5  $\mu\text{M}$  heme-containing medium accumulated about twice more intracellular heme than the WT strain, as evaluated by the pyridine hemochrome assay (22) (Fig. 1B). This result correlated with the intense red color of culture pellets from the  $\Delta hrtBA_{Ef}$  mutant compared to the WT strain (Fig. 1C). Intracellular heme concentrations were also followed using the intracytoplasmic heme sensor HrtR (18):  $\beta$ -gal activity from the reporter plasmid P<sub>hrt</sub>-*hrtR-lac*, was about 4 times higher in  $\Delta hrtBA_{Ef}$  compared to the WT exposed to 5  $\mu\text{M}$  heme (Fig. 1D). Finally, accumulation of heme in the  $\Delta hrtBA_{Ef}$  mutant correlated with an increase of heme induced cellular reactive oxygen species (ROS) levels (Fig. 1E). In conclusion, *E. faecalis* expresses a functional HrtBA<sub>Ef</sub> heme efflux transporter that modulates intracellular heme levels, thus reducing oxidative stress.

Transcriptional regulation of *hrtBA<sub>Ef</sub>* by heme was then investigated using a *hrtBA<sub>Ef</sub>* promoter reporter, P<sub>hrtBA</sub>-*lac*.  $\beta$ -gal expression in the WT strain was induced by 0.1 to 2.5  $\mu\text{M}$  hemin in the culture medium. Induction reached a maximum at concentrations below 5  $\mu\text{M}$  (Fig. 1F). This concentration range is far below WT strain sensitivity to heme toxicity ( $\geq 25 \mu\text{M}$ ) (Fig. 1A). We conclude that HrtBA<sub>Ef</sub> expression is induced at subtoxic heme concentrations.

**A new TetR-regulator, FhtR, controls *hrtBA<sub>Ef</sub>* expression.** The above findings prompted us to investigate the mechanism of *hrtBA<sub>Ef</sub>* induction. Several Gram positive pathogens regulate *hrtBA<sub>Ef</sub>* via an adjacent 2 component system HssR and HssS (13, 19, 20). No *hssR* *hssS* genes were identified in near the *hrtBA<sub>Ef</sub>* operon in OG1RF or other *E. faecalis* genomes. However, a monocistronic gene encoding a TetR family transcriptional regulator, OG1RF\_RS02765, is adjacent to *hrtBA<sub>Ef</sub>* (Fig 2A), sharing no significant AA identity with the *hrtBA* regulator, HrtR, in *Lactococcus lactis* (18). We hypothesized that OG1RF\_RS02765 was the transcriptional regulator of *hrtBA<sub>Ef</sub>* and tentatively named it FhtR (Faecalis heme transport Regulator) (Fig. 2A).

To investigate the role of FhtR in heme-dependent transcription of *hrtBA<sub>Ef</sub>*, an *fhtR* in-frame deletion in OG1RF ( $\Delta fhtR$ ) was constructed and transformed either with pP<sub>hrtBA</sub>-*lac* or *pfhtR* encompassing both (pP<sub>hrtBA</sub>-*lac* and P<sub>fhtR</sub>-*fhtR*) expression cassettes (Fig. 2B). In contrast to the WT strain,  $\beta$ gal was expressed independently of heme in  $\Delta fhtR$ (pP<sub>hrtBA</sub>-*lac*) (Fig. 2B). Transformation of *pfhtR* with  $\Delta fhtR$  led to overcomplementation compared to the WT strain (Fig. 2B). Moreover, on solid medium,  $\Delta fhtR$  exhibited a complete absence of sensitivity to heme compared to WT and complemented  $\Delta fhtR$ (*pfhtR*) strains (Fig. 2C). Similar results were obtained in liquid culture (Fig. S2). These results are in line with the observation that heme accumulation is reduced in  $\Delta fhtR$  compared to the WT or  $\Delta fhtR$ (*pfhtR*) strains (Fig. 2D), and that HrtBA<sub>Ef</sub> may be constitutively expressed in the  $\Delta fhtR$  mutant (Fig. 2B). Indeed, P<sub>fhtR</sub> was constitutively transcribed, with no effects of heme, nor of FhtR expression as shown using P<sub>fhtR</sub>-*lac* as reporter (Fig. 2E), and by Western Blot (WB) using FhtR-HA tagged fusion expressed from P<sub>fhtR</sub> (Fig. 2F). We conclude that *E. faecalis* uses a constitutively expressed, unique intracellular heme sensor, FhtR, to control *hrtBA<sub>Ef</sub>* expression.

**FhtR is a heme binding protein.** Members of the TetR family of transcriptional regulators act as chemical sensors (23, 24). Ligand binding alleviates TetR protein interactions

with their respective operators, leading to promoter induction (23, 24). To verify that heme was the signal that relieves FhtR-mediated *hrtBA<sub>Ef</sub>* repression, recombinant FhtR was purified as a fusion to the maltose binding protein (MBP-FhtR) from *Escherichia coli*. MBP-FhtR appeared green (Fig. 3A, inset) and its UV-visible spectrum exhibited a strong Soret band suggesting that FhtR scavenges the endogenously produced heme (Fig. 3A). To purify an apoFhtR, the MBP-FhtR was expressed from a heme synthesis deficient *E. coli* strain (*hemA::kan*) (Fig. 3B, dashed line). The purified protein bound hemin *in vitro* (*i.e.*, non-covalently) with a similar UV-visible spectrum as observed above for *in vivo* bound heme: a Soret band at 407 nm and Q bands at 491 nm, 528 nm and 608 nm (Fig. 3B, black line). Size-exclusion chromatography profiles showed that both apo- and holo-MBP-FhtR eluted as a single peak corresponding to the size of a dimer (132 kDa), in line with other TetR regulators (Fig. 3C) (23). The 608 nm charge transfer band and Soret at 407 nm are indicative of a ferric high-spin tyrosinate-ligated heme where heme is anchored through a proximal tyrosinate side chain (25, 26). Hemin pentacoordinate high-spin ligation to FhtR was further confirmed by EPR spectroscopy (see below). Heme dissociation coefficient ( $K_d$ ) was 310 nM as determined by MBP-FhtR fluorescence quenching over increasing concentration of hemin (Fig. 3D). Heme titration by differential absorption spectroscopy at 407 nm showed that the saturation point corresponded to the binding of one molecule of hemin per MBP-FhtR monomer (Fig. 3D, inset). Altogether, these data demonstrate that FhtR is a heme-binding protein, suggesting that heme interaction is the primary event leading to activation of *hrtBA<sub>Ef</sub>* transcription.

**Tyrosine 132 is a crucial heme axial ligand in FhtR.** According to UV-visible and EPR spectra, the likely candidate for axial ligand of oxidized heme is a tyrosine (Y) (see above). Several Y residues present in FhtR were substituted to phenylalanine (F) (Fig. S3A). F and Y both have phenyl ring structures, so that F substitution minimizes an impact on FhtR conformation. Although, F lacks the hydroxyl group that coordinates heme, FhtR heme binding

was not modified for several mutants tested individually (in blue, Fig. S3A). Only FhtR<sup>Y132F</sup>, was purified from *E. coli* with a strong decrease in heme content compared to WT MBP-FhtR, indicating a loss of heme affinity *in vivo* (Fig. 4A). Surprisingly, apoMBP-FhtR<sup>Y132F</sup> purified from *hemA::kanA E. coli*; Fig. 4B) exhibited similar UV-visible spectra and  $K_d$  upon hemin addition (data not shown), questioning the implication of this tyrosine in heme binding. The role of Y132 was further analysed by EPR (Electron Paramagnetic Resonance) spectroscopy (Fig. 4C). HoloMBP-FhtR exhibited an axial high spin ( $S = 5/2$ ) heme signal with two well-defined resonances at around  $g \sim 6$  (with a crossing point at 1190 gauss) (Fig. 4C, inset) and a resonance at  $g \sim 2$  ( $\sim 3390$  gauss), indicative of a 5-coordinated Fe<sup>III</sup> structure. Although the UV-visible spectra of FhtR and FhtR<sup>Y132F</sup> supplemented with hemin do not differ to a detectable level, the EPR spectra of FhtR<sup>Y132F</sup> was significantly modified thus showing that either the ligand of the iron has been exchanged for another one or more likely, the interaction of the axial ligand with its environment has been modified. To conciliate these results, it is possible that while Y132 is the primary ligand, another distal ligand can take over ligation in the Y132F mutant to become the dominant ligand *in vitro* (meanwhile hydrophobic contacts would insure retention of the binding affinity).

We then compared FhtR and FhtR<sup>Y132F</sup> activities *in vivo*. The  $\Delta fhtR$  mutant was complemented either with *pfhtR* (pP<sub>hrtBA</sub>-*lac*; P<sub>fhtR</sub>-*fhtR*) or *pfhtR*<sup>Y132F</sup> (pP<sub>hrtBA</sub>-*lac*; P<sub>fhtR</sub>-*fhtR*<sup>Y132F</sup>) and  $\beta$ -gal expression was followed upon hemin addition to medium (Fig. 4D). WT FhtR and FhtR<sup>Y132F</sup> were expressed to similar levels as confirmed on WB (Fig. S3B). Expression of both proteins prevented *hrtBA*<sub>Ef</sub> transcription in the absence of heme, in contrast to full expression in  $\Delta fhtR$  (Fig. 4D). WT FhtR and FhtR<sup>Y132F</sup> were expressed to similar levels as confirmed on WB (Fig. S3B), However, hemin addition led to P<sub>hrtBA</sub>-*lac* expression in the strain carrying WT FhtR, but not FhtR<sup>Y132F</sup> suggesting that heme derepression was impaired

(Fig. 4D). Altogether, these data specify FhtR Y132 as a critical residue in the coordination of heme with FhtR, which enables *hrtBA<sub>Ef</sub>* transcription.

**FhtR controls *hrtBA<sub>Ef</sub>* transcription by binding 2 distinct 14-nt palindromic repeat sequences.** TetR family operators usually comprise a 10-30 nucleotides (nt) inverted repeat sequence with internal palindromic symmetry (23). Two such 14-nt long palindromes were identified in the -10/-35 region of the *hrtBA<sub>Ef</sub>* promoter (called P1 and P2; Fig. 5A). An electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed with apoMBP-FhtR, using a 325-bp DNA segment comprising the *hrtBA<sub>Ef</sub>* promoter (Fig. 5B), or a segment covering the internal *hrtB* region as control (Fig. S4). FhtR specific interaction with the P<sub>*hrtBA*</sub> DNA segment confirmed FhtR binding specificity. The shifted DNA migrated as 2 distinct bands (C1 and C2), in proportions that depended on the MBP-FhtR: DNA ratio (Fig. 5B), plausibly revealing that FhtR complexes with either 1 or 2 palindromes (Fig. 5B). To test this, we performed random substitutions of P1 and/or P2 nucleotides (P1\* and P2\*) and analyzed DNA shifts with EMSA. Replacement of both distal and proximal operators (P<sub>*hrtBA*</sub> P1\*, P2\*) abolished the FhtR induced DNA shift, confirming the role of palindromes in the interaction of FhtR with P<sub>*hrtBA*</sub> (Fig. 5C). Single replacement of P1 (P<sub>*hrtBA*</sub> P1\*) or P2 (P<sub>*hrtBA*</sub> P2\*) resulted in complete DNA shifts that migrated faster in the gel (C1) than seen with the native nucleotide sequence (Fig. 5C). We conclude that both P1 and P2 are FhtR binding sites.

We then tested the effects of heme on FhtR binding by EMSA. Addition of hemin to MBP-FhtR abolished the formation of DNA-FhtR complex, as seen by the progressive disappearance of band shifts with increasing hemin concentrations (Fig. 5D). Complete release of FhtR from P<sub>*hrtBA*</sub> was obtained when hemin was in 10-fold molar excess over FhtR. Both C1 and C2 complexes were revealed when intermediate amounts of heme were added (0.1 and 1  $\mu$ M; Fig. 5D). This suggests the release of MBP-FhtR from only one operator depending on the saturation level of FhtR with hemin.

The role of each operator in the control of *hrtBA<sub>Ef</sub>* was investigated *in vivo*, using  $P_{hrtBA}$  or a  $P_{hrtBA}$  P1\*, P2\* promoter variant to control *lac* gene (Fig. 5E). In contrast to  $pP_{hrtBA}$ -*lac*, which was strongly induced with 1  $\mu$ M hemin,  $P_{hrtBA}$  P1\*, P2\*-*lac* was constitutively expressed (Fig. 5E). In the absence of heme, either P1 or P2 is sufficient for full  $P_{hrtBA}$  repression by FhtR (Fig. 5F). We propose that the presence of 2 operators provides strong repression of the *hrtBA<sub>Ef</sub>* promoter, thus preventing transcriptional leakage and allowing for fine tuning of  $HrtBA_{Ef}$  expression. Taken together, these results demonstrate that FhtR is a heme sensor that directly controls heme homeostasis by regulating *hrtBA<sub>Ef</sub>* transcription.

**FhtR controls  $HrtBA_{Ef}$ , the gatekeeper of intracellular heme availability.** Our observation that FhtR regulates intracellular heme pools even at low heme concentrations, led us to hypothesize that FhtR controls intracellular heme availability in *E. faecalis*. We tested this possible role of FhtR on the *E. faecalis* endogenous heme-dependent catalase (KatA). While *katA* transcription is not susceptible to heme induction, KatA protein stability relies on the presence of heme (9, 11). KatA mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catalysis was measured in WT,  $\Delta fhtR$  and  $\Delta fhtR(pfhtR)$  strains (Fig. 6A). In the absence of hemin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumption was at a basal level (Fig. S5A), thus excluding major contributions of other enzymes in our conditions. In the presence of 1  $\mu$ M hemin (Fig. 6A), the  $\Delta fhtR$  mutant exhibited about 30 % catalase activity compared to WT and complemented  $\Delta fhtR(pfhtR)$  strains, as evaluated by the percent of catabolized H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 6A). This was further confirmed by comparing amounts of KatA (holoKatA) by WB, using anti-KatA antibody (kindly provided by L. Hederstedt). In the absence of hemin, KatA was expressed at low levels in WT,  $\Delta fhtR$  and  $\Delta fhtR(pfhtR)$  strains (Fig. 6B). Comparatively, addition of hemin strongly increased the amounts of KatA in WT and complemented  $\Delta fhtR(pfhtR)$  strains, but not in the  $\Delta fhtR$  mutant (Fig. 6B). Low KatA availability in  $\Delta fhtR$  is readily explained by constitutive heme efflux (*via*  $HrtBA_{Ef}$ ), and consequently depleted intracellular heme pools in this mutant. We then evaluated the survival

capacity of *E. faecalis* OG1RF WT,  $\Delta fhtR$  and  $\Delta fhtR(pfhtR)$  strains when challenged with 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In the absence of hemin, all strains grew equivalently without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. S5B). In contrast, while hemin addition rescued the survival of both WT and  $\Delta fhtR(pfhtR)$ ,  $\Delta fhtR$  strain remained hypersensitive to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Deletion of *hrtBA<sub>Ef</sub>* in the  $\Delta fhtR$  strain ( $\Delta fhtR\Delta hrtBA_{Ef}$ ) restored the survival capacity in presence of hemin (Fig. S5C). Thus, poor survival of  $\Delta fhtR$  reflects the lack of heme needed to stabilize KatA (Fig. 6D). Finally, the OG1RF mutant (*katA::tetR*) was hypersensitive to hemin toxicity showing that KatA was also responsible for mediating oxidative stress generated by hemin (Fig. 1E and Fig. 4E). Taken together, these results identify FhtR as the direct and indirect regulator of HrtBA<sub>Ef</sub>-mediated heme-efflux and KatA activity respectively; both mechanisms lowering heme stress in *E. faecalis* OG1RF. They show that FhtR is a key mediator of heme homeostasis, and consequently, of oxidative stress response in *E. faecalis* generated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Heme sensing in the gastrointestinal tract.** *Enterococcus faecalis* is a normal resident of the gastrointestinal tract (GIT) of vertebrates, an ecosystem where heme is available (27-30). We therefore investigated whether *hrtBA<sub>Ef</sub>*-mediated heme management is required by *E. faecalis* in the GIT in a murine gastrointestinal model. We generated *E. faecalis* OG1RF strains expressing the *luxABCDE* (*lux*) operon from *Photobacterium luminescens* driven by: i- P<sub>hrtBA</sub> (pP<sub>hrtBA</sub>-*lux*), which emits light specifically in the presence of hemin (Fig. 7A), ii- a constitutive promoter P23 (*plux*), constitutively emitting light for bacterial tracking (13), or iii- a control promoterless vector, pP<sub>∅</sub>-*lux*. Cultures of these strains were orally inoculated in the digestive tract of mice, and light emission from whole live animals was measured in an *in vivo* imaging system IVIS200, 6 h post-inoculation (Fig. 7B). This time delay corresponded to the maximum light emission from the tracking strain OG1RF(*plux*) (Fig. S6). Luminescence signaling from the ingested *E. faecalis* pP<sub>hrtBA</sub>-*lux* heme sensor strain also localized in the abdomen, similarly to the tracking strain (Fig. 7B). Examination of dissected organs revealed that the heme sensor-

associated luminescence was mainly detected in the caecum (Fig. 7C), correlating with the high bacterial load of this organ (WT(*plux*), Fig. 7C). A significant signal was also detected in the feces from inoculated animals further highlighting that *E. faecalis* was able to scavenge and internalize heme within the digestive tract to induce *hrtBA<sub>Ef</sub>* expression (Fig. 7D). Finally, mice and human feces samples (as well as faecal waters (Fig. S7A and S7B)) from healthy individuals were able to induce luminescence from WT(pP<sub>hrtBA</sub>-*lux*) *in vitro* excluding the possibility that induction of P<sub>hrtBA</sub> *in vivo* could result from the inoculation procedure (Fig. 7E). Therefore, FhtR heme sensor activity is active and relevant to *E. faecalis* heme management in the lumen of the GIT.

**Heme sources for *E. faecalis* in the GIT.** The results described above implies that *E. faecalis* internalizes heme in the intestinal environment to activate FhtR. Thus, an interesting question remains as to identify heme sources that are accessible to *E. faecalis* in the GIT. Normal bleeding (occult blood), exacerbated in intestinal pathologies, as well as food (as meat) are considered as main sources of heme within the GIT (the second being excluded in mice) (27-30). We thus visualized the ability of hemoglobin (Hb) or blood deposited on plates as schematized (Fig. 8A) to induce P<sub>hrtBA</sub> from the heme sensor strain WT OG1RF(pP<sub>hrtBA</sub>-*lux*). As shown in Fig. 8C and Fig. 8D, luminescence was induced in proximity of Hb and blood sources (Fig. 8C and Fig. 8D) deposits similarly to hemin (Fig. 8A). This result suggests that heme from physiologically available sources are internalized by *E. faecalis*. Crossfeeding of metabolites, including heme between bacteria has been reported (27, 31). The possibility that *E. faecalis* could scavenge heme from intestinal resident heme-synthesizing bacteria, such as *E. coli* - a phylum that becomes prevalent together with *E. faecalis* throughout dysbiosis- was evaluated. The *E. faecalis* WT heme sensor strain was grown in contact with *E. coli* (as the heme source) as in Fig. 8A. Strikingly, induction of luminescence was localized to areas of overlap between the 2 bacteria (Fig. 8E) and required heme synthesis by *E. coli* as no sensing

could be detected with a heme defective mutant *hemA::kan* (Fig. 8F). This result suggests that heme synthesized by *E. coli* is internalized by *E. faecalis* (Fig.8E). Thus, heme crossfeeding between bacterial symbionts in the gut might provide a heme source for *E. faecalis*. We conclude that *E. faecalis* heme sensor is activated by the heme sources available in the GIT.

## Discussion

*E. faecalis* is a core member of the microbiome, and is also the cause of a variety of severe infections (32). The central role of heme in reprogramming *E. faecalis* metabolism and fitness led us to investigate how heme homeostasis is controlled. A novel heme sensor, FhtR, is shown here to regulate heme intracellular homeostasis in *E. faecalis*. FhtR-heme complexes de-repress *hrtBA<sub>Ef</sub>* operon, leading to HrtBA-mediated management of intracellular heme pools. While expression of HrtBA is a conserved strategy in multiple Gram-positive organisms, *E. faecalis* appears to be the first example of an opportunistic pathogen where HrtBA is not controlled by the two-component system HssRS. Blast analysis of FhtR homologs in several Gram-positive bacteria showed that the regulator is present only in enterococci, vagococci and carnobacteria (Fig. S8A and Fig. S8B for FhtR alignments and phylogenetic tree). FhtR shares no homology with HrtR, a TetR regulator of *hrtRBA* in *Lactococcus lactis* (18). In contrast to HrtR which autoregulates its own expression, *fhtR* is monocistronic and expressed constitutively, implying that only HrtBA<sub>Ef</sub> expression is controlled by heme (18).

We characterized FhtR as a heme-binding protein through pentacoordinated ligation of the heme iron implying a tyrosine. This state of coordination is mostly found in heme receptors that transiently bind heme, such as IsdA, IsdC, and IsdH in *S. aureus*, or HmA in *Escherichia coli* (33). FhtR blocks *hrtBA<sub>Ef</sub>* transcription by binding to two distinct 14-nt inverted repeats sequences in its promoter region. Alleviation of repression occurs when the heme-FhtR complex loses its affinity for its DNA binding sites. Conformational changes upon ligand binding is a shared mechanism among TetR regulators, leading to uncoupling from DNA (24). We thus hypothesize that these events, which we verified *in vitro*, explain FhtR regulation of the *hrtBA<sub>Ef</sub>* efflux pump in *E. faecalis*. The unique features of FhtR in *E. faecalis* compared to other regulators of *hrtBA* genes encoding efflux pumps support the idea that control of HrtBA-mediated heme homeostasis may vary among bacteria as a function of their lifestyle. It is thus

tempting to speculate that differences in host niches, and in heme utilization and metabolism, might explain disparities in bacterial heme sensing mechanisms.

Heme efflux by HrtBA is reported as a bacterial detoxification mechanism that prevents intracellular heme overload (8, 13, 15, 16, 18). We showed here that HrtBA induction is required for *E. faecalis* survival when heme concentrations reached toxic levels ( $> 25 \mu\text{M}$ ). Yet, *hrtBA*<sub>Ef</sub> was induced at heme concentrations as low as  $0.1 \mu\text{M}$ , suggesting that heme efflux is also needed at non-toxic levels. Interestingly, *E. faecalis* encodes (at least) two heme-dependent enzymes, cytochrome *bd* oxidase and catalase (9, 10, 34). Both these enzymes not only bind heme and thus lower free heme levels, but also actively lower oxidative stress generated by heme. It will be of interest to determine the hierarchy of heme binding between FhtR, cytochrome *bd* oxidase, and catalase *in vivo*.

To date, no heme import function has been identified in *E. faecalis*, nor in other tested Gram positive heme auxotrophs (13, 18). Blast analysis of these bacteria failed to identify genes of the *isd* heme import system described in *Staphylococcus aureus* (35, 36). In *S. aureus*, heme receptors and transporters are induced in iron-depleted growth media, and imported heme is used as an iron source (36). Thus, our findings led us to question the need for a dedicated transport system to internalize exogenous heme in *E. faecalis*, and to propose an alternative hypothesis. We noted that HrtBA<sub>Ef</sub> is a member of the MacB family of efflux-pumps that is distinct from other structurally characterized ABC transporters (37). A model based on MacB transport of antibiotics and antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae* proposed that transmembrane conformational changes promote lateral entry of substrates in the membrane before they reach the cytoplasm (38). Based on the previous and present data (22), we propose that HrtB<sub>Ef</sub> has the integral role as heme “gatekeeper” in the cell. Like MacB antibiotics and antimicrobial substrates (39), membrane-bound heme could either enter passively into the intracellular compartment, and or be effluxed by HrtB before this step. Altogether, our results

### An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

place HrtBA<sub>Ef</sub> at the forefront of heme homeostasis in *E. faecalis* that is dependent on the key role of FhtR to adapt to the dichotomy between toxicity and benefits of heme which may be crucial in the host.

*In vivo* bioluminescent imaging of *E. faecalis* using an FhtR-based sensor identified the GIT as an environment where HrtBA<sub>Ef</sub> is expressed. The gut lumen of healthy individuals contains heme, independently of the nature of ingested food or of the microbiota (27-30). Heme in the GIT is reported to mainly originate from Hb from normal bleeding (occult blood) (40). Accordingly, *E. faecalis* was able to internalize heme from blood and Hb *in vitro*. In addition, a common microbiota constituent, *Escherichia coli*, is shown to be a heme donor, suggesting a novel basis for intestinal bacterial interactions. As several phylae composing the core microbiota are heme-auxotrophs with vital heme requirements, it is tempting to hypothesize that normal or disease associated fluctuations in host heme levels could be detected by FhtR to adjust its intracellular level and optimize bacterial fitness. Interestingly, *E. faecalis* causes a variety of severe infections, most often among antibiotic-treated hospitalized patients with intestinal dysbiosis favorizing high *E. coli* and enterobacterial populations (41). It will be interesting to evaluate in the impact of HrtBA and FhtR in *E. faecalis* fitness and in infection and intestinal colonization models. Taken together our results suggest that the FhtR-sensor and the HrtBA<sub>Ef</sub> heme gatekeeper allow *E. faecalis* to optimize its adaptation to variable heme pools in the host.

## Materials and Methods

**Bacterial strains and growth conditions.** Strains and plasmids used in this work are listed in Table S1. *E. coli* NEB 10 (New England Biolabs) was grown in LB medium and *E. coli* C600 *hemA::kan* in M17 medium supplemented with 0.5 % glucose (M17G). Experiments in *E. faecalis* were all performed using strain OG1RF and derivatives (Table S1). *E. faecalis* was grown in static conditions at 37°C in M17G. When needed, antibiotics were used for *E. coli* at 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  kanamycin and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  ampicillin, respectively; for *E. faecalis* at 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  erythromycin. Oligonucleotides used for plasmid constructions are listed in Table S2. Hemin (Fe-PPIX) (Frontier Scientific) was prepared from a stock solution of 10 mM hemin chloride in 50 mM NaOH. In this report, heme refers to iron protoporphyrin IX regardless of the iron redox state, whereas hemin refers to ferric iron protoporphyrin IX. For growth homogeneity, WT and mutants strains were transformed with the promoterless pTCV-*lac* plasmid when compared to complemented strains. Plasmid construction and *E. faecalis* gene deletion are described in Supplemental Material and Methods (Text S1).

**$\beta$ -galactosidase assays.** Stationary phase cultures were diluted at  $\text{OD}_{600} = 0.01$  in M17G and grown to  $\text{OD}_{600} = 0.5$ . Hemin was added to cultures, further grown for 1.5 h.  $\beta$ -galactosidase activity was quantified by luminescence in a Spark microplate luminometer (TECAN) using the  $\beta$ -glo substrate (Promega) as described (18).

**Cellular ROS quantification.** Stationary phase cultures were diluted at  $\text{OD}_{600} = 0.01$  in M17G and grown to  $\text{OD}_{600} = 0.5$ . Hemin was added to cultures, further grown for 1.5 h. Bacteria were washed twice with PBS + 0.5 % glucose by centrifugation to remove extracellular heme. Cell pellets were resuspended in PBS + 0.5 % glucose supplemented with 25  $\mu\text{M}$  dihydrorhodamine 123, a cell permeant fluorescent ROS indicator. Cell suspensions were distributed in a 96 well plate (Invitrogen). After 15 min incubation, optical density at 600 nm

and fluorescence (excitation 500 nm; emission, 536 nm) were measured in a Spark microplate spectrofluorimeter (TECAN).

**Bacterial lysate preparation.** Bacteria were pelleted at 3,500g for 10 min, resuspended in 20 mM Hepes pH 7.5, 300 mM NaCl, and disrupted with glass beads (Fastprep, MP Biomedicals). Cell debris were removed by centrifugation at 18,000 g at 4 °C for 15 min from the bacterial lysate supernatant. Proteins were quantified with the Lowry Method (Biorad).

**Heme concentration determination in bacterial lysates.** Equivalent amounts of proteins (in a volume of 250  $\mu$ l) were mixed with 250  $\mu$ l of 0.2 M NaOH, 40 % (v/v) pyridine and 500  $\mu$ M potassium ferricyanide or 5  $\mu$ l of 0.5 M sodium dithionite (diluted in 0.5 M NaOH) and 500-600 nm absorption spectra were recorded in a UV-visible spectrophotometer Libra S22 (Biochrom). Dithionite-reduced minus ferricyanide-oxidized spectra of pyridine hemochromes were used to determine the amount of heme *b* by following the value of the difference between absorbance at 557 nm and 540 nm using a difference extinction coefficient of 23.98 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> (42).

**Recombinant MBP-FhtR purification.** MBP-FhtR and MBP-FhtR<sup>Y132F</sup> were purified by affinity chromatography on amylose resin as reported previously (18) . Briefly, *E. coli* NEB10 or C600  $\Delta$ *hemA* strains were grown to OD<sub>600</sub> = 0.6 or 0.3 respectively, and expression was induced with 1 mM isopropyl 1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) ON at RT. Cells were pelleted at 3,500 g for 10 min, resuspended in 20 mM Hepes pH 7.5, 300 mM NaCl, containing 1 mM EDTA (binding buffer), and disrupted with glass beads (Fastprep, MP Biomedicals). Cell debris was removed by centrifugation at 18,000 g for 15 min at 4°C. MBP-tagged proteins were purified by amylose affinity chromatography (New England Biolabs) following manufacturer's recommendations: the soluble fraction was mixed with amylose resin and incubated on a spinning wheel at 4°C for 1 h. The resin was then centrifuged, and washed 3 times with binding

buffer. Purified proteins were eluted in binding buffer containing 10 mM maltose, and dialyzed against 20 mM Hepes pH 7.5, 300 mM NaCl.

**Heme-dependent catalase expression and activity.** KatA expression was followed on immunoblots with a polyclonal anti-KatA antibody (9). Catalase activity was determined on whole bacteria incubated with 100  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with the spectrophotometric FOX1 method based on ferrous oxidation in xylenol orange as described previously (43). Absorption was measured at 560 nm.

**Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).** A 325-bp DNA fragment containing the *hrtBA*<sub>Ef</sub> promoter (P<sub>hrtBA</sub>) was amplified by PCR from *E. faecalis* OG1RF genomic DNA with primers pair (O21-O22) (Table S2). In P<sub>hrtBA</sub>, the two 14-nt palindromic sequences; P1: 5'-TTATCAATCGATAA-3' and P2: 5'-TTATCGATTGATAA-3' were randomly altered to P1\*: 5'-ACTTGTATACATAA-3' and P2\*: 5'-ATATCTTGTATAAG-3' to generate 3 DNA variants P<sub>hrtBA</sub> P1\*, P<sub>hrtBA</sub> P2\* and P<sub>hrtBA</sub> P1\*, P2\*. These fragments were cloned into pUC plasmid (pUC-VS1, pUC-VS2 and pUC-VS3, Table S1) (Proteogenix, France) that were used as templates to PCR amplify the promoter region DNA variants with the primer pairs (O21-O22) (Table S2) that were cloned into pTCV (Table S1). A DNA fragment located in the *hrtBA*<sub>Ef</sub>-coding region was amplified with (O23-O24) primers (Table S2) and used as a negative control. EMSA (electrophoretic mobility shift assay) was performed in 20 mM Tris-HCl, pH 8, 50mM KCl, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.2 mM DTT, and 5% glycerol as reported previously (18). Binding was analyzed by gel electrophoresis on a 7 % polyacrylamide gel in TBE buffer stained with GelRed (Biotium) following electrophoresis.

**Ethics statement.** Animal experiments were carried out in strict accordance with the recommendations in the guidelines of the Code for Methods and Welfare Considerations in Behavioural Research with Animals of the EEC council (Directive 2010/63/EU). The protocols were approved by the Animal Care and Use Committee at the Research center of Jouy en Josas

(COMETHEA; protocol number 15–61) and by the Ministry of Education and Research (APAFIS#2277-2015081917023093 v4). All efforts were undertaken to minimize animal suffering. All experimental procedures were performed in biosafety level 2 facilities.

***In vivo* heme sensing assay in the mouse GIT.** For inoculation in the digestive tract, *E. faecalis* strains were prepared as follows: OG1RF precultures were diluted and grown in M17G to  $OD_{600} = 0.5$  that was determined to correspond to  $6 \cdot 10^8$  CFU/ml. Bacteria were then centrifuged at 6000 rpm at 4 °C for 15 min and pellets were resuspended in PBS to a final concentration of  $2 \cdot 10^8$  cells/ml. Bacterial stocks were aliquoted and frozen in liquid nitrogen. Aliquots were kept at  $-80$  °C until use. Bacterial counts were confirmed by plating serial dilutions of cultures. 6 week old female BALB/c mice (Janvier, France) were orally administered by gavage of  $10^8$  using a feeding tube. Image acquisition of isoflurane anesthetized mice was performed at the indicated time following gavage. Following image acquisition, mice were removed from the IVIS 200 imaging system and immediately sacrificed by cervical dislocation. When indicated, the animals were dissected for imaging of the isolated organs. *In vivo* luminescence imaging procedure is described in Supplemental Material and Methods (Text S1).

**Acknowledgments.** This work was supported by the HemeDetox -17-CE11-0044-01 project by the French “Agence Nationale de la Recherche”. EPR experiments were supported in part by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INBS-05. V. Saillant is the recipient of a doctoral fellowship from the French ministry of Research and Paris-Saclay University. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank Dr. A. Gruss (INRAE, France) and Dr. P. Moenne-Loccoz, Oregon Health and Science University, USA) for their help and valuable comments on this manuscript. We thank Dr. M. Vos, Dr. U. Liebl (CNRS, INSERM, Ecole Polytechnique, France) and Dr. P. Delepelaire (IBPC, France) for their technical help and insightful comments on our work. We are grateful to Dr. Lars Hederstedt (Lund University, Sweden) for the generous gift of the anti-KatA antibody and OG1RF mutants.

## Bibliography

1. Arias CA, Murray BE. 2012. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol* 10:266-78.
2. Agudelo Higueta NI, Huycke MM. 2014. Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. *In* Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (ed), *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, Boston.
3. Mendes RE, Castanheira M, Farrell DJ, Flamm RK, Sader HS, Jones RN. 2016. Longitudinal (2001-14) analysis of enterococci and VRE causing invasive infections in European and US hospitals, including a contemporary (2010-13) analysis of oritavancin in vitro potency. *J Antimicrob Chemother* 71:3453-3458.
4. Van Tyne D, Gilmore MS. 2017. Raising the Alarm: Within-Host Evolution of Antibiotic-Tolerant *Enterococcus faecium*. *mBio* 8.
5. Gruss A, Borezee-Durant E, Lechardeur D. 2012. Environmental heme utilization by heme-auxotrophic bacteria. *Adv Microb Physiol* 61:69-124.
6. Pishchany G, Skaar EP. 2012. Taste for blood: hemoglobin as a nutrient source for pathogens. *PLoS Pathog* 8:e1002535.
7. Kumar S, Bandyopadhyay U. 2005. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 157:175-88.
8. Anzaldi LL, Skaar EP. 2010. Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens. *Infect Immun* 78:4977-89.
9. Frankenberg L, Brugna M, Hederstedt L. 2002. *Enterococcus faecalis* heme-dependent catalase. *J Bacteriol* 154:6351-6356.
10. Winstedt L, Frankenberg L, Hederstedt L, Von Wachenfeldt C. 2000. *Enterococcus faecalis* V583 contains a cytochrome bd-type respiratory oxidase. *J Bacteriol* 182:3863-3866.
11. Brugna M, Tasse L, Hederstedt L. 2010. In vivo production of catalase containing haem analogues. *FEBS J* 277:2663-72.
12. Hammer ND, Reniere ML, Cassat JE, Zhang Y, Hirsch AO, Indriati Hood M, Skaar EP. 2013. Two heme-dependent terminal oxidases power *Staphylococcus aureus* organ-specific colonization of the vertebrate host. *MBio* 4.
13. Joubert L, Dagieu JB, Fernandez A, Derre-Bobillot A, Borezee-Durant E, Fleurot I, Gruss A, Lechardeur D. 2017. Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*. *Sci Rep* 7:40435.

14. Baureder M, Hederstedt L. 2013. Heme proteins in lactic acid bacteria. *Adv Microb Physiol* 62:1-43.
15. Fernandez A, Lechardeur D, Derre-Bobillot A, Couve E, Gaudu P, Gruss A. 2010. Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathog* 6:e1000860.
16. Knippel RJ, Zackular JP, Moore JL, Celis AI, Weiss A, Washington MK, DuBois JL, Caprioli RM, Skaar EP. 2018. Heme sensing and detoxification by HatRT contributes to pathogenesis during *Clostridium difficile* infection. *PLoS Pathog* 14:e1007486.
17. Torres VJ, Stauff DL, Pishchany G, Bezbradica JS, Gordy LE, Iturregui J, Anderson KL, Dunman PM, Joyce S, Skaar EP. 2007. A *Staphylococcus aureus* regulatory system that responds to host heme and modulates virulence. *Cell Host Microbe* 1:109-19.
18. Lechardeur D, Cesselin B, Liebl U, Vos MH, Fernandez A, Brun C, Gruss A, Gaudu P. 2012. Discovery of an intracellular heme-binding protein, HrtR, that controls heme-efflux by the conserved HrtB HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* 287:4752-8.
19. Stauff DL, Skaar EP. 2009. *Bacillus anthracis* HssRS signalling to HrtAB regulates haem resistance during infection. *Mol Microbiol* 72:763-78.
20. Stauff DL, Skaar EP. 2009. The heme sensor system of *Staphylococcus aureus*. *Contrib Microbiol* 16:120-135.
21. Stauff DL, Torres VJ, Skaar EP. 2007. Signaling and DNA-binding activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS two-component system required for heme sensing. *J Biol Chem* 282:26111-21.
22. Joubert L, Derre-Bobillot A, Gaudu P, Gruss A, Lechardeur D. 2014. HrtBA and menaquinones control haem homeostasis in *Lactococcus lactis*. *Mol Microbiol* 93:823-33.
23. Ramos J, Martinez-Bueno M, Molina-Henares A, Teran W, Watanabe K, Zhang X, Gallegos M, Brennan R, Tobes R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev*; 69:326-356.
24. Routh M, Su C-C, Zhang Q, Yu E. 2009. Structures of the AcrR and CmeR: Insight into the mechanisms of transcriptional repression and multi-drug recognition in the TetR family of regulators in the TetR family of regulators. *Biochim Biophys Acta* 1794:844-851.
25. Kumar R, Lovell S, Matsumura H, Battaile KP, Moenne-Loccoz P, Rivera M. 2013. The hemophore HasA from *Yersinia pestis* (HasA<sub>yp</sub>) coordinates heme with a single residue, Tyr75, and with minimal conformational change. *Biochemistry* 52:2705-7.
26. Aki Y, Nagai M, Nagai Y, Imai K, Aki M, Sato A, Kubo M, Nagatomo S, Kitagawa T. 2010. Differences in coordination states of substituted tyrosine residues and quaternary

structures among hemoglobin M probed by resonance Raman spectroscopy. *J Biol Inorg Chem* 15:147-58.

27. Halpern D, Gruss A. 2015. A sensitive bacterial-growth-based test reveals how intestinal *Bacteroides* meet their porphyrin requirement. *BMC Microbiol* 15:282.
28. Mimee M, Nadeau P, Hayward A, Carim S, Flanagan S, Jerger L, Collins J, McDonnell S, Swartwout R, Citorik RJ, Bulovic V, Langer R, Traverso G, Chandrakasan AP, Lu TK. 2018. An ingestible bacterial-electronic system to monitor gastrointestinal health. *Science* 360:915-918.
29. Fiorito V, Forni M, Silengo L, Altruda F, Tolosano E. 2015. Crucial Role of FLVCR1a in the Maintenance of Intestinal Heme Homeostasis. *Antioxid Redox Signal* 23:1410-23.
30. Rockey DC. 2010. Occult and obscure gastrointestinal bleeding: causes and clinical management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7:265-79.
31. Seth EC, Taga ME. 2014. Nutrient cross-feeding in the microbial world. *Front Microbiol* 5:350.
32. Fiore E, Van Tyne D, Gilmore MS. 2019. Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectr* 7.
33. Brewitz HH, Hagelueken G, Imhof D. 2017. Structural and functional diversity of transient heme binding to bacterial proteins. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1861:683-697.
34. Frankenberg N, Moser J, Jahn D. 2003. Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl Microbiol Biotechnol* 63:115-27.
35. Maresso AW, Schneewind O. 2006. Iron acquisition and transport in *Staphylococcus aureus*. *Biometals* 19:193-203.
36. Price EE, Boyd JM. 2020. Genetic Regulation of Metal Ion Homeostasis in *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* doi:10.1016/j.tim.2020.04.004.
37. Orelle C, Mathieu K, Jault JM. 2019. Multidrug ABC transporters in bacteria. *Res Microbiol* 170:381-391.
38. Yang HB, Hou WT, Cheng MT, Jiang YL, Chen Y, Zhou CZ. 2018. Structure of a MacAB-like efflux pump from *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Commun* 9:196.
39. Sharom FJ. 2006. Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochem Cell Biol* 84:979-92.
40. Bull-Henry K, Al-Kawas FH. 2013. Evaluation of occult gastrointestinal bleeding. *Am Fam Physician* 87:430-6.
41. Zeng MY, Inohara N, Nunez G. 2017. Mechanisms of inflammation-driven bacterial dysbiosis in the gut. *Mucosal Immunol* 10:18-26.

42. Berry EA, Trumpower BL. 1987. Simultaneous determination of hemes a, b, and c from pyridine hemochrome spectra. *Anal Biochem* 161:1-15.
43. Lechardeur D, Fernandez A, Robert B, Gaudu P, Trieu-Cuot P, Lamberet G, Gruss A. 2010. The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase c binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae*. *J Biol Chem* 285:16032-41.

## Figure legends

**Figure 1. HrtBA<sub>Ef</sub> controls and responds to heme intracellular cellular content in *E. faecalis*.** (A) Deletion of *hrtBA<sub>Ef</sub>* increases sensitivity to hemin toxicity. Overnight cultures of WT and  $\Delta$ *hrtBA<sub>Ef</sub>* strains were diluted to OD<sub>600</sub> = 0.01 and grown with the indicated concentrations of hemin ( $\mu$ M) for 10 h at 37 °C in a microplate Spark spectrophotometer (Tecan). OD<sub>600</sub> was measured every 20 min. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. Result is representative of 3 independent experiments. (B) Heme accumulates in  $\Delta$ *hrtBA<sub>Ef</sub>* strain. WT and  $\Delta$ *hrtBA<sub>Ef</sub>* strains were grown to OD<sub>600</sub> = 0.5 prior addition of 5  $\mu$ M hemin in the culture medium for an additional 1.5 h. Bacteria were pelleted by centrifugation and heme content was determined by the pyridine hemochrome assay on cell lysates. Heme content was normalized to the protein concentration. Background from bacteria non-incubated with hemin was subtracted. Results represent the average  $\pm$  S.D. from biological triplicates. \*\*\*,  $P = 0.0002$ , Student's *t* test. (C) HrtBA<sub>Ef</sub> participates in the color phenotype of *E. faecalis* upon heme exposure. Cells were grown as in (A), were incubated for 1.5 h with 5  $\mu$ M hemin. The bacteria were photographed following centrifugation. Result is representative of 3 independent experiments. (D) HrtBA<sub>Ef</sub> reduces heme cytoplasmic concentration. WT and  $\Delta$ *hrtBA<sub>Ef</sub>* strains carrying the intracellular sensor plasmid, pP<sub>hrt</sub>-*hrtR-lac* were grown as in (B). B-gal activity was quantified by luminescence after 1.5 h incubation with 5  $\mu$ M hemin. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , Student's *t* test. Values with no added hemin are subtracted. Result is representative of 3 independent experiments. (E) HrtBA<sub>Ef</sub> prevents hemin induced oxidative stress. WT and  $\Delta$ *hrtBA<sub>Ef</sub>* strains were grown as in (B) with 10  $\mu$ M of hemin. Cells were washed with PBS + 0.5 % and ROS generation was quantified by the fluorescence of dihydrorhodamine 123. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. ns, non-significative; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , Student's *t* test. Background from bacteria non-incubated with hemin was subtracted Result

is representative of 3 independent experiments. **(F)** Induction of *hrtBA<sub>Ef</sub>* operon by hemin. WT OG1RF strain transformed with the reporter plasmid pP<sub>hrtBA</sub>-*lac* was grown and B-gal activity was determined as in (D) following incubation with the indicated concentrations of hemin. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. \*\*\*\*,  $P < 0.001$ , one-way ANOVA followed by Dunnett's post test comparison to 0  $\mu$ M. Result is representative of 3 independent experiments.

**Figure 2. FhtR, a novel heme sensing transcriptional regulator controls *hrtBA<sub>Ef</sub>* expression**

**in *E. faecalis*.** **(A)** Schematic representation of the *fhtR* gene and concomitant *hrtBA<sub>Ef</sub>* operon.

The *fhtR* gene (OG1RF\_RS02765) encodes a TetR family transcriptional regulator. The *hrtB<sub>Ef</sub>* (OG1RF\_RS02770) and *hrtA<sub>Ef</sub>* (OG1RF\_RS02775) genes encode a permease and ATPase, respectively.

**(B)** FhtR controls *hrtBA<sub>Ef</sub>* expression. WT and  $\Delta$ *fhtR* strains carrying the reporter plasmid pP<sub>hrtBA</sub>-*lac*, and  $\Delta$ *fhtR* carrying a plasmid, p*fhtR*, combining both P<sub>hrtBA</sub>-*lac* and P<sub>fhtR</sub>-*fhtR* were grown to OD<sub>600</sub> = 0.5 and Bgal expression was quantified by luminescence as reported

in Fig. 1 with the indicated concentrations of hemin. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. \*\*\*\*,  $P < 0.001$ ; ns, non significant, Student's *t* test. Result is representative of 3 independent experiments. **(C)** *fhtR* deletion abrogates heme toxicity.

Stationary phase cultures of WT,  $\Delta$ *fhtR* and  $\Delta$ *fhtR*(p*fhtR*) were plated on solid medium. Hemin (10  $\mu$ l of a 1 mM stock solution) was pipetted directly onto plates, which were incubated for 24 h. Inhibition zones appear as a circular clearing in the center of each panel. No inhibition zone was observed for  $\Delta$ *fhtR* strain. Result is representative of 3 independent experiments. **(D)**

Visualization of the impact of FhtR on heme accumulation. WT,  $\Delta$ *fhtR* and  $\Delta$ *fhtR*(p*fhtR*) were grown and incubated with 5  $\mu$ M hemin as in (A). The bacteria were pelleted by centrifugation and photographed. Result is representative of 3 independent experiments. **(E)** FhtR expression is constitutively induced. Bgal expression upon hemin addition to the culture medium in WT

and  $\Delta$ *fhtR* strains transformed with the pP<sub>fhtR</sub>-*lac* reporter plasmid was determined by

luminescence as in Fig. 1. Result is representative of 3 independent experiments. **(F)** *fhtR* transcription is not mediated by hemin.  $\Delta fhtR$  strain transformed with pP<sub>fhtR</sub>-*fhtR*-HA or empty vector (control) was used to follow FhtR expression by WB using an anti-HA antibody. Bacteria were grown to OD<sub>600</sub> = 0.5 and incubated with 2.5  $\mu$ M hemin for 1.5 h. SDS-PAGE was performed on cell lysates (80  $\mu$ g per lane). Result is representative of 3 independent experiments.

**Figure 3. FhtR binds heme.** **(A)** UV-visible absorption spectra of MBP-FhtR as purified from *E. coli*. UV-visible spectra of 30  $\mu$ M (in 200  $\mu$ l) MBP-FhtR was obtained in a microplate spectrophotometer (Spark, Tecan) and normalized to OD<sub>280</sub> = 1. *Inset*, a photograph of the purified MBP-FhtR. Results are representative of 3 independent experiments. **(B)** UV-visible spectra of apoMBP-FhtR complexed with hemin. MBP-FhtR was purified from *E. coli* (*hemA::kan*) strain as an apoprotein (dashed line) that was mixed with equimolar concentration of hemin. Spectra was obtained as in (A) with 20  $\mu$ M complex and normalized to OD<sub>280</sub>=1. *Inset*, magnification of the 500-700 nm region. Results are representative of 3 independent experiments. **(C)** Size-exclusion chromatography of apo- and holoMBP-FhtR. MBP-FhtR was purified and complexed with hemin as in (B). 40  $\mu$ M in 100  $\mu$ l were loaded on a Superdex 200 Increase 10/300 GL gel filtration column (GE healthcare) in HEPES 20 mM NaCl 300 mM buffer. Protein and heme content were analyzed at OD<sub>280</sub> and OD<sub>410</sub>, respectively. Results are representative of 3 independent experiments. **(D)** Titration of MBP-FhtR with hemin followed by fluorescence and absorbance (*inset*). For the fluorescence experiment, 50 nM of ApoMBP-FhtR purified from (*hemA::kan*) *E. coli* as in (B) were titrated with increasing increments of hemin. Fluorescence intensity was recorded and plotted against hemin concentration. The experiment was repeated three times, fitted using the nonlinear regression function of GraphPad Prism 4 software and gave a  $K_d$  of 310 nM. The *inset* depicts the absorbance at 407 nm of ApoMBP-FhtR plotted against hemin concentration. Curve is representative of 10 independent

experiments and was fitted using the nonlinear regression function of GraphPad Prism 4 software and determined that the stoichiometry of the FhtR:hemin complex was 1:1.

**Figure 4. Ligation of FhtR with hemin implicates the tyrosine Y132.** (A) Comparative UV-visible absorption spectra of 20  $\mu$ M MBP-FhtR and MBP-FhtR<sup>Y132F</sup> purified from *E. coli*. UV-visible spectra was performed as in Fig. 3A. (B) UV-visible spectra of apoMBP-FhtR<sup>Y132F</sup> complexed with hemin. MBP-FhtR<sup>Y132F</sup> was purified from *E. coli* (*hema::kan*) strain as an apoprotein (dashed line) that was mixed with equimolar concentration of hemin (holoMBP-FhtR). Spectra was obtained as in (A) with 20  $\mu$ M complex and normalized to OD<sub>280nm</sub> = 1. Inset, magnification of the 500-700 nm region. Results are representative of 3 independent experiments. (C) EPR spectroscopy of MBP-FhtR and MBP-FhtR<sup>Y132F</sup> in complex with hemin. EPR spectra of 60  $\mu$ M bound hemin to WT (black line) and Y132 mutant (red line) MBP-FhtR (red line) in 20 mM HEPES, pH 7; 300 mM NaCl were recorded. Inset represents a magnification of the 900-1500 Magnetic Field range. Results are representative of 3 independent experiments. (D) Induction of *hrtBA<sub>Ef</sub>* operon by hemin. Bgal activity from  $\Delta$ *fhtR* OG1RF strain transformed either with pP<sub>hrtBA</sub>-*lac*; P<sub>fhtR</sub>-*fhtR* or pP<sub>hrtBA</sub>-*lac*; P<sub>fhtR</sub>-fhtR<sup>Y132F</sup> was determined as in Fig. 1C following incubation with the indicated concentrations of hemin. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. \*\*, P = 0.0058, \*\*\*\*, P < 0.0001, ns, non-significant, one-way ANOVA followed by Dunnett's posttest comparison to WT (0  $\mu$ M). Result is representative of 3 independent experiments.

**Figure 5. FhtR controls *hrtB<sub>Ef</sub>* transcription via binding to 2 repeated 14-nt palindromic sequences.** (A) Two 14 nucleotides palindromic motifs are present upstream of *hrtBA<sub>Ef</sub>*. The 2 palindromes are in blue (P1) and in red (P2); the RBS sequence is underlined and the start codon is in green. (B) FhtR binds to the promoter region of *hrtBA<sub>Ef</sub>*. EMSA shows binding of FhtR to P<sub>hrtBA</sub>. 0.25 pmoles of the *hrtBA<sub>Ef</sub>* promoter fragment were incubated with increasing amounts of MBP-FhtR as indicated in molar ratios. DNA shift was visualized with GelRed (Biotium)

following PAGE. C1, C2 indicate the 2 shifted DNA-protein complexes and NC, the non-complexed DNA. Result is representative of at least 3 independent experiments. (C) Role of the 2 palindromic sequences on FhtR binding to the promoter region of *hrtBA<sub>Ef</sub>*. EMSA was performed as in (B) with either the native or P<sub>hrtBA</sub> DNA fragment (as in A) or mutated versions fragments P<sub>hrtBA</sub> P1\*, P2\*, P<sub>hrtBA</sub> P1\*, P<sub>hrtBA</sub> P2\* containing P1 and P2 randomly exchanged nucleotides P1\* and P2\* respectively (A). MBP-FhtR: DNA (2.5 pmol: 0.25 pmol). Result is representative of at least 3 independent experiments. (D) Effect of hemin on binding of FhtR to the *hrtBA<sub>Ef</sub>* promoter. 0.25 pmoles of the *hrtBA<sub>Ef</sub>* promoter DNA was incubated with 2.5 pmoles of MBP-FhtR together with increasing amounts of hemin as indicated (molar ratios) and analyzed by EMSA as in (B). Result is representative of at least 3 independent experiments. (E) Substitution of the 2 palindromic nt sequences, P1 and P2, in P<sub>hrtBA</sub> abrogates FhtR mediated control of *hrtBA<sub>Ef</sub>* transcription. WT OG1RF strain was transformed either with the reporter plasmid pP<sub>hrtBA</sub>-*lac* or pP<sub>hrtBA</sub> P1\*P2\* -*lac*. B-gal activity was determined as in Fig. 1 following incubation with 2.5  $\mu$ M hemin. Results represents the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; ns, non significant, Student's *t* test. Result is representative of 3 independent experiments. (F) Substitution of either P1 or P2 nucleotide sequences in P<sub>hrtBA</sub> enhances its transcriptional activation by hemin. WT OG1RF strain was transformed either with the reporter plasmid pP<sub>hrtBA</sub>-*lac* or pP<sub>hrtBA</sub> P1\* -*lac* or pP<sub>hrtBA</sub> P2\* -*lac*. B-gal activity was determined as in Fig. 1 following incubation with 0.1 and 0.5  $\mu$ M hemin. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$  ; \*\*\*,  $P=0.0003$  ; \*\*,  $P = 0.0028$  ; ns, non-significant, one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Result is representative of 3 independent experiments.

**Figure 6. FhtR controls intracellular utilization of heme. (A) *fhtR* deletion limits heme-dependent KatA activity.** KatA enzymatic activity in *E. faecalis* was assessed on WT,  $\Delta$ *fhtR* and  $\Delta$ *fhtR*(*pfhtR*) grown ON with 1  $\mu$ M hemin. Catalase activity was determined on equivalent

number of bacteria incubated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 30 min with the spectrophotometric FOX1 method based on ferrous oxidation in xylenol orange. Results expressed as the % of  $\text{H}_2\text{O}_2$  metabolized in respective strains grown without hemin and are the average  $\pm$  S.D. of technical triplicates. \*\*\*,  $P = 0.0001$ ; ns, non significant, one-way ANOVA followed by Dunnett's posttest comparison to WT. Result is representative of 3 independent experiments. **(B)** Expression of KatA is impaired in the  $\Delta fhtR$  OG1RF mutant. Equivalent amounts of protein (20  $\mu\text{g}$ ) from lysates of WT,  $\Delta fhtR$  and  $\Delta fhtR(\text{pfhtR})$  strains as in (A) were separated on SDS-PAGE and immunoblots probed with an anti-KatA polyclonal antibody. The presented results are representative of 3 independent experiments. **(C, D)**  $\Delta fhtR$  mutant is hypersensitive to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . ON cultures of WT,  $\Delta fhtR$  and  $\Delta fhtR(\text{pfhtR})$  strains were diluted to  $\text{OD}_{600} = 0.01$  and grown to  $\text{OD}_{600} = 0.5$  in the absence (C) or presence of 1  $\mu\text{M}$  hemin (D). Cultures were distributed in a 96 well plate and supplemented or not with 2.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{OD}_{600}$  was monitored every 20 min in a microplate spectrophotometer (Spark, Tecan). Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples and is representative of 3 independent experiments. **(E)** KatA limits heme toxicity. ON cultures of WT and  $\text{katA}::\text{tetR}$  OG1RF strains were diluted to  $\text{OD}_{600} = 0.01$  and grown in 96 well plate in presence of the indicated concentration of hemin as in (D). Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples and is representative of 3 independent experiments.

**Figure 7. HrtBA<sub>Ef</sub> is induced in the gastrointestinal environment.** **(A)** Heme dependent light emission by the heme sensing OG1RF strain. OG1RF WT( $\text{pP}_{\text{hrtBA-lux}}$ ) was plated on M17G agar plates  $\pm$  20  $\mu\text{M}$  hemin. Plates were incubated at 37  $^\circ\text{C}$  for 24 h and luminescence was visualized using an IVIS 200 luminescence imaging system, (acquisition time, 1 min; binning 8). Result is representative of 3 independent experiments. **(B)** Heme sensing by *E. faecalis* over the course of intestinal transit. Female BALB/c mice were force-fed with  $10^8$  CFU of WT( $\text{pP}_{\emptyset\text{-lux}}$ ) (control strain), WT( $\text{pP}_{\text{hrtBA-lux}}$ ) (sensor strain) or WT( $\text{plux}$ )(tracking strain). At

### An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

6 h post-inoculation, anesthetized mice were imaged in the IVIS 200 system (acquisition time, 20 min; binning 16). Figure shows representative animals corresponding to a total of 15 animals for each condition in 3 independent experiments. (C) Caecums exhibit high heme sensing signal. Animals as in (B) were euthanized and immediately dissected. Isolated GIT were imaged as in (B). Caecums that exhibited most of the luminescence are shown (acquisition time, 5 min; binning 8). Scale = 1  $\mu$ M. (D) Visualization of heme sensing in feces collected from mice following ingestion of WT(pP<sub>Ø</sub>-lux), WT(pP<sub>hrtBA</sub>-lux) or WT(plux). WT(pP<sub>hrtBA</sub>-lux) as in (B) were collected 6-9h after gavage. Feces were imaged as in (B) (acquisition time, 20 min; binning 16). Scale = 1  $\mu$ M. Results are representative of 3 independent experiments. (E) Human and mice feces samples activate heme sensing. Human feces from 3 healthy human laboratory volunteers and mice feces from 6 months old female BALB/c mice were deposited on M17G agar plates layered with soft agar containing WT OG1RF (pP<sub>hrtBA</sub>-lux). Plates were incubated at 37 °C for 16 h and imaged in the IVIS 200 system (acquisition time, 10 min; binning 8). Figure shows representative results corresponding to a total of 3 independent experiments.

**Figure 8. Heme sources for *E. faecalis* in the GIT.** (A) Intracellular heme sensing setup. 10  $\mu$ l of the indicated heme sources were deposited on M17G solid medium as shown in red. WT OG1RF carrying pP<sub>hrtBA</sub>-lux heme sensor plasmid was plated as 10  $\mu$ l spots at OD<sub>600</sub> = 0.01 as shown in blue. Plates were incubated at 37°C for 16 h and imaged in the IVIS 200 system (acquisition time, 10 min; binning 8). (B) Visualization of heme sensing from hemin deposits. 1 mM hemin in PBS was used. (C, E) Heme from blood (bovine), from hemoglobin (human) are heme sources for *E. faecalis*. Heparanized bovine blood (Thermofisher) and freshly dissolved human hemoglobin (1 mM) in PBS were used. (F, G) *E. coli* is a heme donor for *E. faecalis*. *E. coli* (NEB10, New England Biolabs) or a mutant strain that cannot synthesize heme (*hemA::kan*) mutant at OD<sub>600</sub> = 0.1 were plated as in (A). Only the heme synthesizing strain

was able to crossfeed heme to *E. faecalis*. Figures (B-F) show representative results corresponding to a total of 3 independent experiments.

An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

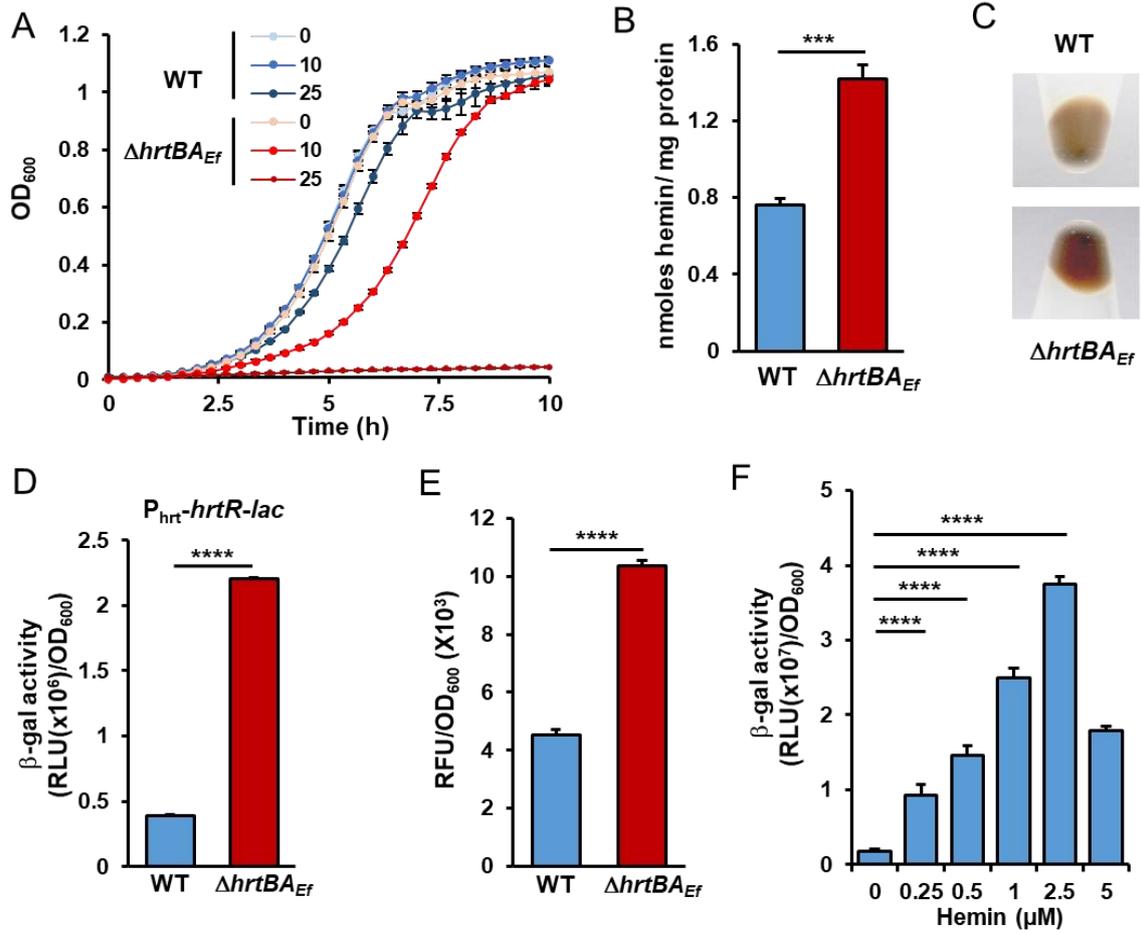


Figure 1

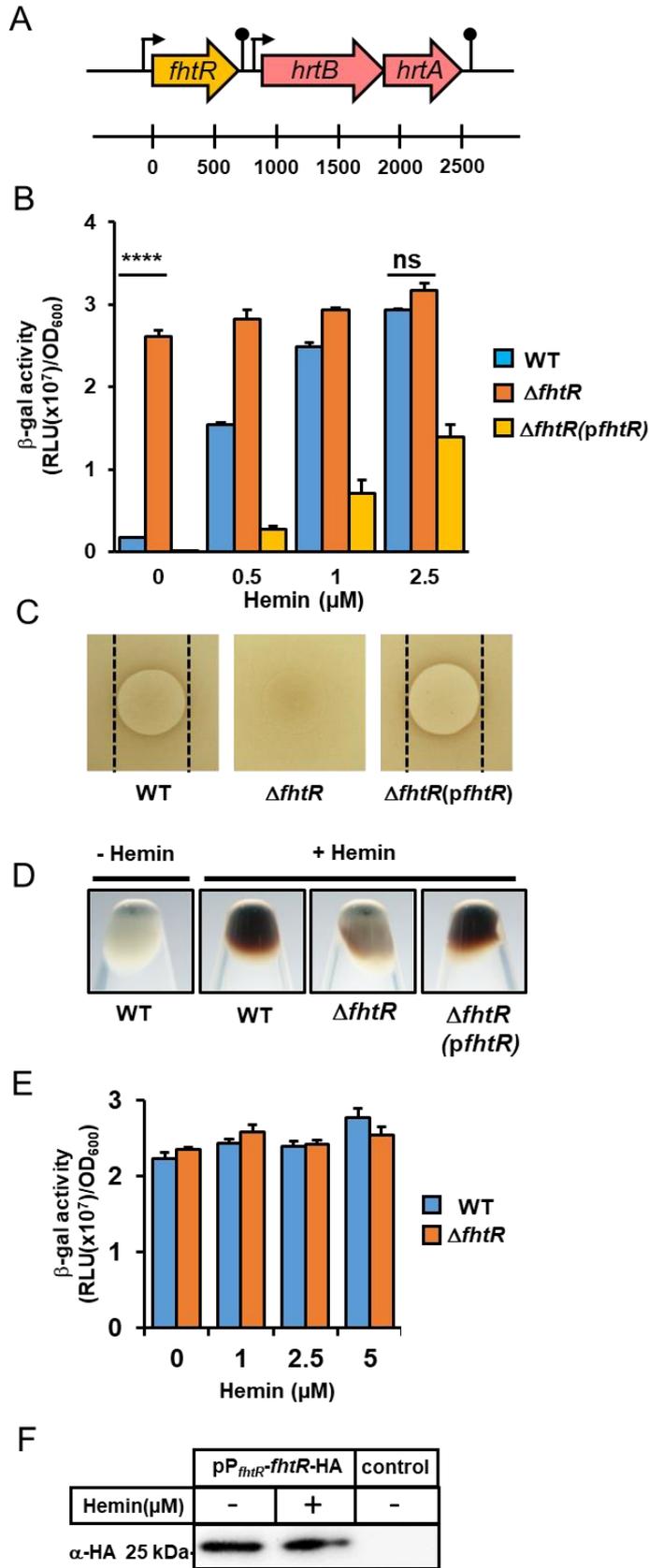


Figure 2

An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

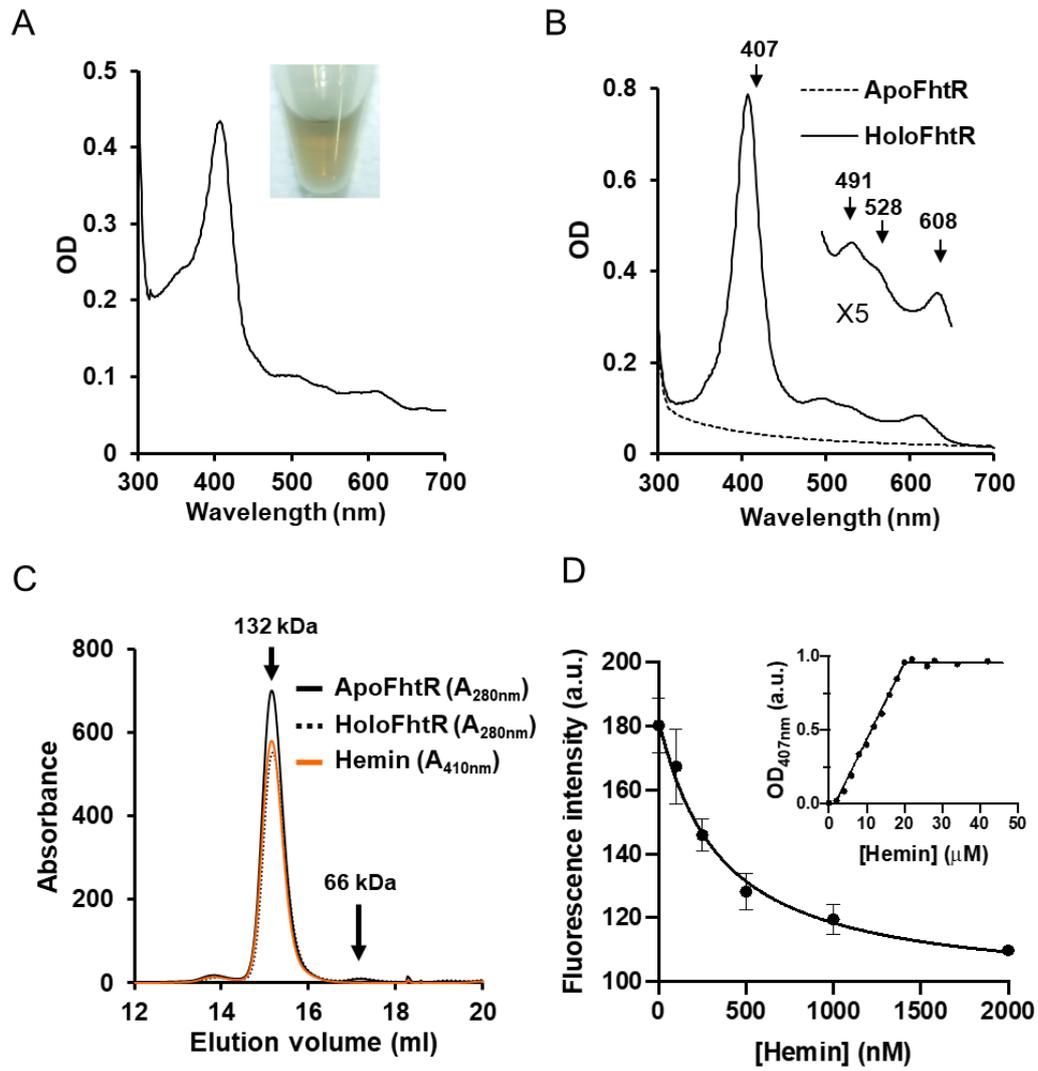


Figure 3

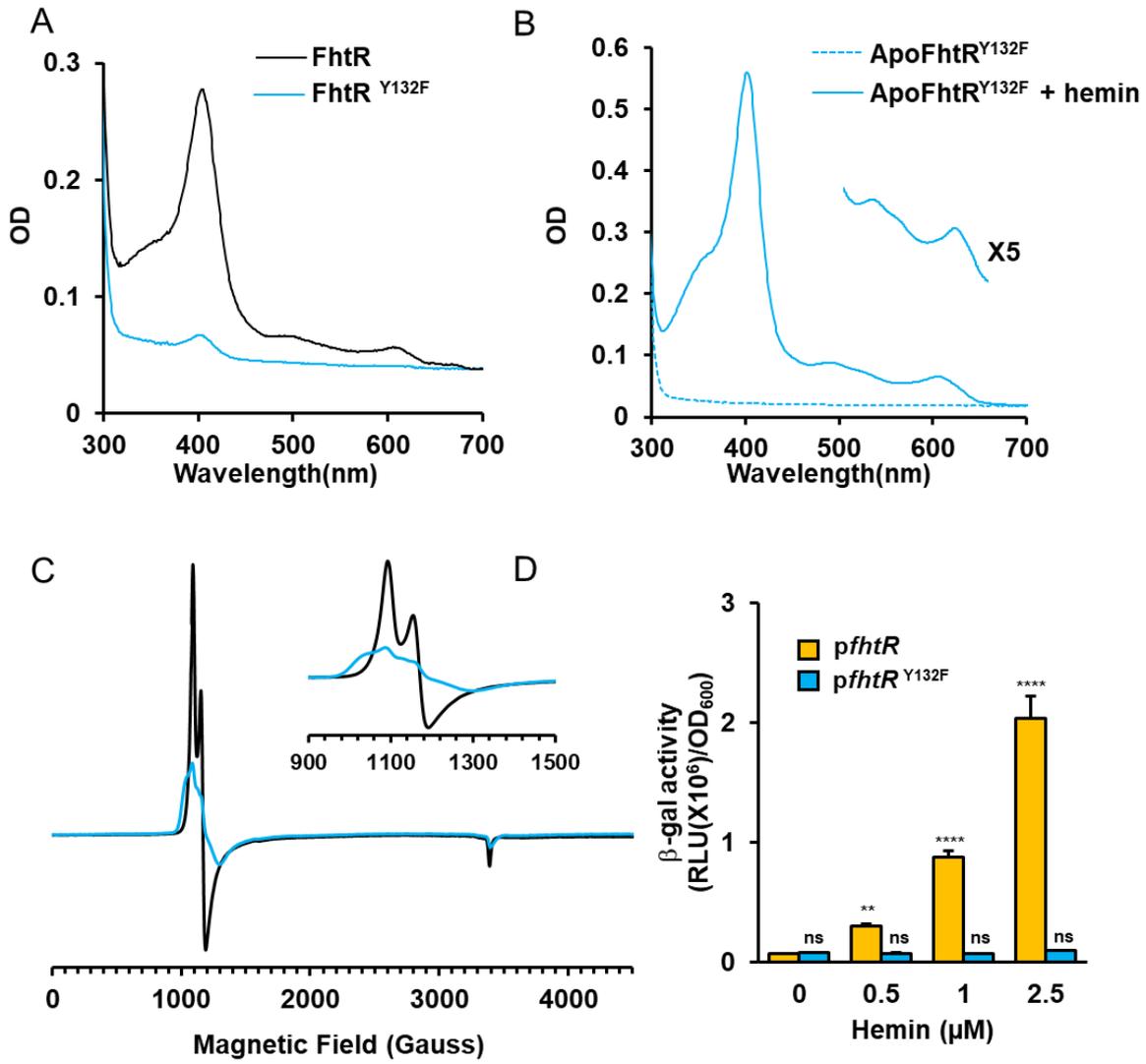


Figure 4

An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

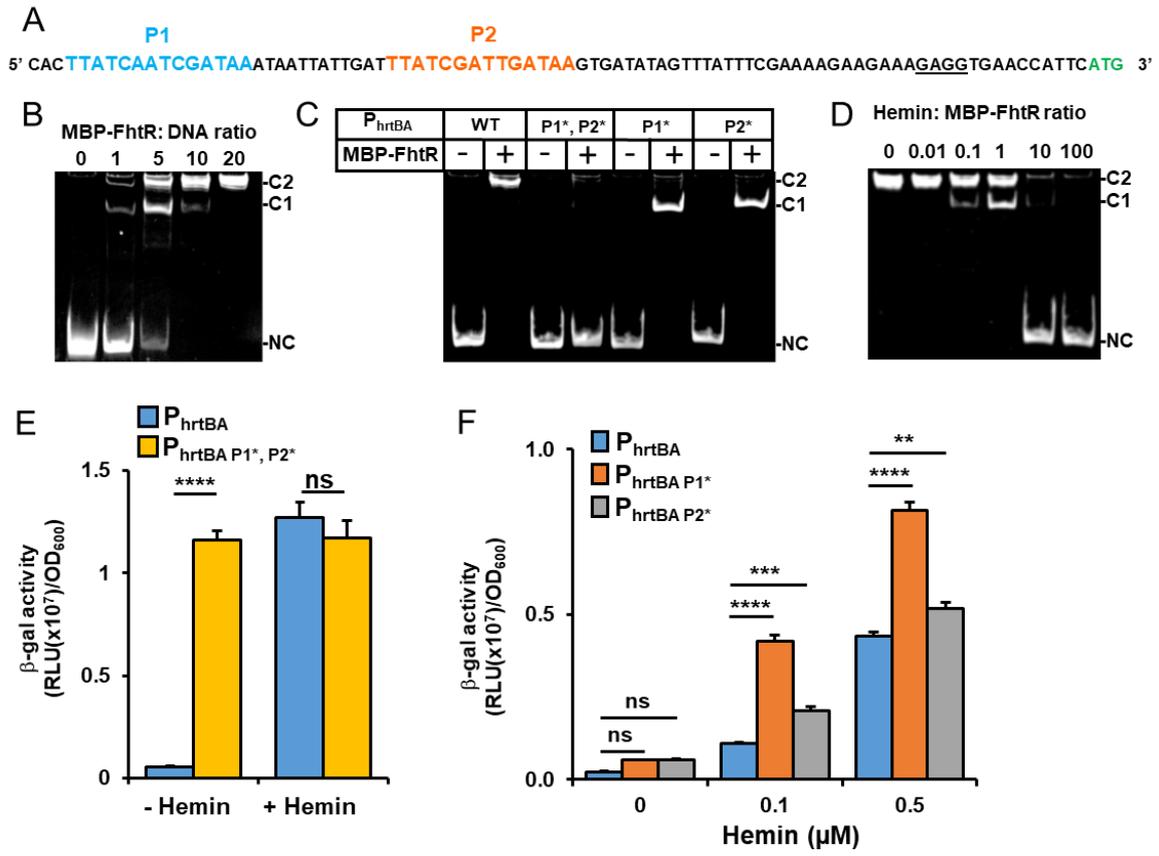


Figure 5

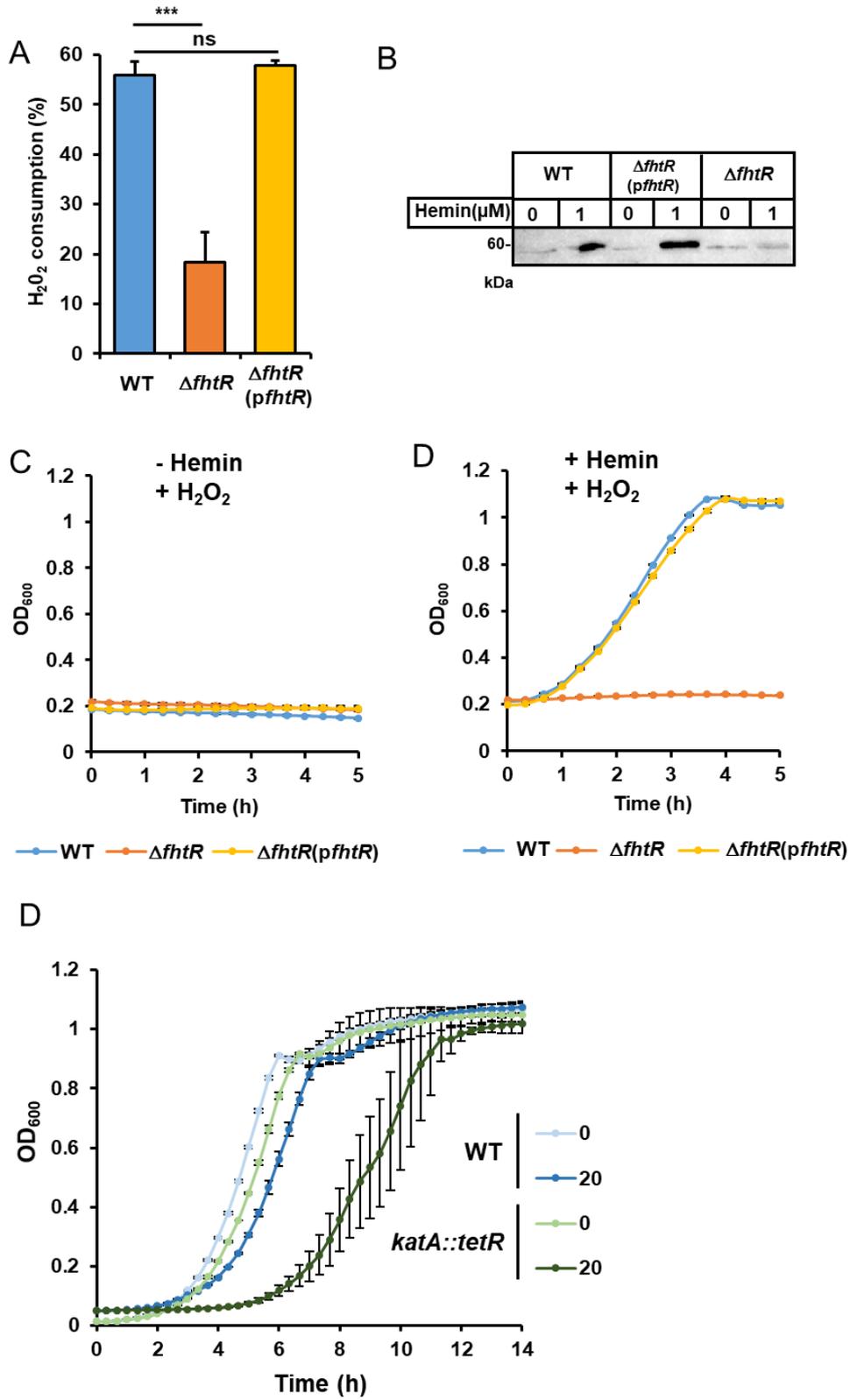


Figure 6

An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

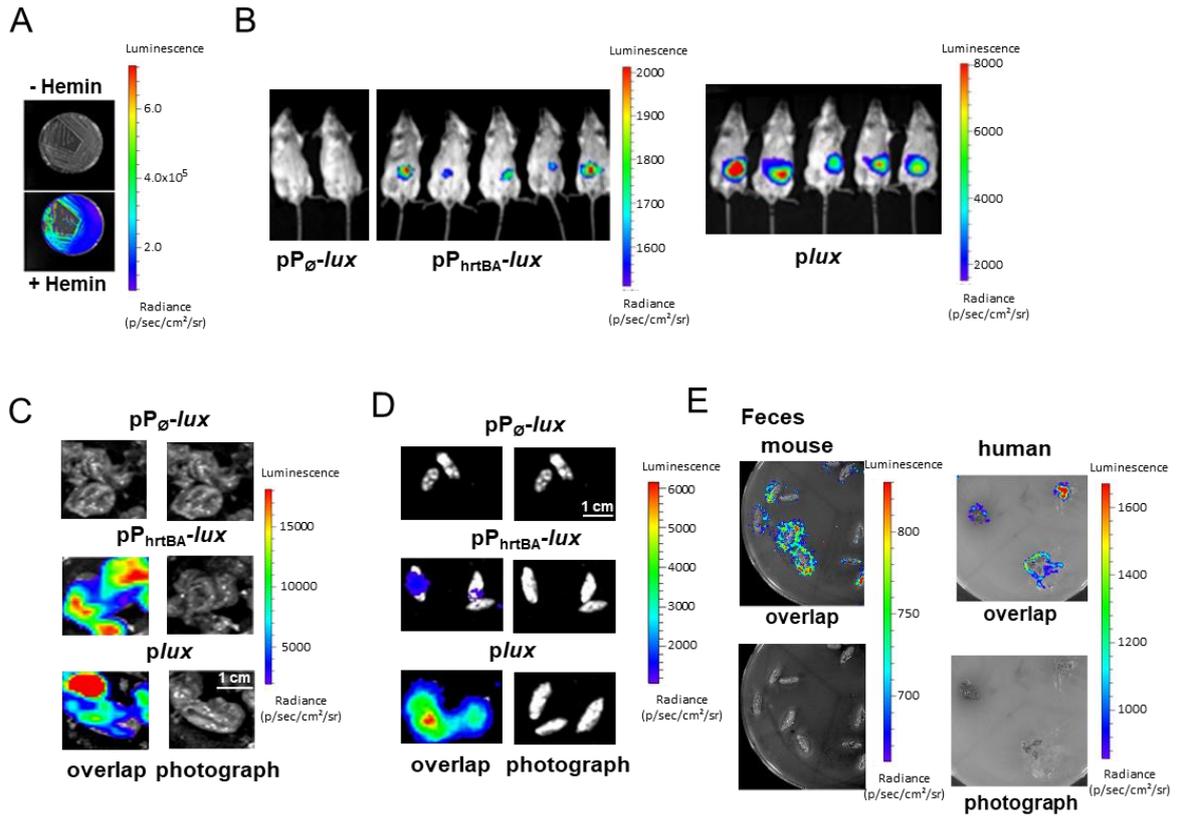


Figure 7

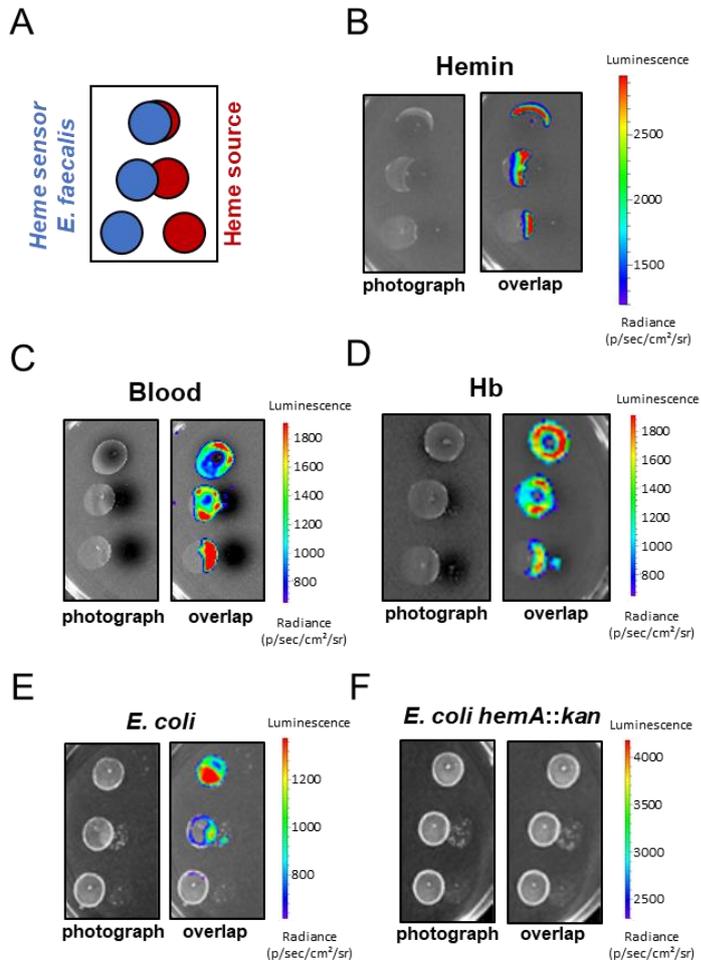


Figure 8

## Supplemental material

### Supplemental materials and methods.

**Plasmid construction.** The plasmids [1-9] were obtained with similar cloning strategy : PCR amplification of the described DNA inserts with oligonucleotides from Table S2, digestion with (*EcoRI*, *BamHI*) and ligation with the (*EcoRI*, *BamHI*) digested plasmid pTCV-*lac* (1) (Table S1). For the following plasmids: [1], pP<sub>hrtBA</sub>-*lac* (pTCV-VS2); [2], pP<sub>fhtR</sub>-*fhtR*, P<sub>hrtBA</sub>-*lac* (pTCV-VS3) and [3], pP<sub>fhtR</sub>-*lac* (pTCV-VS4); fragments containing either P<sub>hrtBA</sub>, P<sub>fhtR</sub>-*fhtR*-P<sub>hrtBA</sub> or P<sub>fhtR</sub> DNA sequences were PCR amplified with the primers pairs (O1-O2), (O2-O3) or (O3-O4) respectively. Plasmid [4], pP<sub>fhtR</sub>-*fhtR*-HA, P<sub>hrtBA</sub>-*lac* (pTCV-VS5) was obtained by PCR amplification of 2 DNA fragments, P<sub>fhtR</sub>-*fhtR* and P<sub>hrtBA</sub> using primer pairs (O3-O5) and (O2-O6), respectively, followed by their fusion by PCR-overlap with the primers (O2-O3) leading to the addition of nt encoding the hemagglutinin influenza epitope (HA, YPYDVPDYA) at the 3' end of *fhtR* (2). The mutation Y132F was introduced into the coding sequence of *fhtR* in the plasmids [5], pP<sub>fhtR</sub>-*fhtR*<sup>Y132F</sup> (pTCV-VS6) and [6], pP<sub>fhtR</sub>-*fhtR*<sup>Y132F</sup>-HA (pTCV-VS7) by a PCR-overlap with (O2-O3) of 2 PCR products obtained with primer pairs (O3-O7) and (O2-O8) using pTCV-VS3 and pTCV-VS5 as templates, respectively. Plasmids [7], pP<sub>hrtBA</sub> P1\*-*lac* (pTCV-VS8); [8], pP<sub>hrtBA</sub> P2\*-*lac* (pTCV-VS9) and [9], pP<sub>hrtBA</sub> P1\*P2\*-*lac* (pTCV-VS10) were obtained by PCR amplification of P<sub>hrtBA</sub> nt sequence with primers pair (O1-O2) using pUC-VS1, pUC-VS2 and pUC-VS3 as templates, respectively (Table S1). The plasmid pP<sub>hrtBA</sub>-*lux* (pTCV-VS11) was constructed as described for pP<sub>hrtBA</sub>-*lac* using the plasmid vector pTCV-J22 (Table S1). Plasmids pMBP-FhtR and pMBP-FhtR<sup>Y132F</sup> (Table S1) were obtained by PCR amplification of FhtR ORF from *E. faecalis* OG1RF genomic DNA and pP<sub>fhtR</sub>-*fhtR*<sup>Y132F</sup> respectively, with the primers pairs (O9-O10) (Table S2). The resulting fragments were digested with *EcoRI* and *PstI* and ligated with the plasmid pMAL-c4X (New England Biolabs) (Table S1). The 3 plasmids pΔ*hrtBA* (pG1-VS1), pΔ*fhtR* (pG1-VS2) and

p $\Delta$ *fhtR* $\Delta$ *hrtBA* (pG1-VS3) were constructed by PCR amplification of 2 fragments of ~ 600-750 pb flanking the genes OG1RF\_RS02770-OG1RF\_RS02775 (*hrtBA*); OG1RF\_RS02765 (*fhtR*) gene and OG1RF\_RS02765-OG1RF\_RS02775 (*fhtR-hrtBA*) with the respective (O11-O12) and (O13-O14); (O15-O16) and (O17-O18); (O15-O19) and (O14-O20) oligonucleotides (Table S1 and S2). Each pair of fragments was fused by PCR overlap as above with the DNA primers pairs (O11-O13); (O15-O18) and (O14-O15), respectively (Table S2). The resulting fragments were digested with *Bam*HI and *Hind*III and ligated into the thermosensitive pG1 (pG1-VS2, Table S1). All plasmids were verified by DNA sequencing.

***E. faecalis*  $\Delta$ *hrtBA*,  $\Delta$ *fhtR* and  $\Delta$ *fhtR* $\Delta$ *hrtBA* mutants.** The plasmids p $\Delta$ *hrtBA* (pG1-VS1), p $\Delta$ *fhtR* (pG1-VS2) and p $\Delta$ *fhtR* $\Delta$ *hrtBA* (pG1-VS3) (Table S1) were transformed by electroporation in *E. faecalis* OG1RF strain. The double cross-over events leading to  $\Delta$ *hrtBA*,  $\Delta$ *fhtR* and mutants and  $\Delta$ *fhtR* $\Delta$ *hrtBA* double mutant were obtained as described (3). Correct inactivation of the targeted genes was confirmed by sequencing.

**Titration of MBP-FhtR with hemin.** ApoFhtR/hemin stoichiometry : hemin binding affinities of MBP-FhtR were determined by adding 0.5 to 1  $\mu$ l increments of a 200  $\mu$ M hemin solution to cuvettes containing 100  $\mu$ l test samples of 20  $\mu$ M MBP-FhtR in 20 mM Hepes pH 7.5, 300 mM NaCl, or reference sample without protein. Spectra were measured from 350 nm to 700 nm in a UV-visible spectrophotometer Libra S22 (Biochrom). OD<sub>407</sub> was plotted against hemin concentration and data were fitted to a one-binding site model (with a calculated extinction coefficient of bound hemin of  $\epsilon_{407} = 70 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) as described (9). Hemin binding affinity: tryptophan fluorescence quenching (emission from 300 nm to 400 nm; 280 nm excitation) was determined as a function of hemin concentration, using a Carry Eclipsefluorimeter. Curves Absorbance and fluorescence curves fitting were fitted to the one-binding site model with the following equation :

$$\text{OD}_{407\text{nm}} = a_0 + \Delta A \times [PL] = a_0 + \Delta A \times 0.5(K_d + [P_0] + [L_0] - \sqrt{(K_d + [P_0] + [L_0])^2 - 4[P_0][L_0]})$$

### An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

$$F = a_0 - \Delta F \times [PL] = a_0 - \Delta F \times 0.5(K_d + [P_0] + [L_0] - \sqrt{(K_d + [P_0] + [L_0])^2 - 4[P_0][L_0]})$$

Here, OD<sub>407nm</sub> and F are respectively the absorbance and fluorescence amplitudes.  $\Delta A$  and  $\Delta F$  are the normalized amplitude of the saturated absorbance and quenching, respectively, [PL] is the concentration of liganded protein, [P<sub>0</sub>] and [L<sub>0</sub>] are the concentrations of the total protein and ligand, respectively and  $a_0$  is the starting absorbance/fluorescence. Fitting of this equation was done with the non-linear regression function of GraphPad Prism 4 software.

**EPR spectroscopy.** X-band cw-EPR spectra were recorded with a Bruker Elexsys 500 X-band spectrometer equipped with a standard ER 4102 (Bruker) X-band resonator, a Bruker teslameter, an Oxford Instruments cryostat (ESR 900) and an Oxford ITC504 temperature controller. The spectra shown were recorded at 15 K with a modulation frequency equal to 100 kHz, a modulation amplitude equal to 25 gauss, a microwave power equal to 5 mW and a microwave frequency equal to 9.49 GHz.

***In vivo* imaging.** Light emission from whole animals was measured in an *in vivo* imaging system (IVIS 200, Caliper Life Sciences, USA) equipped with the Living image software (version 4.0, Caliper Life Science, USA) as reported previously (4). Mice were anesthetized during imaging via inhalation of isoflurane. IVIS 200 was also used to evaluate luminescence on agar plates or from isolated organs (see above). Bioluminescence images were acquired with a 25 cm field of view (FOV), medium or large binning factor and an exposure time as indicated. A digital false-color photon emission image was generated according to photon counts within a constant region of interest (ROI) corresponding to the surface of the entire mouse. Rainbow images show the relative level of luminescence ranging from low (blue), to medium (green), to high (yellow/red). Photon emission was measured in radiance (p.s<sup>-1</sup>.cm<sup>-2</sup>.sr<sup>-1</sup>). Threshold parameters were chosen to maintain the luminescence detection under saturation level and were kept identical within an experiment. Images were adjusted for

brightness and contrast using PhotoShop CS3 (Adobe Systems, San Jose, CA) with parameters kept identical in all images of the same figure.

## Supplemental References

1. Poyart C, Trieu-Cuot P. 1997. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to B-galactosidase in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 156: 193-8.
2. Lechardeur D, Fernandez A, Robert B, Gaudu P, Trieu-Cuot P, Lamberet G, Gruss A. 2010. The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase c binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae*. *J Biol Chem* 285:16032-41.
3. Maguin E, Prevost H, Ehrlich SD, Gruss A. 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 178:931-5.
4. Joubert L, Dagieu JB, Fernandez A, Derre-Bobillot A, Borezee-Durant E, Fleurot I, Gruss A, Lechardeur D. 2017. Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*. *Sci Rep* 7:40435.
5. Letoffe S, Delepelaire P, Wandersman C. 2006. The housekeeping dipeptide permease is the *Escherichia coli* heme transporter and functions with two optional peptide binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:12891-6.
6. Dunny GM, Brown BL, Clewell DB. 1978. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:3479-83.
7. Baureder M, Hederstedt L. 2012. Genes important for catalase activity in *Enterococcus faecalis*. *PLoS One* 7:e36725.
8. Mistou MY, Dramsi S, Brega S, Poyart C, Trieu-Cuot P. 2009. Molecular dissection of the secA2 locus of group B Streptococcus reveals that glycosylation of the Srr1 LPXTG protein is required for full virulence. *J Bacteriol* 191:4195-206.

9. Lechardeur D, Cesselin B, Liebl U, Vos MH, Fernandez A, Brun C, Gruss A, Gaudu P. 2012. Discovery of an intracellular heme-binding protein, HrtR, that controls heme-efflux by the conserved HrtB HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem* 287:4752-8.

**Supplemental Tables**

**Table S1.** Strains and plasmids used in this study.

<i>Strain/plasmid</i>	<i>Characteristics</i>	<i>Source/ reference</i>
<b>Strain</b>		
<b><i>E. coli</i></b>		
NEB 10	$\Delta(\text{ara-leu})$ 7697 <i>araD139 fhuA</i> $\Delta\text{lacX74 galK16 galE15 e14-}\phi$ 80 $\Delta\text{lacZ}\Delta\text{M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1}$ $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$	New England Biolabs
C600 <i>hemA::kan</i>	<i>hemA::kan</i> , derivative of C600, Kan <sup>R</sup> .	(5)
<b><i>E. faecalis</i></b>		
OG1RF	Strain OG1RF rifampicin and fusidic acid resistant derivative of OG1, a human isolate.	(6)
OG1RFVS1	OG1RF $\Delta\text{hrtBA}_{E_f}$ , deletion of <i>hrtB</i> and <i>hrtA</i> genes.	This study
OG1RFVS2	OG1RF $\Delta\text{fhtR}$ , deletion of <i>fhtR</i> gene.	This study
OG1RFVS3	OG1RF $\Delta\text{fhtRhrtBA}_{E_f}$ , deletion of <i>fhtR</i> , <i>hrtB</i> and <i>hrtA</i> genes.	This study
EMB1	<i>katA::ISS1</i> derivative of OG1RF, Tet <sup>R</sup> .	(7)
<b>Plasmid</b>		
pTCV- <i>lac</i>	Conjugative <i>E. coli</i> Gram-positive bacteria shuttle plasmid carrying the promoterless <i>E. coli lacZ</i> gene for constructing transcriptional fusions. Ery <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup> .	(1)
pMAL-c4X	Cloning vector for expression of MBP tagged proteins in <i>E. coli</i> . Amp <sup>R</sup> .	New England Biolabs
pG1	Temperature sensitive cloning vector, Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup> .	(8)

PG1-VS1	p $\Delta hrtBA_{Ef}$ , $hrtBA_{Ef}$ fragment cloned into pG1 to obtain the $\Delta hrtBA_{Ef}$ mutant.	This study
pG1-VS2	p $\Delta fhtR$ , $fhtR$ fragment cloned into pG1 to obtain $\Delta fhtR$ mutant.	This study
pG1-VS3	p $\Delta fhtRhrtBA_{Ef}$ , $fhtRhrtBA_{Ef}$ fragment cloned into pG1 to obtain the $\Delta fhtRhrtBA_{Ef}$ mutant.	This study
pMBP-FhtR	Expression of N-terminal MBP-tagged <i>E. faecalis</i> FhtR. Cloned into pMAL-c4X.	This study
pMBP-FhtR <sup>Y132F</sup>	Expression of N-terminal MBP-tagged <i>E. faecalis</i> FhtR <sup>Y132F</sup> . Cloned into pMAL-c4X.	This study
pTCV-VS1	p $P_{hrt-hrtR-lac}$ , DNA fragment containing the promoter region and $hrtR$ cloned in pTCV- <i>lac</i> . Ery <sup>R</sup> .	(9)
pTCV-VS2	p $P_{hrtBA-lac}$ , <i>E. faecalis</i> OG1RF $hrtBA_{Ef}$ promoter region cloned into pTCV- <i>lac</i> . Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	This study
pTCV-VS3	p $fhtR$ : p $P_{fhtR-fhtR}$ , $P_{hrtBA-lac}$ , <i>E. faecalis</i> OG1RF $fhtR$ promoter and gene region and $hrtBA_{Ef}$ promoter region cloned into pTCV- <i>lac</i> . Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	This study
pTCV-VS4	p $P_{fhtR-lac}$ , <i>E. faecalis</i> OG1RF $fhtR$ promoter region cloned into pTCV- <i>lac</i> . Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	This study
pTCV-VS5	p $fhtR$ -HA: p $P_{fhtR-fhtR}$ -HA, $P_{hrtBA-lac}$ , <i>E. faecalis</i> OG1RF $fhtR$ promoter, Ct HA-tagged $fhtR$ gene region and $hrtBA_{Ef}$ promoter region cloned into pTCV- <i>lac</i> . Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	This study
pTCV-VS6	p $fhtR^{Y132F}$ : p $P_{fhtR-fhtR^{Y132F}}$ , $P_{hrtBA-lac}$ , <i>E. faecalis</i> OG1RF $fhtR$ promoter, $fhtR^{Y132F}$ gene region and $hrtBA$ promoter region cloned into pTCV- <i>lac</i> . Ery <sup>R</sup> Kan <sup>R</sup> .	This study
pTCV-VS7	p $fhtR^{Y132F}$ -HA : p $P_{fhtR-fhtR^{Y132F}}$ -HA , $P_{hrtBA-lac}$ , <i>E. faecalis</i> OG1RF $fhtR$ promoter, Ct HA-tagged $fhtR^{Y132F}$ region and $hrtBA_{Ef}$ promoter region cloned into pTCV- <i>lac</i> . Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	This study
pTCV-VS8	p $P_{hrtBA P1^*-lac}$ , <i>E. faecalis</i> OG1RF $hrtBA_{Ef}$ promoter with 14-nt palindromic sequence P1, TTATCAATCGATAA replaced by ACTTGTATACATAA cloned into pTCV- <i>lac</i> . Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	This study

An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

pTCV-VS9	pP <sub>hrtBA P2*</sub> - <i>lac</i> , <i>E. faecalis</i> OG1RF <i>hrtBA</i> <sub>Ef</sub> promoter with 14-nt palindromic sequence P2, TTATCGATTGATAA replaced by ATATCTTGTATAAG cloned into pTCV- <i>lac</i> . Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	This study
pTCV-VS10	pP <sub>hrtBA P1*</sub> , P2*- <i>lac</i> , <i>E. faecalis</i> OG1RF <i>hrtBA</i> <sub>Ef</sub> promoter which P1 and P2 palindromic sequence have been replaced cloned into pTCV- <i>lac</i> . Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	This study
pTCV-J22	pP <sub>∅</sub> - <i>lux</i> , <i>luxABCDE</i> reporter genes. Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	(4)
pTCV-VS11	pP <sub>hrtBA-lux</sub> , <i>E. faecalis</i> OG1RF <i>hrtBA</i> <sub>Ef</sub> promoter region cloned into pTCV-J22. Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	This study
pTCV-J24	<i>lux</i> , P <sub>23</sub> promoter cloned in pTCV-J22. Ery <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> .	(4)
pUC-VS1	A 325-bp DNA fragment containing pP <sub>hrtBA P1*</sub> cloned in pUC57. Amp <sup>R</sup> .	Proteogenix
pUC-VS2	A 325-bp DNA fragment containing pP <sub>hrtBA P2*</sub> cloned in pUC57. Amp <sup>R</sup> .	Proteogenix
pUC-VS3	A 325-bp DNA fragment containing pP <sub>hrtBA P1*, P2*</sub> in pUC57. Amp <sup>R</sup> .	Proteogenix

**Table S2.** Oligonucleotides used in this study.

Primer	Sequence 5'→3'	Target
<b>O1</b>	CCGGAATTC <u>CCCAGCG</u> AAAAACAGTGGATGACGAT	P <sub>hrtBA</sub>
<b>O2</b>	ATTAATGGATCCGAATGGTTCACCTCTTTCTTC	P <sub>hrtBA</sub>
<b>O3</b>	TAATAAGAATTC <u>TTTTTATATGGACTGCAGTGG</u>	P <sub>fhtR</sub>
<b>O4</b>	TTATTAGGATCCGGT <u>TTTTCTCGCCCCCTGC</u>	P <sub>fhtR</sub>
<b>O5</b>	ACAGGGCTTCTCTATTTTTTAAGCATAATCTGGAACATCATATGGATACA	<i>fhtR-HA</i> *
<b>O6</b>	GCGTTTTGAAAAGTCACAAAATGTATCCATATGATGTTCCAGATTATGCT	<i>fhtR-HA</i> *
<b>O7</b>	CGCAATATTATTGATGAAGGTTTTTTTGAAAAT	<i>Y132F</i>
<b>O8</b>	ATTTTCAAAAAAACCTTCATCAATAATATTGCG	<i>Y132F</i>
<b>O9</b>	TAATAAGAATTCATGGAAAAGCCAAATAAACG	<i>MBP-fhtR</i>
<b>O10</b>	CGGGGTACCGCTGATTTAGAACGTACACGGC	<i>MBP-fhtR</i>

<b>O11</b>	GATCATGTTCTCTTTTATTTGTTTTGCATGAATGGTTCACCTCTTTCTTCT	<i>hrtBA<sub>Ef</sub></i> mutant
<b>O12</b>	AGAAGAAAGAGGTGAACCATTCATGCAAAACAAATAAAAGAGAACATGATC	<i>hrtBA<sub>Ef</sub></i> mutant
<b>O13</b>	AAA <u>ACTGCAGG</u> CGATTGATACGGAAATGAAACGCC	<i>hrtBA<sub>Ef</sub></i> mutant
<b>O14</b>	TAATTA <u>AAGCTT</u> ACGAAGCAATTAAGGGGCGC	<i>hrtBA<sub>Ef</sub></i> mutant
<b>O15</b>	CAACAGGGCTTCTCTATTTTGGTTTTCTCGCCCCCTGCTG	<i>fhtR</i> mutant
<b>O16</b>	CAGCAGGGGGCGAGAAAACCAAATAGAGAAGCCCTGTTG	<i>fhtR</i> mutant
<b>O17</b>	ATGCGGAT <u>CCCC</u> CTGCAGTTAATTTGTCGCC	<i>fhtR</i> mutant
<b>O18</b>	CTTTTATTTGTTTTGGGTTTTCTCGCCCC	<i>fhtR</i> mutant
<b>O19</b>	GGGGGCGAGAAAACCCAAAACAAATAAAAGAGAACATGATCGG	<i>fhtRhrtB<sub>Ef</sub></i> mutant
<b>O20</b>	CCAGCGAAAAACAGTGGATGACGAT	<i>fhtRhrtB<sub>Ef</sub></i> mutant
<b>O21</b>	CGCTAACCTGACAAAATAAAAATTAACC	PF <sub>hrtBA</sub>
<b>O22</b>	GGCCAATAGTAATTTAAATGTATCAGTGTT	PF <sub>hrtBA</sub>
<b>O23</b>	ACTTTTAGAAATAAAGCCGACAATT	CF <sub>hrtB</sub>
<b>O24</b>		CF <sub>hrtB</sub>

The restriction sites included in oligonucleotides are underlined. \* HA sequence corresponds to the peptide MYPYDVPDYA.

## Supplemental Figure Legends

**Figure S1.** HrtBA<sub>Ef</sub>, a *S. aureus* HrtBA-like efflux transporter. **(A, B)** Alignment of OG1RF\_RS02770 and OG1RF\_RS02775 with HrtB (A) and HrtA (B) from *Staphylococcus aureus* respectively. AA sequences were aligned using Clustal W. Identical amino acids “\*”; conserved amino acids “.”; partially conserved amino acids “.”. **(C)** Growth of WT OG1RF in the absence or the presence of the indicated concentrations of hemin. Overnight culture of WT strain were diluted to OD<sub>600</sub> = 0.01 and grown with the indicated concentrations of hemin (μM) for 15 h at 37°C in a microplate Spark spectrophotometer (Tecan). OD<sub>600</sub> was measured every 20 min. Results represent the average ± S.D. from triplicate technical samples. Result is representative of 3 independent experiments.

**Figure S2. Planktonic growth of WT, ΔfhtR, ΔfhtR(pfhtR) in the presence or absence of hemin.** Overnight cultures of WT, ΔfhtR, ΔfhtR(pfhtR) strains were diluted to OD<sub>600</sub> = 0.01 and grown with or without 200 μM hemin for 15 h at 37°C in a microplate Spark spectrophotometer (Tecan). OD<sub>600</sub> was measured every 20 min. Results represent the average ± S.D. from triplicate technical samples. Result is representative of 3 independent experiments.

**Figure S3. Hemin binding to FhtR implicates the tyrosine Y132.** **(A) *E. faecalis* OG1RF FhtR AAs sequence.** Predicted Nt DNA binding region of the TetR family OG1RF\_RS02765 ORF is shown in orange. Tyrosines are in blue and Y132 is in bold. **(B)** FhtR<sup>Y132F</sup> is expressed similarly to WT FhtR. The ΔfhtR mutant was complemented either with pfhtR-HA or pfhtR<sup>Y132F</sup>-HA plasmids. FhtR and FhtR<sup>Y132F</sup> expression were followed by WB with a rabbit anti-HA antibody. Bacteria were grown to OD<sub>600</sub> = 0.5 and incubated with 2.5 μM hemin for 1.5 h. SDS-PAGE was performed on cell lysates (35 μg protein) per lane. Results are representative of 3 independent experiments.

**Figure S4. MBP-FhtR interaction with  $P_{\text{HrtBA}}$  is specific.** 0.25 pmoles of the *hrtBA*<sub>Ef</sub> promoter fragment ( $FP_{\text{HrtBA}}$ ) or a similar size nt sequence in the coding region of *hrtB*<sub>Ef</sub> ( $CF_{\text{HrtB}}$ ) were incubated with 2.5 pmoles of MBP-FhtR. EMSA was performed as in Fig. 4 and DNA shift was visualized with GelRed (Biotium) following PAGE. C2 indicate the shifted DNA-protein complex and NC, the non-complexed DNA. Result is representative of 3 independent experiments.

**Figure S5. Control experiments for the study of KatA and FhtR interplay.** (A) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> background consumption in WT,  $\Delta\text{fhtR}$  and  $\Delta\text{fhtR}(\text{pfhtR})$  grown in absence of hemin. Catalase activity was determined on equivalent number of bacteria from ON cultures incubated with 100  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min with the spectrophotometric FOX1 method based on ferrous oxidation in xylenol orange as in Fig. 6. Results expressed as the % of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration metabolized in respective strains and are the average  $\pm$  S.D. of technical triplicates. ns, nonsignificant, one-way ANOVA followed by Dunnett's posttest comparison to WT. Result is representative of 3 independent experiments. (B) Growth curves of WT,  $\Delta\text{fhtR}$  and  $\Delta\text{fhtR}(\text{pfhtR})$ . Overnight cultures were diluted to OD<sub>600</sub> = 0.01 in M17G and grown to OD<sub>600</sub> = 0.5. Cultures were distributed in a 96 well plate and incubated at 37 °C in a microplate Spark spectrophotometer (Tecan). OD<sub>600</sub> was measured every 20 min. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. Result is representative of 3 independent experiments. (C) In absence of HrtBA<sub>Ef</sub> expression, FhtR has no impact on KatA.  $\Delta\text{hrtBA}_{\text{Ef}}$  and  $\Delta\text{fhtR}\Delta\text{hrtBA}_{\text{Ef}}$  strains were grown as in (B) with 1  $\mu\text{M}$  hemin added at OD<sub>600</sub> = 0.01. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. Result is representative of 3 independent experiments.

**Figure S6. Time course of *Enterococcus faecalis* OGIRF survival in the GIT of mice following ingestion.** Female BALB/c mice were force-fed with 10<sup>8</sup> CFU of WT(pP<sub>Ø</sub>-lux) (control strain) or WT(plux)(tracking strain). At the indicated times post-inoculation, mice were

anesthetized with isoflurane and imaged in the IVIS 200 system (acquisition time, 20 min; binning 16). Results are representative of 3 independent experiments.

**Figure S7. Human and mice fecal waters activate heme sensing.** Human feces from 3 healthy human laboratory volunteers (A) and mice feces from 6 months old female BALB/c mice (B) were resuspended in PBS (25 µg/ml) and debris were removed by centrifugation at 5,000g at 4°C for 30 min. Supernatants were sterile filtrated to remove bacteria from the extracts. Fecal water and WT OG1RF (pP<sub>hrtBA</sub>-*lux*) bacteria were plated as described in Fig. 8. Plates were imaged in the IVIS 200 system (acquisition time, 10 min; binning 8). Figure shows representative results corresponding to a total of 3 independent experiments.

**Figure S8. FhtR conservation in Gram positive bacteria.** (A) FhtR orthologs in Gram positive bacteria. Blast analysis of FhtR shows that the protein is conserved in carnobacteri, enterococci and vagococci. FhtR AA sequences alignment from the following strains: *Carnobacterium divergens* (CDIV41), *Carnobacteriumc maltaromaticum* (DSM 20342 NODE\_78), *Vagococcus lutrae* (CCUG39187), *Vagococcus entomophilus* (DSM 24756,1), *Enterococcus faecalis* (OG1RF), *Vagococcus salmoninarum* (NCFB 2777), *Enterococcus hirae* (ATCC9790), *Enterococcus faecium* (ATCC 8459), *Enterococcus avium* (ATCC14025)) were aligned using Clustal W. Identical amino acids “\*”; conserved amino acids “.”; partially conserved amino acids “.”. (B) Phylogenetic analysis of FhtR amino-acid sequences. Predicted FhtR as in (A) were aligned using Clustal W, and evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method. The tree is drawn to scale, with bootstrap values (×1,000) shown above the nodes.

A

```

HrtB      MKLAIKEIMFYKFRYILITLIILLSIMVLFISGLAQGLGRENISLFEHFDNDEYVVQKM
OG1RF_RS02770 MFLGFNEMKYSKGRYVLVVLVLIWLI FILSGLANGLAQGNRLAVDQWQANQVVLKSKE
* * . : : : : * * * : * . : : : : : : : : : : : : : : : * * . : : : : : * : *
HrtB      KEPQIEKSQSDTQQNQIK--KVIHQEPYKMMIQTLKLSNKEQDVITMNDVKQQRILQLKK
OG1RF_RS02770 ANSNLNVSVLDENVKETISGGKIAPIGQQSLAIRPADDKKAELTNVSLFGIEKESFLMPK
: : : : * * . . : : * . * : : * . . . . : * : : : : : : : *
HrtB      ---GDYPKNAHEVAINDKLAADNIRVGDRLHFKNNSTSYRVSGILNDTMYAHSIVLLND
OG1RF_RS02770 VIEGNAFTDKNQVIASETLKNQGFKIGDKLTAGKYDEQLEIVGFISKSSYNIVPVIYTSL
* : : : * * . * : : : * * . : : : * * . : . . : * : : : * * . : : : .
HrtB      NGFNALNKVNTAFYP--VKNLTQQQRD--ELNKIN-DVQVVSEKDLTGNIASYQAEQAPL
OG1RF_RS02770 DTWRSIKYGDNPAMAKMVNGFIVRSKDNAEVKTTNKDSQVLSISDFIEKLPGYSAQNLTIL
: : : : : : . . * : : . . * * : : * * * * * * * : : . . * : : . *
HrtB      NMMIVSLFAITAVLSAFFYVMTIQKISQIGILKAIGIKTRHLLSALVLQILTLTIIGVG
OG1RF_RS02770 DGMIFFLIVIAAFIIGIFIFVMTLQKTAMFGVLKVGVPVTSFLAKAVMLQTALLAVLGVA
: * * * : * : * : : : . * : * * * : * : * * . * : * . * : * * * : * : * * .
HrtB      IAVIIIVGLSFMMPVTMPFYLTQNILLMVGIFILVAILGASLSFIKLFKVPDIEAIGGA
OG1RF_RS02770 IGLALTGITVLFLEPEAMPYATNGPRMILFSVLLILSALIGGAFSIRTIAKIDPLIAIGG-
* . : : * : : * * * : . . : : * : * * * * : : : * * * : * * * * * *
HrtB      E
OG1RF_RS02770 -
    
```

B

```

HrtA      --MALVVKDIVKNFGEGLSETKVLKGINFEVEQGEFVILNGASGSKTLLTILGGLLSQ
OG1RF_RS02775 MANVLEMKNYKKGKHEVIALKELSFVAVQPGFVAVIGPSGSGKSTFLTIAAGLQAP
* * : * * * : * * * : * . . * : * * : * * * : * . * * * * : * * * * * : * * :
HrtA      TSGTVLYNDAPL--FDKQHRPSDLRLEDIGFIFQSSHLVPLYKLVIEQLTLVVGQEAGMTKQ
OG1RF_RS02775 TSGEVIVGGQSLNKLTKKQRLAQ-RFQKIGFILQSSNLVPPFLTVEDQFHLI-EKVDKSRK
* * * * : . . * : * : * : : * : . * * * * : * * * * * : * * : * : : . . :
HrtA      QSSTRAIQLLKNIGLEDRLNVYPHQLSGGKQRVAIMRAFMMNPKIILADEPTASLDADR
OG1RF_RS02775 NSELKE-QLLETGLKELRNSYPRDLSGGERQRVAIACALYHEPDVILADEPTASLDTEK
: . . * * * : * * : * * * : * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
HrtA      ATKVVMIRQQIKEQQMIGIMITHDRRLFYADRVIELEDGKITD
OG1RF_RS02775 AFDVVQLLAKEAKEKDKGIIMVTHDERLLKYCDRVVIRIDGELTE
* . * * : : : * * : * * * * * * : * * * * * : * * * * : * * * * :
    
```

C

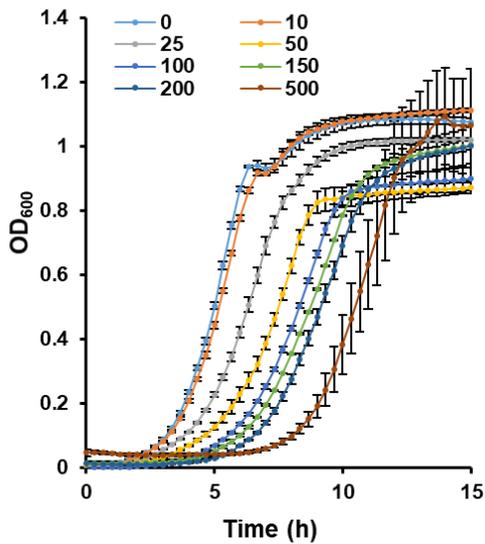


Figure S1

An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

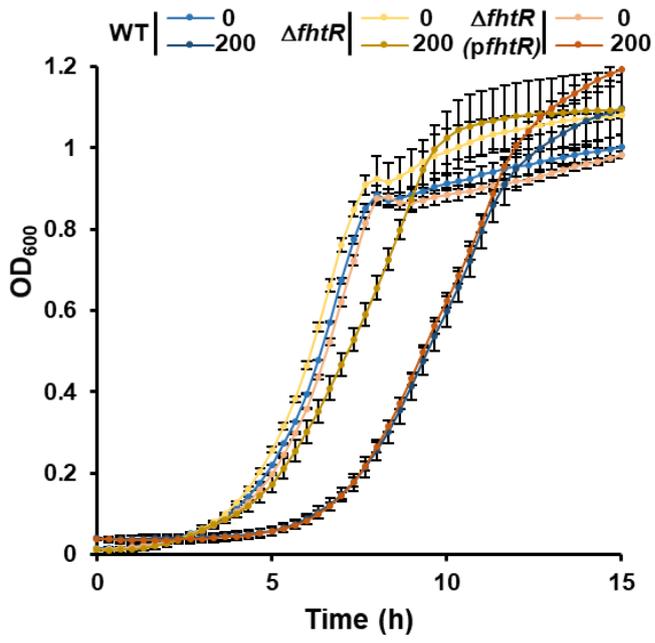


Figure S2

A

1 mekpnkrkad lertrqiils vaselfmtkg fkntstreia lkanitqpnl yhhfknkkel  
 61 ylavieelts rvqeelpiv sgnasveekl yqlikvlde hptnlflmln dmfgemgpd  
 121 nrtlyqifkk tyinniaaif esepetnclq egisvddttr filynvsall siektyqrkt  
 181 vdddvkkfiq fmlhgvksh k

B

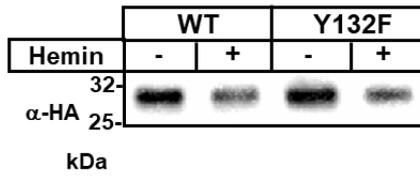


Figure S3

An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

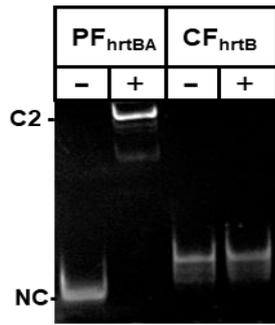


Figure S4

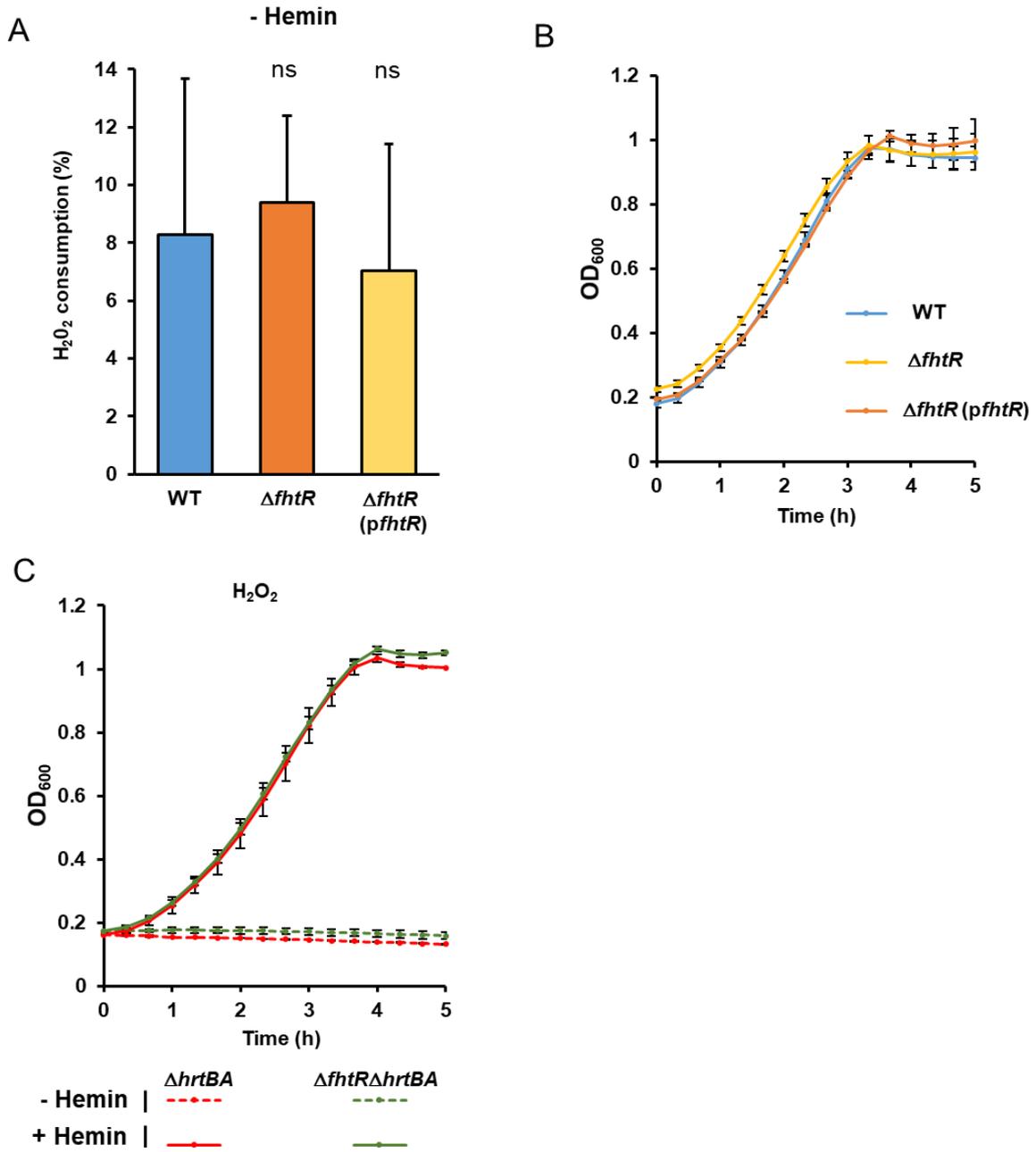


Figure S5

An intracellular heme sensor in *E. faecalis*

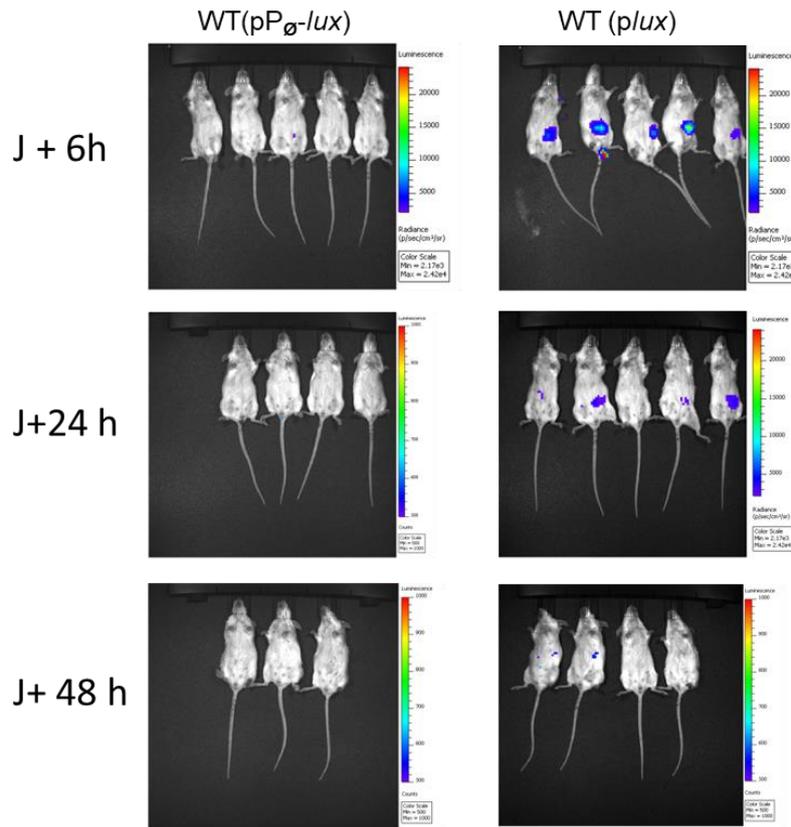


Figure S6

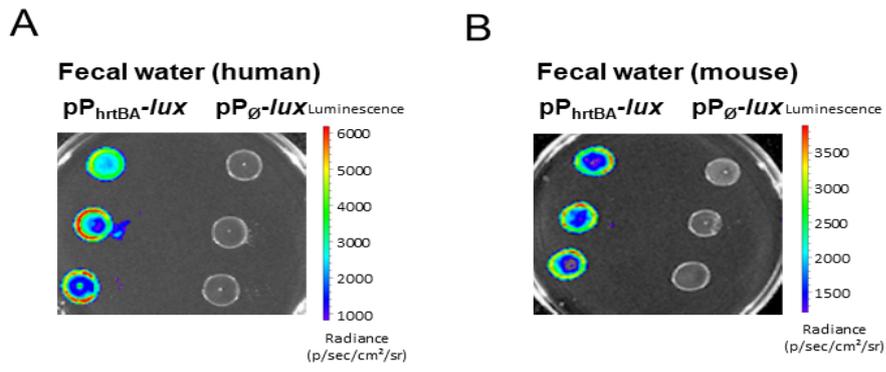


Figure S7

Projet 1

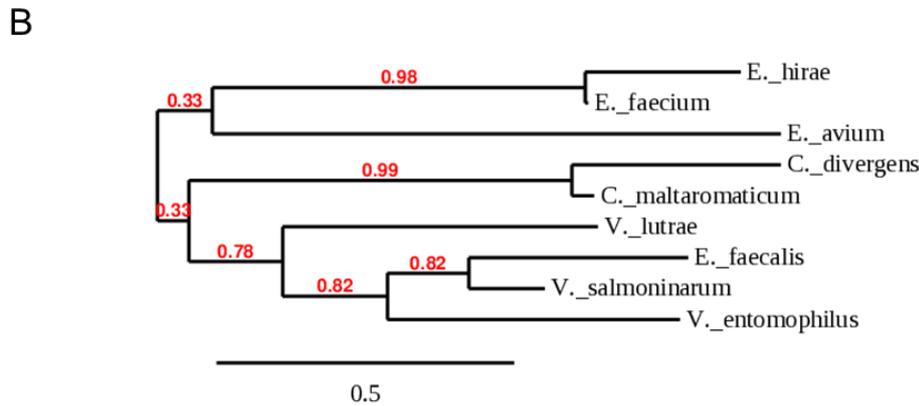
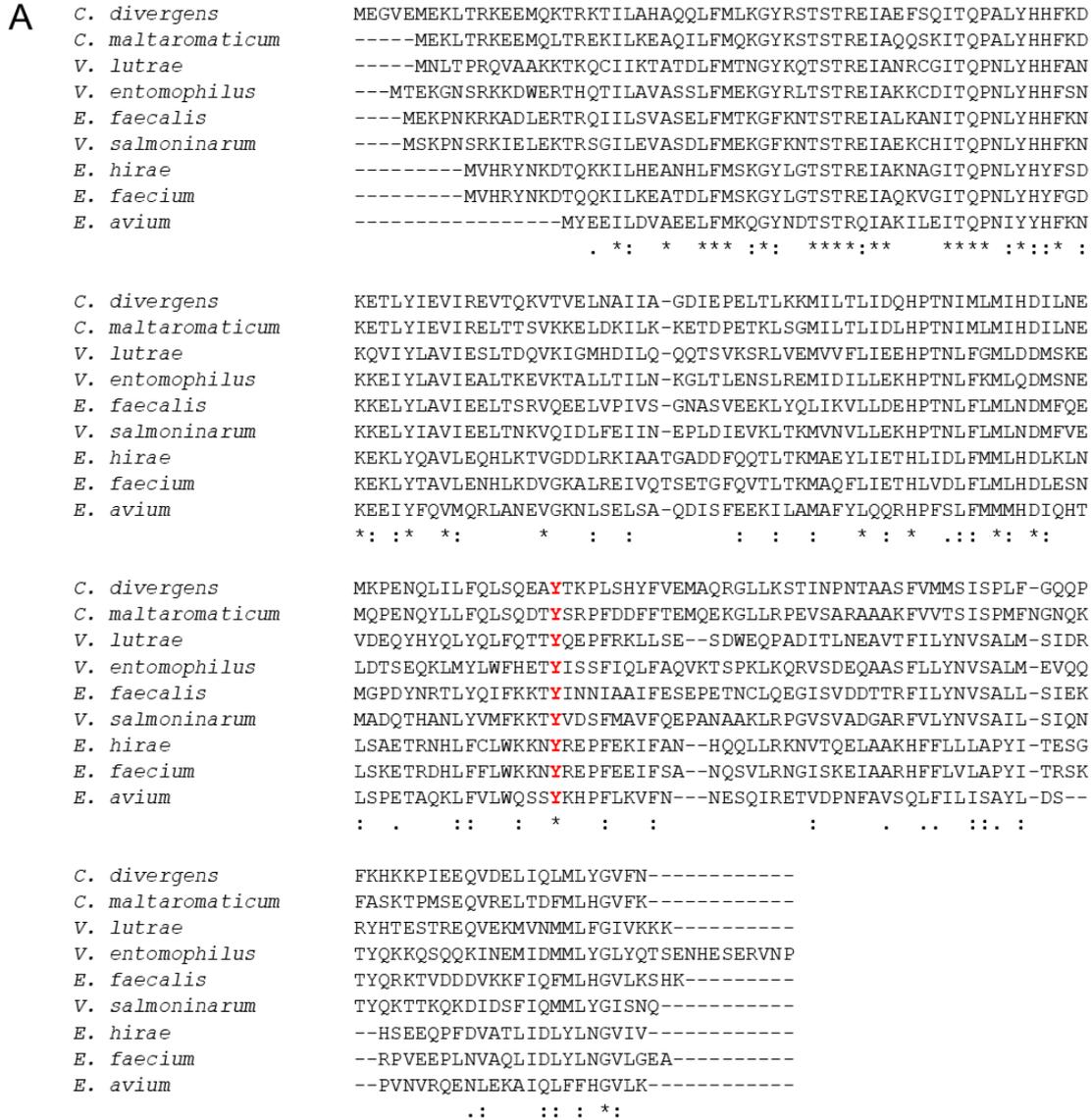


Figure S8

### A.2.3. Principales conclusions

#### A.2.3.1. Identification et caractérisation de la régulation du transporteur d'efflux HrtBA<sub>EF</sub> chez *E. faecalis*

Deux gènes (OG1RF\_RS02770 et OG1RF\_RS02775) ont été identifiés comme des homologues de *hrtBA* chez *E. faecalis*. Nous avons montré que ce transporteur d'efflux nommé HrtBA<sub>EF</sub> permet de limiter la toxicité de l'hème en modulant sa concentration intracellulaire comme chez *S. agalactiae* ou *L. lactis* (Joubert et al., 2014, 2017). L'expression de cet opéron est induite par des concentrations d'hème subtoxiques mais aucun système de régulation connu pour la contrôle de l'expression de HrtBA (2-CS HssRS chez *S. aureus* et un 1-CS HrtR chez *L. lactis*) n'a été identifié chez *E. faecalis*.

Suite à cette observation, nous avons remarqué qu'un gène (OG1RF\_RS02765) monocistronique codant pour un régulateur de la famille TetR inconnu et qui ne partage pas de similitude significative avec HrtR et est voisin de l'opéron *hrtBA*<sub>EF</sub>. Nous avons démontré que ce gène nommé *fhtR*, exprimé constitutivement, code pour un unique senseur d'hème qui régule l'expression de HrtBA<sub>EF</sub>.

Au cours de cette étude, nous avons démontré que FhtR est une protéine capable de fixer l'hème avec une liaison pentacoordonnée impliquant une tyrosine. La tyrosine Y132 semble avoir un rôle crucial dans la détection de l'hème par FhtR mais nos données ne permettent pas d'affirmer qu'elle joue un rôle dans la coordination de l'hème. Les liaisons pentacoordonnées sont présentes principalement parmi des protéines jouant un rôle de récepteur capables de lier l'hème de façon transitoire comme IsdA, IsdC ou IsdH ou des senseurs de gaz comme CoxA, FixL ou DosS (hypothèse testée voir **A.3.2.**) (Brewitz et al., 2017; Girvan and Munro, 2013).

Nous avons aussi démontré que FhtR régule directement l'expression de *hrtBA* en se fixant sur deux séquences palindromiques de 14 nt présentes dans le promoteur de *hrtBA*. Cette fixation sur le promoteur réprime la transcription du transporteur HrtBA<sub>EF</sub>. Lorsque l'hème se lie à FhtR, le complexe hème/FhtR perd son affinité pour le promoteur ce qui permet la transcription de l'opéron *hrtBA*<sub>EF</sub>.

## Projet 1

Si l'expression de HrtBA, pour limiter la toxicité de l'hème, est une stratégie conservée chez de nombreuses bactéries Gram positif, ce résultat est le premier exemple d'une régulation par un 1-CS chez un pathogène. De plus, contrairement à *hrtR* appartenant au même opéron que *hrtBA* et qui par conséquent s'autorégule, FhtR est exprimé de façon constitutive. Toutes ces données montrent que même si la stratégie de l'efflux semble commune, l'évolution a sélectionné des mécanismes différents selon les bactéries. Ces différences pourraient être les résultantes de la diversité des métabolismes de l'hème (auxotrophie obligatoire, facultative, partielle...) et des différentes niches des bactéries afin de maintenir une concentration intracellulaire en hème subtoxique adaptée aux besoins de chaque bactérie.

#### A.2.3.2. FhtR contrôle la disponibilité de l'hème intracellulaire dans le tractus intestinal

Grâce à l'étude de l'activité de la catalase dépendante de l'hème KatA, nous avons pu observer un rôle de FhtR dans la disponibilité intracellulaire de l'hème. Ce résultat démontre que FhtR permet une diminution du stress de l'hème dans *E. faecalis* directement, en contrôlant le transporteur d'efflux HrtBA<sub>ef</sub> et indirectement en régulant l'activité de la catalase KatA. Dans la littérature, HrtBA est décrit comme un système de détoxification de l'hème, ici, nous ajoutons une dimension au rôle de ce transporteur en montrant son impact sur la biodisponibilité intracellulaire de l'hème.

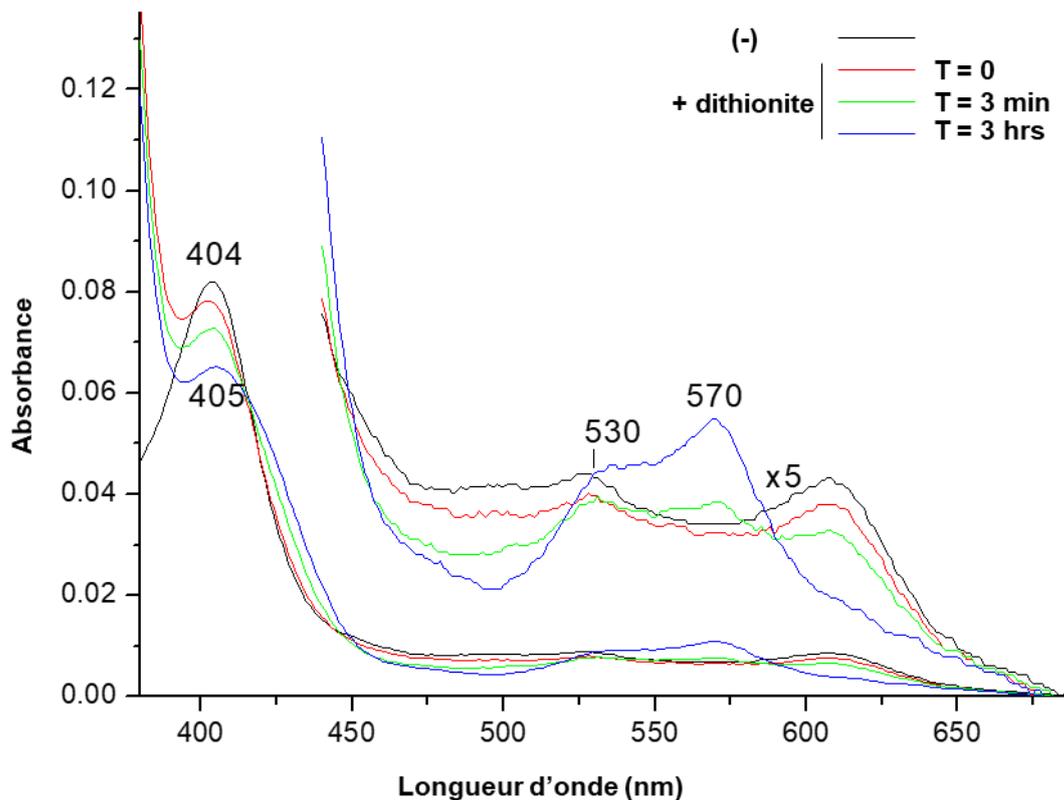
Enfin en construisant un plasmide senseur d'hème luminescent, nous avons prouvé que le système HrtBA est activé dans l'environnement de l'intestin laissant supposer un rôle de ce mécanisme dans l'utilisation de l'hème par *E. faecalis* dans le microbiote. Plusieurs sources d'hème ont été décrites dans le microbiote comme l'hémoglobine ou l'hème produit par des entérobactéries (*E. coli*, par exemple)(Gruss et al., 2012), nous avons pu montrer qu'*in vitro* *E. faecalis* est capable d'utiliser l'hème de l'ensemble de ces sources.

### A.3. Caractérisation biochimique de FhtR

#### A.3.1. Caractérisation de la liaison de l'hème à FhtR

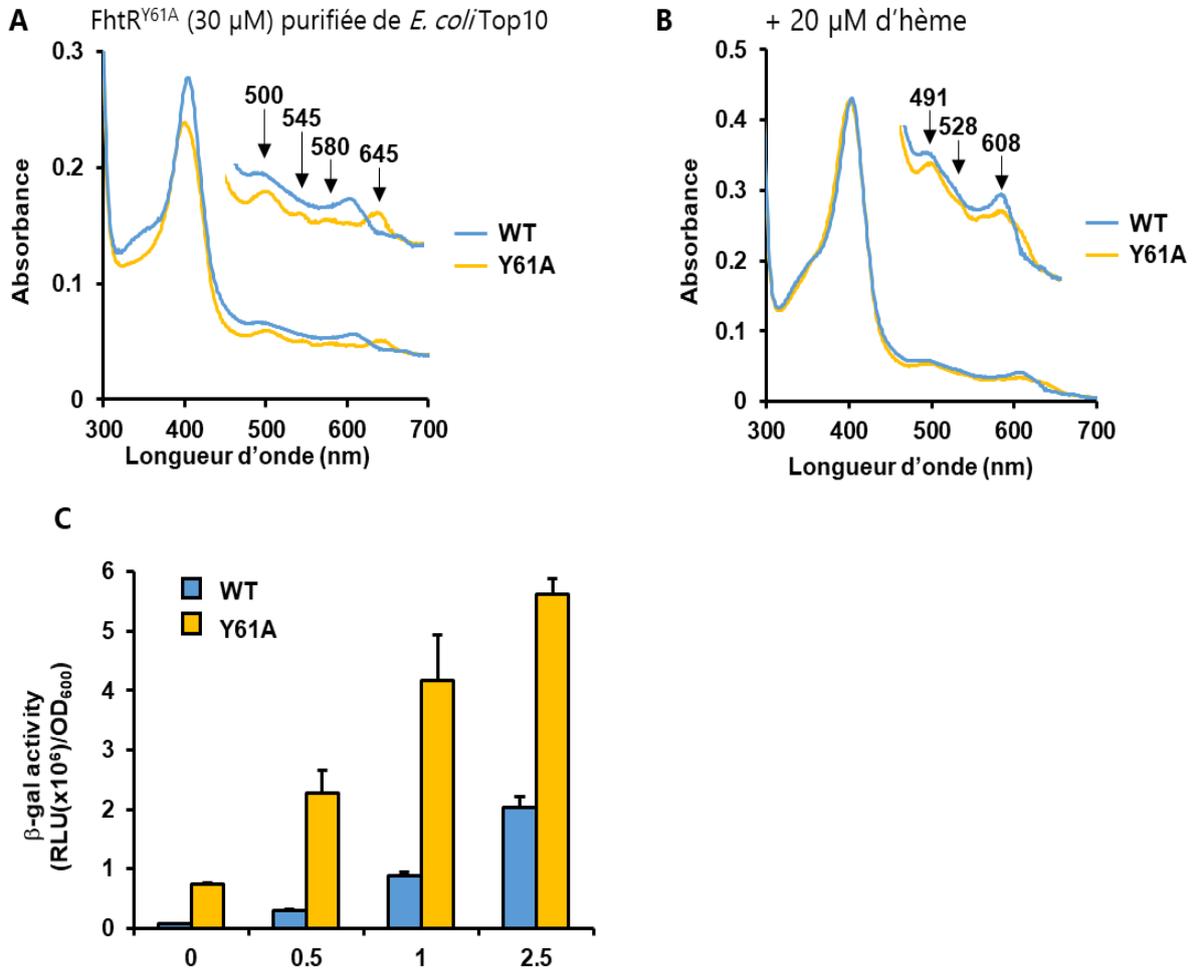
Grâce à la capacité d'oxydo-réduction de son atome de fer, l'hème existe soit sous une forme réduite ( $\text{Fe}^{2+}$ ), soit sous une forme oxydée ( $\text{Fe}^{3+}$ ). L'étude de la liaison de l'hème à une protéine sous ces deux formes est utilisée pour caractériser la liaison. L'étude du spectre en UV-visible de l'hème oxydé lié à la protéine MBP-FhtR (bande de Soret à 407 nm et bande de transfert de charge à 608 nm) est compatible avec une liaison haut spin avec un hème relié à FhtR par la chaîne latérale d'une tyrosine qui serait le ligand proximal (**voir Figure 3 article**). Les caractéristiques du spectre de FhtR lié à l'hème sont, par exemple, similaires à ceux de certains mutants de l'hémoglobine, appelées hémoglobines M dans lesquelles la liaison His-hème de l'hémoglobine est remplacée par une liaison Tyr-hème rendant impossible la fixation de l' $\text{O}_2$  (Aki et al., 2010; Nagai et al., 2002). L'ensemble de ces résultats suggère que l'hème se lie de façon pentacoordonnée à FhtR par une tyrosine. Ce type de liaison étant retrouvé chez des senseurs de gaz diatomiques (**voir A.2.3.1.**), nous avons donc réalisé des tests de fixation du CO et NO sur FhtR (collaboration U. Liebl et M. Vos, Laboratoire d'optique et de biosciences (LOB), Ecole polytechnique, Palaiseau). Lorsque le complexe FhtR-Hème est incubé en présence de CO ou NO en milieu réducteur, aucun changement de spectre d'absorption UV-visible n'est observable (données non montrées) suggérant que FhtR n'est pas un senseur de gaz diatomique.

Le spectre d'absorption UV-visible de l'hème réduit, est obtenu après l'ajout d'un agent réducteur sur le complexe (l'hydrosulfite de sodium  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Dans la plupart des cas l'hydrosulfite de sodium réduit le fer de l'hème instantanément, mais dans le cas de FhtR, la réduction du fer est très lente, suggérant une forte exposition de l'hème à son environnement dans la protéine (Izadi et al., 1997). On peut néanmoins observer un changement de spectre après 3 h d'incubation en atmosphère anaérobie avec l'apparition de 2 pics à 530 et 570 nm à la place des 3 pics à 491 ; 528 et 608 nm de la forme oxydée (**Figure 37**). Ces caractéristiques spectrales sont compatibles avec une liaison hexacoordonnée de l'hème réduit à FhtR suggérant que deux acides aminés de FhtR lient l'hème en conditions réductrices. Ce résultat semble indiquer qu'un sixième ligand dans FhtR pourrait se lier à l'hème dans des conditions réductrices (collaboration U. Liebl et M. Vos, Laboratoire d'optique et de biosciences (LOB), Ecole polytechnique, Palaiseau).



**Figure 37 : Impact de la réduction de l'hème sur la liaison FhtR-Hème.** Spectre UV-visible de la protéine MBP-FhtR WT purifiée de *E. coli* TOP10 (38  $\mu\text{M}$  de protéine avec 10  $\mu\text{M}$  d'hème) en condition réductrice (ajout de l'hydrosulfite de sodium) ou non ont été obtenus dans un spectrophotomètre (en collaboration avec U. LIEBL et M. VOS ; Laboratoire d'optique et de biosciences (LOB), Ecole polytechnique, Palaiseau).

## Projet 1



**Figure 38 : Etude de l'impact de la mutation Y61A sur la liaison de l'hème à FhtR.** **(A)** Spectre d'absorption UV-visible de MBP-FhtR WT et Y61A purifiées de *E. coli* TOP10 (200 μl à 30 μM) ont été obtenus dans un spectrophotomètre (TECAN, Spark) (DO<sub>280</sub> normalisé à 1). **(B)** Spectre d'absorption UV-visible de MBP-FhtR WT et Y61A purifiées de *E. coli*/TOP10 + 20 μM d'hème. Les spectres ont été obtenus comme dans (A). **(C)** Induction de PhrtBA<sub>Ef</sub> par l'hème. Activité βgal de la souche ΔfhtR OG1RF transformée soit avec pP<sub>fhtR</sub>-*fhtR*, P<sub>hrtBA</sub>-*lac* ou pP<sub>fhtR</sub>-*fhtR*<sup>Y61A</sup>, P<sub>hrtBA</sub>-*lac* a été obtenue selon le protocole décrit dans l'article. Les résultats représentent la moyenne ± E.T. d'un triplicat technique. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois.

### A.3.2. Détermination du ligand permettant la liaison de l'hème à FhtR

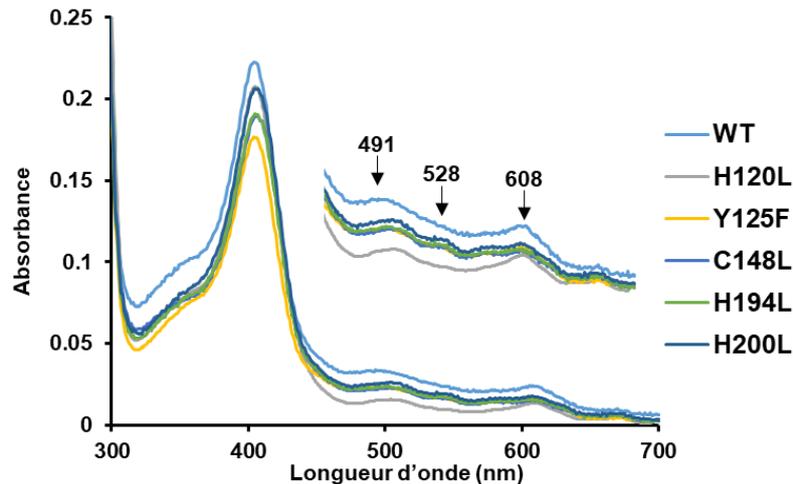
Afin d'identifier l'acide aminé responsable de la liaison pentacoordonnée entre FhtR et l'hème (voir article), nous avons produit chez *E. coli* des mutants ponctuels de FhtR. Ces protéines recombinantes comportent des mutations d'AA pouvant coordonner le fer de l'hème (histidines, tyrosines, cystéines et méthionines ; voir **Synthèse bibliographique B.1.4.**) et conservées dans des alignements d'homologues de FhtR d'autres espèces (**Figure S7A de l'article et 39A**). Quatre acides aminés ont été ainsi choisis : Y61 ; H101 ; M108 ; Y132 et les mutations ont été introduites dans la séquence d'AA de FhtR (Protéogénix). Puis les séquences des protéines recombinantes ont été introduites dans le plasmide pMAL permettant l'ajout du tag MBP (**M**altose **B**inding **P**rotein) en Nt. Les protéines MBP-FhtR<sup>Y61A</sup> ; MBP-FhtR<sup>H101A</sup> ; MBP-FhtR<sup>M108A</sup> ; MBP-FhtR<sup>Y132A</sup> ont été produites et purifiées selon le protocole présenté dans l'article et leur liaison à l'hème étudié. Parmi ces 4 candidats, deux présentent des différences de spectres UV visible par rapport au WT : MBP-FhtR<sup>Y61A</sup> et MBP-FhtR<sup>Y132A</sup>. Lorsque la protéine FhtR<sup>Y61A</sup> est purifiée d'*E. coli* WT, elle est éluée en présence d'hème comme FhtR WT mais avec un spectre UV-visible différent de celui de FhtR WT avec un décalage de la bande de Soret de 407 à 401 nm et l'apparition de bandes supplémentaires dans la zone 480-700 nm (**voir Figure 38A**) laissant supposer que la liaison au fer de l'hème est impactée. Cependant lorsque l'on rajoute de l'hème *in vitro*, le spectre est identique à celui de FhtR WT (**Figure 38B**). L'effet de cette mutation a aussi été étudié *in vivo* en transformant le mutant  $\Delta fhtR$  avec le plasmide rapporteur pP<sub>hrtBA</sub>-*lac*, P<sub>fhtR</sub>-*fhtR*<sup>Y61A</sup>. L'induction de la transcription de la  $\beta$ gal par l'hème n'est pas inhibée mais au contraire surtranscrite (**Figure 38C**). Notre conclusion est que la mutation Y61A n'empêche pas le changement conformationnel induit par la liaison de FhtR à l'hème induisant la transcription de *hrtBA*<sub>Ef</sub>. Nous supposons que le Y61 étant proche du domaine Nt de fixation à l'ADN, une modification de l'affinité de FhtR<sup>Y61A</sup> pour l'ADN pourrait expliquer la suractivation transcriptionnelle observée même en absence d'hème (**Figure 38C**).

## Projet 1

A

1 mekpnkrkad lertrqiils vaselfmtkg fkntstreia lkanitqpnl **yhh**fknkkel  
61 **y**lavieelts rvqeelpviv sgnasveekl **y**qlikvllde **h**ptnlfl**m**ln **d**mfq**m**gpd**y**  
121 nrtl**y**qifkk t**y**inniaaif esepetn**c**lq egisvddttr fil**y**nvsall siekt**y**qrkt  
181 vdddvkkfiq **f**m**h**gvlks**h** k

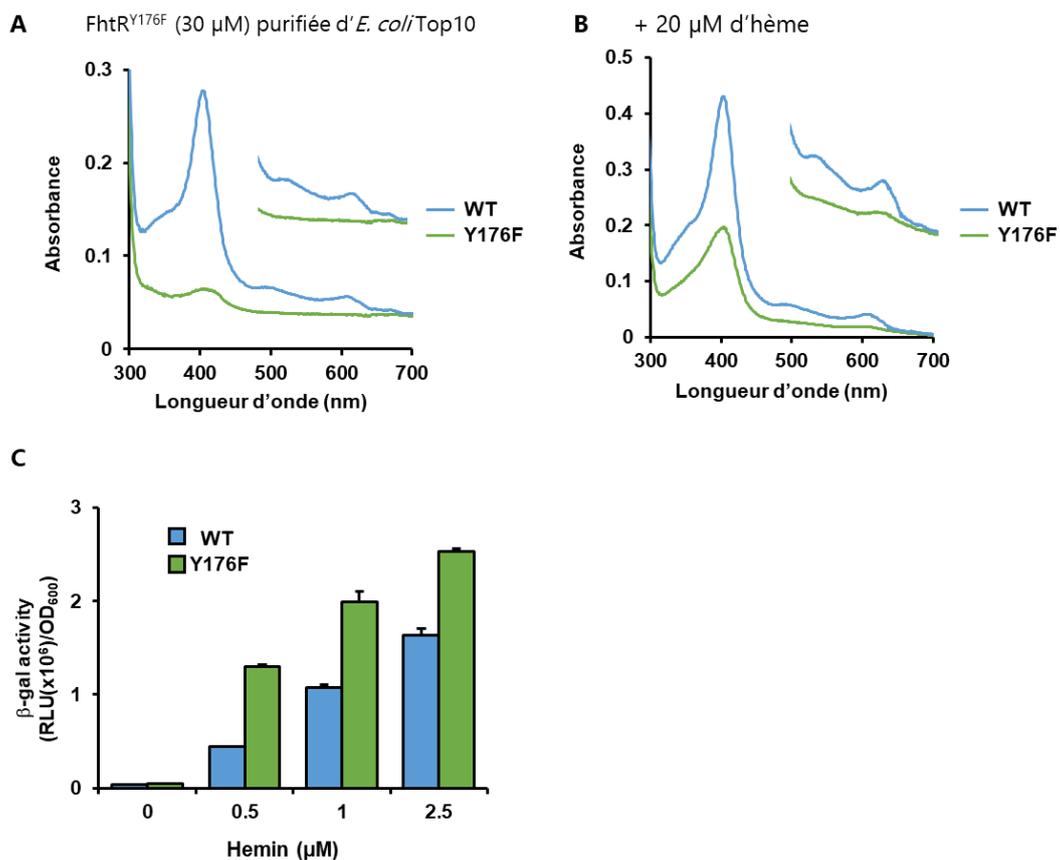
B



**Figure 39 : Détermination du ligand permettant la liaison de l'hème à FhtR. (A) Séquence protéique de FhtR.** En rouge sont indiqués les acides aminés mutés pour l'étude de l'interaction de l'hème. **(B) Etude de l'impact de différentes mutations de FhtR sur la liaison de l'hème.** Spectre d'absorption UV-visible de MBP-FhtR WT; H120L; Y125F; C148L; H194L et H200L purifiés de *E. coli*/TOP10 (DO<sub>280nm</sub> normalisée à 1) ont été obtenus dans un spectrophotomètre (TECAN, Spark).

Nous avons, dans un second temps, élargi notre screening des AA pouvant être responsables de la coordination de l'hème et décidé de muter séparément l'ensemble des histidines, tyrosines, méthionines et cystéine présentes en dehors du domaine de fixation à l'ADN (AA 1 à 51 environ). Les mutants ponctuels de FhtR ont été obtenus par PCR (Polymerase Chain Reaction) « overlap » (**Annexes Tableau IV**), puis elles ont été introduites dans le plasmide pMAL permettant l'ajout du tag MBP en Nt utilisé pour la purification (**voir supplemental materials and methods de l'article**). Les AA mutés sont indiqués en rouge sur la **Figure 39 A**. Ces 14 mutants sauf FhtR<sup>Y176F</sup> sont élués avec de l'hème et ont un spectre similaire à celui de la protéine WT (quelques exemples sont représentés **Figure 39B**).

La protéine FhtR<sup>Y176F</sup> est ainsi le seul mutant additionnel élué d'*E. coli* avec moins d'hème que FhtR WT (**voir Figure 40A**). Cependant, lorsque l'on rajoute de l'hème *in vitro* la liaison de l'hème ne paraît pas affectée. (**Figure 40B**). *In vivo*, l'effet de cette mutation a aussi été étudiée similairement à Y61 en transformant le mutant  $\Delta fhtR$  avec le plasmide rapporteur pP<sub>hrtBA</sub>-*lac*, P<sub>fhtR</sub>-*fhtR*<sup>Y176F</sup>. La  $\beta$ gal est induite en fonction de la concentration d'hème, similairement à FhtR WT, mais plus fortement. De manière équivalente au mutant Y61A, nous concluons que le mutant FhtR<sup>Y176F</sup> est toujours capable de transduire le signal hème suggérant que la tyrosine 176 n'est pas responsable de la liaison de l'hème. Un changement conformationnel de la protéine mutée pourrait expliquer les différences de niveau d'induction de la  $\beta$ gal observés (**voir Figure 40C**).



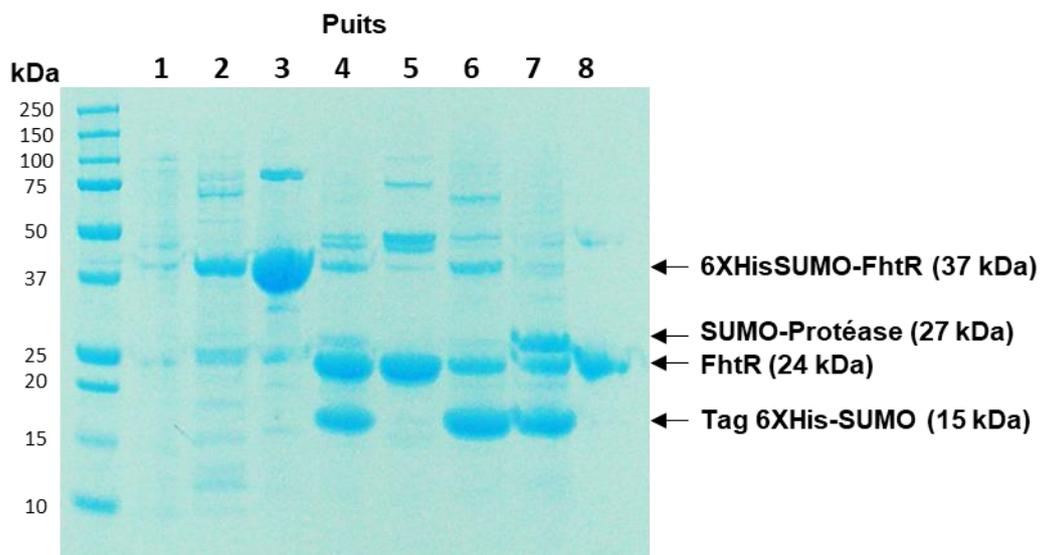
**Figure 40 : Etude de l'impact de la mutation Y176F sur la liaison de l'hème à FhtR.** (A) Spectre d'absorption UV-visible de MBP-FhtR WT et Y176F purifiées d'*E. coli* TOP10 (200 µl à 30 µM) ont été obtenus dans un spectrophotomètre (TECAN, Spark) (DO<sub>280</sub> normalisé à 1). (B) Spectre d'absorption UV-visible de MBP-FhtR WT et Y176F purifiées de *E. coli* TOP10 + 20 µM d'hème. Les spectres ont été obtenus comme dans (A). (C) Induction de l'opéron hrtBA<sub>ef</sub> par l'hème. L'activité  $\beta$ gal de la souche  $\Delta fhtR$  OG1RF transformée soit avec pP<sub>fhtR</sub>-*fhtR*, P<sub>hrtBA</sub>-*lac* ou pP<sub>fhtR</sub>-*fhtR*<sup>Y176F</sup>, P<sub>hrtBA</sub>-*lac* a été obtenue selon le protocole décrit dans l'article. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  E.T. d'un triplicat technique. Les expériences ont été répétées au moins 3 fois.

## Projet 1

Parmi les trois acides aminés testés *in vivo* (Y61 ; Y132 et Y176), seule la tyrosine 132 semble donc essentielle à la détection de l'hème par FhtR (**voir article**). Toutes ces observations ne nous permettent pas de conclure sur l'identité du ligand et il semblerait que nos conditions *in vitro* ne reflètent pas les conditions *in cell*. Nous émettons l'hypothèse que dans l'environnement intracellulaire de la cellule, la liaison de FhtR à l'hème pourrait être différente de celle observée *in vitro*. Les résultats de l'étude cristallographique *as prep* ou après ajout d'hème pourraient permettre d'identifier le mécanisme de la liaison de l'hème à FhtR.

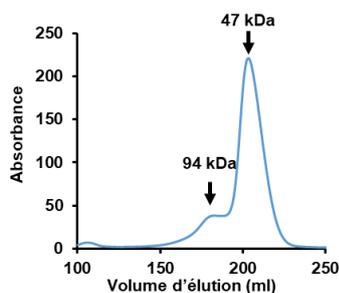
### A.3.3. Détermination de la structure tridimensionnelle de FhtR par cristallographie (en collaboration avec P. ARNOUX, CEA, Cadarache)

#### A.3.3.1. Production et purification de la protéine FhtR



**Figure 41 : Production et purification de la protéine FhtR clivée.** Gel SDS-PAGE 10% coloré au bleu de Coomassie récapitulant les étapes de production et purification de FhtR. **(Puit 1)** Fraction non retenue sur la première colonne HisTrap. **(Puits 2 et 3)** Elution (50 mM et 250 mM Imidazole respectivement) de la première colonne HisTrap contenant la protéine 6XHisSUMO-FhtR. **(Puit 4)** Après clivage avec deux bandes correspondant à FhtR clivée et la SUMO-Protéase. **(Puit 5)** Fraction non retenue de la deuxième colonne HisTrap contenant FhtR clivée. **(Puits 6 et 7)** Elution (50 mM et 250 mM Imidazole respectivement) de la deuxième colonne HisTrap contenant la SUMO-Protéase et le tag 6XHis-SUMO. **(Puit 8)** Fraction contenant le dimère de FhtR clivé après le passage sur la colonne HiLoad® 26/600 Superdex 200 GE Healthcare®.

Pour obtenir FhtR purifiée et sans tag en quantité (>10 mg), le gène *fhtR* d'*E. faecalis* OG1RF a été amplifié avec les oligos O15/O16 (**Annexes Tableau IV**) et cloné dans le plasmide d'expression pETSUMO (Invitrogen). Ce vecteur ajoute une séquence 6xHisSUMO en Nt et permet de purifier la protéine recombinante par chromatographie d'affinité sur des résines Ni-sépharose (colonne HisTrap™ de Invitrogen). Le plasmide est transformé dans la souche *E. coli* BL21 (Biolabs) et la production de la protéine est induite par l'ajout d'isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). 6xHisSUMO-FhtR est ensuite purifiée sur des colonnes HisTrap™ (Invitrogen) (**Figure 41, lignes 2 et 3**). La protéine 6xHisSUMO-FhtR obtenue est éluée en présence d'hème de manière similaire à MBP-FhtR. Afin d'obtenir une forme apo de FhtR, la protéine a été produite dans un mutant d'*E. coli* (*hemA::kan*) déficiente dans la synthèse de l'hème. Pour cela un plasmide permettant la production de FhtR recombinant indépendamment du promoteur T7 a été construit à partir de pMalC4x dans lequel la séquence du tag MBP a été remplacée par la séquence 6xHisSUMO par la méthode Gibson (**Annexes Tableau IV**). La production et la purification sont effectuées avec le même protocole que pour le souche BL21. Afin d'enlever le tag, la protéine 6xHisSUMO-FhtR est clivée avec la SUMO protéase (1 mg de protéase pour 20 mg de protéine) (**Figure 41, ligne 4**) et l'ensemble est repurifié sur la colonne Hisrap™ et cette fois la protéine FhtR clivée est récupérée dans la fraction non retenue (**Figure 41, ligne 5**) alors que le tag 6xHisSUMO et la protéase taguée 6xHis sont retenus sur la colonne (**Figure 41, lignes 6 et 7**). La pureté et la dimérisation de la protéine FhtR clivée sont vérifiées par chromatographie d'exclusion stérique (HiLoad® 26/60 Superdex 200 GE Healthcare®). On peut voir sur l'exemple de FhtR sous forme holo que la protéine est pure et majoritairement sous forme de dimère (47 kDa) (**Figure 42**) et il en est de même pour la forme apo (données non montrées). Seuls les dimères sont collectés pour les tests de cristallographie (**Figure 41, ligne 8**) et la concentration en protéine est ajustée à environ 10 mg/mL.

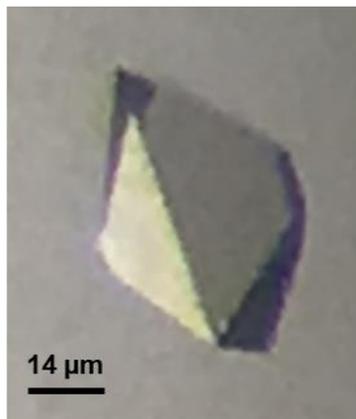


**Figure 42 : Etude de l'état d'oligomérisation de la protéine FhtR clivée sous forme holo par chromatographie d'exclusion stérique.** Spectre d'absorbance à 280 nm de la chromatographie d'exclusion stérique (HiLoad® 26/600 Superdex 200 GE Healthcare®) de la protéine FhtR sous forme holo (**Figure 41, ligne 5**).

## Projet 1

### A.3.3.2. Obtention des cristaux

La cristallisation des protéines sous forme apo et holo purifiées a ensuite été testée par la technique de la goutte assise en diffusion de vapeur, en utilisant différents kits de cristallisation commerciaux (Molecular Dimension : JCSG+, Stura Footprint, PactPremier...; Hampton Research : PEG ions, SaltRX, AmSO4 screen). Plus de 4500 conditions différentes ont été testées pour la protéine avec hème (soit sous sa forme « as-prep », soit en rajoutant des concentrations saturantes en hème, soit enfin en utilisant la protéine marquée à la sélénométhionine + hème) et 1500 conditions avec la protéine apo. Ce protocole nous a permis d'obtenir des premiers cristaux uniquement avec la forme apo, en position G9 du PEG/ions (2% Tacsimate pH6, 0.1 M Bis-Tris pH6.5 et 20% PEG3350) et dans quelques conditions s'en approchant. Après optimisations (test de l'effet du pH et de différents additifs; **Figure 43**), ces cristaux diffractent les rayons X (Synchrotron Soleil, Gif-sur-Yvette) jusqu'à une résolution modérée de 3.3 Å. La première méthode employée pour résoudre la structure a été le remplacement moléculaire, c'est-à-dire l'utilisation des structures 3D de protéines homologues afin de remonter à la structure de FhtR. Malheureusement les homologues cristallisés ont un pourcentage d'identité trop faible (bien inférieur à 30 % d'identité de séquence sur une partie seulement de la protéine) pour permettre de résoudre la structure de FhtR par cette méthode.



**Figure 43 : Photographie d'un cristal de FhtR sous forme apo.**

Deux méthodes ont alors été envisagées ; la première est de produire FhtR en remplaçant les méthionines par des sélénométhionines. L'incorporation d'un atome lourd comme le sélénium permet de résoudre le problème des phases afin de remonter à la structure de la protéine (Larsson and Jones, 2007). Cette méthode requiert l'utilisation d'un milieu chimiquement défini contenant de la sélénométhionine à la place de la méthionine. Dans ces conditions, la souche *E. coli* (*hemA::kan*) qui a un métabolisme fermentaire en absence d'hème se multiplie très mal, et ne permet donc pas de produire FhtR en quantités suffisantes. La deuxième méthode consiste alors à faire des trempages des cristaux dans des solutions de métaux lourds, en espérant que l'un d'eux se fixe de manière spécifique, sans pour autant affecter négativement la diffraction. Ce processus est laborieux et, suite à ces trempages, les cristaux de la forme apo soit ne diffractent plus les rayons X, soit ne montrent pas de signe de fixation d'un atome lourd, empêchant donc la résolution de la structure par cette méthode.

Devant ces difficultés, la dernière stratégie envisagée, qui est toujours en cours, est d'essayer de cristalliser des protéines homologues provenant d'autres espèces. Basés sur des alignements de la séquence d'AA, trois protéines ont été sélectionnées : d'*Enterococcus rivorum* (GenBank: OEH84002.1 ; 64 % de similitude avec FhtR), de *Vagococcus salmoninarum* (GenBank: RST91393.1 ; 59 % de similitude avec FhtR) et de *Listeria monocytogenes* (GenBank: EAF1524715.1 ; 41 % de similitude avec FhtR). Si ces essais permettent d'obtenir une structure 3D, il sera alors possible avec les jeux de données obtenues avec la protéine FhtR sous forme apo de remonter à la structure de FhtR d'*E. faecalis*.

#### **A.4. Etude de la réponse à l'hème d'*Enterococcus faecalis* par une étude transcriptomique**

##### **A.4.1. Réalisation de l'étude transcriptomique comparative entre *E. faecalis* OG1RF WT et $\Delta fhtR$ en présence ou non d'hème**

Une étude transcriptomique a été mise en place comparant deux souches (*E. faecalis* OG1RF WT et  $\Delta fhtR$ ) dans deux conditions différentes (avec ou sans hème dans le milieu). Pour cela, une préculture de nuit de chaque souche a été diluée à  $DO_{600nm} = 0.01$  dans du M17 + 0.5 % de glucose (25 ml) puis cultivée à 37 °C sans agitation jusqu'à une  $DO_{600nm} = 0.5$  puis 10 min en présence ou non de 2.5  $\mu$ M d'hème. La croissance est arrêtée en ajoutant 2 volumes de RNA protect Bacteria Reagent (Qiagen) aux cultures. Les cultures sont vortexées pendant 5s, puis incubées pendant 5 min à température ambiante et centrifugées pendant 10 min à 5000 g à 4°C. Les culots bactériens sont ensuite lavés avec 1 ml d'une solution de PBS (Phosphate Buffer Saline) puis centrifugés (1 min, 8 000 g à 4 °C). Chaque condition a été répliquée de manière indépendante 3 fois. Les culots bactériens sont repris dans 800  $\mu$ l de RNA Pro Blue (MP Biomedicals) et directement transférés dans des tubes contenant des billes permettant une lyse des bactéries par broyage à billes. Les bactéries sont lysées avec 2 cycles de 40 secondes à 6 m/s de Fastprep (MP Biomedicals), puis les tubes sont centrifugés (5 min, 12 000 g à 4 °C). Les surnageants sont alors prélevés et mélangés avec 300  $\mu$ l de chloroforme. Après une centrifugation (5 min, 12 000 g à 4 °C), la phase aqueuse est alors récupérée et les ARNs sont précipités avec 550  $\mu$ l d'éthanol 100 %. Après 1h minimum à -20 °C, le mélange est centrifugé (15 min, 12 000 g à 4 °C). Les culots d'ARNs sont alors lavés avec 500  $\mu$ l d'éthanol 75 % puis centrifugés (15 min, 12 000 g à 4 °C) et sont finalement séchés puis repris avec 50  $\mu$ l d'eau. Afin d'éviter une contamination par de l'ADN génomique, les échantillons subissent un traitement DNase (DNase TURBO™ ; Invitrogen) et la qualité des ARNs est ensuite vérifiée par électrophorèse (DNA 1000 Bioanalyser ; Agilent). La préparation des bibliothèques et le séquençage ont été réalisés sur la plateforme Biomix de l'Institut Pasteur (Paris) en collaboration avec A. Firon et O. Sismeiro. La préanalyse statistique a été réalisée en collaboration avec H. Varet du groupe d'expertise Bioinformatics and biostatistics HUB de l'Institut Pasteur.

### A.4.2. FhtR un régulateur spécifique de HrtBA

Afin d'identifier les gènes contrôlés par FhtR, une comparaison des « fold change » entre WT vs WT + hème et WT vs  $\Delta fhtR$  est réalisée, en faisant l'hypothèse que les gènes potentiels cibles de FhtR sont induits fortement par l'hème (WT vs WT + hème) comme le transporteur d'efflux d'hème HrtBA<sub>EF</sub>. Ma deuxième hypothèse est que, chez le mutant, ces gènes seront fortement transcrits (WT vs  $\Delta fhtR$ ) car FhtR est un répresseur. Seuls deux gènes sont fortement induits en présence d'hème et chez le mutant  $\Delta fhtR$ , ils correspondent aux gènes *hrtA* (OG1RF\_RS02775) et *hrtB* (OG1RF\_RS02770) (**Tableau VI**). Nous concluons que FhtR est un régulateur spécifique de HrtBA<sub>EF</sub>.

<i>E. faecalis</i> ORF	Nom du gène	Fonctions	Fold change WT vs $\Delta fhtR$	Fold change WT vs WT + hème
OG1RF_RS02770	<i>hrtB</i>	Perméase d'un transporteur ABC d'efflux d'hème	825	664
OG1RF_RS02775	<i>hrtA</i>	ATPase d'un transporteur ABC d'efflux d'hème	863	718

**Tableau VI : Gènes contrôlés par FhtR.** Tableau regroupant les gènes induits dans les conditions : WT vs  $\Delta fhtR$  et WT vs WT + hème. Les « fold change » sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

### A.4.3. D'autres systèmes d'efflux en réponse à l'hème

Le deuxième objectif de cette étude transcriptomique était de découvrir les gènes activés ou réprimés en réponse à l'ajout d'hème dans le milieu. Afin d'identifier les gènes les plus impactés par l'ajout d'hème, j'ai comparé les « fold change » entre WT vs WT + hème et  $\Delta fhtR$  vs  $\Delta fhtR$  + hème. L'intérêt d'ajouter les « fold change » de la comparaison  $\Delta fhtR$  vs  $\Delta fhtR$  + hème à cette analyse est de détecter des gènes fortement impactés par l'hème intracellulaire car nous avons montré que dans le mutant  $\Delta fhtR$  la concentration d'hème est plus faible (**voir article**).

## Projet 1

<i>E. faecalis</i> ORF	Nom du gène	Fonctions	Fold change WT vs WT + hème	Fold change $\Delta fhtR$ vs $\Delta fhtR$ + hème
OG1RF_RS02770	<i>hrtB</i>	Perméase d'un transporteur ABC d'efflux d'hème	664	1
OG1RF_RS02775	<i>hrtA</i>	ATPase d'un transporteur ABC d'efflux d'hème	718	1
OG1RF_RS10085		Transporteur ABC (ATPase + perméase)	49	31
OG1RF_RS10090		Transporteur ABC (ATPase + perméase)	47	31
OG1RF_RS10095		TetR régulateur	50	28
OG1RF_RS01680			16	2.5
OG1RF_RS01685		Transporteur MFS	17	2.3
OG1RF_RS01690		MerR régulateur	17	2.2

**Tableau VII : Gènes impactés par l'ajout d'hème dans le milieu.** Tableau regroupant les gènes induits dans les conditions : WT vs WT + hème et  $\Delta fhtR$  vs  $\Delta fhtR$  + hème. Les « fold change » sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

De cette double comparaison, 2 groupes de gènes apparaissent induits par l'hème. Le premier groupe est composé de 3 gènes dont 2 codent pour des transporteurs ABC (ATPase et perméase dans le même gène (OG1RF\_RS10085 et OG1RF\_RS10090)) et un régulateur TetR (OG1RF\_RS10095) (**Tableau VII**). Les deux transporteurs d'efflux (OG1RF\_RS10085 et OG1RF\_RS10090) partagent respectivement 45 % et 41 % d'identité de séquence avec les transporteurs PefD et PefC (**voir Synthèse bibliographique B.4.2.2.**). Il a été montré que des homologues de ces deux transporteurs PefD et PefC ont un rôle dans la régulation de la toxicité de l'hème chez *S. agalactiae* (Fernandez et al., 2010). Fait intéressant, le régulateur induit par l'hème chez *E. faecalis* (OG1RF\_RS10095) n'a aucune similarité de séquence avec le régulateur PefR régulant l'opéron *pefCDR* chez *S. agalactiae*. Il est donc possible que ces 3 gènes qui semblent former un seul opéron (au vu de l'organisation génétique et des « fold change » équivalents) participent à la résistance à l'hème chez *E. faecalis* de façon similaire à l'opéron *pefCDR* chez *S. agalactiae*.

Le deuxième groupe de gènes est aussi composé de trois gènes avec un transporteur d'efflux de la famille MFS (OG1RF\_RS01685), un régulateur de type MerR (OG1RF\_RS01690) et un dernier gène dont la fonction est inconnue (OG1RF\_RS01680)(**Tableau VII**). Ce transporteur

MFS a 50 % d'identité de séquence avec le transporteur PefA décrit chez *S. agalactiae* comme participant à la détoxification de l'hème (**voir Synthèse bibliographique B.4.2.2.**). Bien que ce régulateur appartienne à la même famille de 1-CS que PefR, il ne possède pas de similarité de séquence avec celui-ci. Ces 3 gènes ne sont pas dans un même opéron car le gène du régulateur est antisens par rapport aux deux autres gènes. Néanmoins, les trois gènes au vu des valeurs des « fold change » qui sont identiques, semblent être corégulés (**Tableau VII**). En conclusion, nous avons identifié deux nouveaux régulons chez *E. faecalis* qui pourraient avoir un rôle dans la réponse à l'hème mais dont le rôle et la régulation restent à déterminer.

## **B. Discussions et perspectives**

### **B.1. FhtR, un nouveau régulateur de l'opéron *hrtBA* chez *Enterococcus faecalis***

Mon travail, dans cette première publication, a permis de caractériser une nouvelle protéine de la famille TetR, FhtR, comme senseur d'hème intracellulaire et régulateur de l'opéron *hrtBA* chez *E. faecalis*. J'ai montré que FhtR régule de manière directe l'expression de HrtBA<sub>Ef</sub> mais aussi de façon indirecte l'activité de la catalase A. De plus, en montrant que cette catalase était impliquée dans la toxicité de l'hème, nous avons donc mis en évidence deux systèmes de défense de *E. faecalis* contre la toxicité de l'hème exogène. J'ai démontré que la détection de l'hème par FhtR fait intervenir une liaison pentacoordonnée à l'hème. Cette liaison entraîne le décrochage du complexe FhtR-hème de la zone promotrice de l'opéron *hrtBA* permettant la transcription et l'expression du transporteur d'efflux de l'hème HrtBA<sub>Ef</sub>. Une analyse transcriptionnelle a mis en évidence que FhtR contrôle spécifiquement l'opéron *hrtBA*.

## Projet 1

### B.1.1. FhtR et l'hème

L'étude *in vitro* de la liaison de FhtR à l'hème m'a permis de conclure que la liaison est pentacoordonnée faisant donc intervenir un acide aminé de la protéine. Malgré la mutation un à un des acides aminés susceptibles de lier l'hème (histidine, tyrosine, méthionine et cystéine), seule la tyrosine 132 semble avoir un impact *in vivo* sur la liaison que ce soit chez *E. coli* ou chez *E. faecalis*. Cependant nous ne pouvons pas conclure avec certitude quant à son rôle de ligand de l'hème car la formation du complexe *in vitro* ne semble pas modifiée avec le mutant FhtR Y132F. La spectroscopie RPE montre néanmoins une modification des spectres de l'hème en complexe avec FhtR Y132F par rapport à FhtR WT suggérant que l'environnement de l'hème est modifié. Nous envisageons des expériences de spectrométrie Raman qui pourraient fournir plus d'informations sur la nature du ligand (Ferrante et al., 2020; Uchida et al., 2000). Une collaboration a été mise en place avec Pierre Moenne-Loccoz, (Department of Chemical Physiology and Biochemistry, Oregon Health and Science University) afin d'effectuer ce type d'étude. Mes résultats pourraient aussi suggérer que la liaison de l'hème à FhtR est différente *in vivo* et *in vitro*. Il serait aussi intéressant de comparer les spectres en spectroscopie Raman ou EPR des complexes FhtR-hème et FhtR Y132A hème tels que purifiés d'*E. coli*. Une autre approche est aussi en cours (P. Arnoux, CEA) qui consiste à résoudre la structure tridimensionnelle de FhtR par cristallographie qui permettrait une grande avancée pour la compréhension de la liaison de l'hème à FhtR. Dans le cas où seulement la structure de la forme apo est obtenue, il sera peut-être néanmoins possible de prédire plus précisément le site de liaison de l'hème grâce à des logiciels de prédiction comme HemeBind (Liu and Hu, 2011). Enfin, la détermination de la structure de FhtR sera d'autant plus intéressante qu'aucun homologue cristallisé n'a été identifié (**voir A.3.3.2.**). Ces données apporteraient donc de nouvelles connaissances du point de vue structural dans le domaine des régulateurs de la famille TetR et des hémoprotéines.

Les liaisons pentacoordonnées de l'hème à des protéines sont le plus souvent associées à des récepteurs qui lient l'hème de façon transitoire. On peut citer les récepteurs du système d'acquisition Isd chez *S. aureus* comme IsdA (Vermeiren et al., 2006) et IsdC (Sharp et al., 2007) ou Hma de *E. coli* (Hagan and Mobley, 2009). Une question intéressante qui n'a jamais été

explorée est le devenir de ce type d'hémoprotéine une fois qu'elle a lié l'hème. Les complexes peuvent être recyclés ou dégradés ? FhtR pourrait être un bon modèle pour étudier cette question. Des expériences de Pulse-Chase permettraient d'étudier le devenir du complexe. Des expériences sont en cours au laboratoire (Emeline Ostyn) pour étudier la dynamique de la réponse à l'hème en utilisant un plasmide  $P_{hrtBA}$ -GFP (voir aussi résultats du second projet).

L'hème étant toxique et hydrophobe, il est admis que cette molécule n'existe pas (ou peu) sous forme labile dans la cellule mais qu'elle est prise en charge par des hémoprotéines dites chaperonnes (Hamza and Dailey, 2012; Severance and Hamza, 2009). Chez les eucaryotes, la GAPDH (conservée chez les procaryotes) semble jouer ce rôle (Sweeny et al., 2018). Chez *Streptococcus agalactiae*, l'enzyme AhpC permet une meilleure biodisponibilité de l'hème dans la bactérie (Lechardeur et al., 2010). Il serait intéressant de déterminer si FhtR pourrait jouer un rôle similaire, une hypothèse qui a été montrée récemment pour un autre régulateur, HatR chez *Clostridium difficile* (Knippel et al., 2018). L'évaluation de la toxicité et de la concentration intracellulaire de l'hème chez le mutant  $\Delta fhtR\Delta hrtBA$  pourrait apporter une première réponse.

### B.1.2. FhtR dans le monde bactérien

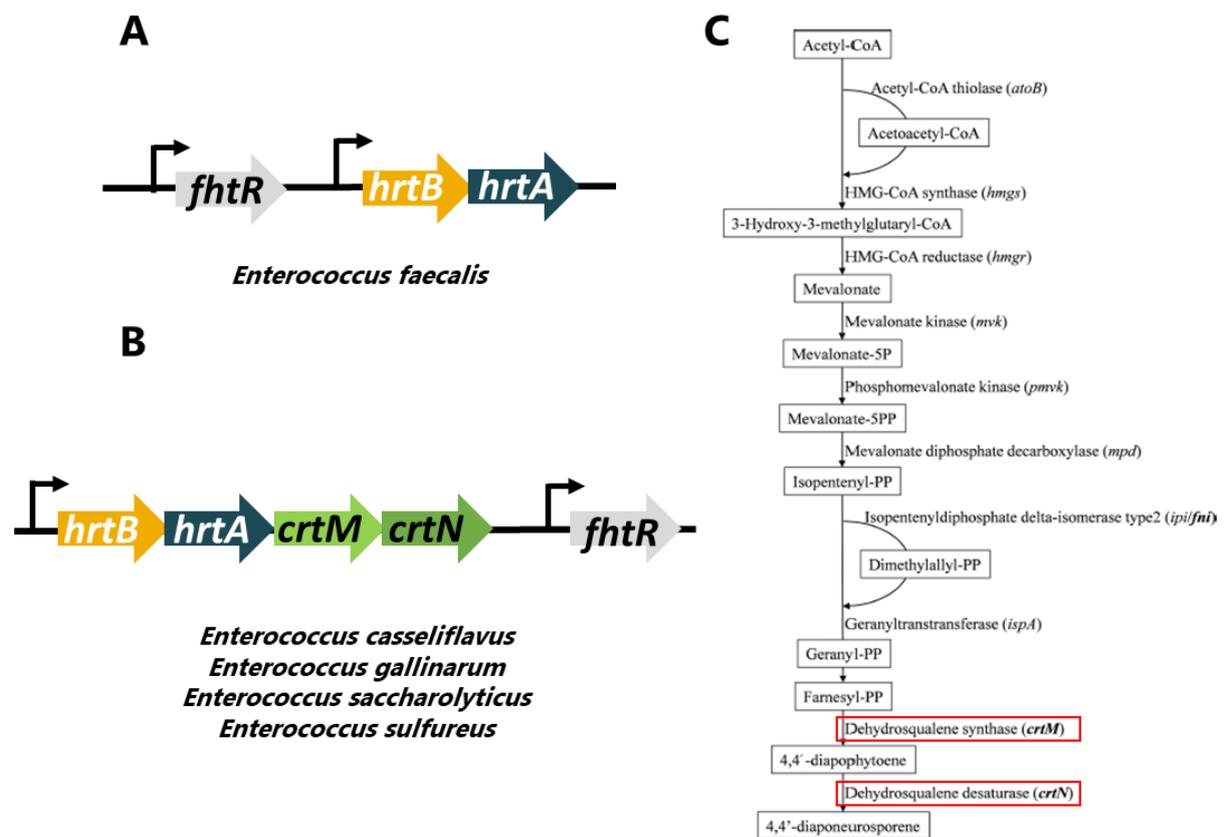
Même si l'expression du transporteur d'efflux d'hème HrtBA est une stratégie qui semble conservée chez les bactéries à Gram positif, FhtR n'est présent que chez les Entérocoques, Vagocoques et les Carnobacterium (voir article Fig S7A et S7B)(**Tableau VIII**). Il serait donc intéressant de vérifier si ces protéines orthologues ont une fonction similaire à FhtR. Parmi les bactéries possédant un orthologue de FhtR citées dans l'article, certaines n'ont pas de catalase à hème et/ou de cytochrome *bd*(**Tableau VIII**). De plus dans la littérature, *E. faecalis* est décrite comme le seul entérocoque à posséder la catalase A (Ramsey et al., 2014). Il sera donc intéressant d'étudier la dépendance de ces bactéries vis-à-vis du système de détoxification FhtR/HrtBA dans la résistance à l'hème.

Espèces bactériennes	FhtR	HrtB	HrtA	KatA	CydA	CydB
<i>Carnobacterium divergens</i>	39	43	59	70	68	67
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	40	45	52	69	68	67
<i>Vagococcus lutrae</i>	45	51	64		60	62
<i>Vagococcus entomophilus</i>	47	59	64		62	65
<i>Vagococcus salmoninarum</i>	59	72	70	72	59	63
<i>Enterococcus hirae</i>	38	43	60			
<i>Enterococcus faecium</i>	35	43	55			
<i>Enterococcus avium</i>	34	44	60		78	79

**Tableau VIII : La présence ou l'absence d'hémoprotéines connues chez différentes espèces et genre bactériens possédant un orthologue de FhtR.** La présence (cases vertes)/absence (cases rouges) des gènes a été déterminée par Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les nombres correspondent au % d'identité de séquence d'AA par rapport à la protéine correspondante chez *E. faecalis* OG1RF.

Enfin, au cours de recherches bio-informatiques, j'ai pu observer que chez certaines espèces (*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Enterococcus gallinarum* et *Enterococcus sulfureus*) pour lesquelles, j'ai trouvé des gènes codant pour des orthologues de FhtR, deux gènes semblent être présents dans le même opéron que *hrtBA* (**Figure 44B**).

Ils codent pour une squalène désaturase (CrtN) et une squalène synthétase (CrtM), deux enzymes connues pour appartenir à la chaîne de biosynthèse des caroténoïdes (**Figure 44C**) (Furubayashi et al., 2014a, 2014b). Les caroténoïdes, ajoutés au niveau de l'enveloppe sous forme de pigments, ont été décrits chez *Enterococcus gilvus* où leur synthèse permet une tolérance accrue au stress oxydatif en condition d'aérobie (Hagi et al., 2014, 2015, 2018). Deux hypothèses peuvent être envisagées. La première est que, participant à une fonction de réduction du stress oxydant la biosynthèse de ces caroténoïdes serait induite par l'hème ? La seconde hypothèse est que ces protéines proches de FhtR et de HrtBA ne régulent pas l'efflux de l'hème mais l'export d'intermédiaires de synthèse de ces pigments.



**Figure 44 : Présence des gènes de dehydroqualène synthétase (CrtM) et désaturase (CrtN) dans l'opéron hrtBA chez différents entérocoques. (A)** Organisation génétique des gènes *fhtR* et *hrtBA* chez *Enterococcus faecalis* OG1RF. **(B)** Organisation génétique des gènes *fhtR*, *hrtBA*, *crtM* et *crtN* chez *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Enterococcus sulfureus*. **(C)** Voie de biosynthèse des isoprénoides permettant la production des caroténoïdes. En rouge sont encadrés les deux gènes présents dans le même l'opéron que *hrtBA*. La biosynthèse des isoprénoides comprend trois voies : la voie des mévalonates (*atoB*, *hmgs* et *hmgr*), la voie des isoprènes (*mvk*, *pmvk*, *mpd*, *ipi* et *ispA*) et la voie des caroténoïdes (*crtM* et *crtN*). D'après (Hagi et al., 2015).

## **B.2. Impact du système de détoxification de l'hème FhtR/HrtBA sur le fitness et le métabolisme d'*Enterococcus faecalis* chez l'hôte**

Nous avons mis en évidence dans cette première publication que le système FhtR lie l'hème et que HrtBA est exprimé chez *E. faecalis* dans le tractus digestif de la souris ainsi que dans les fèces. Parmi les sources d'hème présentes dans le tractus digestif, j'ai montré que l'hème de l'hémoglobine du sang et d'*E. coli* était internalisé par *E. faecalis*.

Cette observation amène de nouvelles questions sur l'importance d'un tel système pour la bactérie dans cet environnement. Premièrement le modèle utilisé dans notre article est un modèle de transit, une deuxième approche intéressante serait d'étudier l'activité de notre système dans un modèle de colonisation du tractus digestif (Kommineni et al., 2015). De plus dans ces deux modèles, un deuxième objectif serait de déterminer l'impact de FhtR et de HrtBA mais aussi de la catalase A sur la survie et la colonisation d'*E. faecalis*. Des tests *in vitro* de culture dans différents milieux (milieu supplémenté en hème, eau fécale...) où la souche WT serait en compétition avec les différents mutants ( $\Delta fhtR$ ;  $\Delta hrtBA$ ;  $\Delta fhtR\Delta hrtBA$ ) pourrait être une première approche afin de déterminer si l'expression du régulateur ou du transporteur est un avantage dans un contexte de compétition. Dans un deuxième temps, une étude *in vivo* dans le tractus digestif des différents mutants permettrait de déterminer l'importance de ces gènes pour *E. faecalis* dans le microbiote intestinal.

Certes *E. faecalis* est une bactérie commensale du microbiote intestinal mais elle est aussi un pathogène opportuniste pouvant provoquer des endocardites et des bactériémies (Agudelo Higuera and Huycke, 2014; Selleck et al., 2019) ; deux types d'infections où la bactérie est en contact avec une grande quantité de sang qui représente la réserve la plus importante en hème dans l'organisme (**voir Synthèse bibliographique B.3.1.**). Il a déjà été montré chez *S. agalactiae* que le transporteur d'efflux HrtBA est crucial pour la survie et donc la virulence de la bactérie dans des organes riches en sang (Joubert et al., 2017). Une première approche *in vitro* dans des milieux supplémentés soit en hémoglobine ou en sang pourra être envisagé pour déterminer si le système FhtR/HrtBA apporte un avantage dans la survie bactérienne. Puis il sera intéressant d'étudier l'importance de FhtR et HrtBA chez *E. faecalis* dans des modèles animaux d'infection (Gentry-Weeks et al., 2003).

### **B.3. Autres gènes impliqués dans la résistance à l'hème chez *E. faecalis***

L'analyse RNAseq de *E. faecalis* en présence d'hème a mis en évidence 2 groupes de gènes qui semblent induits par l'ajout d'hème dans le milieu de culture et qui codent pour des transporteurs d'efflux. Certains de ces gènes ont des similarités de séquence avec le système Pef de *S. agalactiae* ayant un rôle dans la régulation de la toxicité de l'hème chez cette bactérie (Fernandez et al., 2010). Ces résultats suggèrent l'existence d'autres systèmes de transport d'efflux qui pourraient être impliqués dans le contrôle de l'homéostasie de l'hème. De plus, ces deux systèmes de transports sont régulés par un régulateur TetR et un régulateur de la famille MerR qui pourraient être de nouveaux senseurs d'hème. Il sera intéressant de vérifier ces hypothèses qui permettront d'élucider l'ensemble des mécanismes mis en jeu par *E. faecalis* ainsi que les relations entre l'ensemble de ces systèmes, leurs importances, leurs hiérarchies et leurs impacts dans la réponse à l'hème d'*E. faecalis*.

## Projet 1

## Projet 2 : Mécanisme du sensing de l'hème par HssS

### A. Résultats

#### A.1. Contexte

*Staphylococcus aureus* est une bactérie commensale des muqueuses et de la peau chez l'homme mais représente aussi une menace pour la santé mondiale. C'est un pathogène opportuniste responsable de simples infections superficielles mais aussi de septicémies. De plus au cours des dernières décades, *S. aureus* a acquis de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques rendant le traitement des infections à difficiles dans certains cas (Chalmers and Wylam, 2020; Cong et al., 2020). C'est pour ces raisons que *S. aureus* fait partie des bactéries considérées par l'OMS et l'Union Européenne comme hautement prioritaires dans la recherche de nouveaux traitements. Dans ce contexte, la recherche de nouvelles cibles antibiotiques est prioritaire.

*Staphylococcus aureus* est capable de synthétiser l'hème mais aussi de l'importer du milieu extracellulaire (système Isd, **voir Synthèse bibliographique B.3.4.1.**). Le système Isd étant induit en carence de fer et étant couplé à des oxygénases d'hème, l'import d'hème par ce système est considéré principalement comme une source de fer pour *S. aureus* (Wright and Nair, 2012). Néanmoins, un mutant de *S. aureus* qui ne peut pas synthétiser l'hème peut respirer en présence d'hème exogène, démontrant la molécule peut être internalisée pour être utilisée intacte (Hammer et al., 2013). *S. aureus* utilise l'hème dans différentes voies métaboliques (Reniere et al., 2007), cofacteur de protéines impliquées dans la chaîne respiratoire (oxydases terminales ou NO synthase) ou la résistance au stress oxydant (catalase à hème ou coprohème décarboxylase). Comme toutes les bactéries, *S. aureus* est aussi confrontée à la toxicité de l'hème et il a été démontré que cette bactérie possède un système d'efflux de l'hème, HrtBA dont l'expression est contrôlée par un 2-CS HssRS (Stauff and Skaar, 2009)(**Synthèse bibliographique B.4.3.3.**). Des expériences *in vivo* ont montré l'impact du transporteur HrtBA dans la virulence de *Streptococcus agalactiae* (Joubert et al., 2017).

## Projet 2

Mon second projet de recherche consistait à déterminer le mécanisme de détection de l'hème par l'histidine kinase HssS. Ce projet a pour finalité la recherche de molécules qui bloqueraient l'activation de HssS par l'hème et donc l'expression de HrtBA, diminuant les capacités d'adaptation de *S. aureus* et donc sa virulence lors de l'infection. Mon travail centré sur la compréhension au niveau moléculaire de la détection de l'hème par le senseur HssS est le sujet de ma deuxième publication : « Intracellular heme controls the histidine kinase HssS activity in *Staphylococcus aureus*. A new paradigm of efflux regulation by two-component system».

### **A.2. Publication 2 : L'hème intracellulaire contrôle l'activité de l'histidine kinase HssS de *S. aureus***

#### **A.2.1. Résumé**

HssS a été classée dans les 2-CS à senseurs extracellulaire à cause de sa topologie (boucle extracellulaire de 135 AA ; voir **Synthèse bibliographique B.4.3.3.**) et de résultats montrant la nécessité de certains AA de la boucle extracellulaire dans la détection de l'hème par HssS (Mike et al., 2013). L'étude de l'activité du promoteur de *hrtBA* grâce à des plasmides rapporteurs dans des conditions où la concentration en hème intracellulaire est modifiée a permis de démontrer que HssS réagissait à l'hème intracellulaire et non pas extracellulaire. De plus l'analyse de l'activité d'une protéine HssS tronquée de sa partie extracellulaire ou l'expression de la partie cytoplasmique de HssS, nous a permis de déduire que cette boucle extracellulaire n'est pas indispensable au sensing de l'hème par HssS. Enfin la production et l'étude de la partie cytoplasmique de HssS a permis de prouver que le domaine cytoplasmique de HssS est capable de lier l'hème. L'ensemble de ces résultats démontrent que le système de détoxification de l'hème comprenant le transporteur HrtBA et le 2-CS HssRS chez *S. aureus* répond à la concentration d'hème intracellulaire.

#### **A.2.2. Manuscrit**

# Intracellular heme controls the histidine kinase HssS activity in *Staphylococcus aureus*: A new paradigm of efflux regulation by two-component system.

**Vincent Saillant<sup>a</sup>, Damien Lipuma<sup>a</sup>, Alain Boussac<sup>b</sup>, Laetitia Dupont<sup>a</sup>, Philippe Delepelaire<sup>c</sup>, and Delphine Lechardeur<sup>a#</sup>**

<sup>a</sup>Micalis Institute, INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France.

<sup>b</sup>I2BC, CNRS UMR 9198, CEA Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette, France.

<sup>c</sup>Université de Paris, LBPC-PM, CNRS, F-75005, Paris, France; Institut de Biologie Physico-Chimique, F-75005, Paris, France.

<sup>#</sup>Address correspondence: [delphine.lechardeur@inrae.fr](mailto:delphine.lechardeur@inrae.fr)

Running title: Intracellular heme activates HssS

<sup>1</sup> In this report, heme refers to iron protoporphyrin IX regardless of the iron redox state, whereas hemin refers to ferric iron protoporphyrin IX.

## Intracellular heme activates HssS

### Abbreviations:

ALA:  $\delta$ -aminolevulinic acid

Bgal: B-galactosidase

ECD: Extracellular Domain

EPR: Electron Paramagnetic Resonance

HAMP: Histidine kinases, Adenyl cyclases, Methyl-accepting proteins and Phosphatases

HK: Histidine kinase

Hrt: Heme-regulated transport

HssS: Heme sensing system Sensor

HssR: Heme sensing system Regulator

HrtR: Heme-regulated transport Regulator

IM-HK: Intramembrane Histidine Kinase

ROS: Reactive oxygen species

TCS: Two-component system

TM: Transmembrane

WB: Western blot

**Abstract**

*Staphylococcus aureus* causes a wide range of opportunistic infections that range from superficial skin infections to life-threatening diseases, including endocarditis, pneumonia, and septicemia. A critical determinant for a successful infection is the capacity of the bacteria to scavenge host heme as a source of iron while overcoming its toxicity. *S. aureus* responds to heme through the heme sensing system (HssRS) two-component system which controls the expression of the conserved heme-regulated ABC transporter HrtBA, a heme specific efflux pump. Thus, the heme sensor protein HssS, a membrane anchored prototypical histidine kinase, plays an essential role in controlling heme intracellular homeostasis. In this work, we show that the sensing function of HssS is not associated with the extracellular but rather with its cytoplasmic domain, as indicated by the following data: (i) HssS was stimulated by changes in intracellular heme concentrations ie located at the same side as the cytoplasmically located catalytic domains of HssS; (ii) the mutant HssS  $\Delta$ ECD missing the major part of the periplasmic loop was still able to respond to the stimulus exerted by heme; (iii) the cytoplasmic domain of HssS is a heme-binding protein; iv) within the cytoplasmic parts of HssS, which are possible candidates for the binding of heme, the HAMP domain does not seem to be essential for the binding and sensing processes. Thus we postulate that HssS belongs to a class of histidine kinases that sense environmental heme at cytoplasmic protein domains independently of the extracellular loop and the HAMP domain. Furthermore, as heme needs to be internalized to activate HssS, our findings places HrtBA mediated heme efflux at the forefront of heme fluxes control in *S. aureus*.

## Introduction

*Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacteria that asymptotically colonizes the skin and nostrils of nearly one-third of the human population [1]. However, this organism is also a pathogen that has the ability to breach the host defensive barriers to cause invasive diseases such as endocarditis, toxic shock syndrome, osteomyelitis, and sepsis [1]. As most pathogens, to achieve a successful infection, *Staphylococcus aureus* combines the production of numerous virulence determinants including toxins, immune-modulatory factors, exoenzymes and the expression of several mechanisms of adaptation to the host hostile environment [2-4].

Heme, an iron containing tetrapyrrole is an abundant molecule in the host, especially in the blood, as the cofactor of hemoglobin [5]. The importance of heme as an essential prosthetic cofactor resides in the unique properties of its iron center, including the capacity to undergo electron transfer, perform acid-base reactions, and interact with various coordinating ligands [5, 6]. Yet, redox reactions of heme iron with oxygen generate reactive oxygen species (ROS) which are responsible of damages to proteins and DNA [6, 7].

In addition to utilizing heme as a nutrient iron source, *S. aureus* can employ both endogenously synthesized and exogenously acquired heme as a respiratory cofactor [8-10]. As a hydrophobic and cytotoxic species, heme concentration and availability must also be tightly regulated. *Staphylococcus aureus* mediates exogenous heme scavenging and acquisition with the iron-regulated surface determinant system (Isd) [11-15]. The Fur regulated Isd import machinery comprises, i- 4 cell wall-proteins (IsdABCH) responsible for hijacking heme from hemoglobin and for shutteling it to the membrane anchored IsdC heme receptor for transport across the membrane; ii- by the ABC transport system (IsdDEF) and two cytoplasmic heme-oxygenases (IsdG and IsdH) [9, 14, 16-18]. A conserved strategy for heme detoxification and homeostasis in *S. aureus* involves a heme-regulated efflux pump (HrtBA; Heme-regulated transport), also identified in *Lactococcus lactis*, *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus anthracis*,

and *Corynebacterium diphtheriae* [19-21]. HrtBA is a MacB like ABC transporter which expression in numerous Gram positive pathogens is managed by HssRS (Hss; heme sensing system), a two-component system (TCS) [21-24]. HssS senses heme present in the environment and transduces the signal to HssR, the regulator of HrtBA [21, 23, 25]. HrtBA, as a specific heme efflux systems, prevents heme toxic accumulation in membrane and in cytosol compartments [20, 26, 27 ].

HssS is a membrane anchored prototypical histidine kinase with a short Nt cytoplasmic domain, 2 transmembrane helices (TM) flanking a 133 AA extracellular domain [23]. The Ct cytoplasmic domain is organized in structurally conserved modules. The HAMP domain (present in Histidine kinases, Adenylate cyclases, Methyl accepting proteins and Phosphatases) connects the second TM to the dimerization and histidine phosphorylation domain (HisKA). A catalytic and ATP-binding (HATPase c) domain lies at the carboxyl terminus. Upon activation, HssS undergoes autophosphorylation of the His 249 residue and subsequently transfers the phosphoryl group the Asp 52 residue of its partner, the HssR response regulator [23]. As HssS is activated by environmental heme, it is assumed that the HK extracellular domain (ECD) harbors the sensing function. Mutations of single amino-acids residues required for HssS heme sensing were identified in the extracellular domain of the membrane anchored protein, classifying HssS into the family of sensors carrying the sensing domain within the extracellular domain [23]. In contrast, indirect evidences let us recently conclude that intracellularly internalized, rather than extracellular heme is the activating signal for HssS in *S. agalactiae* [26]. This hypothesis raises the question of what means are involved in HssS, the heme-sensing histidine kinase (HK) to transduce the heme signal to induce *hrtBA* expression.

In this work, we describe, in *S. aureus*, the sensing mechanism by which HssS induces the expression of HrtBA, a conserved heme efflux transporter. Using *in vivo* and *in vitro* evidences, we show that the heme signal input locates at the cytoplasmic side of HssS by direct

### **Intracellular heme activates HssS**

binding. These findings establish this system as a master mechanism of control of intracellular heme availability independently of heme scavenging and acquisition by Isd. Our conclusions further add to the understanding of signal recognition in TCS biology, as a paradigm of regulation of efflux transporters implicated in detoxification of exogenous stressors.

## Results

### In *S. aureus* HG001 strain, $P_{hrtBA}$ induction is a specific reporter of HssRS heme sensing and signaling

In the *S. aureus* HG001 strain, Bgal expression from *hrtBA* promoter reporter,  $P_{hrtBA}$ -*lac* responded linearly as a function of exogenously supplied heme concentrations as reported previously in *S. aureus* Newman strain (Fig. 1A) [21]. The *hssS* gene is found as a bicistronic operon together with *hssR* (*hssRS*) that is transcribed divergently from adjacent *hrtBA* operon [21]. In comparison, *hssRS* promoter ( $P_{hssRS}$ ) activity was low and independent of heme concentration (Fig. 1A). Constitutive expression of HssS was also verified on Western Blot (WB) with an anti-HssS antibody (Fig. 1B). The possibility that another TCS could cross-signals with the heme sensing TCS HssRS was discarded as  $P_{hrtBA}$  was not induced in HG001  $\Delta hssRS$  strain (Fig. S1). In HG001 *S. aureus*,  $P_{hrtBA}$  induction thus functions similarly as a specific reporter of HssRS heme sensing and signaling.

### HssS activation depends on intracellular heme concentration

To investigate whether HssS may be stimulated by the pool of internalized heme in *S. aureus*, we measured  $P_{hrtBA}$  induction in conditions where intracellular heme levels were modified. Deletion of *hrtBA*, led to heme hypersensitivity (Fig. S2) that correlated to accumulation of intracellular heme as verified with the HrtR intracellular plasmid heme sensor  $P_{hrt}hrtR$ -*lac*. HrtR was able to detect endogenously synthesized heme in *S. aureus* as shown by the significant level of Bgal induction in absence of exogenous heme (Fig. 2A). HrtR induction was about twice more in  $\Delta hrtBA$  compared to WT HG001 strain (Fig. 2A). Similarly, accumulation of intracellular heme concentration shown to greatly impact HssS activation as  $P_{hrtBA}$ -*lac* expression was about 4 times higher in  $\Delta hrtBA$  compared to WT strain (Fig. 2B). Overinduction of  $P_{hrtBA}$  in  $\Delta hrtBA$  did not result from modification in the kinetics of HssS

### Intracellular heme activates HssS

activation as shown by the comparable expression dynamics of GFP in WT and  $\Delta hrtBA$  HG001 strains transformed with a fluorescent reporter construct (pP<sub>hrtBA</sub>-GFP) (Fig. 2C). In both WT and  $\Delta hrtBA$  strains, P<sub>hrtBA</sub> temporal response to subtoxic amounts of hemin is similar and nearly instantaneous, reaching a fluorescence emission maximum within the 2 first hours of induction (Fig. 2C). The response output was bell shaped with a fast increase followed by a slower decrease of fluorescence emission illustrating a high and transient P<sub>hrtBA</sub> transcriptional activity followed and suggesting a negative feedback independent of intracellular heme regulation via HrtBA (Fig. 2C). When heme reaches toxic concentrations, P<sub>hrtBA</sub> kinetic response is delayed according to the induced growth delay (Fig. S2B). Heme intracellular accumulation upon deletion of *hrtBA* resulted in higher fluorescence peak values compared to the WT strain. As fluorescence value at one particular time point reports all of the accumulated outputs of promoter activity prior to that time point, these results confirm that HssS is activated by internalized hemin. In line with this observation, the GFP output dynamics by the intracellular sensor HrtR (from P<sub>hrt</sub>*hrtR*-GFP) overlapped that from HssS mediated heme signaling (Fig. 2D). Thus, activation of HssS by intracellular heme input best reflects the observed dynamics of P<sub>hrtBA</sub> activation.

### Increase of endogenous heme biosynthesis triggers HssS activation

To further discriminate extracellular from intracellular heme, endogenous heme production was augmented by adding a precursor of the heme synthesis pathway,  $\delta$ -aminolevulinic (ALA) acid, to the culture medium [28]. The increase of the intracytoplasmic heme concentration upon ALA treatment was detectable with HrtR (Fig. S3). ALA led to significant P<sub>hrtBA</sub>-driven  $\beta$ gal expression suggesting that HssS is sensitive to changes in intracellular heme biosynthesis and concentration (Fig. 3A). The dynamics of P<sub>hrtBA</sub> response to ALA was also studied in WT HG001(pP<sub>hrtBA</sub>-*gfp*) (Fig. 3 B). Addition of the heme precursor

led to an increase of GFP expression later in growth compared to the addition of exogenous hemin suggesting that HssS activation correlates to the accumulation of endogenously biosynthesized heme (Fig. 3C). Altogether, these results suggest that similarly to HrtR, HssS is activated in response to internalized rather than exogenous heme input in *S. aureus*. Based on these observations, we conclude that HssS can detect and respond to heme present within the intracellular space.

### **The extracytoplasmic domain is not critical for HssS activation by heme**

The impact of removing the extracellular domain (ECD) domain of HssS on heme signal transduction was investigated. A HG001  $\Delta hssRS$  mutant strain was transformed with a plasmid carrying the *hssRS*-HA operon (*phssRS*-HA) or a truncated version of *hssS* lacking most of the extracellular domain corresponding to the AAs [50-140] (*phssRS*-HA  $\Delta$ ECD). Expression and subcellular localization of HssS-HA  $\Delta$ ECD compared to its full length counterpart was verified on WB using an anti-HA antibody following cell fractionation (Fig. 4A). Removal of the ECD did not disrupt targeting of HssS to the membrane as seen by enriched association of both proteins to this fraction compared to the cytoplasmic fraction (Fig. 4A). Expression of the  $\Delta$ ECD variant compared to the full length (FL) protein was lower, possibly suggesting differences in protein stability (Fig. 4A). The ability of HssS-HA  $\Delta$ ECD to detect and transduce heme signal to HrtBA expression was investigated. As expected, complementation of the mutant  $\Delta hssRS$  strain with *hssRS*-HA strongly diminished hemin toxicity as seen by the shorter growth delay induced by 10  $\mu$ M heme addition to the medium of HG001  $\Delta hssRS$ (*phssRS*-HA) compared to HG001  $\Delta hssRS$  (pAW8) (Fig. 4B). In the same conditions, the strain expressing the  $\Delta$ ECD HssS variant showed greater heme resistance than the  $\Delta hssRS$  parent strain (Fig. 4A et 4B). Growth was slightly slower compared to the strain expressing full length HssS, which may arise from decreased HssS  $\Delta$ ECD expression compared to the full length version (Fig. 4B).

## Intracellular heme activates HssS

These results suggest that ECD deletion does not abolish HssS heme sensing ability to induce HrtBA expression.

To further ascertain that  $\Delta$ ECD HssS responds to heme, a plasmid carrying *hssRS* or *hssRS*  $\Delta$ ECD, also carrying a *hrtBA* promoter fusion to GFP ( $P_{\text{hrtBA}}$ -GFP), which was used as intracellular heme sensor was established in HG001 $\Delta$ *hssRS*. In the strain expressing full length HssRS and the  $P_{\text{hrtBA}}$ -GFP heme sensor, hemin addition induced a fluorescent peak (Fig. 4C). The heme response kinetic remained essentially the same in the strain expressing HssRS-HA  $\Delta$ ECD (Fig. 4C). It is plausible that the decrease of the GFP intensity compared to FL HssS is related to its observed lower expression (Fig. 4A and 4C). Taking into account its lower expression, HssS- $\Delta$ ECD and WT HssS appear to have equivalent functions. Thus, we postulate that HssS, similarly, belongs to a class of histidine protein kinases that sense environmental changes at intracellular protein domains independently of the extracellular loop. To further visualize the impact of ALA on HssS  $\Delta$ ECD, GFP expression from  $P_{\text{hrtBA}}$  reporter fusion was assessed on plates (Fig. 4D). Fluorescence significantly increased in both strains grown with 1 mM ALA, further highlighting the capacity of HssS  $\Delta$ ECD to be stimulated by intracellular heme (Fig. 4D). Based on these independent proofs, we conclude that HssS, while expressed at the membrane, are stimulated through their intracellular domain.

## The cytoplasmic domain of HssS binds heme

The above findings led us to ask whether the HssS cytoplasmic domains have heme binding activities. Unlike many histidine kinases that are activated by multiple substrates, HssRS TCS is stimulated solely by metal porphyrins (not shown and [9, 21]). Moreover, the observation that the metal porphyrin, Ga-PPIX, was able to activate HssS excluded the implication of oxidative stress generated by heme iron as the input (Fig. S4) and [9, 21]). The specific chemical nature of the activator made it likely that it binds a specific site within the

HssS cytoplasmic domain (HssS<sub>cyto</sub>). Amino acids [188-457] corresponding to the predicted cytoplasmic domains of HssS, were cloned at the C-terminus of the maltose-binding protein (MBP-HssS<sub>cyto</sub>) and purified from *E. coli*. MBP-HssS<sub>cyto</sub> mixed with equimolar amounts of hemin exhibited a UV-visible spectrum at pH 7.4 with a Soret band at OD<sub>414</sub> and  $\beta/\alpha$  bands at 530 and 558 nm, respectively (Fig. 5A). These spectral features are consistent with ferric hexacoordinate low-spin binding through the iron center. This result was further confirmed by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy (see below). Reduction of the complex with dithionite resulted in a Soret band shift from 414 nm to 426 nm, indicating that MBP-HssS<sub>cyto</sub> was complexed to Fe<sup>3+</sup> hemin in solution (Fig. S5A). Purified MBP-HssS<sub>cyto</sub> from *E. coli* did not contain hemin in standard culture conditions but coeluted with hemin when ALA was added to culture medium (Fig S5B). Size-exclusion chromatography was performed to verify that MBP-tagged HssS<sub>cyto</sub> proteins eluted as a dimer, as reported for most histidine kinases (Fig. 5B) [29]. Apo-MBP-HssS[188-457] molecules were separated into 2 populations with distinct sizes corresponding to the size of the dimer (144 kDa) for the predominant peak and a smaller amount of monomer (72 kDa) (Fig. 5B). Elution profile of the holo-MBP-HssS[188-457] was essentially the same compared to the apoprotein and hemin as seen at 410 nm, was eluted together with the dimer suggesting a (Fig. 5B). Utilizing the difference of the Soret band peak of free and MBP-HssS[188-457]-bound hemin, spectrophotometric titration with increasing amounts of hemin was carried out at 414 nm (Fig. 5C). The saturation point, as determined by titration, was around 20  $\mu$ M hemin for 20  $\mu$ M protein, indicating that HssS[188-457] binds one molecule of hemin per monomer (Fig. 5C). Titration curves were fitted to a one binding site model which accounts for the protein concentration to determine the dissociation constant [20]. The dissociation constant  $k_d$  value of the MBP-HssS[188-457]-hemin complex was 2.5  $\mu$ M  $\pm$  0.08  $\mu$ M (mean  $\pm$  S.D.; n=6). Finally, to generalize our findings to HssS from other *Staphylococci*, we checked the ability of HssS cytoplasmic domains from *Staphylococcus*

## Intracellular heme activates HssS

*epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* to bind heme (Fig. S6). UV-visible spectra showed spectral features similar to that of HssS<sub>cyto</sub> from *S. aureus*, further establishing HssS as a heme-binding protein (Fig. 5D). Thus, we postulate that HssS belongs to a class of histidine protein kinases that sense environmental changes at cytoplasmic protein domains through direct binding to its input, heme.

### The HAMP domain of HssS is not implicated in heme binding

The HAMP domain mediates input-output signaling in histidine kinases and is implicated in the activation a series of kinases [30]. The HAMP domain corresponding to the AAs [188-233] was deleted in HssS<sub>cyto</sub> and HssS<sub>cyto</sub>ΔHAMP was expressed as a MBP fusion protein that was purified as a dimer as MBP-HssS<sub>cyto</sub> (Fig. S5C). MBP-HssS<sub>cyto</sub>ΔHAMP was still able to bind hemin as seen by the Soret band and absorption features similar to that of MBP-HssS<sub>cyto</sub> (Fig. 6A). Purified MBP-HssS<sub>cyto</sub>ΔHAMP from *E. coli* coeluted with hemin when ALA was added to culture medium similarly to MBP-HssS<sub>cyto</sub> (Fig S5D). To further confirm these data, EPR spectroscopy of MBP-HssS<sub>cyto</sub> and MBP-HssS<sub>cyto</sub>ΔHAMP bound to hemin showed that 2 spectra are very similar with a mixture of high spin and low spin forms (Fig. 6B). The *g* values of MBP-HssS<sub>cyto</sub> in the low spin state were  $g_z = 2.97$ ,  $g_y = 2.26$  and  $g_x = 1.49$  and the high spin state exhibited spectral features at 6.55, 6.20 and 5.15. The relative proportion of the high spin form increased in MBP-HssS<sub>cyto</sub>ΔHAMP thus suggesting that the pentacoordinated ligation of the heme iron slightly increased whereas the hexacoordinated ligation of the heme iron was favored in HssS<sub>cyto</sub>. Altogether, these data suggest that heme binds to the Ct Dhp or CA domains of HssS.

### The cytoplasmic domain of HssS mediates heme sensing

To further establish the essential role of the cytoplasmic domain of HssS in heme sensing, HG001 $\Delta$ *hssRS* transformed with plasmids carrying *hssRS*<sub>cyto</sub>-HA or *hssRS*<sub>cyto $\Delta$ HAMP</sub>-HA together with *hrtBA* promoter fusion to GFP (*phssRS*<sub>cyto</sub>-HA, P<sub>hrtBA</sub>-GFP and *phssRS*<sub>cyto $\Delta$ HAMP</sub>-HA, P<sub>hrtBA</sub>-GFP), were established in HG001 $\Delta$ *hssRS* strain. Both complemented strains were able to withstand hemin toxicity similarly as  $\Delta$ *hssRS*(*phssRS*-HA, P<sub>hrtBA</sub>-GFP) (Fig. 7A). These results suggest that HssS<sub>cyto</sub> and HssS<sub>cyto $\Delta$ HAMP</sub> are able and transduce heme signal leading to HrtBA expression. The ability of these truncated variants of HssS to respond to the addition of heme in the medium were compared to HssS full length (Fig 7B-D). HssS<sub>cyto</sub> and HssS<sub>cyto $\Delta$ HAMP</sub> were both able to respond to increasing heme concentrations with similar dynamics compared to HssS WT suggesting that the heme sensing function is essentially maintained in these truncated HssS. We conclude, that cytoplasmically expressed HssS can be is activated in presence of heme. Altogether, these results correlate heme binding *in vitro* to heme sensing *in vivo*.

### Isd-mediated heme internalization and HssS response to intracellular heme are independent

Our findings that the pool of intracellular heme is the input signal of heme activation imply that heme internalization is a prerequisite to the expression of HrtBA, which in turn controls intracellular heme homeostasis. The iron-regulated surface determinant system (Isd), first described in *S. aureus* is the paradigm for Gram-positive heme acquisition. The Isd system enables utilization of free heme, or heme bound by hemopexin (Hx), free Hb (Hb) and free Hb. Isd expression is induced by iron depletion via the Fur regulator. Strikingly, we observed hemin internalization as seen with the HrtR intracellular sensor in iron rich medium BHI that contains 17-25  $\mu$ M iron [31 , 32] (Fig. 1) or CDM that contained about 150 nM iron [33]. To ascertain the relationship between isd mediated heme import and HssS activation, we compared

### Intracellular heme activates HssS

the dynamics of HssS activation using WT HG001(pP<sub>hrtBA</sub>-GFP) in iron deprived (+10  $\mu$ M EDDHA) or iron supplemented (+10  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>) CDM (Fig. 8A and 8B). P<sub>hrtBA</sub> induction fluorescence profile remained similar in presence or absence of iron suggesting that heme intracellular content was independent of the expression of Isd transport system in our conditions (Fig. 8A and 8B). Accordingly, the dynamics of P<sub>hrtBA</sub> induction in the USA300 *isdF* mutant compared to the WT did not modify heme sensing from heme (Fig. 8C). Our findings suggest that the heme pool that activate HssS is internalized by a new pathway of heme entry into the intracellular space of *Staphylococcus aureus*.

## Discussion

The dichotomy between toxicity and benefits of heme explains the need for strict management of intracellular heme pools, which may be crucial during infection [11]. In bacterial pathogens, homeostasis is mediated by heme efflux *via* HrtBA, whose expression is regulated by HssRS. In this study, we provide an array of insights into TCS biology by dissecting the heme sensor HssS signaling mechanism. The combination of biochemical and genetic approaches employed here have enabled to define a mechanism by which *Staphylococcus aureus* senses and responds to toxic heme, a molecule that is abundant in the host environment. Our experimental results give strong support that cellular, and not extracellular, heme pools control induction and heme efflux shedding new light on a detoxification mechanism in a pathogen.

Our results are therefore in line with previous conclusions on HrtBA regulation in *Streptococcus agalactiae* [26]. While our results suggest that the ECD of HssS is not implicated in heme signal recognition, this  $\approx 133$  AAs long domain is reduced to only 19 amino-acid residues, raising doubts on the role of extracellular heme in its activation [26]. In line, *hrtBA* expression level was correlated to intracellular heme concentration suggesting that intracellular, rather than extracellular heme is the activating signal [26]. In *Lactococcus lactis*, HrtBA is regulated by the TetR transcription factor HrtR by direct heme binding, implicating a regulation by cytoplasmic heme [20]. It is tempting to speculate that whatever the control mechanism involved, heme efflux mediated by HrtBA is controlled by the pool of internalized heme as a main strategy to maintain intracellular heme homeostasis in Gram positive pathogens. Few membrane anchored histidine kinase have been identified with the input domain located at the cytoplasmic side [34]. Their activation often rely on a PAS or GAF signaling domain. An example is the *Bradyrhizobium japonicum* FixL which uses a PAS domain to bind heme as a cofactor to sense oxygen [35]. In the extensively studied ArcB redox sensor, a putative cytoplasmic PAS sensor domain contains redox-active cysteine residues and is regulated by

### Intracellular heme activates HssS

changes in redox state that trigger cytosol-located redox-active cysteine residues [36, 37]. Osmoregulated two-component systems seem to use an internal stimulus for the detection of osmotic stress : MtrB is stimulated by a broad variety of chemically different solutes [38]; EnvZ, KdpD, and CpxA were shown to detect osmotic stress by sensing the increasing concentrations of monovalent cations [37, 39]. For the first time, we show intracellular sensing of an organic molecule from the host by direct binding by a membrane anchored histidine kinase.

Recently, we and others demonstrated that HrtBA controls not only intracellular homeostasis but also membrane-localized heme pools concentrations, thus providing a mechanistic explanation for the role of HrtBA in regulating heme toxicity [27, 40]. HrtBA is a member of the MacB family of efflux-pumps that is distinct from other structurally characterized ABC transporters [41]. A model based on MacB transport of antibiotics and antimicrobial peptides in *Streptococcus pneumoniae* is compatible with our observations: substrates would enter MacAB permeases laterally from the membrane limiting their entry into the cytoplasm [42]. Based on the previous and present data [27], we propose that HrtBA has the integral role as heme “gatekeeper” in the cell. Like MacB antibiotics and antimicrobial substrates [43], membrane-bound heme could either enter passively into the intracellular compartment, and or be effluxed by HrtB before this step. This alternative model would also be compatible with our observations that exogenous heme is internalized in *S. aureus* independently of the Isd system in our experimental conditions. Thus our experimental evidences combined with the hypothesis that HrtBA could prevent heme accumulation and transfer across the membrane, similarly to other MacAB or MDR (multidrug transporters), strongly support that heme import fluxes are, at least in part, managed by HrtBA.

The question arise from these findings as if the sensing mechanism of HssS could represent a general functional principle for other histidine protein kinases involved in the adaptation to membrane stresses ? The question of the location of the input domain is particularly pertinent for substrates that control efflux transporters of substrates originating from outside of the bacteria such as drugs including antibiotics. Detoxification modules that comprise an efflux transporter controlled by a TCS have been reported. These detoxification modules the TCS respond to the extracellular presence of antimicrobial compounds [44-46] . Upon activation, they upregulate the expression of ABC transporters encoded by neighboring, usually downstream, genes [34, 47, 48]. The ABC transporter then facilitates removal of the harmful drug, thereby removing the initial stimulus of the system, which finally shuts down again [34, 45]. Interestingly, in this systems, the sensor kinases lack an obvious input domain. One of the best-characterized examples is the bacitracin resistance module BceRS-BceAB of *Bacillus subtilis*. Strikingly, in this system, the ABC transporter and TCS have an absolute mutual requirement for each other in both sensing of and resistance to bacitracin, suggesting a novel mode of signal transduction in which the transmembrane domains of the HK in interaction with permease constitutes the actual sensor [47]. These HK could thus be sensitive to the fluxes of substrates through the permease and are thus called intramembrane HK (IM-HK). A direct role of HrtBA in HssS activation seems unlikely since  $P_{\text{hrtBA}}$  is induced in the  $\Delta\text{hrtBA}$  mutant. Cytoplasmically expressed HssS was still able to signal heme discarding the possibility of a critical function of the transmembrane domain. We thus hypothesize that HssS is not activated similarly to IM-HK. Finally, HssS was not found in the list of the 10 TCS regulated by the *S. aureus* membrane regulator SpdC, a recently discovered membrane protein [49]. We thus propose a new paradigm of export system regulation by TCS intracellular sensing. Dissecting signaling determinants, further add to the understanding of specificity determinants in TCS

### **Intracellular heme activates HssS**

biology. Our work provides an opening to the possibility of greater variability of TCS detection strategies for substrate recognition.

## Materials and methods

### Bacterial strains

The strains and plasmids used in this work are listed in supplemental Table 1. Plasmid constructions procedures are outlined in the supplemental data. *Staphylococcus aureus* strain HG001, a derivative of the RN1 (NCT8325) strain with restored *rbsU* (a positive activator of SigB) [50]. HG001  $\Delta$ *hrtBA* and  $\Delta$ *hrssS* mutants construction are described in the Supplemental material section. *Staphylococcus aureus* USA300 FPR3757 (referred to as USA300) and the *isdJ::kan* transposon insertion mutant from the Nebraska Transposon Mutant Library (NTML) [51] were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC).

### Bacterial Growth Conditions and Media

*Staphylococcus aureus* HG001 and USA300 and their derivatives were grown as ON pre-cultures at 37°C in rich BHI liquid broth (DIFCO) supplemented with 0.2 % glucose with aeration by shaking at 200 rpm. Precultures were diluted in M17 medium supplemented with 1 % glucose for further use. When indicated, bacteria were plated on M17/agar plates supplemented with 1 % glucose. All growth assays were performed in a 96-well plate in 200  $\mu$ l of BHI. Optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) served as a measurement of growth and was measured every 15 min for the indicated total time in a microplate reader (Spark, Tecan). For fluorescence dynamics studies, *S. aureus* strains were grown a 96-well plate in 200  $\mu$ l CDM (chemically defined medium) as reported [33, 52]. OD<sub>600</sub> and fluorescence (Exc., 475 nm; Em., 520 nm) were measured every 5 min in a microplate spectrofluorimeter at 37 °C under constant orbital shaking (Spark, Tecan). CDM medium contained around 170 nM iron [33]. *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C with aeration by shaking at 180 rpm. When needed, antibiotics were used as follows: 50  $\mu$ g/ml kanamycin and 100  $\mu$ g/ml ampicillin for *E. coli*; 5  $\mu$ g/ml erythromycin and 5  $\mu$ g/ml tetracycline for *S. aureus*. Hemin was prepared from a stock solution of 10 mM hemin chloride dissolved in 50 mM NaOH; Frontier Scientific).

### Expression and purification of recombinant protein

*E. coli* Top10 transformed with pMBP-HssS<sub>cyto</sub> or pMBP-HssS<sub>cyto</sub>ΔHAMP was grown to OD<sub>600</sub> = 0.6 and expression was induced with 1 mM isopropyl 1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG) ON at RT. Cells were pelleted at 3500 g for 10 min, and then resuspended in 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, containing 1 mM EDTA (binding buffer), and disrupted with glass beads (Fastprep, MP Biomedicals). Cell debris was removed by centrifugation at 18000 g for 15 min at 4°C. MBP-tagged proteins were purified by amylose affinity chromatography (New England Biolabs) following manufacturer's recommendations. Briefly, the soluble fraction was mixed with amylose resin and incubated on a spinning wheel at 4°C for 1 h. The resin was then centrifuged, and washed 3 times with binding buffer. Purified proteins were eluted in binding buffer containing 10 mM maltose dialyzed against 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 and finally stored at -80°C. Protein concentrations were determined with the Lowry assay method (Biorad).

### Antibodies

Anti-HrtB antibody targeted to the extracellular domain of *S. aureus* HG001 HrtB was produced. The HrtB[45-236] fragment was purified from *E. coli* as a His-tagged antigen, purified from bacterial lysates on a nickel affinity resin (Sigma Aldrich) as described [20]. The resulting purified His-HrtB-ECL was used for rabbit antibody production (Covalab, France). Antiserum specificity was determined by Western blots using known amounts of purified His-HrtB-ECL proteins and bacterial lysates expressing HrtB. The polyclonal anti-GAPDH antibody was a generous gift from F. Götz (University of Tübingen, Germany) [53]. The polyclonal anti-HA antibody was from Life Technologies.

### Bacterial lysate and membrane isolation

Bacteria were pelleted by centrifugation and washed with PBS. Resuspended cells were then pelleted at 3,500 g for 10 min, resuspended in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl,

containing 0.2 % Triton (lysis buffer), and disrupted with glass beads (Fastprep, MP Biomedicals). Cell debris was removed by centrifugation at 18,000 *g* for 15 min at 4°C. To prepare membranes, bacterial lysates were prepared as above except that bacteria were lysed in 20 mM Tris-HCl pH 7.5. Lysates were then submitted to centrifugation at 100,000 *g* for 45 min at 4°C. Membranes pellets were resuspended in lysis buffer. Proteins were quantified by the Lowry Method (Biorad) and denatured in Laemmli sample buffer at 95°C for 5 min.

### **β-galactosidase assays**

*S. aureus* strains were grown to OD<sub>600</sub> = 0.5 and then incubated for 1 h with the indicated concentrations of hemin. β-galactosidase activity was quantified by luminescence in a infinite M200 spectroluminometer (TECAN, Austria) using the luminescence β-glo assay system as described [20].

### **Absorption spectroscopy**

Hemin binding affinity of MBP-HssS<sub>cyto</sub> was determined by adding 0.5 to 1 μl increments of a 200 μM hemin solution to cuvettes containing 100 μl test samples of 20 μM MBP-HssS<sub>cyto</sub> in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, or reference sample without protein. Spectra were measured from 350 nm to 700 nm in a UV-visible spectrophotometer Spark (Tecan). OD<sub>414</sub> was plotted against hemin concentration and data were fitted to a one-binding site model which accounts for the protein concentration to determine the dissociation constant as described previously [20]. Curves fitting to the one-binding site model with the equation described above was performed with the non-linear regression function of GraphPad Prism 7 software.

### **Electron paramagnetic resonance spectroscopy**

Cw-EPR spectra were recorded with a Bruker Elexsys 500 X-band spectrometer equipped with a standard ER 4102 (Bruker) X-band resonator, a Bruker teslameter, an Oxford Instruments cryostat (ESR 900) and an Oxford ITC504 temperature controller. The samples were frozen to 198 K in a dry ice ethanol bath and then transferred to 77 K in liquid N<sub>2</sub> prior to

### **Intracellular heme activates HssS**

the recording of the spectra. The spectra were recorded at  $-258^{\circ}\text{C}$  with a modulation amplitude of 25 G, a microwave power of 5 mW, a microwave frequency of 9.4 GHz and modulation frequency of 100 kHz.

**Acknowledgments.**

This work was supported by the HemeDetox - 17-CE11-0044-01 project by the French “Agence Nationale de la Recherche”. EPR experiments were supported in part by the French Infrastructure for Integrated Structural Biology (FRISBI) ANR-10-INBS-05. V. Saillant is the recipient of a doctoral fellowship from the French ministry of Research and Paris-Saclay University. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. We thank Dr. A. Gruss (INRAE, France), Dr. P. Arnoux (CNRS, France), G. Brandelet (CNRS, France) for their technical help and insightful comments on our work. We are grateful to A. Hiron (Université de Tours, France) and T. Msadek (Institut Pasteur, France) for the HG001  $\Delta hssRS$  *Staphylococcus aureus* strain and to Dr. F. Götz (University of Tübingen, Germany) for the generous gift of the anti-GAPDH antibody.

## Figure legends

**Figure 1. Distinct response of  $P_{hssRS}$  and  $P_{hrtBA}$  in presence of heme. (A) *hssRS* and *hrtBA* transcription regulation by exogenous heme.** *S. aureus* HG001 transformed with  $pP_{hssRS-lac}$  or  $pP_{hrtBA-lac}$  were grown in BHI to  $OD_{600} = 0.5$  prior addition of the indicated concentration of hemin for 1.5 h. B-gal activity was quantified by luminescence. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. \*\*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , Student's *t* test; ns, non significant, Student's *t* test. Result is representative of 3 independent experiments. (B) HssS and HrtB expressions in presence of heme determined by WB. *S. aureus* HG001 was incubated with 1  $\mu$ M hemin as in (A). WB on bacterial lysates was performed with anti-HA and anti-HrtB antibodies. Result is representative of 3 independent experiments.

**Figure 2. HssS activation is dependent on intracellular concentration of heme. (A)** Exogenous heme accumulates in the cytoplasm of the  $\Delta hrtBA$  mutant. *S. aureus* HG001 WT and  $\Delta hrtBA$  mutant transformed with  $pP_{hrt-hrtR-lac}$  were grown in BHI to  $OD_{600} = 0.5$  prior addition of the indicated concentration of hemin for 1.5 h. B-gal activity was quantified by luminescence. Note that without heme, Bgal expression is significant suggesting that HrtR can detect endogenously synthesized heme. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. \*\*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , Student's *t* test, Student's *t* test. Result is representative of 3 independent experiments. (B)  $P_{hrtBA}$  is overinduced in the  $\Delta hrtBA$  mutant. *S. aureus* HG001 WT and  $\Delta hrtBA$  strains transformed with  $pP_{hrtBA-lac}$  were grown in BHI to  $OD_{600} = 0.5$  prior addition of the indicated concentration of hemin for 1.5 h. B-gal activity was quantified by luminescence. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. \*\*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , Student's *t* test, Student's *t* test. Result is representative of 3 independent experiments. (C) Dynamics of  $P_{hrtBA}$  induction in WT and  $\Delta hrtBA$  strains to exogenous heme. *S. aureus* HG001 WT and  $\Delta hrtBA$  strains transformed with  $pP_{hrtBA-GFP}$  were diluted from an ON culture to  $OD_{600} = 0.05$  in CDM with the indicated concentration of hemin in a microplate

spectrofluorimeter Spark (Tecan). Both fluorescence (Exc: 475 nm; Em: 520 nm) and OD<sub>600</sub> were recorded every 5 min for the indicated time. Fluorescence (RFU) at each time point was divided by the corresponding OD<sub>600</sub>. Results of hemin induced fluorescence minus non-induced (background, 0 μM hemin) are displayed. Results represent the average from triplicate technical samples and are representative of 3 independent experiments. For clarity, S.D. are not shown.

**Figure 3. P<sub>hrtBA</sub> is induced by endogenous overproduction of heme.** WT strain transformed pP<sub>hrtBA</sub>-lac was grown for 16 h in BHI supplemented or not with 1 mM ALA to increase heme biosynthesis. B-gal activity was quantified by luminescence. Results represent the average ± S.D. from triplicate technical samples. \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ , Student's *t* test, Student's *t* test. Result is representative of 3 independent experiments. **(E)** Dynamics of the response of P<sub>hrtBA</sub> to endogenously stimulated heme biosynthesis. Fluorescence from *S. aureus* HG001 transformed pP<sub>hrtBA</sub>-GFP was recorded as in (B). Bacteria were grown in CDM supplemented or not with 1 mM ALA and 10 μM FeSO<sub>4</sub>. Both fluorescence and OD<sub>600</sub> were recorded as in Fig. 2 Results of ALA induced fluorescence minus non-induced (background, 0 μM hemin) are displayed. Results represent the average from triplicate technical samples and are representative of 3 independent experiments. For clarity, S.D. are not shown.

**Figure 4. The extracellular domain of HssS is dispensable for heme dependent activation.** **(A)** HssS ΔECD is expressed at the membrane. Δ*hssRS* HG001 transformed with either *phssRS*-HA or *phssRS*-HA ΔECD were grown in BHI to an OD<sub>600</sub> = 1. Whole cell lysate, isolated membrane and cytoplasm enriched fractions were processed for SDS-PAGE and immunoblot using an anti-HA antibody. An anti-GAPDH antibody was used as a marker of cytoplasm. Result is representative of 3 independent experiments. **(B)** HssS ΔECD signals heme detoxification. Δ*hssRS* HG001 transformed with either *phssRS*-HA, *phssRS*-HA ΔECD or empty vector (control) were diluted from ON cultures to an OD<sub>600</sub> = 0.01 and grown in BHI

### Intracellular heme activates HssS

with the indicated concentration of hemin in a microplate spectrophotometer (Spark, Tecan). OD<sub>600</sub> was recorded every 15 min for the indicated time. Results of bacterial growth minus medium background are displayed. Results represent the average  $\pm$  S.D from triplicate technical samples and are representative of 3 independent experiments. For clarity, one OD<sub>600</sub>  $\pm$  S.D per h is shown. **(C)** Dynamics of P<sub>hrtBA</sub> transcriptional response by HssS  $\Delta$ ECD HG001.  $\Delta$ *hssRS* mutant transformed with either *phssRS*-HA, P<sub>hrtBA</sub>-GFP or *phssRS*-HA  $\Delta$ ECD, P<sub>hrtBA</sub>-GFP were grown as in Fig. 2 in CDM supplemented with 5  $\mu$ M hemin. Fluorescence and OD<sub>600</sub> were determined as in Fig. 2. Results of hemin induced fluorescence/OD<sub>600</sub> minus non-induced (background, 0  $\mu$ M hemin) are displayed. The corresponding growth curves are shown. Results represent the average from triplicate technical samples and are representative of 3 independent experiments. For clarity, S.D. are not shown for clarity. **(D)** Visualization of HssS  $\Delta$ ECD activation in ALA treated bacteria.  $\Delta$ *hssRS* transformed with either *phssRS*-HA, P<sub>hrtBA</sub>-GFP or *phssRS*-HA  $\Delta$ ECD, P<sub>hrtBA</sub>-GFP were plated on BHI agar plates  $\pm$  1 mM ALA. Following ON incubation at 37°C, GFP fluorescence on whole plates was visualized with the IVIS 200 imaging system (acquisition time, 1s; binning 16).

**Figure 5. The cytoplasmic domain of HssS is a heme-binding protein.** **(A)** UV-visible absorption spectra of MBP-HssS<sub>cyto</sub> complexed with hemin. The cytoplasmic domain of HssS corresponding to the AAs [188-457] was purified from *E. coli* as a Nt MBP tagged protein. 20  $\mu$ M of MBP-HssS<sub>cyto</sub> were mixed with an equimolar concentration of hemin and normalized to OD<sub>280</sub> = 1. UV-visible spectra was obtained in a microplate spectrophotometer (Spark, Tecan) and background subtracted with the spectra of 20  $\mu$ M hemin. Inset, magnification of the 500-700 nm region. Results are representative of 3 independent experiments. **(B)** Size-exclusion chromatography of apo- and holo-MBP-HssS<sub>cyto</sub>. MBP-HssS<sub>cyto</sub> was purified and complexed with hemin as in (A). Apo and holo-MBP-HssS<sub>cyto</sub> in 100  $\mu$ l were loaded on a Superdex 200 Increase 10/300 GL gel filtration column (GE Healthcare) in 20 mM HEPES pH 7.2 containing

300 mM NaCl. Protein and heme contents in eluted fractions were analyzed at OD<sub>280</sub> and OD<sub>410</sub>, respectively. Results are representative of 3 independent experiments. Calibration of the column was performed with the Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare). **(C)** Titration of MBP-HssS<sub>cyto</sub> with hemin followed by absorbance at 414 nm. Increasing concentrations of hemin were added to 20 μM MBP-HssS<sub>cyto</sub> purified as in (A). OD<sub>414</sub> was plotted against hemin concentration. Curves are representative of 3 independent experiments and were fitted using the non-linear regression function of GraphPad Prism 7 software. **(D)** Comparative UV-visible absorption of MBP-HssS<sub>cyto</sub> from *S. aureus*, *S. haemolyticus* and *S. epidermidis*. The cytoplasmic domains of HssS of *S. haemolyticus* and *S. epidermidis* corresponding to the AAs [188-457] and [188-451] respectively were cloned and expressed as *S. aureus* MBP-HssS<sub>cyto</sub> as described in (A). 20 μM of the 3 MBP-HssS<sub>cyto</sub> were mixed with equimolar concentration of hemin. UV-visible spectra was obtained as in (A). Spectra are representative of 3 independent experiments.

**Figure 6. The HAMP domain of HssS is not responsible for heme binding** **(A)** Comparative UV-visible absorption of MBP-HssS<sub>cyto</sub> and MBP-HssS<sub>cytoΔHAMP</sub>. The cytoplasmic domains of HssS deleted from the Nt HAMP corresponding to the AAs [234-457] was purified as a NT tagged MBP protein as the MBP-HssS<sub>cyto</sub> as reported in (A). 20 μM of MBP-HssS<sub>cyto</sub> and MBP-HssS<sub>cyto ΔHAMP</sub> were mixed with equimolar concentration of hemin. UV-visible spectra was obtained as in (A). Spectra are representative of 3 independent experiments. **(B)** EPR spectroscopy of MBP-HssS<sub>cyto</sub> and MBP-HssS<sub>cyto ΔHAMP</sub> in complex with hemin. EPR spectra were recorded with 60 μM of MBP-HssS<sub>cyto</sub> and MBP-HssS<sub>cytoΔHAMP</sub> complexed with equimolar concentration of hemin in 20 mM HEPES, pH 7; 300 mM NaCl. **Figure 7. The cytoplasmic domain of HssS signals heme.** **(A)** HssS<sub>cyto</sub> and HssS<sub>cytoΔHAMP</sub> signal heme detoxification. Δ*hssRS* HG001 complemented with either *phssRS*-HA, P<sub>hrtBA</sub>-GFP *phssRS*<sub>cyto</sub>-HA, P<sub>hrtBA</sub>-*gfp* or *phssRS*<sub>cytoΔHAMP</sub>-HA, P<sub>hrtBA</sub>-*gfp* *phssRS*-HA were diluted from ON cultures to

### Intracellular heme activates HssS

an  $OD_{600} = 0.01$  and grown in BHI with the indicated concentration of heme in a microplate spectrophotometer (Spark, Tecan). Results of bacterial growth minus medium background are displayed. Results represent the average  $\pm$  S.D from triplicate technical samples and are representative of 3 independent experiments. For clarity, one  $OD_{600} \pm$  S.D per h is shown. Results are representative of 3 independent experiments. **(B, C, D)** Dynamics of  $P_{hrtBA}$  response to HssS (B),  $HssS_{cyto}$  (C),  $HssS_{cyto\Delta HAMP}$  (D) activation. Fluorescence of  $\Delta hssRS$  HG001 transformed with either  $phssRS$ -HA,  $P_{hrtBA-gfp}$   $phssRS_{cyto}$ -HA,  $P_{hrtBA-gfp}$  or  $phssRS_{cyto\Delta HAMP}$ -HA,  $P_{hrtBA-gfp}$  was followed in a microplate spectrofluorimeter was followed during growth as in Fig.2. Results of heme induced fluorescence (RFU/ $OD_{600}$ ) minus non-induced (background, 0  $\mu$ M heme) are displayed. The corresponding growth curves are shown. Results represent the average from triplicate technical samples and are representative of 3 independent experiments. For clarity, S.D. are not shown.

**Figure 8. Activation of HssS is independent of Isd-mediated heme internalization.** **(A)** Dynamics of  $P_{hrtBA}$  induction by heme in iron supplemented or depleted medium. *S. aureus* HG001 WT strain transformed  $pP_{hrtBA-gfp}$  was diluted from an ON culture to  $OD_{600} = 0.05$  and grown in CDM and CDM supplemented with 10  $\mu$ M  $FeSO_4$  or 10  $\mu$ M EDDHA. 1  $\mu$ M heme was used to induce  $P_{hrtBA}$ . Fluorescence during growth was followed in a microplate spectrofluorimeter as in Fig.2. Fluorescence (RFU) at each time point was divided by the corresponding  $OD_{600}$ . Results of heme induced fluorescence minus non-induced (background, 0  $\mu$ M heme) are displayed. The corresponding growth curves are shown. Results represent the average from triplicate technical samples and are representative of 3 independent experiments. For clarity, S.D. are not shown. **(B)** Internalization of heme in iron containing and depleted mediums. Fluorescence from cultures of *S. aureus* HG001 WT transformed with  $pP_{hrtR-hrtR-gfp}$  grown in CDM containing 10  $\mu$ M  $FeSO_4$  or 10  $\mu$ M EDDHA was followed as in (A). Results of heme induced fluorescence minus non-induced

(background, 0  $\mu$ M hemin) are displayed. The corresponding growth curves are shown. Results represent the average from triplicate technical samples and are representative of 3 independent experiments. For clarity, S.D. are not shown. (C)  $P_{\text{hrtBA}}$  transcriptional activity in the *isdI* *S. aureus* mutant. *S. aureus* USA300 WT and *isdI::kan* mutant were transformed with  $pP_{\text{hrtBA}}\text{-gfp}(\text{CM}^{\text{R}})$  and fluorescence was followed during growth in CDM containing 1  $\mu$ M hemin or 1  $\mu$ M human hemoglobin as described in (A). Results of hemin induced fluorescence minus non-induced (background, 0  $\mu$ M hemin) are displayed. Results represent the average from triplicate technical samples and are representative of 3 independent experiments. For clarity, S.D. are not shown.

## References

1. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):603-61. doi: 10.1128/CMR.00134-14. PubMed PMID: 26016486; PubMed Central PMCID: PMC4451395.
2. Poudel S, Tsunemoto H, Seif Y, Sastry AV, Szubin R, Xu S, et al. Revealing 29 sets of independently modulated genes in Staphylococcus aureus, their regulators, and role in key physiological response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2020;117(29):17228-39. doi: 10.1073/pnas.2008413117. PubMed PMID: 32616573; PubMed Central PMCID: PMC7382225.
3. Balasubramanian D, Harper L, Shopsin B, Torres VJ. Staphylococcus aureus pathogenesis in diverse host environments. *Pathog Dis.* 2017;75(1). doi: 10.1093/femspd/ftx005. PubMed PMID: 28104617; PubMed Central PMCID: PMC5353994.
4. Onyango LA, Alreshidi MM. Adaptive Metabolism in Staphylococci: Survival and Persistence in Environmental and Clinical Settings. *J Pathog.* 2018;2018:1092632. doi: 10.1155/2018/1092632. PubMed PMID: 30327733; PubMed Central PMCID: PMC6171259.
5. Sutak R, Lesuisse E, Tachezy J, Richardson DR. Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. *Trends in microbiology.* 2008;16(6):261-8. doi: 10.1016/j.tim.2008.03.005. PubMed PMID: 18467097.
6. Poulos TL. Heme enzyme structure and function. *Chem Rev.* 2014;114(7):3919-62. doi: 10.1021/cr400415k. PubMed PMID: 24400737; PubMed Central PMCID: PMC3981943.
7. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.* 2005;157(3):175-88. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.03.004. PubMed PMID: 15917143.
8. Haley KP, Skaar EP. A battle for iron: host sequestration and Staphylococcus aureus acquisition. *Microbes and infection / Institut Pasteur.* 2012;14(3):217-27. Epub 2011/11/30. doi: 10.1016/j.micinf.2011.11.001. PubMed PMID: 22123296; PubMed Central PMCID: PMC3785375.
9. Reniere ML, Torres VJ, Skaar EP. Intracellular metalloporphyrin metabolism in Staphylococcus aureus. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine.* 2007;20(3-4):333-45. Epub 2007/03/28. doi: 10.1007/s10534-006-9032-0. PubMed PMID: 17387580.

10. Skaar EP, Humayun M, Bae T, Debord KL, Schneewind O. Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science*. 2004;305:1626-8.
11. Wilks A, Burkhard K. Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme. *Nat Prod Rep*. 2006;24:511-22.
12. Skaar E, Gaspar A, Schneewind O. IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2004;279:436-43.
13. Skaar E, Gaspar A, Schneewind O. *Bacillus anthracis* IsdG, a heme-degrading monooxygenase. *J Bacteriol*. 2006;188:1071-80.
14. Skaar EP, Schneewind O. Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2004;6(4):390-7. Epub 2004/04/23. PubMed PMID: 15101396.
15. Skaar EP GA, Schneewind O. IsdG and IsdI, heme-degrading enzymes in the cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279:436-1.
16. Grigg JC, Ukpabi G, Gaudin CF, Murphy ME. Structural biology of heme binding in the *Staphylococcus aureus* Isd system. *J Inorg Biochem*. 2010;104(3):341-8. Epub 2009/10/27. doi: S0162-0134(09)00231-1  
10.1016/j.jinorgbio.2009.09.012. PubMed PMID: 19853304.
17. Honsa ES, Fabian M, Cardenas AM, Olson JS, Maresso AW. The five near-iron transporter (NEAT) domain anthrax hemophore, IsdX2, scavenges heme from hemoglobin and transfers heme to the surface protein IsdC. *The Journal of biological chemistry*. 286(38):33652-60. Epub 2011/08/03. doi: M111.241687  
10.1074/jbc.M111.241687. PubMed PMID: 21808055; PubMed Central PMCID: PMC3190864.
18. Pluym M, Vermeiren CL, Mack J, Heinrichs DE, Stillman MJ. Heme binding properties of *Staphylococcus aureus* IsdE. *Biochemistry*. 2007;46(44):12777-87. PubMed PMID: 17929943.
19. Bibb LA, Schmitt MP. The ABC transporter HrtAB confers resistance to hemin toxicity and is regulated in a hemin-dependent manner by the ChrAS two-component system in *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of bacteriology*. 2010;192(18):4606-17. Epub 2010/07/20. doi: 10.1128/JB.00525-10. PubMed PMID: 20639324; PubMed Central PMCID: PMC2937406.
20. Lechardeur D, Cesselin B, Liebl U, Vos MH, Fernandez A, Brun C, et al. Discovery of an intracellular heme-binding protein, HrtR, that controls heme-efflux by the conserved HrtB

HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. J Biol Chem. 2012;287(7):4752-8. Epub 2011/11/16. doi: 10.1074/jbc.M111.297531. PubMed PMID: 22084241.

21. Torres VJ, Stauff DL, Pishchany G, Bezbradica JS, Gordy LE, Iturregui J, et al. A *Staphylococcus aureus* regulatory system that responds to host heme and modulates virulence. Cell Host Microbe. 2007;1(2):109-19. doi: 10.1016/j.chom.2007.03.001. PubMed PMID: 18005689; PubMed Central PMCID: PMCPMC2083280.

22. Stauff DL, Skaar EP. The heme sensor system of *Staphylococcus aureus*. Contrib Microbiol. 2009;16:120-35.

23. Mike LA, Dutter BF, Stauff DL, Moore JL, Vitko NP, Aranmolate O, et al. Activation of heme biosynthesis by a small molecule that is toxic to fermenting *Staphylococcus aureus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110(20):8206-11. Epub 2013/05/01. doi: 10.1073/pnas.1303674110. PubMed PMID: 23630262; PubMed Central PMCID: PMC3657828.

24. Stauff DL, Torres VJ, Skaar EP. Signaling and DNA-binding activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS two-component system required for heme sensing. The Journal of biological chemistry. 2007;282(36):26111-21. doi: 10.1074/jbc.M703797200. PubMed PMID: 17635909.

25. Stauff DL, Skaar EP. *Bacillus anthracis* HssRS signalling to HrtAB regulates haem resistance during infection. Mol Microbiol. 2009;72(3):763-78. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06684.x. PubMed PMID: 19400785; PubMed Central PMCID: PMCPMC2891670.

26. Joubert L, Dagieu JB, Fernandez A, Derre-Bobillot A, Borezee-Durant E, Fleurot I, et al. Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*. Sci Rep. 2017;7:40435. doi: 10.1038/srep40435. PubMed PMID: 28091535.

27. Joubert L, Derre-Bobillot A, Gaudu P, Gruss A, Lechardeur D. HrtBA and menaquinones control haem homeostasis in *Lactococcus lactis*. Mol Microbiol. 2014;93(4):823-33. Epub 2014/07/22. doi: 10.1111/mmi.12705. PubMed PMID: 25040434.

28. Gruss A, Borezee-Durant E, Lechardeur D. Environmental heme utilization by heme-auxotrophic bacteria. Adv Microb Physiol. 2012;61:69-124. doi: 10.1016/B978-0-12-394423-8.00003-2. PubMed PMID: 23046952.

29. Bhate MP, Molnar KS, Goulian M, DeGrado WF. Signal transduction in histidine kinases: insights from new structures. Structure. 2015;23(6):981-94. doi: 10.1016/j.str.2015.04.002. PubMed PMID: 25982528; PubMed Central PMCID: PMCPMC4456306.

30. Jacob-Dubuisson F, Mechaly A, Betton JM, Antoine R. Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(10):585-93. doi: 10.1038/s41579-018-0055-7. PubMed PMID: 30008469.
31. Lim Y, Shin SH, Lee SI, Kim IS, Rhee JH. Iron repressibility of siderophore and transferrin-binding protein in *Staphylococcus aureus*. *FEMS microbiology letters.* 1998;163(1):19-24. doi: 10.1111/j.1574-6968.1998.tb13020.x. PubMed PMID: 9631540.
32. Ledala N, Sengupta M, Muthaiyan A, Wilkinson BJ, Jayaswal RK. Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* to iron limitation and Fur mutation. *Applied and environmental microbiology.* 2010;76(2):406-16. doi: 10.1128/AEM.01389-09. PubMed PMID: 19933349; PubMed Central PMCID: PMC2805226.
33. Ghsssein G, Brutesco C, Ouerdane L, Fojcik C, Izaute A, Wang S, et al. Biosynthesis of a broad-spectrum nicotianamine-like metallophore in *Staphylococcus aureus*. *Science.* 2016;352(6289):1105-9. doi: 10.1126/science.aaf1018. PubMed PMID: 27230378.
34. Mascher T, Helmann JD, Uden G. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 2006;70(4):910-38. Epub 2006/12/13. doi: 10.1128/MMBR.00020-06. PubMed PMID: 17158704; PubMed Central PMCID: PMC1698512.
35. Green J, Crack JC, Thomson AJ, LeBrun NE. Bacterial sensors of oxygen. *Current opinion in microbiology.* 2009;12(2):145-51. doi: 10.1016/j.mib.2009.01.008. PubMed PMID: 19246238.
36. Malpica R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D. Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(36):13318-23. doi: 10.1073/pnas.0403064101. PubMed PMID: 15326287; PubMed Central PMCID: PMC516565.
37. Cheung J, Hendrickson WA. Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current opinion in microbiology.* 2010;13(2):116-23. Epub 2010/03/13. doi: 10.1016/j.mib.2010.01.016. PubMed PMID: 20223701; PubMed Central PMCID: PMC3078554.
38. Moker N, Reihlen P, Kramer R, Morbach S. Osmosensing properties of the histidine protein kinase MtrB from *Corynebacterium glutamicum*. *The Journal of biological chemistry.* 2007;282(38):27666-77. doi: 10.1074/jbc.M701749200. PubMed PMID: 17650500.

39. Kenney LJ, Anand GS. EnvZ/OmpR Two-Component Signaling: An Archetype System That Can Function Noncanonically. *EcoSal Plus*. 2020;9(1). doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2019. PubMed PMID: 32003321; PubMed Central PMCID: PMC7192543.
40. Wakeman CA, Hammer ND, Stauff DL, Attia AS, Anzaldi LL, Dikalov SI, et al. Menaquinone biosynthesis potentiates haem toxicity in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2012;86(6):1376-92.
41. Orelle C, Mathieu K, Jault JM. Multidrug ABC transporters in bacteria. *Res Microbiol*. 2019;170(8):381-91. doi: 10.1016/j.resmic.2019.06.001. PubMed PMID: 31251973.
42. Yang HB, Hou WT, Cheng MT, Jiang YL, Chen Y, Zhou CZ. Structure of a MacAB-like efflux pump from *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Commun*. 2018;9(1):196. doi: 10.1038/s41467-017-02741-4. PubMed PMID: 29335499; PubMed Central PMCID: PMC5768738.
43. Sharom FJ. Shedding light on drug transport: structure and function of the P-glycoprotein multidrug transporter (ABCB1). *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. 2006;84(6):979-92. Epub 2007/01/12. doi: 10.1139/o06-199. PubMed PMID: 17215884.
44. Gebhard S. ABC transporters of antimicrobial peptides in Firmicutes bacteria - phylogeny, function and regulation. *Mol Microbiol*. 2012;86(6):1295-317. doi: 10.1111/mmi.12078. PubMed PMID: 23106164.
45. Gebhard S, Mascher T. Antimicrobial peptide sensing and detoxification modules: unravelling the regulatory circuitry of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol*. 2011;81(3):581-7. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07747.x. PubMed PMID: 21696467.
46. Dintner S, Staron A, Berchtold E, Petri T, Mascher T, Gebhard S. Coevolution of ABC transporters and two-component regulatory systems as resistance modules against antimicrobial peptides in Firmicutes Bacteria. *Journal of bacteriology*. 2011;193(15):3851-62. doi: 10.1128/JB.05175-11. PubMed PMID: 21665979; PubMed Central PMCID: PMC3147537.
47. Fritz G, Dintner S, Treichel NS, Radeck J, Gerland U, Mascher T, et al. A New Way of Sensing: Need-Based Activation of Antibiotic Resistance by a Flux-Sensing Mechanism. *mBio*. 2015;6(4):e00975. doi: 10.1128/mBio.00975-15. PubMed PMID: 26199330; PubMed Central PMCID: PMC4513084.
48. Mascher T. Bacterial (intramembrane-sensing) histidine kinases: signal transfer rather than stimulus perception. *Trends in microbiology*. 2014;22(10):559-65. Epub 2014/06/21. doi: 10.1016/j.tim.2014.05.006. PubMed PMID: 24947190.

49. Poupel O, Proux C, Jagla B, Msadek T, Dubrac S. SpdC, a novel virulence factor, controls histidine kinase activity in *Staphylococcus aureus*. *PLoS Pathog.* 2018;14(3):e1006917. doi: 10.1371/journal.ppat.1006917. PubMed PMID: 29543889; PubMed Central PMCID: PMC5854430.
50. Caldelari I, Chane-Woon-Ming B, Noirot C, Moreau K, Romby P, Gaspin C, et al. Complete Genome Sequence and Annotation of the *Staphylococcus aureus* Strain HG001. *Genome Announc.* 2017;5(32). doi: 10.1128/genomeA.00783-17. PubMed PMID: 28798184; PubMed Central PMCID: PMC5552993.
51. Fey PD, Endres JL, Yajjala VK, Widhelm TJ, Boissy RJ, Bose JL, et al. A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. *mBio.* 2013;4(1):e00537-12. doi: 10.1128/mBio.00537-12. PubMed PMID: 23404398; PubMed Central PMCID: PMC3573662.
52. Taylor D, Holland KT. Amino acid requirements for the growth and production of some exocellular products of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Bacteriol.* 1989;66(4):319-29. doi: 10.1111/j.1365-2672.1989.tb02485.x. PubMed PMID: 2753836.
53. Ebner P, Rinker J, Nguyen MT, Popella P, Nega M, Luqman A, et al. Excreted Cytoplasmic Proteins Contribute to Pathogenicity in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* 2016;84(6):1672-81. doi: 10.1128/IAI.00138-16. PubMed PMID: 27001537; PubMed Central PMCID: PMC4907134.

# Intracellular heme activates HssS

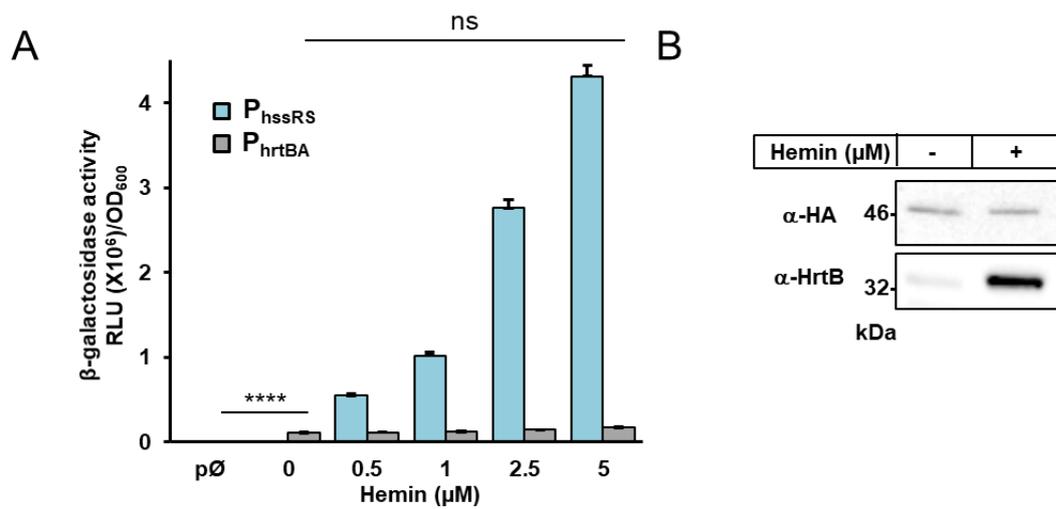


Figure 1

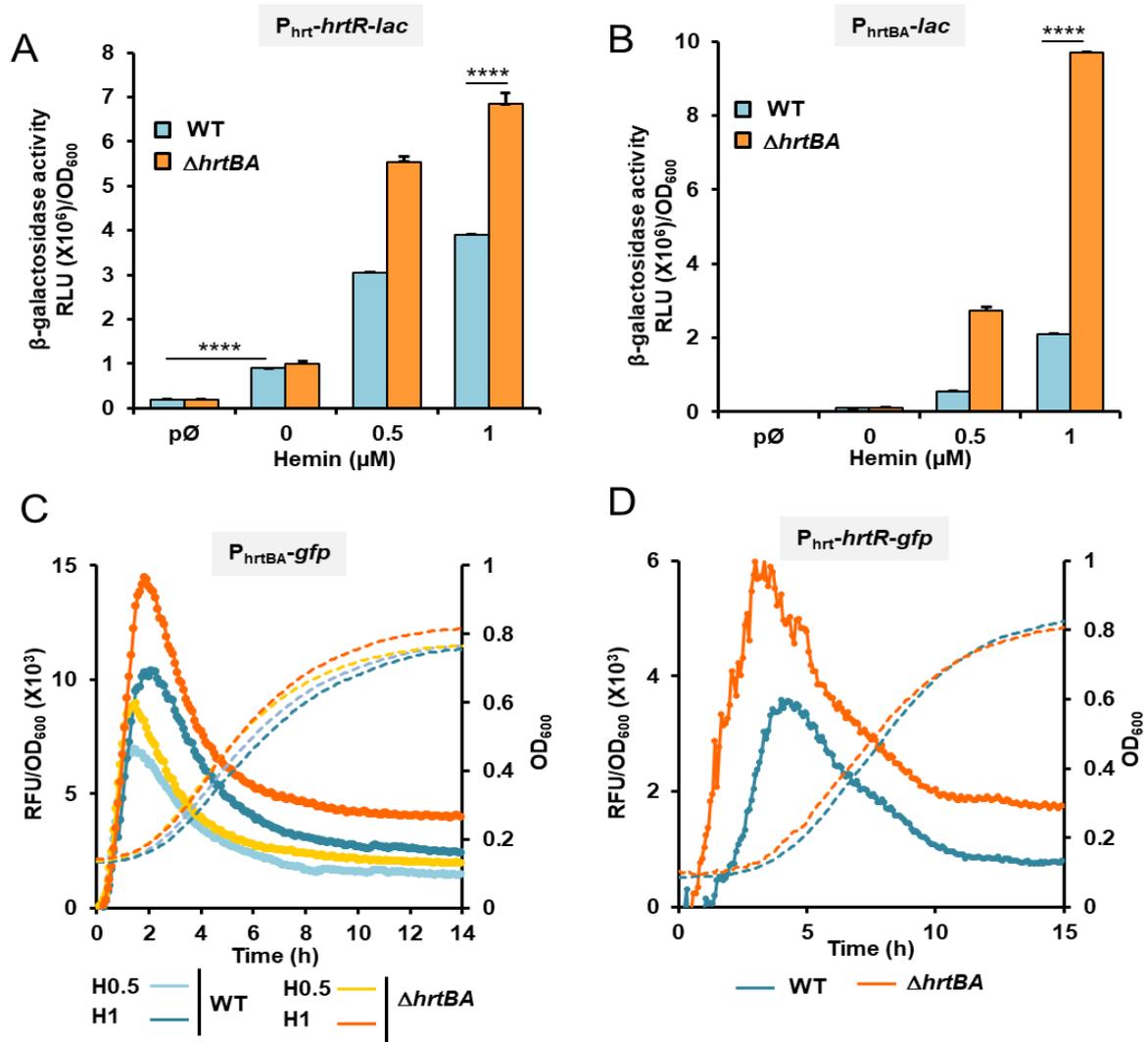


Figure 2

Intracellular heme activates HssS

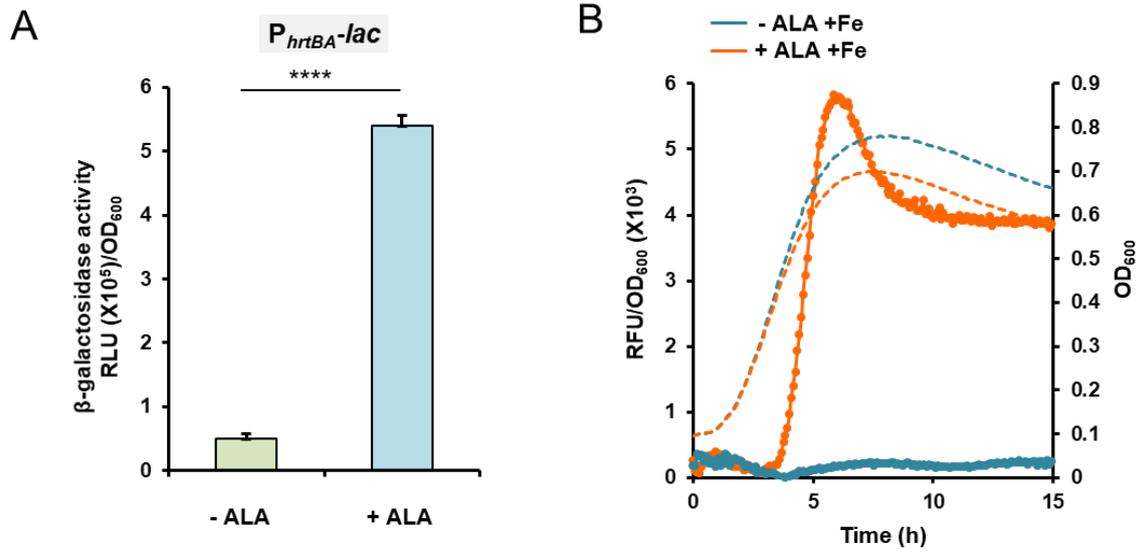


Figure 3

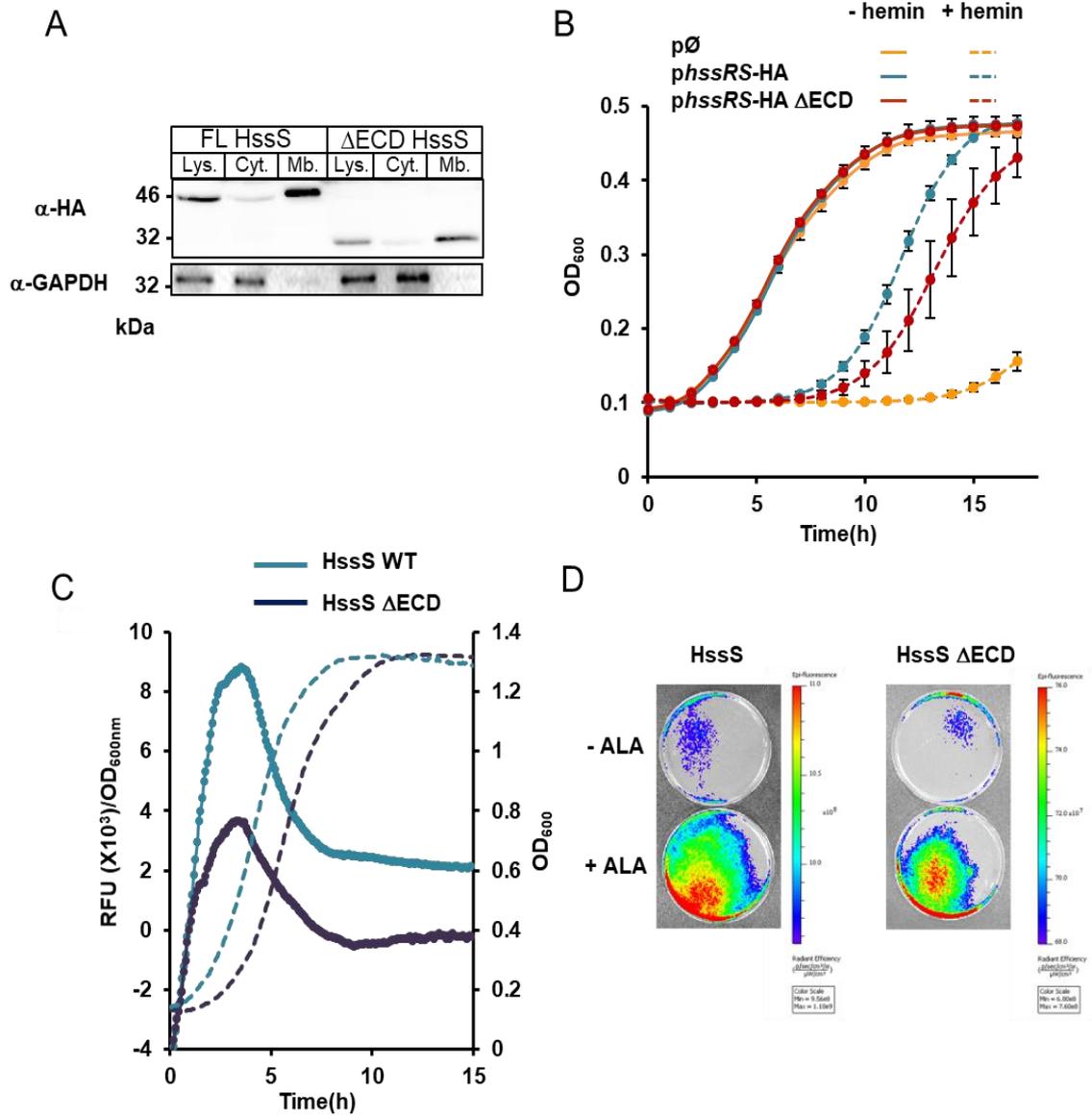


Figure 4

# Intracellular heme activates HssS

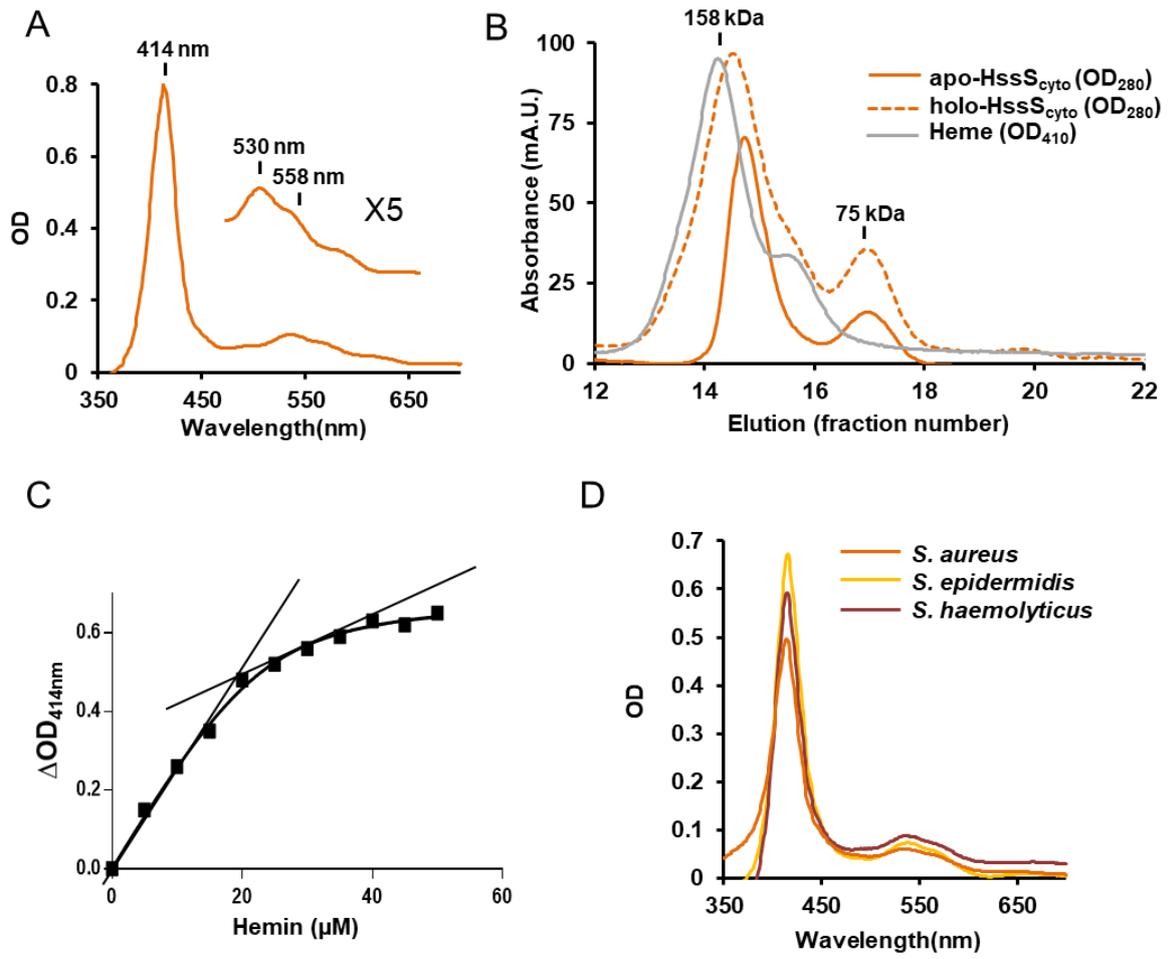


Figure 5

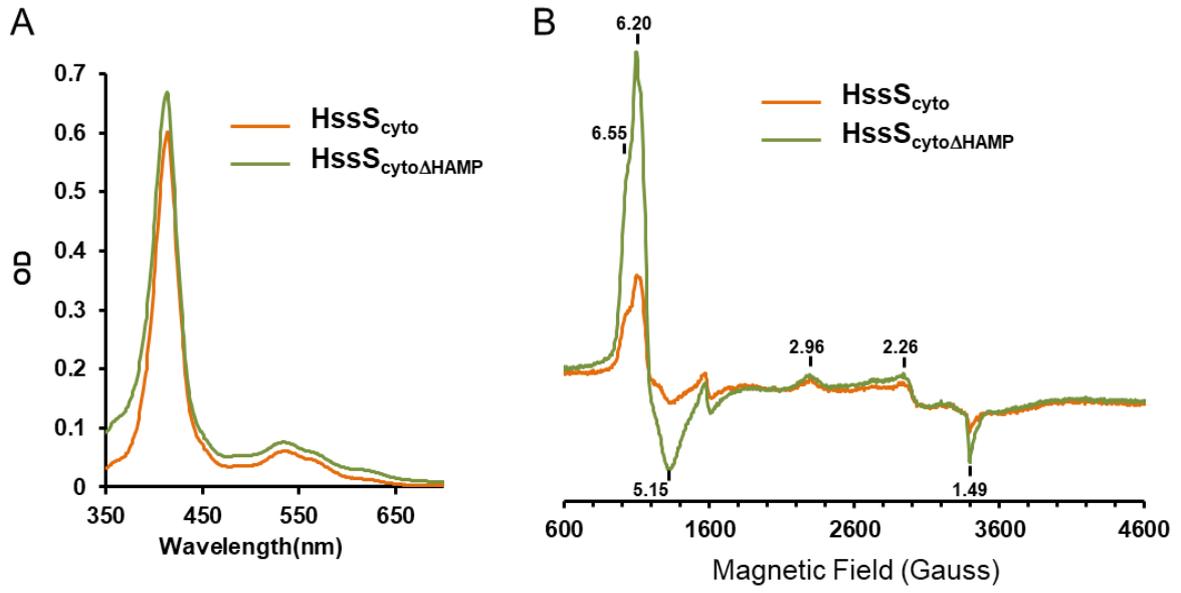


Figure 6

# Intracellular heme activates HssS

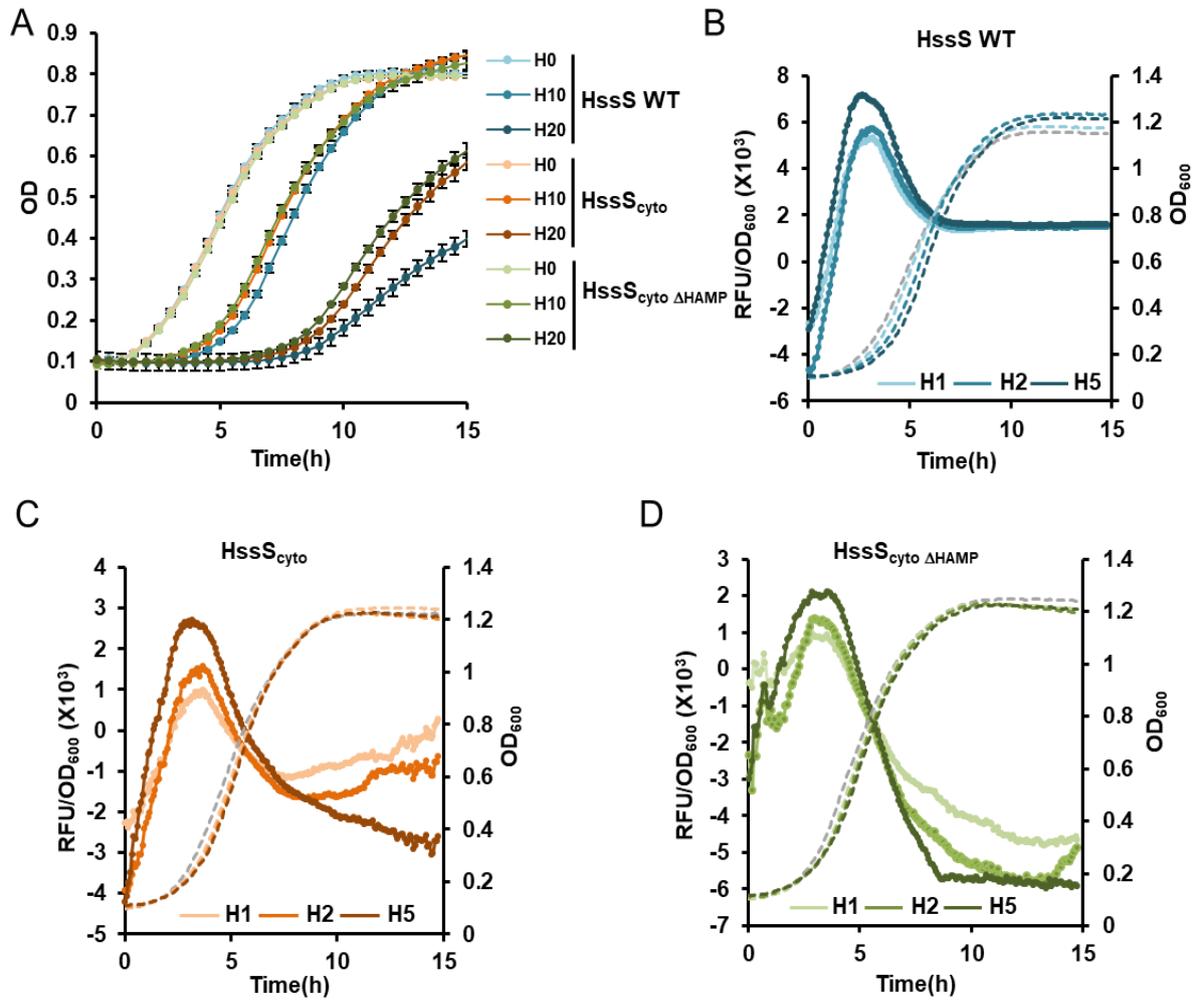


Figure 7

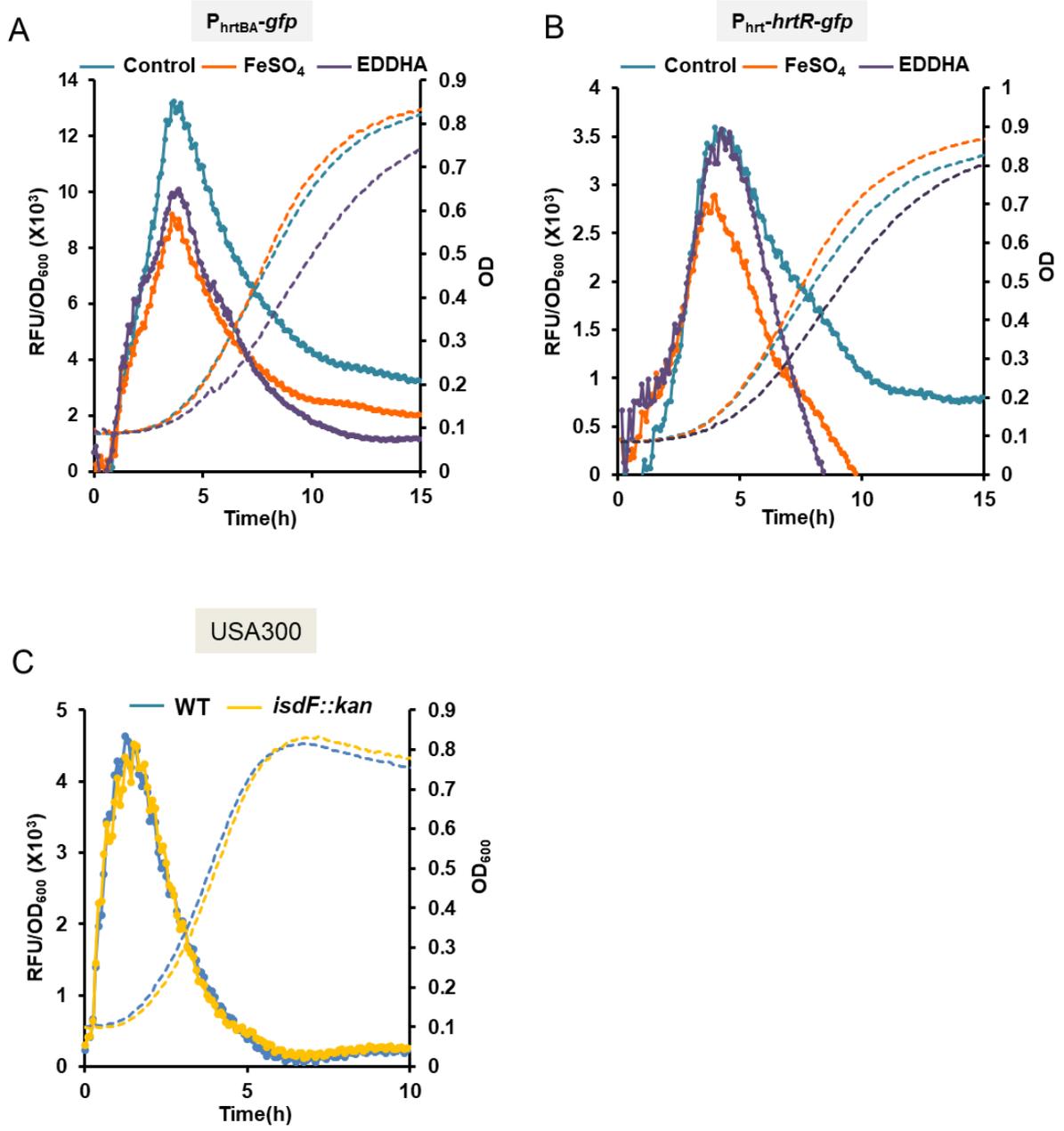


Figure 8

## Supporting Information

### Additional Material and Methods

#### Plasmid construction.

The plasmid pCN52(CM<sup>R</sup>) is a chloramphenicol resistant version of pCN52, that was obtained by Gibson assembly of the DNA sequence of pCN52 without the Ery<sup>R</sup> gene that was PCR amplified with the oligonucleotides O1 and O2 fused to the CM<sup>R</sup> gene, PCR amplified with (O3-O4) primer pairs. Plasmids pMBP-HssS[188-457] (pMBP-HssS<sub>cyto</sub>) and pMBP-HssS[234-457] (pMBP-HssS<sub>cyto</sub>Δ<sub>HAMP</sub>) (Table S1) were obtained by PCR amplification of HssS ORF from *S. aureus* HG001 genomic DNA with the primers pairs (O5-O6) and (O7-O6) respectively (Table S2). The resulting fragments were digested with *EcoRI* and *HindIII* and ligated with the plasmid pMAL-c4X (New England Biolabs) (Table S1). PCR amplification of the described DNA inserts with oligonucleotides from Table S2, digestion with (*EcoRI*, *BamHI*) and ligation with the (*EcoRI*, *BamHI*) digested plasmid pTCV-*lac* [1] (Table S1). Plasmid pTCV-*lac* is a low copy number plasmid that uses the *lacZ* gene as a reporter to evaluate promoter activities in Gram-positive bacteria [1]. DNA fragments containing the *hrtBA* or the *hssRS* promoter were PCR-amplified with primer pairs (O8-O9) or (O10-O11) (Table S1) respectively. The amplified fragments were digested with *EcoRI/BamHI* and cloned into pTCV-*lac*, resulting in plasmids pP<sub>hrtBA</sub>-*lac* and pP<sub>hssRS</sub>-*lac* (Table S2). *phssRS*-HA was constructed by 2 rounds of PCR amplifications of the promoter and coding regions of *hssRS* using from *S. aureus* HG001 genomic with primer pairs (O12-O13) then (O12-O14). O13 and O14 encompass the nt sequence encoding the hemagglutinin influenza epitope (HA, YPYDVPDYA). The fused P<sub>hssRS</sub>/*hssRS*-HA DNA fragment was cloned into *PstI/BamHI* restriction sites of PAW8 (Table S2). *phssRS*-HA ΔECL (Table S2) was obtained by an overlap of two PCRs amplified with the primer pairs (O12-O17) and (O16-O14) (Table S1) using *phssRS*-HA as a template. The P<sub>hssRS</sub>/*hssRS*-HA ΔECL fragment was cloned into *PstI/BamHI*

restriction sites of PAW8 (Table S2). pP<sub>hrtBA</sub>-GFP and pP<sub>hrt</sub>*hrtR*-GFP (Table S2) were constructed by cloning into the *Bam*H1/*Eco*R1 restriction sites of the pCN52 vector the DNA fragments corresponding to P<sub>hrtBA</sub> and P<sub>hrt</sub>*hrtR* with the primer pairs (O18-O19) and (O20-O21) (Table S1) using HG001 and *Lactococcus lactis* MG1363 (ref) genomic DNAs as templates, respectively. pP<sub>hrtBA</sub>-GFP (CM<sup>R</sup>) was constructed as described for pP<sub>hrtBA</sub>-*gfp* (Table S2). The DNA sequence of P<sub>hssRS</sub>*hssRS*-HA-P<sub>hrtBA</sub> was PCR amplified from the plasmid pUC *hssRS*-HA-P<sub>hrtBA</sub> with oligonucleotides (O22-O23) (Table S1), digested with *Bam*H1 and ligated into pTCV-*lac* to give rise to *phssRS*-HA, P<sub>hrtBA</sub>-*lac* (Table S2). Similar strategy was used to clone *phssRS*-HA, P<sub>hrtBA</sub>-GFP (Table S2) using the primer pairs (O24-O25) and *Bam*H1/*Kpn*1 restriction sites (Table S1). *phssRS*-HA ΔECL, P<sub>hrtBA</sub>-GFP was obtained as described for *phssRS*-HA ΔECL with (O24-O17) and (O16-O25) primer pairs to PCR amplify 2 DNA fragments from *phssRS*-HA, P<sub>hrtBA</sub>-GFP that were fused before cloning into the *Bam*H1/*Kpn*1 restriction sites of pCN52. The DNA sequence corresponding to extracellular domain of HrtB was PCR amplified with primers pair (O26-O27) using HG001 genomic DNA as a template was cloned into the *E. coli* expression vector pET200 as recommended by the manufacturer's instructions to generate pET200-*hrtB* ECL (Table S2). *phssRS*[188-457]-HA, P<sub>hrtBA</sub>-GFP (*phssRS*<sub>cyto</sub>-HA, P<sub>hrtBA</sub>-*gfp*) was constructed by fusing 2 PCRs amplified fragments using (O24-O28) and (O29-O25) primer pairs and *phssRS*-HA, P<sub>hrtBA</sub>-*gfp* as a template (Table S1). The resulting fragment was ligated into pCN52 using *Bam*H1/*Kpn*1 restriction sites. The same strategy was used to construct *phssRS*[234-457]-HA, P<sub>hrtBA</sub>-*gfp* (*phssRS*<sub>cyto</sub>ΔHAMP-HA, P<sub>hrtBA</sub>-GFP) with the oligonucleotides (O24-O30) and (O31-O25) (Table S1). The pMADΔ*hrtBA* plasmid was constructed as follows: 2 DNA fragments of ~800 bp flanking the *hrtBA* operon were PCR-amplified using *S. aureus* HG001 genomic DNA as a template and primer pairs (O32-O33) and (O34-O35) (Table S2). Both fragments were used as templates in a second round of PCR amplification with primers (O32-O35), resulting in an overlapping ~1.6 kb

fragment, which was digested by *Xma*I and *Bam*HI and cloned into the thermosensitive plasmid, pMAD [2], giving rise to p $\Delta$ *hrtBA* (Table S2). p $\Delta$ *hrtBA* was established by transformation in *S. aureus* HG001. The double cross-over event leading to the  $\Delta$ *hrtBA* mutant was obtained as described [2]. All plasmids were verified by DNA sequencing.

### Supplementary figures legends

**S1 Fig. *hrtBA* is specifically induced by HssRS in presence of heme.** *S. aureus* HG001 WT and  $\Delta$ *hssRS* mutant transformed with pP<sub>*hrtBA*</sub>-*lac* were grown in BHI to OD<sub>600</sub> = 0.5 prior addition of the indicated concentration of hemin for 1.5 h. B-gal activity was quantified by luminescence. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. Result is representative of 3 independent experiments.

**S2 Fig. HrtBA expression in presence of hemin limits heme toxicity in HG001 *S. aureus*.**

**(A)**  $\Delta$ *hrtBA* HG001 mutant is hypersensitive to heme toxicity. WT and  $\Delta$ *hrtBA* HG001 strains were grown in BHI in presence of the indicated concentrations of hemin. Growth was followed at OD<sub>600</sub> in a microplate reader (Spark, Tecan). Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. Result is representative of 3 independent experiments. **(B)** Dynamics of P<sub>*hrtBA*</sub> activation for toxic concentration of hemin. *S. aureus* HG001 WT transformed pP<sub>*hrtBA*</sub>-*gfp* was grown in CDM with the indicated concentration of hemin. Hemin induced RFU/OD<sub>600</sub> minus non-induced (background, 0  $\mu$ M hemin) is displayed. Results represent the average from triplicate technical samples and are representative of 3 independent experiments. For clarity, S.D. are not shown.

**S3 Fig. HrtR senses the increase of cytoplasmic heme concentration induced by ALA.** *S.*

*aureus* HG001 WT transformed with pP<sub>*hrt*</sub>-*hrtR-gfp* was grown in CDM in presence or in absence of 1 mM ALA for 16 h à 37°C. B-gal activity was quantified by luminescence. Results

represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. Result is representative of 3 independent experiments.

**S4 Fig. Transcriptional activity of  $P_{\text{hrtBA}}$  with Ga-PPIX.** *S. aureus* HG001 WT mutant transformed with  $pP_{\text{hrtBA}}\text{-lac}$  was grown in BHI to  $OD_{600} = 0.5$  prior addition of the indicated concentration of hemin and Ga-PPIX (Frontier Scientific) for 1.5 h. B-gal activity was quantified by luminescence. Results represent the average  $\pm$  S.D. from triplicate technical samples. Result is representative of 3 independent experiments.

**S5 Fig. HssS<sub>cyto</sub> and HssS<sub>cyto</sub> $\Delta$ HAMP is a heme-binding protein.** (A) Reduction of HssS<sub>cyto</sub>-hemin complex. 20  $\mu$ M MBP-HssS<sub>cyto</sub>-hemin complex was reduced with 1 mM dithionite. Reduction of the complex resulted in a shift of the Soret band from 414 nm to 426 nm, suggesting that HssS<sub>cyto</sub> is bound to ferric heme in our experimental conditions. (B) MBP-HssS<sub>cyto</sub> binds endogenous heme in *E. coli* treated with ALA. *E. coli* containing  $p\text{MBP-HssS}_{\text{cyto}}$  was incubated ON at RT simultaneously with 1 mM IPTG and in the presence or absence of 1 mM ALA. UV-visible spectra (normalized to  $OD_{280} = 1$ ) of purified MBP-HssS<sub>cyto</sub> was obtained in a microplate spectrophotometer (Spark, Tecan). Only MBP-HssS<sub>cyto</sub> isolated from *E. coli* treated with ALA exhibited a Soret peak. (C) Size-exclusion chromatography of MBP-HssS<sub>cyto</sub> $\Delta$ HAMP. MBP- Purified MBP-HssS<sub>cyto</sub> $\Delta$ HAMP in 100  $\mu$ l was loaded on a Superdex 200 Increase 10/300 GL gel filtration column (GE Healthcare) in 20 mM HEPES pH 7.2 containing 300 mM NaCl. Protein in eluted fractions was analyzed at  $OD_{280}$  and  $OD_{410}$ , respectively. Results are representative of 3 independent experiments. Calibration of the column was performed with the Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare).

**S6 Fig. AA alignments of HssS from *S. aureus*, *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*.** The three proteins were aligned using Clustal W. Identical amino acids, “\*”; conserved amino acids, “.”; partially conserved amino acids, “:.” *S. epidermidis* and *S. haemolyticus* share 64 % identity with HssS from *S. aureus* respectively.

## Supplementary references

1. Poyart C, Trieu-Cuot P. A broad-host-range mobilizable shuttle vector for the construction of transcriptional fusions to B-galactosidase in Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology letters*. 1997;156:193-8.
2. Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(11):6887-91. doi: 10.1128/AEM.70.11.6887-6891.2004. PubMed PMID: 15528558; PubMed Central PMCID: PMC525206.
3. Caldelari I, Chane-Woon-Ming B, Noirot C, Moreau K, Romby P, Gaspin C, et al. Complete Genome Sequence and Annotation of the *Staphylococcus aureus* Strain HG001. *Genome Announc*. 2017;5(32). doi: 10.1128/genomeA.00783-17. PubMed PMID: 28798184; PubMed Central PMCID: PMC5552993.
4. Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(10):6076-85. doi: 10.1128/AEM.70.10.6076-6085.2004. PubMed PMID: 15466553; PubMed Central PMCID: PMC522135.
5. Wada A, Watanabe H. Penicillin-binding protein 1 of *Staphylococcus aureus* is essential for growth. *Journal of bacteriology*. 1998;180(10):2759-65. PubMed PMID: 9573165; PubMed Central PMCID: PMC107232.
6. Monk IR, Shah IM, Xu M, Tan MW, Foster TJ. Transforming the untransformable: application of direct transformation to manipulate genetically *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *mBio*. 2012;3(2). doi: 10.1128/mBio.00277-11. PubMed PMID: 22434850; PubMed Central PMCID: PMC3312211.
7. Lechardeur D, Cesselin B, Liebl U, Vos MH, Fernandez A, Brun C, et al. Discovery of an intracellular heme-binding protein, HrtR, that controls heme-efflux by the conserved HrtB HrtA transporter in *Lactococcus lactis*. *J Biol Chem*. 2012;287(7):4752-8. Epub 2011/11/16. doi: 10.1074/jbc.M111.297531. PubMed PMID: 22084241.
8. Toledo-Arana A, Merino N, Vergara-Irigaray M, Debarbouille M, Penades JR, Lasa I. *Staphylococcus aureus* develops an alternative, ica-independent biofilm in the absence of the arlRS two-component system. *Journal of bacteriology*. 2005;187(15):5318-29. doi: 10.1128/JB.187.15.5318-5329.2005. PubMed PMID: 16030226; PubMed Central PMCID: PMC1196035.

**S1 Table.** Strains and plasmids used in this study.

<i>Strain/plasmid</i>	<i>Characteristics</i>	<i>Source/ reference</i>
<b>Strain</b>		
<b><i>E. coli</i></b>		
TOP10	<i>F</i> <sup>-</sup> <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) $\emptyset$ 80 <i>lacZ</i> <i>AM15 lacX74 recA1 deoR araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL (Str<sup>r</sup>) endA1</i>	Invitrogen
BL21 (DE3)	<i>lacI<sup>f</sup> rrnB T14</i> $\Delta$ <i>lacZ</i> <i>WJ16 hsdR514</i> $\Delta$ <i>araBA-D</i> <sub>AH33</sub> $\Delta$ <i>rhaBAD</i> <sub>LD78</sub>	Invitrogen
<b><i>S. aureus</i></b>		
HG001	<i>Staphylococcus aureus</i> HG001 strain, derivative of the RN1 (NCT8325) strain with restored <i>rbsU</i> (a positive activator of SigB).	[3]
HG001H1	HG001 $\Delta$ <i>hssRS</i> , deletion of <i>hssR</i> and <i>hssS</i> genes	This study
HG001H2	HG001 $\Delta$ <i>hrtBA</i> , deletion of <i>hrtB</i> and <i>hrtA</i> genes	This study
USA300	<i>Staphylococcus aureus</i> USA300 FPR3757 JE2	ATCC
USA300 <i>isdf::kan</i>	Transposon insertion into <i>isdf</i> gene strains in USA300 FPR3757 JE2	ATCC
<b>Plasmid</b>		
pTCV- <i>lac</i>	Conjugative <i>E. coli</i> Gram-positive bacteria shuttle plasmid carrying the promoter less <i>E. coli lacZ</i> gene for constructing transcriptional fusions. Kan <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	[1]
pCN52	<i>E. coli-S.aureus</i> bacteria shuttle plasmid with <i>gfpmut2 reporter</i> construct. Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	[4]
pAW8	Cloning shuttle vector, pMB1 ori for replication in <i>E. coli</i> , pAM $\alpha$ 1 ori for replication in gram-positive organisms. Tet <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	[5]
pMAL-c4X	Cloning vector for expression of MBP tagged proteins in <i>E. coli</i> . Amp <sup>R</sup>	New England Biolabs
pMAD	Cloning shuttle replication-thermosensitive vector for generating stable chromosomal mutations in low G-C Gram positive bacteria. Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	[2]
pIMAY	Cloning shuttle replication-thermosensitive vector for generating stable chromosomal mutations in Staphylococci. CM <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>	[6]
pCN52(CM <sup>R</sup> )	<i>E. coli-S.aureus</i> bacteria shuttle plasmid with <i>gfpmut2 reporter</i> construct. Amp <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	This study

Intracellular heme activates HssS

pET200	Cloning vector for Nt 6XHis tagged protein production. Amp <sup>R</sup>	Invitrogen
pMBP-HssS <sub>cyto</sub>	Expression of N-terminal MBP-tagged HrtRS. Cloned into pMAL-c4X. Amp <sup>R</sup>	This study
pMBP-HssS <sub>cyto</sub> ΔHAMP	Expression of N-terminal MBP-tagged <i>S. aureus</i> HssS[234-457]. Cloned into pMAL-c4X. Amp <sup>R</sup>	This study
pMBP-HssS (S. haemolyticus) <sub>cyto</sub>	Expression of N-terminal MBP-tagged <i>S. haemolyticus</i> HssS[188-457]. Cloned into pMAL-c4X. Amp <sup>R</sup>	Proteogenix
pMBP-HssS (S. epidermidis) <sub>cyto</sub>	Expression of N-terminal MBP-tagged <i>S. epidermidis</i> HssS[188-451]. Cloned into pMAL-c4X. Amp <sup>R</sup>	Proteogenix
pP <sub>hrtBA</sub> -lac	<i>S. aureus</i> HG001 <i>hrtBA</i> promoter region cloned into pTCV-lac. Kan <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	This study
pP <sub>hrt</sub> -hrtR-lac	DNA fragment containing the promoter region and <i>hrtR</i> cloned in pTCV-lac. Kan <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	[7]
pP <sub>hssRS</sub> -lac	<i>S. aureus</i> HG001 <i>hssRS</i> promoter region region cloned into pTCV-lac. Kan <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	This study
pUC <i>hssRS</i> -HA, P <sub>hrtBA</sub>	P <sub>hssRS</sub> promoter region and <i>hssRS</i> genes followed by the promoter region of <i>hrtBA</i> from <i>S. aureus</i> HG001 cloned into pUC. Amp <sup>R</sup>	Proteogenix
p <i>hssRS</i> -HA, P <sub>hrtBA</sub> -lac	P <sub>hssRS</sub> promoter region and <i>hssRS</i> genes followed by the promoter region of <i>hrtBA</i> from <i>S. aureus</i> HG001 cloned into pTCV-lac. Kan <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	This study
pP <sub>hrtBA</sub> -gfp	<i>S. aureus</i> HG001 <i>hrtBA</i> promoter region cloned into pCN52. Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	This study
pP <sub>hrtBA</sub> -gfp(CM <sup>R</sup> )	<i>S. aureus</i> HG001 <i>hrtBA</i> promoter region cloned into pCN52(CM <sup>R</sup> ). Amp <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	This study
pP <sub>hrt</sub> -hrtR-gfp	DNA fragment containing the promoter region and <i>hrtR</i> cloned into pCN52. Amp <sup>R</sup> , CM <sup>R</sup>	This study
p <i>hssRS</i> -HA, P <sub>hrtBA</sub> -gfp	Promoter region and <i>hssRS</i> genes with a HA epitope at the Ct of <i>hssS</i> from <i>S. aureus</i> HG001 and promoter region of <i>hrtBA</i> cloned upstream GFP in pCN52. Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	This study
p <i>hssRS</i> ΔECL-HA, P <sub>hrtBA</sub> -gfp	Promoter region and <i>hssRS</i> ΔECL genes with a HA epitope at the Ct of <i>hssS</i> ΔECL from <i>S. aureus</i> HG001 and promoter region of <i>hrtBA</i> cloned upstream GFP in pCN52. Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	This study

<i>phssRS</i> <sub>cyto</sub> -HA, <i>P</i> <sub>hrtBA</sub> - <i>gfp</i>	Promoter region and <i>hssR</i> and <i>hssS</i> [188-457] genes with a HA epitope at the Ct of <i>hssS</i> [188-457] from <i>S. aureus</i> HG001 and promoter region of <i>hrtBA</i> cloned upstream GFP in pCN52. Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	This study
<i>phssRS</i> <sub>cyto</sub> $\Delta$ HAMP- HA, <i>P</i> <sub>hrtBA</sub> - <i>gfp</i>	Promoter region and <i>hssR</i> and <i>hssS</i> [234-457] genes with a HA epitope at the Ct of <i>hssS</i> [234-457] from <i>S. aureus</i> HG001 and promoter region of <i>hrtBA</i> cloned upstream GFP in pCN52. Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	This study
<i>phssRS</i> -HA	<i>hssRS</i> promoter region and <i>hssRS</i> genes with a HA epitope at the Ct of <i>hssS</i> from <i>S. aureus</i> HG001. Tet <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	This study
<i>phssRS</i> -HA $\Delta$ ECL	<i>hssRS</i> promoter region and <i>hssRS</i> $\Delta$ ECL genes with a HA epitope at the Ct of <i>hssS</i> $\Delta$ ECL from <i>S. aureus</i> HG001. Tet <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	This study
pET200- <i>hrtB</i> ECL	<i>hrtB</i> ECL, coding sequence corresponding to AAs [38-241] of <i>S. aureus</i> HrtB cloned into pET200. Amp <sup>R</sup>	This study
p $\Delta$ <i>hssRS</i>	<i>hssRS</i> fragment cloned into pMAD to obtain the HG001- $\Delta$ <i>hssRS</i> mutant.	[8]
p $\Delta$ <i>hrtBA</i>	<i>hrtBA</i> fragment cloned into pMAD to obtain the HG001 $\Delta$ <i>hrtBA</i> mutant. Amp <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup>	This study

**S2 Table.** Oligonucleotides used in this study.

<i>Primer</i>	<i>Sequence 5'-3'</i>	<i>Target</i>
<b>O1</b>	TATGAACATGATGAGTGATCGTTAA	pCN52(CM <sup>R</sup> )
<b>O2</b>	GTTAAGGGATGCATAAACTGCATCC	pCN52(CM <sup>R</sup> )
<b>O3</b>	TTAACGATCACTCATCATGTTTCATAGCTTTGGCAGTTT ATTCTTG	pCN52(CM <sup>R</sup> )
<b>O4</b>	GGATGCAGTTTATGCATCCCTTAACACAGTCGGCATT TCTCATA	pCN52(CM <sup>R</sup> )
<b>O5</b>	AATTAAGAATTCATCATTTCGTCCAGTAAAA	pMBP-HssS <sub>cyto</sub>
<b>O6</b>	ATTTTAAAGCTTTTAAAGTGAATTATTTGG	pMBP-HssS <sub>cyto</sub>
<b>O7</b>	ATTTTAGAATTCGGACAAGTTGATCAAATG	pMBP- HssS <sub>cyto</sub> ΔHAMP
<b>O8</b>	ATTTTAGAATTCGCACCATAGCTATAAACT	pP <sub>hrtBA-lac</sub>
<b>O9</b>	ATTTTAGGATCCATCGATTCACTTCTCCCT	pP <sub>hrtBA-lac</sub>
<b>O10</b>	ATTTTAGAATTCGATCCATCGATTCACTTC	pP <sub>hssRS-lac</sub>
<b>O11</b>	TAAAATGGATCCAGCTATAAACTCCCTTAT	pP <sub>hssRS-lac</sub>
<b>O12</b>	GGGGCTGCAGCTCCCTATTTCTTCTTTAGCG	phssRS-HA
<b>O13</b>	AATCTGGAACATCATATGGATACATAAGTGAATTATTT GGCAGTGTAATA	phssRS-HA
<b>O14</b>	AATTAAGGATCCCTTAAGCATAATCTGGAACATCATAT GGATACAT	phssRS-HA
<b>O16</b>	TTAAAAGCATCTAATATGCGTCCAGATATT	phssRS-HA ΔECL
<b>O17</b>	AATATCTGGACGCATATTAGATGCTTTTAA	phssRS-HA ΔECL
<b>O18</b>	TTACCGGAATTCATCGATTCACTTCTCCCT	pP <sub>hrtBA-gfp</sub>
<b>O19</b>	AATCGCGGATCCAGCTATAAACTCCCTTAT	pP <sub>hrtBA-gfp</sub>
<b>O20</b>	ATGCAGGATCCGCTGATTAATATCTGTCAGTAAATT	pP <sub>hrt-hrtR-gfp</sub>
<b>O21</b>	TGCACGAATTCCTATTTTTTGCTTTCAGTAACATAA	pP <sub>hrt-hrtR-gfp</sub>
<b>O22</b>	ATAATAGGATCCCTTAAGCATAATCTGGAAC	phssRS-HA, P <sub>hrtBA-lac</sub>

<b>O23</b>	TAATAAGGATCCATCGATTCACTTCTCCCT	<i>phssRS</i> -HA, P <sub>hrtBA</sub> - <i>lac</i>
<b>O24</b>	ATAATAGGATCCTTAAGCATAATCTGGAAC	<i>phssRS</i> -HA, P <sub>hrtBA</sub> - <i>gfp</i>
<b>O25</b>	TAATAAGGTACCATCGATTCACTTCTCCCT	<i>phssRS</i> -HA, P <sub>hrtBA</sub> - <i>gfp</i>
<b>O26</b>	CACCTCGTTATTTGAACACTTTGATA	pET200- <i>hrtB</i> ECL
<b>O27</b>	TTAACTAACAATCATCATATTT	pET200- <i>hrtB</i> ECL
<b>O28</b>	TTTACTGGACGAATGATTTTAAACATGATTCTC	<i>phssRS</i> <sub>cyto</sub> -HA, P <sub>hrtBA</sub> - <i>gfp</i>
<b>O29</b>	GAGAATCATGTTTAAAATCATTCGTCCAGTAAA	<i>phssRS</i> <sub>cyto</sub> -HA, P <sub>hrtBA</sub> - <i>gfp</i>
<b>O30</b>	TTTGATCAACTTGTCTTTAAACATGATTCTC	<i>phssRS</i> <sub>cyto</sub> $\Delta$ HAMP - HA, P <sub>hrtBA</sub> - <i>gfp</i>
<b>O31</b>	GAGAATCATGTTTAAAGGACAAGTTGATCAAA	<i>phssRS</i> <sub>cyto</sub> $\Delta$ HAMP - HA, P <sub>hrtBA</sub> - <i>gfp</i>
<b>O32</b>	TTAATTGGATCCACTGTTTCAATTG	pMAD $\Delta$ <i>hrtBA</i>
<b>O33</b>	CGTCTTTACAAGCCAATCGATTCACTTCTC	pMAD $\Delta$ <i>hrtBA</i>
<b>O34</b>	GAGAAGTGAATCGATTGGCTTGTAAGACG	pMAD $\Delta$ <i>hrtBA</i>
<b>O35</b>	AATTAACCCGGGGTGCCGTCTCAGC	pMAD $\Delta$ <i>hrtBA</i>

### Intracellular heme activates HssS

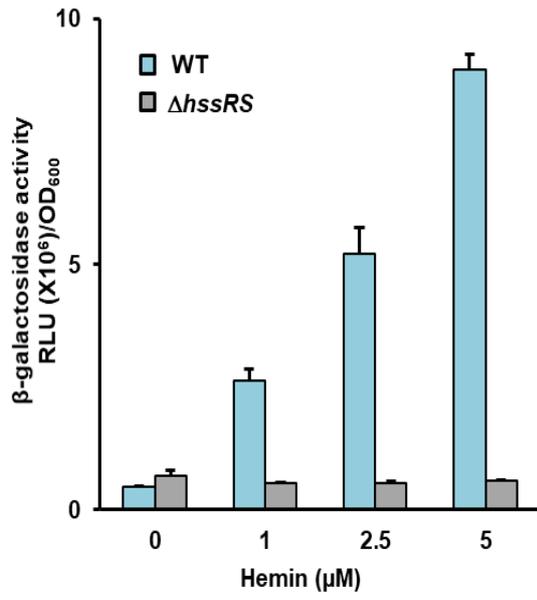


Figure S1

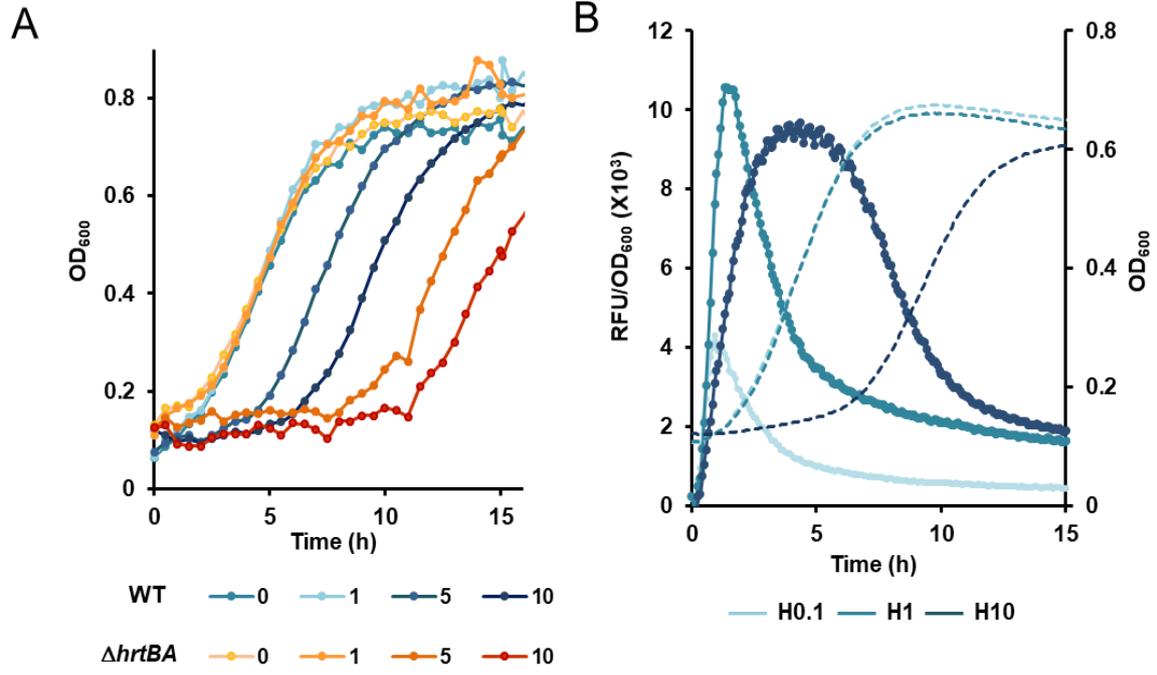


Figure S2

### Intracellular heme activates HssS

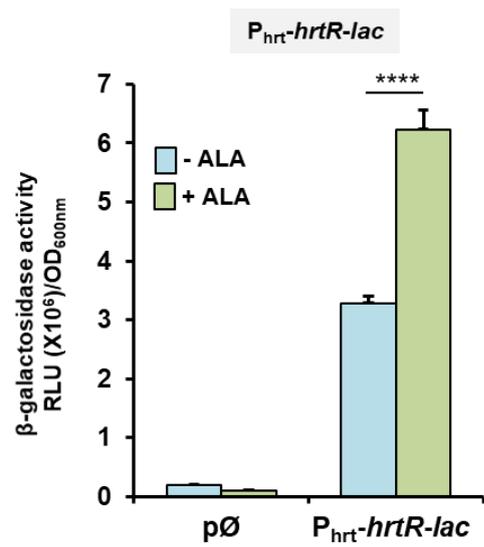


Figure S3

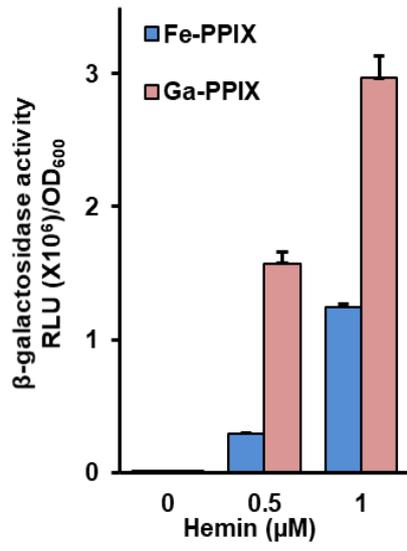


Figure S4

# Intracellular heme activates HssS

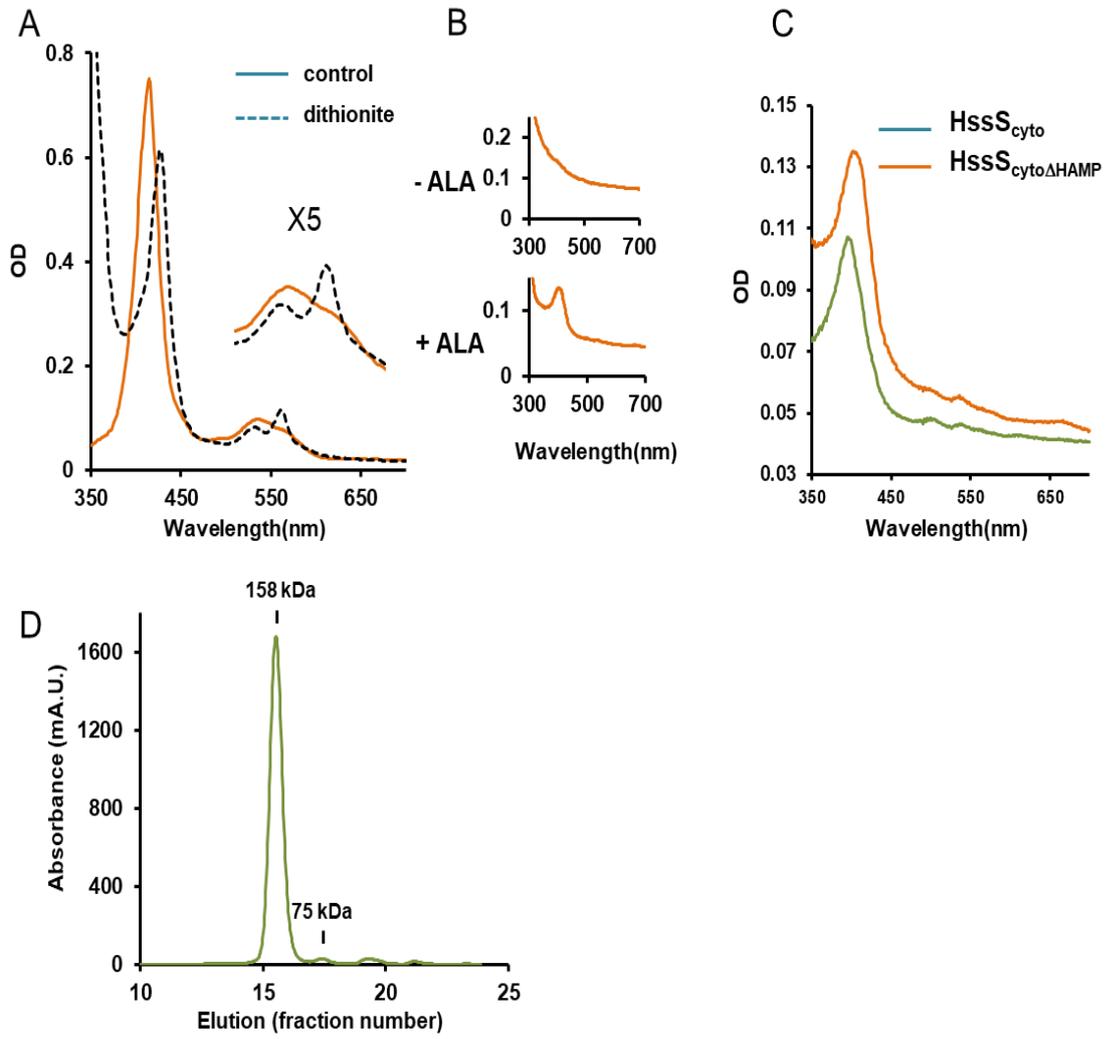


Figure S5



### A.2.3. Principales conclusions

La construction de plasmides rapporteurs m'a permis de déterminer que l'activité du 2-CS HssRS (promoteur  $P_{hrtBA}$  contrôlant le gène *lac* ou le gène *gfp*) est activé dans des conditions où la concentration en hème intracellulaire est modifiée. Une première condition est l'absence des gènes *hrtBA* entraînant une accumulation d'hème dans la cellule et la deuxième est l'ajout d'ALA (acide  $\delta$ -aminolévulinique) dans le milieu de culture ayant pour effet d'augmenter la biosynthèse de l'hème endogène. Ces différentes conditions ont permis d'observer une corrélation entre la concentration d'hème intracellulaire et l'activité de HssS. Suite à cette observation, nous en avons déduit que HssS répond à l'hème intracellulaire et non à l'hème exogène.

Suite à ce premier résultat nous avons voulu déterminer le rôle de la boucle extracellulaire de HssS dans la détection de l'hème. Pour cela nous avons construit une protéine HssS chimérique où la boucle extracellulaire a été tronquée (HssS- $\Delta$ ECD) puis étudié la complémentation d'un mutant  $\Delta$ *hssRS* avec cette protéine. Les résultats montrent que HssS- $\Delta$ ECD est capable d'être activé par l'hème de la même manière que la protéine sauvage. De plus l'absence de la boucle extracellulaire ne modifie pas la résistance de *S. aureus* à la toxicité de l'hème par rapport au senseur exprimé dans son intégralité. Ces résultats ont été confirmés en montrant que l'expression chez *S. aureus* de la partie cytoplasmique de HssS permet toujours la transmission du signal hème pour l'induction de HrtBA. Enfin, dans cette partie cytoplasmique, le domaine HAMP impliqué dans le transfert de l'activation de la partie extracellulaire au domaine kinase des senseurs TCS classiques ne semble pas essentiel.

Ces observations *in vivo* ont été corroborées *in vitro*. J'ai purifié une protéine recombinante comprenant le domaine cytoplasmique de HssS et montré que cette protéine était une hémoprotéine qui lie l'hème par une liaison hexacoordonnée. De plus ce résultat a été confirmé chez des homologues de HssS chez d'autres espèces comme *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus haemolyticus*. Bien que je n'ai pas identifié les ligands de l'hème chez HssS et que les essais de cristallisation de la partie cytoplasmique aient échoué, l'ensemble de ces résultats nous permet de conclure que malgré une topologie d'histidine

kinase à senseur extracellulaire HssS détecte l'hème par une liaison directe par l'intermédiaire de son domaine cytoplasmique.

Ces résultats indiquent que l'hème doit être internalisé pour activer HssS et donc induire la transcription de HrtBA, démontrant, similairement à mes résultats chez *E. faecalis*, que ce système contrôle l'homéostasie intracellulaire de l'hème. Ces résultats impliquent que le pool d'hème détecté par HssS n'est pas internalisé par le système Isd. En effet, dans nos conditions d'expérimentations, le système Isd est réprimé car j'ai utilisé des milieux de culture non carencés en fer et le système Isd est contrôlé par le régulateur Fur (réprime lorsque du fer est présent dans le milieu). J'ai confirmé ces résultats en montrant l'inactivation du système Isd (mutant *isdA*), ne modifiait pas l'activation de HssS.

## B. Discussions et perspectives

### B.1. HssS, une histidine kinase à senseur cytoplasmique

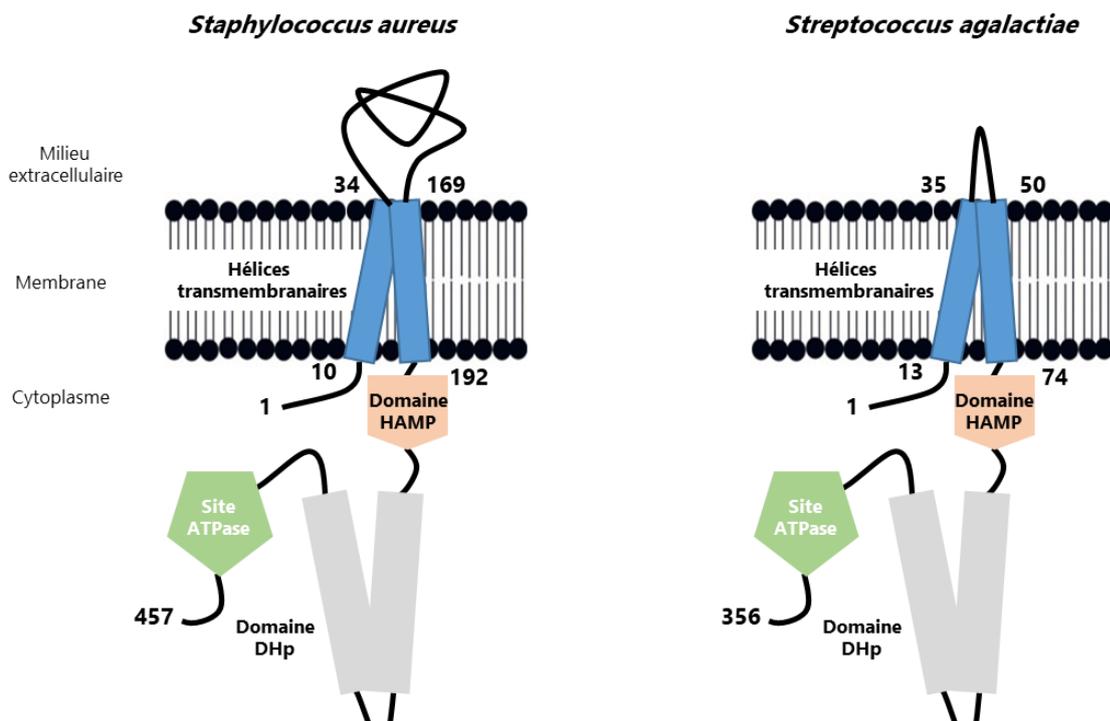
Dans cette seconde publication, nous avons pu montrer que l'histidine kinase HssS de *S. aureus* détecte l'hème par l'intermédiaire de son domaine cytoplasmique. Cette détection est médiée par une liaison hexacoordonnée de l'hème sur la partie cytoplasmique comprenant le domaine de dimérisation et de phosphorylation et le domaine catalytique et de fixation de l'ATP.

Dans la littérature, la majorité des mécanismes de sensing par les HK déterminés correspondent à des senseurs extracellulaires (Cheung and Hendrickson, 2010; Jacob-Dubuisson et al., 2018). De plus une grande partie de ces HK à senseurs extracellulaires ont une topologie proche de celle de HssS, c'est-à-dire un seul domaine extracellulaire encadré de deux domaines transmembranaires (**Figure 10**)(Mascher et al., 2006). Enfin parmi les HK à senseurs cytoplasmiques la majorité des molécules détectées correspondent à des composés inorganiques comme des gaz ou des ions (Cheung and Hendrickson, 2010). Certaines de ces HK utilisent l'hème comme cofacteur au niveau de domaines PAS ou GAF (**Figure 3**) comme la HK FixL de *Bradyrhizobium japonicum* qui détecte l'O<sub>2</sub> par l'intermédiaire d'une molécule d'hème fixée au niveau d'un domaine PAS (Green et al., 2009). Ici nous montrons pour la

## Projet 2

première fois la détection au niveau du cytoplasme d'une molécule organique par une HK ancrée à la membrane. De plus aucun domaine PAS ou GAF n'est présent dans le domaine cytoplasmique de HssS laissant supposer une liaison de l'hème à HssS par un nouveau domaine. La recherche de ligands *in vitro* avec des mutants ponctuels des histidines ou des tyrosines de la partie cytoplasmique de HssS n'a pas permis de caractériser la liaison. Afin de caractériser de façon plus précise la liaison de l'hème à HssS des expériences de spectrométrie Raman sont envisagées.

HssS est présente chez d'autres espèces comme *Streptococcus agalactiae* où la régulation de *hrtBA* dépend elle aussi du pool d'hème cytoplasmique (Joubert et al., 2017). De plus chez *S. agalactiae*, la boucle extracellulaire de HssS est réduite de 135 AA à seulement 15 AA (**Figure 45**) laissant supposer que la boucle n'est pas impliquée dans la détection de l'hème chez cette bactérie. Le mécanisme de détection de l'hème par HssRS chez ces deux bactéries pourrait être similaire.



**Figure 45 : Structure schématique de la protéine HssS chez *S. aureus* et chez *S. agalactiae*.** Les deux HssS sont composées d'une courte boucle extracellulaire (en noir), flanquée de deux domaines transmembranaires (en bleu) prolongés par une région intracytoplasmique. La différence se situe au niveau de la taille de la boucle extracellulaire, (135 AA) chez *S. aureus* et (15 AA) chez *S. agalactiae*.

## **B.2. L'hème une molécule essentielle pour *S. aureus* durant les infections ?**

Il a été démontré que l'hème est la source de fer privilégiée de *S. aureus* au cours de l'infection (Skaar et al., 2004a), mais il peut être aussi utilisé directement et incorporé en tant que cofacteur dans la chaîne respiratoire (Haley and Skaar, 2012; Hammer et al., 2013; Reniere et al., 2007). L'impact de la toxicité de l'hème au cours de l'infection a aussi été étudiée (Torres et al., 2007). Une étude comparant les souches WT,  $\Delta hrtA$  et  $\Delta hssR$  dans un modèle d'infection systémique chez la souris a montré une hypervirulence de ces deux mutants. Cette étude a ensuite été invalidée. Une étude du rôle de hrtBA dans la virulence de *S. aureus* reste donc à faire. On peut néanmoins supposer que, similairement à *S. agalactiae*, HrtBA participe à l'adaptation de *S. aureus* à l'hème de l'hôte en particulier dans les organes riches en sang comme le foie (Joubert et al., 2017). Par conséquent inhiber l'efflux de l'hème représente une nouvelle option de traitement pour les infections à *S. aureus* du système sanguin en supposant que l'inactivation de la pompe HrtBA et donc l'accumulation de l'hème entraînerait une mortalité accrue de la bactérie. Tout comme *E. faecalis* une étude *in vitro* des différents mutants de *S. aureus* ( $\Delta hssRS$  et  $\Delta hrtBA$ ) dans des milieux supplémentés soit en hémoglobine ou en sang suivie d'une étude *in vivo* pourront permettre de déterminer si ce système est indispensable pour la survie de *S. aureus* dans le système sanguin de l'hôte.



# Discussion générale

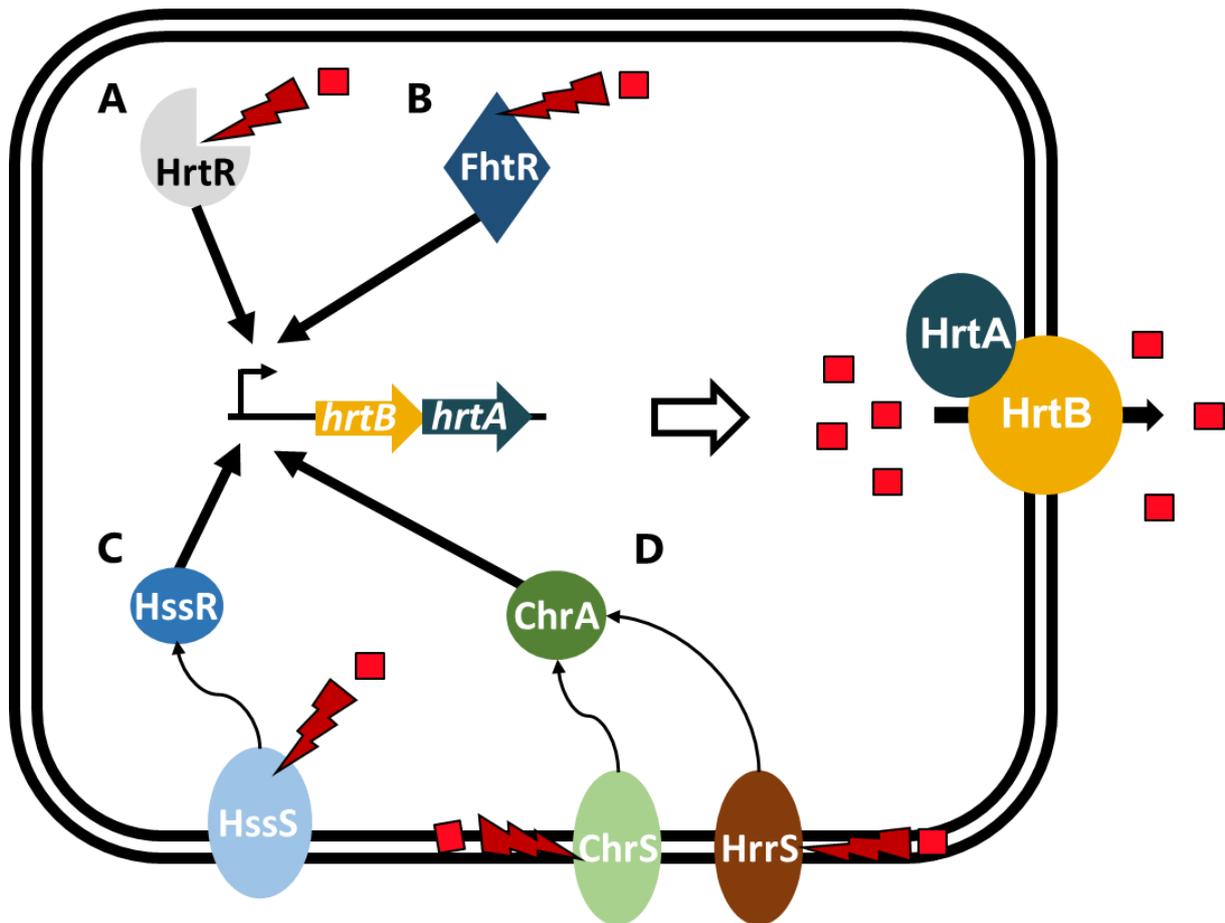


## Discussion générale

### A. La régulation de *hrtBA*

Nous avons mis en évidence un nouveau régulateur de l'opéron *hrtBA* chez *E. faecalis* qui est un facteur de transcription de la famille TetR. Cette protéine nommée FhtR n'a aucune similarité de séquence d'AA avec HrtR un régulateur de transcription de l'opéron *hrtBA* chez *L. lactis* (**Figure 46 A et B**)(Lechardeur et al., 2012). Ces deux régulateurs de la famille TetR s'ajoutent donc aux deux autres systèmes de régulation de l'opéron *hrtBA* appartenant à la famille des 2-CS, HssRS décrit chez différents pathogènes comme *S. aureus*, *B. anthracis* et *S. agalactiae* (Joubert et al., 2017; Stauff and Skaar, 2009a, 2009c) et le système ChrSA/HrrS présent chez *C. diphtheriae* et *C. glutamicum* (**Figure 46C et D**)(Burgos and Schmitt, 2012; Frunzke et al., 2011).

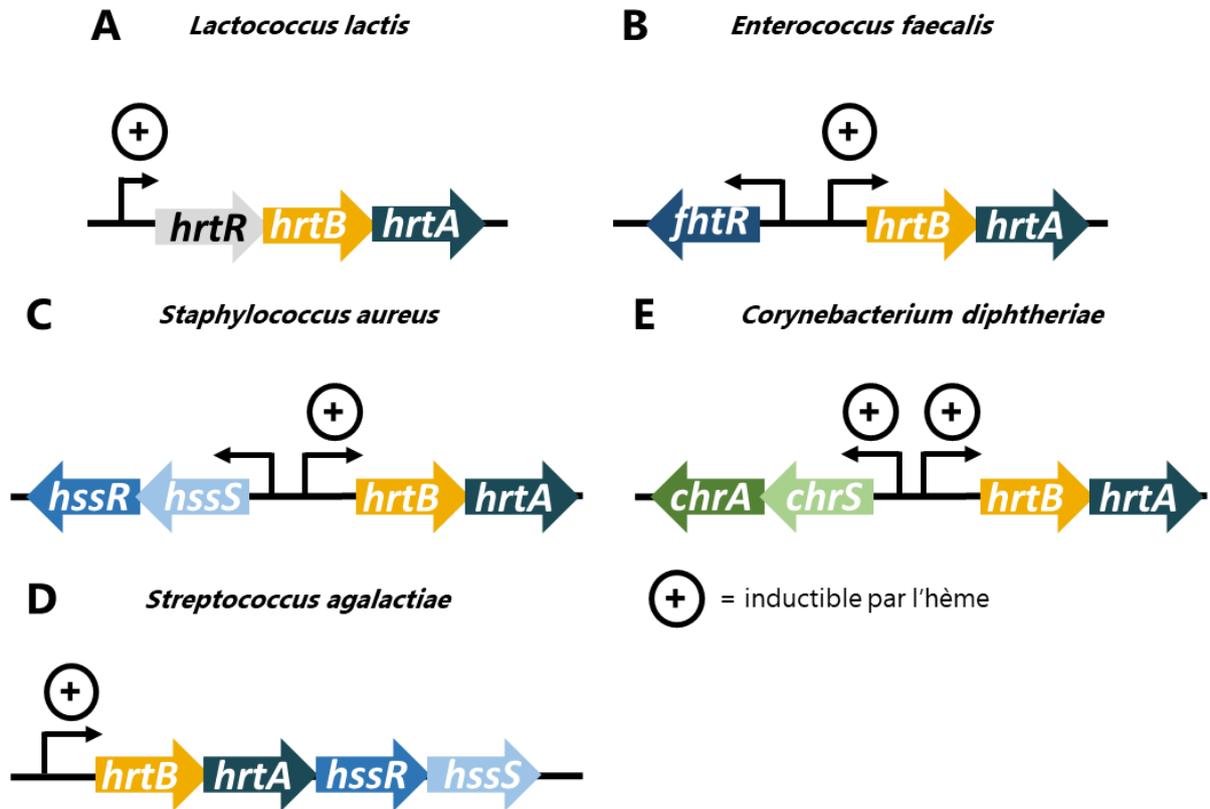
Il semblerait donc que si la stratégie de l'efflux de l'hème grâce au transporteur ABC HrtBA est conservée chez les bactéries à Gram positif, sa régulation quant à elle est multiple mais toujours par l'hème intracellulaire (**Figure 46**). D'un point de vue évolutif, les 1-CS sont décrits comme les ancêtres des 2-CS car lorsque l'on compare ces deux familles de systèmes de perception on retrouve des domaines senseurs et réponses identiques (**voir Synthèses bibliographique A**)(Marijuán et al., 2010, 2018; Ulrich et al., 2005). La différence entre ces deux systèmes est la transduction du signal qui se résume à changement de conformation ou d'oligomérisation de la protéine pour les 1-CS (Ulrich et al., 2005) alors que chez les 2-CS, cette étape fait intervenir trois étapes enzymatiques de phosphorylation (autophosphorylation, transfert du groupement phosphate et déphosphorylation du régulateur)(Jacob-Dubuisson et al., 2018). Ces étapes de phosphorylations permettraient un contrôle plus fin de la réponse bactérienne avec une déphosphorylation qui permet un arrêt de la réponse. On retrouve ce contrôle dans la réponse à l'hème avec le système ChrSA/HrrS où la phosphorylation peut être effectuée par les deux HK ChrS et HrrS alors que la déphosphorylation n'est possible que par ChrS (Keppel et al., 2019). La phosphorylation par deux HK permet une réponse plus rapide et plus forte et la forte activité phosphatase de ChrS



**Figure 46 : Schéma récapitulatif des différents systèmes connus de régulation du transporteur HrtBA.** (A) Le facteur de transcription HrtR décrit chez *Lactococcus lactis*. D'après (Lechardeur et al., 2012). (B) Le facteur de transcription FhtR décrit chez *Enterococcus faecalis*. D'après cette étude. (C) Le système à deux composants HssRS décrit chez *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* et *Streptococcus agalactiae*. D'après (Stauff et al., 2007, 2009) (Joubert et al., 2017) et cette étude. (D) Le système à deux composants ChrSA et l'histidine kinase HrrS décrits chez *Corynebacterium diphtheriae* et *glutamicum*. D'après (Keppel et al., 2019).

permet l'arrêt de la réponse lorsque la concentration en hème diminue (Keppel et al., 2019). Néanmoins l'étude de la dynamique de la réponse à l'hème via HrtR ou HssS chez *S. aureus* semble similaire (**Publication 2**). De plus, la dynamique de la réponse transitoire observée, ne semble pas influencée par l'absence de HrtBA, ce qui laisse supposer que d'autres mécanismes que la diminution de l'hème intracellulaire lorsque HrtBA est exprimé sont impliqués. Dans le cas de HssS, il serait intéressant d'étudier les cinétiques de réponses dans un mutant de l'activité phosphatase (Keppel et al., 2019). Il serait aussi pertinent d'étudier le devenir des complexes FhtR-hème et HrtR-hème pour savoir s'ils sont recyclés ou dégradés.

Un autre avantage apporté par les 2-CS serait la possibilité de détecter des stimuli extracellulaires ou membranaire grâce à l'histidine kinase membranaire. Cela permettrait une réponse plus rapide par rapport aux 1-CS, dont 97 % sont répertoriés comme protéines cytoplasmiques car ne possédant pas de région transmembranaire (Marijuán et al., 2010; Ulrich et al., 2005). Dans le cas de composés toxiques pour la cellule cela permet une adaptation avant que la molécule ne génère du stress dans le cytoplasme. Pourtant pour la HK HssS nous avons montré que malgré une topologie de HK membranaire à senseur extracellulaire elle réagit à l'hème cytoplasmique tout comme les 1-CS FhtR et HrtR. Il a aussi été montré dans le cas de FhtR que le système FhtR/HrtBA avait un impact sur la biodisponibilité et l'utilisation de l'hème dans le cytoplasme avec l'exemple de la catalase KatA. De plus chez certaines bactéries l'hème est synthétisé de façon endogène dans la cellule, il serait donc intéressant d'étudier l'impact de ces différents systèmes de régulation sur la biosynthèse et la biodisponibilité de l'hème endogène. Ces différents systèmes permettent aussi de détecter des concentrations différentes d'hème. Par exemple, l'expression hétérologue de HrtR chez *S. aureus* (**publication 2**) permet la détection de l'hème endogène alors que HssS n'est pas activé sans apport d'hème exogène. L'expression hétérologue de *hssRS* de *Streptococcus agalactiae* permet aussi la détection de l'hème endogène chez *S. aureus* (non-montré).



**Figure 47 : Organisation génétique de l'opéron *hrtBA* et de ses différents systèmes de régulation chez différentes bactéries. (A)** Chez *Lactococcus lactis*, le régulateur HrtR et le transporteur HrtBA appartiennent au même opéron. D'après (Lechardeur et al., 2012). **(B)** Chez *Enterococcus faecalis*, le régulateur FhtR est exprimé de façon constitutive et n'appartient pas au même opéron que *hrtBA*. D'après cette étude. **(C)** Chez *Staphylococcus aureus*, les deux opérons *hssRS* et *hrtBA* sont adjacents et *hssRS* est exprimé de façon constitutive. D'après (Stauff et al., 2007). **(D)** Chez *Streptococcus agalactiae*, *hrtBA* et *hssRS* sont localisés dans le même opéron. D'après (Joubert et al., 2017). **(E)** Chez *Corynebacterium diphtheriae*, les deux opérons *chrSA* et *hrtBA* sont adjacents mais sont tous les deux inductibles par l'hème. D'après (Keppel et al., 2019).

En plus de la différence de système de régulation, on peut aussi observer des différences d'organisation génétique entre l'opéron *hrtBA* et ses différents systèmes de régulation (**Figure 47**). On remarque qu'entre les deux 1-CS HrtR et FhtR il y a une différence car le gène *hrtR* appartient à l'opéron *hrtRBA* alors que le gène *fhtR* est exprimé de façon constitutive (**Figure 47A et B**). On retrouve aussi une différence d'organisation génétique entre *S. aureus* et *S. agalactiae*, chez *S. aureus* les deux opérons *hssRS* et *hrtBA* sont adjacents et *hssRS* est exprimé de façon constitutive alors que, chez *Streptococcus agalactiae*, *hrtBA* et *hssRS* sont localisés dans le même opéron (**Figure 47C et D**). Enfin chez *C. diphtheriae*, les deux opérons *chrSA* et *hrtBA* sont séparés et inductibles par l'hème (**Figure 47E**). Il sera donc intéressant d'étudier l'impact de ces différentes organisations génétiques sur le fonctionnement de ces différents systèmes. Par exemple dans le cas de FhtR, cette expression constitutive irait dans le sens d'une deuxième fonction de protéine chaperonne de l'hème. FhtR pourrait donc participer à la résistance à la toxicité de l'hème ou prendre part au transport et à la biodisponibilité de l'hème intracellulaire.

En conclusion, bien que préliminaires, ces résultats permettent de penser que chaque système est adapté à sa bactérie hôte et aux environnements des différentes bactéries. Dans ce sens, des recherches bio-informatiques ont permis de montrer que les bactéries qui expriment le système HssRS sont des bactéries pathogènes alors que celles qui expriment HrtR sont des bactéries commensales ou alimentaires. Dans le cas de FhtR, ce sont des bactéries à la frontière entre commensalisme et pathogénicité, présentes dans l'intestin. Ces différents systèmes de régulations sont donc vraisemblablement les mieux adaptés aux différents environnements contenant de l'hème rencontrés par ces bactéries diversifiées.

## **B. Mécanisme d'export de l'hème par HrtBA**

Certaines études montrent que HrtBA ne contrôle pas seulement l'homéostasie de l'hème intracellulaire mais aussi l'accumulation de l'hème dans la membrane (Joubert et al., 2014; Wakeman et al., 2012). Nous avons aussi observé ce résultat chez *E. faecalis* dans la

## Discussion générale

première publication où la surproduction du transporteur d'efflux HrtBA (mutant  $\Delta fhtR$ ) empêche l'accumulation de l'hème dans la membrane.

De plus comme il a été rappelé dans la synthèse bibliographique, HrtB appartient à la famille des transporteurs ABC MacB. Des premières données obtenues à partir de la structure cristallographique d'un transporteur de cette famille chez une bactérie à Gram positif propose un efflux du substrat par la membrane sur le côté de la perméase (**Figure 28**) (Yang et al., 2018). Cette hypothèse de fonctionnement des transporteurs de la famille MacB concorde avec les observations obtenues avec le transporteur HrtBA même s'il n'y a pas de protéine MacA-like associée à HrtBA (**Synthèse bibliographique Figure 28**) (Joubert et al., 2014). HrtBA aurait plutôt un rôle de barrière « Gatekeeper » au passage de l'hème dans l'espace intracellulaire au travers de la membrane plutôt que celui de transporteur d'efflux de l'espace intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Ce mécanisme serait compatible avec la nature lipophile de l'hème. Pour déterminer le fonctionnement exact de HrtBA des études *in vitro* avec des vésicules à membrane inversés contenant HrtBA pourraient nous permettre de voir si HrtBA est capable ou non d'effluer du cytoplasme (Steinfels et al., 2004). D'autres expériences dans lesquelles, *hrtBA* serait sous contrôle d'un promoteur inducible, nous permettrait de déterminer si HrtBA est capable d'effluer l'hème préaccumulé dans la membrane. Enfin une étude cristallographique de HrtBA renseignerait sur la possibilité ou non du passage de l'hème sur le côté de la perméase au niveau de la membrane (Lyu et al., 2020; Yang et al., 2018).

## C. Import de l'hème

Au cours de ces projets nous avons mis en évidence que les régulateurs FhtR et HssRS de l'opéron *hrtBA* détectent l'hème au niveau du cytoplasme même si celui-ci a été ajouté dans le milieu extracellulaire. Ces observations impliquent une internalisation de l'hème exogène par la bactérie. Pourtant nous avons démontré que l'unique système décrit chez *S. aureus* pour importer l'hème n'était pas activé dans nos conditions expérimentales. En ce qui concerne *E. faecalis*, aucun transporteur d'hème connu n'a été identifié avec une approche par Blast.

L'import de l'hème chez les bactéries reste une question en suspens car si quelques systèmes d'import ont été décrits dans la littérature (**Synthèse bibliographique B.3.4.**) leurs fonctions exactes restent à préciser (Choby and Skaar, 2016). Si on prend l'exemple du système Isd chez *S. aureus* qui est décrit comme un système d'import de l'hème. Pourtant une première étude a montré qu'une délétion des gènes du système Isd n'empêche pas l'utilisation de l'hème libre ou associé à l'hémoglobine chez *S. aureus* (Wright and Nair, 2012). Nous avons confirmé ce résultat dans notre deuxième publication où l'hème ajouté dans le milieu extracellulaire est internalisé par la bactérie sans que ce système soit activé. De plus avec la régulation de ce système d'import par le régulateur Fur et la présence de gène codant pour des oxygénases à hème dans l'opéron, on peut supposer que ce système soit principalement dédié à supplémenter *S. aureus* en fer dans des environnements carencés en ce métal. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'autres transporteurs de l'hème ou de mécanismes de passage de la membrane par diffusion ou réaction d'oxydo-réduction.

Cependant, un mécanisme de diffusion de l'hème à travers la membrane reste peu probable malgré le caractère hydrophobe de la molécule d'hème. Des données de la littérature semblent montrer que l'hème, s'il s'insère facilement dans les membranes, ne la traverse pas. Ainsi, une étude avec des liposomes a montré que l'hème ne peut traverser la bicouche lipidique (Light and Olson, 1990). Une autre étude montre que l'hème s'associe aux lipides membranaires par l'intermédiaires d'interactions fortes au niveau de ses chaînes propionates l'empêchant de traverser la membrane (Krishnamurthy et al., 2006). Nous avons aussi réalisé un test de diffusion de l'hème à travers une bicouche lipidique constituée de lipides membranaires purifiés de *L. lactis* qui a montré que l'hème ne traversait pas la membrane artificielle (données non montrées). L'hypothèse pour l'import de l'hème s'oriente donc vers soit des transporteurs non spécifiques ou un passage de l'hème à travers la membrane suite à des réactions d'oxydoréduction. En effet chez *L. lactis*, il a été montré que les ménaquinones jouent un rôle sur l'accumulation d'hème dans la membrane suggérant une incorporation de l'hème dans la membrane suite à sa réduction du fer par les ménaquinones (Joubert et al., 2014). On pourrait donc imaginer le passage de la membrane vers le cytoplasme par l'intermédiaire d'une réaction d'oxydoréduction. Une autre explication pourrait être que dans nos conditions expérimentales, l'hème en concentration de l'ordre du  $\mu\text{M}$  peut passer par diffusion alors que dans des conditions physiologiques l'internalisation nécessite des

transporteurs spécifiques. Quoi qu'il en soit, la capacité de HrtBA à effluer l'hème de la membrane et son impact sur l'homéostasie cytoplasmique de l'hème, semblent suggérer que ce système est le médiateur principal de la concentration intracellulaire d'hème et donc indirectement de son internalisation.

### **D. Les systèmes senseur d'hème des bactéries pathogènes à Gram positif, des cibles antibiotiques innovantes**

Des études, chez différents pathogènes, montrent que l'hème peut être un avantage au cours de l'infection. Par exemple chez des bactéries qui ne synthétisent pas l'hème l'acquisition de l'hème exogène permet l'activation de chaîne respiratoire ou de catalase à hème dépendante comme chez *E. faecalis* (Frankenberg et al., 2002; Winstedt et al., 2000). L'activation de ces deux complexes protéiques permet, par exemple, une résistance au stress oxydant provoqué par les  $\beta$ -lactamines (Léger et al., 2019). Il a été montré chez *S. agalactiae* que l'inactivation de son cytochrome *bd* entraînait une diminution de croissance et une atténuation de la virulence dans des modèles murins (Joubert et al., 2017; Yamamoto et al., 2005). L'incorporation de l'hème à certaines protéines comme le complexe HsmA-hème chez *C. difficile* permet une meilleure résistance au stress oxydant et à des antibiotiques comme la vancomycine dans un contexte d'infection après inoculation de spores de *C. difficile* par gavage (Knippel et al., 2020). Malgré l'avantage apporté par l'utilisation de l'hème, le contrôle de sa concentration cytoplasmique reste primordiale pour la bactérie à cause du caractère toxique de cette molécule. Un des principaux systèmes de protection contre la toxicité de l'hème présent chez les bactéries à Gram positif est l'efflux grâce au transporteur HrtBA. Chez *S. agalactiae*, ce transporteur a un rôle primordial pour la survie et la virulence de la bactérie surtout au niveau d'organes riche en sang dans un modèle d'infection systémique chez la souris (Joubert et al., 2017).

Par conséquent cibler les systèmes qui régulent l'homéostasie de l'hème chez les bactéries semble une stratégie intéressante, surtout dans le cas d'infection cardiaque ou du système sanguin où la concentration en hème est la plus importante (Anzaldi and Skaar, 2010;

Choby and Skaar, 2016). De plus avec la diversité des systèmes de régulation du transporteur HrtBA, nous pourrions envisager des traitements ciblés en fonction des bactéries afin d'éviter d'impacter les bactéries du microbiote intestinal. En effet, l'expression de systèmes de régulation de HrtBA distincts selon les bactéries permettrait de cibler de manière spécifique un seul type de régulateur et donc de bactérie. Contrairement aux propositions de développement d'inhibiteur généraux des histidines kinases (Bem et al., 2015; Gotoh et al., 2010), la connaissance du mécanisme de reconnaissance de l'hème par les différents senseurs permettra de concevoir cette stratégie plus spécifique. L'objectif serait de prédire puis cribler des molécules qui empêcheraient l'activation des différents senseurs par l'hème en bloquant sa fixation. L'obtention de ces antagonistes spécifiques sera une grande avancée pour l'étude du mécanisme d'activation des senseurs mais aussi dans une perspective de développement de nouveaux traitements antibiotiques.

Cette stratégie pourrait être aussi considérée en appui à des traitements antibiotiques classiques qui pourraient être plus performants dans des conditions où le pathogène serait affaibli par son incapacité à s'adapter à la toxicité de l'hème. Ce type de stratégie permettrait aussi de diminuer les doses d'antibiotiques.



# Bibliographie



## Bibliographie

- Abicht, H.K., Martinez, J., Layer, G., Jahn, D., and Solioz, M. (2012). *Lactococcus lactis* HemW (HemN) is a haem-binding protein with a putative role in haem trafficking. *Biochem J* *442*, 335–343.
- Agudelo Higueta, N.I., and Huycke, M.M. (2014). Enterococcal Disease, Epidemiology, and Implications for Treatment. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds. (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary), p.
- Ahlquist, D.A., McGill, D.B., Schwartz, S., Taylor, W.F., and Owen, R.A. (1985). Fecal Blood Levels in Health and Disease. *New England Journal of Medicine* *312*, 1422–1428.
- Aki, Y., Nagai, M., Nagai, Y., Imai, K., Aki, M., Sato, A., Kubo, M., Nagatomo, S., and Kitagawa, T. (2010). Differences in coordination states of substituted tyrosine residues and quaternary structures among hemoglobin M probed by resonance Raman spectroscopy. *J Biol Inorg Chem* *15*, 147–158.
- Al Jubair, T., Singh, B., Fleury, C., Blom, A.M., Mörgelin, M., Thunnissen, M.M., and Riesbeck, K. (2014). *Haemophilus influenzae* stores and distributes hemin by using Protein E. *International Journal of Medical Microbiology* *304*, 662–668.
- Allen, C.E., and Schmitt, M.P. (2009). HtaA Is an Iron-Regulated Hemin Binding Protein Involved in the Utilization of Heme Iron in *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Bacteriology* *191*, 2638–2648.
- Allen, C.E., and Schmitt, M.P. (2011). Novel Hemin Binding Domains in the *Corynebacterium diphtheriae* HtaA Protein Interact with Hemoglobin and Are Critical for Heme Iron Utilization by HtaA. *Journal of Bacteriology* *193*, 5374–5385.
- Alm, E., Huang, K., and Arkin, A. (2006). The Evolution of Two-Component Systems in Bacteria Reveals Different Strategies for Niche Adaptation. *PLOS Computational Biology* *2*, e143.
- Anantharaman, V., and Aravind, L. (2000). Cache – a signaling domain common to animal Ca<sup>2+</sup>-channel subunits and a class of prokaryotic chemotaxis receptors. *Trends in Biochemical Sciences* *25*, 535–537.
- Andersen, C.B.F., Torvund-Jensen, M., Nielsen, M.J., Oliveira, C.L.P. de, Hersleth, H.-P., Andersen, N.H., Pedersen, J.S., Andersen, G.R., and Moestrup, S.K. (2012). Structure of the haptoglobin–haemoglobin complex. *Nature* *489*, 456–459.
- Andersen, M.H., Holle, S.L.K., Klein, C.F., Bruun, N.E., Arpi, M., Bundgaard, H., Tønder, N., and Iversen, K.K. (2020). Risk for infective endocarditis in bacteremia with Gram positive cocci. *Infection*.
- Andreini, D.E., Bell, C.D., Xing, M., and Li, B. (2020). Insights into the Emergence, Clinical Prevalence, and Significance of *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants. In *Racing for the Surface: Pathogenesis of Implant Infection and Advanced Antimicrobial Strategies*, B. Li, T.F. Moriarty, T. Webster, and M. Xing, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 189–211.
- Andrewes, F.W., and Horder, T.J. (1906). a study of the streptococci pathogenic for man. *The Lancet* *168*, 775–783.
- Ann M. Stock, Victoria L. Robinson, and Goudreau, and P.N. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry* *69*, 183–215.
- Anzaldi, L.L., and Skaar, E.P. (2010). Overcoming the Heme Paradox: Heme Toxicity and Tolerance in Bacterial Pathogens. *Infect. Immun.* *78*, 4977–4989.

## Bibliographie

- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., and Shirtliff, M.E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence* 2, 445–459.
- Armin, S., Fallah, F., Karimi, A., Rashidan, M., Shirdust, M., and Azimi, L. (2017). Genotyping, antimicrobial resistance and virulence factor gene profiles of vancomycin resistance *Enterococcus faecalis* isolated from blood culture. *Microbial Pathogenesis* 109, 300–304.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Visca, P., Altruda, F., Tolosano, E., Beringhelli, T., and Fasano, M. (2005). Hemoglobin and heme scavenging. *I.U.B.M.B. Life* 57, 749–759.
- Balderas, M.A., Nobles, C.L., Honsa, E.S., Alicki, E.R., and Maresso, A.W. (2012). Hal Is a *Bacillus anthracis* Heme Acquisition Protein. *Journal of Bacteriology* 194, 5513–5521.
- Bastos, C.P., Bassani, M.T., Mata, M.M., Lopes, G.V., and da Silva, W.P. (2017). Prevalence and expression of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from food poisoning outbreaks. *Can. J. Microbiol.* 63, 834–840.
- Battersby, A.R. (2000). Tetrapyrroles: the pigments of life. *Nat. Prod. Rep.* 17, 507–526.
- Baureder, M., Reimann, R., and Hederstedt, L. (2012). Contribution of catalase to hydrogen peroxide resistance in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiology Letters* 331, 160–164.
- Baureder, M., Barane, E., and Hederstedt, L. (2014). In Vitro Assembly of Catalase. *J. Biol. Chem.* 289, 28411–28420.
- Beale, S.I., Gough, S.P., and Granick, S. (1975). Biosynthesis of delta-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *PNAS* 72, 2719–2723.
- Bellelli, A., and Brunori, M. (2011). Hemoglobin allostery: variations on the theme. *Biochim. Biophys. Acta.* 1807, 1262–1272.
- Bem, A.E., Velikova, N., Pellicer, M.T., Baarlen, P. van, Marina, A., and Wells, J.M. (2015). Bacterial Histidine Kinases as Novel Antibacterial Drug Targets. *ACS Chem. Biol.* 10, 213–224.
- Bezwodna, W.R., Bothwell, T.H., Charlton, R.W., Torrance, J.D., MacPhail, A.P., Derman, D.P., and Mayet, F. (1983). The relative dietary importance of haem and non-haem iron. *S. Afr. Med. J.* 64, 552–556.
- Bibb, L.A., and Schmitt, M.P. (2010). The ABC transporter HrtAB confers resistance to hemin toxicity and is regulated in a hemin-dependent manner by the ChrAS two-component system in *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* 192, 4606–4617.
- Bizzini, A., Zhao, C., Auffray, Y., and Hartke, A. (2009). The *Enterococcus faecalis* superoxide dismutase is essential for its tolerance to vancomycin and penicillin. *J Antimicrob Chemother* 64, 1196–1202.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., and Piddock, L.J.V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Micro* 13, 42–51.
- Borisov, V.B., Forte, E., Siletsky, S.A., Arese, M., Davletshin, A.I., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2015). Cytochrome bd protects bacteria against oxidative and nitrosative stress: A potential target for next-generation antimicrobial agents. *Biochemistry Moscow* 80, 565–575.
- Brewitz, H.H., Hagelueken, G., and Imhof, D. (2017). Structural and functional diversity of transient heme binding to bacterial proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1861, 683–697.

- Browning, D.F., and Busby, S.J.W. (2004). The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* *2*, 57–65.
- Brugna, M., Tasse, L., and Hederstedt, L. (2010). In vivo production of catalase containing haem analogues. *FEBS J.* *277*, 2663–2672.
- Bryant, D.A., Hunter, C.N., and Warren, M.J. (2020). Biosynthesis of the modified tetrapyrroles--the pigments of life. *J. Biol. Chem.*
- Bung, N., Pradhan, M., Srinivasan, H., and Bulusu, G. (2014). Structural Insights into E. coli Porphobilinogen Deaminase during Synthesis and Exit of 1-Hydroxymethylbilane. *PLoS Comput Biol* *10*.
- Burgos, J.M., and Schmitt, M.P. (2012). The ChrA response regulator in *Corynebacterium diphtheriae* controls heme-regulated gene expression through binding to the hmuO and hrtAB promoter regions. *Journal of Bacteriology* *194*, 1717–1729.
- Carbona, S.L., Sauvageot, N., Giard, J.-C., Benachour, A., Posteraro, B., Auffray, Y., Sanguinetti, M., and Hartke, A. (2007). Comparative study of the physiological roles of three peroxidases (NADH peroxidase, Alkyl hydroperoxide reductase and Thiol peroxidase) in oxidative stress response, survival inside macrophages and virulence of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology* *66*, 1148–1163.
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2009). Structural Insight into Partner Specificity and Phosphoryl Transfer in Two-Component Signal Transduction. *Cell* *139*, 325–336.
- Cassat, J.E., and Skaar, E.P. (2013). Iron in Infection and Immunity. *Cell Host & Microbe* *13*, 509–519.
- Cederlund, M., Deric, A., Pallon, J., Sørensen, O.E., and Kerström, B. (2015). A1M-microglobulin is proteolytically activated by myeloperoxidase, binds its heme group and inhibits low density lipoprotein oxidation. *Frontiers in Physiology* *6*.
- Celis, A.I., Gauss, G.H., Streit, B.R., Shisler, K., Moraski, G.C., Rodgers, K.R., Lukat-Rodgers, G.S., Peters, J.W., and DuBois, J.L. (2017). Structure-Based Mechanism for Oxidative Decarboxylation Reactions Mediated by Amino Acids and Heme Propionates in Coproheme Decarboxylase (HemQ). *J. Am. Chem. Soc.* *139*, 1900–1911.
- Chalmers, S.J., and Wylam, M.E. (2020). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection and Treatment Options. In *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Protocols: Cutting-Edge Technologies and Advancements*, Y. Ji, ed. (New York, NY: Springer US), pp. 229–251.
- Chang, W., Small, D.A., Toghrol, F., and Bentley, W.E. (2006). Global Transcriptome Analysis of *Staphylococcus aureus* Response to Hydrogen Peroxide. *Journal of Bacteriology* *188*, 1648–1659.
- de Chateau, M., and Bjorck, L. (1994). Protein PAB, a mosaic albumin-binding bacterial protein representing the first contemporary example of module shuffling. *J. Biol. Chem.* *269*, 12147–12151.
- Chen, Q., and Hirsch, R.E. (2006). A direct and simultaneous detection of zinc protoporphyrin IX, free protoporphyrin IX, and fluorescent heme degradation product in red blood cell hemolysates. *Free Radic. Res.* *40*, 285–294.
- Cheung, J., and Hendrickson, W.A. (2010). Sensor domains of two-component regulatory systems. *Current Opinion in Microbiology* *13*, 116–123.
- Cho, K.-H., Crane, B.R., and Park, S. (2011). An insight into the interaction mode between CheB and chemoreceptor from two crystal structures of CheB methyltransferase catalytic domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *411*, 69–75.

## Bibliographie

- Choby, J.E., and Skaar, E.P. (2016). Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. *Journal of Molecular Biology* *428*, 3408–3428.
- Choi, H.-J., Kim, S.-J., Mukhopadhyay, P., Cho, S., Woo, J.-R., Storz, G., and Ryu, S.-E. (2001). Structural Basis of the Redox Switch in the OxyR Transcription Factor. *Cell* *105*, 103–113.
- Collectif, Loir, Y.L., and Gautier, M. (2009). *Staphylococcus aureus* (Paris: Tec & Doc Lavoisier).
- Cong, Y., Yang, S., and Rao, X. (2020). Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *Journal of Advanced Research* *21*, 169–176.
- Cope, L.D., Thomas, S.E., Hrkal, Z., and Hansen, E.J. (1998). Binding of heme-hemopexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* *66*, 4511–4516.
- Cosgrove, K., Coutts, G., Jonsson, I.-M., Tarkowski, A., Kokai-Kun, J.F., Mond, J.J., and Foster, S.J. (2007). Catalase (KatA) and Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) Have Compensatory Roles in Peroxide Stress Resistance and Are Required for Survival, Persistence, and Nasal Colonization in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology* *189*, 1025–1035.
- Craft, K.M., Nguyen, J.M., Berg, L.J., and Townsend, S.D. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *Med. Chem. Commun.* *10*, 1231–1241.
- Cuthbertson, L., and Nodwell, J.R. (2013). The TetR Family of Regulators. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *77*, 440–475.
- Dahl, A., Iversen, K., Tonder, N., Hoest, N., Arpi, M., Dalsgaard, M., Chehri, M., Soerensen, L.L., Fanoe, S., Junge, S., et al. (2019). Prevalence of Infective Endocarditis in *Enterococcus faecalis* Bacteremia. *J. Am. Coll. Cardiol.* *74*, 193–201.
- Dailey, H.A., Gerdes, S., Dailey, T.A., Burch, J.S., and Phillips, J.D. (2015). Noncanonical coproporphyrin-dependent bacterial heme biosynthesis pathway that does not use protoporphyrin. *PNAS* *112*, 2210–2215.
- Daou, N., Buisson, C., Gohar, M., Vidic, J., Bierne, H., Kallassy, M., Lereclus, D., and Nielsen-LeRoux, C. (2009). IIsA, A Unique Surface Protein of *Bacillus cereus* Required for Iron Acquisition from Heme, Hemoglobin and Ferritin. *PLOS Pathogens* *5*, e1000675.
- Deckers-Hebestreit, G., and Altendorf, K. (1996). The f0f1-type atp synthases of bacteria: Structure and Function of the F0 Complex. *Annual Review of Microbiology* *50*, 791–824.
- Delanghe, J.R., and Langlois, M.R. (2001). Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine. *Clinica Chimica Acta* *312*, 13–23.
- Delgado-Nixon, V.M., Gonzalez, G., and Gilles-Gonzalez, M.-A. (2000). Dos, a Heme-Binding PAS Protein from *Escherichia coli*, Is a Direct Oxygen Sensor. *Biochemistry* *39*, 2685–2691.
- Devriese, L.A., Pot, B., Van Damme, L., Kersters, K., and Haesebrouck, F. (1995). Identification of Enterococcus species isolated from foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology* *26*, 187–197.
- Díaz, A., Loewen, P.C., Fita, I., and Carpena, X. (2012). Thirty years of heme catalases structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics* *525*, 102–110.
- Drazek, E.S., Hammack, C.A., and Schmitt, M.P. (2000). *Corynebacterium diphtheriae* genes required for acquisition of iron from haemin and haemoglobin are homologous to ABC haemin transporters. *Molecular Microbiology* *36*, 68–84.

- Dryla, A., Gelbmann, D., Gabain, A.V., and Nagy, E. (2003). Identification of a novel iron regulated staphylococcal surface protein with haptoglobin-haemoglobin binding activity. *Molecular Microbiology* *49*, 37–53.
- Duwat, P., Sourice, S., Cesselin, B., Lamberet, G., Vido, K., Gaudu, P., Le Loir, Y., Violet, F., Loubiere, P., and Gruss, A. (2001). Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology* *183*, 4509–4516.
- Egesten, A., Frick, I.M., Morgelin, M., Olin, A.I., and Bjorck, L. (2011). Binding of albumin promotes bacterial survival at the epithelial surface. *J. Biol. Chem.* *286*, 2469–2476.
- Escudero, J.A., Millan, A.S., Gutierrez, B., Hidalgo, L., Ragione, R.M.L., AbuOun, M., Galimand, M., Ferrándiz, M.J., Domínguez, L., Campa, A.G. de la, et al. (2011). Fluoroquinolone Efflux in *Streptococcus suis* Is Mediated by SatAB and Not by SmrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *55*, 5850–5860.
- Facklam, R.R., Carvalho, M. da G.S., and Teixeira, L.M. (2014). History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In *The Enterococci*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 1–54.
- Faller, M., Matsunaga, M., Yin, S., Loo, J., and Gua, F. (2007). Heme is involved in microRNA processing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 23–29.
- Falord, M., Karimova, G., Hiron, A., and Msadek, T. (2012). GraXSR Proteins Interact with the VraFG ABC Transporter To Form a Five-Component System Required for Cationic Antimicrobial Peptide Sensing and Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *56*, 1047–1058.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., and Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatrica* *92*, 48–55.
- Farhana, A., Saini, V., Kumar, A., Lancaster, J.R., and Steyn, A.J.C. (2012). Environmental Heme-Based Sensor Proteins: Implications for Understanding Bacterial Pathogenesis. *Antioxidants & Redox Signaling* *17*, 1232–1245.
- Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., and Ascenzi, P. (2005). The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *I.U.B.M.B. Life* *57*, 787–796.
- Fernandez, A., Lechardeur, D., Derré-Bobillot, A., Couvé, E., Gaudu, P., and Gruss, A. (2010a). Two Coregulated Efflux Transporters Modulate Intracellular Heme and Protoporphyrin IX Availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLOS Pathogens* *6*, e1000860.
- Fernandez, A., Lechardeur, D., Derré-Bobillot, A., Couvé, E., Gaudu, P., and Gruss, A. (2010b). Two coregulated efflux transporters modulate intracellular heme and protoporphyrin IX availability in *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathogens* *6*, e1000860.
- Ferrante, C., Batignani, G., Pontecorvo, E., Montemiglio, L.C., Vos, M.H., and Scopigno, T. (2020). Ultrafast Dynamics and Vibrational Relaxation in Six-Coordinate Heme Proteins Revealed by Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* *142*, 2285–2292.
- Ferris, H.U., Dunin-Horkawicz, S., Mondéjar, L.G., Hulko, M., Hantke, K., Martin, J., Schultz, J.E., Zeth, K., Lupas, A.N., and Coles, M. (2011). The Mechanisms of HAMP-Mediated Signaling in Transmembrane Receptors. *Structure* *19*, 378–385.
- Firon, A., Tazi, A., Cunha, V.D., Brinster, S., Sauvage, E., Dramsi, S., Golenbock, D.T., Glaser, P., Poyart, C., and Trieu-Cuot, P. (2013). The Abi-domain Protein Abx1 Interacts with the CovS Histidine Kinase to Control Virulence Gene Expression in Group B Streptococcus. *PLOS Pathogens* *9*, e1003179.

## Bibliographie

- Ford, C.D., Lopansri, B.K., Gazdik, M.A., Webb, B., Snow, G.L., Hoda, D., Adams, B., and Petersen, F.B. (2016). Room contamination, patient colonization pressure, and the risk of vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization on a unit dedicated to the treatment of hematologic malignancies and hematopoietic stem cell transplantation. *American Journal of Infection Control* *44*, 1110–1115.
- Forte, E., Borisov, V.B., Vicente, J.B., and Giuffrè, A. (2017). Chapter Four - Cytochrome bd and Gaseous Ligands in Bacterial Physiology. In *Advances in Microbial Physiology*, R.K. Poole, ed. (Academic Press), pp. 171–234.
- Fournier, C., Smith, A., and Delepelaire, P. (2011). Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity. *Molecular Microbiology* *80*, 133–148.
- Frankenberg, L., Brugna, M., and Hederstedt, L. (2002). *Enterococcus faecalis* Heme-Dependent Catalase. *Journal of Bacteriology* *184*, 6351–6356.
- Friedland, N., Mack, T.R., Yu, M., Hung, L.-W., Terwilliger, T.C., Waldo, G.S., and Stock, A.M. (2007). Domain Orientation in the Inactive Response Regulator *Mycobacterium tuberculosis* MtrA Provides a Barrier to Activation. *Biochemistry* *46*, 6733–6743.
- Friedman, D.B., Stauff, D.L., Pishchany, G., Whitwell, C.W., Torres, V.J., and Skaar, E.P. (2006). *Staphylococcus aureus* Redirects Central Metabolism to Increase Iron Availability. *PLOS Pathogens* *2*, e87.
- Frunzke, J., Gätgens, C., Brocker, M., and Bott, M. (2011). Control of Heme Homeostasis in *Corynebacterium glutamicum* by the Two-Component System HrrSA. *Journal of Bacteriology* *193*, 1212–1221.
- Furubayashi, M., Li, L., Katabami, A., Saito, K., and Umeno, D. (2014a). Construction of carotenoid biosynthetic pathways using squalene synthase. *FEBS Letters* *588*, 436–442.
- Furubayashi, M., Li, L., Katabami, A., Saito, K., and Umeno, D. (2014b). Directed evolution of squalene synthase for dehydrosqualene biosynthesis. *FEBS Letters* *588*, 3375–3381.
- Galperin, M.Y. (2004). Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental Microbiology* *6*, 552–567.
- Galperin, M.Y. (2005). A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: Bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiology* *5*, 35.
- Galperin, M.Y. (2018). What bacteria want. *Environmental Microbiology* *20*, 4221–4229.
- Gama-Castro, S., Salgado, H., Santos-Zavaleta, A., Ledezma-Tejeida, D., Muñoz-Rascado, L., García-Sotelo, J.S., Alquicira-Hernández, K., Martínez-Flores, I., Pannier, L., Castro-Mondragón, J.A., et al. (2016). RegulonDB version 9.0: high-level integration of gene regulation, coexpression, motif clustering and beyond. *Nucleic Acids Res* *44*, D133–D143.
- Gamini Kannangara, C., Gough, S.P., Bruyant, P., Kenneth Hooper, J., Kahn, A., and von Wettstein, D. (1988). tRNAGlu as a cofactor in  $\delta$ -aminolevulinic acid biosynthesis: steps that regulate chlorophyll synthesis. *Trends in Biochemical Sciences* *13*, 139–143.
- García-Solache, M., and Rice, L.B. (2019). The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clin Microbiol Rev* *32*.
- Gat, O., Zaide, G., Inbar, I., Grosfeld, H., Chitlaru, T., Levy, H., and Shafferman, A. (2008). Characterization of *Bacillus anthracis* iron-regulated surface determinant (Isd) proteins containing NEAT domains. *Molecular Microbiology* *70*, 983–999.

- Gaudu, P., Vido, K., Cesselin, B., Kulakauskas, St., J., Rezaiki, L., Lamberet, G., Sourice, S., Duwat, P., and Gruss, A. (2002). Respiration capacity and consequences in *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* *82*, 263–269.
- Geissler, C., and Singh, M. (2011). Iron, meat and health. *Nutrients* *3*, 283–316.
- Gentry-Weeks, C., Estay, M., Loui, C., and Baker, D. (2003). Intravenous Mouse Infection Model for Studying the Pathology of *Enterococcus faecalis* Infections. *Infection and Immunity* *71*, 1434–1441.
- Gilmore, M.S., Lebreton, F., and van Schaik, W. (2013). Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. *Current Opinion in Microbiology* *16*, 10–16.
- Girvan, H.M., and Munro, A.W. (2013). Heme Sensor Proteins. *J. Biol. Chem.* *288*, 13194–13203.
- Giuffrè, A., Borisov, V.B., Arese, M., Sarti, P., and Forte, E. (2014). Cytochrome bd oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* *1837*, 1178–1187.
- Gonçalves, V.L., Nobre, L.S., Vicente, J.B., Teixeira, M., and Saraiva, L.M. (2006). Flavohemoglobin requires microaerophilic conditions for nitrosative protection of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Letters* *580*, 1817–1821.
- Gotoh, Y., Eguchi, Y., Watanabe, T., Okamoto, S., Doi, A., and Utsumi, R. (2010). Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *13*, 232–239.
- Green, J., Crack, J.C., Thomson, A.J., and Lebrun, N. (2009). Bacterial sensors of oxygen. *Curr. Opin. Microbiol.* *12*, 145–151.
- Grigg, J.C., Vermeiren, C.L., Heinrichs, D.E., and Murphy, M.E. (2007). Haem recognition by a *Staphylococcus aureus* NEAT domain. *Mol. Microbiol.* *63*, 139–149.
- Grigg, J.C., Mao, C.X., and Murphy, M.E.P. (2011). Iron-Coordinating Tyrosine Is a Key Determinant of NEAT Domain Heme Transfer. *Journal of Molecular Biology* *413*, 684–698.
- Gruss, A., Borezee-Durant, E., and Lechardeur, D. (2012). Environmental heme utilization by heme-auxotrophic bacteria. *Adv Microb Physiol* *61*, 69–124.
- Gushchin, I., Melnikov, I., Polovinkin, V., Ishchenko, A., Yuzhakova, A., Buslaev, P., Bourenkov, G., Grudinin, S., Round, E., Balandin, T., et al. (2017). Mechanism of transmembrane signaling by sensor histidine kinases. *Science* *356*.
- Guzman Prieto, A.M., van Schaik, W., Rogers, M.R.C., Coque, T.M., Baquero, F., Corander, J., and Willems, R.J.L. (2016). Global Emergence and Dissemination of Enterococci as Nosocomial Pathogens: Attack of the Clones? *Front. Microbiol.* *7*.
- Haas, W., Shepard, B.D., and Gilmore, M.S. (2002). Two-component regulator of *Enterococcus faecalis* cytolysin responds to quorum-sensing autoinduction. *Nature* *415*, 84–87.
- Hagan, E.C., and Mobley, H.L.T. (2009). Haem acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney infection. *Mol. Microbiol.* *71*, 79–91.
- Hagi, T., Kobayashi, M., and Nomura, M. (2014). Aerobic condition increases carotenoid production associated with oxidative stress tolerance in *Enterococcus gilvus*. *FEMS Microbiol Lett* *350*, 223–230.

## Bibliographie

- Hagi, T., Kobayashi, M., and Nomura, M. (2015). Aerobic conditions increase isoprenoid biosynthesis pathway gene expression levels for carotenoid production in *Enterococcus gilvus*. *FEMS Microbiol Lett* *362*.
- Hagi, T., Kobayashi, M., and Nomura, M. (2018). Whole-transcriptome analysis of oxidative stress response genes in carotenoid-producing *Enterococcus gilvus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* *82*, 1053–1057.
- Hakansson, K.O., Brugna, M., and Tasse, L. (2004). The three-dimensional structure of catalase from *Enterococcus faecalis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *60*, 1374–1380.
- Haley, K.P., and Skaar, E.P. (2012). A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* *14*, 217–227.
- Halpern, D., and Gruss, A. (2015). A sensitive bacterial-growth-based test reveals how intestinal Bacteroides meet their porphyrin requirement. *BMC Microbiology* *15*, 282.
- Hammer, N.D., Reniere, M.L., Cassat, J.E., Zhang, Y., Hirsch, A.O., Hood, M.I., and Skaar, E.P. (2013). Two Heme-Dependent Terminal Oxidases Power *Staphylococcus aureus* Organ-Specific Colonization of the Vertebrate Host. *MBio* *4*.
- Hammer, N.D., Schurig-Briccio, L.A., Gerdes, S.Y., Gennis, R.B., and Skaar, E.P. (2016). CtaM Is Required for Menaquinol Oxidase aa3 Function in *Staphylococcus aureus*. *MBio* *7*.
- Hamza, I., and Dailey, H.A. (2012). One ring to rule them all: Trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1823*, 1617–1632.
- HANDLEY, P.S., and JACOB, A.E. (1981). Some Structural and Physiological Properties of Fimbriae of *Streptococcus faecalis*. *Microbiology*, *127*, 289–293.
- Hansson, M., Rutberg, L., Schröder, I., and Hederstedt, L. (1991). The *Bacillus subtilis* hemAXCDBL gene cluster, which encodes enzymes of the biosynthetic pathway from glutamate to uroporphyrinogen III. *Journal of Bacteriology* *173*, 2590–2599.
- Hardwick, S.W., Pané-Farré, J., Delumeau, O., Marles-Wright, J., Murray, J.W., Hecker, M., and Lewis, R.J. (2007). Structural and Functional Characterization of Partner Switching Regulating the Environmental Stress Response in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* *282*, 11562–11572.
- Hederstedt, L. (2012). Heme A biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*.
- Hengge, R., Gründling, A., Jenal, U., Ryan, R., and Yildiz, F. (2016). Bacterial Signal Transduction by Cyclic Di-GMP and Other Nucleotide Second Messengers. *Journal of Bacteriology* *198*, 15–26.
- Hennekinne, J.-A. (2018). Chapter 7 - *Staphylococcus aureus* as a Leading Cause of Foodborne Outbreaks Worldwide. In *Staphylococcus Aureus*, A. Fetsch, ed. (Academic Press), pp. 129–146.
- Hess, J.F., Oosawa, K., Kaplan, N., and Simon, M.I. (1988). Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* *53*, 79–87.
- Heyer, A., Gätgens, C., Hentschel, E., Kalinowski, J., Bott, M., and Frunzke, J. (2012). The two-component system ChrSA is crucial for haem tolerance and interferes with HrrSA in haem-dependent gene regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Microbiology*, *158*, 3020–3031.
- Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., Fridkin, S.K., Team, N.H.S.N., and Facilities, P.N.H.S.N. (2008). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at

the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology* *29*, 996–1011.

Hiron, A., Falord, M., Valle, J., Débarbouillé, M., and Msadek, T. (2011). Bacitracin and nisin resistance in *Staphylococcus aureus*: a novel pathway involving the BraS/BraR two-component system (SA2417/SA2418) and both the BraD/BraE and VraD/VraE ABC transporters. *Molecular Microbiology* *81*, 602–622.

Hollenbeck, B.L., and Rice, L.B. (2012). Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. *Virulence* *3*, 421–569.

Hoober, J.K., Kahn, A., Ash, D.E., Gough, S., and Kannangara, C.G. (1988). Biosynthesis of  $\Delta$ -aminolevulinate in greening barley leaves. IX. Structure of the substrate, mode of gabaculine inhibition, and the catalytic mechanism of glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Carlsberg Res. Commun.* *53*, 11.

Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J.U., Truffault, V., Schultz, A., Martin, J., Schultz, J.E., Lupas, A.N., and Coles, M. (2006). The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell* *126*, 929–940.

Hurley, J.H. (2003). GAF Domains: Cyclic Nucleotides Come Full Circle. *Sci. Signal.* *2003*, pe1–pe1.

Ishikawa, H., Kato, M., Hori, H., Ishimori, K., Kirisako, T., Tokunaga, F., and Iwai, K. (2005). Involvement of Heme Regulatory Motif in Heme-Mediated Ubiquitination and Degradation of IRP2. *Molecular Cell* *19*, 171–181.

Itou, H., Watanabe, N., Yao, M., Shirakihara, Y., and Tanaka, I. (2010). Crystal Structures of the Multidrug Binding Repressor *Corynebacterium glutamicum* CgmR in Complex with Inducers and with an Operator. *Journal of Molecular Biology* *403*, 174–184.

Iwasawa, Y., and Ishihara, K. (1967). Resistance of *Staphylococcus aureus* to Desiccation, Heat and Ultraviolet Rays in Relation to Phage Pattern. *Japanese Journal of Microbiology* *11*, 305–309.

Izadi, N., Henry, Y., Haladjian, J., Goldberg, M., Wandersman, C., Delepierre, M., and Lecroisey, A. (1997). Purification and characterization of an extracellular heme-binding protein, HasA, involved in heme iron acquisition. *Biochemistry* *36*, 7050–7056.

Jacob-Dubuisson, F., Mechaly, A., Betton, J.-M., and Antoine, R. (2018). Structural insights into the signalling mechanisms of two-component systems. *Nat Rev Microbiol* *16*, 585–593.

Jenul, C., and Horswill, A.R. (2019). Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. In *Gram-Positive Pathogens*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 669–686.

Joubert, L., Derré-Bobillot, A., Gaudu, P., Gruss, A., and Lechardeur, D. (2014). HrtBA and menaquinones control haem homeostasis in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology* *93*, 823–833.

Joubert, L., Dagieu, J.-B., Fernandez, A., Derré-Bobillot, A., Borezée-Durant, E., Fleurot, I., Gruss, A., and Lechardeur, D. (2017). Visualization of the role of host heme on the virulence of the heme auxotroph *Streptococcus agalactiae*. *Sci Rep* *7*, 1–13.

Juárez-Verdayes, M.A., González-Urbe, P.M., Peralta, H., Rodríguez-Martínez, S., Jan-Roblero, J., Escamilla-Hernández, R., Cancino-Díaz, M.E., and Cancino-Díaz, J.C. (2012). Detection of hssS, hssR, hrtA, and hrtB genes and their expression by hemin in *Staphylococcus epidermidis*. *Can. J. Microbiol.* *58*, 1063–1072.

## Bibliographie

- Karatan, E., Saulmon, M.M., Bunn, M.W., and Ordal, G.W. (2001). Phosphorylation of the Response Regulator CheV Is Required for Adaptation to Attractants during *Bacillus subtilis* Chemotaxis. *J. Biol. Chem.* *276*, 43618–43626.
- Kaur, A., Lansky, I., and Wilks, A. (2008). The role of the cytoplasmic heme-binding protein (PhuS) of *Pseudomonas aeruginosa* in intracellular heme trafficking and iron homeostasis. *J Biol Chem.*
- Keppel, M., Davoudi, E., Gätgens, C., and Frunzke, J. (2018). Membrane Topology and Heme Binding of the Histidine Kinases HrrS and ChrS in *Corynebacterium glutamicum*. *Front Microbiol* *9*.
- Keppel, M., Piepenbreier, H., Gätgens, C., Fritz, G., and Frunzke, J. (2019). Toxic but tasty – temporal dynamics and network architecture of heme-responsive two-component signaling in *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular Microbiology* *111*, 1367–1381.
- Keppel, M., Hünnefeld, M., Filipchuk, A., Viets, U., Davoudi, C.-F., Krüger, A., Mack, C., Pfeifer, E., Polen, T., Baumgart, M., et al. (2020). HrrSA orchestrates a systemic response to heme and determines prioritization of terminal cytochrome oxidase expression. *Nucleic Acids Res* *48*, 6547–6562.
- Kikuchi, G., Shemin, D., and Bachmann, B.J. (1958). The enzymic synthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid. *Biochimica et Biophysica Acta* *28*, 219–220.
- Kinkel, T.L., Roux, C.M., Dunman, P.M., and Fang, F.C. (2013). The *Staphylococcus aureus* SrrAB Two-Component System Promotes Resistance to Nitrosative Stress and Hypoxia. *MBio* *4*.
- Kinkel, T.L., Ramos-Montañez, S., Pando, J.M., Tadeo, D.V., Strom, E.N., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2016). An essential role for bacterial nitric oxide synthase in *Staphylococcus aureus* electron transfer and colonization. *Nature Microbiology* *2*, 1–7.
- Kleingardner, J.G., and Bren, K.L. (2015). Biological Significance and Applications of Heme c Proteins and Peptides. *Acc. Chem. Res.* *48*, 1845–1852.
- Knippel, R.J., Zackular, J.P., Moore, J.L., Celis, A.I., Weiss, A., Washington, M.K., DuBois, J.L., Caprioli, R.M., and Skaar, E.P. (2018). Heme sensing and detoxification by HatRT contributes to pathogenesis during *Clostridium difficile* infection. *PLOS Pathogens* *14*, e1007486.
- Knippel, R.J., Wexler, A.G., Miller, J.M., Beavers, W.N., Weiss, A., de Crécy-Lagard, V., Edmonds, K.A., Giedroc, D.P., and Skaar, E.P. (2020). *Clostridioides difficile* Senses and Hijacks Host Heme for Incorporation into an Oxidative Stress Defense System. *Cell Host & Microbe*.
- Kobayashi, N., Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2001). Novel Macrolide-Specific ABC-Type Efflux Transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* *183*, 5639–5644.
- Kobayashi, S.D., Malachowa, N., and DeLeo, F.R. (2015). Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* Abscesses. *The American Journal of Pathology* *185*, 1518–1527.
- Kommineni, S., Bretl, D.J., Lam, V., Chakraborty, R., Hayward, M., Simpson, P., Cao, Y., Bousounis, P., Kristich, C.J., and Salzman, N.H. (2015). Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature* *526*, 719–722.
- Korshunov, S., Imlay, K.R.C., and Imlay, J.A. (2016). The cytochrome bd oxidase of *Escherichia coli* prevents respiratory inhibition by endogenous and exogenous hydrogen sulfide. *Molecular Microbiology* *101*, 62–77.
- Krishnamurthy, P.C., Du, G., Fukuda, Y., Sun, D., Sampath, J., Mercer, K.E., Wang, J., Sosa-Pineda, B., Murti, K.G., and Schuetz, J.D. (2006). Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* *443*, 586–589.

- Kumar, S., and Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicology Letters* *157*, 175–188.
- Kundu, S., and Hargrove, M.S. (2003). Distal heme pocket regulation of ligand binding and stability in soybean leghemoglobin. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* *50*, 239–248.
- Kunkle, C.A., and Schmitt, M.P. (2005). Analysis of a DtxR-Regulated Iron Transport and Siderophore Biosynthesis Gene Cluster in *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Bacteriology* *187*, 422–433.
- Laakso, H.A., Marolda, C.L., Pinter, T.B., Stillman, M.J., and Heinrichs, D.E. (2016). A Heme-responsive Regulator Controls Synthesis of Staphyloferrin B in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* *291*, 29–40.
- Ladjouzi, R., Bizzini, A., Lebreton, F., Sauvageot, N., Rincé, A., Benachour, A., and Hartke, A. (2013). Analysis of the tolerance of pathogenic enterococci and *Staphylococcus aureus* to cell wall active antibiotics. *J Antimicrob Chemother* *68*, 2083–2091.
- Larsson, A.M., and Jones, T.A. (2007). Selenomethionine Labeling of Recombinant Proteins. In *Pichia Protocols*, J.M. Cregg, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 165–174.
- Layer, G., Verfurth, K., Mahlitz, E., and Jahn, D. (2002). Oxygen-independent coproporphyrinogen-III oxidase HemN from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *277*, 34136–34142.
- Lebreton, F., Willems, R.J.L., and Gilmore, M.S. (2014). Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds. (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary), p.
- Lebreton, F., Manson, A.L., Saavedra, J.T., Straub, T.J., Earl, A.M., and Gilmore, M.S. (2017). Tracing the Enterococci from Paleozoic Origins to the Hospital. *Cell* *169*, 849-861.e13.
- Lechardeur, D., Fernandez, A., Robert, B., Gaudu, P., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., and Gruss, A. (2010). The 2-Cys peroxiredoxin alkyl hydroperoxide reductase C binds heme and participates in its intracellular availability in *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 16032–16041.
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Fernandez, A., Lamberet, G., Garrigues, C., Pedersen, M., Gaudu, P., and Gruss, A. (2011). Using heme as an energy boost for lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol.* *22*, 143–149.
- Lechardeur, D., Cesselin, B., Liebl, U., Vos, M.H., Fernandez, A., Brun, C., Gruss, A., and Gaudu, P. (2012). Discovery of Intracellular Heme-binding Protein HrtR, Which Controls Heme Efflux by the Conserved HrtB-HrtA Transporter in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* *287*, 4752–4758.
- Lee, A.I., Delgado, A., and Gunsalus, R.P. (1999). Signal-Dependent Phosphorylation of the Membrane-Bound NarX Two-Component Sensor-Transmitter Protein of *Escherichia coli*. Nitrate Elicits a Superior Anion Ligand Response Compared to Nitrite. *Journal of Bacteriology* *181*, 5309–5316.
- Léger, L., Budin-Verneuil, A., Cacaci, M., Benachour, A., Hartke, A., and Verneuil, N. (2019).  $\beta$ -Lactam Exposure Triggers Reactive Oxygen Species Formation in *Enterococcus faecalis* via the Respiratory Chain Component DMK. *Cell Reports* *29*, 2184-2191.e3.
- Levdikov, V.M., Blagova, E., Colledge, V.L., Lebedev, A.A., Williamson, D.C., Sonenshein, A.L., and Wilkinson, A.J. (2009). Structural Rearrangement Accompanying Ligand Binding in the GAF Domain of CodY from *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology* *390*, 1007–1018.

## Bibliographie

- Lewis, M., Chang, G., Horton, N.C., Kercher, M.A., Pace, H.C., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., and Lu, P. (1996). Crystal Structure of the Lactose Operon Repressor and Its Complexes with DNA and Inducer. *Science* *271*, 1247–1254.
- Li, C., and Stocker, R. (2009). Heme oxygenase and iron: from bacteria to humans. *Redox Report* *14*, 95–101.
- Light, W.R., and Olson, J.S. (1990). The effects of lipid composition on the rate and extent of heme binding to membranes. *J. Biol. Chem.* *265*, 15632–15637.
- Lister, J.L., and Horswill, A.R. (2014). *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *4*.
- Liu, R., and Hu, J. (2011). HemeBIND: a novel method for heme binding residue prediction by combining structural and sequence information. *BMC Bioinformatics* *12*, 207.
- Lo, E., Nicolle, L.E., Coffin, S.E., Gould, C., Maragakis, L.L., Meddings, J., Pegues, D.A., Pettis, A.M., Saint, S., and Yokoe, D.S. (2014). Strategies to Prevent Catheter-Associated Urinary Tract Infections in Acute Care Hospitals: 2014 Update. *Infection Control & Hospital Epidemiology* *35*, S32–S47.
- Lobo, S.A.L., Scott, A., Videira, M.A.M., Winpenny, D., Gardner, M., Palmer, M.J., Schroeder, S., Lawrence, A.D., Parkinson, T., Warren, M.J., et al. (2015). *Staphylococcus aureus* haem biosynthesis: characterisation of the enzymes involved in final steps of the pathway. *Molecular Microbiology* *97*, 472–487.
- Lubelski, J., Jong, A.D., Merkerk, R.V., Agustiandari, H., Kuipers, O.P., Kok, J., and Driessen, A.J.M. (2006). LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology* *61*, 771–781.
- Lyu, M., Moseng, M.A., Reimche, J.L., Holley, C.L., Dhulipala, V., Su, C.-C., Shafer, W.M., and Yu, E.W. (2020). Cryo-EM Structures of a Gonococcal Multidrug Efflux Pump Illuminate a Mechanism of Drug Recognition and Resistance. *MBio* *11*.
- MacCallum, W.G., and Hastings, T.W. (1899). A case of acute endocarditis caused by micrococcus zymogenes (nov. spec.), with a description of the microorganism. *J Exp Med* *4*, 521–534.
- Mackie, R.I., Sghir, A., and Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* *69*, 1035s–1045s.
- Maddocks, S.E., and Oyston, P.C.F. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, *154*, 3609–3623.
- Maresso, A.W., Garufi, G., and Schneewind, O. (2008). *Bacillus anthracis* secretes proteins that mediate heme acquisition from hemoglobin. *PLoS Pathog* *4*, e1000132.
- Marijuán, P.C., Navarro, J., and del Moral, R. (2010). On prokaryotic intelligence: Strategies for sensing the environment. *Biosystems* *99*, 94–103.
- Marijuán, P.C., Navarro, J., and del Moral, R. (2018). How prokaryotes ‘encode’ their environment: Systemic tools for organizing the information flow. *Biosystems* *164*, 26–38.
- Mascher, T., Helmann, J.D., and Uden, G. (2006). Stimulus Perception in Bacterial Signal-Transducing Histidine Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* *70*, 910–938.
- Mazmanian, S.K., Skaar, E.P., Gaspar, A.H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2003). Passage of Heme-Iron Across the Envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* *299*, 906–909.

- McKessar, S.J., Berry, A.M., Bell, J.M., Turnidge, J.D., and Paton, J.C. (2000). Genetic Characterization of vanG, a Novel Vancomycin Resistance Locus of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *44*, 3224–3228.
- Meganathan, R. (2001). Biosynthesis of menaquinone (vitamin K<sub>2</sub>) and ubiquinone (coenzyme Q): A perspective on enzymatic mechanisms. In *Vitamins & Hormones*, (Academic Press), pp. 173–218.
- Melter, O., and Radojevic, B. (2010). Small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Folia Microbiol. (Praha)* *55*, 548–558.
- Mense, S.M., and Zhang, L. (2006). Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Res.* *16*, 681–692.
- Mike, L.A., Dutter, B.F., Stauff, D.L., Moore, J.L., Vitko, N.P., Aranmolate, O., Kehl-Fie, T.E., Sullivan, S., Reid, P.R., DuBois, J.L., et al. (2013). Activation of heme biosynthesis by a small molecule that is toxic to fermenting *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 8206–8211.
- Nagai, M., Yoneyama, Y., and Kitagawa, T. (2002). Characteristics in tyrosine coordinations of four hemoglobins M probed by resonance Raman spectroscopy (American Chemical Society).
- Nakamura, T., Saito, M., Shimada, Y., Fukaya, H., Shida, Y., and Tokuji, Y. (2011). Induction of aminolevulinic acid synthase gene expression and enhancement of metabolite, protoporphyrin IX, excretion by organic germanium. *Eur. J. Pharmacol.* *653*, 75–81.
- Nambu, S., Matsui, T., Goulding, C.W., Takahashi, S., and Ikeda-Saito, M. (2013). A New Way to Degrade Heme the *mycobacterium tuberculosis* enzyme mhud catalyzes heme degradation without generating CO. *J. Biol. Chem.* *288*, 10101–10109.
- Ninfa, A.J., and Magasanik, B. (1986). Covalent modification of the glnG product, NRI, by the glnL product, NRII, regulates the transcription of the glnALG operon in *Escherichia coli*. *PNAS* *83*, 5909–5913.
- Nitzan, Y., Wexler, H.M., and Finegold, S.M. (1994). Inactivation of anaerobic bacteria by various photosensitized porphyrins or by hemin. *Current Microbiology* *29*, 125–131.
- Nixon, B.T., Ronson, C.W., and Ausubel, F.M. (1986). Two-component regulatory systems responsive to environmental stimuli share strongly conserved domains with the nitrogen assimilation regulatory genes ntrB and ntrC. *PNAS* *83*, 7850–7854.
- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W., and Hinrichs, W. (2000). Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor–operator system. *Nat Struct Mol Biol* *7*, 215–219.
- Ouellet, Y.H., Ndiaye, C.T., Gagné, S.M., Sebilo, A., Suits, M.D.L., Jubinville, É., Jia, Z., Ivancich, A., and Couture, M. (2016). An alternative reaction for heme degradation catalyzed by the *Escherichia coli* O157:H7 ChuS protein: Release of hematinic acid, tripyrrole and Fe(III). *Journal of Inorganic Biochemistry* *154*, 103–113.
- Palmer, K.L., Kos, V.N., and Gilmore, M.S. (2010). Horizontal gene transfer and the genomics of enterococcal antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* *13*, 632–639.
- Panek, H., and O'Brian, M.R. (2002). A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology*, *148*, 2273–2282.
- Pantosti, A., Sanchini, A., and Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology* *2*, 323–334.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., and Saier, M.H. (1998). Major Facilitator Superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* *62*, 1–34.

## Bibliographie

- Parfentjev, I.A., and Catelli, A.R. (1964). Tolerance of *Staphylococcus Aureus* to Sodium Chloride. *Journal of Bacteriology* *88*, 1–3.
- Park, D.I., Ryu, S., Kim, Y.-H., Lee, S.-H., Lee, C.K., Eun, C.S., and Han, D.S. (2010). Comparison of Guaiac-Based and Quantitative Immunochemical Fecal Occult Blood Testing in a Population at Average Risk Undergoing Colorectal Cancer Screening. *American Journal of Gastroenterology* *105*, 2017–2025.
- Park, S.-Y., Chao, X., Gonzalez-Bonet, G., Beel, B.D., Bilwes, A.M., and Crane, B.R. (2004). Structure and Function of an Unusual Family of Protein Phosphatases: The Bacterial Chemotaxis Proteins CheC and CheX. *Molecular Cell* *16*, 563–574.
- Pas, J., Grotthuss, M. von, Wyrwicz, L.S., Rychlewski, L., and Barciszewski, J. (2004). Structure prediction, evolution and ligand interaction of CHASE domain. *FEBS Letters* *576*, 287–290.
- Pedersen, M.B., Garrigues, C., Tuphile, K., Brun, C., Vido, K., Bennedsen, M., Møllgaard, H., Gaudu, P., and Gruss, A. (2008). Impact of aeration and heme-activated respiration on *Lactococcus lactis* gene expression: Identification of a heme-responsive operon. *Journal of Bacteriology* *190*, 4903–4911.
- Pedersen, M.B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M.A., and Gruss, A. (2012). Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* *3*, 37–58.
- Peyrusson, F., Varet, H., Nguyen, T.K., Legendre, R., Sismeiro, O., Coppée, J.-Y., Wolz, C., Tenson, T., and Van Bambeke, F. (2020). Intracellular *Staphylococcus aureus* persists upon antibiotic exposure. *Nature Communications* *11*, 2200.
- Piezzi, V., Gasser, M., Atkinson, A., Kronenberg, A., Vuichard-Gysin, D., Harbarth, S., Marschall, J., Buetti, N., Swiss Centre for Antibiotic Resistance (ANRESIS), and National Centre for Infection Control (Swissnoso) (2020). Increasing proportion of vancomycin-resistance among enterococcal bacteraemias in Switzerland: a 6-year nation-wide surveillance, 2013 to 2018. *Euro Surveill.* *25*.
- Pishchany, G., Dickey, S.E., and Skaar, E.P. (2009). Subcellular Localization of the *Staphylococcus aureus* Heme Iron Transport Components IsdA and IsdB. *Infection and Immunity* *77*, 2624–2634.
- Pishchany, G., Sheldon, J.R., Dickson, C.F., Alam, M.T., Read, T.D., Gell, D.A., Heinrichs, D.E., and Skaar, E.P. (2014). IsdB-dependent hemoglobin binding is required for acquisition of heme by *Staphylococcus aureus*. *Journal of Infectious Diseases* *209*, 1764–1772.
- Postle, K., Nguyen, T.T., and Bertrand, K.P. (1984). Nucleotide sequence of the repressor gene of the TN10 tetracycline resistance determinant. *Nucleic Acids Res* *12*, 4849–4863.
- Poupel, O., Proux, C., Jagla, B., Msadek, T., and Dubrac, S. (2018). SpdC, a novel virulence factor, controls histidine kinase activity in *Staphylococcus aureus*. *PLOS Pathogens* *14*, e1006917.
- Quail, M.A., Dempsey, C.E., and Guest, J.R. (1994). Identification of a fatty acyl responsive regulator (FarR) in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* *356*, 183–187.
- Ramos, J.L., Martínez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Terán, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R., and Tobes, R. (2005). The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *69*, 326–356.
- Ramsey, M., Hartke, A., and Huycke, M. (2014). The Physiology and Metabolism of Enterococci. In *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*, M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar, eds. (Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary), p.
- Rao, C., Dhawan, B., Vishnubhatla, S., Kapil, A., Das, B., and Sood, S. (2020). Emergence of high-risk multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* CC2 (ST181) and CC87 (ST28) causing healthcare-associated infections in India. *Infect. Genet. Evol.* 104519.

- Ratliff, M., Zhu, W., Deshmukh, R., Wilks, A., and Stojiljkovic, I. (2001). Homologues of Neisserial Heme Oxygenase in Gram-Negative Bacteria: Degradation of Heme by the Product of the pigA Gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* *183*, 6394–6403.
- Reniere, M.L., Torres, V.J., and Skaar, E.P. (2007). Intracellular metalloporphyrin metabolism in *Staphylococcus aureus*. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* *20*, 333–345.
- Reniere, M.L., Ukpabi, G.N., Harry, S.R., Stec, D.F., Krull, R., Wright, D.W., Bachmann, B.O., Murphy, M.E., and Skaar, E.P. (2010). The IsdG-family of haem oxygenases degrades haem to a novel chromophore. *Molecular Microbiology* *75*, 1529–1538.
- Rhee, S.G. (2016). Overview on Peroxiredoxin. *Mol Cells* *39*, 1–5.
- Richard, K.L., Kelley, B.R., and Johnson, J.G. (2019). Heme Uptake and Utilization by Gram-Negative Bacterial Pathogens. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* *9*.
- Richardsont, A.R., Somerville†, G.A., and Sonenshein†, A.L. (2015). Regulating the Intersection of Metabolism and Pathogenesis in Gram-positive Bacteria. *Microbiology Spectrum* *3*.
- Rinaldo, S., Castiglione, N., Giardina, G., Caruso, M., Arcovito, A., Longa, S. della, D'Angelo, P., and Cutruzzolà, F. (2012). Unusual Heme Binding Properties of the Dissimilative Nitrate Respiration Regulator, a Bacterial Nitric Oxide Sensor. *Antioxidants & Redox Signaling* *17*, 1178–1189.
- Rkenes, T.P., Lamark, T., and Strøm, A.R. (1996). DNA-binding properties of the BetI repressor protein of *Escherichia coli*: the inducer choline stimulates BetI-DNA complex formation. *Journal of Bacteriology* *178*, 1663–1670.
- Rossi, M., Martínez-Martínez, D., Amaretti, A., Ulrici, A., Raimondi, S., and Moya, A. (2016). Mining metagenomic whole genome sequences revealed subdominant but constant *Lactobacillus* population in the human gut microbiota. *Environmental Microbiology Reports* *8*, 399–406.
- Rutardottir, S., Karnaukhova, E., Nantasenamat, C., Songtawee, N., Prachayasittikul, V., Rajabi, M., Rosenlöf, L.W., Alayash, A.I., and Åkerström, B. (2016). Structural and biochemical characterization of two heme binding sites on  $\alpha$ 1-microglobulin using site directed mutagenesis and molecular simulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* *1864*, 29–41.
- Safarian, S., Rajendran, C., Müller, H., Preu, J., Langer, J.D., Ovchinnikov, S., Hirose, T., Kusumoto, T., Sakamoto, J., and Michel, H. (2016). Structure of a bd oxidase indicates similar mechanisms for membrane-integrated oxygen reductases. *Science* *352*, 583–586.
- Salman, M., Villamil Franco, C., Ramodiharilafy, R., Liebl, U., and Vos, M.H. (2019). Interaction of the Full-Length Heme-Based CO Sensor Protein RcoM-2 with Ligands. *Biochemistry* *58*, 4028–4034.
- Sawai, H., Yamanaka, M., Sugimoto, H., Shiro, Y., and Aono, S. (2012). Structural Basis for the Transcriptional Regulation of Heme Homeostasis in *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* *287*, 30755–30768.
- Schell, M.A. (1993). Molecular biology of the lysr family of transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology* *47*, 597–626.
- Schleifer, K.H., and Kilpper-Bälz, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *34*, 31–34.
- Schmitt, M.P. (1997). Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *Journal of Bacteriology* *179*, 838–845.

## Bibliographie

- Schneider, S., Marles-Wright, J., Sharp, K.H., and Paoli, M. (2007). Diversity and conservation of interactions for binding heme in b-type heme proteins. *Nat. Prod. Rep.* *24*, 621–630.
- Schumacher, M.A., Miller, M.C., Grkovic, S., Brown, M.H., Skurray, R.A., and Brennan, R.G. (2002). Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. *The EMBO Journal* *21*, 1210–1218.
- Seale, T.W., Morton, D.J., Whitby, P.W., Wolf, R., Kosanke, S.D., VanWagoner, T.M., and Stull, T.L. (2006). Complex role of hemoglobin and hemoglobin-haptoglobin binding proteins in *Haemophilus influenzae* virulence in the infant rat model of invasive infection. *Infect. Immun.* *74*, 6213–6225.
- Selleck, E.M., Van Tyne, D., and Gilmore, M.S. (2019). Pathogenicity of Enterococci. *Microbiol Spectr* *7*.
- Semsey, S., Geanacopoulos, M., Lewis, D.E.A., and Adhya, S. (2002). Operator-bound GalR dimers close DNA loops by direct interaction: tetramerization and inducer binding. *The EMBO Journal* *21*, 4349–4356.
- Severance, S., and Hamza, I. (2009). Trafficking of Heme and Porphyrins in Metazoa. *Chem. Rev.* *109*, 4596–4616.
- Sharp, K., Schneider, S., Cockayne, A., and Paoli, M. (2007). Crystal structure of the heme-IsdC complex, the central conduit of the Isd iron/heme uptake system in *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* *282*, 10625–10631.
- Sherman, J.M. (1937). THE STREPTOCOCCI. *Bacteriol Rev* *1*, 3–97.
- Shipulina, N., Smith, A., and Morgan, W.T. (2000). Heme Binding by Hemopexin: Evidence for Multiple Modes of Binding and Functional Implications. *J Protein Chem* *19*, 239–248.
- Shu, C.J., Ulrich, L.E., and Zhulin, I.B. (2003). The NIT domain: a predicted nitrate-responsive module in bacterial sensory receptors. *Trends in Biochemical Sciences* *28*, 121–124.
- Sievert, D.M., Ricks, P., Edwards, J.R., Schneider, A., Patel, J., Srinivasan, A., Kallen, A., Limbago, B., Fridkin, S., and Facilities, for the N.H.S.N. (NHSN) T. and P.N. (2013). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection Control and Hospital Epidemiology* *34*, 1–14.
- Sifri, C.D., Mylonakis, E., Singh, K.V., Qin, X., Garsin, D.A., Murray, B.E., Ausubel, F.M., and Calderwood, S.B. (2002). Virulence Effect of Enterococcus faecalis Protease Genes and the Quorum-Sensing Locus *fsr* in *Caenorhabditis elegans* and Mice. *Infection and Immunity* *70*, 5647–5650.
- Sillanpää, J., Xu, Y., Nallapareddy, S.R., Murray, B.E., and Höök, M. (2004). A family of putative MSCRAMMs from Enterococcus faecalis. *Microbiology*, *150*, 2069–2078.
- Skaar, E.P. (2010). The Battle for Iron between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. *PLOS Pathogens* *6*, e1000949.
- Skaar, E.P., Humayun, M., Bae, T., Debord, K.L., and Schneewind, O. (2004a). Iron-source preference of *Staphylococcus aureus* infections. *Science* *305*, 1626–1628.
- Skaar, E.P., Gaspar, A.H., and Schneewind, O. (2004b). IsdG and IsdI, Heme-degrading Enzymes in the Cytoplasm of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* *279*, 436–443.
- Smalley, J.W., and Olczak, T. (2017). Heme acquisition mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* – strategies used in a polymicrobial community in a heme-limited host environment. *Molecular Oral Microbiology* *32*, 1–23.

- Sone, N., Hägerhäll, C., and Sakamoto, J. (2004). Chapter 2: Aerobic Respiration in the Gram-Positive Bacteria. In *Respiration in Archaea and Bacteria: Diversity of Prokaryotic Respiratory Systems*, D. Zannoni, ed. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 35–62.
- Spaan, A.N., Reyes-Robles, T., Badiou, C., Cochet, S., Boguslawski, K.M., Yoong, P., Day, C.J., de Haas, C.J.C., van Kessel, K.P.M., Vandenesch, F., et al. (2015). *Staphylococcus aureus* Targets the Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC) to Lyse Erythrocytes. *Cell Host & Microbe* *18*, 363–370.
- Stauff, D., and Skaar, E. (2009a). the heme sensor system of *Staphylococcus aureus*. *Contrib. Microbiol.* *16*, 120–135.
- Stauff, D.L., and Skaar, E.P. (2009b). *Bacillus anthracis* HssR signaling to HrtAB regulates heme resistance during infection. *Mol. Microbiol.* *72*, 763–778.
- Stauff, D.L., and Skaar, E.P. (2009c). *Bacillus anthracis* HssRS signalling to HrtAB regulates haem resistance during infection. *Molecular Microbiology* *72*, 763–778.
- Stauff, D.L., Torres, V.J., and Skaar, E.P. (2007a). Signaling and DNA-binding Activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS Two-component System Required for Heme Sensing. *J. Biol. Chem.* *282*, 26111–26121.
- Stauff, D.L., Torres, V.J., and Skaar, E.P. (2007b). Signaling and DNA-binding activities of the *Staphylococcus aureus* HssR-HssS two-component system required for heme sensing. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 26111–26121.
- Stauff, D.L., Bagaley, D., Torres, V.J., Joyce, R., Anderson, K.L., Kuechenmeister, L., Dunman, P.M., and Skaar, E.P. (2008). *Staphylococcus aureus* HrtA Is an ATPase Required for Protection against Heme Toxicity and Prevention of a Transcriptional Heme Stress Response. *J. Bacteriol.* *190*, 3588–3596.
- Steck, N., Hoffmann, M., Sava, I.G., Kim, S.C., Hahne, H., Tonkonogy, S.L., Mair, K., Krueger, D., Pruteanu, M., Shanahan, F., et al. (2011). *Enterococcus faecalis* Metalloprotease Compromises Epithelial Barrier and Contributes to Intestinal Inflammation. *Gastroenterology* *141*, 959–971.
- Steinfels, E., Orelle, C., Fantino, J.-R., Dalmas, O., Rigaud, J.-L., Denizot, F., Di Pietro, A., and Jault, J.-M. (2004). Characterization of YvcC (BmrA), a Multidrug ABC Transporter Constitutively Expressed in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* *43*, 7491–7502.
- Stojiljkovic, I., and Hantke, K. (1994). Transport of haemin across the cytoplasmic membrane through a haemin-specific periplasmic binding-protein-dependent transport system in *Yersinia enterocolitica*. *Molecular Microbiology* *13*, 719–732.
- Stojiljkovic, I., Evavold, B.D., and Kumar, V. (2001). Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert Opin. Investig. Drugs* *10*, 309–320.
- Stoyanov, J.V., Hobman, J.L., and Brown, N.L. (2001). CueR (YbbI) of *Escherichia coli* is a MerR family regulator controlling expression of the copper exporter CopA. *Molecular Microbiology* *39*, 502–512.
- Subiros, M., Colomb-Cotinat, M., Bernet, C., Blanchard, H., Sénechal, H., Simon, L., Venier, A.-G., Bouchiat, C., Tristan, A., and Berger-Carbonne, A. (2017). Signalements d'infections nosocomiales à *Staphylococcus aureus* depuis 2012 et particularités épidémiologiques en réanimation néonatale. *Médecine et Maladies Infectieuses* *47*, S77.
- Sweeny, E.A., Singh, A.B., Chakravarti, R., Martinez-Guzman, O., Saini, A., Haque, M.M., Garee, G., Dans, P.D., Hannibal, L., Reddi, A.R., et al. (2018). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a chaperone that allocates labile heme in cells. *J. Biol. Chem.* *293*, 14557–14568.

## Bibliographie

- Taylor, B.L., and Zhulin, I.B. (1999). PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *63*, 479–506.
- Tedim, A.P., Ruiz-Garbajosa, P., Corander, J., Rodríguez, C.M., Cantón, R., Willems, R.J., Baquero, F., and Coque, T.M. (2015). Population Biology of Intestinal *Enterococcus* Isolates from Hospitalized and Nonhospitalized Individuals in Different Age Groups. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 1820–1831.
- Teng, F., Wang, L., Singh, K.V., Murray, B.E., and Weinstock, G.M. (2002). Involvement of PhoP-PhoS Homologs in *Enterococcus faecalis* Virulence. *Infection and Immunity* *70*, 1991–1996.
- Testoni, F., Montanaro, L., Poggi, A., Visai, L., Campoccia, D., and Arciola, C.R. (2011). Internalization by osteoblasts of two *Staphylococcus aureus* clinical isolates differing in their adhesin gene pattern. *Int J Artif Organs* *34*, 789–798.
- Thiercelin (1899). Sur un diplocoque saprophyte de l'intestin.
- Throne-Holst, M., Thöny-Meyer, L., and Hederstedt, L. (1997). *Escherichia coli* ccm in-frame deletion mutants can produce periplasmic cytochrome b but not cytochrome c. *FEBS Letters* *410*, 351–355.
- Tong, S.Y.C., Chen, L.F., and Fowler, V.G. (2012). Colonization, pathogenicity, host susceptibility, and therapeutics for *Staphylococcus aureus*: what is the clinical relevance? *Semin Immunopathol* *34*, 185–200.
- Tong, S.Y.C., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clin Microbiol Rev* *28*, 603–661.
- Torres, V., Stauff, D., Bezbradica, J., Gordy, L., Iturregui, J., Anderson, K., Dunman, P., Joyce, S., and Skaar, E. (2007). A *Staphylococcus aureus* regulatory system that responds to host heme and modulates virulence. *Cell Host and Microbe* *1*, 109–119.
- Turlin, E., Heuck, G., Brandão, M.I.S., Szili, N., Mellin, J.R., Lange, N., and Wandersman, C. (2014). Protoporphyrin (PPIX) efflux by the MacAB-TolC pump in *Escherichia coli*. *MicrobiologyOpen* *3*, 849–859.
- Tyne, D.V., and Gilmore, M.S. (2017). Raising the Alarmone: Within-Host Evolution of Antibiotic-Tolerant *Enterococcus faecium*. *MBio* *8*.
- Tyrrell, R., Verschueren, K.H., Dodson, E.J., Murshudov, G.N., Addy, C., and Wilkinson, A.J. (1997). The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. *Structure* *5*, 1017–1032.
- Uchida, T., Ishikawa, H., Ishimori, K., Morishima, I., Nakajima, H., Aono, S., Mizutani, Y., and Kitagawa, T. (2000). Identification of Histidine 77 as the Axial Heme Ligand of Carbonmonoxy CooA by Picosecond Time-Resolved Resonance Raman Spectroscopy. *Biochemistry* *39*, 12747–12752.
- Ulrich, L.E., Koonin, E.V., and Zhulin, I.B. (2005). One-component systems dominate signal transduction in prokaryotes. *Trends in Microbiology* *13*, 52–56.
- Vermeiren, C.L., Pluym, M., Mack, J., Heinrichs, D.E., and Stillman, M.J. (2006). Characterization of the Heme Binding Properties of *Staphylococcus aureus* IsdA. *Biochemistry* *45*, 12867–12875.
- Verneuil, N., Mazé, A., Sanguinetti, M., Laplace, J.-M., Benachour, A., Auffray, Y., Giard, J.-C., and Hartke, A. (2006). Implication of (Mn)superoxide dismutase of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress responses and survival inside macrophages. *Microbiology (Reading)* *152*, 2579–2589.

- Vorobiev, S.M., Neely, H., Yu, B., Seetharaman, J., Xiao, R., Acton, T.B., Montelione, G.T., and Hunt, J.F. (2012). Crystal structure of a catalytically active GG(D/E)EF diguanylate cyclase domain from *Marinobacter aquaeolei* with bound c-di-GMP product. *J Struct Funct Genomics* *13*, 177–183.
- Wakeman, C.A., Hammer, N.D., Stauff, D.L., Attia, A.S., Anzaldi, L.L., Dikalov, S.I., Calcutt, M.W., and Skaar, E.P. (2012). Menaquinone biosynthesis potentiates haem toxicity in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* *86*, 1376–1392.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2012). Haemophore functions revisited. *Molecular Microbiology* *85*, 618–631.
- Wang, S. (2012). Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms.
- Weiner, L.M., Webb, A.K., Limbago, B., Dudeck, M.A., Patel, J., Kallen, A.J., Edwards, J.R., and Sievert, D.M. (2016). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011–2014. *Infection Control & Hospital Epidemiology* *37*, 1288–1301.
- Weitz, S.H., Gong, M., Barr, I., Weiss, S., and Guo, F. (2014). Processing of microRNA primary transcripts requires heme in mammalian cells. *PNAS* *111*, 1861–1866.
- Wells, C.L., Jechorek, R.P., and Erlandsen, S.L. (1990). Evidence for the Translocation of *Enterococcus faecalis* across the Mouse Intestinal Tract. *J Infect Dis* *162*, 82–90.
- Werner, G., Coque, T.M., Franz, C.M.A.P., Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., van Schaik, W., and Weaver, K. (2013). Antibiotic resistant enterococci—Tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology* *303*, 360–379.
- Werten, S., Dalm, D., Palm, G.J., Grimm, C.C., and Hinrichs, W. (2014). Tetracycline Repressor Allostery Does Not Depend on Divalent Metal Recognition. *Biochemistry* *53*, 7990–7998.
- West, A.H., and Stock, A.M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences* *26*, 369–376.
- West, A.R., and Oates, P.S. (2008). Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World J. Gastroenterol.* *14*, 4101–4110.
- Wilkinson, S.P., and Grove, A. (2006). Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr Issues Mol Biol* *8*, 51–62.
- Wilks, A., and Burkhard, K.A. (2007). Heme and virulence: how bacterial pathogens regulate, transport and utilize heme. *Nat. Prod. Rep.* *24*, 511–522.
- Winstedt, L., Frankenberg, L., Hederstedt, L., and Von Wachenfeldt, C. (2000). *Enterococcus faecalis* V583 contains a cytochrome bd-type respiratory oxidase. *J. Bacteriol.* *182*, 3863–3866.
- Wißbrock, A., Paul George, A.A., Brewitz, H.H., Kühl, T., and Imhof, D. (2019). The molecular basis of transient heme-protein interactions: analysis, concept and implementation. *Biosci Rep* *39*.
- Wright, J.A., and Nair, S.P. (2012). The lipoprotein components of the Isd and Hts transport systems are dispensable for acquisition of heme by *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* *329*, 177–185.
- Wriston, J.C., Lack, L., and Shemin, D. (1955). The Mechanism of Porphyrin Formation Further Evidence on the Relationship of the Citric Acid Cycle and Porphyrin Formation. *J. Biol. Chem.* *215*, 603–611.

## Bibliographie

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

Yamamoto, Y., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., Gruss, A., and Gaudu, P. (2006). Roles of environmental heme, and menaquinone, in *streptococcus agalactiae*. *Biometals : An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* *19*, 205–210.

Yang, H.-B., Hou, W.-T., Cheng, M.-T., Jiang, Y.-L., Chen, Y., and Zhou, C.-Z. (2018). Structure of a MacAB-like efflux pump from *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Communications* *9*, 196.

Yang, H.L., Zubay, G., and Levy, S.B. (1976). Synthesis of an R plasmid protein associated with tetracycline resistance is negatively regulated. *PNAS* *73*, 1509–1512.

Zamocky, M., and Koller, F. (1999). Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *72*, 19–66.

Zehava, S. and (2016). The GAS PefCD exporter is a MDR system that confers resistance to heme and structurally diverse compounds. *BMC Microbiol.*

Zhu, H., Xie, G., Liu, M., Olson, J.S., Fabian, M., Dooley, D.M., and Lei, B. (2008). Pathway for Heme Uptake from Human Methemoglobin by the Iron-regulated Surface Determinants System of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* *283*, 18450–18460.

Zhu, W., Wilks, A., and Stojiljkovic, I. (2000). Degradation of Heme in Gram-Negative Bacteria: the Product of the hemO Gene of Neisseriae Is a Heme Oxygenase. *Journal of Bacteriology* *182*, 6783–6790.

Zimmermann, R.A., Moellering, R.C., and Weinberg, A.N. (1971). Mechanism of Resistance to Antibiotic Synergism in Enterococci. *Journal of Bacteriology* *105*, 873–879.

Zschiedrich, C.P., Keidel, V., and Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology* *428*, 3752–3775.

# Annexes



## Annexes

<b>Primer</b>	<b>Sequence 5' → 3'</b>	<b>Cible</b>
<b>O1</b>	TAATAAGAATTCATGGAAAAGCCAAATAAACG	<i>MBP-fhtR</i>
<b>O2</b>	TTATTACTGCAGTTATTTGTGACTTTTCAAAA	<i>MBP-fhtR</i>
<b>O3</b>	GTTTTGTTAGATGAACTTCCGACCAATCTTTTC	<i>H120L</i>
<b>O4</b>	GAAAAGATTGGTCGGAAAGTTCATCTAACAAAAC	<i>H120L</i>
<b>O5</b>	TACAATCGTACGCTGTTCCAAATTTTCAAAAAA	<i>Y125F</i>
<b>O6</b>	TTTTTTGAAAATTTGGAACAGCGTACGATTGTA	<i>Y125F</i>
<b>O7</b>	GAACCTGAAACCAATTTATTACAAGAGGGCATC	<i>C148L</i>
<b>O8</b>	GATGCCCTCTTGTAAATAAATTGGTTTCAGTTTC	<i>C148L</i>
<b>O9</b>	GTATTGAAAAACGTTTCAGCGAAAAACAG	<i>Y176F</i>
<b>O10</b>	CTGTTTTTCGCTGAAACGTTTTTTCAATAC	<i>Y176F</i>
<b>O11</b>	TCAATTTATGCTATTAGGCGTTTTGAAAAGTC	<i>H194L</i>
<b>O12</b>	GACTTTTCAAACGCCTAATAGCATAAATTGA	<i>H194L</i>
<b>O13</b>	CATGGCGTTTTGAAAAGTTTAAAATAAAAAATAGAG	<i>H200L</i>
<b>O14</b>	CTCTATTTTTTATTTTAAACTTTTCAAACGCCATG	<i>H200L</i>
<b>O15</b>	ATGGAAAAGCCAAATAAACGCAAAGCTGAT	<i>6xHisSUMO-FhtR</i>
<b>O16</b>	TTATTTGTGACTTTTCAAACGCCATGTAG	<i>6xHisSUMO-FhtR</i>
<b>O17</b>	ACTTCACCAACAAGGACCATAGCATTATGGGCAGCAGCCATCATC	<i>6xHisSUMO-FhtR</i> dans pMAL
<b>O18</b>	CTCTAGAGGATCCGAATTCTGAAATTTATTTGTGACTTTTCAAAA	<i>6xHisSUMO-FhtR</i> dans pMAL
<b>O19</b>	ATGCTATGGTCCTTGTGGTGAAGT	<i>6xHisSUMO-FhtR</i> dans pMAL
<b>O20</b>	ATTCAGAATTCGGATCCTCTAGAG	<i>6xHisSUMO-FhtR</i> dans pMAL

Tableau IX : Liste des oligonucléotides utilisés au cours de cette thèse.

**Titre :** Comprendre le mécanisme du système senseur d'hème des bactéries pathogènes, une cible antibiotique innovante

**Mots clés :** *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, homéostasie de l'hème, facteur de transcription, système à deux composants, adaptation à l'hôte

**Résumé :** L'hème, une structure porphyrique contenant un atome de fer, est un cofacteur essentiel à de nombreuses fonctions bactériennes. Cependant, le fer de l'hème génère des radicaux libres, ce qui explique sa toxicité. Un des mécanismes principaux de détoxification de l'hème est l'expression, par les bactéries à Gram positif, d'un transporteur d'efflux de la famille ABC, HrtBA. La régulation de ce transporteur a été étudiée chez deux bactéries pathogènes opportunistes *Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*, responsables d'infections nosocomiales multirésistantes.

Chez *E. faecalis*, un nouveau régulateur de la famille TetR, FhtR, a été identifié et caractérisé. L'inhibition de la transcription de *hrtBA* par FhtR est levée par sa liaison à l'hème. FhtR a aussi un impact important sur l'activité de la catalase à hème, KatA. FhtR a donc un rôle majeur dans l'homéostasie intracellulaire de l'hème. Dans un modèle de

transit intestinal chez la souris, HrtBA est induit, suggérant que ce mécanisme est important pour *E. faecalis*, une bactérie commensale de l'intestin, dans cet environnement.

Chez *S. aureus*, la transcription de *hrtBA* est régulée par un système à deux composants HssRS. L'étude du mécanisme du senseur membranaire HssS a révélé que la partie cytoplasmique de l'histidine kinase était impliquée dans la liaison et la transduction du signal hème pour l'expression de HrtBA.

L'ensemble de ces résultats démontre que, bien que HrtBA soit conservée, plusieurs systèmes distincts régulent son expression, suggérant une adaptation complexe de la réponse bactérienne à l'hème de l'hôte et son importance dans la relation hôte-pathogène. Bloquer HrtBA ou la transduction du signal hème par ces deux senseurs d'hème pourrait constituer une cible pour la recherche antibiotique chez ces deux pathogènes.

**Title :** Understanding heme stress sensing system by pathogens, to design new antibiotics.

**Keywords :** *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, heme homeostasis, transcription factor, two-component system, host adaptation

**Résumé :** Heme, a porphyrin containing an iron atom, is an essential cofactor of several bacterial functions. Heme is also toxic because of the reactivity of the iron generating reactive oxygen species. One of the main mechanisms of heme detoxification, in Gram-positive bacteria, relies on the expression of a heme efflux ABC transporter, HrtBA. The regulation of this transporter has been investigated in two opportunistic pathogens, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*, two bacteria responsible for multiresistant nosocomial infections. In *E. faecalis*, a new TetR family regulator, FhtR, has been identified and characterized. The FhtR dependent transcriptional inhibition of *hrtBA* is lifted by its binding to heme. FhtR controls the intracellular heme pools as showed par the activity of the endogenous heme dependent catalase, KatA. FhtR is thus a master regulator of heme intracellular homeostasis in *E. faecalis*. In a mouse model of intestinal

transit, HrtBA is expressed, demonstrating the relevance of this system in the gastrointestinal tract where *E. faecalis* is a commensal resident.

In *S. aureus*, *hrtBA* transcription is controlled by the two-component system, HssRS. The study of the mechanism of the membrane heme sensor HssS showed that the intracytoplasmic of the histidine kinase was responsible of the binding and heme signal transduction for HrtBA expression.

Alltogether, these results demonstrate that while HrtBA is conserved among Gram positive bacteria, the regulating mechanisms leading to its expression are varied. This suggests that the host heme response is dependent of the bacteria lifestyle and underlies the importance of this cofactor in the host-pathogen relationship. Inhibiting heme efflux by HrtBA or the heme sensing mechanisms could lead to new antibiotic strategies.