



HAL
open science

Dynamique de l'exoprotéome et homéostasie rédox chez *Bacillus cereus* : rôle de l'oxydation et réduction des résidus méthionines

Jean-Paul Madeira

► **To cite this version:**

Jean-Paul Madeira. Dynamique de l'exoprotéome et homéostasie rédox chez *Bacillus cereus* : rôle de l'oxydation et réduction des résidus méthionines. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2016. Français. NNT : 2016AVIG0336 . tel-01809650

HAL Id: tel-01809650

<https://theses.hal.science/tel-01809650v1>

Submitted on 7 Jun 2018

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.



INRA
SCIENCE & IMPACT

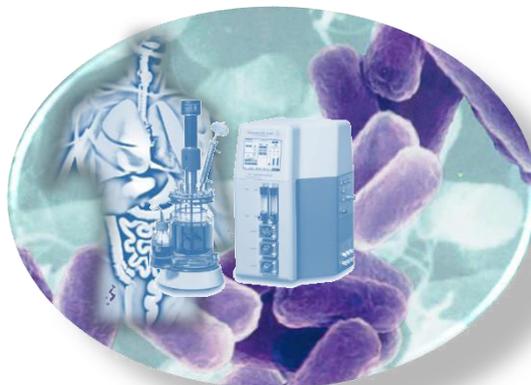


Ecole doctorale

« Sciences et Agrosciences »

Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse

Thèse pour obtenir le titre de docteur en Biologie, Biochimie
de l'Université d'Avignon et des Pays du Vaucluse



Dynamique de l'exoprotéome et homéostasie rédox chez *Bacillus cereus*: rôle de l'oxydation et réduction des résidus méthionines

Jean-Paul MADEIRA

Soutenue publiquement le 23 juin 2016

Rapporteurs	Pascal Cosette	Professeur à l'Université de Rouen
	Laurence Girbal	Chargée de Recherches CNRS
Examineurs	Jean Armengaud	Directeur de Recherches CEA
	Béatrice Alpha-Bazin	Chercheur CEA
Directrice de Thèse	Catherine Duport	Professeur à l'Université d'Avignon

Thèse réalisée au sein de l'UMR A408 « Sécurité et qualité des produits d'origine végétale », INRA, Avignon et en collaboration avec « l'Institut de biologie environnementale et biotechnologie », DSV-CEA, Marcoule

Remerciements

Ce projet de thèse a été financé par une allocation de recherche du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) et mené au sein de l'équipe « Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale » (SQPOV), Unité Mixte de Recherche 408 de l'INRA PACA d'Avignon et en collaboration avec « l'Institut de Biologie Environnementale et Biotechnologie » (IBEB) au sein de la direction du service des vivants (DSV) du CEA de Marcoule.

Je remercie très sincèrement les rapporteurs de cette thèse, Laurence Girbal et Pascal Cosette pour l'intérêt qu'ils ont apporté à mon travail.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à Madame Catherine Duport, Professeur à l'Université d'Avignon. Tu m'as offert la possibilité de travailler sur ce sujet passionnant et de gagner en maturité scientifique. J'ai vraiment eu beaucoup de chance de t'avoir comme directrice de thèse. Tu es une chercheuse très impliquée et passionnée par son travail. Merci d'avoir partagé tes connaissances lors de nos échanges scientifiques ainsi que ton soutien sans faille et la totale confiance que tu m'as accordée. Je te remercie d'avoir fait de ma thèse une expérience enrichissante scientifiquement et humainement agréable.

Je remercie également Monsieur Jean Armengaud, directeur de laboratoire au CEA de Marcoule pour m'avoir accueilli dans son unité. Je te remercie de m'avoir permis d'acquérir des compétences en protéomique et la grande qualité de nos échanges scientifiques dans ce domaine. Je te remercie également de m'avoir mis à ma disposition l'ensemble des matériels présents dans ton laboratoire et pour les centaines d'heures de spectromètre de masse que tu m'as accordées pour passer mes échantillons. Je remercie également Madame Béatrice Alpha-Bazin, chercheuse au CEA de Marcoule. Tu m'as permis de ne pas me perdre dans ton laboratoire et tu as toujours été disponible lors de mes longs séjours au CEA. Je te remercie pour ton accueil, ta grande gentillesse et nos nombreux échanges scientifiques. Tu as toujours été de bons conseils et je te remercie pour les moyens que tu as mis à ma disposition. J'étais dans des conditions optimum pour travailler au CEA.

Je remercie Thierry Clavel pour ses précieux conseils sur l'utilisation des fermenteurs et son aide lors des nombreuses opérations de maintenance. Je le remercie également pour sa totale confiance lors de mon monitorat et de son aide pour la préparation des TP de licence et 1^{ère} année de master.

Je remercie les informaticiens Dominique Loonis et Éric Piétri. Je vous remercie pour le matériel que vous m'avez fourni et la VM pour réaliser mes analyses sous R. Vous avez toujours été disponibles et vous m'avez toujours accueilli dans vos bureaux dans la bonne humeur pour résoudre des problèmes techniques.

Je tiens à remercier les anciens doctorants, Gérémy, Sabrina, Amina et Benoît. Merci pour votre accueil chez les SQPOV et vos conseils lors de mon arrivée alors que vous étiez en pleine rédaction de vos manuscrits.

J'adresse un spécial remerciement à mes amis et anciens doctorants Julien Le Lay et Sara Diomande (maintenant Madame Le Lay). Mes deux premières années de thèse n'auraient pas été aussi belles sans vous. J'ai apprécié chaque moment passer ensemble et j'en garde d'excellents souvenirs. Nos fous rires resteront gravés à jamais dans ma mémoire. J'ai vraiment été fier d'avoir assisté à l'apogée de votre histoire et que vous m'ayez choisi comme témoin de votre mariage.

Je remercie très sincèrement Hélène Omer qui a commencé son post-doc sous la direction de Catherine Duport le même jour que j'ai commencé ma thèse. J'ai vraiment apprécié ta bienveillance et ta gentillesse. J'ai encore plus apprécié d'être à deux quand il a fallu réaliser les TP des L2&L3 les deux premières années de ma thèse.

Je remercie également Guillaume Girardin pour avoir pris la relève d'Hélène pour les TP lors de ma 3^e année. Un grand merci à toute l'équipe IBEB et ses jeunes : Cédric, Suong, Sarah, Sabrina, Océane, François, Emy, Emilie, Ali, Esther, Elodie, Erica, Mélanie, Charlotte et Hélène. Merci à tous ceux qui ont été de passage à SQPOV Jean-Luc, Houria, Amine, Kélé, Virginie et à ceux qui y sont encore.

Une pensée émue pour toutes les personnes avec qui j'ai partagé une salle, un logement, un repas ou un ordinateur pendant ces trois dernières années.

Enfin, un sincère remerciement à mes amis et à ma famille. Je remercie Jeanne pour avoir été là pour moi depuis le début de ma thèse et j'espère encore longtemps après. Je remercie mon frère Jérôme et ma sœur Laura. Je vous souhaite bonne chance dans vos projets futurs et j'ai de la chance de vous avoir. Je remercie enfin mes parents qui ont toujours été présents et m'ont soutenu tout au long de mon parcours. Je dédie cette thèse à ma mère sans qui je ne serais pas où j'en suis aujourd'hui. Je ne pourrai jamais te rendre tout ce que tu m'as donné mais j'ai toujours œuvré pour que tu sois fier de ton fils.

Table des matières

Remerciements	3
Abréviations	11
Liste des figures.....	15
Liste des tableaux.....	17
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	19
CHAPITRE I – <i>Bacillus cereus</i>	21
I.1 Historique et taxonomie.....	21
I.2 Génome de <i>B. cereus</i>	23
I.2.1 Génome chromosomique	23
I.2.2 Les plasmides.....	24
I.3 Cycle de vie	26
I.4 Pathologies engendrées par <i>Bacillus cereus s.s.</i>	28
I.4.1 Les infections gastro-intestinales.....	28
I.4.1.1 Le syndrome émétique	28
I.4.1.2 Le syndrome diarrhéique.....	28
I.4.2 Infections non gastro-intestinales.....	29
I.5 Le milieu digestif	29
I.5.1 Le pH	30
I.5.2 Les sels biliaires	31
I.5.3 La quantité d'oxygène	31
I.5.4 Le potentiel d'oxydo-réduction	31
I.5.5 La microflore intestinale	32
I.6 Les facteurs de pathogénicité.....	32
I.6.1 Le céréulide	32
I.6.2 Les entérotoxines	33
I.6.2.1 Les cytotoxines tripartites formant des pores.....	33
I.6.2.2 Les cytotoxines formant des pores de la famille des tonneaux β ...	35
I.6.2.3 La céréolysine O ou hémolysine I, HlyI.....	36

I.6.2.4 L'hémolysine III, HlyIII	36
I.6.2.5 L'entérotoxine EntFM ou CwpFM (Cell wall peptidase FM)	37
I.6.3 Les autres facteurs de virulence	37
I.6.3.1 Les protéines Ent identifiées par protéomique	37
I.6.3.2 Les phospholipases	39
I.6.3.3 Les métalloprotéases et protéines flagellaires.....	39
I.7 Régulation des facteurs de virulence.....	39
I.7.1 Le régulateur PlcR.....	39
I.7.2 Le système ResD/ResE	40
I.7.3 Le régulateur Fnr	41
I.7.4 Le système OhrA/OhrR	42
I.7.5 Le régulateur Rex.....	43
I.7.5 Le régulateur Fur	43
I.8 Métabolisme de <i>B. cereus</i>	44
I.8.1 Utilisation des acides aminés et glucides	44
I.8.2 Glucose et psychrotrophie.....	44
I.8.3 La respiration aérobie.....	45
I.8.4 La respiration anaérobie	47
I.8.5 La fermentation	47
CHAPITRE II – Le stress oxydant	49
II.1 Apparition de l'O ₂ dans l'atmosphère.....	49
II.1.1 La molécule de dioxygène	49
II.1.1.1 La réduction monoélectronique du dioxygène	50
II.1.1.2 La formation de radicaux centrés sur le carbone	51
II.1.1.3 L'oxygène singulet	51
II.2 Origine des ROS endogènes.....	51
II.3 Les ROS exogènes et leurs rôles.....	52
II.4 Les effets toxiques des ROS endogènes	53
II.4.1 La peroxydation lipidique	53

II.4.2 Oxydation de l'ADN par les ROS endogènes	54
II.4.3 Oxydation des protéines.....	55
II.4.3.1 Fragmentation du squelette carboné des protéines	55
II.4.3.2 Modification des chaînes latérales protéiques par les ROS.....	56
II.4.3.3 Altérations des centres Fe-S	56
II.5 Les systèmes de défense contre les ROS	56
II.5.1 Les systèmes de défense non enzymatiques.....	57
II.5.2 Les systèmes de défense enzymatiques.....	58
CHAPITRE III – Oxydation des résidus méthionines et réduction par les Msr ...	61
III.1 Oxydo-réduction des méthionines	61
III.2 Rôle antioxydant des méthionines	61
III.3 Modulation de la fonction des protéines par l'oxydation des résidus Met	62
III.4 Rôle de l'oxydation des méthionines dans la dégradation des protéines ..	62
III.5 Propriétés des méthionines sulfoxydes réductases	62
III.6 Structures et organisation des gènes codant pour les Msr	63
III.7 Implication des Msr dans la résistance au stress oxydant.....	64
III.8 Implication des Msr dans la pathogénicité bactérienne	64
III.8.1 Implication des Msr dans l'adhérence	64
III.8.2 Implication des Msr dans la formation de biofilms	65
III.8.3 Implication des Msr dans la mobilité	65
Objectifs des travaux de thèse	67
MATERIELS ET METHODES.....	69
1. Les souches de <i>B. cereus</i>	71
1.1 Construction du mutant $\Delta msrAB$	71
1.2 Complémentation du mutant $\Delta msrAB$ -Construction de la souche $\Delta msrAB/pHT304-msrAB$	72
2. Les milieux de culture.....	72
2.1 Le milieu MOD	73
2.2 Le milieu LB	73

3. Les conditions de culture.....	73
3.1 Culture en conditions non contrôlées.....	73
3.2 Culture en conditions contrôlées.....	73
4. Suivi de la croissance et prélèvements	74
4.1 Mesure du taux de croissance bactérienne μ_{\max}	74
4.2 Dénombrement et détermination de la biomasse bactérienne	74
4.3 Prélèvements des surnageants cellulaires et récoltes des cellules bactériennes.....	74
5. Les techniques de biochimie.....	76
5.1 Dosage du glucose et des métabolites.....	76
5.2 Dosage de Bradford	76
5.3 Détermination de l'activité protéasique du surnageant	76
5.4 Précipitation des protéines extracellulaires.....	76
5.5 Extraction des protéines intracellulaires.....	76
5.6.1 Migration sur gel	77
5.6.2 Digestion trypsique « <i>in gel</i> »	77
5.7 Analyse par spectrométrie de masse en tandem.....	78
5.7.1 Principe de la spectrométrie de masse	78
5.7.2 La spectrométrie de masse en tandem.....	78
5.7.3 Analyse des échantillons par nanoLC-MS/MS.....	79
5.7.4 Traitements des données	79
6. Les analyses statistiques.....	79
6.1 Les analyses statistiques descriptives multidimensionnelles	79
6.2 Les classifications hiérarchiques	80
6.3 Les analyses d'abondances des protéines.....	80
7. Quantification relative de l'expression des gènes <i>msr</i> par RT-PCR	81
7.1 Extraction des ARN totaux.....	81
7.2 Elimination de l'ADN contaminant.....	81
7.3 Evaluation de la qualité des ARN	81

7.4 Quantification relative des gènes <i>msrAB</i> et <i>msrA</i> par RT-qPCR.....	81
RESULTATS	83
CHAPITRE I – Rôle des résidus méthionines des protéines extracellulaires de <i>B. cereus</i> dans le maintien de l’homéostasie redox	85
I.1 Problématique.....	85
I.2 Stratégie de détection des méthionines oxydées	85
I.2.1 Techniques d’immunologies	86
I.2.2 Utilisation d’isotopes	86
I.2.3 Utilisation de la fluorescence.....	86
I.2.4 Détection par spectrométrie de masse.....	87
I.3 Stratégie d’analyse de la dynamique de l’exoprotéome	87
Article 1: Time dynamics of the <i>Bacillus cereus</i> exoproteome are shaped by cellular oxidation.....	90
Principaux résultats.....	90
CHAPITRE II – Rôle du plasmide pBClin15 dans la dynamique de l’exoprotéome et du protéome cellulaire de <i>B. cereus</i> en aérobiose	107
II.1 Problématique et objectifs	107
II.2 Stratégie d’analyse de la dynamique des protéines intracellulaires	107
Article 2: Deciphering the interactions between the <i>Bacillus cereus</i> linear plasmid, pBClin15, and its host by high-throughput comparative proteomics	108
Principaux résultats.....	108
Résultats complémentaires.....	109
Dynamique des résidus méthionines oxydées de l’exoprotéome et protéome cellulaire	109
CHAPITRE III – Rôle de la méthionine sulfoxyde réductase <i>msrAB</i> et ses cibles dans le maintien de l’homéostasie redox de <i>B. cereus</i> en aérobiose.....	147
III.1 Problématique et objectifs	147
III.2 Résultats et discussions	148
Dynamique de l’expression de <i>msrAB</i> chez <i>B. cereus</i> en aérobiose	148
Implication de MsrAB sur la croissance de <i>B. cereus</i> en aérobiose	148

Implication de MsrAB dans la sécrétion des protéines extracellulaires ..	151
Analyse du protéome cellulaire des souches WT, NM et OP	152
Analyse de l'exoprotéome des souches Δ pBclin15, Δ msrAB et Δ msrAB-pHT304msrAB	154
Implication de <i>msrAB</i> dans la dynamique des résidus méthionines oxydées en aérobiose.....	156
CHAPITRE IV – Rôle de la méthionine sulfoxyde réductase <i>msrAB</i> de <i>B. cereus</i> en anaérobiose à haut POR	159
III.1 Problématique et objectifs	159
Résultats	160
Dynamique de l'expression de <i>msrAB</i> chez <i>B. cereus</i> en anaérobiose	160
Implication de MsrAB sur la croissance et l'activité réductrice de <i>B. cereus</i> en anaérobiose.....	160
Implication de MsrAB dans la sécrétion des protéines extracellulaires en anaérobiose.....	163
Analyse du protéome cellulaire des souches WT et NM en anaérobiose	163
Analyse de l'exoprotéome des souches WT et NM en anaérobiose	166
Implication de <i>msrAB</i> dans la dynamique des résidus méthionines oxydées en anaérobiose.....	167
Conclusions et perspectives	171
Le protéome de <i>B. cereus</i>	171
Le rôle du plasmide pBclin15.....	172
Le rôle antioxydant des résidus méthionines	173
Le rôle de MsrAB dans l'homéostasie redox.....	174
Références bibliographiques	177
Résumé	198
Abstract.....	198

Abréviations

°C : degré Celsius

%GC : pourcentage de guanine (G)-cytosine (C) ou coefficient de Chargaff

Å : Ångström, unité de longueur valant 0,1 nanomètre

µm : micromètre

aa : acide aminé

ACN : acétonitrile

ACP : Analyses en composantes principales

ADN/DNA : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNr : ADN ribosomique

ADP : Adénosine Di Phosphate

AFLP : Amplification Fragment Length Polymorphism

AhpF : alkyl hydroperoxyde peroxydase sous-unité F

AMP : Adénosine Mono Phosphate

ARN/RNA : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine triphosphate

B. : Bacillus

Ba : Bacillus anthracis

Bc : Bacillus cereus

BSA : bovine serum albumine

BSH : bacillithiol

Bt : Bacillus thuringiensis

Caco-2 : Colorectal Adenocarcinoma

ccm : cubic centimeter per minute

CDC : cholesterol-dependent cytolysin

cds : Coding DNA sequence

CFU/UFC : Colony Forming Unit ou Unité formant une colonie

CGH: Comparative genomic hybridization

CHAPS : 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate

CoA : Coenzyme A

Crp : cAMP receptor protein

Cys : cystéine

CytK : Cytotoxine K

CwpFM: Cell wall peptidase FM

Da : Dalton

DO : Densité optique

DRO : Dérivés réactifs de l'oxygène

DTT : Dithiothréitol

EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acétate

EE : Early exponential growth phase

Eh : potentiel d'oxydo-réduction
Ent : entérotoxine
EntFM : entérotoxine FM
Eno : émolase
ESAT-6 : Early Secreted Antigen 6 kDa
et al. : et alius
FAD : Flavine adénine dinucléotide
Fnr : Fumarate nitrate reductase
GAPDH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GI : GenInfo Identifier
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GSH : glutathion
GOE : Great Oxygenation Event
Hbl : Hémolysine BL
HCl : Acide chlorhydrique
HeLa : Henrietta Lacks
HlyI : Hémolysine I
HlyII : Hémolysine II
HK : histidine kinase
HPLC : high performance liquid chromatography
IAM : Iodoacétamide
INSDC : International Nucleotide Sequence Database Collaboration
IS : Insertion Sequence
K : constante de vitesse
Ka : constante d'acidité
kb : kilobase
kDa : kilodalton
LB : Luria Bertani
LC-MS : Liquid chromatography–mass spectrometry
LDS : Lithium dodecyl sulfate
LE : Late exponential growth phase
LPSN : List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
l.s. : lato sensu
LTP : Living-Tree Project
LTQ : Linear Trap Quadropole
M : méthionine
Mal : malate
MarR : Multiple antibiotic resistance regulator
Mb: millions de paire de bases
MDA : malondialdéhyde
MLEE : Multi locus enzyme electrophoresis
MLST : Multilocus sequence typing
mmHg : millimètre de mercure
M(O) : méthionine sulfoxyde
MS : Mass Spectrometry ou Spectrométrie de masse
Msr : Méthionine sulfoxyde réductase

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
ncbi : National Center for Biotechnology Information
Nhe : Toxine non hémolytique
NlpC/P60 : New lipoprotein C / 60 kDa extracellular protein
nm : nanomètre
NM : null mutant
NO : oxyde nitrique
NOS : NO synthase
NRPS : non-ribosomal peptides synthetase
NVH : Norges veterinærhøgskole
Ohr : Organic hydroperoxide resistance
OP : overexpressed mutant
Opp: oligopeptide-binding protein
ORF : Open Reading Frame ou cadre ouvert de lecture
ORP : Oxidation Reduction Potential
PapR : peptide activating PlcR
pb : paire de bases
PBS : Phosphate Buffer Saline
PC : phosphatidylcholine
PCR : Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne
Pfk : phosphofructokinase
Pgi : phosphoglucose isomérase
Pgk : phosphoglycérate kinase (Pgc)
PLC : phospholipase
PlcR : Phospholipase c regulator
pH : potentiel hydrogène
pI : point isoélectrique
PI : phosphatidylinositol
pO₂ : pression partielle d'oxygène
POR : potentiel d'oxydo-réduction
PPCO : Translucent Polypropylene Copolymer
ppm : parts-per-million
qPCR : PCR quantitative
RefSeq : Reference Sequence
RNS : Reactive nitrogen species
ROS : Reactive oxygen species
RR : régulateur de réponse
S : Svedberg, unité de mesure du taux de sédimentation
S : Stationary growth phase
SBA : sheep blood agar
SC : Spectral Count ou nombre de spectres
SM : sphingomyéline
SOD : superoxyde dismutase
s.s. : stricto sensu
TCA : Trichloroacetic acid

TCA cycle : tricarboxylic acide cycle
TCS : Two-component regulatory system
TIA : Toxi-infection alimentaire
TIAC : Toxi-infection alimentaire collective
Tpx : thiol peroxydase
Trx : thiorédoxine
TryR : trypanothione reductase
UW: University of Wisconsin
w/v : weight / volume percentage concentration
WT : wild-type

Liste des figures

- ✚ Figure 1: Observation au microscope (x1000) en contraste de phase des endospores de *B. cereus* ATCC 14579 (INRA, Avignon)
- ✚ Figure 2: Observation au microscope électronique (x7000) de la ciliature péritriche de *B. cereus* ATCC 14579 (Omer, et al., 2015)
- ✚ Figure 3: Dendrogramme phylogénétique réalisé à partir des données de séquençage des ARNm 16S de 39 souches de *B. cereus* s.l. (Jimenez, et al., 2013)
- ✚ Figure 4: Représentation des cycles de vie dans différents hôtes du groupe *B. cereus* s.l. (Ceuppens, et al., 2013)
- ✚ Figure 5: Caractéristiques des principaux habitats du tractus gastro-intestinal humain et du microbiote. D'après (Walter & Ley, 2011)
- ✚ Figure 6 : Schéma représentant la structure chimique de la céréulide provenant de *B. cereus* (A), de la valinomycine de *Streptomyces tsusimaensis* (B) et de leurs motifs répétés (C et D) (Krotten, et al., 2010)
- ✚ Figure 7: Représentation schématique des gènes *cesHPTCD* (Dommel, et al., 2011)
- ✚ Figure 8: Dendrogramme réalisé à partir des séquences protéiques des 6 composants Hbl et Nhe de *B. cereus* ATCC 14579 (Stenfors Arnesen, et al., 2008)
- ✚ Figure 9: Représentation schématique de l'opéron *nheABC* avec les promoteurs et sites de régulation chez *B. cereus* ATCC 14579 (Stenfors Arnesen, et al., 2008)
- ✚ Figure 10: Représentation schématique des mécanismes de régulations de l'expression de *hlyII* en présence (A) et absence (B) de fer et glucose (Ramarao & Sanchis, 2013)
- ✚ Figure 11: Alignement des séquences protéiques de EntA, EntB et EntC (Clair, et al., 2010)
- ✚ Figure 12: Séquences protéiques de EntD (Omer, et al., 2015)
- ✚ Figure 13: Mécanismes d'activation du PlcR par PapR (Grenha, et al., 2013)
- ✚ Figure 14: Influence des conditions d'oxygénation sur Fnr et son centre fer-soufre (Antelmann, 2015)
- ✚ Figure 15: Régulation d'OhrA par OhrR
- ✚ Figure 16: Schéma représentant les voies respiratoires et fermentaires chez *B. cereus* (Zigha, et al., 2007, Messaoudi, et al., 2010)
- ✚ Figure 17: Schéma représentant les voies du métabolisme de l'azote chez *B. cereus*. D'après (Mols, et al., 2007)
- ✚ Figure 18: Schéma représentant les variations de concentration des principaux oligo-éléments essentiels dans les océans et du dioxygène dans l'atmosphère (Anbar, 2008)
- ✚ Figure 19: Réduction du dioxygène (Pinto, et al., 2010)
- ✚ Figure 20: Les espèces réactives intermédiaires de l'oxygène et de l'azote (Sawyer, 1990)
- ✚ Figure 21: Origine et effets toxiques des ROS endogènes (Favier, 2003)
- ✚ Figure 22: Les 3 phases de la peroxydation lipidique
- ✚ Figure 23: Les altérations de l'ADN par les ROS endogènes (Favier, 2003)

- ✚ Figure 24: Structure du coenzyme A (Antelmann, 2015)
- ✚ Figure 25: Biosynthèse du bacillithiol (Antelmann, 2015)
- ✚ Figure 26 : Cycle d'oxydo-réduction de la méthionine chez *E. coli* (Ezraty, et al., 2005)
- ✚ Figure 27: Oxydation du résidu méthionine
- ✚ Figure 28: Couplage impliqué dans la réduction des méthionines sulfoxydes
- ✚ Figure 29: Activité réductrice de MsrA, MsrB et fRMsr sur les méthionines sulfoxydes libres et incorporées (Lee, et al., 2009)
- ✚ Figure 30: Représentation sur la courbe de croissance de la souche sauvage (WT) des trois prélèvements réalisés en phase exponentielle, de ralentissement et stationnaire
- ✚ Figure 31: Stratégie expérimentale shotgun mise en place lors de nos analyses protéomiques de l'exoprotéome
- ✚ Figure 32: Stratégie expérimentale shotgun mise en place lors de nos analyses du protéome cellulaire
- ✚ Figure 33: Dynamique des résidus méthionines oxydées du protéome cellulaire et exoprotéome des souches ATCC 14579 et $\Delta pBClin15$ de *B. cereus* en aérobiose
- ✚ Figure 34: Comparaison du niveau d'expression du gène *msrAB* des souches WT et OP en phase exponentielle (EE), de ralentissement (LE) et stationnaire (S) en aérobiose
- ✚ Figure 35: Courbe de croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose
- ✚ Figure 36: Courbe de croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose
- ✚ Figure 37: Consommation du glucose au cours de la croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose
- ✚ Figure 38: Stœchiométrie de l'acétate au cours de la croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose
- ✚ Figure 39: Comparaison de l'activité protéasique du surnageant au cours de la croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose
- ✚ Figure 40: Comparaison de l'activité protéasique du surnageant au cours de la croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose
- ✚ Figure 41: Dynamique des résidus méthionines oxydés dans l'exoprotéome et le protéome cellulaire des souches WT, NM et OP en aérobiose
- ✚ Figure 42 : Dynamique de l'oxydation des résidus méthionines des peptides appartenant aux toxines et enzymes de dégradation dans l'exoprotéome des souches WT, NM et OP en aérobiose
- ✚ Figure 43: Comparaison du niveau d'expression du gène *msrAB* en phase exponentielle (EE), de ralentissement (LE) et stationnaire (S) de WT en anaérobiose
- ✚ Figure 44: Courbe de croissance des souches WT et NM en anaérobiose à haut POR
- ✚ Figure 45: Consommation du glucose au cours de la croissance des souches WT et NM en anaérobiose
- ✚ Figure 46: Stœchiométrie du succinate au cours de la croissance des souches WT et NM en anaérobiose
- ✚ Figure 47: Comparaison de la quantité de protéines extracellulaires des souches WT et NM en anaérobiose

- ✚ Figure 48: Abondance des familles fonctionnelles des protéines intracellulaires au cours de la croissance des souches WT et NM en anaérobiose
- ✚ Figure 49: Abondance des familles fonctionnelles des protéines extracellulaires au cours de la croissance des souches WT et NM en anaérobiose
- ✚ Figure 50: Dynamique des résidus méthionines oxydés dans l'exoprotéome et le protéome cellulaire des souches WT et NM en anaérobiose
- ✚ Figure 51: Dynamique de l'oxydation des résidus méthionines des peptides du protéome cellulaire classés dans 5 familles fonctionnelles des souches WT et NM en anaérobiose
- ✚ Figure 52: Dynamique de l'oxydation des résidus méthionines des peptides de l'exoprotéome classés dans 6 familles fonctionnelles des souches WT et NM en anaérobiose

Liste des tableaux

- ✚ Tableau 1: Caractéristiques génomiques des 8 espèces types de *B. cereus* s.l.
- ✚ Tableau 2: Comparaison des séquences de plasmides (Rasko, et al., 2005)
- ✚ Tableau 3: Nombres de gènes impliqués dans l'utilisation des acides aminés et carbohydrates chez *B. cereus* sl et *B. subtilis* (Han, et al., 2006)
- ✚ Tableau 4: Constante de vitesse de réaction de la méthionine avec des oxydants à pH= 7 en solution aqueuse (Davies, 2004)
- ✚ Tableau 5: Composition du milieu MOD
- ✚ Tableau 6: Liste des amorces utilisées lors des RT-qPCR
- ✚ Tableau 7: Caractéristiques de croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose
- ✚ Tableau 8: Tableau récapitulatif des 33 protéines intracellulaires significativement impactées par MsrAB en aérobiose
- ✚ Tableau 9: Tableau récapitulatif des 20 protéines de l'exoprotéome significativement impactées par MsrAB en aérobiose
- ✚ Tableau 10: Tableau récapitulatif des peptides oxydés du protéome cellulaire significativement impactées par MsrAB en aérobiose
- ✚ Tableau 11: Tableau récapitulatif des peptides oxydés de l'exoprotéome significativement impactées par MsrAB en aérobiose
- ✚ Tableau 12: Caractéristiques de croissance des souches WT et NM en anaérobiose à haut POR
- ✚ Tableau 13: Tableau récapitulatif des 10 protéines cellulaires de chaque phase de croissance les plus significativement impactées (p-value) par MsrAB en anaérobiose
- ✚ Tableau 14: Tableau récapitulatif des exoprotéines les plus significativement impactées à chaque phase de croissance par MsrAB en anaérobiose
- ✚ Tableau 15: Tableau récapitulatif des peptides oxydés les plus impactés du protéome cellulaire des souches WT et NM en anaérobiose
- ✚ Tableau 16: Tableau récapitulatif des peptides oxydés les plus impactés de l'exoprotéome des souches WT et NM en anaérobiose

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

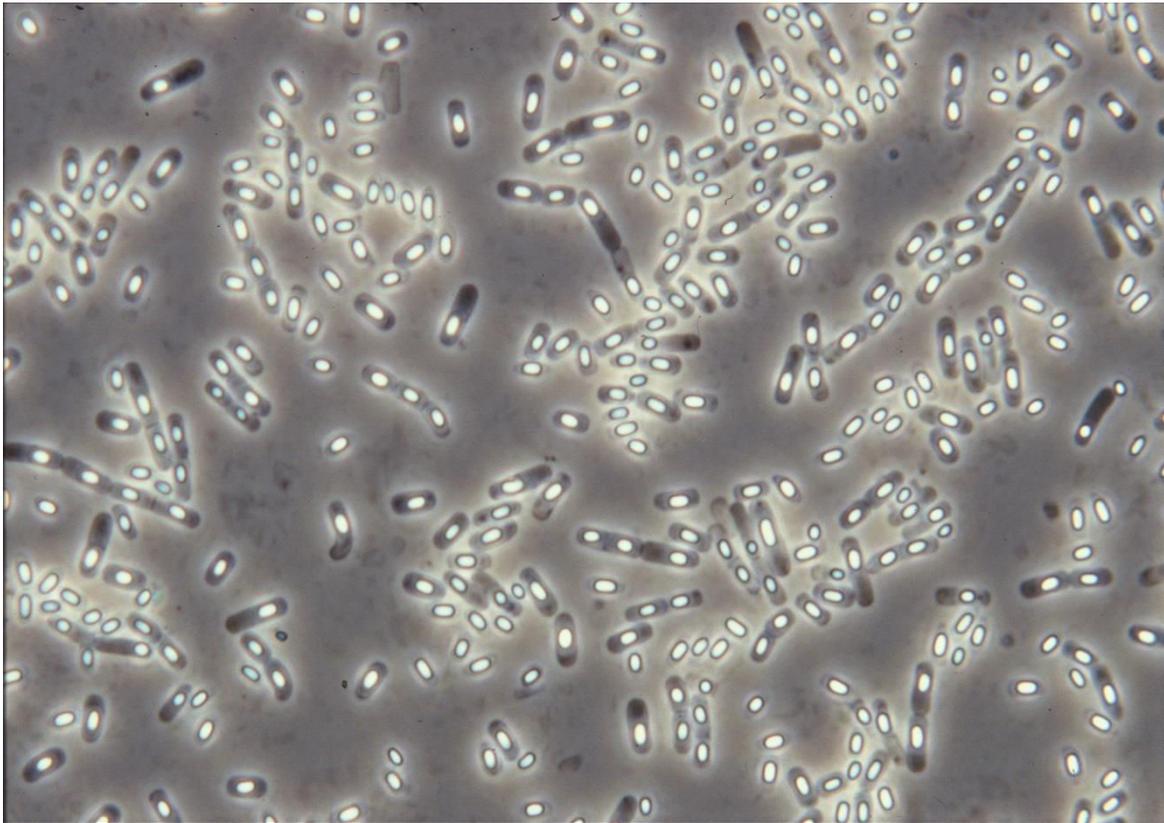


Figure 1: Observation au microscope (x1000) en contraste de phase des endospores de *B. cereus* ATCC 14579 (INRA, Avignon)

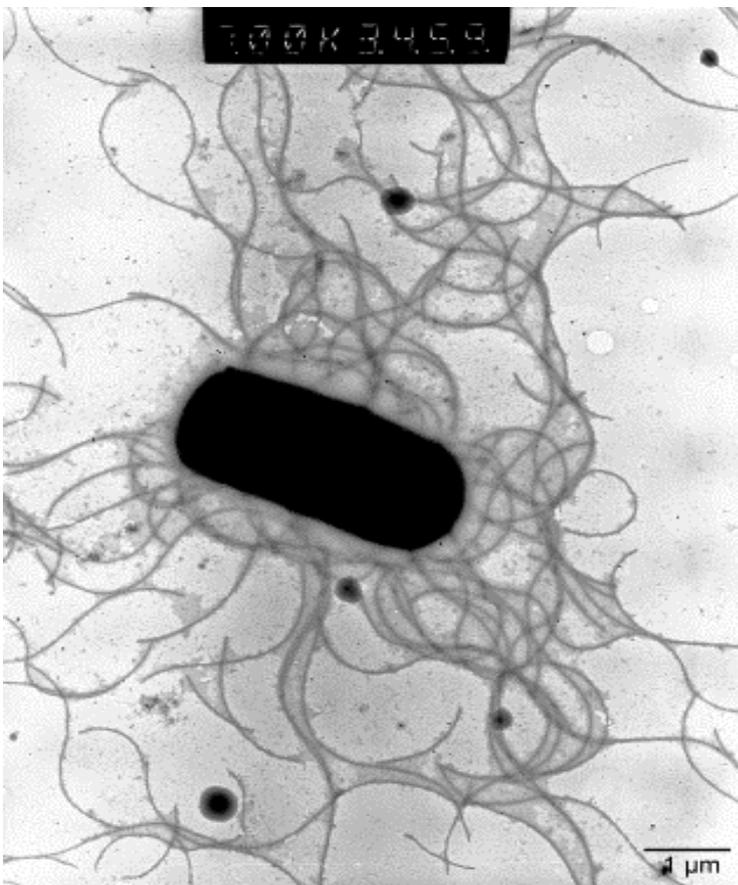


Figure 2: Observation au microscope électronique (x7000) de la ciliature péritriche de *B. cereus* ATCC 14579 (Omer, *et al.*, 2015)

La ciliature péritriche est un système de flagelles recouvrant de tous côtés la surface de la bactérie et leur permettant de se déplacer dans un milieu liquide.

CHAPITRE I – *Bacillus cereus*

I.1 Historique et taxonomie

Bacillus cereus est une bactérie appartenant au genre *Bacillus* et à la famille des *Bacillaceae*. Il a été répertorié pour la 1^{ère} fois en 1887 à partir d'un prélèvement d'air dans une étable (Frankland & Frankland, 1887). L'origine du nom de l'espèce provient de l'aspect cireux des colonies sur boîte de Pétri rappelant celui des bougies (*cereus* en latin).

Le genre *Bacillus* (anciennement *Bacterium*) a été baptisé en 1835 par Christian Gottfried Ehrenberg et regrouper des bactéries de forme allongée dite « en bâtonnet ». En 1872, Ferdinand Cohn a apporté d'avantages de caractéristiques en regroupant dans ce genre les bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, de coloration Gram positive et ayant la capacité de former des spores (**Figure 1**) (Cohn, 1872). Aujourd'hui, d'après la base de données LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature), ce genre regroupe 306 espèces. Ces bactéries sont largement répandues dans l'environnement (sol, air, eau), les plantes, les aliments et les échantillons cliniques humains (Alcaraz, *et al.*, 2010).

Parmi le genre *Bacillus*, un clade regroupant plusieurs « espèces » devrait être considéré comme une seule espèce en vertu des normes de classification en vigueur. Ce clade est celui de *B. cereus* souvent désigné dans la littérature sous le terme de «*Bacillus cereus sensu lato*» (*B. cereus s.l.*). Ce groupe rassemble des bacilles chimio-organohétérotrophes, de 1,0-1,5 x 3,0-6,0 µm, immobile ou mobile grâce à une ciliature péritriche (**Figure 2**). A l'heure actuelle, *B. cereus lato sensu* regroupe 8 espèces (**Figure 3**) (Guinebretiere, *et al.*, 2008, Jimenez, *et al.*, 2013):

- *B. anthracis*, un agent étiologique de la maladie du charbon ou anthrax qui est une anthroponose. C'est la 1^{ère} bactérie à avoir été identifiée comme agent infectieux d'une maladie par Robert Koch en 1876 (Koch, 1876). Les souches de *B. anthracis* sont non-hémolytiques sur plaque de gélose au sang de mouton (SBA) (Grass, *et al.*, 2013).
- *B. cereus sensu stricto* (*s.s.*), un pathogène humain responsable de toxi-infections alimentaires et dans certains cas particuliers d'infections systémiques et locales (Bottone, 2010).
- *B. cytotoxicus*, une espèce thermophile pathogène pour l'homme responsable d'intoxications alimentaires. Elle peut se développer à une température comprise entre 20 et 50°C (Guinebretiere, *et al.*, 2013).
- *B. mycoides*, une espèce caractérisée par la formation de colonies à bord filamenteux (rhizoïdes) sur milieux nutritifs gélosés. C'est une bactérie immobile et couramment utilisée en agroalimentaire car elle induit une résistance systématique contre divers agents phytopathogènes (bactéries, champignons, oomycètes et virus) (Bargabus, *et al.*, 2003).
- *B. pseudomycoides*, une espèce au phénotype identique à *B. mycoides* mais qui se distingue par sa composition en acide gras (Nakamura, 1998).



Figure 3: Dendrogramme phylogénétique réalisé à partir des données de séquençage des ARNm 16S de 39 souches de *B. cereus s.l.* (Jimenez, *et al.*, 2013)

L'échelle indique 1% de divergence génétique. Le numéro d'accèsion est indiqué entre parenthèses. Les séquences en gras correspondent aux souches de référence des 8 espèces de *B. cereus s.l.* obtenues sur la base de données LTP (Living-Tree Project). On considère qu'il faut un «cut-off» de 3% de divergence comme critère pour différencier deux espèces d'un point de vue génétique.

- *B. toyonensis*, une espèce longtemps utilisée comme probiotique dans la nutrition animale sous l'appellation Toyocerin®. Par rapport à *B. cereus s.s.*, les opérons codant pour les toxines Hbl, Nhe sont non fonctionnels et vraisemblablement aussi ceux de la céréulide. Le gène CytK est quant à lui absent (Jimenez, *et al.*, 2013).
- *B. thuringiensis*, une espèce se différenciant de *B. cereus stricto sensu* par la formation durant la sporulation d'un cristal parasporal toxique pour certains insectes et nématodes (Bravo, *et al.*, 2011).
- *B. weihenstephanensis*, les souches de cette espèce sont psychrotolérantes et peuvent ainsi se développer à des températures comprises entre 7°C et 43 °C (Lechner, *et al.*, 1998).

Les premières classifications des espèces appartenant au groupe *B. cereus s.l.* reposaient pour la plupart sur des caractères phénotypiques. Par la suite, la phylogénie de ce groupe a été déterminée par différentes techniques : l'électrophorèse des enzymes (ou MLEE), le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (ou AFLP) et par ce qui est actuellement considéré comme la technique de référence pour de telles études, le typage génomique multilocus (ou MLST) (Tourasse, *et al.*, 2011). Aujourd'hui, ces espèces sont classées dans 7 groupes phylogénétiques (Guinebretiere, *et al.*, 2008). Chaque groupe phylogénétique possède une gamme de température de croissance définie. Les différences en termes de températures limites tolérées de ces groupes suggèrent une diversification de *B. cereus s.l.* liée à la colonisation de nouvelles niches écologiques. Le nombre croissant dans les bases de données publiques de séquences génomiques complètes ou partielles des espèces du groupe *B. cereus* a confirmé la diversité affichée de ce groupe et élargi nos connaissances sur les spécificités de chaque espèce (Tourasse, *et al.*, 2011). La combinaison des résultats de MLST et AFLP sur 2143 souches a permis de réaliser un arbre phylogénétique dont les résultats sont disponibles sur la base de données de l'université d'Oslo (<http://mlstoslo.uio.no/>).

I.2 Génome de *B. cereus*

I.2.1 Génome chromosomique

Comme beaucoup de bactéries, le groupe *B. cereus* a bénéficié de l' « ère génomique » depuis la publication du 1^{er} génome bactérien en 1995, celui d'*Haemophilus influenzae* (Fleischmann, *et al.*, 1995). Les attentats à l'anthrax aux Etats-Unis en automne 2001 ont eu un énorme impact sur le choix des projets entrepris en génomique. Les projets en médecine légale et bio défense sont devenus des projets pilotes. En 2003, le génome de la souche Ames de *B. anthracis*, a été publié. Cette souche est celle identifiée en automne 2001 dans les courriers contenant de l'anthrax et correspond à une souche isolée sur un bœuf de 14 mois en 1981 au Texas (Read, *et al.*, 2003). La même année, le génome de *B. anthracis* souche A2012 et celui de *B. cereus* souche ATCC 14579 (Ivanova, *et al.*, 2003) ont été publiés. Aujourd'hui, sur la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information), les génomes de 250 souches appartenant au groupe *B. cereus s.l.* sont disponibles. La taille du génome de *B. cereus s.l.* est comprise entre 4,9 et 5,9 millions paires de bases (pb) sauf pour *B. cereus* NVH391–98 « *cytotoxicus* » (4,1Mb) et se caractérise par un faible pourcentage de GC situé entre 35,2 et 35,9% (**Tableau 1**) (Papazisi, *et al.*, 2011). La comparaison des séquences d'ARN ribosomal

(ARNr) 16S chez ce groupe a révélé un pourcentage d'identité supérieur à 99% (Ash, *et al.*, 1991). La comparaison génomique de 15 isolats de *B. cereus s.l.* a avéré une forte syntonie au sein du groupe avec une conservation de l'ordre d'organisation des gènes orthologues (Rasko, *et al.*, 2005). Une comparaison par hybridation génomique comparative (abrégéé CGH en anglais) sur *B. anthracis* Ames, 19 souches de *B. cereus* et *B. thuringiensis* a révélé que la région entourant la séquence de terminaison (2 Mb) contient une quantité significativement plus élevée de gènes spécifiques à la souche et présente une plasticité chromosomique supérieure (Read, *et al.*, 2003).

Tableau 1 : Caractéristiques génomiques des 8 espèces types de *B. cereus s.l.*

Organisme	Souche	RefSeq	INSDC	Taille (en Mb)	%GC	Gènes	Protéines
<i>B. cereus</i>	ATCC 14579	NC_004722.1	AE016877.1	5.41	35.3	5,473	5,210
<i>B. anthracis</i>	Ames	NC_003997.3	AE016879.1	5.23	35.4	5,636	5,326
<i>B. cytotoxicus</i>	NVH 391-98	NC_009674.1	CP000764.1	4.09	35.9	4,062	3,758
<i>B. mycoides</i>	Rock1-4	NZ_CM000743.1	CM000743.1	5.84	35.3	5,965	5,406
<i>B. pseudomycoides</i>	DSM 12442	NZ_CM000745.1	CM000745.1	5.78	35.4	5,818	5,407
<i>B. thuringiensis</i>	97-27	NC_005957.1	AE017355.1	5.24	35.4	5,263	5,117
<i>B. toyonensis</i>	BCT-7112T	NC_022781.1	CP006863.1	4.94	35.6	5,017	4,780
<i>B. weihenstephanensis</i>	KBAB4	NC_010184.1	CP000903.1	5.65	35.2	5,811	5,565

Les différences entre les espèces du groupe *B. cereus* se situent essentiellement au niveau des plasmides qui confèrent certains traits phénotypiques utilisés pour différencier notamment *B. anthracis*, *B. cereus s.s.* et *B. thuringiensis* (Alcaraz, *et al.*, 2010).

1.2.2 Les plasmides

A l'heure actuelle, 104 plasmides différents ont été identifiés au sein du groupe *B. cereus s.l.*. Leurs tailles sont comprises entre 2 et 566 kb avec un pourcentage en GC variant entre 31 et 38% (**Tableau 2**) (Zheng, *et al.*, 2015). Les plasmides ne sont pas présents dans toutes les souches mais certaines peuvent en posséder un nombre supérieur à dix (Reyes-Ramirez & Ibarra, 2008). De plus, la taille des plasmides peut varier fortement au sein d'une même bactérie. Par exemple, *B. thuringiensis* souche CT-43 possède 10 plasmides dont les tailles sont comprises entre 6 et 300 kb (Guan, *et al.*, 2012). Ces plasmides peuvent être conjugatifs et posséder un certain nombre de séquences d'insertion (abrégéé IS en anglais). De plus, les souches du groupe *B. cereus* peuvent également contenir des prophages qui peuvent s'intégrer dans le chromosome ou se multiplier comme des éléments linéaires indépendants (Zheng, *et al.*, 2015).

Tableau 2: Comparaison des séquences de plasmides (Rasko, et al., 2005)

Nom du plasmide	Organisme	Souche	Taille (en pb)	G+C (%)	Réplicon	Système de réplication	Nombre de CDS	Functional CDS
pXO1	<i>B. anthracis</i>	All	181,677	33	Unknown	Unknown	204	48
pXO2	<i>B. anthracis</i>	All	94,830	33	pAMβ1	Thêta	104	26
pBc10987	<i>B. cereus</i>	ATCC 10987	208,369	33	Unknown	Unknown	242	91
pBClin15	<i>B. cereus</i>	ATCC 14579	15,100	38	Phage	Phage	21	4
pBCXO1	<i>B. cereus</i>	G9241	191,110	33	Unknown	Unknown	177	61
pBC218	<i>B. cereus</i>	G9241	218,094	32	Unknown	Unknown	185	116
pZK5	<i>B. cereus</i>	Zebra Killer	5108	31	Group VII	RCR	5	2
pZK8	<i>B. cereus</i>	Zebra Killer	8191	32	Group VII	RCR	8	4
pZK9	<i>B. cereus</i>	Zebra Killer	9150	31	Group VII	RCR	10	5
pZK54	<i>B. cereus</i>	Zebra Killer	53,501	32	pAMβ1	Thêta	58	27
pZK467	<i>B. cereus</i>	Zebra Killer	466,370	33	Unknown	Unknown	465	228
pBT9727	<i>B. thuringiensis</i>	9727	77,122	33	pAMβ1	Thêta	80	18

La spécificité d'hôtes de *B. anthracis* pour les Vertébrés et *B. thuringiensis* pour les larves d'Insectes a longtemps été utilisée comme critères de distinction entre les deux espèces. Les gènes codant pour les facteurs de virulence impliqués dans l'interaction hôte-agent pathogène sont portés par des plasmides. Chez *B. thuringiensis*, les cristaux protéiques (Cry ou Cyt) qui ont une activité insecticide sont codés uniquement par des gènes présents sur des plasmides de tailles variables et parfois associés à des éléments IS (Reyes-Ramirez & Ibarra, 2008). Chez *B. anthracis*, sa virulence nécessite la présence des plasmides pXO1 (182 kb) et pXO2 (95 kb). pXO1 porte les gènes codant pour les toxines tripartites (*pag*, *lef*, *cya*) tous localisés sur un îlot de pathogénicité de 44,8 kb (Okinaka, et al., 1999). Cet îlot comporte également l'activateur transcriptionnel AtxA et le répresseur PagR qui régulent l'expression des gènes codant pour les toxines (Fouet, 2010, Sastalla, et al., 2010). Le plasmide pXO2 possède un opéron de 5 gènes (*capBCADE*) codant pour les composants de la capsule de *B. anthracis*. Cette capsule est composée uniquement d'acide D- poly-γ-glutamique (polyglutamate) et constitue un facteur de virulence important du pathogène. L'expression de la capsule est activée par les régulateurs transcriptionnels AcpA et AcpB.

L'opéron de la capsule et ces gènes de régulation sont tous localisés sur un îlot de pathogénicité de 35 kb (Van der Auwera, et al., 2005). L'expression de *acpA* et *acpB* (localisés sur pXO2) est sous le contrôle de AtxA (pXO1) (Fouet, 2010). Il y a donc une interconnexion entre les deux plasmides de virulence alors que chacun constitue une entité distincte.

En dehors des gènes portés par les plasmides de virulence, les déterminants génétiques nécessaires pour d'autres aspects de l'infection (adhérence et colonisation) sont situés sur le chromosome et peuvent être communs à *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis* (Rasko, et al., 2005, Scarano, et al., 2009).

I.3 Cycle de vie

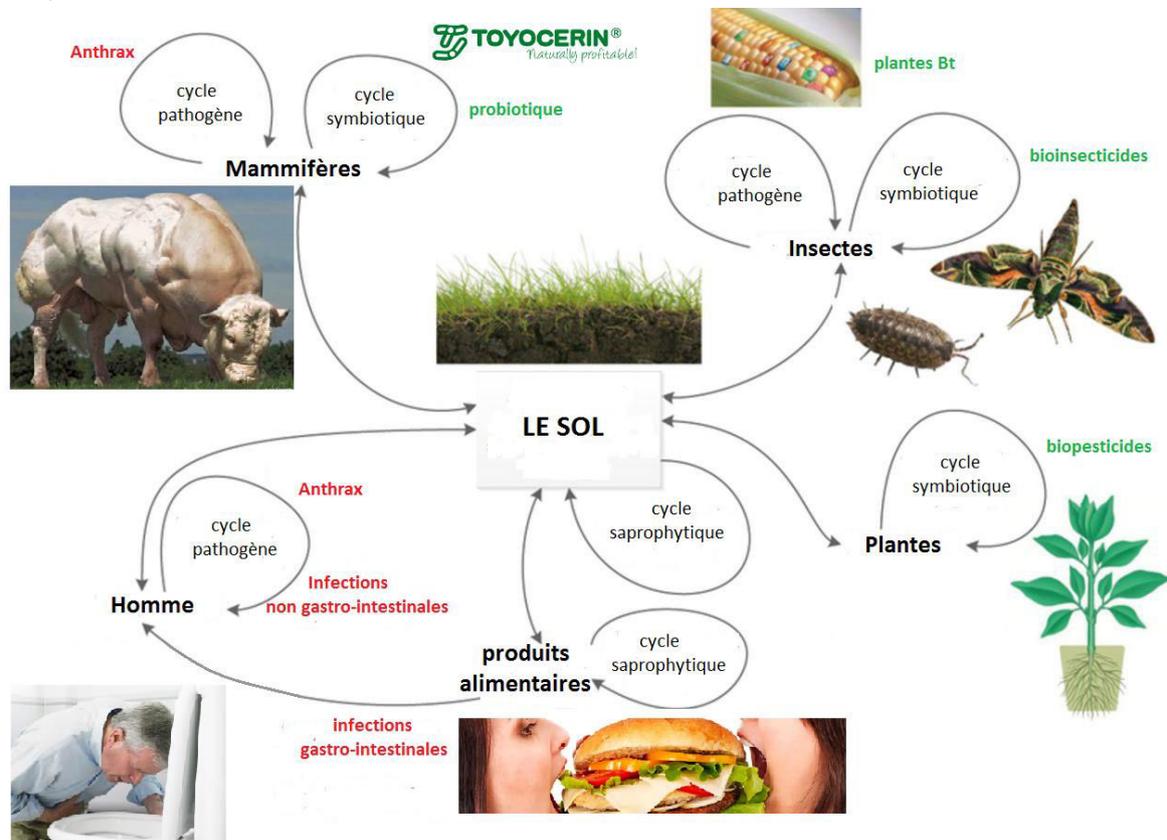


Figure 4: Représentation des cycles de vie dans différents hôtes du groupe *B. cereus s.l.* (Ceuppens, et al., 2013)

Le principal réservoir environnemental du groupe *B. cereus s.l.* est le sol (Figure 4). Lorsque les conditions sont favorables, les spores de *B. cereus s.l.* présents dans le sol germent. La matière organique en décomposition est utilisée comme substrat pour réaliser son cycle saprophyte. Une fois les sources de nutriments épuisées ou dans des conditions défavorables, les cellules végétatives sporulent bouclant ainsi le cycle (Vilain, et al., 2006). De même pour *B. thuringiensis*, sa croissance a été démontrée dans des microcosmes de sol artificiel (Ellis, 2004). Pour *B. anthracis*, les spores restent en dormance dans le sol (Ceuppens, et al., 2012). Le sol constitue une niche écologique abritant une communauté microbienne riche et diversifiée. La production de toxines par *B. cereus s.l.* dans le sol peut donner un avantage compétitif (compétition par interférence) sur les autres micro-organismes et de ce fait augmenter leur fitness (Tempelaars, et al., 2011).

Hormis le sol, *B. cereus s.l.* peut aussi être rencontré dans de nombreux environnements : la rhizosphère, la phyllosphère, le tractus digestif des Invertébrés terrestres ainsi que dans les produits issus de l'industrie agroalimentaire et les milieux hospitaliers.

Au niveau de la rhizosphère et phyllosphère, *B. cereus s.l.* peut établir avec les plantes une interaction directe de nature mutuellement bénéfique (symbiose). Par exemple, *B. cereus* UW85 produit la zwittermicine A et la kanosamine. Ce sont des antibiotiques connus pour être important dans le biocontrôle des oomycètes phytopathogènes comme *Phytophthora* (Silo-Suh, *et al.*, 1994, Milner, *et al.*, 1996). La plante en retour modifie les exsudats racinaires en produisant préférentiellement des glucides, acides organiques, polyols et alcanes pour favoriser la colonisation de ces racines par des micro-organismes mutualistes (Dutta, *et al.*, 2013).

Le tractus digestif des Arthropodes riche en éléments nutritifs constitue un milieu propice à la croissance des bactéries. Les spores de *B. cereus* présentes dans le sol ou fèces sont ingérées par les Arthropodes. Après ingestion des spores et germination, les bactéries forment de longs filaments, perdent leurs flagelles, s'adhèrent à la chitine de l'épithélium intestinal et sporulent au niveau de l'extrémité libre distale des filaments (Margulis, *et al.*, 1998). La présence de *B. cereus s.s.*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* et *B. mycooides / B. pseudomycooides* a été révélée dans le tractus digestif de plusieurs espèces d'Arthropodes : termites, vers de terre, collemboles, isopodes et myriapodes (Konig, 2006). Dans le tractus digestif des termites, le genre *Bacillus* est le genre majoritaire. Il jouerait un rôle dans la dégradation de polysaccharides et composés aromatiques (Wenzel, *et al.*, 2002). Dans l'intestin du vers de terre, la présence de plusieurs espèces du groupe *B. cereus* a été démontrée (Konig, 2006). Via la respiration anaérobie, cette bactérie confère à son hôte la capacité de dénitrifier le sol et d'émettre du protoxyde d'azote (Drake, *et al.*, 2006). De surcroît, la présence de cellules végétatives de *B. anthracis* a été observée dans l'intestin de certaines espèces de vers de terre (Schuch, *et al.*, 2010). En plus de permettre la dégradation de composés organiques complexes, *B. cereus* peut aussi produire des toxines, bactériocines, lactonases et antibiotiques pouvant protéger l'hôte contre des pathogènes entériques (Tempelaars, *et al.*, 2011). Cela représente le mode de vie symbiotique de *B. cereus*, qui peut être soit commensal ou mutualiste, s'il n'y a aucun effet ou des effets bénéfiques pour l'hôte respectivement. Cependant, le groupe *B. cereus* peut aussi être un agent pathogène des Insectes en fonction des souches. Par exemple la sous-espèce *kurstaki* de *B. thuringiensis* est un agent pathogène des lépidoptères et diptères (Sevim, *et al.*, 2012). Lorsque c'est un agent pathogène, *B. cereus* tue l'hôte en produisant des toxines au niveau intestinal. Par la suite, la bactérie colonise et se multiplie dans le cadavre de l'insecte jusqu'à épuisement des ressources nutritives (Swiecicka, *et al.*, 2008).

Tout comme chez les Insectes, le groupe *B. cereus* peut être un agent pathogène ou une bactérie commensale/mutualiste chez les Mammifères. Le plus connu des agents pathogènes appartenant au groupe *B. cereus* est *B. anthracis*, agent étiologique de la maladie du charbon (Koch, 1876). La maladie du charbon est une anthroponose contractée via les spores par voie pulmonaire, cutanée, gastro-intestinale ou injection avec une seringue contaminée (Baillie & Rice, 2014). En revanche, *B. toyonensis* est un membre de la microflore intestinale

améliorant le transit. Il est d'ailleurs utilisé sous forme de spores comme additif alimentaire probiotique pour améliorer les performances zootechniques des animaux (mammifères, oiseaux ou poissons) (Williams, *et al.*, 2009).

I.4 Pathologies engendrées par *Bacillus cereus s.s.*

I.4.1 Les infections gastro-intestinales

L'ingestion d'aliments contaminés par des spores et/ou cellules végétatives de *B. cereus s.s.* peut être à l'origine de toxi-infections alimentaires (TIA) chez l'homme. Le pouvoir pathogène de *B. cereus* est attribuée à la production de facteurs de virulence extracellulaires telles que les phospholipases, le céréulide, l'entérotoxine Hbl, la toxine non-hémolytique (Nhe), l'hémolysine II, l'hémolysine IV qui a un fort effet perturbateur sur les membranes cellulaires et associé à la cytotoxine K (CytK), induisant une entérocolite nécrosante (Agata, *et al.*, 1995, Beecher, *et al.*, 1995, Beecher, *et al.*, 2000, Lund, *et al.*, 2000, Hardy, *et al.*, 2001). Les TIA se manifestent par deux types de syndromes : le syndrome émétique et le syndrome diarrhéique.

I.4.1.1 Le syndrome émétique

Le syndrome émétique a été identifié pour la première fois en Angleterre après plusieurs épidémies non gastro-intestinales causées par *B. cereus* (Mortimer & McCann, 1974). Les symptômes et temps d'incubation sont les mêmes que dans le cas d'une intoxication à *Staphylococcus aureus*. Ils surviennent 1 à 5 heures après l'ingestion d'aliments contaminés ce qui suggère l'implication d'une toxine-préformée. Les premiers symptômes sont des nausées, des vomissements avec douleurs et crampes abdominales. Dans 30% des cas, des diarrhées peuvent survenir plusieurs heures après l'apparition des premiers symptômes (Logan & Rodríguez-Díaz, 2006). Des cas de décès ont été reportés suite à des insuffisances hépatiques aiguës mettant en cause des souches émétiques de *B. cereus* (Dierick, *et al.*, 2005). Le syndrome émétique est causé par l'ingestion d'un peptide lipophile cyclique de 1152 Da, le céréulide. Cette toxine émétique est thermostable, elle peut résister à une température de 121°C pendant 90 minutes mais aussi à la dégradation protéolytique à un pH compris entre 2 et 11 (Granum & Lund, 2006). Il faut 10^5 à 10^8 bacilles par gramme d'aliment avant d'avoir une quantité suffisante de toxines. Le syndrome émétique est induit par le céréulide via la stimulation des récepteurs ionotropes 5-HT 3 des nerfs vagues afférents (Agata, *et al.*, 1995). Cette toxine exerce également une activité cytotoxique en perturbant le potentiel redox de la membrane mitochondriale à l'ion potassium (Mikkola, *et al.*, 1999). Les aliments contaminés par le céréulide sont essentiellement des végétaux. L'hypothèse sur son rôle est que sa production confère un avantage compétitif dans les rhizosphères envers d'autres bactéries Gram positif dans des environnements alcalins (Tempelaars, *et al.*, 2011). La surexpression du céréulide a été observée lorsque le milieu est pauvre en potassium. Cette observation suggère un rôle de sidérophore dans le maintien de l'homéostasie intracellulaire en ion potassium (Ekman, *et al.*, 2012).

I.4.1.2 Le syndrome diarrhéique

Le syndrome diarrhéique a été décrit pour la première fois par Hauge (Hauge, 1950, Hauge, 1955). Il se manifeste par des crampes abdominales, des diarrhées aqueuses profuses et un

ténesme rectal (tension douloureuse avec sensation de brûlures et envie constante d'aller à la selle) parfois associés à des nausées et de la fièvre dans plus de 23% des cas (Luby, *et al.*, 1993). Les temps d'incubation après l'ingestion d'aliments contaminés varient entre 6 et 15 heures avec rétablissement dans les 24 à 48 heures. La dose infectieuse est de 10^4 à 10^9 bacilles par gramme d'aliment. Les symptômes sont identiques à ceux causés par une intoxication à *Clostridium perfringens* et sans coproculture, il est difficile de différencier les deux agents pathogènes (Logan & Rodríguez-Díaz, 2006). Contrairement à la céréulide qui est une toxine thermotolérante, les entérotoxines sont thermolabiles. Elles sont détruites au bout de 5 minutes à une température de 56°C et elles ne résisteraient pas au pH gastrique et aux protéases présent dans l'estomac et les intestins (Granum & Lund, 2006, Ceuppens, *et al.*, 2012). Les entérotoxines sont donc produites après ingestion de cellules végétatives et/ou spores. Il a été démontré que les toxines diarrhéiques de *B. cereus* peuvent être produites en anaérobiose et au niveau de l'intestin grêle par les cellules végétatives. Cependant, il apparait que *B. cereus* est incapable de coloniser l'intestin humain et que sa présence n'est que transitoire (Turnbull & Kramer, 1985, Ceuppens, *et al.*, 2012).

1.4.2 Infections non gastro-intestinales

En plus d'être impliquée dans les TIA, *B. cereus s.s.* peut provoquer un certain nombre d'infections systémiques et locales aussi bien chez les immunocompétents que les immunodéprimés. Il est l'un des agents étiologiques d'endophtalmie résultant de son introduction dans le segment postérieur de l'œil suite à une intervention chirurgicale, blessure ou d'un site distant. Cette infection provoque des dommages irréversibles de la rétine conduisant à une perte définitive de la vision au bout d'un à deux jours.

Malgré une intervention thérapeutique, cette infection peut nécessiter une éviscération ou énucléation du globe oculaire (Callegan, *et al.*, 2007). *B. cereus* peut aussi être responsable d'infections du système nerveux central des nouveau-nés prématurés (Hilliard, *et al.*, 2003), de pneumonies (Miller, *et al.*, 1997), d'endocardites (Steen, *et al.*, 1992), d'infections cutanées de type gangrène gazeuse (Fitzpatrick, *et al.*, 1979) et de septicémies (Bottone, 2010).

1.5 Le milieu digestif

La survie et la croissance dans le tractus digestif (**Figure 5a**) de *B. cereus s.s.* sont conditionnées par les variations de pH (**Figure 5b**), de potentiel d'oxydo-réduction, de pression partielle d'oxygène mais aussi par les sels biliaires et la flore intestinale (Walter & Ley, 2011).

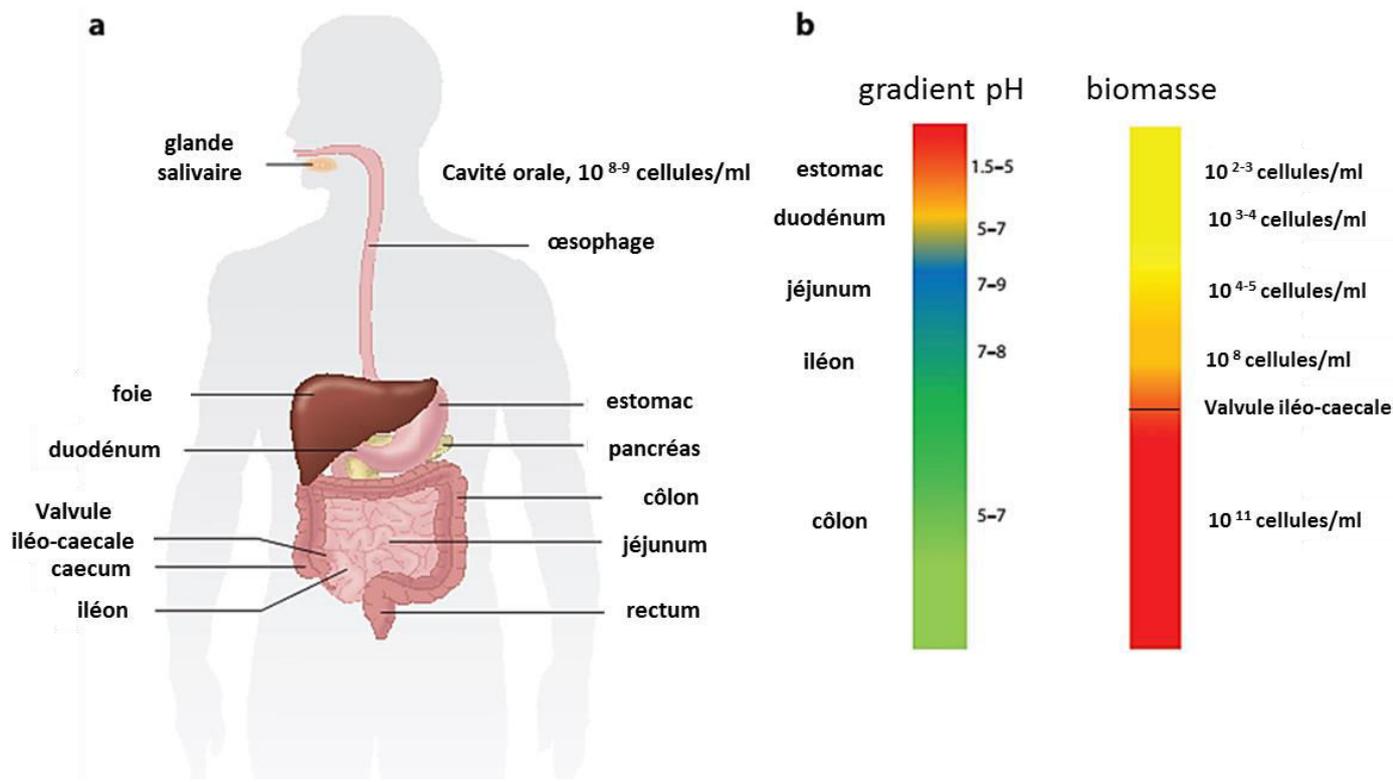


Figure 5: Caractéristiques des principaux habitats du tractus gastro-intestinal humain et du microbiote. D'après (Walter & Ley, 2011)

(a) Les principales sections du tube digestif

(b) les barres indiquent les niveaux de pH (à gauche) et la concentration de la biomasse microbienne (à droite)

1.5.1 Le pH

Chez une personne adulte et en bonne santé, le pH gastrique à jeun est de 1,3 (1,1-1,6). Après un repas, le pH gastrique augmente puis diminue passant de 6,2 (5,8 à 6,7) à 2,0 en 4 heures. Au niveau du duodénum, le pH est proche de la neutralité aussi bien avant qu'après le repas : 6.5 (6,2 à 6,7) (Russell, *et al.*, 1993). Cependant, il existe des variations importantes du pH gastrique selon l'âge des consommateurs. Les bébés prématurés ont un estomac moins acide ($\text{pH} > 4$) et sont plus sensibles aux infections entériques (Carrion & Egan, 1990). De même, les personnes âgées ont une faible acidité gastrique (pH de 6,6) et sont sujettes à des infections bactériennes au niveau de l'estomac et des intestins (Husebye, *et al.*, 1992, Hu, *et al.*, 2012). D'après une étude chez plusieurs espèces de Vertébrés dont l'homme, le pH gastrique constituerait une barrière biologique pour prévenir la colonisation du tractus digestif par des pathogènes d'origine alimentaire (Beasley, *et al.*, 2015).

Les spores de *B. cereus* sont plus résistantes aux faibles valeurs du pH gastrique que les cellules végétatives (Clavel, *et al.*, 2004, Ceuppens, *et al.*, 2012). De plus, il a été démontré que le taux de survie des cellules végétatives dépendait de leur phase de croissance, de la souche et de l'âge du consommateur (Wijnands, *et al.*, 2009).

I.5.2 Les sels biliaires

Une fois que les bactéries ont franchi l'estomac, elles rencontrent un autre composé antimicrobien, les sels biliaires. La concentration en sels biliaires dans l'intestin grêle n'est pas constante. Elle varie entre 0,2 et 2% (w/v) en fonction des individus, de la composition et quantité de nourriture ingérée et d'autres paramètres (Kristoffersen, *et al.*, 2007). La fonction principale de la bile est de faciliter la décomposition et l'absorption des lipides. Les constituants de la bile sont également importants pour le système immunitaire en raison de leur forte activité antimicrobienne (Begley, *et al.*, 2005). La bile peut aussi engendrer un stress oxydant chez les bactéries par la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (Lechner, *et al.*, 2002, Begley, *et al.*, 2005). D'après les résultats obtenus par Kristoffersen *et al.* (Kristoffersen, *et al.*, 2007), les spores de *B. cereus* ne sont pas affectés par l'exposition à un milieu contenant 0,1 g/L de sels biliaires alors que ce milieu dilué au 1/100^e inhibe la croissance des cellules végétatives. Des études ont également montré que certains constituants alimentaires (par exemple les phospholipides) peuvent se lier aux sels biliaires et inhiber leur activité antibactérienne (Berthold-Pluta, *et al.*, 2015).

I.5.3 La quantité d'oxygène

La quantité d'oxygène influence la répartition spatiale des bactéries dans le tractus digestif (Swidsinski, *et al.*, 2008). Il existe plusieurs microenvironnements dans l'intestin entre les régions proximales et distales, et plus localement entre la lumière et les surfaces intestinales (Flint, *et al.*, 2012). Ces microenvironnements se caractérisent par un gradient radial d'oxygène depuis les cellules épithéliales ($pO_2 < 40,0$ mm Hg) vers la lumière intestinale majoritairement anaérobie ($pO_2 < 0,5$ mm Hg) (Albenberg, *et al.*, 2014). La forte vascularisation des cellules épithéliales entraîne une diffusion passive de l'oxygène depuis le sang oxygéné vers le mucus recouvrant la paroi intestinale. L'ordre de grandeur de cette zone oxygénée est de 70 μ m sur des anses intestinales ligaturées de lapin (Marteyn, *et al.*, 2010). Cet oxygène est rapidement consommé par des bactéries anaérobies facultatives du microbiote tel que *Akkermansia muciniphila* (Flint, *et al.*, 2012). La grande majorité du microbiote intestinale est anaérobie stricte et ne parvient pas à se développer à une $pO_2 > 3,8$ mm Hg (Baughn & Malamy, 2004).

Les conditions d'oxygénation affectent la croissance, la toxigenèse et le métabolisme des souches diarrhéiques de *B. cereus*. La bactérie produit plus de toxines Hbl et Nhe en anaérobiose qu'en aérobie (Duport, *et al.*, 2004, Zigha, *et al.*, 2006). Dans le milieu intestinal correspondant à un environnement strictement anaérobie, *B. cereus* met en place un métabolisme fermentaire de type acides mixtes (cf. I.8).

I.5.4 Le potentiel d'oxydo-réduction

En plus d'être anaérobie, la lumière intestinale est un milieu réducteur avec un bas potentiel d'oxydo-réduction (POR) de l'ordre de -150 mV au niveau de l'intestin grêle (Moriarty-Craige & Jones, 2004). Le maintien du bas POR dans l'intestin est lié aux couples oxydants-réducteurs cystéine/cystine ($E_h = -145$ mV) et glutathion oxydé/glutathion réduit (-250 mV) (Jones, *et al.*, 2004).

I.5.5 La microflore intestinale

Les micro-organismes résident tout le long du tractus gastro-intestinal humain et sont adaptés à des conditions particulières telles que le pH gastrique extrêmement faible ou la présence de substances bactéricides comme les sels biliaires dans l'intestin (Walter & Ley, 2011). Les microflores intestinales autochtones ont des activités métaboliques bénéfiques pour l'hôte mais offrent également une protection en formant une « barrière » contre la microflore allochtone (exogène), y compris les micro-organismes pathogènes. Les bactéries lactiques, principalement celles appartenant au genre *Lactobacillus*, empêchent la croissance d'agents pathogènes grâce à la production d'acide lactique et de bactériocines. Des études ont confirmé l'influence inhibitrice de bactéries lactiques sur la croissance de cellules végétatives et la germination de spores de *B. cereus* (Rosslund, *et al.*, 2003, Rosslund, *et al.*, 2005). L'effet bactériostatique de la microflore intestinale endogène résulte aussi de l'occupation du milieu intestinal. De cette manière, la microflore prive les agents pathogènes de conditions favorables à leur croissance.

I.6 Les facteurs de pathogénicité

I.6.1 Le céréulide

Le céréulide est un peptide cyclique composé de 3 répétitions de 4 acides aminés et d'oxacides [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]₃ liés successivement par des liaisons esters et amides avec une masse moléculaire de 1165 Da et un point isoélectrique (pI) prédit de 5,52 (Figure 6).

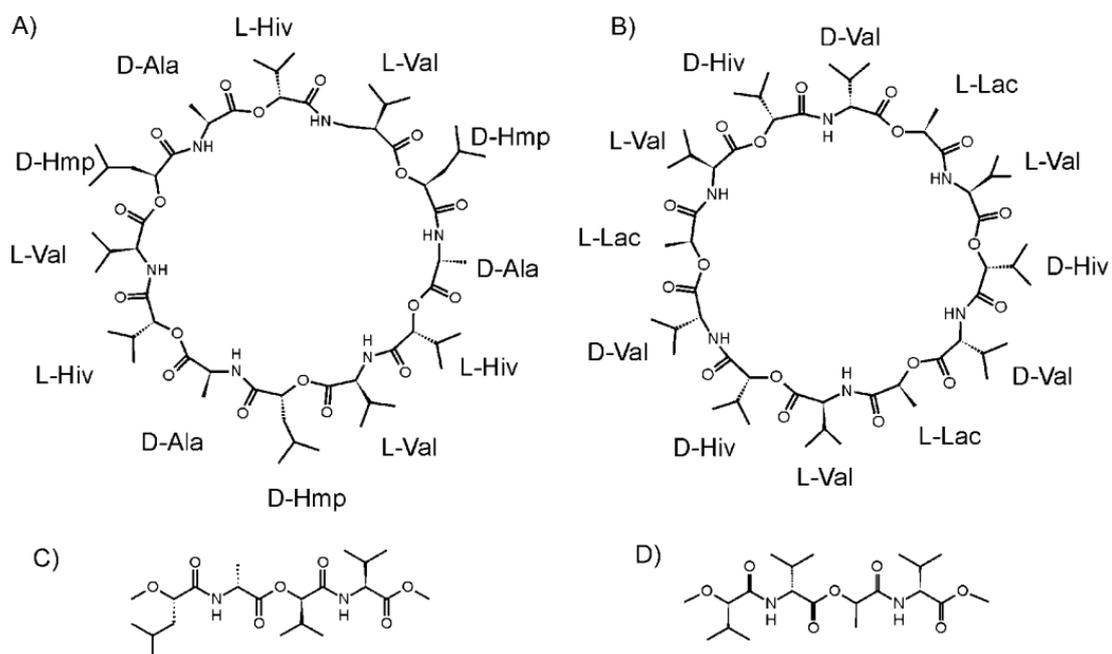


Figure 6: Schéma représentant la structure chimique de la céréulide provenant de *B. cereus* (A), de la valinomycine de *Streptomyces tsusimaensis* (B) et de leurs motifs répétés (C et D) (Kroten, *et al.*, 2010)

Ala : alanine, Val : valine, Hmp : acide α -hydroxy-4-ethylpentanoïque, Hiv : acide hydroxy-isovalérique, L et D indique les énantiomères.

La structure du céréulide est proche de la valinomycine, un dodécadepsipeptide synthétisé par certaines espèces appartenant au genre *Streptomyces* (Kroten, *et al.*, 2010). Cette toxine est résistante à la chaleur, au pH [2-12], à la protéolyse par la trypsine et la pepsine et n'est pas antigénique. La synthèse peptidique du céréulide est réalisée par des enzymes de synthèse des peptides non ribosomiques, aussi appelées NRPS (non-ribosomal peptides synthetase). Les NRPS du céréulide sont codés par un opéron de 24 kpb qui est localisé sur un plasmide similaire au plasmide PXO1 de *B. anthracis*, nommé pBCE. Cet opéron est composé de 7 gènes qui codent pour une hydrolase potentielle (*cesH*), une 4'-phosphopantetheinyl transférase (*cesP*), une thioestérase de type II (*cesT*), deux modules NRPS (*cesA* et *cesB*) et deux transporteurs ABC potentiels (*cesC* et *cesD*) (**Figure 7**) (Dommel, *et al.*, 2011).

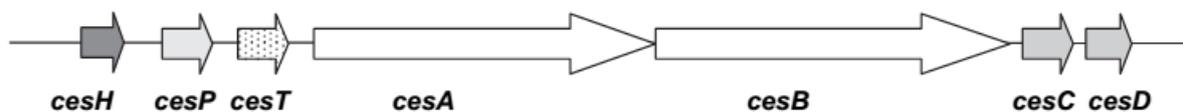


Figure 7: Représentation schématique des gènes *cesHPTCD* (Dommel, *et al.*, 2011)

1.6.2 Les entérotoxines

1.6.2.1 Les cytotoxines tripartites formant des pores

L'hémolysine BL (Hbl) est composée de deux sous-unités lytiques L₂ et L₁ codées par les gènes *hblC* et *hblD* respectivement et d'une protéine de liaison HblB codée par *hblA* permettant la fixation de l'ensemble sur leurs cibles (Beecher & Macmillan, 1991). C'est une toxine hémolytique et cytotoxique qui possède une activité dermonécrotique et entraîne une perméabilisation vasculaire. Elle peut également entraîner une accumulation de liquide sur des anses d'iléon de lapin ligaturé (Beecher, *et al.*, 1995). De plus, Hbl est probablement le facteur de virulence le plus important des endophtalmies traumatiques en raison de sa toxicité élevée sur le tissu rétinien à la fois *in vitro* et *in vivo* (Beecher, *et al.*, 1995, Jessberger, *et al.*, 2014). Un ratio de 1:1:1 des trois composants est nécessaire pour une activité biologique maximale et la formation de pores transmembranaires (Schoeni & Wong, 1999, Jessberger, *et al.*, 2015). Cependant, les trois composants se lient aux cellules cibles de façon indépendante et alors constituerait un complexe d'attaque membranaire, ce qui entraîne une lyse osmotique colloïde (Wong, 1997). Avant 2010, le gène *hblB* situé immédiatement en aval de *hblCDA* était considéré comme un pseudogène (similaire à *hblA*). Des travaux menés au laboratoire ont démontré que le gène *hblB* était transcrit, traduit et exporté à un niveau détectable dans l'exoprotéome de *B. cereus* en phase exponentielle de croissance (Clair, *et al.*, 2010). *hblB* est transcrit indépendamment du polycistron *hblCDA* qui est régulé par le facteur transcriptionnel PlcR (Gohar, *et al.*, 2008). Malgré une faible homologie de séquence des composants de Hbl, le composant B codé par *hblA* montre une forte similarité structurale avec les entérotoxines hémolytiques HlyE, ClyA, et SheA d'*Escherichia coli*, *Salmonella enterica* et *Shigella flexneri* respectivement (Madegowda, *et al.*, 2008). Il a été suggéré que les composants de Hbl sont sécrétés par la cellule bactérienne à l'aide du dispositif d'exportation flagellaire (Ghelardi, *et al.*, 2002). Plus récemment, des études ont révélées que la sécrétion

des composants Hbl n'était pas dépendante du dispositif d'exportation flagellaire mais que ces composants étaient sécrétés par la voie de sécrétion générale (Sec) tout comme Nhe et CytK (Fagerlund, *et al.*, 2010).

L'entérotoxine Non hémolytique (Nhe) est une toxine tripartite comme Hbl. Les trois composants de Nhe, NheA, NheB et NheC sont homologues entre eux mais aussi avec les composants de Hbl. Le pourcentage d'identité varie entre 18 et 44% (**Figure 8**).

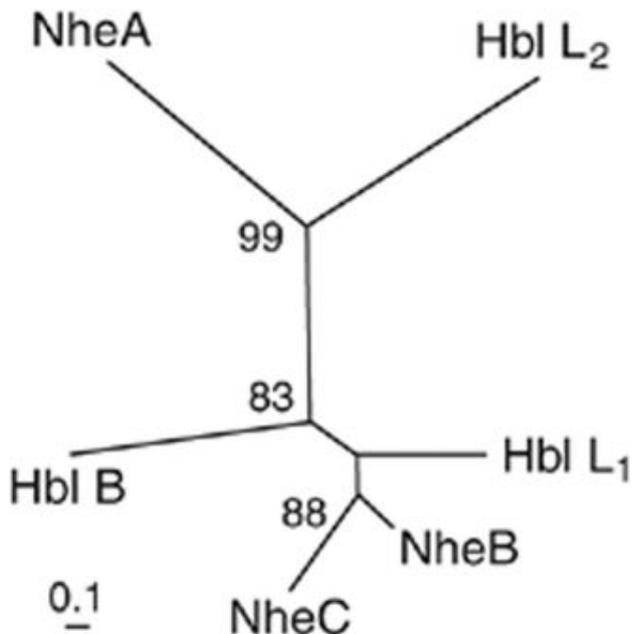


Figure 8: Dendrogramme réalisé à partir des séquences protéiques des 6 composants Hbl et Nhe de *B. cereus* ATCC 14579 (Stenfors Arnesen, *et al.*, 2008)

La barre d'échelle indique une divergence de 10%. Les valeurs de bootstrap sont indiquées et ont été générées après 1000 permutations.

Nhe a été caractérisée pour la première fois chez la souche NVH 0075/95 de *B. cereus* dépourvue des entérotoxines Hbl et CytK, après une toxi-infection alimentaire confirmée (TIAC) chez 152 personnes en Norvège en 1995 (Lund & Granum, 1996). L'entérotoxine Nhe possède une activité cytotoxique en formant des pores transmembranaires à hélices α sur les cellules épithéliales des lignées cellulaires HeLa et CaCo2. L'activité cytotoxique est maximale sur les cellules CaCo2 lorsque le ratio molaire est de 10:10:1 pour NheA, NheB et NheC respectivement (Lindback, *et al.*, 2004). Dans la plupart des souches de *B. cereus*, la région intergénique entre *nheB* et *nheC* contient une séquence inversée répétée provoquant la formation d'une structure secondaire qui assure une diminution de la traduction de l'ARNm *nheC* (**Figure 9**) (Stenfors Arnesen, *et al.*, 2008). Bien que décrite comme étant non hémolytique sur des plaques de géloses au sang de bovins, la toxine Nhe a une activité hémolytique sur les érythrocytes de plusieurs espèces de mammifères en milieu liquide (Fagerlund, *et al.*, 2008).

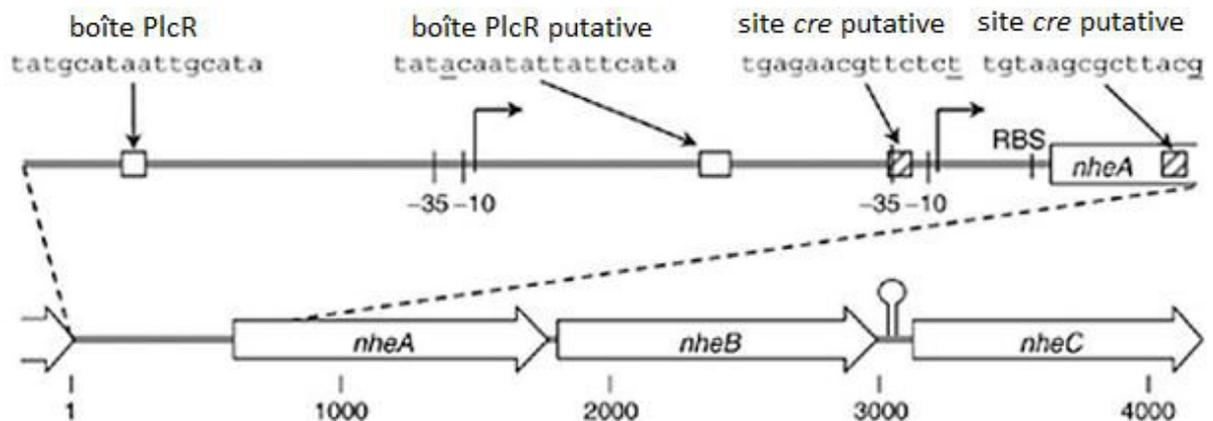


Figure 9: Représentation schématique de l'opéron *nheABC* avec les promoteurs et sites de régulation chez *B. cereus* ATCC 14579 (Stenfors Arnesen, *et al.*, 2008)

Un atténuateur a été identifié entre *nheB* et *nheC*. Il est représenté par la structure en tige-boucle qu'il forme. Il est responsable du faible ratio de la transcription de *nheC* par rapport à *nheA* et *nheB*.

En 2013, la cristallographie au rayon X de la toxine NheA a révélé sa structure. La toxine NheA forme des pores à hélices β plutôt que α (Ganash, *et al.*, 2013).

1.6.2.2 Les cytotoxines formant des pores de la famille des tonneaux β

Un tonneau β (« β barrel » en anglais) est une structure protéique constituée de feuilletts β en torsion avec un arrangement antiparallèle (le 1^{er} brin lié au dernier par liaison hydrogène). Chez *B. cereus* s.s., certaines souches produisent deux toxines capables de former des pores transmembranaires au niveau des membranes plasmiques des cellules épithéliales de l'intestin : CytK et l'hémolysine II, HlyII. Ces deux cytotoxines peuvent former dans des bicouches lipidiques des canaux sélectifs aux anions avec des diamètres fonctionnels de 7 Å (Hardy, *et al.*, 2001, Andreeva, *et al.*, 2007).

La cytotoxine CytK a été identifiée pour la 1^{ère} fois dans la souche NVH 391/98 de *B. cereus* après une TIA dans une maison de retraite française en 1998. Plusieurs personnes ont développé une diarrhée sanglante et trois personnes âgées sont décédés (Lund, *et al.*, 2000). CytK est une protéine de 34 kDa codée par le gène *cytK*. Elle possède une activité cytotoxique et nécrotique pour l'épithélium intestinal (Hardy, *et al.*, 2001). La séquence peptidique de CytK est homologue à l' α -hémolysine, la gamma-hémolysine et la leucocidine de *S. aureus* (Vandenesch, *et al.*, 2012).

L'hémolysine II, la 2^e toxine appartenant à la famille des « β barrel » a été caractérisée pour la 1^{ère} fois par Sinev (Sinev, *et al.*, 1993). C'est une toxine de 42,3 kDa codée par *hem2* et dont la partie C-terminale n'est pas nécessaire pour la formation de pores ou l'activité hémolytique (Baida, *et al.*, 1999). Il a été démontré que HlyII pouvait provoquer l'apoptose des macrophages en formant des pores (Tran, *et al.*, 2011). L'expression de cette toxine est indépendante du régulateur transcriptionnel pléiotrope PlcR. Elle est contrôlée par deux

régulateurs négatifs, HlyIIR et Fur en phase exponentielle de croissance (Budarina, *et al.*, 2004, Sineva, *et al.*, 2012). Le régulateur HlyIIR est activé par le glucose-6-phosphate (Guillemet, *et al.*, 2013) alors que le régulateur Fur est activé par le fer (Sineva, *et al.*, 2012) pour réprimer l'expression du gène *hlyII*. Par conséquent, tant que le glucose et le fer sont abondants dans le milieu environnant, *hlyII* ne sera pas exprimé (**Figure 10**) (Ramarao & Sanchis, 2013).

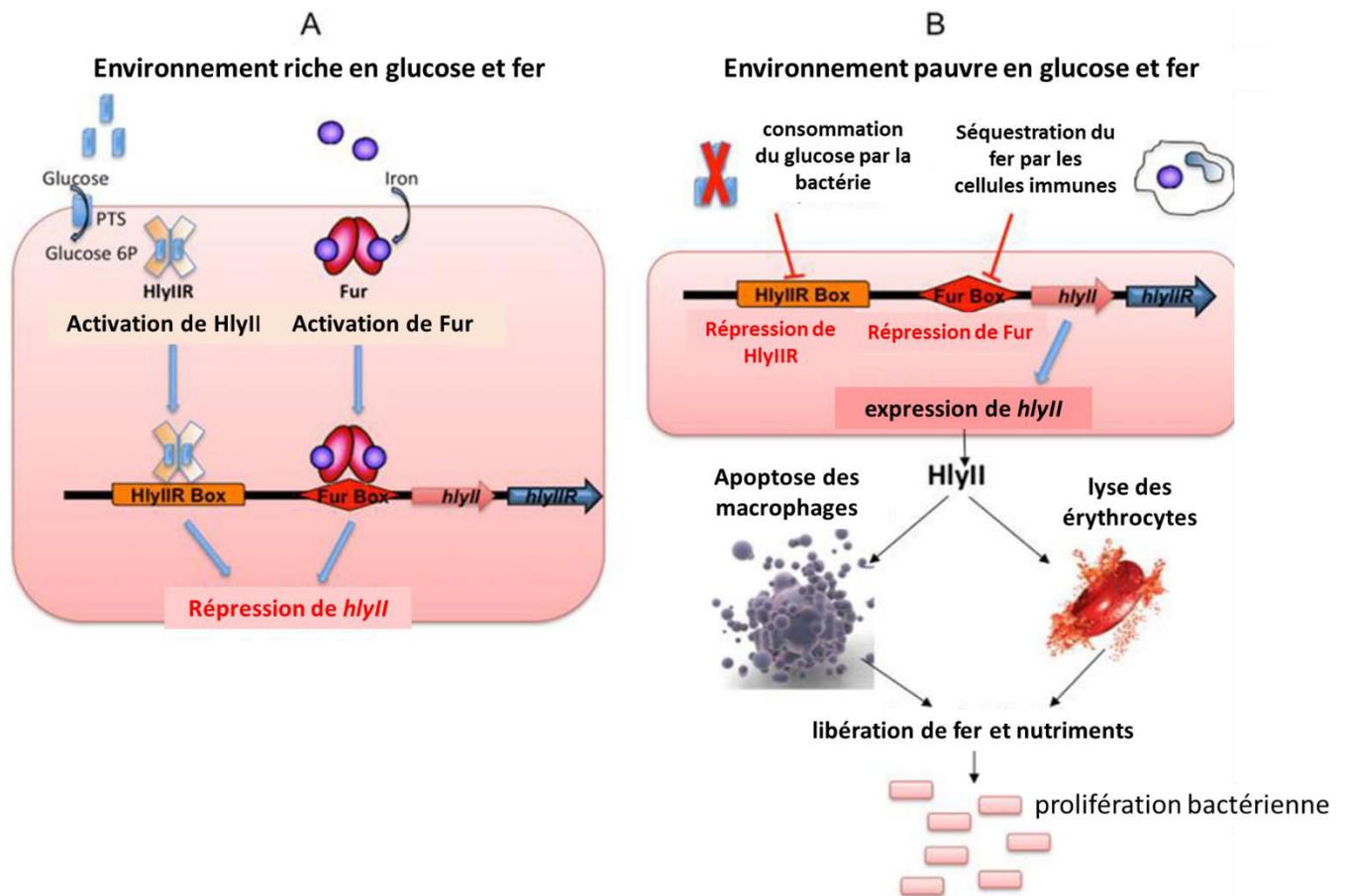


Figure 10: Représentation schématique des mécanismes de régulations de l'expression de *hlyII* en présence (A) et absence (B) de fer et glucose (Ramarao & Sanchis, 2013)

1.6.2.3 La céréolysine O ou hémolysine I, HlyI

HlyI est une toxine faisant partie de la famille des cytolysines dépendantes du cholestérol. Cette toxine de 52 kDa codée par le gène *clo* a été décrite pour la 1^{ère} fois en 1967 (Bernheimer & Grushoff, 1967). Elle se dénomme céréolysine O ou HlyI chez *B. cereus*, thuringiolysine O chez *B. thuringiensis* et anthrolyisine O chez *B. anthracis* (Kreft, *et al.*, 1983). Ces toxines se fixent au cholestérol des membranes plasmiques et forment de larges pores supérieurs à 30 nm de diamètre (Ramarao & Sanchis, 2013).

1.6.2.4 L'hémolysine III, HlyIII

HlyIII est une toxine d'une masse de 24,4 kDa codée par *hem3* (Baida & Kuzmin, 1995). Elle forme des pores d'un diamètre de 3,0-3,5 nm et son activité est thermo-dépendante pour la fixation et la formation de pores transmembranaires sur les érythrocytes. La lyse des

érythrocytes qui s'ensuit est quant à elle indépendante de la température (Baida & Kuzmin, 1996).

I.6.2.5 L'entérotoxine EntFM ou CwpFM (Cell wall peptidase FM)

EntFM est une toxine de 45 kDa codée par *entFM* identifiée pour la 1^{ère} fois chez la souche FM1 de *B. cereus* (Asano, *et al.*, 1997). EntFM possède un domaine NlpC/P60 (New lipoprotein C / 60 kDa extracellular protein) et un domaine caractéristique des peptidases de la paroi cellulaire. Cette protéine est impliquée dans la morphologie de la bactérie, la mobilité, l'adhésion aux cellules épithéliales de l'intestin, la formation de biofilm et la vacuolisation des macrophages (Tran, *et al.*, 2010). Jusqu'à présent, aucune activité entérotoxique n'a été démontrée pour cette protéine. De plus, les données publiées concernant la cytotoxicité d'EntFM sont limitées. De ce fait, EntFM a été renommé CwpFM (Tran, *et al.*, 2010).

I.6.3 Les autres facteurs de virulence

I.6.3.1 Les protéines Ent identifiées par protéomique

Les études menées au laboratoire ont permis d'identifier dans l'exoprotéome de la souche ATT14579 de *B. cereus* 3 protéines (GI: 30018972, GI: 30021068 et GI: 30023271) nommées EntA, EntB et EntC (**Figure 11**) ayant des domaines en commun : deux domaines SH₃ (pfam08239) au niveau N-terminal et un domaine 3D (pfam06725) au niveau C-terminal. Ces domaines sont présents dans certaines entérotoxines (Clair, *et al.*, 2010). Une quatrième protéine, présentant de fortes homologies avec EntA, B et C a été identifiée par protéogénomique. Cette protéine a été nommée EntD et comme EntA, EntB et EntC, possède deux domaines SH₃ et un domaine 3D (**Figure 12**). La construction d'un mutant a permis de mettre en évidence son implication dans la croissance, la mobilité, la formation de biofilm et la cytotoxicité de *B. cereus* (Omer, *et al.*, 2015).

1.6.3.2 Les phospholipases

En plus des toxines, le pouvoir pathogène de *B. cereus* relève aussi de sa capacité à coloniser l'hôte, à adhérer à l'épithélium intestinal, produire des enzymes de dégradation spécifiques des tissus et contourner le système immunitaire de l'hôte. Plusieurs protéines autres que les toxines ont été décrites comme jouant un rôle dans la pathogénicité de *B. cereus* e.g. les phospholipases, les métalloprotéases, les protéines flagellaires et bien d'autres. Il existe trois types de phospholipases (PLC) (Hondal, *et al.*, 1998, Martin, *et al.*, 2000):

- SM-PLC ou SMase qui clive la sphingomyéline (SM)
- PC-PLC qui clive la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine
- PI-PLC qui clive la phosphatidylinositol et glycolipides dérivés.

Contrairement aux hémolysines qui provoquent la lyse des érythrocytes par la formation de pores, les PLCs provoquent la lyse des cellules par leur activité enzymatique. Cette réaction enzymatique implique l'hydrolyse entre le glycérol et la tête polaire hydrophile. Les phospholipases PC-PLC et SMase forment un complexe, la céréolysine AB. Ce complexe possède une activité hémolytique e.g. sur les érythrocytes humains (Gilmore, *et al.*, 1989).

1.6.3.3 Les métalloprotéases et protéines flagellaires

Les métalloprotéases sont des facteurs de virulence importants et possèdent un large éventail d'action. Elles peuvent activer des toxines, accélérer l'adhésion des cellules bactériennes aux cellules épithéliales en digérant le mucus, induire une perméabilité vasculaire, avoir une activité nécrotique, cytotoxique ou perturber la signalisation du système immunitaire en agissant sur les cytokines (Miyoshi & Shinoda, 2000).

Les protéines flagellaires participent aussi à la virulence de la bactérie en facilitant la colonisation de l'hôte. Elles permettent l'adhésion de la bactérie aux cellules épithéliales et la mise en place d'une interaction stable (Ramarao & Lereclus, 2006).

1.7 Régulation des facteurs de virulence

1.7.1 Le régulateur PlcR

PlcR est un facteur transcriptionnel pléiotrope activant la transcription de 45 gènes, notamment des facteurs de virulence importants comme Hbl, Nhe, CytK et les hémolysines (Agaisse, *et al.*, 1999, Gohar, *et al.*, 2008). PlcR active la transcription de ses gènes cibles en se fixant à une séquence pseudo palindromique (TATGnAnnnnTnCATA), la boîte PlcR. Cette séquence consensus est située à différentes distances en amont du site de début de transcription (Agaisse, *et al.*, 1999). L'inactivation du gène *plcR* cause une diminution drastique de la pathogénicité de *B. cereus* chez la souris (Salamitou, *et al.*, 2000). En aval du gène *plcR*, un ORF codant pour un peptide de 48 acides aminés est positivement régulé par PlcR. Ce peptide, PapR (peptide activating PlcR) possède une séquence signal qui est clivée lors de sa sécrétion. Au niveau extracellulaire, le peptide subit des phénomènes de maturation dont le produit principal est un heptapeptide (ADLPFEF), correspondant à l'extrémité carboxy-terminale. Les heptapeptides ensuite s'assemble sous la forme de pentamère avant d'être

importés dans la cellule par des systèmes de perméation d'oligopeptides (Opp-A,-B,-D, et -E) essentiels pour la régulation de PlcR (Gominet, *et al.*, 2001, Slamti & Lereclus, 2002). Pendant la phase exponentielle de croissance, les faibles concentrations de PapR ne permettent pas l'activation des régulons du PlcR (Lereclus, *et al.*, 1996). C'est seulement en entrée de phase stationnaire que l'augmentation de la concentration extracellulaire de PapR conduit à l'activation de PlcR (**Figure 13**) (Grenha, *et al.*, 2013).

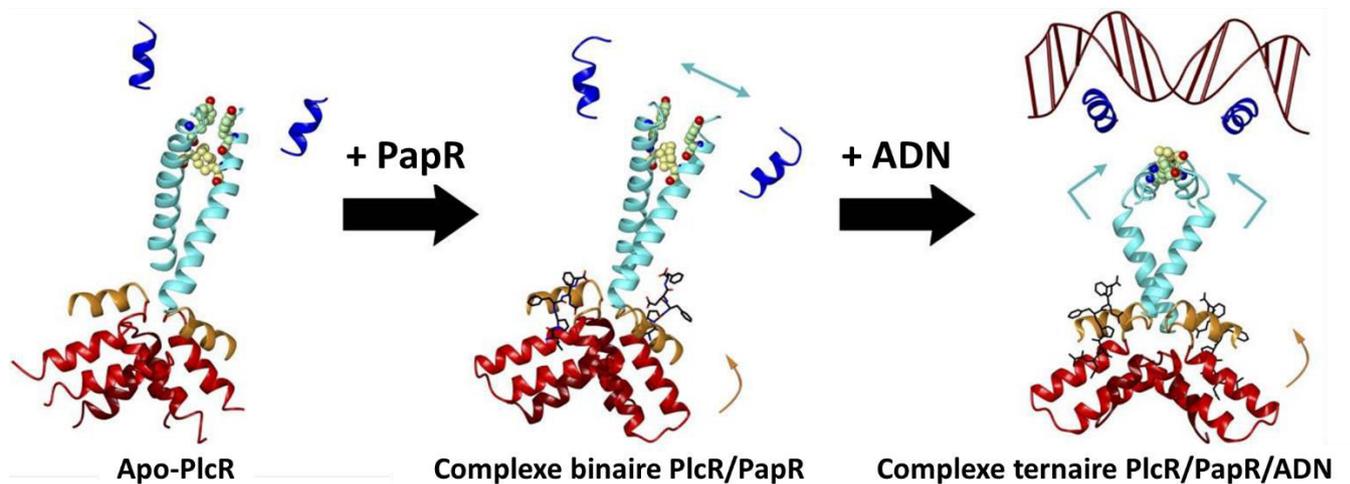


Figure 13: Mécanismes d'activation du PlcR par PapR (Grenha, *et al.*, 2013)

1.7.2 Le système ResD/ResE

Pour s'adapter aux différents environnements rencontrés, les bactéries possèdent des voies de signalisation impliquant des systèmes à deux composants (TCS) (Galperin, 2005). Ce système ubiquitaire se compose d'une histidine kinase (HK) et d'un régulateur de réponse (RR), permettant la régulation de nombreux gènes (Kojetin, *et al.*, 2007). Les TCS sont impliqués dans des mécanismes d'adaptations aux conditions environnementales comme les milieux acides et l'anaérobiose (Cui, *et al.*, 2012). Ils contrôlent aussi les interactions hôtes-agents pathogènes et sont également impliqués dans l'expression des facteurs de virulence (Hall, *et al.*, 2015).

Chez *B. cereus*, un système à deux composants a été identifié comme étant impliqué dans l'adaptation à l'anaérobiose et la production de toxines. Il s'agit du système ResDE (Duport, *et al.*, 2006). Il se compose d'un senseur histidine kinase transmembranaire (ResE) et d'un régulateur de réponse cytoplasmique (ResD). Comme la majorité des systèmes à deux composants, ResE possède à son extrémité N-terminale un domaine senseur périplasmique et en C-terminale, un domaine auto-kinase et de transfert de phosphate cytoplasmique. ResD quant à lui possède un domaine receveur N-terminal et un domaine effecteur C-terminal. Le domaine senseur de ResE perçoit la limitation en oxygène ce qui entraîne une autophosphorylation sur un résidu histidine. Le groupement phosphate peut ensuite être transféré à un résidu acide aspartique de ResD qui est un régulateur transcriptionnel (Eselin, *et al.*, 2009). Ce système à deux composants est autorégulé grâce à la double fonction de ResE qui peut à la fois donner un groupement phosphate à ResD mais également le retirer grâce à son activité phosphatase. Le niveau de phosphorylation de ResD est déterminé par l'équilibre

entre les deux activités possédées par ResE modulant ainsi son activité (Duport, *et al.*, 2006). La phosphorylation de ResD lui confère une plus grande affinité pour les gènes des entérotoxines *hbl*, *nhe* et également pour les gènes des facteurs transcriptionnels PlcR, Fnr et ResDE (Eselin, *et al.*, 2009). La mutation du senseur ResE entraîne une diminution à la fois de la vitesse de croissance et de la biomasse en anaérobiose à bas POR. De plus, cette mutation entraîne également une diminution de l'expression des entérotoxines en anaérobiose à haut POR et particulièrement à bas POR (Duport, *et al.*, 2006).

1.7.3 Le régulateur Fnr

La protéine Fnr fait partie de la famille des régulateurs transcriptionnels Crp/Fnr (cAMP Receptor Protein/Fumarate Nitrate reductase). Chez le genre *Bacillus*, ces activateurs transcriptionnels régulent un grand nombre de gènes en réponse à l'absence de glucose pour CRP et d'oxygène pour Fnr (Korner, *et al.*, 2003). La protéine Fnr possède deux domaines :

- un domaine en C-terminal constitué d'une séquence palindromique avec une structure en hélice-tour-hélice impliqué dans la fixation aux régions promotrices de l'ADN
- un domaine senseur redox en N-terminal constitué de 4 résidus cystéines dont 3 résidus sont impliqués dans la constitution d'un centre fer-soufre $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ en anaérobiose (Reents, *et al.*, 2006)

Il peut y avoir deux formes de la protéine Fnr: une forme où la protéine Fnr ne possède pas de centre fer-soufre (forme apo), et une forme correspondant à l'homodimère ou oligomère de Fnr/centre fer-soufre (forme holo) en anaérobiose. Lors du passage de l'anaérobiose à l'aérobiose, le centre fer-soufre de Fnr subit des oxydations et se dissocie de l'homodimère perdant ainsi son affinité pour les promoteurs (**Figure 14**) (Crack, *et al.*, 2004, Esbelin, *et al.*, 2012, Antelmann, 2015).

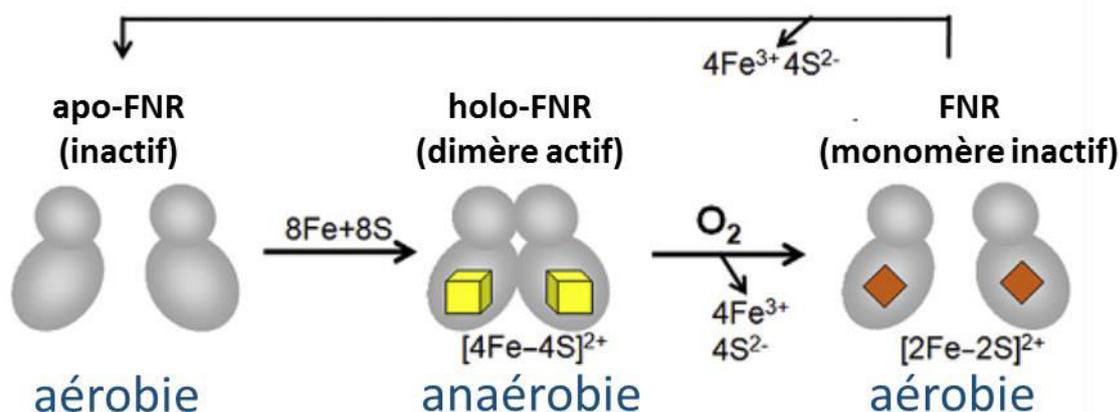


Figure 14: Influence des conditions d'oxygénation sur Fnr et son centre fer-soufre (Esbelin, *et al.*, 2012, Antelmann, 2015)

Chez *B. cereus*, la protéine Fnr est beaucoup plus exprimée en aérobiose qu'en anaérobiose. La suppression du gène *fnr* entraîne une incapacité de la bactérie à se développer en anaérobiose (Zigha, *et al.*, 2007). En aérobiose, la protéine Fnr est produite sous la forme

d'apoprotéine. Elle n'est capable de se fixer sur l'ADN que sous sa forme monomérique. De plus, son état d'oligomérisation est POR dépendant. En anaérobiose, elle peut être présente sous les formes apo- et holo-. Le ratio des deux formes de Fnr en anaérobiose dépend du statut rédox de la cellule. En plus de réguler le métabolisme, la protéine Fnr participe également à l'expression des entérotoxines. Les formes réduites de Fnr sont capable de se fixer en amont des gènes *hbl*, *nhe* et des gènes codant pour les facteurs transcriptionnels PlcR, ResDE et Fnr (Esbelin, *et al.*, 2012). De surcroît, la protéine Fnr est capable de former des complexes avec PlcR et ResDE (Esbelin, *et al.*, 2008, Esbelin, *et al.*, 2012). Dans le cas du complexe Fnr/ResDE, celui-ci augmenterait leur affinité pour des régions promotrices spécifiques (Esbelin, *et al.*, 2009).

1.7.4 Le système OhrA/OhrR

Ohr est une thiol peroxydase (Tpx) qui catalyse la réduction des hydroperoxydes organiques en l'alcool correspondant (Cussioli, *et al.*, 2003). L'activité peroxydase dépend de deux résidus cystéines localisés en N- et C-terminal. La réduction des ROOH entraîne l'oxydation de la cystéine en N-terminale (acide sulfénique –SOH). Cette cystéine oxydée peut ensuite former un pont disulfure avec un autre monomère Ohr (Lesniak, *et al.*, 2002). Le répresseur OhrR est impliqué dans la régulation des facteurs de pathogénicité (Ellison & Miller, 2006). Chez *B. cereus*, l'antioxydant OhrA et le régulateur redox OhrR participent à l'adaptation de la bactérie à des variations de POR et d'oxygénation (Clair, *et al.*, 2013). Les analyses protéomiques des mutants $\Delta ohrR$ et $\Delta ohrA$ ont révélé que ce sont des protéines clés dans l'adaptation aux différentes conditions de POR et d'oxygénation (Clair, *et al.*, 2012). La suppression d'OhrA par mutation entraîne une augmentation significative de la production des toxines en aérobie et une diminution en anaérobiose à bas POR. Chez le mutant $\Delta ohrR$, toutes les toxines et toxines putatives sont plus abondantes peu importe les conditions d'oxygénation et de POR (Clair, *et al.*, 2013). Des études de retard sur gel ont révélé qu'OhrR sous sa forme de dimère non covalent (forme réduite) pouvait se fixer sur les régions promotrices des gènes/opérons *OhrRA* et de toutes les toxines hormis EntFM (**Figure 15**) (Clair, *et al.*, 2013).

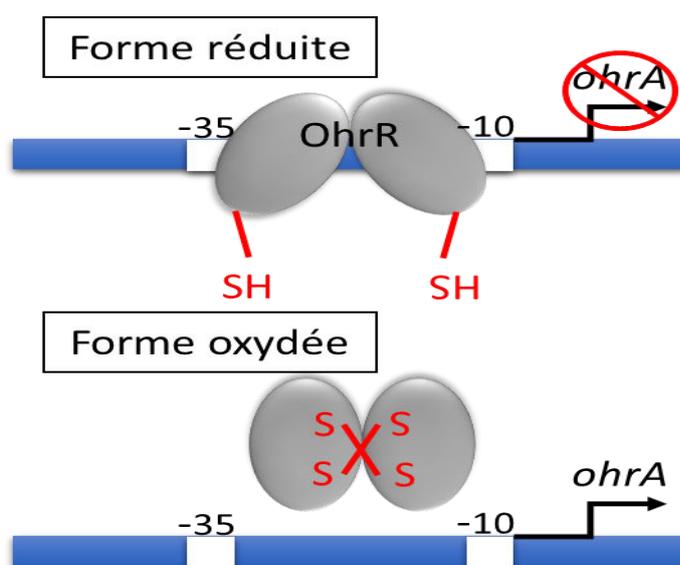


Figure 15: Régulation d'OhrA par OhrR

1.7.5 Le régulateur Rex

Rex est un régulateur transcriptionnel dont l'activité est NADH dépendante. Selon le ratio NADH/NAD⁺, la protéine Rex module l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme fermentaire, la formation de biofilms, et le stress oxydant chez plusieurs espèces de bactéries (Brekasis & Paget, 2003, Schau, *et al.*, 2004, Pagels, *et al.*, 2010, Christensen, *et al.*, 2015). La protéine Rex contient un domaine de liaison à l'ADN en N-terminal, un domaine de dimérisation et un pli Rossmann impliqué dans la fixation au NADH. Rex se fixe sur les régions promotrices des gènes cibles sous forme de dimère lorsqu'il est associé au NAD⁺. L'association de Rex avec le NADH pour lequel le régulateur a plus d'affinité que pour le NAD⁺ annihile la formation du complexe Rex-ADN. L'activité de Rex est donc dépendante du ratio NAD⁺/NADH (Sickmier, *et al.*, 2005, Wang, *et al.*, 2008, McLaughlin, *et al.*, 2010, Laouami, *et al.*, 2014). Chez *B. cereus*, la protéine Rex est impliquée dans le métabolisme à la fois respiratoire et fermentaire, dans les mécanismes de résistance au stress oxydant externe ainsi que dans la toxigenèse (Laouami, *et al.*, 2014). La délétion du gène *rex* entraîne une augmentation du taux de croissance de *B. cereus* en aérobiose sans avoir une modification significative de la biomasse finale. Cette différence est due à une modification du flux carboné vers la voie du lactate permettant de régénérer le NAD⁺ à l'issue de la glycolyse (Laouami, *et al.*, 2014). Le taux de survie aux stress externes est plus élevé chez le mutant Δrex en aérobiose. En anaérobiose c'est l'inverse, le mutant est plus sensible au peroxyde d'hydrogène. Rex doit probablement moduler la distribution des systèmes antioxydants et également réguler la production de NADPH. En aérobiose, les données protéomiques ont révélé que l'abondance des toxines était plus élevée lorsque Rex est absent. Les expériences de retard sur gel ont révélé que Rex se fixe sur les régions promotrices des gènes *fnr*, *resDE*, *ohrRA*, *nhe*, *entFM* et *hlyI*. Rex régule l'expression à la fois de gènes toxines et de certains régulateurs de toxines (Laouami, *et al.*, 2014).

1.7.5 Le régulateur Fur

Fur est un régulateur transcriptionnel de 17 kDa avec comme cofacteur l'ion ferreux (Fe²⁺) (Sineva, *et al.*, 2012). C'est une protéine dimérique possédant deux domaines: un domaine de liaison à l'ADN avec une structure hélice-tour-hélice à l'extrémité N-terminale et un domaine d'activation riche en histidines permettant la formation de dimères à l'extrémité C-terminale (Harvie, *et al.*, 2005). Avec HlyII, c'est l'un des deux régulateurs transcriptionnels connus du gène *hlyII* (Guillemet, *et al.*, 2013). Lorsque la concentration en ions Fe²⁺ est élevée, Fur se dimérise et le complexe formé avec son cofacteur se lie au niveau d'une boîte de fixation (boîte Fur) située en amont du gène *hlyII*. L'ARN polymérase ne peut plus se fixer au promoteur et le gène *hlyII* n'est pas transcrit. Lorsque le fer n'est pas disponible, *hlyII* est transcrit. De par l'activité hémolytique de HlyII, sa sécrétion dans le milieu intestinal permet la libération de l'hémoglobine et l'utilisation du cation ferreux de l'hème b comme source de fer pour la croissance de *B. cereus* (Sineva, *et al.*, 2012).

I.8 Métabolisme de *B. cereus*

I.8.1 Utilisation des acides aminés et glucides

B. cereus *sl* possède moins de gènes pour le catabolisme des glucides que de gènes pour le métabolisme des acides aminés (**Tableau 3**) (Ivanova, *et al.*, 2003). Par exemple, il y a 6 à 9 gènes codant pour des protéines de la famille LysE (transporteurs des acides aminés) chez le groupe *B. cereus* pour seulement deux chez *B. subtilis*. Il y a 18 à 23 gènes codant pour des transporteurs ABC chez *B. cereus* *sl*, comparé à 7 chez *B. subtilis*. Pour le catabolisme des glucides, il y a 12 gènes chez *B. cereus* ATCC 14579 comparés à 41 gènes chez *B. subtilis*. Ces observations suggèrent que les acides aminés, peptides et protéines constituent une source nutritive préférentielle pour *B. cereus* *sl* (Han, *et al.*, 2006).

Tableau 3: Nombres de gènes impliqués dans l'utilisation des acides aminés et carbohydrates chez *B. cereus* *sl* et *B. subtilis* (Han, *et al.*, 2006)

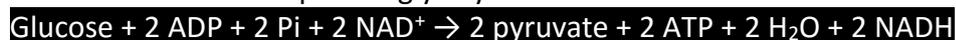
Fonctions	Nombre de gènes				
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. anthracis</i> Ames	<i>B. cereus</i> 14579	<i>B. cereus</i> E33L	<i>B. thuringiensis</i> 97-27
Métabolisme des acides aminés					
Transporteur ABC	7	18	23	20	18
Transporteur d'aa ramifié	4	11	11	13	14
Système d'efflux LysE/RhtB/CadD	2	6	8	9	8
peptidase	30	64	91	92	90
protéase	24	50	49	61	52
catabolisme des aa et amines	34	52	55	55	55
dégradation tyrosine (BA00242)	non	oui	oui	oui	oui
protéase Epr, Bpr, AprX	oui	non	non	non	non
Métabolisme des glucides					
transporteur PTS	25	19	18	23	20
Dégradation des polymères de glucides	41	12	12	23	12
catabolisme du mannose, arabinose, rhamnose	oui	non	non	non	non

« oui » et « non » indiquent respectivement l'absence ou la présence des gènes dans la voie métabolique

I.8.2 Glucose et psychrotrophie

Chez *B. cereus*, le glucose est métabolisé à la fois par la voie d'Embden-Meyerhof (ou glycolyse) et par la voie des pentoses phosphates. Le choix relatif entre ces deux voies dépend des exigences ponctuelles de la bactérie en énergie métabolique (ATP) et en précurseurs biosynthétiques (NADPH et ribose 5-phosphate).

Le bilan des réactions pour la glycolyse est :



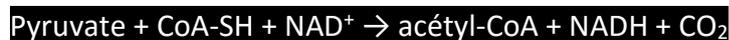
Pour la voie des pentoses phosphates :



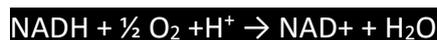
Quand la température de croissance diminue, le glucose est surtout métabolisé par la voie des pentoses phosphates. Quand la température augmente, c'est la voie de la glycolyse qui est privilégiée (Chung, *et al.*, 1976). L'expression de certains gènes de ces voies métaboliques a été vérifiée par RT-PCR et analyses protéomiques chez *B. cereus* (**Figure 16**) (Zigha, *et al.*, 2007, Laouami, *et al.*, 2011).

1.8.3 La respiration aérobie

En aérobiose, le pyruvate subit une décarboxylation et une oxydation combinée. Cette réaction irréversible est catalysée par le complexe multienzymatique du pyruvate déshydrogénase. Ce complexe catalyse la conversion globale du pyruvate en acétyl-CoA et CO₂. Chez *B. cereus*, ce complexe est constitué de trois composants enzymatiques : le pyruvate déshydrogénase (E1), le dihydrolipoamide acétyltransférase (E2) et la lipoamide déshydrogénase (E3) ainsi que cinq coenzymes (thiamine pyrophosphate, acide lipoïque, CoASH, FAD et NAD⁺). L'équation bilan de la décarboxylation oxydative est :



Cette réaction auto catalytique engage le pyruvate vers le cycle des acides tricarboxyliques (TCA). Le cycle TCA est une voie métabolique presque universelle dans laquelle le groupement acétyle de l'acétylcoenzyme A est efficacement oxydé en libérant deux molécules de CO₂. Le groupe acétyle se combine avec l'oxaloacétate pour former du citrate, qui subit des transformations successives en isocitrate, 2-oxoglutarate, succinyl-CoA, succinate, fumarate, malate et de nouveau oxaloacétate complétant ainsi le cycle. Les coenzymes NADH réduits au cours de la glycolyse, décarboxylation oxydative et cycle TCA sont ré-oxydés par la chaîne respiratoire. Les électrons libérés au niveau de la chaîne respiratoire par les NADH déshydrogénases (complexe I) vont être transférés via les enzymes de la chaîne respiratoire vers l'accepteur final d'électrons, le dioxygène. L'équation bilan de cette réaction est :



B. cereus possède plusieurs opérons ou gènes codant pour les NADH déshydrogénases membranaires : *yumB*, *yjlD*, *yutJ* et *yrkE*. En plus des NADH déshydrogénases, la succinate déshydrogénase (complexe II) codée par *sdhABC* et le cytochrome *bc1* (complexe III) codé par *qcrABC* participent également aux transferts des électrons. La suite de ce transfert se déroule au niveau de trois oxydoréductases: le cytochrome *c* oxydase correspondant au complexe IV (*ctaDEF*), le cytochrome *bd* quinol oxydase codée par le gène *cydAB* et pour finir le cytochrome *aa3* quinol oxydase codé par le gène *qoxABCD* (Zigha, *et al.*, 2007). Le transport d'électrons entraîne la formation d'un gradient de protons depuis le cytoplasme vers l'extérieur. Ce gradient génère une force proton motrice, ce qui permet la synthèse d'ATP lors d'une réaction catalysée par l'ATP synthase et la réduction de l'oxygène moléculaire en H₂O. L'oxydation d'une molécule de NADH génère ainsi 3 molécules d'ATP.

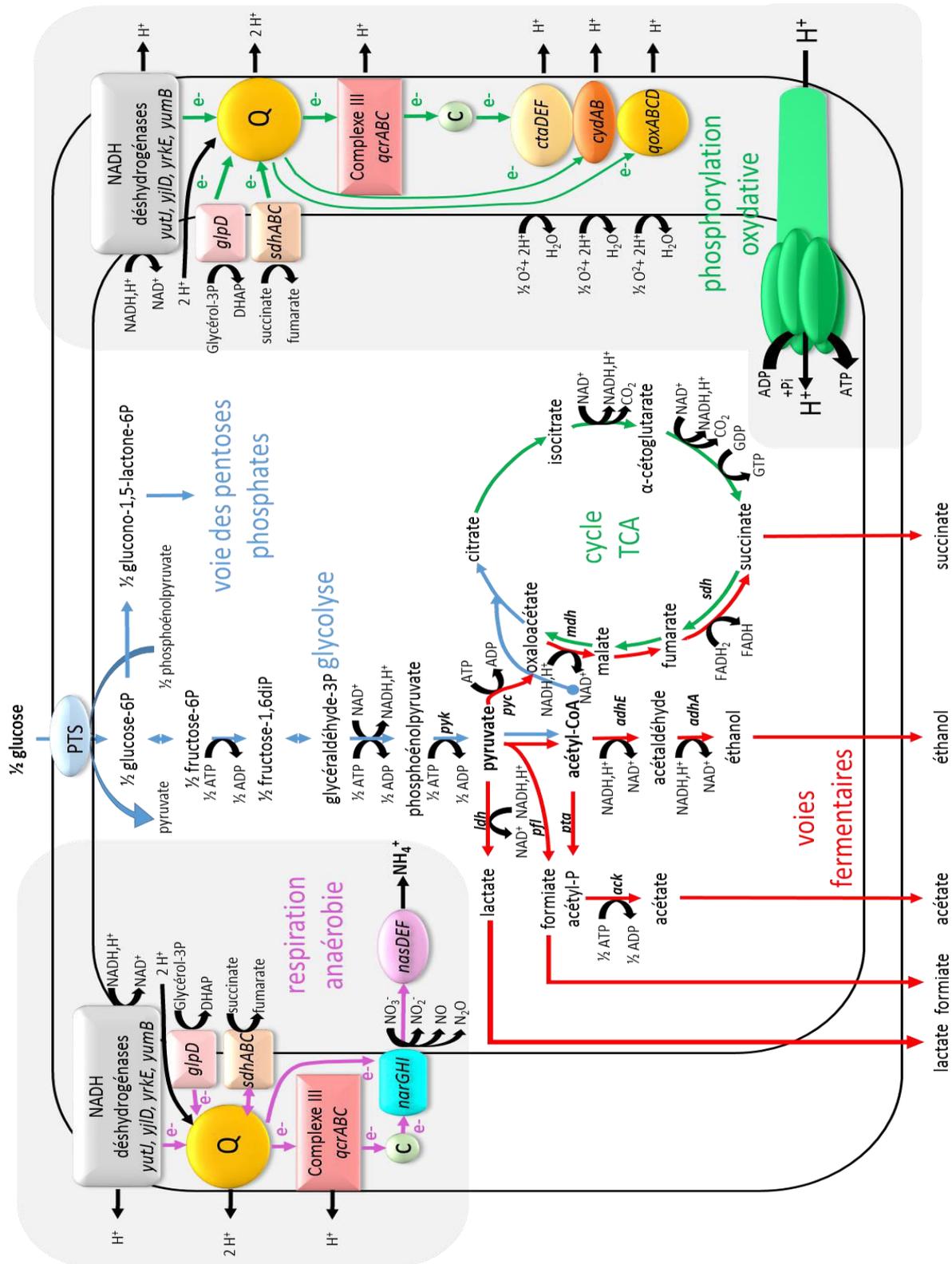


Figure 16: Schéma représentant les voies respiratoires et fermentaires chez *B. cereus* (Zigha, et al., 2007, Messaoudi, et al., 2010)

1.8.4 La respiration anaérobie

En absence d'oxygène, *B. cereus* est capable d'utiliser le nitrate comme accepteur final d'électron. Il possède des gènes codant pour la nitrate réductase (BC2118 à BC2121 : opéron *narGHIJ*) et la nitrite réductase (BC2136 à BC2138 : opéron *nasDEF*) (**Figure 17**). Le nitrate réductase réduit le nitrate en nitrite, et le nitrite réductase réduit le nitrite en ion ammonium. Les complexes nitrates et nitrites réductases peuvent également fonctionner dans une chaîne de transport d'électrons alternative pour soutenir la croissance dans des conditions limitées en oxygène. Chez la souche ATCC 14579, un meilleur rendement de croissance est observé lorsqu'il y a du nitrate dans le milieu de culture (Mols, *et al.*, 2007).

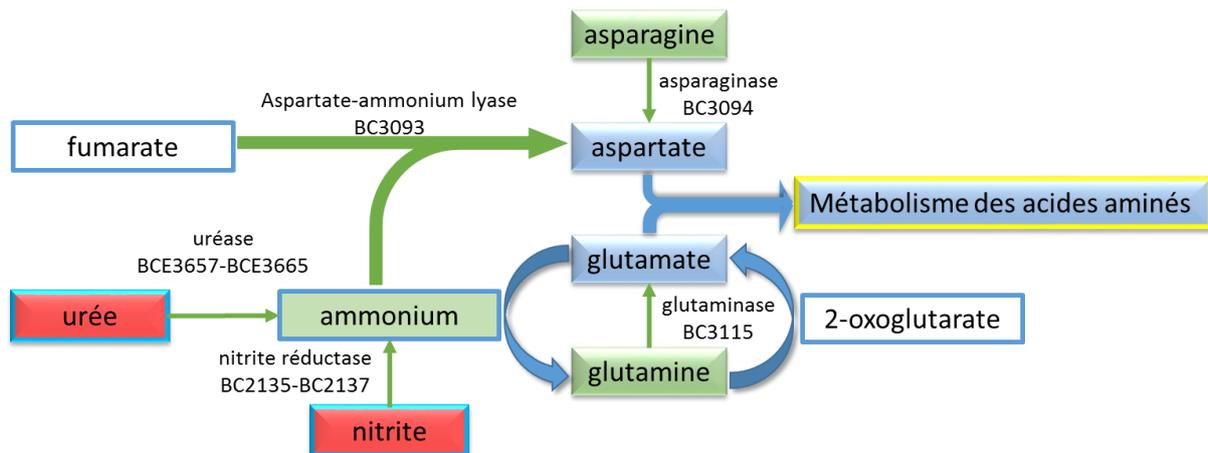


Figure 17: Schéma représentant les voies du métabolisme de l'azote chez *B. cereus*. D'après (Mols, *et al.*, 2007)

1.8.5 La fermentation

En absence d'oxygène et d'un autre accepteur final d'électrons comme le nitrate, le pyruvate est catabolisé en plusieurs acides organiques et en éthanol. Dans le milieu MOD supplémenté avec du glucose (30 mM) et à pH7, l'acide lactique est le produit majoritaire de la fermentation. Sa formation est catalysée par les lactates déshydrogénases (LDH) codés par *ldhA*, *ldhB* et *ldhC* (Laouami, *et al.*, 2011). Les autres acides organiques (acide succinique, acide formique, et acide acétique) sont produits en moindre quantité. A pH acide, le pyruvate est majoritairement décarboxylé en α -acétolactate, puis en acétoïne qui est ensuite réduite en 2,3-butanediol. Au cours de ces réactions, une grande quantité d'éthanol est produite. (**Figure 16**).

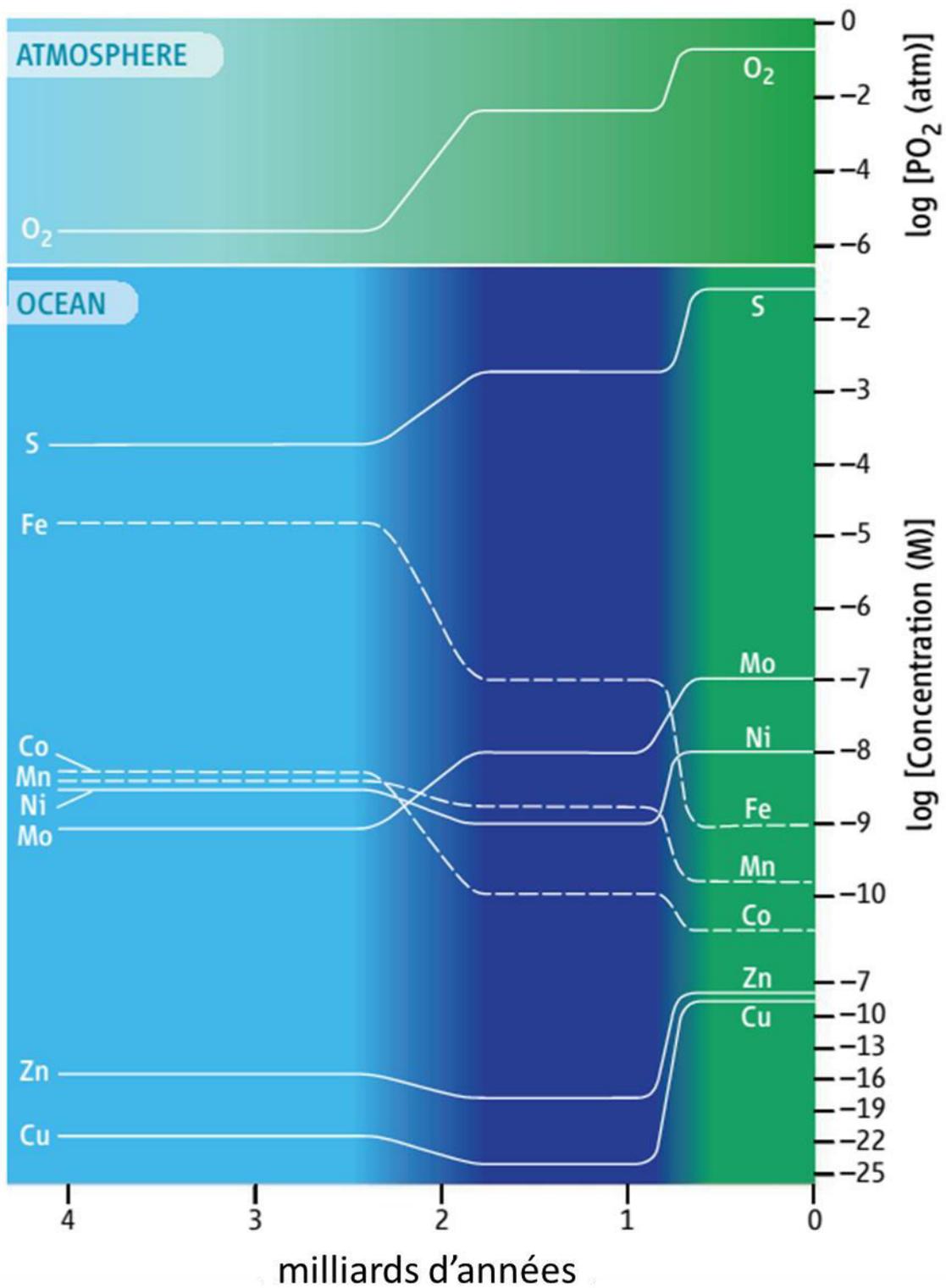


Figure 18: Schéma représentant les variations de concentration des principaux oligo-éléments essentiels dans les océans et du dioxygène dans l'atmosphère (Anbar, 2008)

CHAPITRE II – Le stress oxydant

II.1 Apparition de l'O₂ dans l'atmosphère

L'âge de la Terre est de $4,54 \cdot 10^9$ années $\pm 1\%$ (Dalrymple, 2001). D'après Mojzsis, les océans se sont rapidement formés il y a $4,3 \cdot 10^9$ années, soit 240 millions d'années après l'accrétion de la Terre (Mojzsis, *et al.*, 2001). La formation des océans riches en fer dissous comme attestent les gisements de fer rubané datant de l'Archéen et l'apparition des premiers organismes vivants ont conduit à la Grande Oxydation (Great Oxygenation Event en anglais, abrégé GOE). Cette période correspond à l'apparition du dioxygène dans l'atmosphère terrestre (Sosa Torres, *et al.*, 2015). Des données géologiques, isotopiques et chimiques suggèrent que ce changement environnemental majeur s'est produit il y a $2,3 \cdot 10^9$ années (**Figure 18**) (Anbar, 2008). Avant cet événement, l'atmosphère était constituée de dioxyde de carbone, méthane et d'ammoniaque. Les cyanobactéries, apparues 200 millions d'années avant la catastrophe de l'oxygène, ont commencé à produire du dioxygène en fixant le dioxyde de carbone et en utilisant les rayonnements solaires comme source d'énergie (Flannery & Walter, 2012). Avant la crise écologique de l'oxygène, le dioxygène produit réagissait avec le fer dissous dans les océans pour précipiter en hématite et magnétite. Ce n'est que vers l'ère de la Grande Oxydation, après épuisement du fer ferreux marin que le dioxygène (déchet toxique des cyanobactéries) s'est répandu dans les océans et l'atmosphère. La présence du dioxygène dans l'atmosphère a permis de réduire la quantité de méthane (gaz à effet de serre avec le dioxyde de carbone) et est à l'origine de la formation de la couche d'ozone qui absorbe une grande partie des rayonnements ultraviolets solaires. La présence de dioxygène dans les océans puis dans l'atmosphère est responsable de l'extinction d'un grand nombre de bactéries anaérobies strictes. Certains micro-organismes anaérobies ont dû mettre en place des mécanismes de défense face à une atmosphère de plus en plus oxydante. Sous cette pression de sélection, ils ont pu développer un métabolisme de type respiratoire et se diversifier. En consommant du dioxygène, ces organismes ont apporté un équilibre dans la quantité de dioxygène, constituant important de l'atmosphère (Flannery & Walter, 2012).

II.1.1 La molécule de dioxygène

Le dioxygène possède un grand pouvoir oxydant. La réduction des 4 électrons du dioxygène en deux molécules d'eau ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$, $E'_o(O_2/H_2O) = +0.815$ V à pH=7 et 25°C) constitue la dernière réaction de la chaîne respiratoire. La réaction inverse fournit les électrons pour la photosynthèse (Wood, 1988). La configuration de la molécule de dioxygène à l'état fondamental est un état triplet. Cet état confère des propriétés paramagnétiques et explique son inertie chimique à température ambiante. Il possède deux électrons non appariés de spin parallèle chacun sur une orbitale atomique propre. Cette répartition des deux électrons explique le caractère diradicalaire et paramagnétique du dioxygène (Sawyer, 1990). La réduction du dioxygène peut se produire par réduction monoélectronique avec une espèce paramagnétique, radicalaire ou par formation préalable de l'oxygène singulet (**Figure 19**).

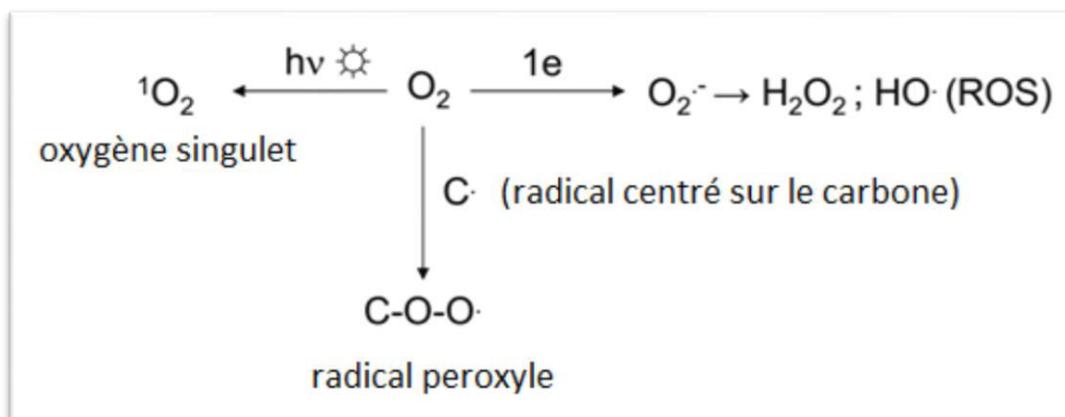


Figure 19: Réduction du dioxygène (Pinto, *et al.*, 2010)

II.1.1.1 La réduction monoélectronique du dioxygène

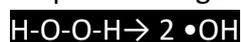
La réduction monoélectronique du dioxygène conduit à la formation du radical superoxyde ($\bullet\text{O}_2^-$). L'anion superoxyde est une espèce réactive de l'oxygène radicalaire et paramagnétique. Le radical ou ion superoxyde est thermodynamiquement instable par rapport à sa dismutation en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et dioxygène. Le superoxyde peut réagir avec l'oxyde nitrique ($\bullet\text{NO}$) pour former du peroxy-nitrite ou avec le peroxyde d'hydrogène pour donner le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) (Figure 20) (Sawyer, 2014):

- 1^{ère} étape de réduction catalysée par des ions de certains métaux comme le fer ou cuivre : $\text{Fe}^{3+} + \bullet\text{O}_2^- \rightarrow \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$
- 2^e étape, réaction de Fenton : $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$
- Dernière étape, réaction de Haber-Weiss : $\bullet\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \bullet\text{OH} + \text{OH}^- + \text{O}_2$

Contrairement à $\bullet\text{O}_2^-$ et $\bullet\text{OH}$, H_2O_2 n'est pas un radical libre mais il est chimiquement plus actif que l'oxygène moléculaire (Winterbourn, 2008). Du fait qu'il soit non radicalaire, c'est l'intermédiaire le plus stable du processus de réduction de l'oxygène. Il peut être généré par dimérisation des radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$), dismutation des anions superoxydes ou réduction consécutive du dioxygène par 2 électrons (Sawyer, 1990):



Le peroxyde d'hydrogène peut être totalement réduit en eau ou partiellement en radicaux hydroxyles ($\bullet\text{OH}$) (Turrens, 2003). Le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) est la forme neutre de l'ion hydroxyle (OH^-). C'est le plus puissant oxydant parmi les dérivés réactifs de l'oxygène (Turrens, 2003). Sa réactivité est très élevée avec une constante de vitesse $k = \sim 1.109 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Cette extrême réactivité du radical hydroxyle a pour conséquence qu'il diffuse très peu et réagit quasiment sur le lieu de sa production. Dès qu'un radical hydroxyle rencontre un substrat, il réagit dès la première collision sans qu'un apport énergétique soit nécessaire à la réaction. Cette grande réactivité lui confère également une très faible durée de vie qui ne dépasse pas quelques microsecondes (Halliwell & Gutteridge, 2007). Il est produit lors de réactions de dissociation de peroxydes, en présence d'ions de métaux de transition (réaction de Fenton) ou par le clivage homolytique induit par les UV de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène :



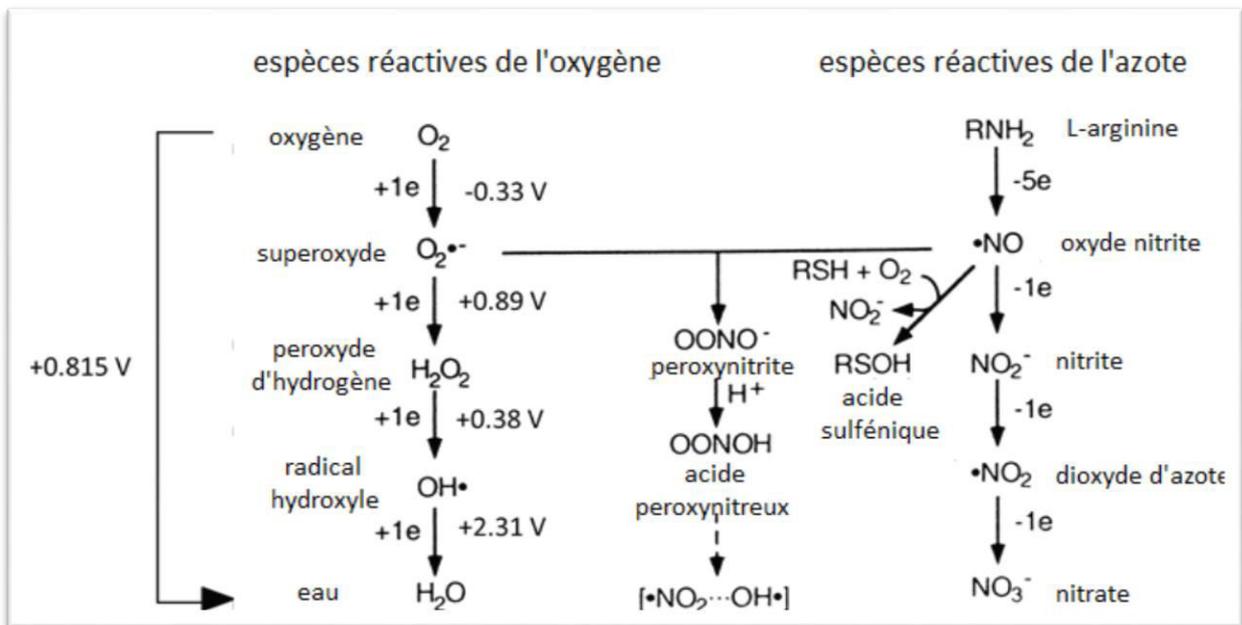


Figure 20: Les espèces réactives intermédiaires de l'oxygène et de l'azote (Sawyer, 1990)

Les valeurs de potentiels de réduction du dioxygène (en volt) sont ceux pour un pH=7 et 25°C

II.1.1.2 La formation de radicaux centrés sur le carbone

La réduction du dioxygène peut se faire au niveau des radicaux carbonés (par exemple les groupes alkyles, benzyles) pour générer des radicaux peroxydes (C–O–O•). Les radicaux centrés sur le carbone présentent un caractère électrophile ou nucléophile prononcé selon les substituants présents.

II.1.1.3 L'oxygène singulet

L'oxygène singulet (O_2^-) est une espèce réactive de l'oxygène non radicalaire. Il se forme à partir du dioxygène par photoexcitation sensibilisée par un chromatophore ou par des réactions chimiques ou enzymatiques (peroxydases). Il correspond à l'état métastable excité du dioxygène (Davies, 2004).

II.2 Origine des ROS endogènes

En aérobiose, les bactéries aérobies utilisent l'oxygène moléculaire (O_2) pour la respiration. Des dérivés réactifs de l'oxygène peuvent être formés de manière endogène par addition consécutive d'électrons à l'oxygène moléculaire. La plupart de ces réactifs sont générés par l'oxydation accidentelle de plusieurs enzymes redox de la chaîne respiratoire associés à la membrane notamment les flavoenzymes comme le NADH déshydrogénase II, le lipoamide déshydrogénase et le fumarate réductase (Messner & Imlay, 2002). Des données expérimentales chez *E. coli* indiquent que les chaînes respiratoires produisent plus de 87% de la production totale de peroxyde d'hydrogène (Gonzalez-Flecha & Demple, 1995). De plus, le peroxyde d'hydrogène peut également être formé au niveau intracellulaire par l'intermédiaire des oxydases comme la L-aspartate oxydase et la phényléthylamine oxydase (Korshunov &

Imlay, 2010, Ravindra Kumar & Imlay, 2013). En anaérobiose, des ROS endogènes sont aussi produits au cours de la croissance des bactéries ; ce qui est confirmé par l'existence de système de protection contre le stress oxydant (Lumppio, *et al.*, 2001, Rusnak, *et al.*, 2002). Des superoxydes et du peroxyde d'hydrogène sont générés à des concentrations faibles de l'ordre du 10^{-9} à 10^{-6} mol.l⁻¹ au niveau intracellulaire en anaérobiose (Imlay, 2003, Kurtz, 2004). Cette production de ROS peut entraîner un stress oxydant lorsqu'il y a un déséquilibre entre génération et élimination des ROS endogènes. Les cibles biologiques des ROS sont l'ADN, l'ARN, les protéines et les lipides (**Figure 21**).

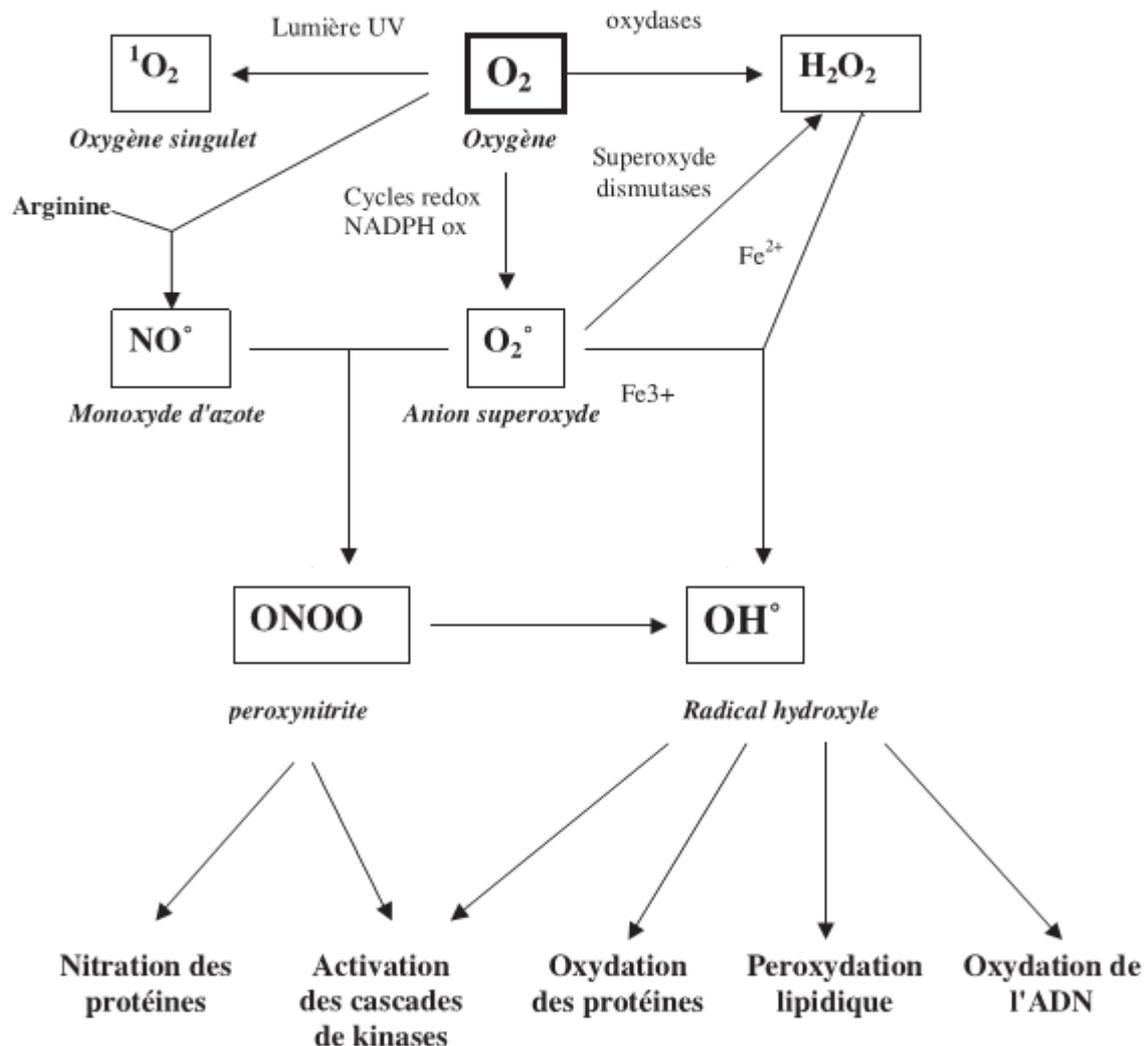


Figure 21: Origine et effets toxiques des ROS endogènes (Favier, 2003)

II.3 Les ROS exogènes et leurs rôles

Les ROS peuvent également être générés par d'autres organismes ou procédés chimiques. Les bactéries lactiques sécrètent des ROS pour inhiber la croissance des bactéries compétitrices (Pericone, *et al.*, 2000). Lors d'un « burst oxydatif », des ROS et peroxydes organiques sont générés par les plantes et animaux pour lutter contre les agents pathogènes (Lamb & Dixon, 1997, Rada & Leto, 2008, Garcia & Hirt, 2014). Chez les plantes, la première réaction induite par l'agent pathogène est la production de superoxyde et/ou de peroxyde d'hydrogène pour renforcer la paroi cellulaire et confiner l'infection. Les ROS peuvent également diffuser aux

travers des membranes biologiques, ce qui leur confèrent des propriétés messagers (Torres, 2010, Stael, *et al.*, 2015). Chez les Mammifères, la production de ROS fait partie des mécanismes de défense immunitaire innée antimicrobienne (Deffert, *et al.*, 2014). Lors de l'infection bactérienne, les neutrophiles produisent du peroxyde d'hydrogène, des ions chlorures et de l'acide hypochloreux (HOCl) catalysé par la myéloperoxydase (Albrich, *et al.*, 1981, Roos & Winterbourn, 2002). L'HOCl est également produit par l'épithélium de la muqueuse intestinale pour contrôler la colonisation bactérienne (Ha, *et al.*, 2005). Dans l'environnement, des superoxydes et peroxydes d'hydrogène peuvent être générés par oxydation de métaux réduits au niveau des interfaces oxiques-anoxiques ou par radiation de chromophores extracellulaires (Mishra & Imlay, 2012).

II.4 Les effets toxiques des ROS endogènes

II.4.1 La peroxydation lipidique

La peroxydation lipidique fait partie des marqueurs biologiques du stress oxydant. Les radicaux libres peuvent attaquer directement les acides gras polyinsaturés des membranes et initier la peroxydation des lipides. L'effet principal de la peroxydation lipidique est une diminution de la fluidité membranaire. Cette peroxydation induit également une altération des propriétés physico-chimiques des protéines membranaires notamment les protéines de la chaîne respiratoire, les transporteurs, etc. (Farr, *et al.*, 1988). Si le transport des électrons le long de chaîne respiratoire est altéré, il y a plus de ROS produits et par voie de cascade engendre la lyse cellulaire (Demple, 1991).

La peroxydation des lipides est initiée par la déshydrogénation des acides gras insaturés. Cette étape correspond à l'auto-oxydation du lipide. La présence d'une double liaison carbone fragilise le groupement méthyle à proximité et facilite le départ du proton H⁺. Les initiateurs de la peroxydation sont les radicaux hydroxyles (•OH), peroxydes (COO•) et alkoxydes (CO•), et pas le peroxyde d'hydrogène et le radical superoxyde (•O₂⁻) (Turrens & Boveris, 1980, Bandyopadhyay, *et al.*, 1999). La formation d'un radical lipidique entraîne une réorganisation de doubles liaisons covalentes C-C par délocalisation de l'électron célibataire et retarde la dimérisation de la structure conjuguée. Après cette phase d'initiation, il y a une phase de propagation correspondant à des réactions en chaîne où le radical est à la fois initiateur et produit final de la réaction. Le diène conjugué en présence de dioxygène forme un radical peroxyde capable d'enlever un atome d'hydrogène à une nouvelle molécule lipidique. Il y a propagation de l'oxydation à la fois par la présence de l'oxygène et du radical peroxyde formé. Le proton H⁺ libéré va s'unir avec le radical peroxyde pour former le radical hydroperoxyde bouclant ainsi la boucle. La phase de terminaison correspond à la phase où il y a dimérisation des radicaux lipidiques (**Figure 22**). Plus le taux d'insaturation des lipides est élevé, plus ils sont sensibles au ROS endogènes (Bandyopadhyay, *et al.*, 1999).

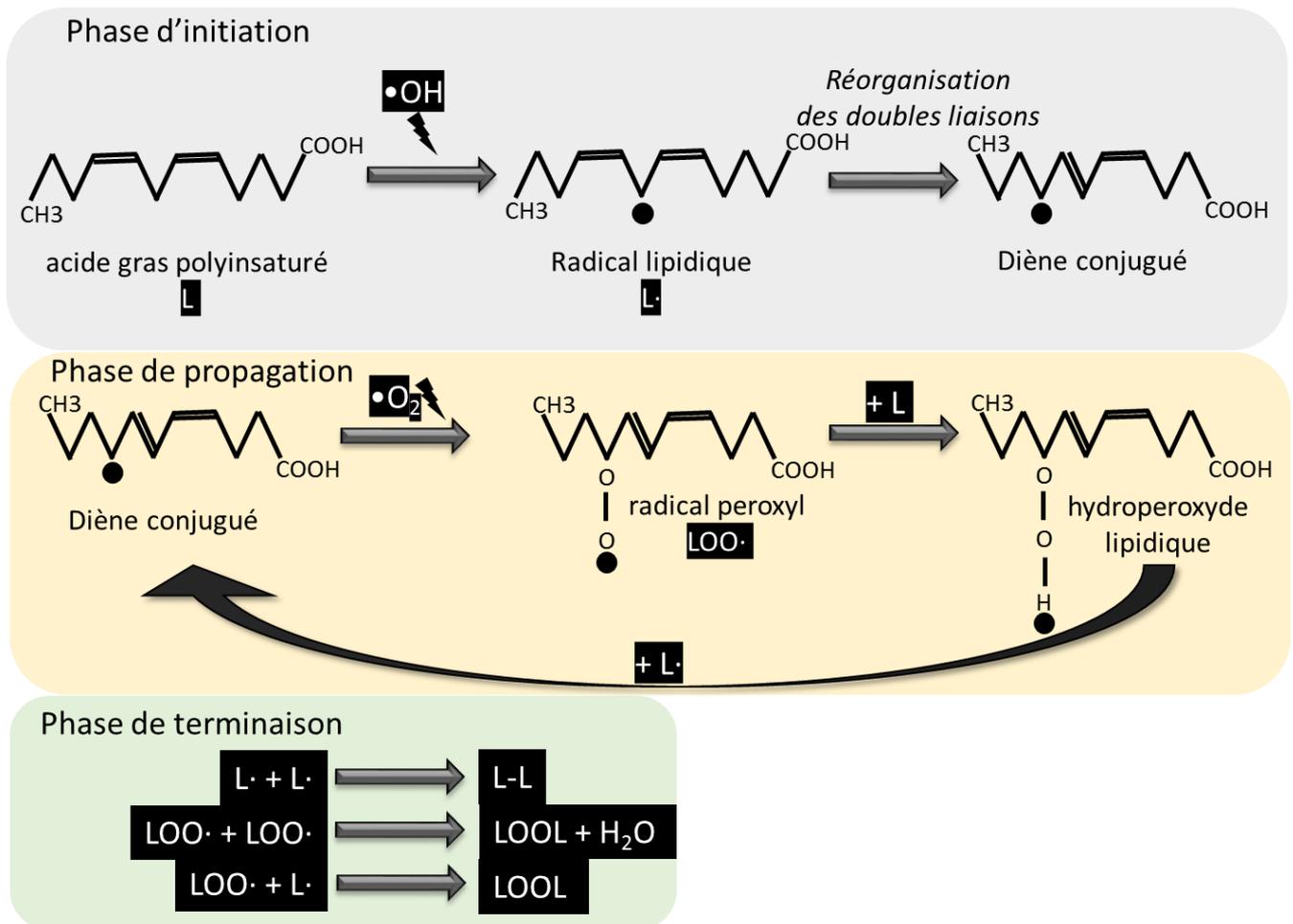


Figure 22: Les 3 phases de la peroxydation lipidique

II.4.2 Oxydation de l'ADN par les ROS endogènes

L'ADN est le support de l'information génétique des êtres vivants. Cette molécule est très sensible aux ROS endogènes. Parmi les dommages oxydatifs de l'ADN par les ROS, il y a l'oxydation des bases, la rupture de la liaison entre la base et le désoxyribose (sites abasiques), les adduits intra-caténaires, les ruptures de brins et les pontages ADN-protéines (**Figure 23**) (Cadet, *et al.*, 2002, Favier, 2003). Il y a des spécificités d'interaction entre les bases azotées de l'ADN et les différents ROS. Les 4 bases azotées sont susceptibles d'être oxydées par l'oxygène singulet à cause de leur faible potentiel redox. Cependant, la guanine est une cible privilégiée de l'oxygène singulet car elle présente le degré d'ionisation le plus faible (Sajous, *et al.*, 2008). Le 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodG) est le produit principal de la réaction de l'oxygène singulet avec les désoxynucléosides libres (Lutgerink, *et al.*, 1992). Le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde n'oxydent pas les bases de l'ADN alors que le radical hydroxyle réagit avec toutes les bases et génère une multitude de produits (Halliwell & Gutteridge, 2007). En plus de l'oxydation des bases azotées, les ROS peuvent aussi cliver la liaison entre la base et le désoxyribose (effet clastogène). En l'absence de réparation, cette dépurination ou dépyrimidation évolue vers une rupture simple brin de l'ADN. Il peut aussi y avoir une action directe des ROS sur le désoxyribose entraînant aussitôt la rupture du brin de l'ADN. En plus des ROS, les produits dérivés de la peroxydation lipidique comme les

aldéhydes α -insaturées peuvent former des adduits sur les bases de l'ADN. Ces adduits intra-caténaires sont de type malondialdéhyde-guanine (MDA-guanine) ou éthénodérivés (Kasai, 1997). De nombreuses protéines rentrent en interaction avec l'ADN par exemple des facteurs de transcription, enzymes. L'oxydation de ces protéines peut entraîner la formation de pontage ADN-protéines ou des adduits sur des bases de type lysinoguanine (Sajous, *et al.*, 2008). De nombreux métaux sont fixés à l'ADN, qui est un polyanion (Fe, Cu, Mg, Zn, Ni, Cd, etc.). Par la réaction de Fenton, ces métaux peuvent générer des radicaux hydroxyles à partir du peroxyde d'hydrogène (cf. 2.3.3). L'oxydation de l'ADN par les ROS endogènes n'affecte pas seulement les bactéries aérobies. Les bactéries anaérobies strictes, peuvent aussi subir un stress oxydant et des altérations de leur matériel génétique (Takeuchi, *et al.*, 1999).

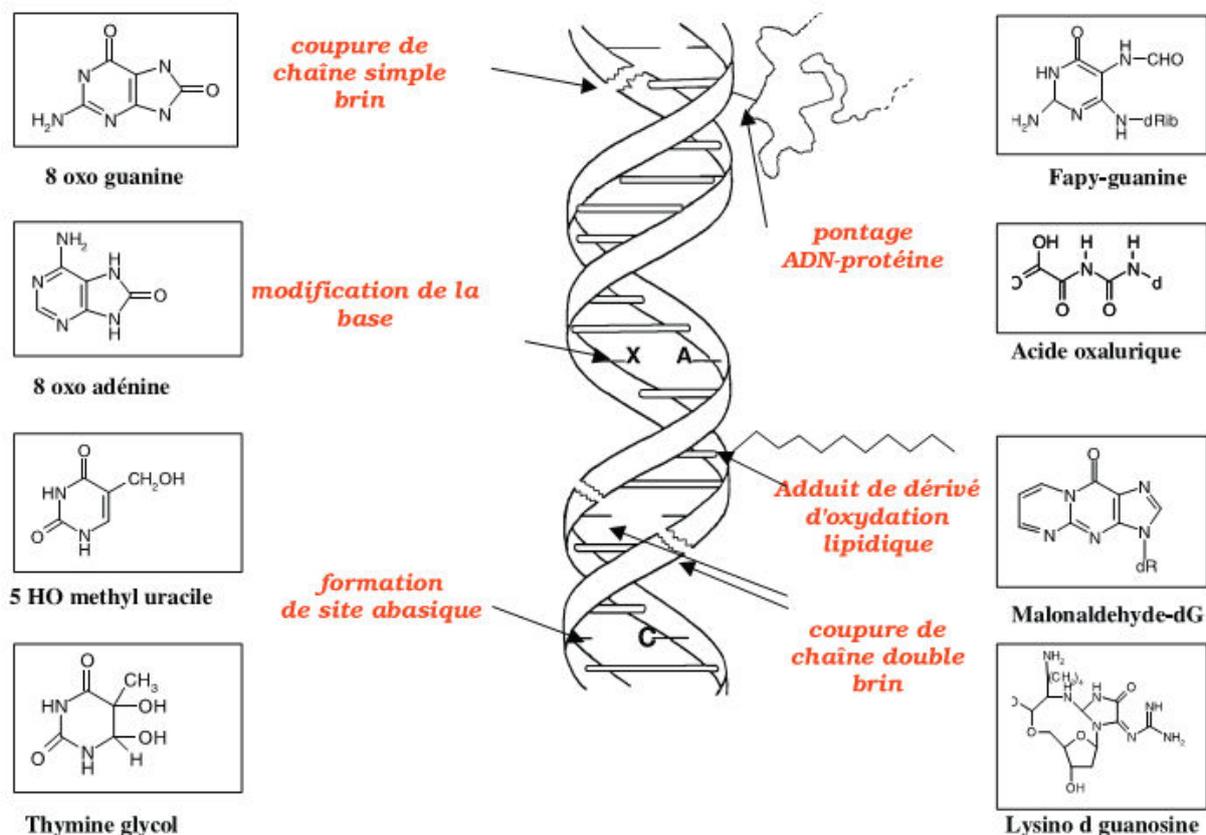


Figure 23: Les altérations de l'ADN par les ROS endogènes (Favier, 2003)

II.4.3 Oxydation des protéines

Les protéines sont des composants majeurs de la plupart des systèmes biologiques. De ce fait, elles constituent une cible majeure des ROS. L'oxydation des protéines par les radicaux libres engendre un large éventail de modifications.

II.4.3.1 Fragmentation du squelette carboné des protéines

La structure primaire d'une protéine correspond à une succession des acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Le squelette carboné peut subir des dommages par les ROS et plus spécifiquement par les ROS radicalaires. Au niveau du carbone α , les radicaux

libres causent une substitution électrophile en alpha du groupe carbonyle (Hawkins & Davies, 2001).

En aérobiose, les radicaux carbonés de la protéine peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire pour former un radical peroxyde (cf. 2.2.2). Ce composé peut être éliminé par libération d'un radical hydroperoxyde ($\text{HO}_2\bullet$) et généré un imine subissant par la suite une hydrolyse et donnant lieu à une fragmentation du squelette carboné (Garrison, 1987). Le radical peroxyde peut aussi réagir avec une autre espèce que l'oxygène pour former un hydroperoxyde. La décomposition de l'hydroperoxyde en radical est réalisée par l'intermédiaire d'un radical alkoxyde ($\text{RO}\bullet$) résultant aussi à une fragmentation du squelette carboné (Davies, 1996). En anaérobiose, peu de fragmentations du squelette carboné sont observés ce qui confirme le rôle clé de l'oxygène dans les processus de dégradation du squelette protéique (Garrison, 1987).

II.4.3.2 Modification des chaînes latérales protéiques par les ROS

Il y a des spécificités d'oxydation des acides aminés par les différents radicaux libres. Le peroxyde d'hydrogène oxyde préférentiellement les résidus cystéines mais aussi les résidus méthionines, histidines, tyrosines et tryptophanes (Davies, 2005). Les résidus cystéines sont impliqués dans la conformation de la protéine via les ponts disulfures. La réduction des ponts conduit à la perte de la structure protéique modifiant ainsi l'activité et la stabilité de la protéine. La reformation de ces ponts disulfures peut conduire à une dimérisation protéine-protéine mais aussi à une structure différente de la structure initiale (Gilbert, 1990).

Le radical hydroxyle oxyde les chaînes latérales de tous les acides aminés (Davies, 2005). Il entraîne une déshydrogénation du carbone α (cf. 2.4.3.1) et des chaînes latérales aliphatiques apolaires (hydrophobe) entraînant la production d'un large éventail de ROS. Les conséquences de ces attaques radicalaires sont des endommagements du squelette carboné et des chaînes latérales (Davies, 2005).

L'oxygène singulet réagit rapidement avec les résidus méthionines, cystéines, tyrosines, histidines et tryptophanes à pH physiologique. Hormis les résidus soufrés, la réaction des résidus protéiques avec l'oxygène singulet génère des endo- et hydroperoxydes (Davies, 2004).

II.4.3.3 Altérations des centres Fe-S

Les centres Fe-S des protéines peuvent être altérés par les ROS. L'oxydation du centre fer-soufre entraîne une déstabilisation de la structure protéique et la libération d'atome de fer au niveau intracellulaire (Imlay, 2006). Une forte concentration de fer favorise les réactions de Fenton et Haber-Weiss génératrices de radicaux hydroxyles. La génération de ces radicaux libres en grande quantité peut entraîner l'arrêt de croissance via l'altération des métalloprotéases et être létale (Ceragioli, *et al.*, 2010).

II.5 Les systèmes de défense contre les ROS

Il existe plusieurs molécules permettant le maintien de l'environnement intracellulaire réduit et la capture des ROS. Une partie est constituée par des antioxydants non enzymatiques

comme le couple NADPH/NADH, le coenzyme A et le bacillithiol. L'autre partie est constituée d'enzymes spécifiques capables de diminuer le niveau de ROS comme les superoxydes dismutases (SOD), les catalases et les peroxydases.

II.5.1 Les systèmes de défense non enzymatiques

Le coenzyme A (CoASH) est un thiol de bas poids moléculaire abondant chez *Bacillus megaterium*, *B. cereus* et *Staphylococcus aureus* (**Figure 24**) (Newton, *et al.*, 1996, Antelmann, 2015).

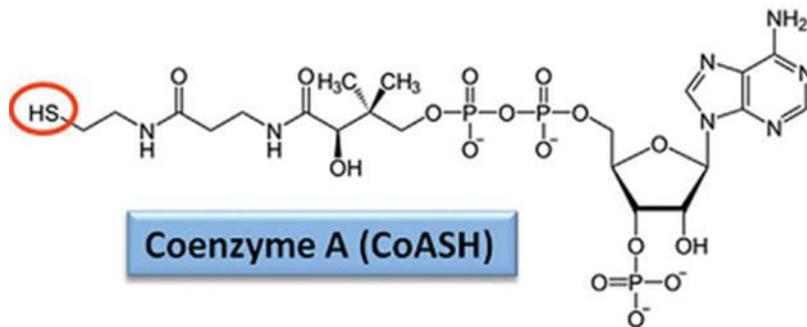


Figure 24: Structure du coenzyme A (Antelmann, 2015)

Le CoASH est impliqué dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant en réduisant le peroxyde d'hydrogène. Il est par la suite régénéré via le coenzyme A disulfide réductase (Boylan, *et al.*, 2006). De nombreuses bactéries Gram positif à faible pourcentage de GC possèdent un autre thiol de bas poids moléculaire, le bacillithiol (BSH). Le BSH dont l'expression est liée à OhrR a été caractérisé pour la première fois en 2009 chez *S. aureus* et *D. radiodurans* (Newton, *et al.*, 2009). La structure du bacillithiol est similaire à celui du mycothiol, un substitut du glutathion. Le groupement inositol est remplacé par le L-malate, ce qui fait du bacillithiol un glycoside α -anomérique de L-cystéinyl-D-glucosamine avec un groupe acide L-malique (Newton, *et al.*, 2009). Le potentiel redox du BSH est de -221 mV *in vitro*, ce qui est légèrement supérieur à celui de la cystéine (-223 mV) et supérieur à celui du coenzyme A (-234 mV) (Sharma, *et al.*, 2013). Cela implique que le BSH n'a pas une plus grande capacité de réduire le stress oxydant que les résidus cystéines et le CoASH. De plus, la délétion du gène codant pour ce thiol entraîne une légère augmentation de la sensibilité de la bactérie au diamide, méthylglyoxal et ROS (paraquat, H₂O₂) (Gaballa, *et al.*, 2010). Ceci suggère que la cystéine et / ou CoASH peuvent compenser l'absence de BSH. Cependant, en considérant la faible valeur du pKa du BSH (pKa_{SH/S} = 7,97) et sa concentration intracellulaire élevée (0.5-5,0 mmol.L⁻¹), il est possible que le BSH constitue une cible importante des ROS (Sharma, *et al.*, 2013). Le BSH est principalement présent sous sa forme réduite avec un ratio BSH/BSSB situé entre 100 :1 et 400 :1 chez *B. subtilis*. Ce ratio indique la présence probable d'une bacillithiol disulfide réductase (Chi, *et al.*, 2011).

L'enzyme qui aurait ce rôle serait le FAD-dépendant pyridine nucléotide oxydoréductase de thiol-disulfure YpdA (Gaballa, *et al.*, 2010). La biosynthèse du BSH se déroule en trois étapes (**Figure 25**) (Antelmann, 2015). Le glycosyltransférase BshA transfère un N-acétylglucosamine

(GlcNAc) sur le malate (Mal). Les N-acétylglucosamine déacétylase BshB1 et BshB2 catalysent la désacétylation du GlcNAc-Mal. La dernière étape consiste à l'ajout d'une cystéine sur l'intermédiaire GlcN-Mal (Antelmann, 2015). Une étude a révélé que le BSH pouvait moduler la concentration intracellulaire du zinc en formant un complexe BSH :zinc avec une structure en tétraèdre comportant deux ligands soufres et deux ligands oxo (Ma, *et al.*, 2014). Chez *B. subtilis*, il a été démontré que le BSH permettait de protéger les résidus cystéines d'une oxydation irréversible en acides sulfoniques (Chi, *et al.*, 2011, Chi, *et al.*, 2013). Chez *B. subtilis*, une bacillithiol-S-transférase a été décrite comme étant responsable de la conjugaison du bacillithiol avec différents substrats. Le rôle de la S-bacillithiolation est de protéger les thiols et les mécanismes de régulation redox chez plusieurs bactéries, comme le régulateur transcriptionnel OhrR et les enzymes métaboliques. La S-bacillithiolation de OhrR au niveau du résidu Cys15 conduit à l'inactivation du régulateur et à l'expression de OhrA chez *B. subtilis* (Lee, *et al.*, 2007).

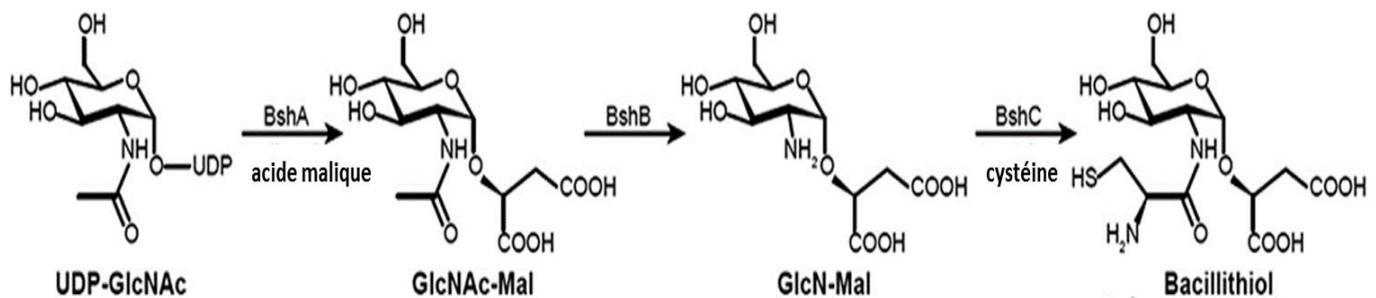


Figure 25: Biosynthèse du bacillithiol (Antelmann, 2015)

II.5.2 Les systèmes de défense enzymatiques

Les superoxydes dismutases (SOD) catalysent la réduction de deux superoxydes en peroxyde d'hydrogène et oxygène. Il existe quatre types de SOD classés sur la base du cofacteur métallique qui peut être du cuivre et du zinc, du manganèse, du fer ou du nickel: Cu / Zn-SOD, Mn-SOD, Fe / Ni-SOD. Deux SOD ont été décrites chez *E. coli* : une enzyme utilisant le fer comme cofacteur et dont l'expression est modulée par la concentration intracellulaire en fer (Niederhoffer, *et al.*, 1990) et une SOD à manganèse prédominante en aérobiose dont l'expression implique six régulateurs transcriptionnels (Compan & Touati, 1993). Dans l'espace périplasmique d'*E. coli*, un troisième SOD utilisant le cuivre ou zinc comme cofacteur a été identifié (Benov & Fridovich, 1994). Ces deux classes de SOD dont les cofacteurs sont le fer ou le cuivre-zinc ont par la suite été identifiées chez plusieurs bactéries dont *B. anthracis* (Passalacqua, *et al.*, 2006). Le peroxyde d'hydrogène est ensuite éliminé grâce à l'action de deux catalases : l'hydroperoxydase I (HPI) et l'hydroperoxydase II (HPII). Chez *B. subtilis*, les gènes codant pour les deux catalases font partie d'un opéron de 9 gènes contrôlés par le régulateur *oxyR* (Storz & Tartaglia, 1992). *katG* est le gène codant pour HPI dont l'expression est inductible par la présence de peroxyde d'hydrogène. *katE* code pour HPII. Il est exprimé en entrée de phase stationnaire sous le contrôle du régulateur *rpoS* codant pour le facteur σ^S (Kolter, *et al.*, 1993). Les systèmes de défense enzymatiques incluent également des systèmes de réparations de l'ADN et des enzymes protéolytiques et lipolytiques. Les systèmes de

réparation de l'ADN sont constitués par l'endonucléase IV, une métalloenzyme induite par le stress oxydant et l'exonucléase III induite au cours de la phase stationnaire (Dempfle & Harrison, 1994). L'une des modifications les plus fréquentes est la réduction des ponts disulfures. Cette réduction implique la thiorédoxine réductase qui transfère les électrons depuis le NADPH vers la thiorédoxine oxydée via le coenzyme transporteur d'hydrogène FAD. La thiorédoxine est une enzyme antioxydante découverte en 1964 chez *E. coli*. Le système de thiorédoxine comprend le NADPH, la thiorédoxine réductase (TrxR), et la thiorédoxine (TRX). C'est un système de type disulfure-réductase qui peut fournir des électrons à une large gamme d'enzymes impliquées dans la synthèse de l'ADN et la défense contre le stress oxydant (Holmgren, 1985). La thiorédoxine est une réductase de 12 kDa catalysant la réduction des ponts disulfures des protéines avec un motif conservé (CGPC) au niveau du site actif. La structure de la thiorédoxine est composée de 5 feuillets β formant le noyau de la protéine et 4 hélices α plus une partie d'hélice entourant le noyau. Le site actif est situé après le feuillet β_2 au niveau de la partie N-terminale de l'hélice α_2 (Eklund, *et al.*, 1991). De nombreuses enzymes essentielles impliquées dans les systèmes antioxydants thiol-dépendants possèdent cette structure comme la glutarédoxine (Fernandes & Holmgren, 2004), la peroxyrédoxine (Wood, *et al.*, 2003) et le glutathion peroxydase (Ladenstein, *et al.*, 1979). La thiorédoxine réductase est une flavoprotéine homodimérique faisant partie de la famille pyridine nucléotide-disulfide oxydoréductase incluant le glutathion réductase (GR), le trypanothione réductase (TryR), l'alkyl hydroperoxyde réductase, le lipoamide déshydrogénase et le mercurique réductase (Argyrou & Blanchard, 2004). En plus de la thiorédoxine réductase, il existe un homologue participant également aux mécanismes de défense contre le stress oxydant qui est AhpF (alkyl hydroperoxyde peroxydase sous-unité F). AhpF transfère directement les électrons depuis AhpC vers un alkyl hydroperoxyde (Poole, *et al.*, 2000). Les cellules procaryotes possèdent également des protéines capables de réparer directement les modifications de la structure primaire des protéines. Tous les acides aminés des protéines sont oxydables par les ROS. La cystéine et la méthionine sont les deux seuls acides aminés contenant un atome de soufre. Ils sont présents dans la plupart des protéines et leur oxydation est réversible. L'une des modifications les plus fréquentes est l'oxydation des cystéines conduisant à la formation de ponts disulfures. Leur réduction est possible grâce aux thiorédoxine réductases, glutarédoxines et la protéine disulfide isomérase chez *E. coli* qui est à la fois une enzyme et une protéine chaperonne (Cabisco, *et al.*, 2000). Les résidus cystéines sont connus pour contribuer à la structure et fonction des protéines mais le rôle clé des résidus méthionines n'est pas clairement établi. Les résidus méthionines sont les plus susceptibles à être oxydés par les ROS (Vogt, 1995) et des études montrent qu'ils jouent un rôle important dans les mécanismes de défense contre le stress oxydant (Levine, *et al.*, 1996, Levine, *et al.*, 1999, Luo & Levine, 2009). Les méthionines oxydées peuvent être réduites grâce à l'action d'une famille d'enzymes, les méthionines sulfoxydes réductases.

CHAPITRE III – Oxydation des résidus méthionines et réduction par les Msr

III.1 Oxydo-réduction des méthionines

La méthionine est un acide α -aminé apolaire protéinogénique et hydrophobe dont la forme naturelle est l'énantiomère L. C'est l'acide aminé le plus sensible à l'oxydation par un grand nombre d'oxydants (**Tableau 4**) dont les produits sont deux stéréoisomères de la méthionine sulfoxyde (MetSO) en raison de la position asymétrique de l'atome de soufre sur la chaîne latérale : Met-(S)-SO et Met-(R)-SO (**Figure 26**). Une oxydation ultérieure de la méthionine sulfoxyde par des ROS produit la méthionine sulfone. Bien que cela se produise dans une moindre mesure, cette oxydation est irréversible (**Figure 27**) (Nielsen, *et al.*, 1985).

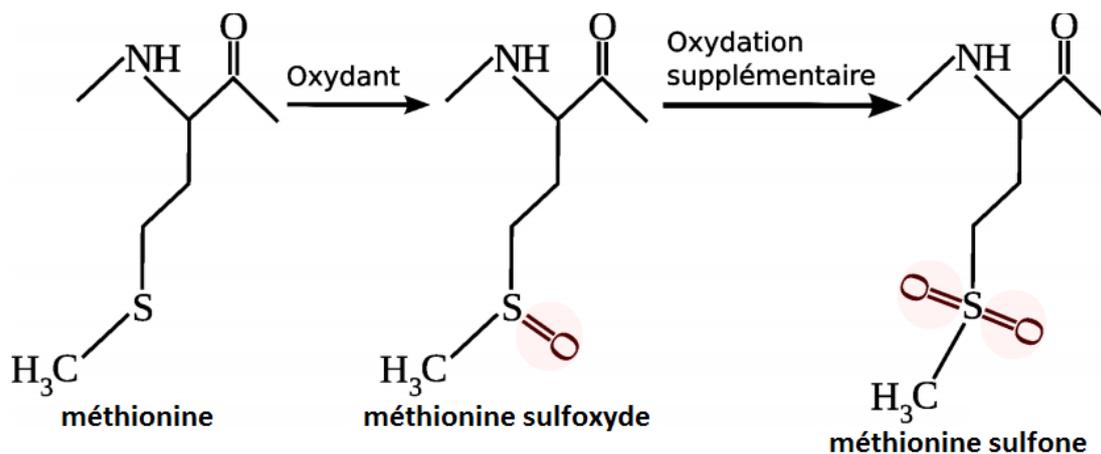


Figure 27: Oxydation du résidu méthionine

III.2 Rôle antioxydant des méthionines

En moyenne, environ 1,5% des acides aminés dans une protéine sont des résidus Met (Chiao & Peterson, 1953). Ce pourcentage de Met est plus élevé si on se restreint aux protéines liées au stress oxydant. Il est admis que les résidus méthionines les plus susceptibles d'être oxydés par les ROS sont ceux exposés à la surface des protéines. La concentration de ces résidus Met exposés est extrêmement élevée (> 1M) près de la surface des protéines (Levine, *et al.*, 1996). Des études proposent que ces résidus constituent un système d'antioxydant au niveau intracellulaire. Ce système de défense de la « dernière chance » des protéines permettrait de protéger la fonction et la structure de la protéine. En captant les oxydants, ils évitent une oxydation irréversible des résidus critiques. Ces méthionines oxydées sont ensuite réduites par les méthionines sulfoxydes réductases (Msr) (Levine, *et al.*, 1996, Moskovitz, *et al.*, 1997, Levine, *et al.*, 1999). La réduction des méthionines oxydées par les Msr est dépendante du NADPH et implique la thiorédoxine et la thiorédoxine réductase comme intermédiaires (**figure 28**) (Moskovitz, 2005).

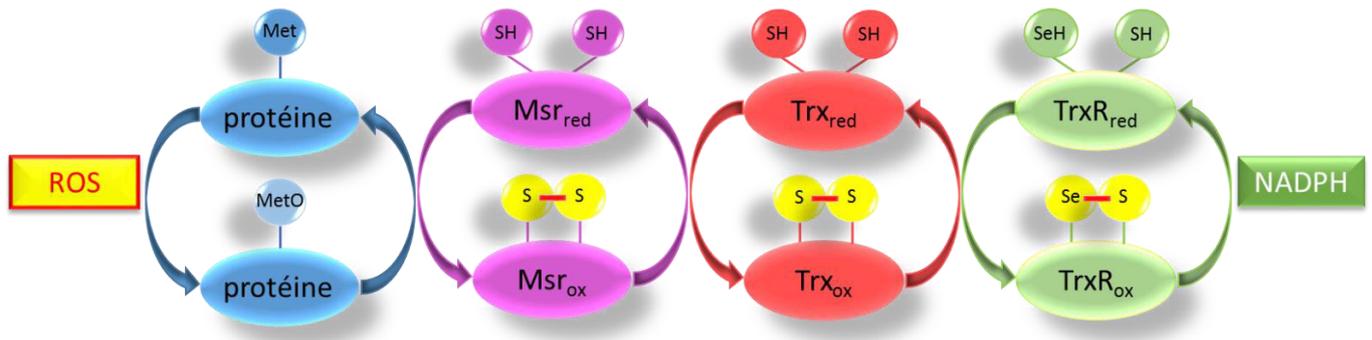


Figure 28: Couplage impliqué dans la réduction des méthionines sulfoxydes

III.3 Modulation de la fonction des protéines par l'oxydation des résidus Met

Comme la phosphorylation, l'oxydation des méthionines est une modification covalente réversible. La méthionine sulfoxyde étant moins hydrophobe que les résidus méthionines, cette oxydation peut entraîner une modification de la structure des protéines (Levine, *et al.*, 1999). Ainsi, le cycle d'oxydation/réduction des méthionines constituerait un processus de modulation des fonctions cellulaires et activités protéiques (Hoshi & Heinemann, 2001, Bigelow & Squier, 2005). Ciorba et ses collaborateurs ont montré que l'inactivation d'un canal potassique par l'oxyde nitrique était vraisemblablement due à l'oxydation d'un résidu Met essentielle (Ciorba, *et al.*, 1999). Chez *E. coli*, la protéine chaperonne GroEL permet le repliement des polypeptides néosynthétisés. En présence de peroxyde d'hydrogène, les résidus méthionines de cette protéine sont oxydés ce qui conduit à la dissociation irréversible des oligomères en monomères (Melkani, *et al.*, 2004).

III.4 Rôle de l'oxydation des méthionines dans la dégradation des protéines

L'oxydation complète de la méthionine conduit à la formation de méthionine sulfone [acide 2-amino-4-(S-méthylsulfonyl) butanoïque, MetSO_2]. Contrairement à la méthionine sulfoxyde, la méthionine sulfone libre ou incorporée ne peut pas être réduite par des réductases. La formation des méthionines sulfones est considérée comme une modification irréversible des protéines. Ces modifications oxydatives irréversibles se produisent dans des conditions de stress oxydant. Elles conduisent à des changements structuraux, une inactivation de la protéine et au final à la dégradation des protéines par clivage du squelette carboné (Pajares, *et al.*, 2015). L'oxydation partielle des résidus méthionines en méthionines sulfoxydes peut également être impliquée dans les voies de dégradation des protéines. Chez *M. tuberculosis*, la protéine Hsp16.3 était originalement identifiée comme une protéine de choc thermique. Cette protéine a également une activité chaperonne et elle est induite en condition de stress oxydant. L'oxydation de ces trois résidus méthionines entraîne une perte de sa structure et une dissociation des oligomères de la protéine. Ces modifications rendent la protéine sensible à une dégradation par les protéases (Abulimiti, *et al.*, 2003).

III.5 Propriétés des méthionines sulfoxydes réductases

Les méthionines sulfoxydes réductases sont des protéines ubiquitaires. La première méthionine sulfoxyde réductase caractérisée est *MsrA* chez *E. coli* (Brot, *et al.*, 1981). *MsrA*

permet la réduction des Met-(S)-SO libres et incorporées. Vingt ans plus tard, une deuxième méthionine sulfoxyde réductase, MsrB a été caractérisée (Grimaud, *et al.*, 2001). Celle-ci permet la réduction des Met-(R)-SO libres et incorporées. En 2007, une troisième méthionine sulfoxyde réductase associée aux vésicules membranaires est découverte chez *E. coli*. Elle est appelée fRMs pour free-R-méthionine sulfoxyde réductase (fRMs) (**Figure 29**) (Lin, *et al.*, 2007). Lin et ses collaborateurs ont constaté que l'efficacité enzymatique de MsrB pour la réduction des formes libres des Met-(R)-SO est 100 à 1000 fois inférieure à celui de MsrA pour la réduction des Met-(S)-SO libres. De plus, l'inactivation totale du gène *msrB* modifie très faiblement l'activité réductrice des extraits cellulaires sur les méthionines-R-sulfoxydes libres (Lin, *et al.*, 2007). Depuis, d'autres protéines ayant une activité méthionine sulfoxyde réductases ont été identifiées chez *E. coli* : fSMsr, MsrA1, Mem-R et S-Msr (Weissbach, *et al.*, 2005). Le mécanisme de réduction des méthionines oxydées par les Msr est identique pour tous les Msr et se déroule en trois étapes. La première étape (étape réductase) consiste en la formation d'un acide sulfénique au niveau du résidu cystéine catalytique avec la libération concomitante d'une méthionine. La deuxième étape correspond à la formation d'un pont disulfure conduisant à la libération d'H₂O. La dernière étape fait intervenir la thiorédoxine permettant la réduction du pont disulfure (Boschi-Muller, *et al.*, 2008).

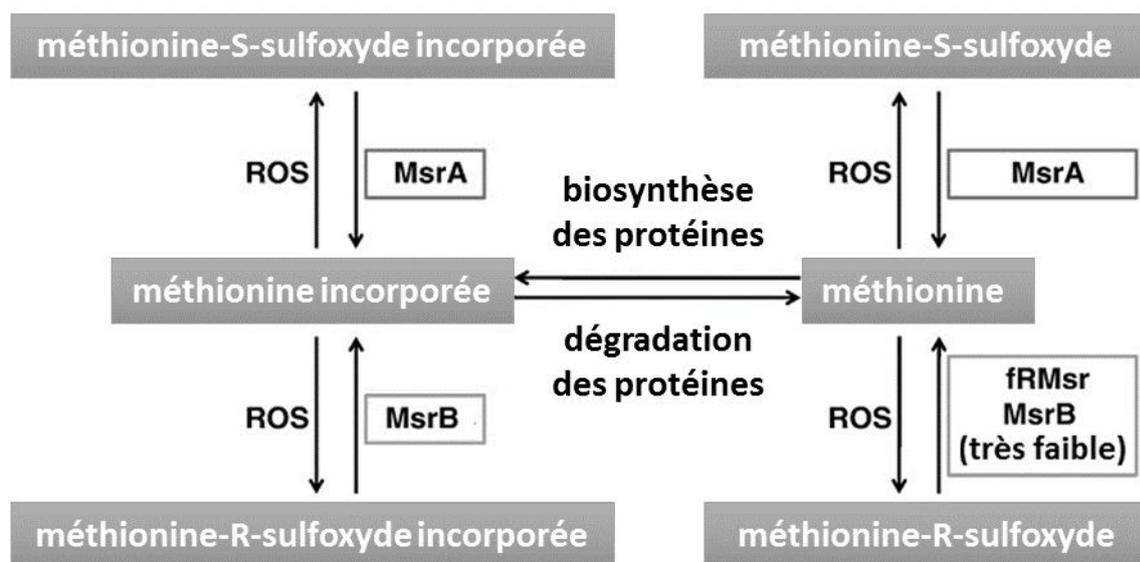


Figure 29: Activité réductrice de MsrA, MsrB et fRMs sur les méthionines sulfoxydes libres et incorporées (Lee, *et al.*, 2009)

III.6 Structures et organisation des gènes codant pour les Msr

Il existe une grande variété d'organisation des gènes codant pour les Msr. Chez un grand nombre de procaryotes, les gènes *msrA* et *msrB* forment deux unités de transcription distinctes. Chez *B. subtilis* et *S. aureus*, les gènes *msrA* et *msrB* forment un opéron (Kryukov, *et al.*, 2002). Chez le genre *Neisseria*, les gènes *msrA* et *msrB* sont fusionnés et codent pour une protéine ayant deux domaines Msr auxquels sont associés un troisième domaine de type thiorédoxine (Olry, *et al.*, 2005). En plus de l'organisation, le nombre de copies des gènes *msr* varient également entre les organismes : *E. coli* possède une copie de chaque gène ; les espèces appartenant au genre *Neisseria* possèdent trois copies de *msrA* et une seule copie de

msrB. Chez l'homme, le génome contient trois copies du gène *msrB* et une copie de *msrA* alors qu'*Arabidopsis thaliana* possède 5 copies orthologues de *msrA* et 9 de *msrB* (Kryukov, *et al.*, 2002). La redondance génétique est souvent associée à la nécessité d'un organisme d'avoir plusieurs allèles exprimés selon les différentes conditions qu'il rencontre. Les séquençages et clonages des gènes codant pour les méthionines sulfoxydes réductases ont permis de réaliser de nombreuses études sur le rôle de ces protéines.

III.7 Implication des Msr dans la résistance au stress oxydant

Chez *E. coli*, un mutant *msrA* a été construit (SK8779). Le taux de survie du mutant a été comparé à celui d'une souche sauvage (MC1061). Sur boîtes de Pétri, la souche mutante est plus sensible au peroxyde d'hydrogène que la souche sauvage (Moskovitz, *et al.*, 1995). L'activité enzymatique de MsrA est trois à quatre fois plus élevée quand il y a une source limitée de glucose et au cours de la croissance bactérienne depuis le milieu de la phase exponentielle jusqu'en phase stationnaire. Ces résultats suggèrent que MsrA est essentielle pour la croissance et la survie des bactéries en condition de stress oxydant (Moskovitz, *et al.*, 1995). Chez d'autres organismes, la délétion de *msrA* conduit systématiquement à une augmentation de la sensibilité au stress oxydant. Chez la souris, l'absence de *msrA* entraîne une accumulation tissulaire de protéines oxydées et une durée de vie plus courte en condition normale et de stress oxydant (atmosphère contenant 100% d'oxygène) (Moskovitz, *et al.*, 2001). Cette augmentation de la sensibilité au stress oxydant a également été observé chez la levure (Moskovitz, *et al.*, 1997) et *Mycobacterium bovis* (St John, *et al.*, 2001).

MsrB est également impliqué dans la résistance au stress oxydant. Chez *E. coli*, l'expression du gène *msrB* est positivement régulée par le petit ARN régulateur RhyB, régulant l'homéostasie intracellulaire du fer (Masse, *et al.*, 2005). MsrB est capable de se lier au fer, une source importante de superoxyde via la réaction de Fenton (Olry, *et al.*, 2005). Chez *E. coli*, *msrA* est donc exprimé de façon constitutive alors que l'expression de *msrB* est modulée par le stress oxydant.

III.8 Implication des Msr dans la pathogénicité bactérienne

En plus de leur rôle de protection contre le stress oxydant, les méthionines sulfoxydes réductases apparaissent être des facteurs de virulence importants chez plusieurs agents pathogènes.

III.8.1 Implication des Msr dans l'adhérence

Parmi les déterminants du pouvoir pathogène d'une bactérie, l'un des premiers facteurs est la capacité de se fixer et envahir ou coloniser l'hôte. L'étape de fixation est réalisée grâce à la présence de macromolécules à la surface de la bactérie. Plusieurs paramètres sont impliqués dans l'expression, le positionnement, l'assemblage et la maintenance de ces macromolécules. Des études ont montré que la protéine MsrA est impliquée dans la production d'adhésines fonctionnelles à la surface de *Neisseria gonorrhoeae* et *E. coli* (Wizemann, *et al.*, 1996). L'inactivation du gène *msrA* chez *N. gonorrhoeae* cause une réduction significative de la capacité de la bactérie à se fixer aux récepteurs glucidiques GalNAc β 1-4Gal des cellules eucaryotes présents sur les pneumocytes de type II et les cellules endothéliales. Chez *E. coli*,

la perte de MsrA est responsable de la perte de l'activité de type I fimbriae (structure adhérente répartie de façon péritriche) permettant la fixation de la bactérie aux érythrocytes (Wizemann, *et al.*, 1996).

III.8.2 Implication des Msr dans la formation de biofilms

Les biofilms sont des amas bactériens structurés fixés sur une surface biotique ou abiotique maintenus dans une matrice polymérique composée d'exopolysaccharides, de protéines et d'acides nucléiques. La formation de cette structure permet aux bactéries d'être plus résistantes à la réponse immunitaire de l'hôte et aux antibiotiques. Chez *E. coli*, l'expression de *msrA* est induite durant la formation d'un biofilm. L'absence de la protéine de MsrA affecte la capacité de cette bactérie à réaliser des biofilms (Beloin, *et al.*, 2003).

III.8.3 Implication des Msr dans la mobilité

La mobilité fait partie des facteurs de virulence car elle facilite la colonisation de l'hôte. Chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi*, le mutant *msrA* est plus sensible au stress oxydant mais il est aussi moins mobile sur des surfaces solides que la souche sauvage. De plus, cette étude a aussi montré que la virulence et l'invasion systémique du mutant étaient réduites (Hassouni, *et al.*, 1999).

Objectifs des travaux de thèse

Au sein de l'équipe SQPOV, plusieurs travaux ont révélé le lien entre la toxigenèse et le métabolisme cellulaire chez *B. cereus*. La quantité de toxines sécrétées varie en fonction des conditions de POR/oxygénation ainsi que de la quantité et source de carbone (Duport, *et al.*, 2004, Zigha, *et al.*, 2006, Clair, *et al.*, 2010, Laouami, *et al.*, 2011, Clair, *et al.*, 2012). Le pouvoir pathogène de *B. cereus* dépend de sa capacité à s'adapter aux différents environnements et à y produire des facteurs de virulence. En aérobiose, *B. cereus* met en place un métabolisme de type respiratoire en aérobiose ou de type fermentaire en anaérobiose et en absence de source de nitrates. En aérobiose, la chaîne de transport des électrons est la source majeure de ROS endogènes. En anaérobiose, ceux-ci sont générés à la suite du stress nutritionnel ou réducteur à bas POR. Les résidus méthionines des protéines intracellulaires sont connus pour être oxydés en méthionines sulfoxydes par les ROS endogènes. L'oxydation des résidus Met par les ROS est réversible du fait de l'activité réductrice des Msr. Pour une protéine donnée, le rapport Met(O)/Met est donc dépendant de la sensibilité des résidus Met aux ROS (qui est elle-même dépendante de la quantité de ROS présent) et de l'activité Msr.

Nous avons fait l'hypothèse que les résidus méthionines des protéines extracellulaires sont oxydés par les ROS avant leur exportation. Par ailleurs, les protéines extracellulaires étant exportées sous formes dépliées, elles pourraient être des cibles privilégiées pour les Msr. Pour tester la 1^{ère} hypothèse, nous avons évalué la dynamique des méthionines sulfoxydes (Met(O)) dans l'exoprotéome de *B. cereus* souche ATCC 14579/pBclin15 au cours de la croissance à différents potentiels d'oxydo-réduction en aérobiose et anaérobiose.

Pour tester la seconde hypothèse, nous avons construit une souche ne synthétisant plus la méthionine sulfoxyde réductase MsrAB. La construction de cette souche s'est accompagnée de la perte du plasmide cryptique pBclin15. Nous avons donc cherché à déterminer l'implication de ce plasmide dans le métabolisme de *B. cereus* en comparant les protéomes et exoprotéomes de la souche sauvage et la souche Δ pBclin15.

La dynamique des Met(O) et l'implication de MsrAB dans cette dynamique ont été analysées en comparant (i) les teneurs en Met(O) des protéomes et exoprotéomes de la souche sauvage dans différentes conditions d'oxygénation et de POR et en comparant (ii) les teneurs en Met(O) des protéomes et exoprotéomes du mutant Δ msrAB et de la souche Δ pBclin15 en aérobiose dans un premier temps, puis en anaérobiose sous flux d'azote par la suite.

MATERIELS ET METHODES

1. Les souches de *B. cereus*

Quatre souches de *B. cereus* ont été utilisées :

- La souche de référence ATCC 14579 isolée dans une étable par Frankland (Frankland & Frankland, 1887). Cette souche possède un seul plasmide : le plasmide pBClin15. La séquence du chromosome et du plasmide sont entièrement établies (Ivanova, *et al.*, 2003).
- La souche ATCC 14579 curée du plasmide pBClin15 (Δ pBClin15) (Madeira, *et al.*, 2016) en utilisant la méthode décrite par Voros (Voros, *et al.*, 2013).
- Le mutant Δ *msrAB* construit dans le cadre du travail présenté. Le gène *msrAB* de la souche ATCC 14579 a été interrompu par la cassette de résistance à la spectinomycine.
- Le mutant complémenté Δ *msrAB* (pHT304-*msrAB*) construit dans le cadre du travail présenté en insérant une copie de *msrAB* avec son promoteur dans le plasmide pHT304.

Les souches sont conservées à -80°C dans du glycérol 30% (w/v).

1.1 Construction du mutant Δ *msrAB*

Le gène *msrAB* avec ses régions flanquantes (288 pb en 5' et 127 pb en 3') a été amplifié par PCR à partir d'extraction d'ADN génomique de *B. cereus* souche ATCC 14579 obtenu en suivant le protocole décrit par Guinebretière et Nguyen-The (Guinebretière & Nguyen-The, 2003). Les séquences des amorces sont :

- Pour l'amorce sens : 5'-gaattcTCATGCGCTTGAAAGTTACG-«3' avec un site de restriction *EcoRI*
- Pour l'amorce anti-sens : 5'-agatctTTGGCGTAACGGTAATTGGT-3' avec un site de restriction *BglII*

Le kit PCR pour l'amplification du fragment d'ADN de 1401 kpb contenant le gène *msrAB* est AmpliTaq® PCR Products (ThermoFisher). Le programme du thermocycleur est le suivant :

Dénaturation initiale	94°C	2 min	} 35 cycles
Dénaturation	94°C	1 min	
Hybridation des amorces	45°C	1 min	
Elongation	72°C	2 min	
Elongation finale	72°C	7 min	
Température finale	10°C	∞	

La taille des produits PCR est estimée après migration (100 V) sur gel d'agarose 1% dans une solution tampon de TAE (40 mM Tris, 0.1 % acide acétique, 2 mM EDTA, pH 8.5). Le marqueur de poids moléculaire est le Smart Ladder de chez Eurogentec. Le gel est coloré dans un bain de bromure d'éthidium (0,2 μ g/ml) puis visualisé sous lumière UV. Le produit PCR est ensuite extrait et purifié à l'aide du Kit de purification High Pure PCR Product (Roche). Le produit PCR est cloné dans le vecteur pCR®-XL-TOPO® 3.5 kb (Invitrogen) en respectant les instructions du fournisseur, générant ainsi le plasmide pCRXL*msrAB*. Des cellules d'*E. coli* chimio-compétentes (One Shot® competent cells) ont ensuite été transformées avec la construction pCRXL*msrAB*.

Les clones bactériens transformés ont été sélectionnés sur boîte de gélose LB contenant de la kanamycine (Km, 50 µg/ml). Après une mise en culture de 24 h dans du milieu LB liquide + Km des colonies, les plasmides ont été extraits à l'aide du kit « PureYield™ Plasmid Miniprep » (Promega) en respectant les consignes du fournisseur. Les plasmides sont digérés par *StuI* pour insérer la cassette de résistance à la spectinomycine (Murphy, 1985) provenant du plasmide pDIA (Laouami, *et al.*, 2011). Cette cassette *spc* de 1,5 kpb est libérée du plasmide pDIA par digestion avec *SmaI*. Le plasmide résultant pCRXL-*msrAB*Δ*spc* subit une double digestion par *EcoRI* et *BglIII*. Le fragment *msrAB*-Δ*spc**msrAB* est ensuite inséré entre les sites correspondant du plasmide pMAD (Arnaud, *et al.*, 2004). Le plasmide résultant est introduit chez *B. cereus* ATCC14579 par électroporation en utilisant l'appareillage « Gene Pulser II System » (Bio-Rad). Le gène disrupté *msrAB*Δ*spc* est ensuite intégré dans le génome à la place de la copie sauvage par recombinaison homologue (Arnaud, *et al.*, 2004). La recombinaison est confirmée par PCR en utilisant les oligonucléotides précédemment décrits.

1.2 Complémentation du mutant Δ*msrAB*-Construction de la souche Δ*msrAB*/pHT304-*msrAB*

Le gène *msrAB* avec ses régions flanquantes (288 pb en 5' et 127 pb en 3') a été amplifié par PCR (cf 1.1) pour ensuite être cloné dans le plasmide pCR®-XL-TOPO®. Le fragment PCR est digéré par *EcoRI* puis ligaturer sur les mêmes sites de coupure du plasmide digéré pHT304 (Arantes & Lereclus, 1991). L'intégrité de l'insert du vecteur recombinant a été vérifié par séquençage et le vecteur a été utilisé pour transformer la souche Δ*msrAB*.

2. Les milieux de culture

Tableau 5: Composition du milieu MOD

Constituants	concentration en g/L
K ₂ HPO ₄	1.000
(NH ₄) ₂ SO ₄	6.000
MgSO ₄	0.040
Arginine	0.460
Acide aspartique	0.910
Cystéine	0.040
Acide glutamique	2.000
Glycine	0.390
Histidine	0.360
Isoleucine	0.700
Leucine	1.370
Lysine	1.180
Méthionine	0.400
Phénylalanine	0.280
Sérine	0.660
Thréonine	0.710
Tyrosine	0.042
Valine	0.910

2.1 Le milieu MOD

Le milieu de culture utilisé en fermenteur est un milieu chimiquement défini riche en acides aminés (**Tableau 5**). Le pH est ajusté à 7,2 avec une solution de KOH 2M avant autoclavage. Le glucose stérilisé par filtration est ajouté après autoclavage pour obtenir une concentration finale de 30 mM.

2.2 Le milieu LB

Le milieu LB (lysogeny broth) est un milieu de culture empirique nutritif développé par Bertani (Bertani, 1951). Ce milieu est composé de 10 g/L de peptone, 5 g/L d'extrait de levures et 10 g/L de NaCl.

3. Les conditions de culture

3.1 Culture en conditions non contrôlées

Les cultures en Erlenmeyer ont été réalisées en aérobiose et anaérobiose. Pour l'aérobiose, l'espace de tête correspondait à 9/10 du volume total de l'Erlenmeyer. Pour les cultures en anaérobiose, l'espace de tête correspondait à la moitié du volume total de l'Erlenmeyer. L'anaérobiose a été obtenue par la disposition d'un bouchon à jupe rabattable de 30,7 mm de diamètre et un bullage d'une heure sous flux d'azote filtré. Les cultures ont été incubées à 37°C dans un incubateur (Thermo Scientific™ MaxQ™ 4000 Benchtop Orbital Shakers) avec une agitation de 200 tours par minute. Les pré-cultures sont inoculées avec des cellules qui ont été isolées sur boîte de gélose LB et incubées 24 h à 37°C.

3.2 Culture en conditions contrôlées

Les cultures en batch ont été réalisées dans un fermenteur en verre de 3 litres (BioFlo®/CelliGen®115, New Brunswick Scientific) avec un volume initial de 2 litres de milieu de culture. Ce fermenteur était équipé d'une sonde de température de série, d'une sonde polarographique à oxygène (Mettler Toledo), d'une sonde pH (Mettler Toledo) et d'une sonde d'oxydo-réduction (AgCl, Mettler Toledo). Avant autoclavage 20 minutes à 121°C, la sonde pH est étalonnée sur le moniteur à pH 4 puis pH 7 jusqu'à stabilisation des valeurs affichées. Pour la sonde d'oxydo-réduction, une mesure de contrôle est réalisée avant l'autoclavage dans de l'eau de robinet (Abraham, *et al.*, 2013) après polissage de la partie métallique avec de la poudre d'alumine (Durmax). La sonde polarographique à oxygène est étalonnée après autoclavage en faisant buller de l'azote (0 % d'oxygénation) puis de l'air (100 % d'oxygénation) jusqu'à stabilisation des valeurs. Pour l'anaérobiose, c'est dans l'ordre inverse que l'étalonnage est réalisé. Le fermenteur est relié à un cryostat (Polystat, Bioblock Scientific) pour fonctionner en circuit fermé et stabiliser la température.

Les conditions et paramètres de culture sont :

- Température : 37°C
- Agitation : 300 rpm
- pH : 7,2 (régulé par une pompe péristaltique reliée à une solution de KOH 2 M)
- débit de gaz : 1150 ccm (centimètre cube par minute) pour la condition aérobiose (flux d'air ambiant) et 300 ccm pour l'anaérobiose (flux d'azote et d'hydrogène).

Les cultures en fermenteurs sontensemencées à partir de pré-cultures réalisées en Erlenmeyer. Les cellules de la pré-culture sont lavées trois fois dans du milieu MOD avant leur inoculation dans le fermenteur. La quantité de cellules à injecter est calculée pour avoir une DO initiale dans le fermenteur de 0,02.

4. Suivi de la croissance et prélèvements

4.1 Mesure du taux de croissance bactérienne μ_{\max}

La croissance a été suivie en mesurant la densité optique (DO) à 600 nm toutes les 30 minutes. La croissance bactérienne est ensuite modélisée selon l'équation modifiée de Gompertz (Zwietering, *et al.*, 1990).

4.2 Dénombrement et détermination de la biomasse bactérienne

Pour chaque souche bactérienne, un prélèvement a été réalisé en phase exponentielle, phase de ralentissement et phase stationnaire pour réaliser un étalement sur milieu LB et déterminer la biomasse. Pour l'étalement, des dilutions sérielles de 10^{-1} à 10^{-9} ont été effectuées dans du tampon phosphate à 0,1 M. Les boîtes de Pétri sont incubées une heure à l'étuve à 30°C avant le dénombrement des unités formant des colonies (UFC). La biomasse est déterminée après filtration de 50 ml de culture avec une unité de filtration équipée d'un filtre à membrane en acétate de cellulose de 0,20 μM de porosité (Sartorius) et reliée à une pompe à vide. 150 ml d'eau physiologique sont ajoutés pour s'assurer du dépôt de toutes les bactéries sur le filtre. Le filtre est ensuite délicatement récupéré de l'unité de filtration puis placé dans une boîte de Pétri maintenue légèrement ouverte. Le fond est recouvert de parafilm (Parafilm M® Brand Products) pour éviter une adhésion du filtre pendant le séchage. La durée de séchage est de 5 jours (jusqu'à stabilisation de la masse) dans une étuve à 37°C.

4.3 Prélèvements des surnageants cellulaires et récoltes des cellules bactériennes

Trois prélèvements de 200 ml sont réalisés au cours de la culture: en phase exponentielle, en phase de ralentissement puis en phase stationnaire (**Figure 30**). Ils sont déterminés à partir d'une première croissance réalisée en fermenteur dans les mêmes conditions que les triplicats biologiques. Le prélèvement en phase exponentielle correspond au μ_{\max} et se situe à une DO de 0,1. La phase de ralentissement correspond au rapport sur la courbe de croissance du point d'intersection entre la tangente du point de prélèvement au μ_{\max} et à celle de la phase stationnaire.

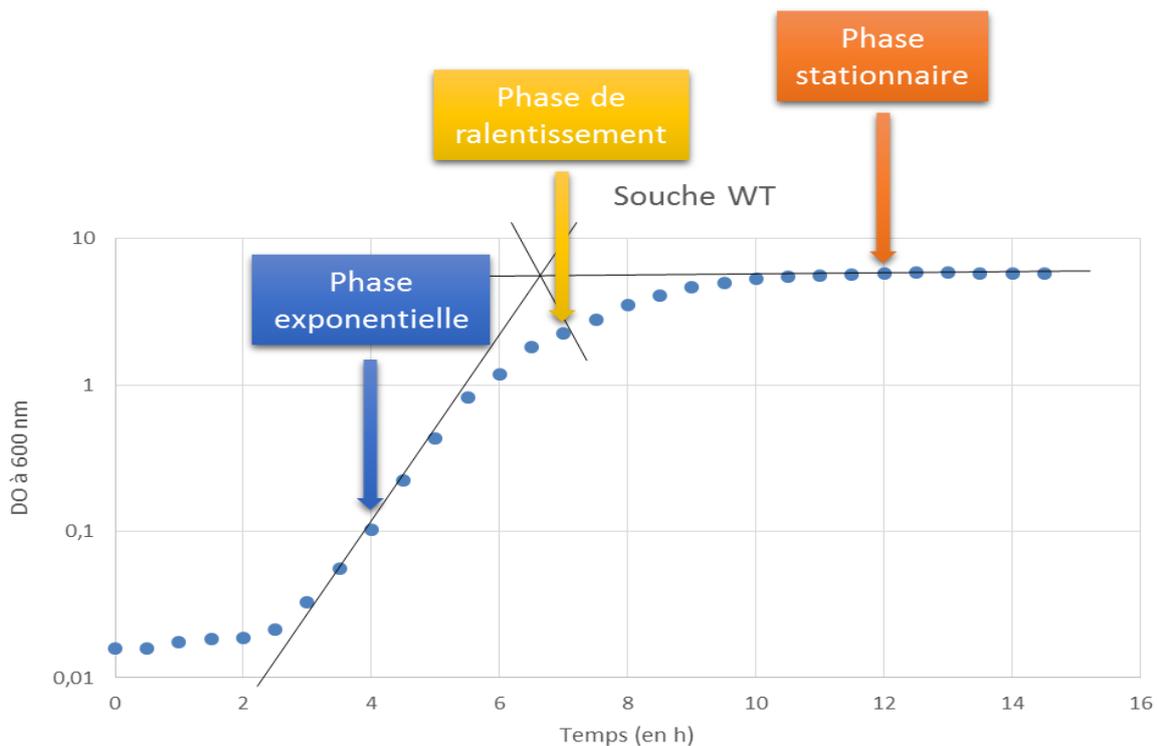


Figure 30: Représentation sur la courbe de croissance de la souche sauvage (WT) des trois prélèvements réalisés en phase exponentielle, phase de ralentissement et phase stationnaire

Le prélèvement en phase stationnaire est réalisé 90 minutes après que la DO reste stable. Ces prélèvements sont réalisés dans des bouteilles à centrifuger en PPCO (Translucent Polypropylene Copolymer) de 250 ml (Thermo Scientific Nalgene®). Les cultures sont stoppées en fin de phase stationnaire après le dernier prélèvement. Un montage a été mis en place pour à la fois réaliser des prélèvements de gros volumes en peu de temps mais aussi pour qu'il y est un flux de gaz identique dans le fermenteur et la bouteille à centrifuger.

Les cellules et le surnageant sont séparés par centrifugation à 10000 g pendant 10 min à 4°C. Le culot cellulaire est immédiatement congelé à -20°C après remise en suspension dans 30 ml de PBS 1X froid. Le milieu extracellulaire est filtré successivement avec des filtres à membrane en acétate de cellulose de 0.85, 0.45 et 0.20 µm de porosité via des unités de filtration. 80 ml sont utilisés pour l'analyse en spectrométrie de masse. 40 ml sont précipités avec du TCA 50%. Le tube de 50 ml est inversé 5 fois puis centrifugé à 7000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé puis une nouvelle centrifugation est réalisée à 2500 g pendant 2min (2 à 3 fois) pour éliminer au maximum le TCA. Le culot est remis en suspension dans 40 µl de PBS 1X. Pour neutraliser le TCA, la suspension est transvasée dans un microtube de 1,5 ml. Il est placé bouchon ouvert dans une boîte hermétique avec 400 µl d'ammoniaque sur du papier buvard pendant 1h avant d'être congelé à -20°C. Le surnageant filtré restant est conditionné en plusieurs aliquotes puis congelé à -20°C pour le dosage du glucose, des métabolites, des protéines et de l'activité protéasique du surnageant.

5. Les techniques de biochimie

5.1 Dosage du glucose et des métabolites

A partir des surnageants filtrés conservés à -20°C, les concentrations de glucose, acétate, lactate, succinate, formiate et éthanol ont été déterminées par dosage enzymatique en utilisant les kits Roche (Meylan, France) et en respectant les instructions du fabricant. Pour le dosage de chaque échantillon, un dupliquât technique est réalisé.

5.2 Dosage de Bradford

La concentration des échantillons de surnageant filtré a été déterminée par dosage colorimétrique à 600 nm en utilisant le kit Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay. La gamme étalon a été réalisée avec de la BSA (bovine serum albumine) de $7,81 \cdot 10^{-3}$ mg/ml à 2,00 mg/ml. Pour chaque échantillon, un dupliquât technique est réalisé.

5.3 Détermination de l'activité protéasique du surnageant

L'activité protéasique du surnageant filtré a été déterminée par dosage colorimétrique à 660 nm en utilisant le kit « Universal Protease Activity Assay » (Sigma) et en utilisant comme appareil de mesure le BMG FLUOstar OPTIMA. La tyrosine libérée par digestion de la caséine réagit avec le réactif de Folin-Ciocalteu pour produire un chromophore de couleur bleue, qui est quantifiable en mesurant l'absorbance au spectrophotomètre. Pour chaque échantillon, un dupliquât technique est réalisé.

5.4 Précipitation des protéines extracellulaires

Pour chaque prélèvement, 3 x 40 ml des fractions filtrées sont précipités en ajoutant 10 ml de TCA 50%. Les flacons de 50 ml sont inversés 5 fois puis conservés à 4°C. Pour les prélèvements de culture en anaérobiose, après centrifugation, ces étapes sont réalisées en chambre anaérobie. Une fois la précipitation achevée au TCA, une centrifugation à 7000 g pendant 10 min à 4°C est réalisée. Le surnageant est éliminé puis une nouvelle centrifugation est réalisée à 2500 g pendant 2 min (2 à 3 fois) pour éliminer le maximum de liquide. Le culot est remis en suspension dans 40 µl de LDS 1X + β-mercaptoéthanol (solution mère à 4X, Invitrogen). Les échantillons sont ensuite conservés à 4°C.

5.5 Extraction des protéines intracellulaires

Après décongélation totale au cours de la nuit à 4°C, 12 ml sont prélevés pour chaque échantillon issu de la phase exponentielle et 6 ml pour ceux issus de la phase de ralentissement et stationnaire. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est éliminé puis 1 ml de tampon final est ajouté dans chaque tube. Le tampon de lyse 9X est composé d'urée à 8.75 M, de thio-urée à 2.5 M et de CHAPS 5%. Le DTT (50 mM), spermine base (25 mM) et un comprimé de minicocktail antiprotéase (Roche, 1 comprimé pour 10 ml) sont ajoutés extemporanément. Le tampon est ensuite dilué au 1/9 dans du Tris/HCl ajusté à pH 7.5 pour obtenir le tampon de lyse final.

L'ensemble est transféré dans des tubes stériles de 2.5 ml contenant 400 mg de billes de 0.1 mm de zirconium (VWR). Les tubes sont placés dans un Precelys24 (Bertin). Le programme est : 6500 tours pendant 20 secondes. Ce programme est réalisé trois fois avec 5 secondes de

latence entre chaque répétition. Après 30 minutes à température ambiante, 600 µl sont récupérés dans un tube stérile. 1 ml de tampon final est ajouté dans le tube contenant les billes. Le tube est ensuite centrifugé 4 minutes à 3500 g à une température de 4°C avant de récupérer 1 ml de l'extraction. Cette étape est répétée deux fois. Le volume final de l'échantillon est de 3,6 ml. Un dosage de Bradford est réalisé pour chaque échantillon. Selon la concentration, les échantillons sont dilués dans du PBS 1X contenant du β-mercaptoéthanol ou concentrés par précipitation au TCA pour obtenir 40 µg de protéines repris dans 30µl de LDS 1X.

5.6 Préparation des échantillons protéiques

5.6.1 Migration sur gel

20 µl des échantillons extra- et intracellulaires sont chargés dans des gels pré-coulés 4-12% gradient 10-dents NuPAGE (Invitrogen). Le marqueur de poids moléculaire est le SeeBlue Plus 2 (Invitrogen) dont 10 µl sont déposés dans un puit. Le tampon de migration est le NuPAGE MES SDS Running Buffer préparé à partir d'une solution mère 20X. Avant migration, 500 µl d'antioxydant (Invitrogen) sont ajoutés dans le bain de migration contenant un volume d'environ 200 ml de tampon de migration. La migration est de l'ordre de 3 à 5 minutes à un voltage constant de 200 V.

Les gels sont ensuite rincés trois fois pendant 5 minutes sous faible agitation avec de l'eau Milli-Q. Ils sont ensuite colorés avec une dose de Simply Blue Safe Strain (Invitrogen) pendant une heure sous faible agitation. Après un premier rinçage à l'eau Milli-Q puis un lavage, les gels sont conservés toute la nuit à 4°C.

5.6.2 Digestion trypsique « *in gel* »

Après la migration sur gel des échantillons et l'étape de coloration, les bandes protéiques sont découpées en éliminant le surplus de gel. Chaque bande correspondant à un échantillon est ensuite coupée en deux. Les morceaux de gel sont placés dans une plaque 96 puits pour subir une première étape de lavage/déshydratation successive à l'eau Milli-Q, à l'acétonitrile 50 mM puis à l'acétonitrile pur. Les morceaux de gels déshydratés sont ensuite séchés au SpeedVac pendant deux minutes. Pour la réduction et l'alkylation des ponts disulfures, les solutions de DTT à 25 mM et d'iodoacétamide à 55 mM sont préparés extemporanément dans du tampon de bicarbonate d'ammonium à 50 mM. Ces solutions sont conservées dans de la glace et à l'abri de la lumière pour l'iodoacétamide. Les fractions de gels sont réhydratées avec la solution de DTT à 25 mM puis incubées pendant 10 minutes à 56°C. Le surnageant est ensuite éliminé. La solution d'iodoacétamide à 55 mM est ajoutée dans chaque puit. La plaque est incubée 10 minutes à température ambiante et dans le noir sous une agitation de 500 tours par minute. Après élimination du surnageant, les fractions de gels sont déshydratées à l'acétonitrile comme précédemment puis séché au SpeedVac. Pour la digestion trypsique, deux solutions sont préparées : une solution enzymatique contenant 10 ng/µl de trypsine Gold (Promega) dans 0.1% ProteaseMAX™ surfactant : 50 mM NH₄HCO₃ et une solution de 0.01% ProteaseMAX™ surfactant : 50 mM NH₄HCO₃. Toute l'étape de la préparation de la digestion trypsique se déroule sur de la glace. Les fractions de gels sont réhydratées avec 20 µl de la

solution enzymatique. Après pénétration de la solution (environ 15 minutes), le surnageant est retiré puis 50 µl de la deuxième solution sont ajoutés. La plaque est ensuite incubée pendant deux heures à 37°C.

Pour la dernière étape d'extraction des peptides, on ajoute 10 µl de TFA 5% pour inactiver la trypsine dans chaque puit après avoir regroupé les échantillons (volume total : 100 µl). Les échantillons sont ensuite dilués au 1/20 dans du TFA 0,1% avant le passage dans le spectromètre de masse.

5.7 Analyse par spectrométrie de masse en tandem

5.7.1 Principe de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). De plus, la spectrométrie de masse permet de caractériser la structure chimique des composés par fragmentation.

Le spectromètre de masse comporte toujours :

- une source d'ionisation où se produit l'ionisation-désorption des analytes
- un analyseur séparant les ions selon leur rapport masse sur charge (m/z)
- un détecteur convertissant le courant ionique en courant électrique
- un système de traitement informatique pour analyser les spectres

Pour améliorer les performances du spectromètre de masse, il est souvent couplé avec une méthode de séparation d'un mélange comme la chromatographie en phase gazeuse (CPG) ou en phase liquide (CPL ou LC pour liquid chromatography). Les performances d'un spectromètre de masse sont définies par :

- sa résolution : capacité de l'instrument à séparer des ions de masses voisines. Plus la résolution est élevée, plus la différence entre deux signaux distincts est faible.
- sa sensibilité : capacité à mesurer des petites quantités (de l'ordre de l'attomole)
- son exactitude : capacité à mesurer la masse exacte des ions. C'est le ratio du rapport m/z mesuré sur la valeur réelle du m/z . Il est exprimé en ppm (parts-per-million, 10^{-6})
- son domaine de masse : échelle dans laquelle le spectromètre de masse réalise les mesures, e.g. 50-2000 m/z .

5.7.2 La spectrométrie de masse en tandem

La spectrométrie de masse en tandem (mass spectrometry ou MS/MS en anglais) combine deux analyseurs permettant d'obtenir une meilleure résolution de masse et une caractérisation de la structure chimique des mélanges peptidiques complexes des échantillons. Au cours de mes travaux de thèses, nous avons utilisé un LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific) couplé à un HPLC (high performance liquid chromatography) UltiMate® 3000 Nano LC systems (Dionex-LC Packings).

5.7.3 Analyse des échantillons par nanoLC-MS/MS

Après digestion tryptique, un volume suffisant de chaque échantillon est déposé dans l'insert en verre contenu dans les flacons du passeur d'échantillons. 5 µl sont chargés et dessalés dans une pré-colonne en phase reverse (Acclaim™ PepMap™ 100 C18, taille de billes : 5 µm, taille de pores : 100 Å, 5 mm x 300 µm) à un débit de 0,3 µl par minute, puis séparés sur une colonne capillaire (nanoscale Acclaim PepMap100 C18 3 µm, 100 Å, 75 µm i.d. x 50 cm) avant l'injection dans la trappe ionique linéaire. Les peptides sont résolus en utilisant un gradient de 90 minutes allant de 4 à 48 % d'un solvant B (0,1% HCOOH dans CH₃CN/ H₂O 80/20) (solvant B / solvant A). Le solvant A est composé de 0,1% HCOOH dans H₂O. La gamme de masse est de 300-1800 m/z. Il y a exclusion dynamique des ions sélectionnés (ions parents) par la trappe ionique linéaire vers la cellule de collision. La fragmentation MS/MS des trois ions les plus abondants sont ensuite réalisés dans la trappe ionique linéaire (Clair, *et al.*, 2010).

5.7.4 Traitements des données

En sortie du spectromètre de masse, les résultats sont enregistrés en format. RAW. Le logiciel utilisé pour l'analyse des spectres est Mascot Daemon (version 2.3.2) (Perkins, *et al.*, 1999). La base de données utilisée pour l'identification des polypeptides a été construite à partir des données d'annotations génomiques du chromosome (NC_004722) et du plasmide pBClin15 (NC_004721) de la souche ATCC 14579 (Ivanova, *et al.*, 2003). Les paramètres utilisés sont : une tolérance de masse des ions parents de 5 ppm avec une tolérance sur les spectres MS/MS de 0,6 Da et l'absence maximale de digestion tryptique au niveau des sites de coupures (missed cleavages en anglais abrégé MC) de 2. La carboxyamidométhylation des résidus cystéines (+57.0215) est paramétrée comme une modification fixe et l'oxydation des méthionines (+15.9949) comme une modification post-traductionnelle variable. Le logiciel Mascot génère ensuite des fichiers en format .DAT. Les résultats sont ensuite filtrés par le logiciel IRMaBatch (version 1.28.0) (Dupierris, *et al.*, 2009) qui génère des fichiers en format Excel directement exploitables.

6. Les analyses statistiques

6.1 Les analyses statistiques descriptives multidimensionnelles

En statistique, les analyses multivariées ont pour but de synthétiser l'information issue de plusieurs variables. Dans notre cas, les tableaux de données contiennent jusqu'à 922 protéines (variables). Il existe deux méthodes d'analyses : les méthodes explicatives et les méthodes descriptives. Les méthodes explicatives visent à expliquer une variable en fonction de deux ou plusieurs variables. Les méthodes descriptives permettent de structurer et simplifier un tableau de données contenant plusieurs variables sans privilégier l'une d'entre elles en particulier. Les valeurs de nos variables sont exprimées en nombre de spectres et sont donc des variables quantitatives. La méthode adaptée pour l'analyse de nos données est l'analyse en composantes principales (ACP). Ces analyses consistent en un regroupement des variables selon leur variance en plusieurs composantes principales. Avant les analyses, les données sont centrées et réduites. Le principe de l'ACP est de réduire le nombre d'axes correspondant aux n protéines pour faciliter l'analyse des données. Ces nouveaux axes sont appelées composantes principales. Chaque composante principale correspond à une combinaison

linéaire de plusieurs anciens axes (anciennes variables). Les composantes principales sont classées selon leur inertie (valeur propre) du plus grand au plus petit. Ainsi, la 1^{ère} composante principale regroupe un plus grand nombre de protéines que les composantes suivantes. Chaque variable regroupée dans une composante principale est caractérisée par un coefficient de corrélation variant entre -1 et 1 et une *p*-value. Cette transformation permet de résumer l'information redondante d'un tableau pour pouvoir décrire/explorer un jeu de données (data mining) et interpréter les résultats en mettant en corrélation le regroupement des variables (protéines) en fonction de celui des individus (les échantillons). De plus, la représentation de la projection des individus sur le plan factoriel des composantes donne le moyen de s'assurer du bon regroupement des 3 réplicats biologiques. Les ACP ont été réalisées avec le package FactoMineR (Lê, *et al.*, 2008) sous R (version 3.2.0). Chaque variable a un poids affecté identique de 1 grâce à l'argument `scale.unit` du package.

6.2 Les classifications hiérarchiques

Une classification hiérarchique a été réalisée dans certains cas à partir des composantes principales. Cette classification permet de classer les protéines selon *k* catégories correspondant à trois réplicats biologiques d'une phase de croissance. Elle met en avant les protéines dont l'abondance est phase dépendante.

6.3 Les analyses d'abondances des protéines

Les analyses d'abondances des protéines ont été réalisées avec le package LIMMA (linear models for microarray data) (Ritchie, *et al.*, 2015) en utilisant la méthode voom (acronyme de « variance modeling at the observational level ») (Law, *et al.*, 2014). LIMMA est un test statistique linéaire populaire parmi le plus utilisé dans la littérature pour déterminer les différences d'expressions des gènes. Il est performant pour toutes les tailles de données et pour tous les types de distribution. Nos données sont des données quantitatives discrètes qui suivent une distribution binomiale négative (tests non paramétriques). La méthode voom permet d'appliquer ce test statistique aux données d'abondances des protéines en transformant les données quantitatives discrètes en données quantitatives continues. Les données de spectrométrie de masse consistent en une matrice de nombres de spectres r_{pi} , pour chaque échantillon $i=1$ à n , et chaque protéine $p=1$ à P . Cette méthode permet de définir à partir du nombre de spectres de chaque protéine pour chaque échantillon une valeur de log-cpm (log-counts per million) selon la formule suivante :

$$Y_{pi} = \log_2 \left(\frac{R_{pi} + 0,5}{R_i + 1,0} \times 10^6 \right) \text{ avec } R_i = \sum_{p=1}^P r_{pi}$$

L'addition de 0,5 sur le nombre de spectres permet d'éviter d'avoir un log de 0 pour les protéines non observées dans un échantillon et de réduire la variabilité du log-cpm pour les protéines peu observées. L'addition de 1 à la somme totale du nombre de spectres permet de s'assurer que $(R_{pi} + 0,5) / (R_i + 1,0)$ est strictement inférieur à 1 et strictement supérieur à 0. De plus, la méthode voom permet d'estimer la relation moyenne-variance et de générer un

poids précis pour chaque échantillon afin de les normaliser. Le log-cpm de chaque observation et le facteur de normalisation pour chaque échantillon sont pris en compte dans le processus de modélisation linéaire pour ajuster l'hétéroscédasticité. Le package EdgeR (Robinson, *et al.*, 2010) est utilisé pour pouvoir implémenter des tests non paramétriques dans LIMMA mais aussi identifier les groupes correspondant aux réplicats biologiques avec l'argument « DGEList ». A la sortie du test statistique, nous avons les valeurs de fold-change de chaque protéine pour chaque matrice de comparaison et la valeur de p -value associée. Il est également possible d'avoir la p -value ajustée à l'ensemble des matrices de comparaison (comparaison multiples) et de calculer le seuil de significativité (B-value ou log-odds) en utilisant une méthode de correction (Holm, Hochberg, Hommel, Bonferroni, FDR, BH ou BY).

7. Quantification relative de l'expression des gènes *msr* par RT-PCR

7.1 Extraction des ARN totaux

Pour l'extraction des ARN, 6 ml de culots cellulaires sont utilisés pour les prélèvements de la phase exponentielle et 3 ml pour ceux de la phase de ralentissement et stationnaire. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 5 minutes à 9000 rpm à 4°C. Le culot est repris avec 1 ml de Tri reagent froid (Ambion) sous une hotte chimique. La suspension est ensuite transférée dans un tube stérile contenant des billes en verre du kit Precellys VK05 (Bertin). Les échantillons sont passés 3 fois au Precellys pendant 45 secondes à une vitesse de 6500 tours. A la fin du cycle, 200 µl de chloroforme sont ajoutés dans chaque tube. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, une centrifugation est réalisée à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. La phase aqueuse est récupérée dans des tubes stériles garanti sans RNase de 2 ml. 500 µl d'isopropanol sont ajoutés dans les tubes et une deuxième centrifugation à 13000 rpm pendant 8 minutes à 4°C est réalisée. Le surnageant est éliminé puis le culot est lavé avec 1 ml d'éthanol froid à 75%. Après une troisième centrifugation à 13000 rpm pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé puis le culot est séché pendant 5 minutes sous une hotte chimique. Le culot est remis en suspension dans 50 µl d'eau « nuclease-free ». Des aliquotes des ARN totaux sont réalisés avant la conservation des échantillons à -80°C.

7.2 Elimination de l'ADN contaminant

L'élimination de l'ADN dans les échantillons est obtenue en utilisant le kit RNase-Free DNase Set (Qiagen) et en respectant les instructions du fabricant. A la fin de la purification, les ARN sont dosés au NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific).

7.3 Evaluation de la qualité des ARN

La quantité et l'intégrité des ARN ont été vérifiées avec le bioanalyseur 2100 Agilent en utilisant le kit Agilent RNA 6000 Nano Quick Start et en respectant les instructions du fabricant.

7.4 Quantification relative des gènes *msrAB* et *msrA* par RT-qPCR

La RT-PCR a été réalisée en utilisant le kit iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step (Bio-Rad) et un appareil MiniOpticon Real-Time PCR System (Bio-Rad). Les paires d'amorces utilisées sont présentées dans le **Tableau 6**.

Tableau 6: Liste des amorces utilisées lors des RT-qPCR

Amorces	Séquences
16S-F	GGTAGTCCACGCGTAAACG
16S-R	GACAACCATGCACCACCTG
msrAB-F	TTCTGGTACACAGGTGGTC
msrAB-R	AAAGCGTCCACTCTGCTCAA
msr2-F	TCCA ACTGATGGCGGAC
msr2-R	TCACGCCAGATTCTTTTGC

F pour forward : amorces sens

R pour reverse : amorces anti-sens

RESULTATS

CHAPITRE I – Rôle des résidus méthionines des protéines extracellulaires de *B. cereus* dans le maintien de l'homéostasie redox

I.1 Problématique

B. cereus est une bactérie aéro-anaérobie facultative à Gram positif ubiquiste pouvant s'adapter à de nombreux environnements et s'y développer. C'est un agent pathogène capable de produire tout un éventail de protéines extracellulaires dans son milieu environnant (Gilois, *et al.*, 2007). Les composants majoritaires des protéines extracellulaires de *B. cereus* sont les toxines ($\approx 35\%$, estimé par spectrométrie de masse), les enzymes de dégradation/adhésines ($\approx 21\%$) et les protéines flagellaires (17%). Ces familles fonctionnelles de protéines sont reconnues comme étant impliquées dans la virulence.

En fonction des conditions de POR et d'oxygénation, *B. cereus* adapte son métabolisme. En aérobiose, *B. cereus* utilise l'oxygène moléculaire (O_2) pour la respiration. Au cours de ces processus, des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) peuvent être produits (Nieselt, *et al.*, 2010). En anaérobiose, des ROS peuvent aussi être générées à la suite d'un stress réducteur à bas POR (Clair, *et al.*, 2012). Dans toutes les conditions, l'entrée en phase stationnaire engendre un passage du métabolisme primaire vers un métabolisme secondaire en réponse à un stress nutritionnelle ou à cause de l'accumulation de ROS au niveau intracellulaire (Mols, *et al.*, 2007).

Les cibles des ROS sont les glucides, l'ADN, les protéines et les lipides. Au niveau intracellulaire, les protéines représentent entre 50 et 61% de la masse sèche des cellules chez *E. coli* (Stouthamer, 1973). De par leur abondance et en tant que constituant majeur des cellules, les protéines constituent des cibles privilégiées pour les ROS (cf. Chapitre 2 – étude bibliographique). Parmi les acides aminés constitutifs des protéines, le plus susceptible d'être oxydé est la méthionine (cf. Chapitre 3 – étude bibliographique). Son oxydation conduit à la formation de méthionine sulfoxyde détectable en spectrométrie de masse (+15.9949).

De plus en plus d'études révèlent le rôle de résidus méthionines des protéines dans la lutte contre le stress oxydant. L'oxydation préférentielle des résidus méthionines par les ROS permettrait d'éviter l'oxydation des protéines intracellulaires au niveau de sites critiques (Levine, *et al.*, 1996, Moskovitz, *et al.*, 1997, Levine, *et al.*, 1999, Luo & Levine, 2009). Avant ces travaux, aucune étude n'a été réalisée sur le rôle des méthionines de protéines extracellulaires dans le maintien de l'homéostasie redox.

I.2 Stratégie de détection des méthionines oxydées

Il existe plusieurs approches pour détecter l'oxydation des méthionines en méthionines sulfoxydes. Celles-ci reposent sur des techniques d'immunologies avec l'utilisation d'anticorps spécifiques des Met(O) (Le, *et al.*, 2008, Liang, *et al.*, 2012), des techniques de fluorescence

(Tarrago, *et al.*, 2015), de dosage de la radioactivité (Brot, *et al.*, 1982) et de détection par spectrométrie de masse (Rosen, *et al.*, 2009) pouvant être couplée à la chromatographie en phase liquide (Minetti, *et al.*, 1994, Ghesquiere, *et al.*, 2011).

1.2.1 Techniques d'immunologies

Le Western Blot est une méthode permettant de détecter et identifier des protéines spécifiques. Il peut être utilisé pour déterminer le degré d'oxydation des résidus méthionines dans des échantillons de protéines purifiées ou dans un mélange complexe. Néanmoins, l'emplacement exact des résidus méthionines oxydés ne peut être identifié. Le et ses collaborateurs ont généré des anticorps spécifiques des résidus méthionines oxydés de protéines cibles ayant un pourcentage élevé de Met compris entre 21 et 33% (Le, *et al.*, 2008). Cette technique de détection n'est pas fiable car les anticorps peuvent également se fixer sur les résidus méthionines de protéines non cibles à fort % de Met mais également sur les protéines cibles avec des résidus méthionines non oxydés (Liang, *et al.*, 2012).

Oien et ses collaborateurs ont mis au point des anticorps polyclonaux se fixant sur les résidus méthionines oxydés des protéines en général. En utilisant ces anticorps, ils ont pu révéler qu'il y avait une accumulation de résidus méthionines oxydés dans l'albumine sérique et l'immunoglobuline lors du processus de vieillissement chez la souris et chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Oien, *et al.*, 2009). Cependant, Wehr et Levine ont remis en question la spécificité de ces anticorps après les avoir testés sur la glutamine synthétase purifiée et l'aprotinine. Les anticorps se fixaient aussi bien sur les résidus méthionines oxydés que réduits de la glutamine synthétase, et ne se fixaient pas sur les résidus méthionines oxydés présents à la surface de l'aprotinine (Wehr & Levine, 2012). Ainsi, ils suggèrent que les anticorps peuvent être spécifiques d'un peptide contenant une méthionine sulfoxyde et non pas d'un résidu méthionine oxydé.

1.2.2 Utilisation d'isotopes

Il est possible d'analyser l'oxydation des méthionines grâce à l'utilisation d'un isotope de l'hydrogène, le tritium (^3H). Le dosage est réalisé grâce à la réduction des N-acétylméthionine sulfoxydes marqués par l'isotope en N-acétylméthionine par une méthionine sulfoxyde réductase. Les mélanges sont séparés par chromatographie sur couche mince puis les spots sont extraits pour la quantification de la radioactivité (Brot, *et al.*, 1982). Cette méthode est limitée à la quantification des méthionines oxydées libres.

1.2.3 Utilisation de la fluorescence

Face à la difficulté de mettre au point une technique de détection des méthionines oxydées basée sur les anticorps, Tarrago et ses collaborateurs ont développé une technique basée sur des analyses ratiométriques de la fluorescence de deux sondes. Ces sondes sont des protéines fluorescentes circulaires dont les séquences codantes sont insérées entre les méthionines sulfoxydes réductases et les thiorédoxines chez la levure (Tarrago, *et al.*, 2015). Ces sondes nommées MetSOx et MetROx sont utilisées pour détecter les deux stéréoisomères des méthionines sulfoxydes -S et -R respectivement. Elles permettent de réaliser des analyses de l'oxydation des protéines et de détecter les méthionines oxydées chez les bactéries et

Mammifères. L'inconvénient de cette technique est qu'il faut apporter une correction de la mesure du ratio entre les deux sondes en divisant par le ratio des deux sondes inactives. De plus, il faut également se placer dans des conditions où il n'y a pas une saturation du signal.

1.2.4 Détection par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est la technique de choix pour l'identification des protéines oxydées et l'analyse de l'oxydation des méthionines à l'échelle d'un protéome. Au cours de la préparation des échantillons et lors de l'analyse des échantillons, une oxydation artéfactuelle des résidus méthionines en méthionines sulfoxydes peut avoir lieu. L'une des sources majeures de l'oxydation spontanée des méthionines est l'ionisation des peptides (Morand, *et al.*, 1993, Guan, *et al.*, 2003, Chen & Cook, 2007). Ces oxydations ont été inhibées en ajoutant un agent réducteur dans les échantillons, le β -mercaptoéthanol. Par ailleurs, le gel utilisé pour l'électrophorèse des échantillons peut contenir du perchlorate de potassium. Ce composé est un puissant oxydant et peut réagir avec de nombreuses substances chimiques et organiques dont les résidus méthionines. Pour éviter cette oxydation, les gels sont rincés et 500 μ l d'un tampon antioxydant sont ajoutés dans la cuve de migration (Hartmann & Armengaud, 2014). De plus, le temps de migration des échantillons est court, compris entre 3 et 5 minutes.

Rosen et ses collaborateurs ont analysé par spectrométrie de masse des hydrolysats de protéines issus de cellules d'*E. coli* traitées avec du peroxyde d'hydrogène, de l'acide hypochloreux et mises en présence avec des neutrophiles (Rosen, *et al.*, 2009). Les protéines cytoplasmiques, périplasmiques et membranaires ont été extraites à partir des cellules d'*E. coli*. Après digestion des extraits, les peptides ont été analysés par chromatographie en phase liquide couplé à un électronébuliseur et un spectromètre de masse en tandem (LC-ESI-MS/MS). L'oxydation des cystéines est exclue des analyses car les résidus cystéines sont tous réduits et irréversiblement modifiés avant l'analyse en spectrométrie de masse. L'oxydation des résidus méthionines des peptides en méthionine sulfoxyde génère un incrément de la masse de 16 Da. Le nombre de spectres obtenus pour les résidus méthionines réduits et oxydés sont dénombrés. Dans les conditions où la majorité des bactéries survivent (> 80% de viabilité), le pourcentage de méthionines oxydées est inférieur à 10% au niveau intracellulaire. Au niveau de la membrane plasmique, le pourcentage de méthionines sulfoxydes est de 40% alors que la viabilité est de 95%. Les auteurs ont réalisé des tests pour estimer la formation spontanée de méthionines oxydées au cours des analyses. Le pourcentage d'oxydation spontanée est compris entre 2 et 6% (Rosen, *et al.*, 2009). Aucune liste complète des protéines et des positions des résidus méthionines oxydés n'a été fournie. Ainsi, cette étude chez *E. coli* correspond uniquement à une évaluation globale de l'oxydation des résidus méthionines. Le rôle de l'oxydation des méthionines à l'échelle du protéome reste encore indéterminé.

1.3 Stratégie d'analyse de la dynamique de l'exoprotéome

En dehors de notre laboratoire, les seuls à avoir mené des études sur l'exoprotéome de *B. cereus* sont M. Gohar et ses collaborateurs. Ils ont identifié 36 exoprotéines dans la plupart sont des facteurs de virulence (Gohar, *et al.*, 2002, Gohar, *et al.*, 2005, Gilois, *et al.*, 2007). Leurs études reposent uniquement sur des analyses de l'exoprotéome de *B. cereus* en entrée de phase stationnaire et en aérobiose. La technique utilisée pour la séparation des protéines

de *B. cereus* est l'électrophorèse bidimensionnelle. De plus, ils ont utilisé comme milieu de culture le milieu LB qui est un milieu riche en nutriments. Les conditions de culture en aérobiose et dans un milieu riche en nutriments ne correspondent pas à celles rencontrées dans l'intestin humain. En effet, les études menées au sein de notre laboratoire ont révélé que les conditions de POR et d'oxygénation impactent la production des facteurs de virulence (Zigha, *et al.*, 2007, Esbelin, *et al.*, 2008, Laouami, *et al.*, 2011). La première étude exhaustive de l'exoprotéome de *B. cereus* a été réalisée dans notre laboratoire en utilisant une stratégie shotgun (Clair, *et al.*, 2010). Cette étude a permis d'identifier 133 exoprotéines dont 57 sont des facteurs de virulence. Le nombre de protéines identifiées dans l'exoprotéome avec au moins deux peptides est passé à 181 lors d'une étude portant sur le régulateur OhrR (Clair, *et al.*, 2013). Les cultures ont été réalisées en fermenteur dans du milieu MOD qui est un milieu minimum riche en acides aminés. Les conditions d'oxygénation testées sont l'aérobiose (flux d'air atmosphérique), l'anaérobiose à haut POR sous flux d'azote et à bas POR sous flux d'hydrogène correspondant aux conditions rencontrées dans le duodénum. Un seul prélèvement a été réalisé en début de phase exponentielle de croissance. En plus, aucune précaution particulière n'a été prise pour éviter l'oxydation artéfactuelle des résidus méthionines au cours des analyses en spectrométrie de masse.

Pour déterminer la dynamique de l'exoprotéome et l'évolution de l'oxydation des résidus méthionines des protéines, nous avons choisi la souche ATCC 14579 de *B. cereus* dont le génome est entièrement séquencé (Ivanova, *et al.*, 2003). Les cultures cellulaires ont été réalisées en fermenteur dans du milieu MOD avec du glucose comme source de carbone (30 mM) à un pH de 7,2 et une température de 37°C selon trois conditions de POR obtenus par bullage d'air atmosphérique (POR initial = 195mV), d'azote (POR initial = 130mV) et d'hydrogène (POR initial = -370mV), une condition identique à celle rencontrée dans le colon. Pour chaque condition de POR, trois cultures ont été réalisées (réplicats biologiques). Les échantillons ont été prélevés au cours de la croissance en phase exponentielle (μ_{\max}), de ralentissement ($\mu = \mu_{\max}/2$) et stationnaire ($\mu = 0$ pendant au moins 90 minutes). La méthode de prélèvements des surnageants cellulaires et la préparation des échantillons protéiques sont décrites dans le chapitre matériels et méthodes (cf. 4.3 et 5.4). Pour éviter une oxydation artéfactuelle des méthionines, les prélèvements ont été filtrés dans une chambre à atmosphère contrôlée anaérobie « Bactron » pour les fermenteurs sous flux d'azote et d'hydrogène. Jusqu'à la précipitation des protéines extracellulaires et la reprise des culots dans du LDS 1X + β -mercaptoéthanol, ces échantillons ne sont jamais mis en présence d'air atmosphérique. Les échantillons ne sont pas congelés avant leurs analyses pour éviter une oxydation des méthionines. Les échantillons ont été analysés suivant une stratégie *shotgun*. Cette stratégie repose sur l'identification des protéines dans un mélange complexe à partir de peptides obtenus par digestion trypsique (stratégie *bottom-up*). Elle combine la chromatographie en phase liquide à haute performance pour séparer les peptides et la spectrométrie de masse en tandem pour leur identification. La spectrométrie de masse en tandem est un système de configuration hybride combinant deux analyseurs. Le premier analyseur permet de fournir un spectre MS à partir duquel un ion-peptide peut être sélectionné pour une fragmentation. Les résultats de la fragmentation sont ensuite

enregistrés dans le deuxième analyseur fournissant un spectre MS/MS (Armengaud, 2013). Il est également possible de travailler sur des protéines entières (stratégie *top-down*). Dans ce cas, la MS/MS permet de fractionner les protéines en peptides pour l'identification des protéines et des modifications post-traductionnelles (Halgand, *et al.*, 2010). Le laboratoire Li2D du CEA de Marcoule dirigé par Jean Armengaud est un laboratoire de référence dans le domaine de la protéomique. Au début de ma thèse, le laboratoire ne disposait pas de l'équipement requis pour une stratégie *top-down*. Cet équipement est désormais disponible depuis 2015. Pour nos études, nous avons utilisé un spectromètre de masse de type LTQ-Orbitrap couplé à une HPLC (high performance liquid chromatography en anglais) UltiMate® 3000 Nano LC systems (Dionex-LC Packings). Nous avons réalisé 27 analyses en spectrométrie de masse par souche: 3 réplicats biologiques x 3 conditions x 3 temps. Les spectres MS/MS des peptides obtenus ont permis d'identifier les protéines et les modifications post-traductionnelles des méthionines mais aussi de les quantifier. L'identification des protéines est réalisée à l'aide du logiciel Mascot Daemon (cf. 5.7.4) (Perkins, *et al.*, 1999). Les résultats sont ensuite filtrés par le logiciel IRMaBatch (version 1.28.0) afin de conserver uniquement les peptides identifiés avec une probabilité d'erreur de 5% (Dupierris, *et al.*, 2009). Seules les protéines identifiées avec au moins deux peptides protéotypiques différents ont été validées comme étant réellement observées dans l'exoprotéome. Le nombre de résidus méthionines oxydés dans un échantillon a été normalisé par le nombre total de spectres. Pour nos analyses statistiques, les protéines observées qu'une fois dans un des trois réplicats biologiques et qu'à une seule phase de croissance ont été retirées du jeu de données (étape de filtration). Les analyses statistiques ont été réalisés sous R (cf. 6.5). La démarche adoptée pour les analyses de la dynamique des protéines extracellulaires et de l'oxydation de leurs résidus méthionines est représentée dans la **figure 31**.

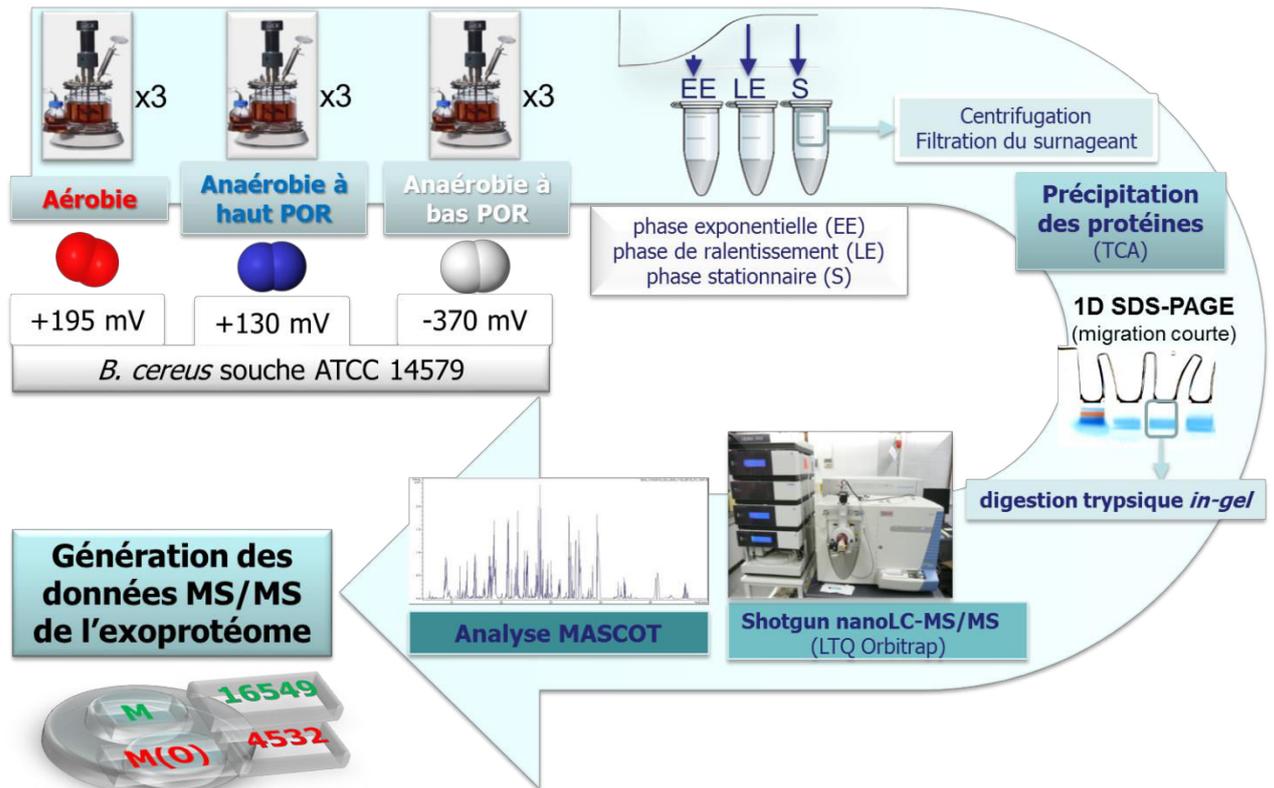


Figure 31: Stratégie expérimentale *shotgun* mise en place lors de nos analyses protéomiques de l'exoprotéome

Article 1: Time dynamics of the *Bacillus cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation

Principaux résultats

Lors de cette étude, nous avons obtenu 120 470 spectres MS/MS. Ils ont été attribués à 392 protéines dont 76 sont des facteurs de virulence: 15 sont des composants de toxines ou toxines supposées, 50 sont des enzymes de dégradation et 11 des protéines flagellaires. A notre connaissance, c'est l'étude protéomique la plus exhaustive de l'exoprotéome de *B. cereus* souche ATCC 14579. Parmi les 392 protéines identifiées, 32 protéines ont été détectées pour la 1^{ère} fois et représentent au total 11% de l'exoprotéome en termes d'abondance. Parmi ces 32 protéines, 11 protéines n'étaient pas annotées dans la 1^{ère} annotation du génome de *B. cereus* (Ivanova, *et al.*, 2003) et 9 protéines ne s'accumulaient pas dans l'exoprotéome en phase exponentielle de croissance dans toutes les conditions testées. La détection des 12 protéines restantes jamais observées auparavant dans l'exoprotéome a été probablement favorisée par la stratégie expérimentale mise en place lors de cette étude.

Les 392 protéines identifiées dans l'exoprotéome ont été classées dans 16 groupes fonctionnels en accord avec leurs rôles biologiques. Le groupe des toxines (15 protéines sur 392) représente approximativement un tiers de l'exoprotéome en termes d'abondance

(nombre de spectres) dans toutes les conditions de culture. La dynamique des protéines constitutives de ce groupe est représentative de la dynamique de l'exoprotéome. L'abondance des toxines est cependant significativement plus élevée au début qu'en fin de croissance. La diminution d'abondance est plus importante en aérobiose (de 35% en phase exponentielle à 18% en phase stationnaire) qu'en anaérobiose à haut POR (de 40 à 23%) et bas POR (de 36 à 26%).

L'analyse de l'abondance des résidus Met(O) des exoprotéines a révélé leur présence aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. Leur abondance diminue au cours de la croissance en aérobiose et en anaérobiose à bas POR mais pas en anaérobiose à haut POR. La diminution d'abondance est plus importante en aérobiose (de 13% en phase exponentielle de croissance à 6% en phase stationnaire) qu'en anaérobiose à haut POR (de 11 à 7%). En anaérobiose à haut POR, l'abondance des Met(O) reste stable aux alentours de 10%. La dynamique des toxines en termes de Met(O), est aussi représentative de celle de l'exoprotéome.

Nous avons pu établir que dans la toxine NheA, certains résidus méthionines ne sont pas sujets à l'oxydation et que d'autres sont oxydés dans certaines conditions. Par exemple, le résidu Met en position 53 est oxydé uniquement en anaérobiose. Quant aux résidus aux positions 111 et 112, le résidu à la position 111 est oxydé en aérobiose uniquement si le résidu à la position 112 est oxydé. En anaérobiose, le résidu à la position 111 peut être oxydé indépendamment du résidu méthionine à la position 112.

Time dynamics of the *Bacillus cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation

Jean-Paul Madeira^{1,2,3}, Béatrice Alpha-Bazin³, Jean Armengaud³ and Catherine Duport^{1,2*}

¹UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Université d'Avignon, Avignon, France, ²INRA, UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d' Origine Végétale, Avignon, France, ³Commissariat à l'énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA), Direction des Sciences du Vivant (DSV), IBEB, Li2D, Bagnols sur Cèze, France

At low density, *Bacillus cereus* cells release a large variety of proteins into the extracellular medium when cultivated in pH-regulated, glucose-containing minimal medium, either in the presence or absence of oxygen. The majority of these exoproteins are putative virulence factors, including toxin-related proteins. Here, *B. cereus* exoproteome time courses were monitored by nanoLC-MS/MS under low-oxidoreduction potential (ORP) anaerobiosis, high-ORP anaerobiosis, and aerobiosis, with a specific focus on oxidative-induced post-translational modifications of methionine residues. Principal component analysis (PCA) of the exoproteome dynamics indicated that toxin-related proteins were the most representative of the exoproteome changes, both in terms of protein abundance and their methionine sulfoxide (Met(O)) content. PCA also revealed an interesting interconnection between toxin-, metabolism-, and oxidative stress-related proteins, suggesting that the abundance level of toxin-related proteins, and their Met(O) content in the *B. cereus* exoproteome, reflected the cellular oxidation under both aerobiosis and anaerobiosis.

Keywords: exoproteome, *Bacillus cereus*, shotgun proteomics, methionine oxidation, toxins

OPEN ACCESS

Edited by:

William P. Inskip,
Montana State University, USA

Reviewed by:

Dong-Woo Lee,
Kyungpook National University,
South Korea

Haik Antelmann,
Ernst-Moritz-Arndt-University of
Greifswald, Germany

*Correspondence:

Catherine Duport,
UMR SQPOV -INRA PACA, 228, route
de l'Aérodrome, CS 40509, Domaine
Saint Paul-Site Agroparc, 84914
Avignon, France
catherine.duport@univ-avignon.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Physiology and Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 23 January 2015

Accepted: 07 April 2015

Published: 22 April 2015

Citation:

Madeira J-P, Alpha-Bazin B,
Armengaud J and Duport C (2015)
Time dynamics of the *Bacillus cereus*
exoproteome are shaped by cellular
oxidation. *Front. Microbiol.* 6:342.
doi: 10.3389/fmicb.2015.00342

Introduction

The gram-positive, motile bacterium, *Bacillus cereus*, is a well-known agent of gastrointestinal (GI) tract infection (Stenfors Arnesen et al., 2008; Bishop et al., 2010). The critical step of infection occurs in the small intestine, where *B. cereus* encounters carbohydrate starvation conditions and changing oxygenation and oxidoreduction potential (ORP) conditions (Guyton, 1977; Moriarty-Craige and Jones, 2004; Fabich et al., 2008; Marteyn et al., 2010). During the course of infection, the survival and growth of *B. cereus* depend on the secretion and release into the extracellular compartment of multiple proteins (Gilois et al., 2007; Gohar et al., 2008). The *B. cereus* ATCC 14579 exoproteome, which comprises the secreted proteins and all the other released proteins found in the pathogen's extracellular surroundings (Armengaud et al., 2012), was recently established for cells grown under conditions considered to mimic those encountered in the human intestine, i.e., low-ORP anoxic conditions, high-ORP anoxic conditions, and oxic conditions, in pH-regulated culture using glucose as the sole carbohydrate source (Clair et al., 2010). The *B. cereus* exoproteome is dominated by toxin-related proteins (~35% of the exoproteome, as estimated by spectral count) and degradative enzymes plus adhesins (~35% of the exoproteome), which are all recognized as major virulence factors (Stenfors Arnesen et al., 2008; Ingmer and Brondsted, 2009; Kamar et al., 2013;

Ramarao and Sanchis, 2013). The other components of the *B. cereus* exoproteome comprise components of the flagellar apparatus (~15% of the exoproteome), as well as an important number of proteins that lack export signal sequences, accounting for 15% of the exoproteome. These proteins, found more abundantly in the cytoplasm, include metabolic enzymes (mainly glycolytic enzymes), translation-related proteins, molecular chaperones, and antioxidant enzymes such as catalase, hydroperoxide reductase, and superoxide dismutase. Several studies have reported the moonlighting activities of these proteins, which are involved in bacterial virulence. Most enzymes in the glycolytic pathway, tricarboxylic acid (TCA) cycle and glyoxylate cycle have adhesive properties that aid in interacting with the host extracellular matrix. The most common moonlighting activity of bacterial molecular chaperones is to activate (or inhibit) mononuclear phagocyte cytokine synthesis. Antioxidants produced by *Mycobacterium bovis* suppress host immune response (Sadagopal et al., 2009; Vellasamy et al., 2009; Henderson and Martin, 2011).

B. cereus adjusts its primary metabolism to grow efficiently under aerobic respiratory and anaerobic fermentative conditions and to adapt to low-ORP conditions (Duport et al., 2006; Clair et al., 2012). In addition, as for all other bacteria, *B. cereus* undergoes a major metabolic switch from primary metabolism (exponential growth) to secondary metabolism (stationary phase) in response to nutrient starvation or oxidative stress (Nieselt et al., 2010). Aerobic respiration relies on dioxygen to drive ATP production via the respiratory chain (Duport et al., 2006). One caveat is that this process is accompanied by a major production of reactive oxygen species (ROS) (Gonzalez-Flecha and Demple, 1995; Brynildsen et al., 2013; Imlay, 2013). In addition to the respiratory chain, endogenous ROS can be generated in response to starvation (nutrient stress) as a secondary stress (Mols and Abee, 2011). Under anaerobiosis, *B. cereus* catabolizes glucose-using, fermentative pathways, which are not recognized as high-ROS-producing pathways under normal conditions. However, low-ORP conditions can induce ROS production in response to reductive stress (Clair et al., 2012). Bacteria use a large spectrum of ROS scavenging systems, including low-molecular-weight molecules, metabolites, and antioxidant enzymes, to maintain ROS at non-toxic levels and to prevent macromolecule damage (Chi et al., 2011; Mailloux et al., 2011). Amino acid residues in proteins represent one of the major targets of ROS and cellular oxidants. The two amino acids that are the most prone to oxidative attack by ROS are cysteine and methionine (Met), both of which contain susceptible sulfur atoms. However, Met residues are the most susceptible to oxidation by almost all forms of ROS (Vogt, 1995; Stadtman et al., 2005). Met oxidation produces a stable product, methionine sulfoxide, Met(O), which can be detected readily by mass spectrometry through a mass increase of 15.9949 atomic mass units. Thus, Met oxidation might serve as a sensitive marker for proteins oxidized by ROS.

The objective of the present study was to define the exoproteome time dynamics of *B. cereus* grown in three ORP conditions, and to assess by tandem mass spectrometry the oxidation level of the secreted proteins, which should be correlated with the cellular oxidation level. For this purpose, we collected *B. cereus*

supernatant at three points of the time-growth curve, i.e., during early exponential growth phase (EE), at the late exponential growth phase (LE) signifying the transition between exponential and stationary phases, and during the stationary phase (S). This was performed for cells grown under aerobiosis, as well as under high- and low-ORP anaerobiosis. Time-course changes in terms of exoprotein abundance level and the Met(O) peptide content of exoproteins were assessed by high-throughput nanoLC-MS/MS (Clair et al., 2010). The repertoire of experimentally confirmed exoproteins of *B. cereus* presented here is the largest ever reported, and more interestingly provides new insights into the interplay between toxin-related protein secretion and intracellular ROS production.

Materials and Methods

B. cereus Growth Conditions

B. cereus ATCC 14579 cells were grown in a batch bioreactor on MOD medium supplemented with 30 mM glucose as the carbon source (Rosenfeld et al., 2005) and buffered at pH 7.2 with 2 M KOH. The bioreactor was an autoclavable 3-liter glass BioFlo[®]/CelliGen[®] 115 (New Brunswick Scientific) with a working volume of 2 liters. It was equipped with a polarographic oxygen electrode (Mettler Toledo), a pH electrode (Mettler Toledo), and a redox-combined electrode (AgCl, Mettler Toledo). Sterile gas was fed through the culture at a constant flow set to 20 mL/h. For oxic conditions, oxygen saturation was maintained at 100% by automatic adjustment of the stirring speed. For anoxic conditions, a dissolved oxygen tension value (pO_2) of 0% was obtained with a constant flow of pure nitrogen (high-ORP condition) or hydrogen gas (low-ORP condition). Each bioreactor was inoculated with a subculture grown for 8 h (exponential growth phase) in glucose-containing MOD medium under aerobiosis or anaerobiosis. Cells from the inocula were harvested by centrifugation (7000 × g for 5 min at room temperature), washed in fresh medium, and then diluted to achieve an initial optical culture density at 600 nm of 0.02. Batch cultures were carried out at 37°C under a 300 rpm agitation speed.

Exoproteome Preparations and Trypsin In-Gel Proteolysis

For each of the three growth conditions, three independent growth cultures in a fermenter were carried out, resulting in biological samples in triplicate for each time point. Optical density, ORP, and pO_2 were monitored every 30 min during the bacterial growth. The growth rate was determined from the absorbance data. A 200-mL sample of the culture was systematically taken at the exponential, transition, and stationary phases for the nine bioreactor cultures. Cell pellets and extracellular media were separated by centrifugation at 10,000 × g for 10 min at 4°C. The extracellular media were successively filtered through acetate membrane filters (Sartorius) with pore sizes of 0.85, 0.45, and 0.20 μm, respectively. Proteins from the 27 samples were precipitated by adding 10 mL trichloroacetic acid solution at 100% (w/v) to 40 mL filtered solution. The precipitated material was recovered after overnight incubation at 4°C by centrifugation at 7000 × g for 15 min at 4°C, and the extracellular proteins in the

resulting pellet were then dissolved in 100 μ L NUPAGE[®] LDS (Lithium dodecyl sulfate) sample buffer 1X (Invitrogen) supplemented with β -mercaptoethanol. Samples were boiled for 5 min at 95°C, sonicated for 5 \times 5 s in a transonic 780H sonicator and loaded on NuPAGE[®] Novex 4–12% Bis-Tris gels (Invitrogen) that were run for a short 5-min migration at 200 V using NuPAGE[®] MES supplemented with NuPAGE antioxidant as the running buffer (Hartmann and Armengaud, 2014). This avoids any artifactual protein oxidation. Gels were stained with Simply Blue SafeStain, a ready-to-use Coomassie G-250 stain from Invitrogen. After overnight destaining, the single band of each gel lane was cut and divided into 2 fractions, each corresponding to a 3 \times 4 mm² polyacrylamide band. The 54 resulting polyacrylamide gel pieces were processed for further destaining, reduction and iodoacetamide treatments, and in-gel proteolysis with trypsin (Roche) in the presence of ProteaseMax additive (Promega), as previously described (De Groot et al., 2009; Clair et al., 2010). The two digests obtained from the same sample were pooled as a single peptide mixture. Exponential phase samples were injected without being diluted, due to their lower protein content, while the samples collected at the transition and stationary phases were diluted 1:50 in 0.1% trifluoroacetic acid prior to nanoLC-MS/MS analysis.

Tandem Mass Spectrometry

NanoLC-MS/MS experiments were performed using an LTQ-Orbitrap XL hybrid mass spectrometer (ThermoFisher) coupled to an UltiMate 3000 nRSLC system (Dionex ThermoFisher), in similar conditions to those previously described (Dedieu et al., 2011). Peptide mixtures were loaded and desalted on-line on a reverse-phase precolumn (Acclaim PepMap 100 C18, 5 μ m bead size, 100 Å pore size, 300 μ m i.d. \times 5 mm (Dionex-ThermoFisher). Peptides were then resolved on a Dionex nanoscale Acclaim Pepmap100 C18 capillary column (3 μ m bead size, 100 Å pore size, 75 μ m i.d. \times 15 cm) at a flow rate of 0.3 μ L/min using a 90 min. gradient from 4 to 40% solvent B (0.1% HCOOH/100% CH₃CN) prior to injection into the mass spectrometer. Solvent A was 0.1% HCOOH/100% H₂O. Full-scan mass spectra were measured from m/z 300 to 1800 with the LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer in data-dependent mode using TOP3 strategy. In brief, a scan cycle was initiated with a full scan of high mass accuracy in the Orbitrap, followed by MS/MS scans in the linear ion trap on the three most abundant precursor ions, with 60 s dynamic exclusion of previously selected ions.

Protein Identification

Peak lists from the tandem mass spectrometry raw data were generated with the MASCOT DAEMON software (version 2.3.2) from Matrix Science using the extract_msn.exe data import filter from the Xcalibur FT package (version 2.0.7) proposed by ThermoFisher. Data import filter options were set as follows: at 400 (minimum mass), 5000 (maximum mass), 0 (grouping tolerance), 0 (intermediate scans), and 1000 (threshold). Using the MASCOT search engine (version 2.3.02) from Matrix Science, we searched all MS/MS spectra against an in-house polypeptide sequence database containing the sequences of all annotated proteins encoded by the *B.*

cereus ATCC 14579 chromosome (NC_004722) and plasmid, pBClin15 (NC_004721), supplemented with 44 new proteins discovered by a previous proteogenomic analysis (unpublished data). This database comprises 5299 polypeptide sequences, totaling 1,464,675 amino acids. Searches for tryptic peptides were performed with the following parameters: full trypsin specificity, a mass tolerance of 5 ppm on the parent ion and 0.6 Da on the MS/MS, static modifications of carboxyamidomethylated Cys (+57.0215), and dynamic modifications of oxidized Met (+15.9949). The maximum number of missed cleavages was set at 2. All peptide matches with a peptide score below a p -value of

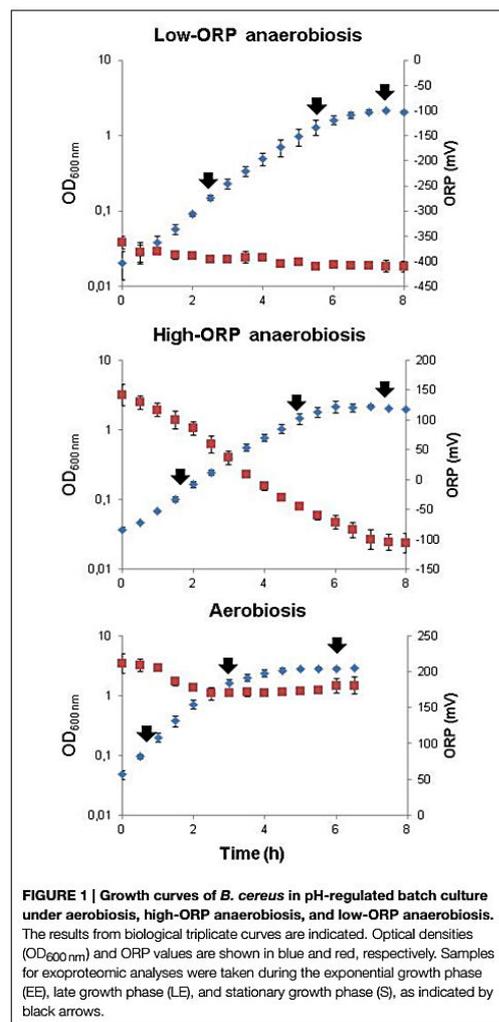


TABLE 1 | Novel exoproteins identified in this study.

Gene	Accession n° (NP)	Protein name	Functional annotation	Secretion signals and functional domains ^a	Total NSAF ^b									
					Low-ORP anaerobiosis			High-ORP anaerobiosis			Aerobiosis			
					EE	LE	S	EE	LE	S	EE	LE	S	
GROUP A^c														
BC1177	NA		Tryptophanyl-tRNA synthetase		0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.14	0.00	0.00	0.00	0.27
NA	NA	ArgC	Gamma-glutamylphosphate reductase		0.06	0.00	0.06	0.00	0.00	0.03	0.03	0.00	0.00	0.09
BC3716	NA	EntD	Enterotoxin-like	S, SH3	0.19	0.15	0.19	0.65	0.27	0.23	0.19	0.27	0.34	0.00
BC4122	NA		2',3'-cyclic nucleotide 2'-phosphodiesterase		0.09	0.05	0.02	0.23	0.08	0.05	0.20	0.01	0.00	0.00
BC5138	NA	Pgk	Phosphoglycerate kinase		0.90	0.66	1.74	0.49	1.15	2.00	0.40	0.07	1.25	0.00
BC5137	NA	TpiA	Triosephosphate isomerase		1.36	0.94	2.87	1.36	1.25	2.98	0.42	0.23	1.32	0.00
BC1649	NA		Unknown		0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.46	0.02	0.00	
NA	NA	ChnE	Collagen adhesion protein	S	0.95	0.44	0.51	1.27	0.76	0.32	0.70	0.76	0.44	
NA	NA	SipB	Signalpeptidase	S	0.66	0.53	0.79	0.99	0.92	0.79	0.73	0.92	1.25	
BC3705	NA	GlnA	Glutamine synthetase		1.00	0.30	0.74	0.48	0.40	0.78	0.78	0.38	1.20	
BC3763	NA		Cellulohydrolase	S	0.00	1.55	1.59	0.17	0.00	0.00	0.00	0.97	0.55	
GROUP B														
BC0602	NP_8330419	NprA	Neutral protease	S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07
BC1161	NP_830947	PrgA2	Peptidoglycanase		0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.12
BC1641	NP_831419	FgJ	Flagellar basalbody rod protein		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.00	
BC1642	NP_831420	FgC	Flagellar basalbody rod protein		0.00	0.13	0.27	0.00	0.00	0.27	0.00	0.00	0.47	
BC1687	NP_831462		Unknown		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.09	
BC1901	NP_831673		Unknown		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	
BC4363	NP_834075		Ferrichrome-binding protein	S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	1.15	
BC4546	NP_834253		Ferrichrome-binding protein	S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	
BC5359	NP_835020		Aminopeptidase Y	S	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.10	
GROUP C														
BC1689	NP_831739	LyfR3	LyfR family transcriptional regulator		0.00	0.00	0.08	0.00	0.05	0.00	0.03	0.13	0.13	
BC4549	NP_834256	IsdC	Cellulose protein	S, srtB	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.19	0.27	
BC2473	NP_832233		Beta-lactamase	S	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.06	0.06	0.03	
BC1893	NP_831666		Scaffold protein		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.07	0.35	0.00	
BC3221	NP_832962		Surface protein	S, Fib-alpha	0.32	0.30	0.62	0.32	0.67	0.81	0.09	0.42	0.99	
BC1862	NP_831635		Unknown		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	
BC1634	NP_831412		UDP-N-acetylglucosamine reductase		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	
BC2186	NP_831951	FtsK	Cell division protein	S	0.05	0.09	0.09	0.05	0.14	0.14	0.14	0.45	0.23	
BC1680	NP_831437		Soluble lytic murein transglycosylase	S, LT_GEWL	0.04	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	
BCp0009	NP_829897		DNA packaging		0.00	0.08	0.08	0.00	0.16	0.08	0.16	0.00	0.08	
BCp0018	NP_829906		Unknown		0.00	0.17	0.58	0.00	0.21	0.41	0.38	0.07	0.14	
BC4548	NP_834255		Cellulose protein	S	0.17	0.17	1.34	0.00	0.17	1.40	0.45	3.98	3.81	

^a Domains that are inherently related to the functional annotation of the proteins are not indicated. S, export signal peptide; SH3, SH3 domain; srtB, sortase B cell surface sorting signal; Fib-alpha, fibrogen alpha/beta chain family; LTGEWL, lytic transglycosylase and goose egg-white lysozyme (GEWL) domain.
^b NSAF values are given at early growth phase (EE), declining growth phase (LE), and stationary growth phase under anaerobiosis, high-ORP anaerobiosis, and low-ORP anaerobiosis.
^c Group A, proteins not hitherto annotated (NA); Group B, proteins not detected in EE; Group C, proteins not detected in previous studies.
 NA, not annotated.
 Bold values are greater than zero.

0.05 were parsed using the IRMa 1.28.0 software (Dupierris et al., 2009). A protein was considered to be validated when at least two different peptides were detected in the same sample. The false-positive rate for protein identification was estimated using the appropriate decoy database as below 0.1% with these parameters.

Label-free Protein Quantification and Statistical Analysis

The number of MS/MS spectra per protein (spectral counts) was extracted for the 27 samples and used for protein quantification. The normalized spectral abundance factor (NSAF) was calculated by dividing the spectral count for each observed protein by the polypeptide theoretical mass, as described previously (Christie-Oleza et al., 2012). Principal component analysis (PCA) was carried out with R version 3.0.1 (<http://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.0.1/>). The data analyses were performed with "FactoMineR," a package written in R dedicated to multivariate exploration data analysis (Lê et al., 2008). PCA was carried out with biological replicates of each growth phase as individuals and the spectral counts of proteins as quantitative variables. The correlation coefficients between the variable and the coordinates of the individuals on the axis were calculated for all the variables, dimension by dimension. The significance of each correlation coefficient was calculated using a Student's *t*-test. Variables, for which the *p*-value associated with this test was smaller than 0.05, are reported in Table S4 in Supplementary Material.

Proteomic Data Repository

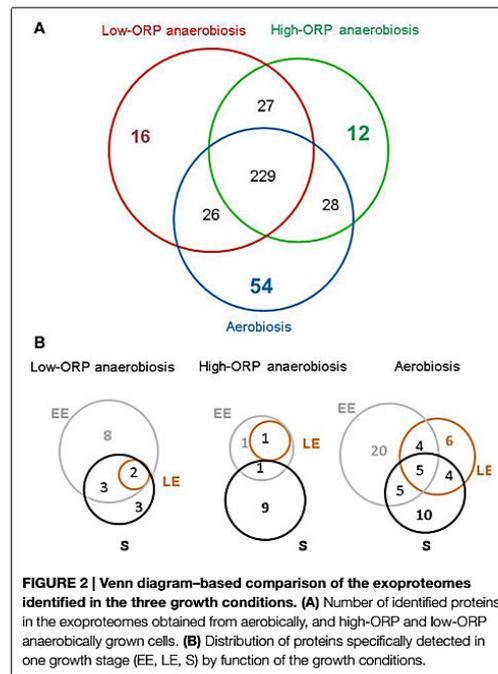
The mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository (<http://www.ebi.ac.uk/pride/>), with the dataset identifier PXD001482 and DOI 10.6019/PXD001482.

Results and Discussion

Comparative Exoproteome, Large Survey Growth Kinetics of *B. cereus* ATCC 14579

Bacteria were grown in pH- and temperature-regulated bioreactors using glucose as the sole carbon source (pH 7, 37°C, 30 mM glucose). Growth was investigated under aerobiosis ($pO_2 = 100\%$) and anaerobiosis ($pO_2 = 0\%$). Two different ORP conditions were obtained under anaerobiosis: a high-ORP anoxic condition (initial ORP = 130 ± 20 mV) and a low-ORP anoxic condition (iORP = -390 ± 35 mV), this latter condition being achieved under flux of hydrogen, a non-toxic reducing agent. Three biological replicates were performed per culture condition. Figure 1 shows the *B. cereus* growth curves and the extracellular ORP profiles established for the three culture conditions. As reported previously (Clair et al., 2012), *B. cereus* cells grew more slowly and produced less biomass in anoxic fermentative conditions than in oxic respiratory conditions. Changes in the initial extracellular ORP did not alter the growth rate and biomass production under fermentative anoxic conditions (Table S1 in Supplementary Material). However, the extracellular ORP profile differed significantly in the three conditions.

Under aerobiosis (initial ORP = 210 ± 13 mV), the ORP dropped rapidly to its minimal value (final ORP = 184 ± 11 mV). This reflects the rapid consumption of dissolved oxygen through respiration, to generate ATP for growth (Rosenfeld et al., 2005). The ORP measured under high-ORP anoxic fermentative conditions (iORP = 130 ± 20 mV) decreased concomitantly with the biomass increase to reach a minimal value of -106 ± 16 mV, while under low-ORP conditions the ORP remained constant (iORP = -390 ± 35 mV and fORP = -410 ± 10 mV). Clearly, the reducing capacity of *B. cereus* cells is higher under high-ORP anaerobiosis than under low-ORP anaerobiosis (Le Lay et al., 2015). To examine the changes in exoproteome profiles associated with growth, samples were taken at the time points indicated by the arrows in Figure 1, i.e., during early exponential growth phase (EE), late exponential growth phase (LE), and stationary phase (S). Proteins from the 27 filtered supernatants were concentrated by precipitation with trichloroacetic acid. The resulting samples were then dissolved into NuPAGE LDS sample buffer supplemented with β -mercaptoethanol to prevent protein oxidation. Samples were loaded on NUPAGE® precast gels that were run for a short migration time only (Hartmann and Armengaud, 2014). NUPAGE® antioxidant was added in the upper buffer chamber to maintain the reduced state of the proteins during the run and avoid any protein oxidation. Each sample was excised from the gel as a polyacrylamide band. Trypsin proteolysis was carried out *in-gel*. The resulting peptides were analyzed



by shotgun tandem mass spectrometry (Clair et al., 2010). A total of 120,470 MS/MS spectra were detected when considering the three biological repeats. Among them, 50,828 were assigned to *B. cereus* peptide sequences (Table S2 in Supplementary Material). A total of 392 proteins were identified based on the confident detection of at least two different peptides (Table S3 in Supplementary Material).

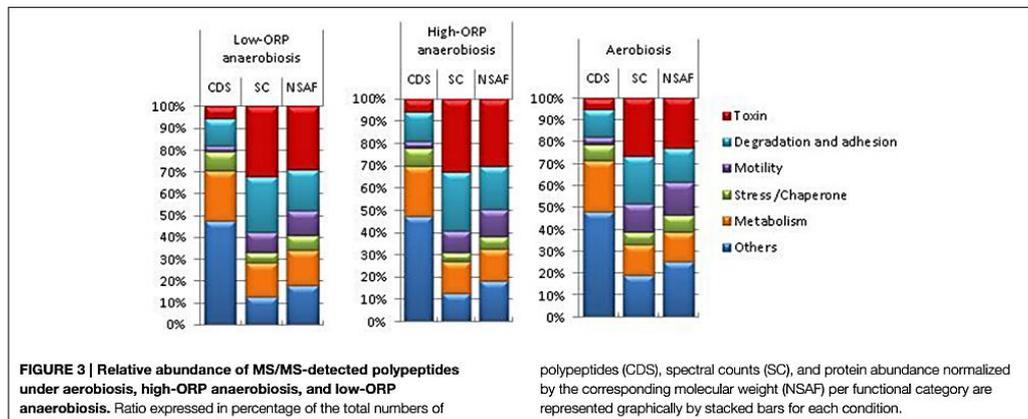
New Mass Spectrometry-Identified Exoproteins

Compared to previous large shotgun proteomic studies on exoproteomes from *B. cereus* ATCC 14579 (Clair et al., 2010; Laouami et al., 2014), a total of 32 proteins were detected for the first time. These 32 new mass spectrometry-certified proteins account for 11% of the exoproteome, as assessed by the global sum of their normalized spectral count abundance factors (NSAF) cumulated over the 27 samples (Table S3 in Supplementary Material). Table 1 shows the sequence similarity-based functional annotation of these proteins and their abundances under aerobiosis, high-ORP- and low-ORP anaerobiosis. The 32 proteins could be categorized into three groups. Group A comprises 11 proteins that were not annotated in the first annotation report of the genome (Ivanova et al., 2003), but have been indicated by a proteogenomic study (unpublished data). Group B comprises 9 proteins that did not accumulate in EE growth phase in all the conditions tested, which explains why they were not detected in our previous study focused on this growth stage (Clair et al., 2010; Laouami et al., 2014). The protocol used in the present study probably favored the detection of the 12 other proteins (group C), which were found in very poor abundance. Among the new proteins identified, we identified a protein exhibiting high sequence similarity with the three putative enterotoxins, EntA, EntB, and EntC (Clair et al., 2010), and that we named EntD (unpublished results). Like EntD, 13 proteins comprised a predicted peptide signal. These were classified into cell-wall/cell-surface biogenesis, degradation/adhesion, and transport functional groups on the basis of data available in the literature and/or using the information

available in the Kegg classification (Table S3 in Supplementary Material). The other proteins did not contain typical peptide signals and were classified as flagella components (BC1641 and BC1642), enzymes of the central glycolytic pathway (TpiA-BC5137 and Pkg-BC5138), enzymes of amino acid-related metabolic pathways (ArgC and GlnA), chaperones (BC1161-PrsA2), translation/transcription-associated proteins (BC1177), and proteins with unknown functions (BC4122 and BC1649).

Insights into the Core-exoproteome of *B. cereus*

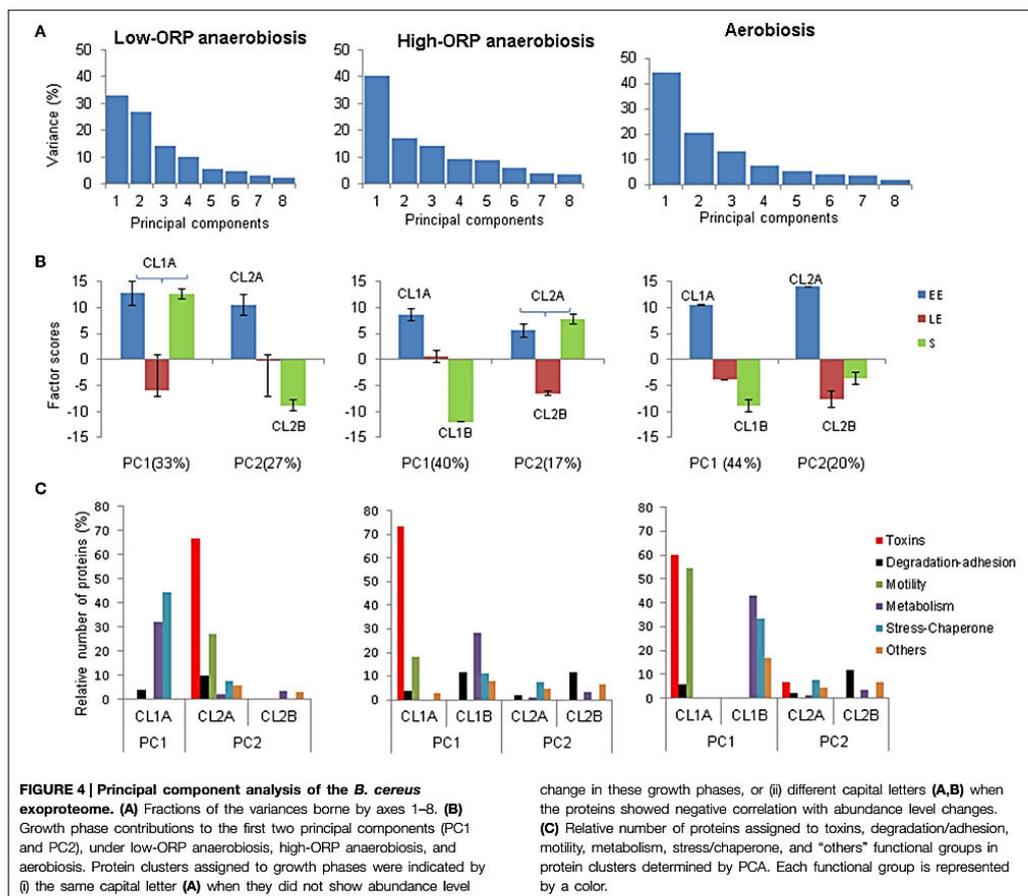
Figure 2A, shows a Venn diagram comparing the exoproteomes identified in the three different growth conditions. In this case, 229 of the 392 proteins identified were found to accumulate in the extracellular milieu, whatever the redox growth conditions. Regarding this feature from a quantitative perspective, this core proteome accounts for 89% of the total NSAF. Besides this core exoproteome, 54, 12, and 16 proteins were found exclusively in aerobically, high-ORP- and low-ORP-anaerobically grown cells, respectively. Globally, these proteins are poorly abundant, explaining why some of them were detected in the EE growth phase and not in the LE and S growth phases, especially under aerobiosis (20/54) and low-ORP anaerobiosis (8/16), as shown in Figure 2B. However, 5 and 2 proteins may be considered as fully representative of oxic and low-ORP anoxic conditions, respectively, because they were systematically detected in the three growth phases. The five aerobiosis-specific proteins are: the β -subunit of pyruvate dehydrogenase E1 (PdhB; BC3972), which catalyzes the decarboxylation of pyruvate into acetyl-CoA in oxic conditions; a ribosomal protein (RpsH, BC0145); a putative cell-surface protein (BC4549); a scaffold protein (BC1893); and a putative ferrichrome ABC transporter substrate-binding protein (BC5380). The two proteins that specifically accumulated under low-ORP anaerobiosis are a putative D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (BC3248) and a putative nucleoside-binding protein (BC3791). No protein was found to be specifically assigned to high-ORP anoxic conditions.



Functional Insights into the Pan-Exoproteome of *B. cereus*

Figure 3 shows the whole set of exoproteins that were detected for the three growth phases in each growth condition and were classified into six main functional categories. The group “Others” comprises non-classical secreted proteins (translation, transcription, cell division, rod shape-related proteins), extracellular component of transport systems, proteins that are usually anchored to the bacterial membrane, and proteins with no function yet identified. Remarkably, more than 40% of the identified exoproteins (CDS) were classified in this group. Among these, 27 did not show any significant similarities with any known proteins, as determined by BLAST searches against the NCBI nr database. Therefore, these could be considered as lineage-specific proteins for the *B. cereus* species (for more details see Table S3 in Supplementary Material). The number of CDS assigned to the

toxin-related group is much lower (10-fold) than to the “Others” group, but the toxin-related group was more highly represented in terms of spectral counts (SC) and NSAF, and thus abundant whatever the condition. Toxin-related group represented the largest ratio of the MS/MS-detected peptides, with a range from 26 to 33%. Like the toxin-related group, the motility and stress/chaperone-related groups contain a low number of proteins. However, these two groups represent a lower abundance fraction of the exoproteome than the toxin-related group in the three conditions. Flagella components, usually anchored to the membrane, are the main contributors to the motility group (Table S3 in Supplementary Material). Their presence in the exoproteome could be explained by their fragility. When shaking the culture or removing cells by filtration or centrifugation, they can be easily broken into small pieces. Like the flagella components, the proteins belonging to the group comprising stress-



and chaperone-related proteins (such as catalases, superoxide dismutase, GroEL, Dnak, etc.) did not comprise any typical peptide signal. However, they are known as typical components of the exoproteome of pathogens (Armengaud et al., 2012). Adhesion and degradative proteins belong to an abundant fraction of the *B. cereus* exoproteome in the three conditions. The number of proteins dedicated to adhesion functions was lower than those assigned to degradation and the adhesion-related group was also less detected in terms of SC (Table S3 in Supplementary Material). The metabolism group comprises proteins related to central, amino acid, lipid, and fatty acid metabolism. The former subgroup is the most abundant and the latter the least abundant in terms of spectral counts (Table S3 in Supplementary Material). Specifically, Figure 3 shows that the percentages of proteins belonging to the stress/chaperone-related and motility-related groups were higher under aerobiosis than under anaerobiosis, especially under high-ORP anaerobiosis. In contrast, the percentages of toxin-, degradative- and adhesion-related proteins were higher under anaerobiosis than under aerobiosis. The genes/operons involved in flagellum biosynthesis, enzymatic defenses against stress, and virulence factors are known to be tightly regulated in response to the presence or absence of dioxygen (Evans et al., 2011). This may contribute to the changes observed in the exoproteome.

Principal Component Analysis of *B. cereus* Exoproteome Dynamics

PCA was carried out to simplify the exoproteome time-course data of *B. cereus* (Ivosev et al., 2008; Jayapal et al., 2008), following a previous procedure (Clair et al., 2013). We chose to exclude

from the original datasets (259 proteins, Table S2 in Supplementary Material) the proteins found in less than two out of the three replicates for each growth phase sample in each condition. Considering the three growth phase-related observations (EE, LE, and S) and the three biological replicates for each observation, datasets for PCA comprised 9 readouts for 88 proteins under low-ORP anaerobiosis, 106 proteins under high-ORP anaerobiosis, and 114 proteins under aerobiosis. These datasets and analytical details are given in Table S4 in Supplementary Material.

Overview of Exoproteome Dynamics

PCAs extracted two principal components (PC1 and PC2), which explained ~60% of the total variance in the three conditions (Figure 4A). Scores and loadings of PC1 and PC2 are different in the three growth conditions (Figure 4B). This indicates that PCA extracted two time-course clusters (represented by PC1 and PC2) that did not contribute equally to the dynamics of the exoproteome in each condition. Figure 4B shows that, under low-ORP anaerobiosis, PC1 represented the tendency of some proteins (co-clustered in CL1A) to be similarly abundant in the EE and S growth phases. PC2 negatively correlates the abundance level decrease of some proteins (CL2A) between the EE and S growth phases with the abundance level increase of other proteins (CL2B). Under high-ORP anaerobiosis PC1 showed the same features as PC2 under low-ORP anaerobiosis and identified two protein clusters, named CL1A and CL1B. PC2 negatively correlates the absence of abundance level change of some proteins (CL2A) between the EE and S growth phases with the abundance level decrease of some proteins (CL2A) between the EE and LE growth phases. Under aerobiosis, PC1 represented the

TABLE 2 | Clustering of toxin-related proteins during *B. cereus* growth under low- and high-ORP anaerobiosis and aerobiosis.

Gene	Protein name	Clustering of toxin-related proteins ^a										
		Low-ORP anaerobiosis			High-ORP anaerobiosis				Aerobiosis			
		CL1A ^b	CL2A	CL2B	CL1A	CL1B	CL2A	CL2B	CL1A	CL1B	CL2A	CL2B
BC1110	CytK		■		■							
BC5239	EntA		■		■							
BC2952	EntB		■					■				
BC0813	EntC				■							
BC3716	EntD											
BC1953	EntFM											
BC3101	HblB'		■		■			■				
BC3102	HblB		■		■			■				
BC3103	Hbl1		■		■			■				
BC3104	Hbl2		■		■			■				
BC5101	HlyI									■		
BC3523	HlyII							■				
BC1809	NheA		■		■			■				
BC1810	NheB		■		■			■				
BC1811	NheC		■		■			■				

^aBackground colors identify proteins that are co-clustered.

^bClusters extracted from PCA and contributing to PC1 and PC2 were indicated as CL1 and CL2. The capital letters indicate sub-clusters of CL1 and CL2.

same features as PC1 and PC2 under high- and low-ORP anaerobiosis, respectively and identified two clusters of proteins CL1A and CL1B. PC2 negatively correlates the decrease in abundance level of some proteins (CL2A) with the increase in abundance level of other proteins (CL2B) between the EE and S growth phases.

Distribution of Functional Groups inside Kinetic Clusters of Proteins

All proteins contributing to the CL clusters extracted from PC1 and PC2 were assigned to one of the six functionally distinguished groups established in Figure 3. Figure 4C shows that, under low-ORP anaerobiosis, stress/chaperone- and metabolism-related proteins preferentially contributed to CL1A and toxin- and motility-related proteins to CL2A. Under both high-ORP anaerobiosis and aerobiosis, toxin-, motility-, metabolism-, and stress/chaperone-related proteins preferentially contributed to CL1A. However, CL1A co-clustered a higher number of toxin-related proteins under high-ORP anaerobiosis while it clustered a higher number of motility-, metabolism-, and stress-related proteins under aerobiosis. Taken together, the results show that toxin-related proteins displayed the highest functional-group homogeneity compared to other functionally related proteins in the three growth conditions. Specifically, PCA revealed that the decrease in abundance level of the majority of toxin-related proteins between EE and S growth phases was (i) uncorrelated with the change in abundance level of the majority of metabolism- and stress-related proteins under low-ORP anaerobiosis, (ii) negatively correlated with the increase in abundance level of less than ~30% of metabolism-related proteins under high-ORP anaerobiosis, and (iii) negatively correlated with the increase in abundance level of more than 40 and 30% of metabolism- and stress-related proteins, respectively, under aerobiosis. Studies of metabolic network structures have shown that connected functional groups of proteins may contribute to a common cellular process (Ravasz et al., 2002). Our data raise the question of the role of toxins in *B. cereus* active growth, i.e., in primary metabolism and possibly in cellular protection against metabolism-related oxidative stress in respiring aerobic cells.

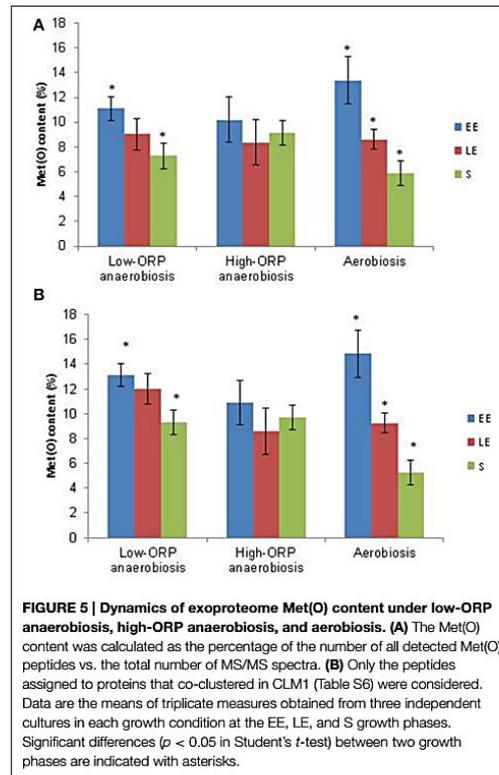
Focus on the Dynamics of Toxin-Related Proteins

Table 2 lists the toxin-related proteins that contributed to CL2A under low-ORP anaerobiosis and CL1A under high-ORP anaerobiosis and aerobiosis. The data show that the three hemolysin BL (Hbl) components (HblL1, HblL2, and HblB) co-clustered with HblB¹, which is encoded by the *hblB* gene located downstream of the *hblCDA* operon (Clair et al., 2010), in the three conditions. Co-clustering was also observed for the three non-hemolytic enterotoxin (Nhe) components, which are encoded by the *nheABC* operon (Lindback et al., 2004). Hbl and Nhe components also co-clustered with (i) hemolysin II (HlyII) under aerobiosis, (ii) EntB under both aerobiosis and low-ORP anaerobiosis, (iii) EntA and EntC under high-ORP anaerobiosis, and (iv) cytotoxin K (CytK) and Hly I under both high- and low-ORP anaerobiosis. In conclusion, Hbl and Nhe components may constitute the core of the toxin-related clusters and the other proteins

constitute the growth condition variance with (i) HlyII representative of aerobic respiratory condition, (ii) CytK and HlyI representatives of the anaerobic fermentative conditions, (iii) EntA and EntC representatives of classical anoxic conditions (high-ORP anaerobiosis), and (iv) EntB representative of both aerobic respiration and low-ORP anaerobic fermentation. These two latter conditions generate endogenous oxidative stress, which is counteracted by antioxidant systems. Among these, OhrRA was found to regulate EntB (Clair et al., 2012). Consequently, EntB could be a marker of oxidative stress-generating conditions.

Dynamics of the Met(O) Content of the *B. cereus* Exoproteome

In all Gram-positive bacteria, the majority of extracellular proteins need to remain unfolded to be translocated across the plasma membrane, the plasma membrane being known to support the highest level of ROS production in the cell (Fisher, 2009; Schneewind and Missiakas, 2014). On the other hand, Met residues in polypeptidic chains are more sensitive to oxidation than Met residues in mature proteins, as Met residues are usually located in the hydrophobic core of proteins (Fliss et al.,



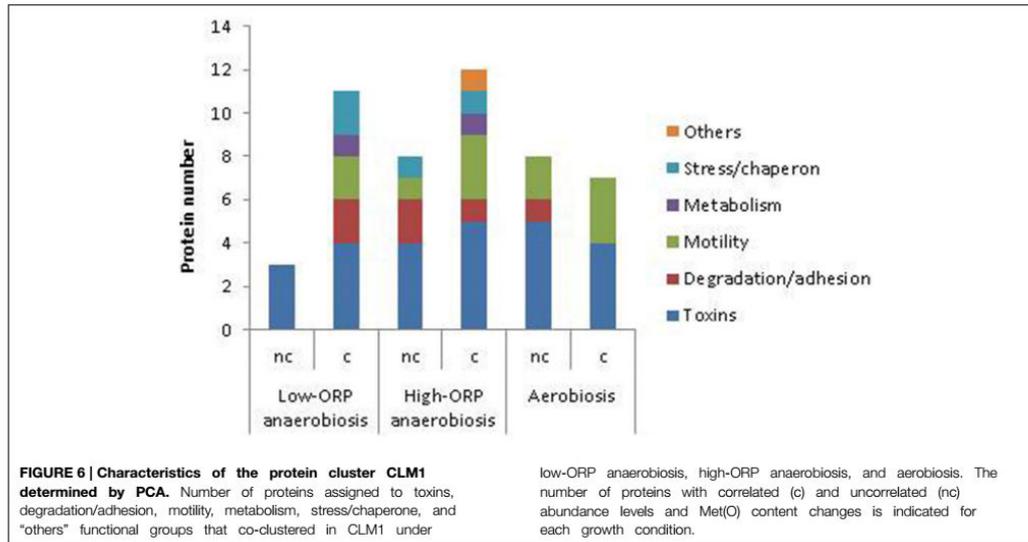


TABLE 3 | Co-clustering of toxin-related proteins in CLM1 under low-ORP anaerobiosis, high-ORP anaerobiosis, and aerobiosis.

Gene	Protein name	Clustering of toxin-related proteins ^a		
		Anaerobiosis		Aerobiosis
		Low-ORP	High-ORP	
BC1110	CytK			
BC5239	EntA		c ^b	nc
BC2952	EntB	nc	nc	c
BC0813	EntC		c	nc
BC1953	EntFM		nc	
BC3102	HblB	nc		nc
BC3103	HblL1	c		c
BC3104	HblL2	c	c	c
BC3101	HblB'	nc	nc	nc
BC5101	HlyI			
BC1809	NheA	c	c	nc
BC1810	NheB	c	c	c
BC1811	NheC			

^aBackground colors identify proteins that are co-clustered.

^bThe symbols c and nc indicate that the Met(O) peptide content change of a protein is correlated or uncorrelated, respectively, with its abundance level change during growth.

1983; Drazic and Winter, 2014). For these reasons, intracellular ROS may cause significant oxidation of exoproteins prior to their translocation. Insofar as Met(O) residues are not reduced back to Met, and there is no ROS source in the extracellular medium, the Met(O) content of the exoproteome might directly reflect endogenous ROS oxidation. To test this hypothesis, we used nanoLC-MS/MS to assess Met(O) content in all the proteins

identified in the exoproteome. We analyzed their time-course dynamics in aerobically grown cells and in anaerobically grown cells for this specific parameter.

Overview of Methionine Oxidation

A total of 4532 peptides containing oxidized Met residue(s) (Met(O) peptides) were identified along the 27 nanoLC-MS/MS runs (Table S1 in Supplementary Material). A total of 211 different Met(O) peptides were listed (Table S5 in Supplementary Material), a significant number of them being detected reproducibly. The Met(O) peptide content of the *B. cereus* exoproteome was estimated as a percentage of the total number of peptides identified in each of the three biological samples obtained for each growth phase sample under low- and high-ORP anaerobiosis and aerobiosis. Figure 5A shows that the Met(O) peptide content of the *B. cereus* exoproteome decreased significantly during growth under low-ORP anaerobiosis and aerobiosis, to reach its minimum in the stationary phase. However, aerobiosis sustains a higher decrease along this kinetic compared to low-ORP anaerobiosis. Strikingly, no significant change was observed under high-ORP anaerobiosis. Similar results were obtained by comparing the number of Met(O) to the total number of Met (Figure S1 in Supplementary Material). The level of Met oxidation as assessed here is a complex result of the balance between endogenous ROS generation on the one hand and the ability of the cell to repair Met on the other. Oxidized Met can be repaired by antioxidant systems (Drazic and Winter, 2014). Under aerobiosis, the high Met(O) peptide content of the EE exoproteome compared to the S exoproteome could reflect either a surplus of ROS generated by the activity of the respiratory chain (Seaver and Imlay, 2001) or a higher activity of the antioxidant

systems in S growth phase (Alamuri and Maier, 2006; Vekaria and Chivukula, 2010). Under anaerobiosis, and in the absence of final electron acceptors for respiratory electron processes, *B. cereus* cells ferment glucose (Zigha et al., 2007). Fermentative pathways do not produce ROS as typical metabolic by-products under classical anaerobic conditions (Landolfo et al., 2008). This may explain why there is no change in the Met(O) peptide content of the *B. cereus* exoproteome during growth under high-ORP anaerobiosis. We reported previously that reductive stress, such as is encountered under low-ORP anaerobiosis, caused intracellular redox imbalance at the EE growth phase, and generated a secondary oxidative stress response (Mols and Abee, 2011; Clair et al., 2013). This could increase the ability of anaerobic cells to repair oxidized Met and explain why S growth phase sustains a lower Met(O) content under low-ORP anaerobiosis than under high-ORP anaerobiosis.

Identification of Proteins with Differential Abundance Levels and Met(O)-Content Dynamics

To identify proteins exhibiting differences in abundance level and Met(O)-content dynamics, we conducted a second PCA using both abundance (in terms of total number of peptides) and Met(O) peptide content (number of Met(O)-containing

peptides) to define proteins in each growth condition. For a robust analysis of the variability in terms of Met(O) peptide content, we considered the proteins containing at least one Met(O) peptide identified in at least two biological replicates. A total of 43 proteins were confidently listed as being oxidized with this criterion (Table S6 in Supplementary Material). Among these, 13 proteins are toxin-related proteins. Remarkably, EntD and HlyII are the only components from the list of detected toxins reported in Table 2 that are not post-translationally modified. The other oxidized proteins are degradative enzymes and adhesins (10), and to a lesser extent, flagella (6), stress-related proteins (4), metabolism-related proteins (7), and uncharacterized proteins (3). PCA extracted 3 Met(O)-related groups (CLM1-3) under low-ORP anaerobiosis, high-ORP anaerobiosis, and aerobiosis (Table S6 in Supplementary Material). Figure 5B shows that CLM1 is representative of the variability of the Met(O) peptide content of the *B. cereus* exoproteome during growth in the three conditions tested. When analyzing the correlation between Met(O) peptide content and abundance level, proteins with differential abundance levels and Met(O)-content dynamics were highlighted. These represent 27, 40, and 53% of proteins co-clustered in CLM1 under low- and high-ORP anaerobiosis, and aerobiosis, respectively (Figure 6). This suggests that oxidation of

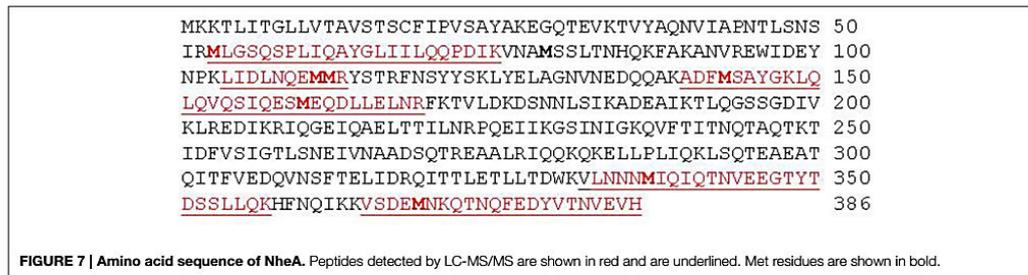


FIGURE 7 | Amino acid sequence of NheA. Peptides detected by LC-MS/MS are shown in red and are underlined. Met residues are shown in bold.

TABLE 4 | List of NheA peptides containing oxidized and non-oxidized Met residues.

Peptides detected by LC-MS/MS	Met ^a	LC-MS/MS identification		
		Met oxidation		Aerobiosis
		Anaerobiosis		
		Low-ORP	High-ORP	
MLGSQSPLIQAYGLIILQQPDIK	M53	M53(O)	M53(O)	nd ^b
LIDLNQEMMR	M111	M111(O) M112(O)	M111(O)	nd
	M112	M112(O)	M112(O)	M111(O)M112(O)
ADFMSAYGK	M143	nd	Nd	nd
LQLQVQSIQESMEQDLLELNRF	M160	nd	Nd	nd
VLNNMIIQIQTNVEEGTYDSSLQK	M337	nd	Nd	nd
VSDENKQTNQFEDYVTNVEVH	M369	nd	Nd	nd

^aMethionine residues (Met) and oxidized Met residues Met(O) were identified by their position in the protein sequence (Figure 7).

^bNd indicates that no oxidized Met residue was detected.

Methionine residues are indicated in bold in peptides detected by LC-MS/MS.

TABLE 5 | Oxidation of Met residues in toxin-related proteins under low-ORP anaerobiosis, high-ORP anaerobiosis, and aerobiosis.

Gene	Protein name	Number of Met residues		Number of Met(O) residues		
		Total ^a	Detected ^b	Low-ORP anaerobiosis	High-ORP anaerobiosis	Aerobiosis
BC1110	CytK	5	5	1	2	0
BC5239	EntA	3	2	2	2	2
BC2952	EntB	4	2	1	1	1
BC0813	EntC	2	2	2	2	2
BC1953	EntFM	1	1	0	1	0
BC3101	HblB'	13	1	1	1	1
BC3102	HblB	7	6	6	5	4
BC3103	HblL1	7	4	4	4	3
BC3104	HblL2	7	6	6	5	4
BC5101	HlyI	5	2	0	0	2
BC1809	NheA	8	7	3	3	2
BC1810	NheB	4	3	2	2	2
BC1811	NheC	10	2	0	1	0

^aThe number of Met residues was calculated from the sequence of the mature form of the protein (without peptide signal).

^bThe numbers reported in this column are the numbers of Met residues detected in our study by LC-MS/MS.

Met residues may be more specific under aerobiosis than under anaerobiosis. **Figure 6** shows that CLM1 comprises a significant subset of Met(O) toxin-related proteins whatever the conditions (7, 9, and 9 under low- and high-ORP anaerobiosis, and aerobiosis, respectively). **Table 3** lists the toxin-related proteins that contributed to CML1 and differentiates proteins with similar abundance levels and Met(O)-content dynamics from proteins with differential abundance levels and Met(O)-content dynamics. The data show that HblB, HblL2, HblB', NheA, NheB, and EntB may constitute the core of the toxin-related sub clusters and HblL1, EntA, EntC, and EntFM constitute the growth condition variance with EntFM representative of high-ORP aerobiosis. **Table 3** also shows that aerobiosis may sustain higher specific oxidation of Met residues in NheA compared to anaerobiosis. To further strengthen this latter observation, we analyzed the peptides specifically assigned to NheA (**Figure 7**). Among the 7 Met residues detected in the 6 NheA-assigned peptides reported in **Figure 7**, four were never detected as oxidized (**Table 4** and Supplementary Table S6). This indicates that all NheA-bound methionines are not equally susceptible to oxidation. This may be due to their neighboring amino acids (Ghesquiere et al., 2011). Secondly, NheA contains one Met residue (M53) that is oxidized under anaerobiosis but not under aerobiosis. In addition, NheA contains two adjacent Met residues at positions 111 and 112, which are differentially oxidized under aerobiosis compared to anaerobiosis: oxidation of the first Met residue (M111) occurred only when the second (M112) was oxidized under aerobiosis, while oxidation of M111 did not depend on M112 oxidation under anaerobiosis. Therefore, NheA contains Met residues that respond differently to oxidation under anaerobiosis and

aerobiosis. This is also the case for CytK, EntFM, HblB, HblL1, HblL2, and NheC, which all contain one Met residue oxidized under anaerobiosis but not under aerobiosis (**Table 5**). Thus, anaerobiosis increases the oxidation susceptibility of methionine in toxin-related proteins. This may be due to the presence of a different pattern of oxidants in fermentative cells (Mahawar et al., 2012). Taken together, our data indicate that toxin-related proteins contain Met residues that are not equally susceptible to oxidation and Met residue selectivity is a factor that may contribute to Met oxidation under aerobiosis.

Conclusion

We used nanoLC-MS/MS data to analyze global changes in the *B. cereus* exoproteome during growth in glucose-containing medium under controlled conditions of pH and pO₂. We have shown that PCA can identify groups of exoproteins that are coordinately controlled at the growth phase level. The results indicated that proteins belonging to the toxin-related group define characteristic kinetic profiles correlated with the physiological state of the culture in respiring, as in fermenting, cells. The majority of toxin-related proteins accumulated during the exponential growth phase, whatever the conditions. However, their dynamics differ significantly under aerobiosis and anaerobiosis if we consider how their patterns in terms of metabolism, oxidative stress-related proteins and the time dynamics of their Met(O) content are interconnected. Several studies have reported that Met residues of proteins may act as ROS scavengers (Luo and Levine, 2009). It is thus possible that Met residues in toxin-related proteins may act as endogenous antioxidants before being secreted into the extracellular medium. High-level secretion of toxins during the exponential phase may thus contribute to the protection of *B. cereus* cells against cellular oxidation and maintain redox homeostasis by keeping endogenous ROS at bay, especially under aerobiosis. Evidently further studies should be now conducted to confirm these hypotheses. The consequences of methionine oxidation on proteins may vary from structural alterations leading to altered activity and/or altered signal events to protein degradation (Levine et al., 2000). This raises questions about the role of Met oxidation in *B. cereus* virulence, and especially in *B. cereus* cytotoxicity. Indeed, our study demonstrated that the major cytotoxins of the *B. cereus* exoproteome, such as Nhe and Hbl (Sastalla et al., 2013), contain oxidizable methionines, and the effect of oxidation on their biological activity is worthy of documentation.

Acknowledgments

We thank Virginie Jouffrey for her assistance in bioinformatics analyses.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00342/abstract>

References

- Alamuri, P., and Maier, R. J. (2006). Methionine sulfoxide reductase in *Helicobacter pylori*: interaction with methionine-rich proteins and stress-induced expression. *J. Bacteriol.* 188, 5839–5850. doi: 10.1128/JB.00430-06
- Armengaud, J., Christie-Oleza, J. A., Clair, G., Malard, V., and Duport, C. (2012). Exoproteomics: exploring the world around biological systems. *Expert Rev. Proteomics* 9, 561–575. doi: 10.1586/ep.12.52
- Bishop, B. L., Lodolce, J. P., Kolodziej, L. E., Boone, D. L., and Tang, W. J. (2010). The role of anthrolysin O in gut epithelial barrier disruption during *Bacillus anthracis* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 254–259. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.091
- Brynildsen, M. P., Winkler, J. A., Spina, C. S., Macdonald, I. C., and Collins, J. J. (2013). Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. *Nat. Biotechnol.* 31, 160–165. doi: 10.1038/nbt.2458
- Chi, B. K., Gronau, K., Maeder, U., Hessling, B., Becher, D., and Antelmann, H. (2011). S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in *Bacillus subtilis* as revealed by transcriptomics and redox proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M111.009506. doi: 10.1074/mcp.M111.009506
- Christie-Oleza, J. A., Pina-Villalonga, J. M., Bosch, R., Nogales, B., and Armengaud, J. (2012). Comparative proteogenomics of twelve *Roseobacter* exoproteomes reveals different adaptive strategies among these marine bacteria. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.013110. doi: 10.1074/mcp.M111.013110
- Clair, G., Armengaud, J., and Duport, C. (2012). Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.013102. doi: 10.1074/mcp.M111.013102
- Clair, G., Lorphelin, A., Armengaud, J., and Duport, C. (2013). OhrRA functions as a redox-responsive system controlling toxinogenesis in *Bacillus cereus*. *J. Proteomics* 94, 527–539. doi: 10.1016/j.jprot.2013.10.024
- Clair, G., Roussi, S., Armengaud, J., and Duport, C. (2010). Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 1486–1498. doi: 10.1074/mcp.M000027-MCP201
- Dedieu, A., Gaillard, J. C., Pourcher, T., Darrouzet, E., and Armengaud, J. (2011). Revisiting iodination sites in thyroglobulin with an organ-oriented shotgun strategy. *J. Biol. Chem.* 286, 259–269. doi: 10.1074/jbc.M110.159483
- De Groot, A., Dulermeo, R., Ortet, P., Blanchard, L., Guerin, P., Fernandez, B., et al. (2009). Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. *PLoS Genet.* 5, e1000434. doi: 10.1371/journal.pgen.1000434
- Drazic, A., and Winter, J. (2014). The physiological role of reversible methionine oxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1844, 1367–1382. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.01.001
- Dupierri, V., Masselon, C., Court, M., Kieffer-Jaquinod, S., and Bruley, C. (2009). A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMA. *Bioinformatics* 25, 1980–1981. doi: 10.1093/bioinformatics/btp301
- Duport, C., Zigha, A., Rosenfeld, E., and Schmitt, P. (2006). Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J. Bacteriol.* 188, 6640–6651. doi: 10.1128/JB.00702-06
- Evans, M. R., Fink, R. C., Vazquez-Torres, A., Porwollik, S., Jones-Carson, J., McClelland, M., et al. (2011). Analysis of the ArcA regulon in anaerobically grown *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*. *BMC Microbiol.* 11, 58. doi: 10.1186/1471-2180-11-58
- Fabich, A. J., Jones, S. A., Chowdhury, F. Z., Cernosek, A., Anderson, A., Smalley, D., et al. (2008). Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infect. Immun.* 76, 1143–1152. doi: 10.1128/IAI.01386-07
- Fisher, A. B. (2009). Redox signaling across cell membranes. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1349–1356. doi: 10.1089/ars.2008.2378
- Fliss, H., Weissbach, H., and Brot, N. (1983). Oxidation of methionine residues in proteins of activated human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 7160–7164. doi: 10.1073/pnas.80.23.7160
- Ghesquiere, B., Jonckheere, V., Colaert, N., Van Durme, J., Timmerman, E., Goethals, M., et al. (2011). Redox proteomics of protein-bound methionine oxidation. *Mol. Cell. Proteomics* 10, M110.006866. doi: 10.1074/mcp.M110.006866
- Gilois, N., Ramarao, N., Bouillaut, L., Perchat, S., Aymerich, S., Nielsen-Leroux, C., et al. (2007). Growth-related variations in the *Bacillus cereus* secretome. *Proteomics* 7, 1719–1728. doi: 10.1002/pmic.200600502
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Okstad, O. A., Gominet, M., et al. (2008). The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE* 3, e2793. doi: 10.1371/journal.pone.0002793
- Gonzalez-Flecha, B., and Demple, B. (1995). Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 13681–13687. doi: 10.1074/jbc.270.23.13681
- Guyton, A. C. (1977). "Basic human physiology," in *Normal Function and Mechanisms of Diseases* (Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company), 408–423.
- Hartmann, E. M., and Armengaud, J. (2014). N-terminomics and proteogenomics, getting off to a good start. *Proteomics* 14, 2637–2646. doi: 10.1002/pmic.201400157
- Henderson, B., and Martin, A. (2011). Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect. Immun.* 79, 3476–3491. doi: 10.1128/IAI.00179-11
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 443–454. doi: 10.1038/nrmicro3032
- Ingmer, H., and Bronsted, L. (2009). Proteases in bacterial pathogenesis. *Res. Microbiol.* 160, 704–710. doi: 10.1016/j.resmic.2009.08.017
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., et al. (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423, 87–91. doi: 10.1038/nature01582
- Ivosev, G., Burton, L., and Bonner, R. (2008). Dimensionality reduction and visualization in principal component analysis. *Anal. Chem.* 80, 4933–4944. doi: 10.1021/ac800110w
- Jayapal, K. P., Philp, R. J., Kok, Y. J., Yap, M. G., Sherman, D. H., Griffin, T. J., et al. (2008). Uncovering genes with divergent mRNA-protein dynamics in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS ONE* 3, e2097. doi: 10.1371/journal.pone.0002097
- Kamar, R., Gohar, M., Jehanno, L., Rejasse, A., Kallassy, M., Lereclus, D., et al. (2013). Pathogenic potential of *Bacillus cereus* strains as revealed by phenotypic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 51, 320–323. doi: 10.1128/JCM.02848-12
- Landolfo, S., Politi, H., Angelozzi, D., and Mannazzu, I. (2008). ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim. Biophys. Acta* 1780, 892–898. doi: 10.1016/j.bbagen.2008.03.008
- Laouami, S., Clair, G., Armengaud, J., and Duport, C. (2014). Proteomic evidences for rex regulation of metabolism in toxin-producing *Bacillus cereus* ATCC 14579. *PLoS ONE* 9, e107354. doi: 10.1371/journal.pone.0107354
- Lé, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). FactoMineR: an R Package for multivariate analysis. *J. Stat. Softw.* 25, 1–18.
- Le Lay, J., Bahloul, H., Serino, S., Jobin, M., and Schmitt, P. (2015). Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels. *Food Microbiol.* 46, 314–321. doi: 10.1016/j.fm.2014.07.007
- Levine, R. L., Moskowitz, J., and Stadtman, E. R. (2000). Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. *IUBMB Life* 50, 301–307. doi: 10.1080/15216540051081056
- Lindback, T., Fagerlund, A., Rodland, M. S., and Granum, P. E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* 150, 3959–3967. doi: 10.1099/mic.0.27359-0
- Luo, S., and Levine, R. L. (2009). Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J.* 23, 464–472. doi: 10.1096/fj.08-118414
- Mahawar, M., Atianand, M. K., Dotson, R. J., Mora, V., Rabadi, S. M., Metzger, D. W., et al. (2012). Identification of a novel *Francisella tularensis* factor required for intramacrophage survival and subversion of innate immune response. *J. Biol. Chem.* 287, 25216–25229. doi: 10.1074/jbc.M112.367672
- Mailloux, R. J., Lemire, J., and Appanna, V. D. (2011). Metabolic networks to combat oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 99, 433–442. doi: 10.1007/s10482-010-9538-x
- Marteyn, B., West, N. P., Browning, D. F., Cole, J. A., Shaw, J. G., Palm, F., et al. (2010). Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen *in vivo*. *Nature* 465, 355–358. doi: 10.1038/nature08970
- Mols, M., and Abee, T. (2011). Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environ. Microbiol.* 13, 1387–1394. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02433.x

- Moriarty-Craige, S. E., and Jones, D. P. (2004). Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 24, 481–509. doi: 10.1146/annurev.nutr.24.012003.132208
- Nieselt, K., Battke, F., Herbig, A., Bruheim, P., Wentzel, A., Jakobsen, O. M., et al. (2010). The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics* 11:10. doi: 10.1186/1471-2164-11-10
- Ramarao, N., and Sanchis, V. (2013). The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins (Basel)* 5, 1119–1139. doi: 10.3390/toxins5061119
- Ravasz, E., Somera, A. L., Mongru, D. A., Oltvai, Z. N., and Barabasi, A. L. (2002). Hierarchical organization of modularity in metabolic networks. *Science* 297, 1551–1555. doi: 10.1126/science.1073374
- Rosenfeld, E., Dupont, C., Zigha, A., and Schmitt, P. (2005). Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Can. J. Microbiol.* 51, 149–158. doi: 10.1139/w04-132
- Sadagopal, S., Braunstein, M., Hager, C. C., Wei, J., Daniel, A. K., Bochan, M. R., et al. (2009). Reducing the activity and secretion of microbial antioxidants enhances the immunogenicity of BCG. *PLoS ONE* 4:e5531. doi: 10.1371/journal.pone.0005531
- Sastalla, I., Fattah, R., Coppage, N., Nandy, P., Crown, D., Pomerantsev, A. P., et al. (2013). The *Bacillus cereus* Hbl and Nhe tripartite enterotoxin components assemble sequentially on the surface of target cells and are not interchangeable. *PLoS ONE* 8:e76955. doi: 10.1371/journal.pone.0076955
- Schneewind, O., and Missiakas, D. (2014). Sec-secretion and sortase-mediated anchoring of proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1687–1697. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.11.009
- Seaver, L. C., and Imlay, J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 7173–7181. doi: 10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001
- Stadtman, E. R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N. B., and Levine, R. L. (2005). Methionine oxidation and aging. *Biochim. Biophys. Acta* 1703, 135–140. doi: 10.1016/j.bbapap.2004.08.010
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A., and Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 579–606. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00112.x
- Vekaria, H. J., and Chivukula, R. P. (2010). Influence of thiol stress on oxidative phosphorylation and generation of ROS in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biophys. Chem.* 1, 172–176. doi: 10.4236/jbpc.2010.13020
- Vellasamy, K. M., Vasu, C., Puthuchery, S. D., and Vadivelu, J. (2009). Comparative analysis of extracellular enzymes and virulence exhibited by *Burkholderia pseudomallei* from different sources. *Microb. Pathog.* 47, 111–117. doi: 10.1016/j.micpath.2009.06.003
- Vogt, W. (1995). Oxidation of methionyl residues in proteins—tools, targets, and reversal. *Free Rad. Biol. Med.* 18, 93–105. doi: 10.1016/0891-5849(94)00158-G
- Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., and Dupont, C. (2007). The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J. Bacteriol.* 189, 2813–2824. doi: 10.1128/JB.01701-06

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2015 Madeira, Alpha-Bazin, Armengaud and Dupont. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CHAPITRE II – Rôle du plasmide pBClin15 dans la dynamique de l'exoprotéome et du protéome cellulaire de *B. cereus* en aérobiose

II.1 Problématique et objectifs

Dans notre précédente étude, nous avons pu observer que les résidus méthionines des protéines extracellulaires étaient oxydés potentiellement par les ROS endogènes et que l'abondance des Met(O) était dépendante de la phase de croissance en aérobiose (Madeira, *et al.*, 2015). Sachant que l'activité des Msr est dépendante de la phase de croissance, qu'elle a une activité préférentielle sur les protéines dépliées (et donc sur les protéines sécrétées) et qu'elle régule le taux d'oxydation, nous avons fait l'hypothèse que MsrAB pouvait réguler le taux d'oxydation des Met des protéines extracellulaires. Pour tester cette hypothèse, nous avons construit une souche ne synthétisant plus MsrAB. La construction de cette souche s'est accompagnée de la perte du plasmide pBClin15. Pour pouvoir réaliser des analyses comparatives de l'exoprotéome et du protéome intracellulaire, nous avons construit un mutant à partir de la souche sauvage ne possédant plus le plasmide pBClin15. Nous avons ensuite cherché à déterminer le rôle de ce plasmide dans la dynamique de l'exoprotéome et protéome intracellulaire.

II.2 Stratégie d'analyse de la dynamique des protéines intracellulaires

Pour déterminer le rôle du plasmide pBClin15 dans la dynamique des protéomes, les cultures cellulaires ont été réalisées en fermenteur dans du milieu MOD contenant 30 mM de glucose comme source de carbone. L'aérobiose est obtenue par bullage d'air atmosphérique ($pO_2 = 100\%$). Les prélèvements sont réalisés au cours de la croissance en phase exponentielle, de ralentissement et stationnaire. Pour chaque souche, trois cultures ont été réalisées. La méthode de prélèvements des surnageants et récolte des cellules sont décrites dans le chapitre Matériel et méthodes (cf. 4.3). Les cellules sont rincées et remises en suspension dans du PBS 1X avant leur conservation à -80°C . La méthode d'extraction des protéines intracellulaires et la préparation des échantillons protéiques sont décrites dans le chapitre Matériel et méthodes (cf. 5.5 et 5.6). Chaque échantillon contient 40 μg de protéines cellulaires totales repris dans 30 μl de LDS 1X + β -mercaptoéthanol. La stratégie d'analyse des échantillons est une stratégie *shotgun*. Les mêmes précautions ont été prises que celles prises dans l'étude précédente. Pour pouvoir réaliser une comparaison des résultats obtenus pour le protéome cellulaire et l'exoprotéome, les conditions d'analyse en spectrométrie de masse sont identiques (**Figure 32**).

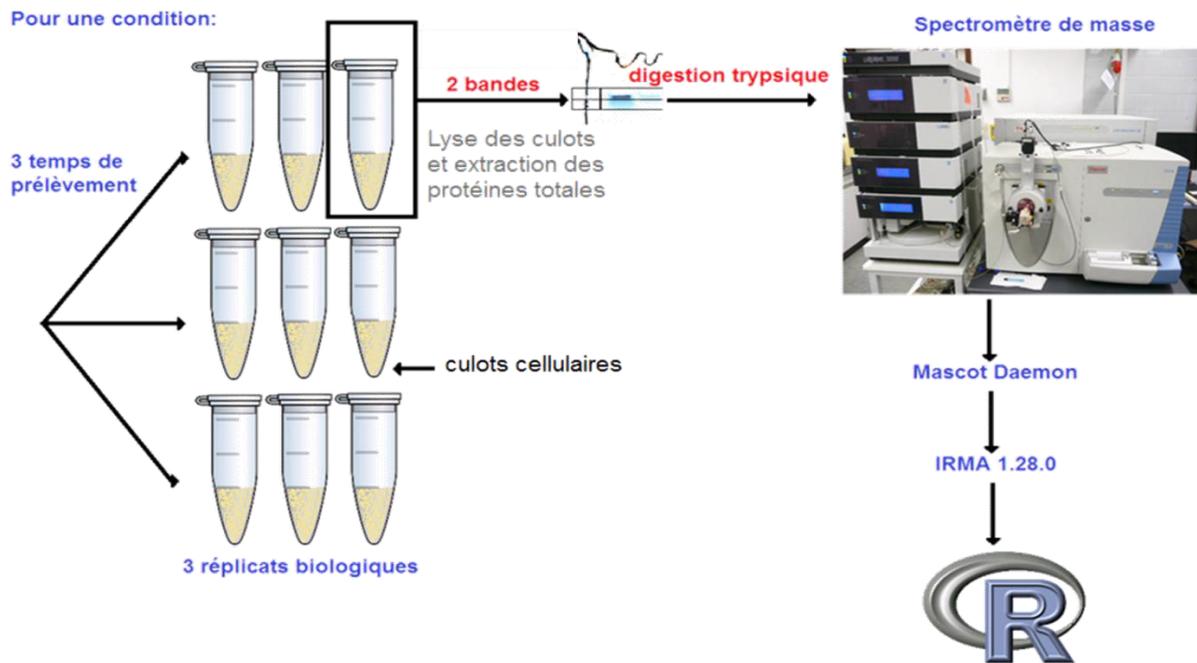


Figure 32: Stratégie expérimentale *shotgun* mise en place lors de nos analyses du protéome cellulaire

[Article 2: Deciphering the interactions between the *Bacillus cereus* linear plasmid, pBClin15, and its host by high-throughput comparative proteomics](#)

Principaux résultats

La souche dépourvue du plasmide pBClin15, nommée Δ pBClin15 a été construite à partir de la souche ATCC 14579 de *B. cereus* selon la méthode employée par Voros et ses collaborateurs (Voros, *et al.*, 2013). L'absence du plasmide chez le mutant a été confirmée par PCR et ultérieurement par les résultats obtenus en spectrométrie de masse (absence de protéines plasmidiques dans l'exoprotéome). Les cultures cellulaires des deux souches ont été réalisées en fermenteur dans du milieu MOD contenant 30 mM de glucose à une température de 37°C et un pH de 7,2. La croissance a été suivie en mesurant la DO toutes les 30 minutes à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. La comparaison des courbes de croissance des deux souches a révélé que la phase de latence est plus longue chez Δ pBClin15 que chez la souche sauvage ($1,9 \pm 0,2$ vs. $0,6 \pm 0,6$). En phase exponentielle de croissance, le taux de croissance des deux souches est identique : $1,7 \pm 0,3$ h⁻¹. En revanche, la DO finale atteinte est plus élevée chez le mutant que chez la souche sauvage ($3,8 \pm 0,4$ vs $2,9 \pm 0,0$) tout comme la biomasse ($1,46 \pm 0,07$ g.l⁻¹ vs $1,13 \pm 0,01$ g.l⁻¹). Ces résultats semblent suggérer que le plasmide limite la multiplication cellulaire de son hôte.

Pour déterminer l'impact du plasmide sur le protéome intracellulaire et l'exoprotéome, des analyses en spectrométrie de masse ont été réalisées. Ces analyses ont permis d'identifier et de valider la présence de 933 protéines cellulaires et 377 protéines dans l'exoprotéome.

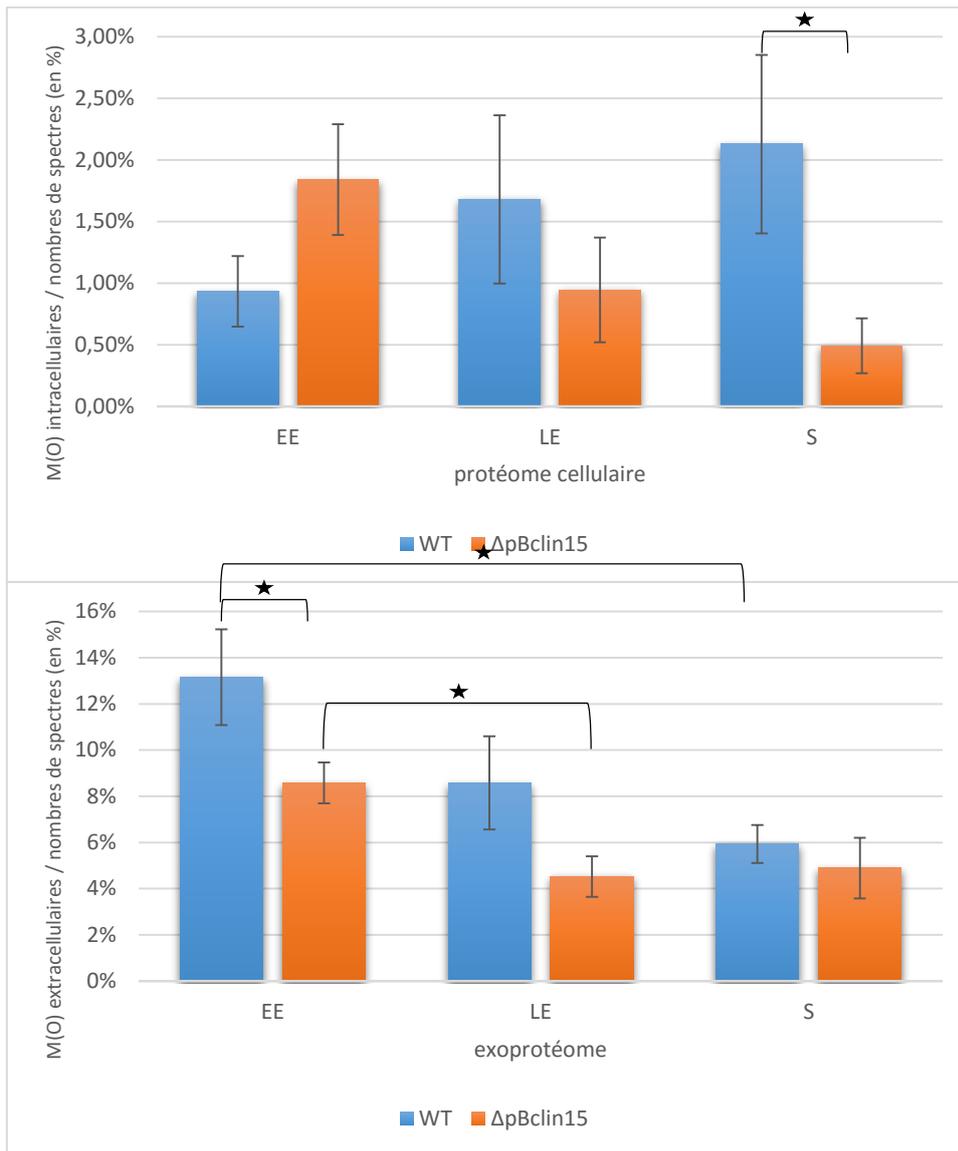
L'analyse détaillée du protéome cellulaire des deux souches a révélé une restructuration des groupes fonctionnels de protéines au cours de la croissance. Cette restructuration se caractérise par une forte interconnexion des voies métaboliques chez le mutant. Le plasmide pBClin15 module donc les processus biologiques de son hôte à l'échelle du protéome.

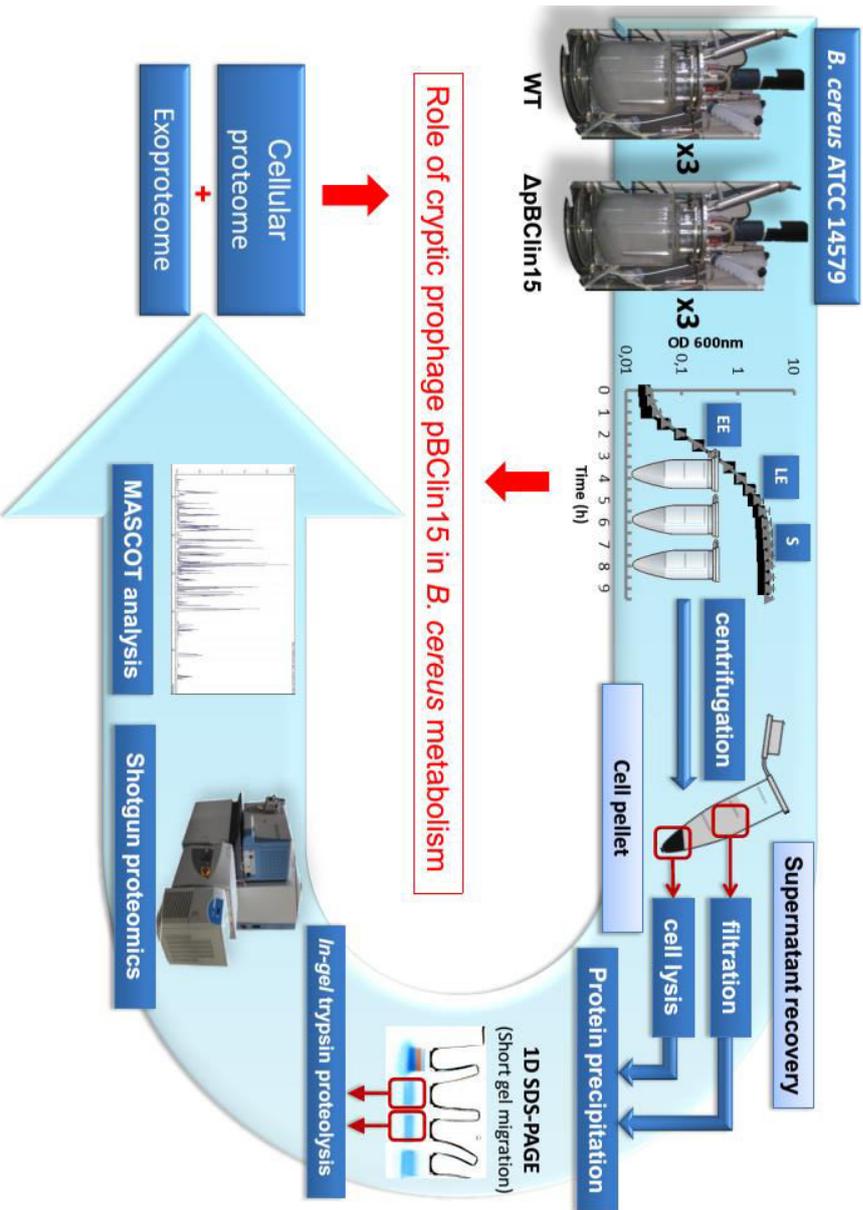
Le dosage des protéines extracellulaires a révélé qu'en l'absence du plasmide pBClin15, *B. cereus* produit plus de protéines extracellulaires tout au long de la croissance. L'analyse de la composition de l'exoprotéome a permis d'identifier les protéines dont l'abondance est augmentée par le plasmide. Ces protéines sont majoritairement des protéines phagiques.

Résultats complémentaires

Dynamique des résidus méthionines oxydées de l'exoprotéome et protéome cellulaire

L'abondance des résidus méthionines oxydées dans l'exoprotéome et le protéome cellulaire a été estimée en rapportant le nombre de Met(O) au nombre total de spectres pour chaque réplicat biologique et chaque phase de croissance pour les deux souches (**Figure 33**). Le pourcentage de Met(O) dans le protéome cellulaire augmente au cours de la croissance pour la souche ATCC 14579 alors que ce taux diminue pour la souche Δ pBClin15. Au niveau extracellulaire, le taux de Met(O) diminue au cours de la croissance pour la souche ATCC 14579. Pour la souche Δ pBClin15, le pourcentage de Met(O) diminue entre la phase exponentielle de croissance et la phase de ralentissement. En phase exponentielle de croissance, il y a une différence significative de l'oxydation des résidus méthionines de l'exoprotéome. Le pourcentage d'oxydation des résidus méthionine est plus élevé chez la souche ATCC 14579.





Deciphering the interactions between the *Bacillus cereus* linear plasmid, pBClin15, and its host by high-throughput comparative proteomics

Jean-Paul Madeira^{1,2,3}, Hélène Omer^{1,2,3}, Béatrice Alpha-Bazin³, Jean Armengaud³, Catherine Duport^{1,2*}

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

² INRA, UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84914 Avignon, France.

³ CEA, DSV, IBiTec-S, SPI, Li2D, Laboratory "Innovative technologies for Detection and Diagnostics", Bagnols-sur-Cèze, F-30200, France.

*Correspondence :

Pr Catherine Duport; UMR SQPOV -INRA PACA; 228, route de l'A  rodrome; CS 40509; Domaine Saint Paul-Site Agroparc; 84914 Avignon Cedex 9. E-mail: catherine.duport@univ-avignon.fr

Running title: pBClin15 & *B. cereus* interactions

Key words: proteome, *Bacillus cereus*, plasmid, prophage, shotgun proteomics.

1 **ABSTRACT**

2 The pathogen, *Bacillus cereus*, is able to adapt its metabolism to various environmental
3 conditions. The reference strain, *B. cereus* ATCC 14579, harbors a linear plasmid, pBClin15,
4 which displays a cryptic prophage behavior. Here, we studied the impact of pBClin15 on the
5 aerobic respiratory metabolism of *B. cereus* by curing its host strain. We compared, by means
6 of a high-throughput shotgun proteomic approach, both the cellular proteome and the
7 exoproteome of *B. cereus* ATCC 14579 in the presence and absence of pBClin15 at the early,
8 late and stationary growth phases. The results were visualized through a hierarchical cluster
9 analysis of proteomic data. We found that pBClin15 contributes significantly to the metabolic
10 efficiency of *B. cereus* by restricting the production of chromosome-encoded phage proteins
11 in the extracellular milieu. The data also revealed intricate regulatory mechanisms between
12 pBClin15 and its host. Finally, we show that pBClin15 provides benefit to its host to adapt to
13 different ecologic niches.

14

15 **INTRODUCTION**

16 Members of the *Bacillus cereus sensu lato* group are found in diverse environments and
17 include eight closely related species – *B. cereus sensu stricto*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus*
18 *thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*,
19 *Bacillus cytotoxicus*, and *Bacillus toyonensis* [1, 2]. The plasmids in this group display a
20 strain-dependent distribution, with some strains containing no plasmid, whereas others have
21 many. Some of these plasmids have a small genome size, only 2 kb, whereas others are very
22 large, up to 600 kb [3]. Large plasmids are key components in defining the phenotypic traits
23 associated with pathogenesis [4]. For example, emetic syndrome, which is associated with *B.*
24 *cereus sensu stricto*, is caused by cereulide. The cereulide synthetase gene cluster, which
25 encodes the enzymatic machinery required for the biosynthesis of cereulide, is located on a

26 208 kb megaplasmid [5]. As a mammalian pathogen, the ability of *B. anthracis* to cause
27 anthrax originates from two large plasmids: pXO1 (181.6 kb) that encodes the tripartite lethal
28 toxin complex and pXO2 (93.5 kb), which contains the biosynthetic genes for the poly- γ -d-
29 glutamic acid capsule [6]. *B. thuringiensis* forms crystal-like parasporal inclusions during
30 sporulation [7-9]. These inclusions contain δ -endotoxins with insecticidal properties. Most of
31 the genes (*cry*) encoding these toxins are located on large plasmids [10]. Whereas the role of
32 large plasmids in pathogenesis is well defined, the function of the other plasmids in the group
33 is relatively unknown.

34 The *B. cereus* type, strain ATCC 14579, harbors a 15,274 bp linear plasmid, pBClin15, which
35 displays cryptic prophage behavior [11-13]. The genetic structure of pBClin15 is reminiscent
36 of temperate phages belonging to the *Tectiviridae* family. This family includes the
37 bacteriophages, Bam35, GIL01 and GIL16 from *B. thuriengensis* and AP50 from *B. anthracis*
38 [13-18]. The pBClin15 genome contains 28 open reading frames (ORFs) [17]. Some of these
39 ORFs encode proteins involved in phage genome replication and regulation, virion structure
40 and DNA packaging [17, 19], but the function of many is so far undocumented. One of these
41 ORFs, namely ORF2, encodes a protein (Bcp0002) that displays binding properties towards
42 DNA fragments of both chromosomal and plasmid origin. The effect of Bcp0002 binding is
43 currently unknown [20].

44 With the emergence of “global systems biology” tools (mainly DNA microarrays),
45 cryptic prophages have gradually gained attention, as part of host physiology, especially
46 under stress conditions [21]. Our goal here was to understand the importance of the effect of
47 pBClin15 on *B. cereus* physiology under normal growth conditions. For this, bacteria were
48 grown in pH-regulated batch cultures under fully oxic conditions. We designed a high-
49 throughput shotgun proteomic approach to decipher the interaction of pBClin15 with its host.
50 Hierarchical clustering analysis of the proteomic data identified the altered biological

51 processes, according to the metabolic data, and the empirical Bayes approach identified the
52 main regulators responsible for the changes in the phenotypes. Strikingly, we determined that
53 pBClin15 has a beneficial impact on *B. cereus* physiology. This probably helps these bacteria
54 to cope with adverse environments.

55

56 **MATERIALS AND METHODS**

57 **Bacterial strains and growth conditions.**

58 *The B. cereus* strain used in this study was the reference strain, ATCC 14579 [12]. This strain
59 was cured of pBClin15 as described by Voros et al [21], resulting in the Δ pBClin15 strain. *B.*
60 *cereus* strains (with and without pBClin15) were cultured in batches (three independent
61 cultivations per strain) at $pO_2 = 100\%$ [22] in minimal MOD medium supplemented with 30
62 mM glucose as the carbon source [23]. Each batch culture was inoculated with an overnight
63 subculture at an initial optical density at 600 nm (OD_{600nm}) of 0.02. Aerobic batch cultures
64 were performed at 37°C in a 3-liter bioreactor (BioFlo®/CelliGen®115, New Brunswick),
65 with a working volume of 2 liters. The pH was maintained at a controlled value of 7.2 by
66 automatic addition of 5 M KOH. *B. cereus* growth was monitored spectrophotometrically at
67 600 nm.

68

69 **Cellular and exoproteome extraction and metabolite assays.**

70 The cells were harvested by centrifugation at the early exponential (EE), late exponential (LE)
71 and stationary (S) growth phases for each of the bioreactor cultures and stored frozen at -80°C
72 until analysis. Soluble cellular proteins were extracted as previously described [24]. The
73 extracellular proteins were obtained by trichloroacetic acid precipitation as described in [22].
74 The protein concentration was determined by the Bradford protein assay after TCA

75 precipitation. Enzymatic test kits from Roche (Meylan, France) were used to measure glucose,
76 lactate, ethanol, formate, acetate, and succinate concentrations in the supernatants.

77

78 **Proteolysis and shotgun tandem mass spectrometry.**

79 Protein samples were loaded onto NuPAGE 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen) for a short
80 (about 3 mm) electrophoretic migration in denaturing conditions. For each protein sample, the
81 whole content was extracted as a single polyacrylamide band. The bands were subjected to
82 proteolysis with sequencing grade trypsin (Roche) using 0.01% ProteaseMAX surfactant
83 (Promega) as previously described [25, 26]. The resulting peptides were analyzed by nanoLC-
84 MS/MS using an LTQ-Orbitrap XL hybrid mass spectrometer (ThermoFisher) coupled to an
85 Ultimate 3000 nRSLC system (Dionex, ThermoFisher). The experimental set-up and
86 conditions were as described [22, 27]. Briefly, peptide digests were desalted on-line on a
87 reverse-phase precolumn (Acclaim PepMap 100 C18, 5 μm bead size, 100- \AA pore size, 300
88 μm i.d. x 5 mm, Dionex ThermoFisher). The peptides from the extracellular digests were then
89 resolved on a nanoscale C18 PepMap100TM capillary column (3 μm bead size, 100- \AA pore
90 size, 75 μm i.d., 15 cm length, LC Packings, ThermoFisher) using a 90-min gradient. The
91 peptides from cellular digests were resolved with the same column but 50 cm long using a
92 180-min gradient. In both cases, the gradient was from 4 to 40% solvent B (0.01% HCOOH,
93 100% CH₃CN) with solvent A being 0.01% HCOOH, 100% H₂O. Full-scan mass spectra
94 were measured from m/z 300 to 1,800 in data-dependent mode using the TOP3 strategy.

95

96 **MS/MS spectra assignments to peptide sequences and protein validation.**

97 An in-house polypeptide sequence database was made of the sequences of all previously
98 annotated proteins encoded by the *B. cereus* ATCC 14579 chromosome (NC_004722) and the
99 plasmid pBclin15 (NC_004721), and 44 proteins identified by a previous proteogenomic

100 study (Supplementary Table S1 [22] and unpublished data). This database, used to assign
101 peptide sequences to MS/MS spectra, comprises 5,299 polypeptide sequences totaling
102 1,464,675 amino acids. The MASCOT Daemon search engine (version 2.3.02; Matrix
103 Science) was used for searching tryptic peptides with the following parameters: full-trypsin
104 specificity, a mass tolerance of 5 ppm on the parent ion and 0.5 Da on the MS/MS,
105 carboxyamidomethylated Cys (+57.0215) as a fixed modification and oxidized methionine
106 (+15.9949) as a variable modification. The number of tolerated missed cleavages was set at 2.
107 All peptide matches with a score below a *p*-value of 0.05 were filtered by the IRMa 1.28.0
108 parser [28]. A protein was considered validated when at least two different peptides were
109 detected when considering all the samples. The false-positive rate for protein identification
110 was estimated using the appropriate decoy database as below 0.1% with these parameters. The
111 mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium
112 (<http://proteomecentral.proteomeexchange.org>) via the PRIDE partner repository
113 (<http://www.ebi.ac.uk/pride>) with the dataset identifiers, PXD001568, PXD002788 and
114 PXD002789.

115

116 **Spectral count-based protein quantification and statistical analysis.**

117 The number of MS/MS spectra per protein (spectral counts) was extracted in the 3 different
118 nanoLC-MS/MS biological replicates for each growth phase. The normalized spectral
119 abundance factor (NSAF) for each protein was calculated by dividing the number of spectral
120 count (SC) by the polypeptide theoretical mass (expressed in kDa). Hierarchical clustering
121 analysis (HCA) was carried out with biological replicates of each growth phase as individuals
122 and the NSAF values assigned to functional groups as quantitative variables. The data
123 analyses were performed with Pvcust, a package written in R ([https://cran.r-](https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.2.0/)
124 [project.org/bin/windows/base/old/3.2.0/](https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/3.2.0/)) for assessing the uncertainty in HCA [29]. Pvcust

125 provides a dendrogram that assembles all elements into a single tree with two types of p -
126 values: Approximately Unbiased (AU) p -value, which is computed by multiscale bootstrap
127 resampling, is a better approximation to unbiased p -value than Bootstrap Probability (BP)
128 value computed by normal bootstrap resampling. One can consider that clusters (edges) with
129 high AU values (e.g. 95%) are strongly supported by data. A colored representation of the
130 primary data table was carried out with the R package MADE4 [30] and appended to the
131 dendrogram to indicate the nature of the computed relationship among functional groups in
132 the table [31]. Analyses of abundance level change of proteins were performed with the
133 LIMMA package by the LIMMA Voom method [32], a package written in R dedicated to
134 linear models for microarrays. The Voom transformation was applied to the spectral counts of
135 each protein. After this transformation, the protein abundances from label-free quantitative
136 proteomics can be analyzed as if they were microarray data, and linear modeling may apply.
137 To determine the differential abundance factors of proteins, the trimmed mean of M-values
138 (TMM) normalization method was applied. After Voom transformation and TMM
139 normalization, quantitative proteomics data were analyzed by empirical Bayes moderation of
140 the standard errors towards a common value. Results include (\log_2) fold changes, the average
141 \log_2 -abundance level for each protein across all samples, t -statistics, p -values, p -value
142 adjusted for multiple testing, and B -statistics.

143

144 **Hydrogen peroxide killing assay.**

145 *B. cereus* strains (with and without pBClin15) were grown to mid-log phase
146 ($OD_{600} \sim 0.3$) in MOD medium supplemented with 30 mM glucose. The cells were then
147 centrifuged and resuspended in an equal volume of phosphate-buffered saline solution
148 (PBS). Hydrogen peroxide responses were assessed by exposing samples 20 min to 0.5
149 mM and 1 mM H_2O_2 , respectively. Aliquots (100 μ L) of the samples were diluted in

150 H₂O, appropriate dilutions of the culture were plated onto LB agar, and after overnight
151 incubation at 37°C the colony forming units (CFUs) were counted. All the experiments
152 were performed at least in triplicate, and at least 2 technical replicates from each
153 dilution step were carried out to determine the number of CFUs.

154

155 **RESULTS AND DISCUSSION**

156

157 **Growth characteristics of the *B. cereus* ATCC 14579 and Δ pBClin15 (pBClin15-cured) 158 strains.**

159 A pBClin15-cured *B. cereus* ATCC 14579 strain, named Δ pBClin15, was constructed as
160 described by Voros *et al.* [21]. The removal of pBClin15 was confirmed by PCR. The
161 Δ pBClin15 and wild-type strains were grown in pH-regulated batch cultures (pH 7.2) on
162 MOD medium supplemented with 30 mM glucose as the carbon source, under full aerobiosis
163 (pO₂ = 100%). Supplementary Figure 1 reports the growth curves of both strains. Despite an
164 extended lag time (1.9 ± 0.2 vs 0.6 ± 0.6), Δ pBClin15 cells started exponential growth at a
165 rate comparable to that of the wild-type ($\mu_{\max} = 1.7 \pm 0.3$ h⁻¹). However, they reached the
166 stationary growth phase at a higher final density ($OD_{600nm} = 3.8 \pm 0.4$) than the wild-type cells
167 ($OD_{600nm} = 2.9 \pm 0.0$). These observations suggest that Δ pBClin15 had a growth advantage
168 over the wild-type strain; in other words pBClin15 placed some burden on its host. During
169 aerobic respiratory growth, acetate is the major by-product of glucose catabolism in *B. cereus*
170 [23]. Figure 1A and 1B show the kinetics of glucose consumption and acetate excretion,
171 respectively, during growth. Δ pBClin15 consumed higher glucose quantities than its parental
172 strain during the exponential growth phase (Fig. 1A) and excreted less acetate (Fig. 1B). At
173 the end of growth, Δ pBClin15 and WT cells consumed a similar amount of glucose (Fig. 1A).
174 These results indicate that glucose supported a higher glycolytic flux (glucose uptake), lower

175 acetate overflow and higher final growth yield (in term of final biomass per mole of glucose)
176 in Δ pBClin15 than in the wild-type strain [33-35]. pBClin15 thus impacts glucose catabolism
177 in *B. cereus*.

178 Perturbation of glucose catabolism modifies endogenous ROS production in aerobically
179 grown bacteria. Increased endogenous ROS production can translate into increased killing by
180 oxidants [36]. To evaluate the impact of pBClin15 on *B. cereus* tolerance to oxidant, *B. cereus*
181 cells were exposed to hydrogen peroxide. Figure 2 shows that Δ pBClin15 cells were more
182 susceptible to H₂O₂ killing. Cells devoid of pBClin15 could thus experience more endogenous
183 oxidative stress than wild-type cells.

184

185 **Comparative proteomics strategy & global features.**

186 To explore the molecular impact of pBClin15 on its host, we analyzed the soluble total
187 proteome as well as the proteins found in the extracellular environment of the cells, the so-
188 called exoproteome [37]. Shotgun comparative proteomics was carried out by means of a
189 label-free strategy on cells harvested by centrifugation on the first hand and on proteins
190 present in the supernatants on the other. Figure 3 shows the comparative proteomics strategy.
191 Three biological replicated cultures were performed for wild-type and Δ pBClin15 cells grown
192 in pH- and pO₂-controlled batch cultures. As indicated in Figure 3, three samples were taken
193 at the time points corresponding to the early exponential growth phase (EE), late exponential
194 growth phase (LE), and stationary phase (S). From the 18 resulting samples, all of the cellular
195 soluble proteins and exoproteins obtained after trichloroacetic acid precipitation were
196 processed separately by means of a standard gel-based procedure for trypsin proteolysis [38].
197 The 36 resulting peptide fractions corresponding to these proteomes were analyzed by high-
198 throughput tandem mass spectrometry [25]. For the cellular proteomes, a total of 242,671
199 MS/MS spectra were detected. Among these, 129,791 were assigned to a peptide sequence

200 (Supplementary Table S2), resulting in the identification of 8,452 unique peptide sequences
201 and the quantitative monitoring of 933 proteins certified with at least two different peptides
202 (Supplementary Table S3). Regarding exoproteins, a total of 49,666 MS/MS spectra were
203 assigned (Supplementary Table S4) from the 97,175 spectra recorded. In this case, a total of
204 377 proteins were validated with at least two different peptides and their quantities were
205 monitored (Supplementary Table S5). Supplemental Table S3 and S5 present the list of these
206 proteins categorized into 20 and 9 functional large groups, respectively [39]. The
207 exoproteome comprises 92 proteins that were not detected and validated in the cellular
208 proteome. When considering both datasets, a total of 1,025 proteins were validated and
209 monitored for assessing the pBClin15-dependent changes in protein abundance. These
210 changes based on spectral counting were tested statistically by empirical Bayes moderation of
211 the analyzed standard errors towards a common value with the LIMMA R package [40]. They
212 are presented in Supplementary Tables S6 and S7 as \log_2 of the ratio of protein abundance in
213 Δ pBClin15 relative to that measured for the wild-type cells.

214

215 **Detailed analysis of the whole cell proteome.**

216 We first examined the group behavior of cellular proteins during growth. Cellular proteins
217 were categorized into 20 functional groups that define the principal biological processes
218 encoded by the *B. cereus* ATCC 14579 genome [12, 39]. HCA was carried out to cluster
219 functional groups with similar time-course dynamics in wild-type and Δ pBClin15. The results
220 of HCA are displayed as dendrograms, together with the ordered heat maps that reflect the
221 original experimental observations (Fig. 4). Figure 4 shows a strong difference in the
222 clustering of functional groups in WT (Fig. 4A) and Δ pBClin15 (Fig. 4B). This indicates that
223 pBClin15 modulates the dynamics of biological processes at the proteome level. Specifically,
224 the dendrograms show a higher partitioning of functional groups in WT compared to

225 Δ pBClin15, suggesting that pBClin15 may increase the propensity of the primary metabolism
226 network to organize into nearly-independent regulation units [41]. This probably allows
227 bacteria to use nutrients more efficiently and conserve energy to adapt to starvation conditions
228 such as those encountered at the end of growth. Adaptation to starvation conditions involves a
229 wide array of regulatory responses, requires high-level synthesis of proteins related to
230 detoxification and repair systems (e.g., stress, biosynthesis of cofactors), is accompanied by a
231 higher rate of synthesis of extracellular proteins and precedes sporulation. All of these
232 biological processes are closely associated in Δ pBClin15 (edge 13 in Fig. 4B).

233 We then focused on central metabolism, which provides energy, cofactor regeneration and
234 building blocks (nucleic acids and amino acids) for biomass synthesis and controls the extent
235 and nature of extracellular protein expression. We subdivided the central metabolism
236 functional group into 9 subgroups and conducted a second HCA analysis. Figure 5 shows a
237 breakdown of the central metabolism groups into 7 edges, which are differentially partitioned
238 and formed in the two strains. This indicates a significant impact of pBClin15 on different
239 pathways of central metabolism during growth. Specifically, HCA clustered
240 glycolysis/gluconeogenesis group proteins with TCA group proteins (edge 4) with an AU *p*-
241 value of 97% in Δ pBClin15 (Fig. 5B). This indicates that the time-course dynamics of
242 glycolytic/gluconeogenesis and TCA group proteins were similar in Δ pBClin15. Interestingly,
243 we noted that Δ pBClin15 sustained a lower level of glycolytic/gluconeogenesis proteins and
244 higher level of TCA proteins than WT at EE growth phase (Supplementary Table S3). As a
245 result, the ratio of glycolysis/gluconeogenesis vs TCA proteins was markedly higher in WT
246 cells compared with Δ pBClin15 cells in the EE growth phase (~2.5-fold, Fig. 6A). Taken
247 together, these data suggest that by disconnecting the regulation of glycolytic and TCA
248 enzymes, pBClin15 does allow efficient coupling between glycolysis and TCA. This probably
249 leads to higher acetate accumulation in wild-type cells, as illustrated in Fig. 6B [42, 43].

250 Production of acetate wastes carbon that might otherwise be directed toward protein synthesis
251 through TCA intermediates. Proteins are either used for biomass synthesis or exported. To
252 determine whether Δ pBClin15 produced higher levels of extracellular proteins, we measured
253 the concentration of proteins in cell supernatants. Figure 7 shows that Δ pBClin15 produced
254 higher levels of exoproteins than wild-type cells during growth. Biosynthesis and export of
255 proteins require energy (ATP), which is not available for cellular oxidative damage repair
256 systems. This could lead to a significant increase in macromolecule damage. Accordingly, we
257 found that Δ pBClin15 exhibited (i) a significant increase in lag phase, which represents the
258 rejuvenation of bacterial life that accompanies the repair of oxidative damage [44], and (ii) a
259 decreased tolerance to exogenous oxidant [36, 45]. Finally, by increasing the modularity of
260 central metabolic pathways, pBClin15 may increase the ATP-dependent ability of the cell to
261 repair the damage caused by endogenous oxidative stress during aerobic growth and increase
262 the cell's ability to cope with additional oxidative stress.

263 Next, we examined the abundance-level changes of individual proteins in Δ pBClin15 vs WT
264 in each growth phase (Table S6) to identify the main contributors to metabolic changes. The
265 *B*-statistical analysis uncovered a total of 58, 90 and 12 differentially expressed proteins in the
266 EE, LE, and S growth phases, respectively (*B*-value>0). Table 1 shows the top 12 proteins
267 showing significant abundance level changes in the EE, LE and S growth phases, as ranked by
268 the *B*-statistics [40]. The top protein in the three growth phases is the abundant pBClin15-
269 encoded protein, Bcp0002, which is absent in Δ pBClin15, as expected. In the EE growth
270 phase, the β and β' subunits of RNA polymerase (RpoC and RpoB) stand out clearly from the
271 other chromosome-encoded proteins in terms of \log_2 (fold-change) and *B*-value ($\log_2 > 5$ and
272 *B*>16, Table 1). An increase in their abundance level in Δ pBClin15 compared to WT probably
273 increased RNA polymerase availability. This may contribute to the deregulation of growth at
274 the expense of maintenance and damage protection [46, 47]. In the LE and S growth phases,

275 the *B*-statistics did not clearly separate the top proteins from the others (Table 1). However,
276 LE sustained higher abundance-level change than the S growth phase, both in terms of
277 number of proteins and fold-changes. Interestingly, we noted that the complete list of
278 differentially expressed proteins in LE (Table S6) includes the LexA repressor, which was
279 downregulated ($\log_2 = -3.9$, $B=3.73$) in $\Delta pBClin15$, the catabolite control protein A (CcpA),
280 which was upregulated ($\log_2 = 3.4$, $B= 2.72$) and the transcriptional regulator, TenA ($\log_2 = -$
281 3.9 , $B= 0.79$). LexA represses the SOS response to DNA damage and regulates the lytic
282 switch in the *Bacillus thuriensis* temperate phage, GIL01 [19]. CcpA plays a major role in
283 the coordinated regulation of catabolism and anabolism to ensure optimum cell propagation
284 [48]. It also plays a key role in toxin gene expression and virulence [49]. TenA regulates the
285 production of extracellular proteases in *Bacillus subtilis* [50]. Therefore, regulatory changes
286 induced by pBClin15 may occur mainly at the transcriptional level through RNA polymerase
287 availability during growth and several regulatory circuits at the end of growth.

288

289 **Detailed analysis of the exoproteome.**

290 We showed that pBClin15 restricted the production of extracellular proteins, in terms of
291 quantities. To determine whether pBClin15 also modulated the composition of the *B. cereus*
292 exoproteome, we first compared the group behavior of exoproteins in $\Delta pBClin15$ and its
293 parental strain during growth. Figure 8 (Panels A and B) shows that pBClin15 influences the
294 hierarchical organization of functional groups during growth. Interestingly, the dendrograms
295 revealed that (i) the dynamics of metabolism group proteins is very similar to the dynamics of
296 phage group proteins in $\Delta pBClin15$ (edge 2, AU *p*-value =100 %, Fig. 8B), while it was very
297 similar to the dynamics of the folding, stress response and detoxification group proteins in
298 WT (edge 1, AU *p*-value =100 %, Fig. 8A); this suggests a disorganization of the intracellular
299 metabolism in pBClin15 [22], (ii) the degradative enzyme & adhesins group is in the

300 immediate vicinity of the motility and enterotoxin/virulence-associated protein groups in
301 Δ pBclin15 (Fig. 8A), while it was far from these groups in WT (Fig. 8B); this suggests a
302 more efficient coordination of virulence factor secretion in Δ pBclin15. Comparison of
303 heatmaps reveals a coordinate enrichment of metabolism and phage proteins in the EE growth
304 phase compared with the LE and S growth phases in Δ pBclin15. Table 2 shows that the
305 enrichment in phage proteins in EE was mainly due to the overexpression of 4 phage proteins
306 of unknown function: BC1894, BC1893, BC1862, and BC1901. Table 2 also shows that in
307 the EE growth phase, the pBclin15-encoded protein, Bcp0002, was at the top of the list as
308 ranked by the *B*-statistics and was downregulated in the Δ pBclin15 exoproteome as in the
309 cellular proteome. In the LE growth phase, the top protein in terms of fold-change and *B*-
310 value was the cold-shock protein, CspB. Interestingly, CspB shows some sequence
311 similarities with Bcp0002 [20]. The S growth phase supports the largest list of differentially
312 expressed proteins with, at the top of the list, the pBclin15-encoded protein, Bcp0010, which
313 is downregulated as expected. Taken together these data suggest that pBclin15 influences the
314 dynamics of the *B. cereus* exoproteome by restricting the production of chromosome-encoded
315 phage proteins through cellular regulatory circuits.

316

317 **Conclusion**

318 To our knowledge, this paper reports the first proteomic approach to deciphering the
319 interaction between a cryptic prophage and its host under normal growth conditions. Our
320 results demonstrate the beneficial impact of pBclin15 on *B. cereus* metabolism during
321 respiratory aerobic growth. Intricate regulatory networks, including positive or negative
322 regulation by transcriptional regulators and RNA polymerase regulation, may explain the
323 dynamic nature of the pBclin15 interaction with its host. The pBclin15-encoded DNA-

324 binding protein, Bcp0002, which was expressed constitutively during growth, may play an
325 important role in this regulatory network, which needs to be investigated.

326 The beneficial impact of pBClin15 on *B. cereus* metabolism includes protection from
327 oxidative damage. This helps the bacteria to cope with adverse environments [21]. This may
328 also increase genetic stability by limiting high-frequency mutations, based on the
329 accumulation of DNA damage.

330 Evolutionary forces promote bacterial growth in many environmental niches, so survival and
331 growth under difficult conditions is crucial. It is then not surprising that bacteria adapt to their
332 environment via the acquisition of novel genes via phages. Our results show that the release
333 of chromosome-encoded phage proteins into the extracellular milieu causes a selective
334 disadvantage to *B. cereus*, and the introduction of pBClin15 confers beneficial phenotypes
335 that allow the exploitation of a competitive environment. We thus conclude that the capacity
336 of *B. cereus* ATCC14579 to adapt to various environments arises in some cases from the
337 acquisition of pBClin15. Finally, these data support the idea that pBClin15 may have a much
338 greater role in *B. cereus* ecology than has hitherto been suspected.

339 **ACKNOWLEDGEMENTS**

340 We thank Virginie Jouffrey for her help in proteomic data editing.

341 **REFERENCES**

- 342 [1] Guinebretiere MH, Auger S, Galleron N, Contzen M, De Sarrau B, De Buyser ML, et al.
343 *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group
344 occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013;63:31-40.
- 345 [2] Jimenez G, Urdiain M, Cifuentes A, Lopez-Lopez A, Blanch AR, Tamames J, et al.
346 Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and

347 pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. Syst
348 Appl Microbiol. 2013;36:383-91.

349 [3] Zheng J, Guan Z, Cao S, Peng D, Ruan L, Jiang D, et al. Plasmids are vectors for
350 redundant chromosomal genes in the *Bacillus cereus* group. BMC Genomics. 2015;16:6.

351 [4] Rasko DA, Rosovitz MJ, Okstad OA, Fouts DE, Jiang L, Cer RZ, et al. Complete
352 sequence analysis of novel plasmids from emetic and periodontal *Bacillus cereus* isolates
353 reveals a common evolutionary history among the *B. cereus*-group plasmids, including
354 *Bacillus anthracis* pXO1. J Bacteriol. 2007;189:52-64.

355 [5] Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretiere MH, Lindback T, Andersson M, Schulz A, et
356 al. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of
357 closely related strains. Microbiology. 2005;151:183-97.

358 [6] Koehler TM. *Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation. Curr Top
359 Microbiol Immunol. 2002;271:143-64.

360 [7] Aronson A. Sporulation and delta-endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. Cell Mol
361 Life Sci. 2002;59:417-25.

362 [8] Bulla LA, Jr., Bechtel DB, Kramer KJ, Shethna YI, Aronson AI, Fitz-James PC.
363 Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. Crit Rev Microbiol.
364 1980;8:147-204.

365 [9] Whiteley HR, Schnepf HE. The molecular biology of parasporal crystal body formation in
366 *Bacillus thuringiensis*. Annu Rev Microbiol. 1986;40:549-76.

367 [10] Guo S, Liu M, Peng D, Ji S, Wang P, Yu Z, et al. New strategy for isolating novel
368 nematocidal crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain YBT-1518. Appl Environ
369 Microbiol. 2008;74:6997-7001.

370 [11] Carlson CR, Johansen T, Kolsto AB. The chromosome map of *Bacillus thuringiensis*
371 subsp. canadensis HD224 is highly similar to that of the *Bacillus cereus* type strain ATCC
372 14579. FEMS Microbiol Lett. 1996;141:163-7.

373 [12] Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, et al. Genome
374 sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. Nature.
375 2003;423:87-91.

376 [13] Verheust C, Fornelos N, Mahillon J. GIL16, a new gram-positive tectiviral phage related
377 to the *Bacillus thuringiensis* GIL01 and the *Bacillus cereus* pBClin15 elements. J Bacteriol.
378 2005;187:1966-73.

379 [14] Ackermann HW, Smirnov WA. Study of lysogeny in *Bacillus thuringiensis* and *B.*
380 *cereus*. Can J Microbiol. 1978;24:818-26.

381 [15] Bishop-Lilly KA, Plaut RD, Chen PE, Akmal A, Willner KM, Butani A, et al. Whole
382 genome sequencing of phage resistant *Bacillus anthracis* mutants reveals an essential role for
383 cell surface anchoring protein CsaB in phage AP50c adsorption. Virol J. 2012;9:246.

384 [16] Sozhamannan S, McKinstry M, Lentz SM, Jalasvuori M, McAfee F, Smith A, et al.
385 Molecular characterization of a variant of *Bacillus anthracis*-specific phage AP50 with
386 improved bacteriolytic activity. Appl Environ Microbiol. 2008;74:6792-6.

387 [17] Stromsten NJ, Benson SD, Burnett RM, Bamford DH, Bamford JK. The *Bacillus*
388 *thuringiensis* linear double-stranded DNA phage Bam35, which is highly similar to the
389 *Bacillus cereus* linear plasmid pBClin15, has a prophage state. J Bacteriol. 2003;185:6985-9.

390 [18] Verheust C, Jensen G, Mahillon J. pGIL01, a linear tectiviral plasmid prophage
391 originating from *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis. Microbiology. 2003;149:2083-92.

392 [19] Fornelos N, Bamford JK, Mahillon J. Phage-borne factors and host LexA regulate the
393 lytic switch in phage GIL01. J Bacteriol. 2011;193:6008-19.

394 [20] Stabell FB, Egge-Jacobsen W, Risoen PA, Kolsto AB, Okstad OA. ORF 2 from the
395 *Bacillus cereus* linear plasmid pBClin15 encodes a DNA binding protein. Lett Appl
396 Microbiol. 2009;48:51-7.

397 [21] Voros A, Simm R, Kroeger JK, Kolsto AB. Gene transcription from the linear plasmid
398 pBClin15 leads to cell lysis and extracellular DNA-dependent aggregation of *Bacillus cereus*
399 ATCC 14579 in response to quinolone-induced stress. Microbiology. 2013;159:2283-93.

400 [22] Madeira JP, Alpha-Bazin B, Armengaud J, Duport C. Time dynamics of the *Bacillus*
401 *cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation. Front Microbiol. 2015;6:342.

402 [23] Rosenfeld E, Duport C, Zigha A, Schmitt P. Characterization of aerobic and anaerobic
403 vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. Can J
404 Microbiol. 2005;51:149-58.

405 [24] Clair G, Armengaud J, Duport C. Restricting Fermentative Potential by Proteome
406 Remodeling: An adaptative strategy evidenced In *Bacillus cereus*. Mol Cell Proteomics.
407 2012;11:M111 013102.

408 [25] Clair G, Roussi S, Armengaud J, Duport C. Expanding the known repertoire of virulence
409 factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox
410 conditions. Mol Cell Proteomics. 2010;9:1486-98.

411 [26] de Groot A, Dulermo R, Ortet P, Blanchard L, Guerin P, Fernandez B, et al. Alliance of
412 proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus*
413 *deserti*. PLoS Genet. 2009;5:e1000434.

414 [27] Dedieu A, Gaillard JC, Pourcher T, Darrouzet E, Armengaud J. Revisiting iodination
415 sites in thyroglobulin with an organ-oriented shotgun strategy. J Biol Chem. 2011;286:259-
416 69.

417 [28] Dupierris V, Masselon C, Court M, Kieffer-Jaquinod S, Bruley C. A toolbox for
418 validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa.
419 Bioinformatics. 2009;25:1980-1.

420 [29] Suzuki R, Shimodaira H. Pvclust: an R package for assessing the uncertainty in
421 hierarchical clustering. Bioinformatics. 2006;22:1540-2.

422 [30] Culhane AC, Thioulouse J, Perriere G, Higgins DG. MADE4: an R package for
423 multivariate analysis of gene expression data. Bioinformatics. 2005;21:2789-90.

424 [31] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-
425 wide expression patterns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United
426 States of America. 1998;95:14863-8.

427 [32] Smyth GK, Michaud J, Scott HS. Use of within-array replicate spots for assessing
428 differential expression in microarray experiments. Bioinformatics. 2005;21:2067-75.

429 [33] Castano-Cerezo S, Pastor JM, Renilla S, Bernal V, Iborra JL, Canovas M. An insight into
430 the role of phosphotransacetylase (pta) and the acetate/acetyl-CoA node in *Escherichia coli*.
431 Microb Cell Fact. 2009;8:54.

432 [34] Peebo K, Valgepea K, Nahku R, Riis G, Oun M, Adamberg K, et al. Coordinated
433 activation of PTA-ACS and TCA cycles strongly reduces overflow metabolism of acetate in
434 *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 2014;98:5131-43.

435 [35] Sadykov MR, Thomas VC, Marshall DD, Wenstrom CJ, Moormeier DE, Widhelm TJ, et
436 al. Inactivation of the Pta-AckA pathway causes cell death in *Staphylococcus aureus*. J
437 Bacteriol. 2013;195:3035-44.

438 [36] Brynildsen MP, Winkler JA, Spina CS, MacDonald IC, Collins JJ. Potentiating
439 antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production. Nat
440 Biotechnol. 2013;31:160-5.

441 [37] Armengaud J, Christie-Oleza JA, Clair G, Malard V, Duport C. Exoproteomics:
442 exploring the world around biological systems. *Expert Rev Proteomics*. 2012;9:561-75.

443 [38] Hartmann EM, Allain F, Gaillard JC, Pible O, Armengaud J. Taking the shortcut for
444 high-throughput shotgun proteomic analysis of bacteria. *Methods Mol Biol*. 2014;1197:275-
445 85.

446 [39] Omer H, Alpha-Bazin B, Brunet JL, Armengaud J, Duport C. Proteomics identifies
447 *Bacillus cereus* EntD as a pivotal protein for the production of numerous virulence factors.
448 *Front Microbiol*. 2015;6:1004.

449 [40] Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential
450 expression in microarray experiments. *Statistical applications in genetics and molecular*
451 *biology*. 2004;3:Article3.

452 [41] Ravasz E, Somera AL, Mongru DA, Oltvai ZN, Barabasi AL. Hierarchical organization
453 of modularity in metabolic networks. *Science*. 2002;297:1551-5.

454 [42] Veit A, Polen T, Wendisch VF. Global gene expression analysis of glucose overflow
455 metabolism in *Escherichia coli* and reduction of aerobic acetate formation. *Appl Microbiol*
456 *Biotechnol*. 2007;74:406-21.

457 [43] Zhuang K, Vemuri GN, Mahadevan R. Economics of membrane occupancy and respiration
458 fermentation. *Mol Syst Biol*. 2011;7:500.

459 [44] Rolfe MD, Rice CJ, Lucchini S, Pin C, Thompson A, Cameron AD, et al. Lag phase is a
460 distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient
461 metal accumulation. *J Bacteriol*. 2012;194:686-701.

462 [45] Adolfsen KJ, Brynildsen MP. Futile cycling increases sensitivity toward oxidative stress
463 in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*. 2015;29:26-35.

464 [46] Gummesson B, Magnusson LU, Lovmar M, Kvint K, Persson O, Ballesteros M, et al.
465 Increased RNA polymerase availability directs resources towards growth at the expense of
466 maintenance. *EMBO J.* 2009;28:2209-19.

467 [47] Nystrom T. Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase
468 availability and sigma factor competition? *Molecular microbiology.* 2004;54:855-62.

469 [48] Fujita Y, Satomura T, Tojo S, Hirooka K. CcpA-mediated catabolite activation of the
470 *Bacillus subtilis* *ilv-leu* operon and its negation by either CodY- or TnrA-mediated negative
471 regulation. *J Bacteriol.* 2014;196:3793-806.

472 [49] Chiang C, Bongiorni C, Perego M. Glucose-dependent activation of *Bacillus anthracis*
473 toxin gene expression and virulence requires the carbon catabolite protein CcpA. *J Bacteriol.*
474 2011;193:52-62.

475 [50] Toms AV, Haas AL, Park JH, Begley TP, Ealick SE. Structural characterization of the
476 regulatory proteins TenA and TenI from *Bacillus subtilis* and identification of TenA as a
477 thiaminase II. *Biochemistry.* 2005;44:2319-29.

478

479

480 **FIGURE LEGENDS**

481 **Figure 1. Growth characteristics of Δ pB_{Clin15} and its parental *B. cereus* ATCC 14579**
482 **strain. Panel A.** Kinetics of glucose consumption in Δ pB_{Clin15} and WT cells. Consumption
483 of glucose was measured from the samples isolated at the EE, LE and S growth phases. **Panel**
484 **B.** Kinetics of acetate production. Acetate yield was measured from the samples isolated at
485 the EE, LE and S growth phases. Error bars represent the standard deviation from 3
486 independent measures. Significant differences (p -value<0.05) are indicated with asterisks.

487

488 **Figure 2. Survival of Δ pBclin15 and its parental *B. cereus* ATCC 14579 strain towards**
489 **external hydrogen peroxide insult.** Cells were grown in liquid culture to the mid-
490 exponential growth phase, and subjected to 0.5 and 1 mM H₂O₂, respectively. Colony forming
491 units per mL were counted and expressed as (N/N0) x 100. Error bars represent the standard
492 deviation from 6 independent measures. Significant differences (*p*-value<0.05) between
493 Δ pBclin15 and wild-type (WT) cells are indicated with asterisks.

494

495 **Figure 3. Schematic description of the comparative analysis of Δ pBclin15 and *B. cereus***
496 **ATCC 14579 proteomic profiles.** Cellular and extracellular samples were harvested at the
497 early exponential (EE), late exponential (LE) and stationary (S) growth phases and separated
498 by centrifugation. Protein samples were separated by one-dimensional (1D) polyacrylamide
499 gel electrophoresis (PAGE). Proteins were converted into a set of peptides by trypsin
500 digestion. Peptide mixtures were analyzed by shotgun proteomics. Peak lists were generated
501 with the MASCOT software. Cellular and extracellular proteins were identified using an in-
502 house polypeptide sequence database containing the sequences of all annotated proteins
503 encoded by the *B. cereus* chromosome (NC_004722) and pBclin15 plasmid (NC_004721).
504 See text for further details on strategy.

505

506 **Figure 4. Hierarchical clustering of cellular proteome dynamics based on functional**
507 **group profiles. Panel A.** HCA from *B. cereus* ATCC 14579 proteomic data. **Panel B.** HCA
508 from Δ pBclin15 proteomic data. Detailed composition of the 20 functional groups is given in
509 supplementary Table S3. The dendrograms and heat maps were constructed as described in
510 the Material and Methods. Values on the edges (clusters) of the clustering are AU *p*-values
511 (%). The colored scale in the heatmaps ranges from saturated green for column *z*-score -2 to
512 saturated red for column *z*-score 2. Each functional group is represented by a single row of

22

513 colored boxes. Each growth phase is represented by 3 columns, which correspond to the 3
514 biological replicates.

515

516 **Figure 5. Comparative analysis of central metabolism-related protein dynamics.** Proteins
517 classified in the central metabolism group were subcategorized into 9 subgroups (see Table S3
518 for details). Hierarchical clustering analysis of the 9 central metabolism-related subgroups in
519 WT (**Panel A**) and Δ pBCLin15 (**Panel B**), respectively. The dendrograms and heat maps were
520 constructed as described in the Material and Methods. Values on the edges (clusters) of the
521 clustering are AU p -values (%). The colored scale in the heatmaps ranges from saturated
522 green for column z -score -2 to saturated red for column z -score 2. Each functional group is
523 represented by a single row of colored boxes. Each growth phase is represented by 3 columns,
524 which correspond to the 3 biological replicates.

525

526 **Figure 6. Focus on glycolysis/gluconeogenesis and TCA pathways based on proteomic**
527 **profiles. Panel A.** Dynamics of proteins categorized in glycolysis/gluconeogenesis and TCA
528 in *B. cereus* ATCC 14579 (WT) and Δ pBCLin15. **Panel B.** Simplified overviews of the main
529 central metabolic pathways in WT and Δ pBCLin15. Line width and font size indicate low or
530 high protein levels based on NSAF. Acetate excretion, which was quantified, is shown.
531 Glycolysis is represented in blue and TCA is indicated in green.

532

533 **Figure 7. Specific production of extracellular proteins by Δ pBCLin15 and its parental**
534 **strain.** Proteins were measured from culture supernatants harvested at the early exponential
535 (EE), late exponential (LE) and stationary phases (S). Error bars represent the standard
536 deviation from 3 independent measures. Significant differences (p -value<0.05) between
537 Δ pBCLin15 and wild-type cells are indicated with asterisks.

23

538

539 **Figure 8. Comparative analysis of exoproteome dynamics based on proteomic profile of**
540 **functional groups.** HCA based on 9 functional groups in *B. cereus* ATCC 14579 WT (**Panel**
541 **A**) and Δ pBclin15 (**Panel B**), respectively. Detailed composition of the 9 functional groups is
542 given in Table S5. The dendrograms and heat maps were constructed as described in the
543 Material and Methods. Values on the edges (clusters) of the clustering are AU *p*-values (%).
544 The colored scale in the heatmaps ranges from saturated green for column *z*-score -2 to
545 saturated red for column *z*-score 2. Each functional group is represented by a single row of
546 colored boxes. Each growth phase is represented by 3 columns, which correspond to the 3
547 biological replicates.

548

549 **Supplementary data**

550 **Figure S1.** Growth curves of Δ pBclin15 and its parental strain, ATCC 14579 (WT). The
551 strains were cultured in MOD medium supplemented with 30 mM glucose under aerobiosis.
552 Samples from Δ pBclin15 and WT were isolated from the early exponential (EE), late
553 exponential (LE) and stationary (S) growth phases as indicated by the arrows.

554

555 **Table S1.** List of the 44 proteins identified by proteogenomics.

556 **Table S2.** List of assigned MS/MS spectra in the cellular proteomes of the Δ pBclin15 and
557 wild-type ATCC 14579 strains.

558 **Table S3.** List of proteins identified in the cellular proteome analysis of the Δ pBclin15 and
559 wild-type ATCC 14579 strains. The Excel worksheet “SC” contains the list of proteins
560 identified in the cellular proteome analysis of the Δ pBclin15 and wild-type ATCC 14579
561 strains and their spectral counts in each sample. The Excel worksheet “NSAF groups”
562 contains the Total NSAF of cellular proteins categorized into 20 functional groups. The Excel

563 worksheet "NSAF metabolism" contains the Total NSAF of cellular proteins categorized into
564 the 9 central metabolism -related subgroups.

565 **Table S4.** List of MS/MS assigned to peptide sequences in the exoproteome analysis of the
566 Δ pBClin15 and wild-type ATCC 14579 strains.

567 **Table S5.** List of proteins identified in the exoproteome analysis of the Δ pBClin15 and wild-
568 type ATCC 14579 strains. The Excel worksheet "SC" contains the list of proteins identified in
569 the exoproteome analysis of the DpBClin15 and wild-type ATCC 14579 strains and their
570 spectral counts in each sample. The Excel worksheet "NSAF groups" contains the Total
571 NSAF of extracellular proteins categorized into 9 functional groups.

572 **Table S6.** List of the abundance-level changes of cellular proteins in the Δ pBClin15 *versus*
573 wild-type strain, as ranked by the *B*-statistics.

574 **Table S7.** List of the abundance-level changes of exoproteins in the Δ pBClin15 *versus*
575 wild-type strain, as ranked by the *B*-statistics.

576

577

578 **Table 1:** Top 12 cellular proteins showing abundance-level change in Δ pBClin15 vs WT in the EE, LE
 579 and S growth phases, as ranked by the *B*-statistics. More details are given in Table S6.

Growth phase	Name	Protein	Gene	Functional annotation	log ₂ FC ^a	Adj. ^b p-value	B ^c
EE	BCp0002	NP_829890	BCp0002	pBClin15 encoded protein	-6.95	2.00E-22	46.12
	RpoC	NP_830004	BC0123	DNA-directed RNA polymerase subunit β'	6.18	4.42E-11	20.04
	RpoB	NP_830003	BC0122	DNA-directed RNA polymerase subunit β	5.74	8.07E-10	16.91
	Tpx	NP_834345	BC4639	Thiol peroxidase	-4.47	4.90E-07	10.53
	TegA	NP_835080	BC5419	Acetylglucosaminyldiphosphoundecaprenol N-acetyl-beta-D-mannosaminyltransferase	-4.50	4.90E-07	10.42
	BC4791	NP_834493	BC4791	Carbonic anhydrase	-4.61	7.92E-07	9.79
	FusA	NP_830008	BC0128	Elongation factor G	4.18	1.20E-06	9.27
	Tig	NP_834192	BC4480	Trigger factor	4.94	2.77E-06	8.31
	DeaD2	NP_830127	BC0259	ATP-dependent RNA helicase	4.88	2.95E-06	8.14
	BC4157	NP_833872	BC4157	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	4.77	3.79E-06	7.75
	AspS	NP_834109	BC4397	Aspartyl-tRNA synthetase	4.70	3.79E-06	7.64
	Apt	NP_834114	BC4402	Adenine phosphoribosyltransferase	-4.25	3.79E-06	7.60
LE	BCp0002	NP_829890	BCp0002	pBClin15 encoded protein	-6.90	1.56E-06	11.49
	SufB	NP_834650	BC4979	ABC transporter-associated protein	5.96	2.56E-05	8.41
	BC1376	NP_831157	BC1376	Flavodoxin	-5.60	2.56E-05	8.15
	ClpX	NP_834191	BC4479	ATP-dependent protease	5.24	3.60E-05	7.53
	RpsA	NP_831277	BC1498	30S ribosomal protein S1	5.23	4.12E-05	7.16
	BC3898	NP_833618	BC3898	Integral membrane protein	-4.94	4.12E-05	7.02
	BC4157	NP_833872	BC4157	Branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase subunit E2	5.72	4.12E-05	6.95
	PurL	NP_830168	BC0329	Phosphoribosylformylglycinamide synthase II	5.54	4.83E-05	6.67
	GlmS	NP_830058	BC0190	D-Fructose-6-phosphate amidotransferase	5.17	6.99E-05	6.01
	RocA	NP_830183	BC0344	1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	5.69	6.99E-05	5.96
	CutC	NP_832817	BC3071	Copper homeostasis protein	-4.64	6.99E-05	5.91
	DacC	NP_829918	BC0014	D-Alanyl-D-alanine carboxypeptidase	4.57	6.99E-05	5.84
S	BCp0002	NP_829890	BCp0002	pBClin15 encoded protein	-7.49	1.12E-03	5.47
	FlaB	NP_831435	BC1658	Flagellin	3.30	1.77E-02	2.55
	RpmJ	NP_830034	BC0155	50S Ribosomal protein L36	-3.24	1.77E-02	2.05
	BC3312	NP_833051	BC3312	3-Oxoadipate enol-lactonase	3.19	1.77E-02	1.99
	BC2311	NP_832074	BC2311	4'-Phosphopantetheinyl transferase	-3.99	3.79E-02	0.87
	FeoB	NP_830520	BC0708	Ferrous iron transport protein B	-1.76	3.79E-02	0.68
	BC4042	NP_833760	BC4042	3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-3.07	3.79E-02	0.55
	CwlF	NP_829909	BCp0021	N-Acetylmuramoyl-L-alanine amidase	-2.49	3.79E-02	0.38
	BioB	NP_833832	BC4114	Biotin synthase	-2.54	3.79E-02	0.36
	FabZ	NP_834943	BC5280	(3R)-Hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	-2.32	3.79E-02	0.30
	PheS	NP_834267	BC4561	Phenylalanyl-tRNA synthetase subunit α	-2.32	3.79E-02	0.30
	CutC	NP_832817	BC3071	Copper homeostasis protein	-3.85	3.79E-02	0.21

580 ^aFC: fold-change

581 ^badj. *p*-value is the *p*-value adjusted for multiple testing

582 ^c*B*-statistic (B) is the log-odds that the protein is differentially expressed

583 **Table 2:** List of exoproteins showing abundance-level change in Δ pBClin15 vs WT in the EE, LE and
 584 S growth phases, as ranked by the *B*-statistics. More details are given in Table S7.

585

Growth phase	Name	Protein	Gene	Functional annotation	log ₂ FC ^a	Adj. ^b p-value	B ^c
EE	BC1894	NP_831667	BC1894	Phage protein	5.96	4.3E-06	9.90
	BCp0002	NP_829890	BCp0002	pBClin15 encoded protein	-5.38	5.5E-05	6.89
	BC1893	NP_831666	BC1893	Phage protein	4.8	2.63E-04	5.2
	BC1862	NP_831635	BC1862	Phage protein	3.41	4.59E-03	2.3
	BC1911	NP_831682	BC1911	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	3.50	1.68E-02	0.65
	BC1901	NP_831673	BC1901	Phage protein	3.42	1.68E-02	0.52
LE	CspB	NP_833272	BC3539	Cold shock protein	5.28	1.25E-10	19.82
	BC1893	NP_831666	BC1893	Phage protein	3.53	6.45E-05	6.33
	FlaA	NP_831434	BC1657	Flagellin	-2.56	7.74E-05	5.47
	FlaB	NP_831435	BC1658	Flagellin	2.65	1.79E-02	0.20
S	BCp0010	NP_829898	BCp0010	pBClin15 encoded protein	-5.02	1.02E-03	4.38
	GlmM	NP_830056	BC0188	Phosphoglucosamine mutase	-4.55	1.02E-03	4.16
	BC2078	NP_831846	BC2078	Membrane Spanning Protein	3.74	3.02E-03	2.58
	BC4985	NP_834656	BC4985	ABC transporter substrate-binding protein	4.50	3.02E-03	2.48
	RocA	NP_830183	BC0344	1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	-4.52	3.02E-03	2.34
	BCp0002	NP_829890	BCp0002	pBClin15 encoded protein	-4.45	4.2E-03	1.82
	CspB	NP_833272	BC3539	Cold shock protein	5.70	4.2E-03	1.78
	LppC	NP_834220	BC4511	Acid phosphatase	3.3	4.2E-03	1.48
	TgC	NP_831760	BC1991	Putative murein endopeptidase	-0.46	3.02E-03	1.40
	BC1903	NP_831675	BC1903	Phage protein	2.97	4.2E-03	1.40
	BC3728	NP_833453	BC3728	DNA-binding protein HU	2.88	4.2E-03	1.35
	RpmE2	NP_834993	BC5331	50S Ribosomal protein	2.95	4.2E-03	1.34
	Asd	NP_833521	BC3799	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	-3.36	4.2E-03	1.32
	DnaK	NP_834024	BC4312	Molecular chaperone	-4.04	4.8E-03	1.26
	Rpe	NP_833579	BC3858	Ribulose-phosphate 3-epimerase	-2.75	4.47E-03	1.11
	Prc	NP_834848	BC5184	Carboxyl-terminal protease	3.31	4.52E-03	1.06
	TerD1	NP_830282	BC0443	Tellurium resistance protein	-3.38	4.80E-03	0.93
	DltD	NP_832595	BC2846	Protein dltD precursor	3.01	6.27E-03	0.63
	TrpB	NP_831021	BC1237	Tryptophan synthase subunit beta	-3.74	6.48E-03	0.54
	FtsL	NP_833637	BC3917	Cell division protein	2.49	8.50E-03	0.22
BC4371	NP_834083	BC4371	Putative FMN-dependent NADH-azoreductase 1	3.38	8.50E-03	0.10	
VanW	NP_833266	BC3533	Vancomycin B-type resistance protein	4.01	8.50E-03	0.10	
PtsH	NP_833767	BC4049	Phosphocarrier protein HPr	2.91	8.69E-03	0.07	

586 ^aFC: fold-change

587 ^badj. *p*-value is the *p*-value adjusted for multiple testing

588 ^c*B*-statistic (B) is the log-odds that the protein is differentially expressed

589

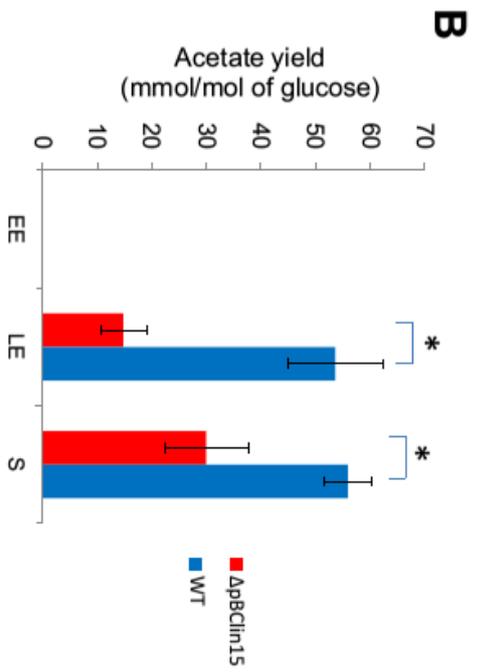
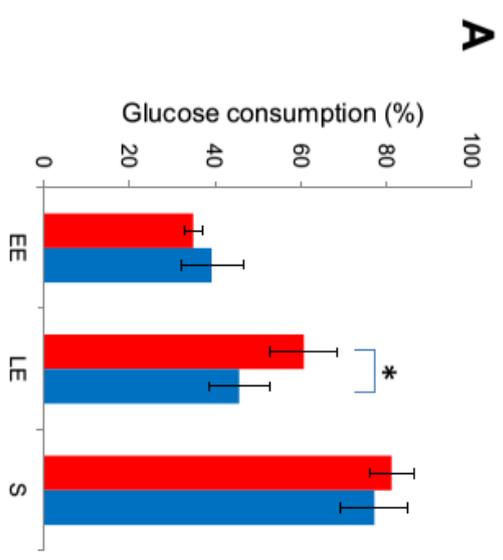


Figure 1

Figure 2
[Click here to download Figure: Figure 2.pptx](#)

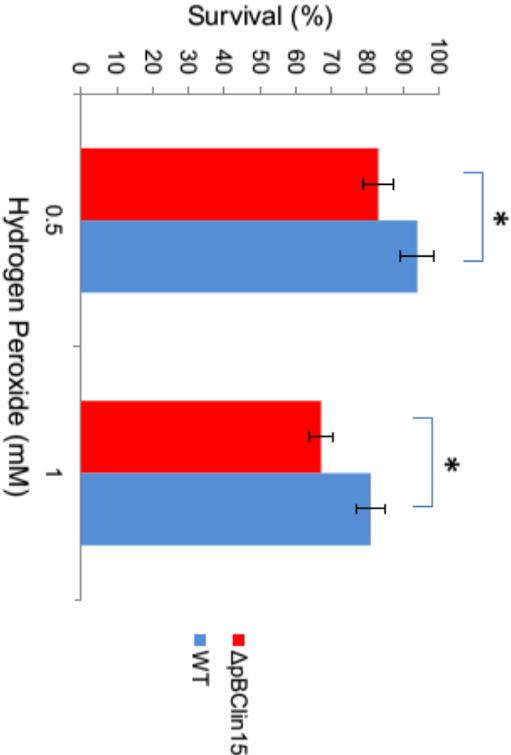


Figure 2

Figure 3
Click here to download Figure: Figure 3new.pptx

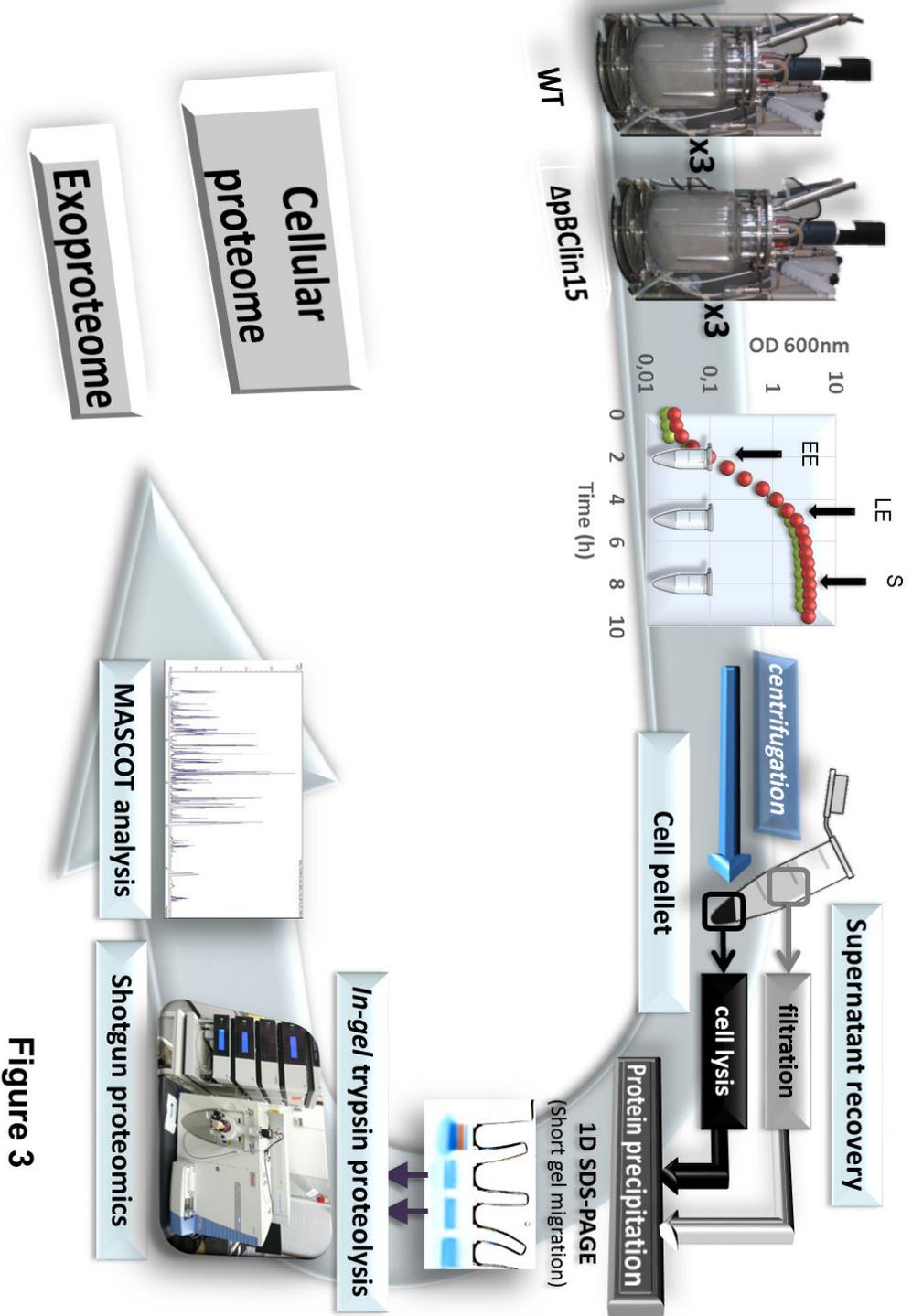


Figure 3

Figure 4
[Click here to download Figure: Figure 4 rev.pptx](#)

Figure 4

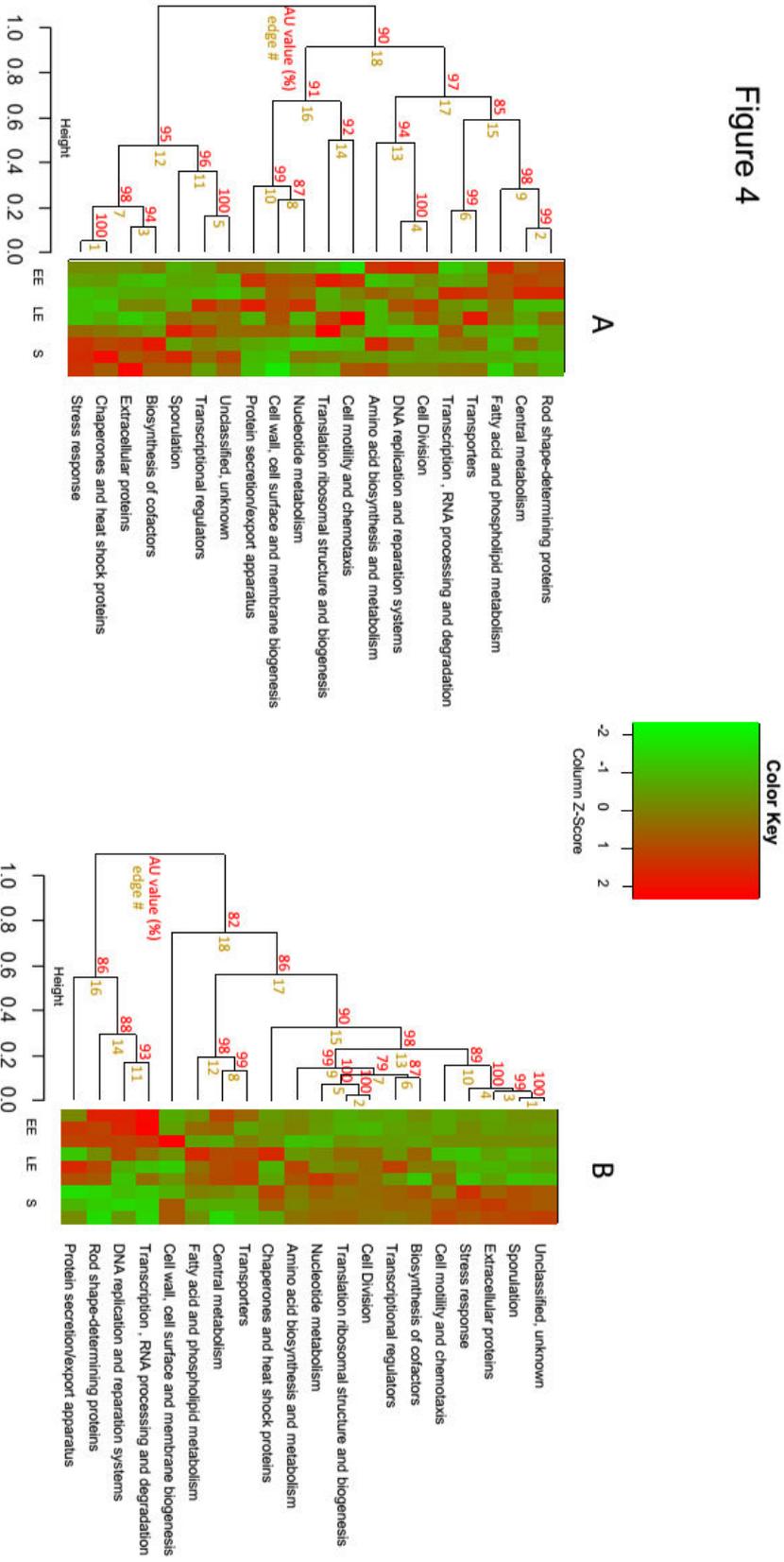
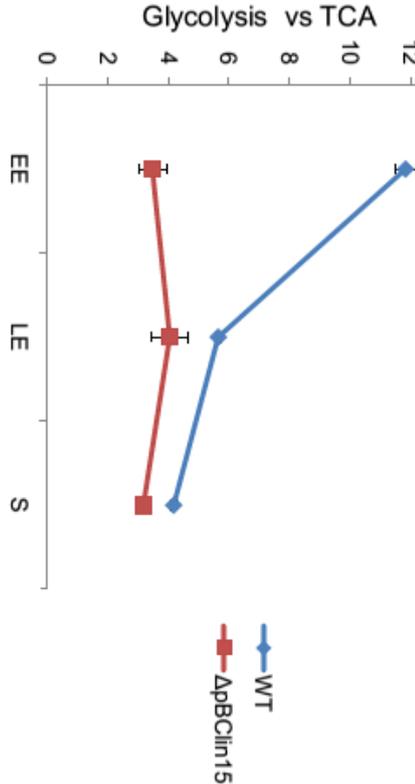


Figure 6
Click here to download Figure: Figure 6.pptx

A



B

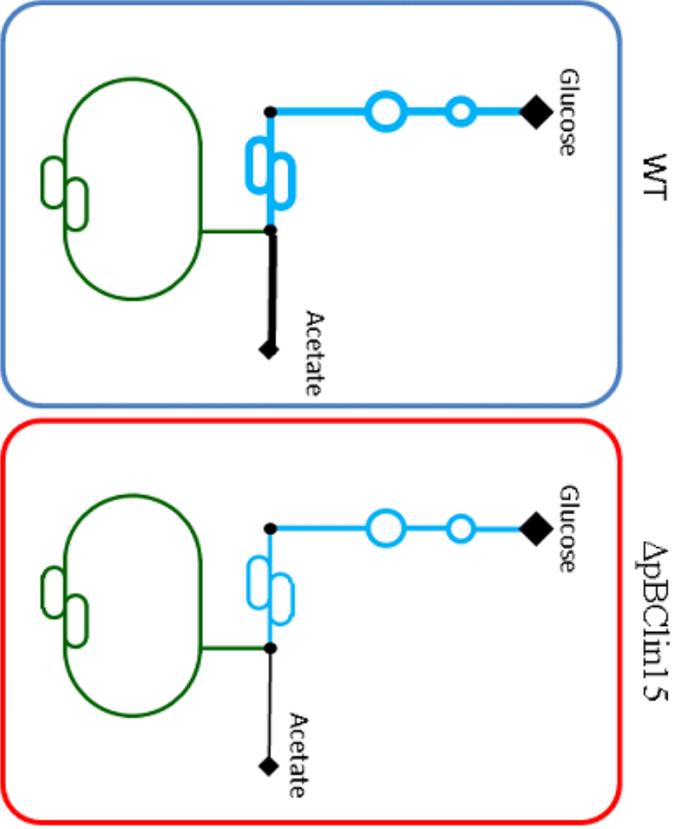


Figure 6

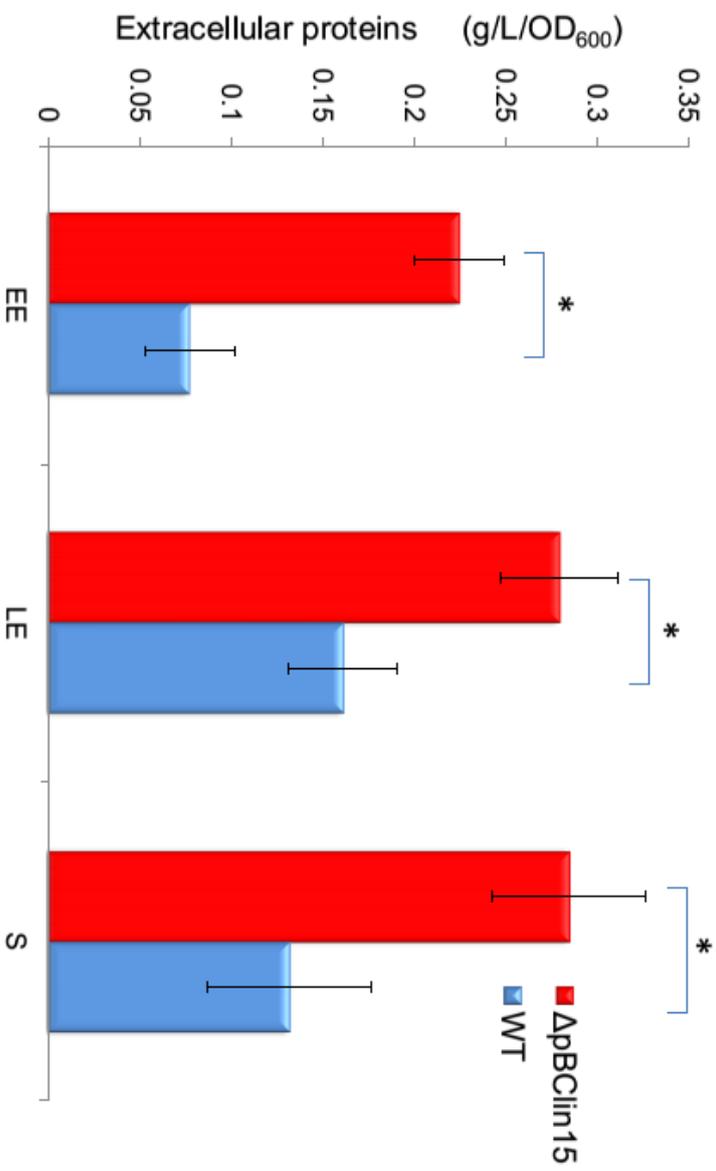
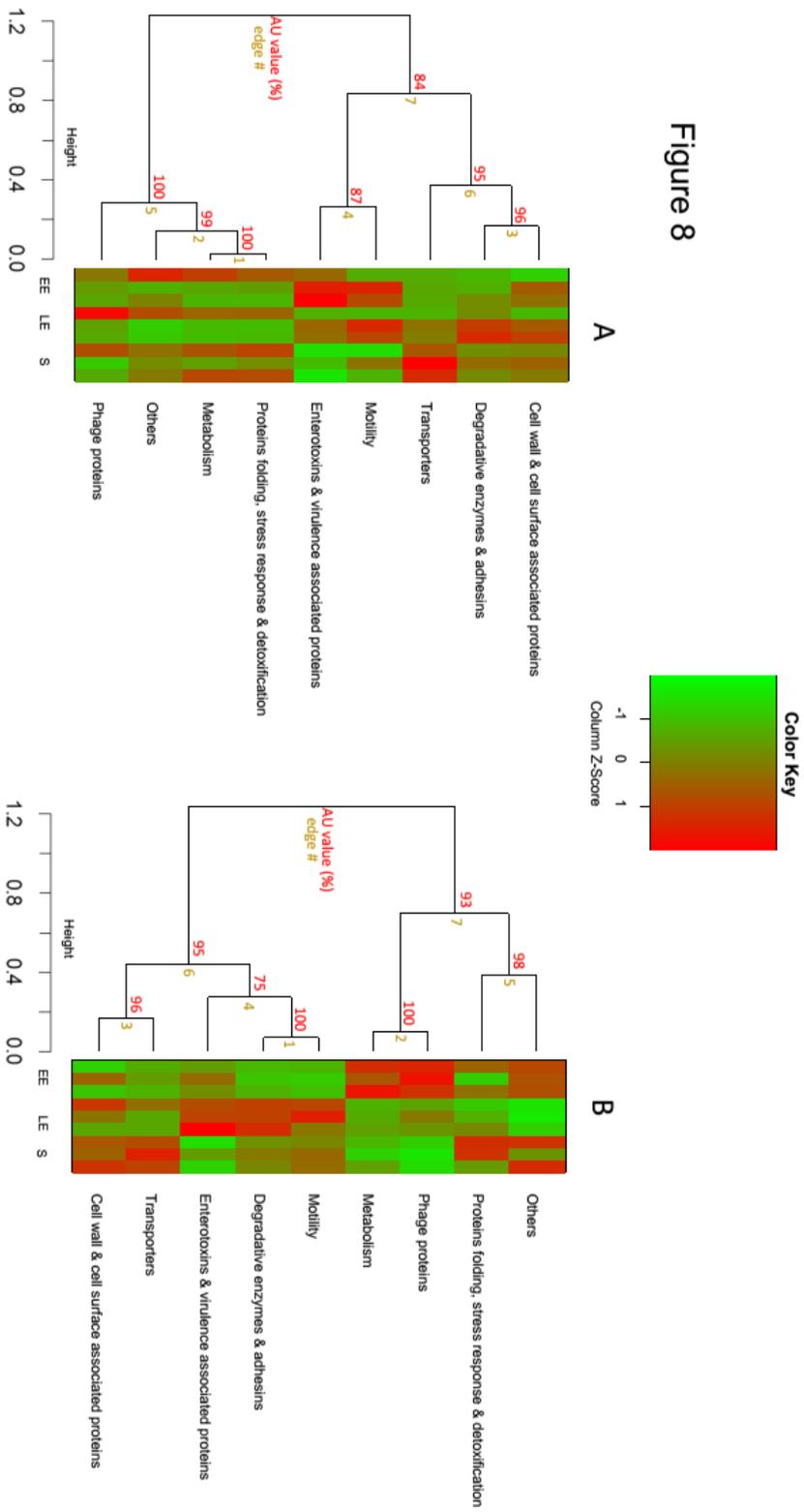


Figure 7

Figure 8
 Click here to download Figure: Figure 8 rev.pptx



CHAPITRE III – Rôle de la méthionine sulfoxyde réductase *msrAB* et ses cibles dans le maintien de l'homéostasie redox de *B. cereus* en aérobiose

III.1 Problématique et objectifs

En aérobiose, les ROS sont générés au cours du métabolisme respiratoire et la respiration est considérée comme une source majeure de ROS endogènes chez les bactéries (Vinogradov & Grivennikova, 2015). Les résidus méthionines sont les résidus les plus sensibles à l'oxydation par les ROS et génèrent un produit, la méthionine sulfoxyde. Il existe deux stéréoisomères de la méthionine sulfoxyde de par la position asymétrique de l'atome de soufre sur la chaîne latérale : la méthionine-S-sulfoxyde et la méthionine-R-sulfoxyde (Kim, *et al.*, 2014). La réduction des méthionines oxydées sous la forme libre ou incorporée dans une protéine est possible grâce à l'action d'une famille d'enzyme, les méthionines sulfoxydes réductases (Boschi-Muller & Branlant, 2014). Il existe plusieurs méthionines réductases dont l'activité est stéréospécifique. MsrA réduit les formes libres et incorporées des méthionines –S-sulfoxydes et MsrB réduit principalement les formes libres et dans une moindre mesure les formes incorporées des méthionines-R-sulfoxydes. L'activité de MsrB sur les formes incorporées des méthionines oxydées est parfois complémentée par la méthionine sulfoxyde réductase fRMs (Lee, *et al.*, 2009). Les deux méthionines sulfoxydes réductases MsrA et MsrB en plus de leur activité stéréospécifique, réduisent préférentiellement les résidus méthionines des protéines dépliées (Tarrago, *et al.*, 2012). Plusieurs études ont révélé l'importance des Msr et des résidus méthionines dans les mécanismes de résistance au stress oxydant et la modulation des facteurs de virulence. La plupart de ces études reposent sur la caractérisation de mutant ne possédant plus un ou plusieurs méthionines sulfoxydes réductases (cf. Introduction bibliographique-Chapitre III).

Chez *B. cereus* souche ATCC 14579, *msrA* et *msrB* sont fusionnés et forment un seul gène (BC 5436) codant pour une seule protéine nommée MsrAB (NP_835097) et possédant les deux domaines. MsrAB est une protéine de 36 938 Da constituée de 321 acides aminés dont 5 résidus cystéines. C'est une protéine très conservée au sein du groupe *B. cereus*. Aucune étude n'a été réalisée sur cette protéine. Pour déterminer le rôle de MsrAB en aérobiose, nous avons comparé les phénotypes, les compositions et teneurs en Met(O) des protéomes et exoprotéomes du mutant et de la souche sauvage dépourvue du plasmide en aérobiose.

III.2 Résultats et discussions

Dynamique de l'expression de *msrAB* chez *B. cereus* en aérobiose

Pour déterminer le rôle de MsrAB chez *B. cereus*, nous avons construit une souche mutante ($\Delta msrAB$) ne synthétisant plus MsrAB et réalisé la complémentation du mutant en introduisant le plasmide pHT304-*msrAB* apportant 3 ± 1 copies sauvages du gène *msrAB* (Arantes & Lereclus, 1991). L'expression de *msrAB* chez la souche complétementée est sous le contrôle de son propre promoteur. Le but de la complémentation du mutant est de restaurer le phénotype sauvage et valider ainsi la construction du mutant. Nous avons vérifié le niveau d'expression du gène *msrAB* par RT-qPCR quantitative pour les trois prélèvements réalisés au cours de la croissance pour la souche sauvage (WT), le mutant $\Delta msrAB$ (NM) et le mutant complétementée $\Delta msrAB$ (pHT304-*msrAB*) (OP). Nous n'avons pas détecté d'ARNm de *msrAB* chez la souche NM. Le gène *msrAB* est surexprimé chez la souche OP en phase exponentielle de croissance et de ralentissement par rapport à la souche WT (**Figure 34**).

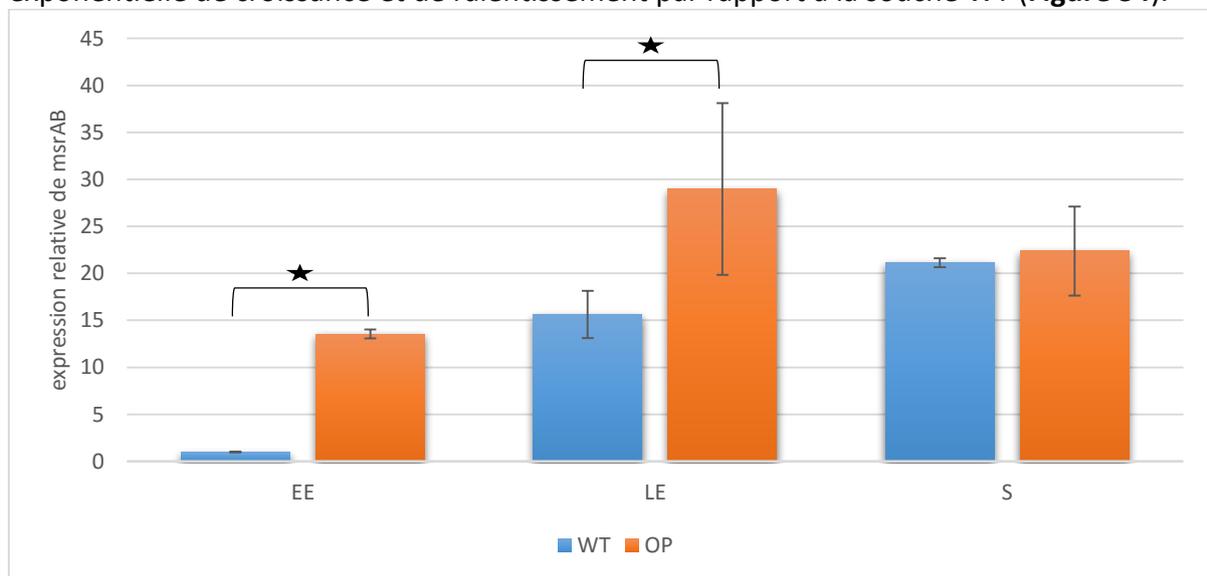


Figure 34: Comparaison du niveau d'expression du gène *msrAB* des souches WT et OP en phase exponentielle (EE), de ralentissement (LE) et stationnaire (S) en aérobiose

★ *p*-value du test de Student < à 0,05

L'expression de *msrAB* dans la souche WT est maximale en phase stationnaire. La complémentation du mutant $\Delta msrAB$ restaure l'expression de *msrAB* en phase stationnaire mais la cinétique d'expression n'est pas la même que dans WT.

Implication de MsrAB sur la croissance de *B. cereus* en aérobiose

La comparaison des courbes de croissance des trois souches a révélé que la phase de latence (λ) est 2,5 fois plus courte chez le mutant NM par rapport aux deux autres souches (**figure 35**, **Tableau 7**).

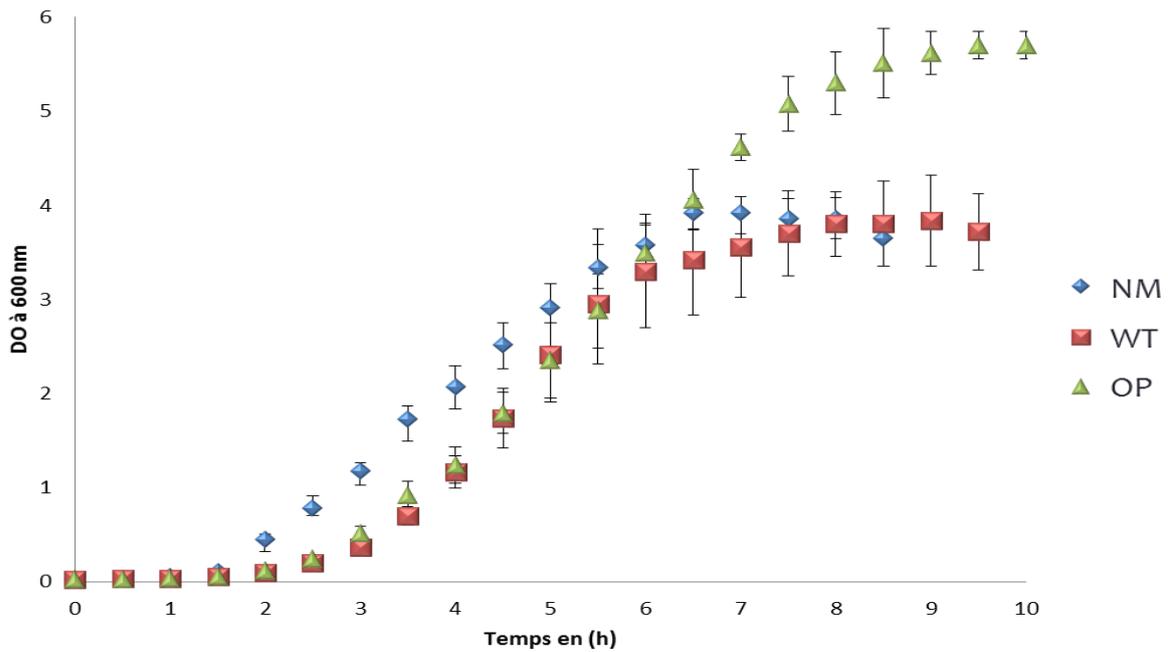


Figure 35: Courbe de croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose

Tableau 7: Caractéristiques de croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose

	ΔpB_{Clin15}	$\Delta msrAB$	$\Delta msrAB/pHTmsrAB$
ΔPOR (mV)	111 ± 10	88 ± 9	136 ± 16
λ (h)	1.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1.8 ± 0.9
μ_{max} (h^{-1})	1.6 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2
DO final	3.8 ± 0.4	3.9 ± 0.2	5.8 ± 0.1
biomasse ($g.l^{-1}$)	1.8 ± 0.2	1.9 ± 0.1	2.6 ± 0.1

La cinétique en phase exponentielle de croissance est identique entre les trois souches. A partir de 6h de culture, les souches WT et NM entrent en phase stationnaire alors que la souche OP entre en phase de ralentissement. A la fin de la croissance, la biomasse finale est plus élevée pour la souche OP que pour les deux autres souches (**Tableau 7**). Le ΔPOR est plus faible chez la souche NM que WT alors que la biomasse finale est identique. Il n'y a pas de différence significative du ΔPOR entre les souches WT et OP. La différence de l'activité réductrice entre les trois souches de *B. cereus* peut être due à une implication de MsrAB dans l'activité réductrice des thiols exofaciaux membranaires (Michelon, *et al.*, 2010, Le Lay, *et al.*, 2015). La cinétique de consommation du glucose diffère entre les trois souches (**Figure 36**).

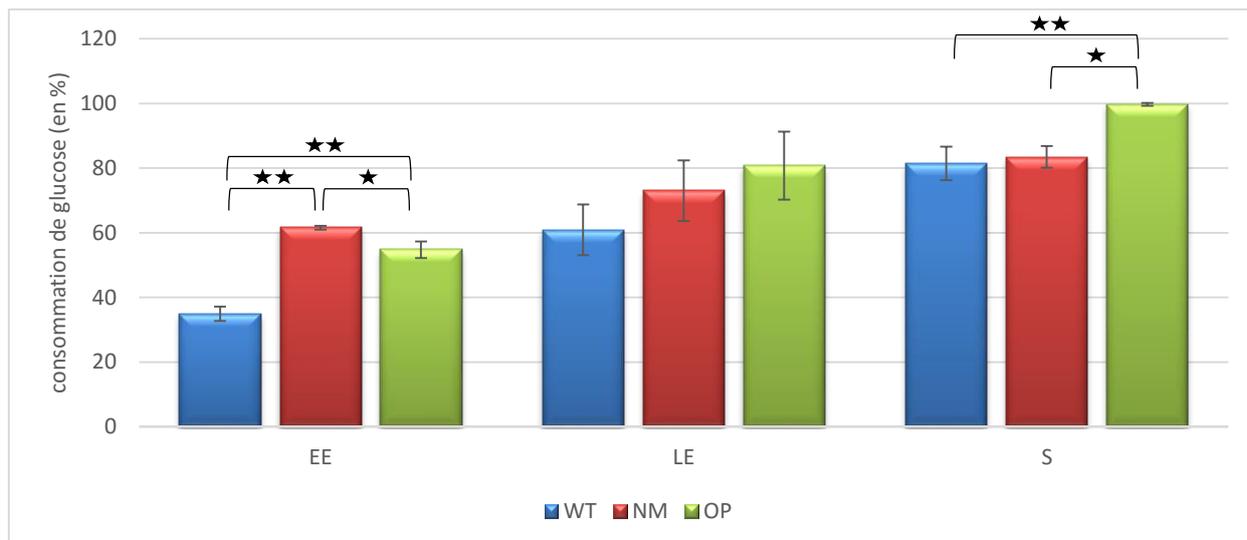


Figure 36: Consommation du glucose au cours de la croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose

En phase exponentielle de croissance, les souches NM et OP ont consommé plus de la moitié du glucose présent dans le milieu alors qu'au même stade de croissance, la consommation du glucose par la souche WT est de $35 \pm 2\%$. La phase stationnaire est atteinte chez la souche OP une fois que tout le glucose est consommé. Pour les deux autres souches, $82 \pm 1\%$ du glucose est consommé. La quantité de glucose n'est donc pas un facteur limitant responsable de l'entrée en phase stationnaire chez la souche WT et NM. Au cours de la croissance, l'accumulation de ROS liée au métabolisme respiratoire pourrait être responsable de l'entrée en phase stationnaire des souches WT et NM alors que le glucose présent dans le milieu de culture n'est pas totalement consommé (Saint-Ruf, *et al.*, 2007, Rolfe, *et al.*, 2012). La surexpression de *msrAB* chez OP au cours de la phase active de croissance permet probablement à la bactérie de lutter plus efficacement contre les ROS endogènes.

Le dosage des métabolites sécrétés au cours de la croissance n'a pas révélé de différences significatives pour le lactate, formiate et succinate qui sont sécrétés en très faibles quantités. Par contre, la sécrétion d'acétate est deux fois plus élevée en phase de ralentissement et stationnaire (**Figure 37**). La sécrétion plus élevée de l'acétate implique moins d'acétyl-CoA entrant dans le cycle de Krebs, il y aura donc moins de NADH à réoxyder via la chaîne respiratoire (**Figure 16**). Sachant que la chaîne respiratoire est la source majeure de ROS (Gonzalez-Flecha & Demple, 1997, Seaver & Imlay, 2001), un moindre fonctionnement devrait engendrer une plus faible formation de ROS endogène.

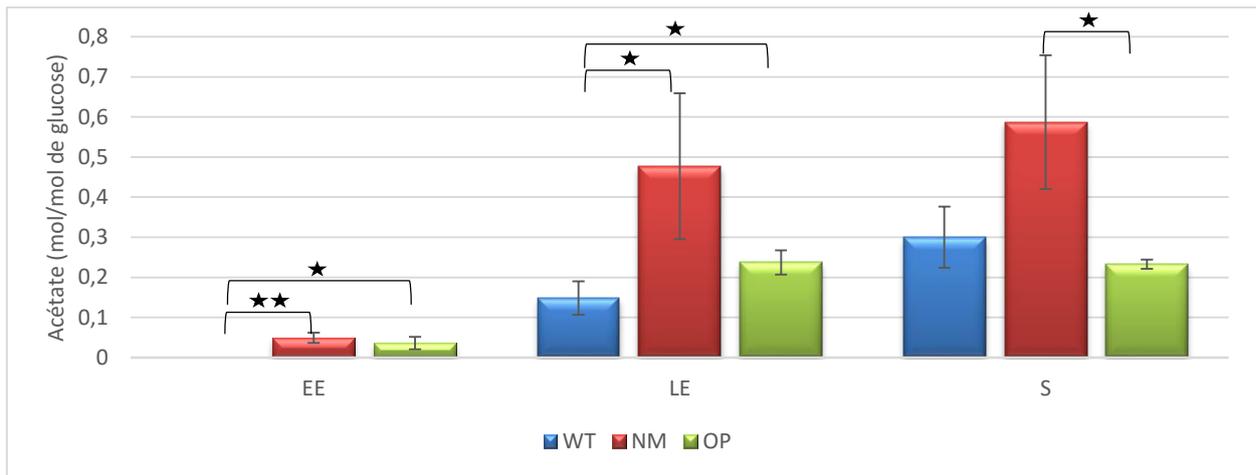


Figure 37: Stœchiométrie de l'acétate au cours de la croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose

Implication de MsrAB dans la sécrétion des protéines extracellulaires

La quantité de protéines extracellulaires a été déterminée par dosage de Bradford à partir des surnageants filtrés (**Figure 38**).

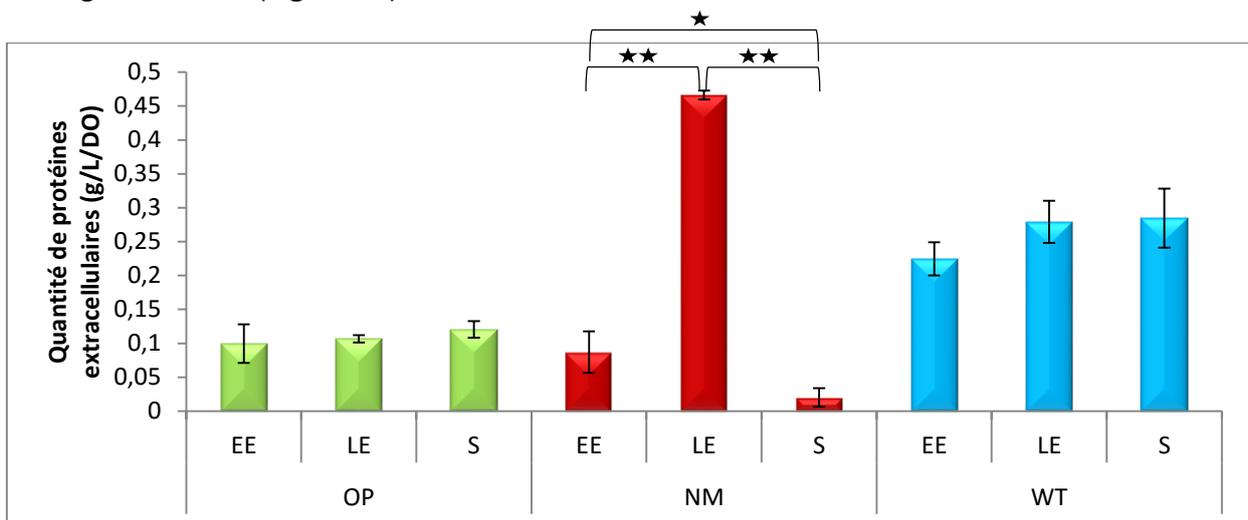


Figure 38: Comparaison de la quantité de protéines extracellulaires au cours de la croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose

★★ p -value du test de Student $< 0,01$

★ p -value du test de Student $< 0,05$

La quantité de protéines extracellulaires augmente légèrement entre la phase exponentielle et de ralentissement chez la souche WT. Elle est deux fois plus élevée dans la souche sauvage que dans la souche OP tout au long de la croissance. Ce résultat suggère une implication du niveau d'expression de *msrAB* sur la sécrétion des protéines. Chez le mutant, la quantité de protéines extracellulaires est deux fois plus élevée que chez le sauvage en phase de ralentissement. Elle est très faible en phase stationnaire. Cette chute de la quantité de protéines extracellulaires en phase stationnaire pour le mutant peut être due à une activité protéasique élevée du surnageant. Pour tester cette hypothèse, l'activité protéasique spécifique du surnageant a été mesurée (**Figure 39**). L'activité protéasique est

significativement plus élevée chez la souche NM que chez la souche WT tout au long de la croissance. La surexpression de *msrAB* chez la souche OP ne permet pas de rétablir le phénotype sauvage au niveau de l'activité protéasique. La faible quantité de protéines extracellulaires en phase stationnaire chez la souche NM est certainement due à l'activité des protéases présents dans le surnageant à la fin de la phase active de croissance. La plus faible quantité de protéines extracellulaires chez la souche OP par rapport à WT pourrait être également due à l'activité protéasique du surnageant.

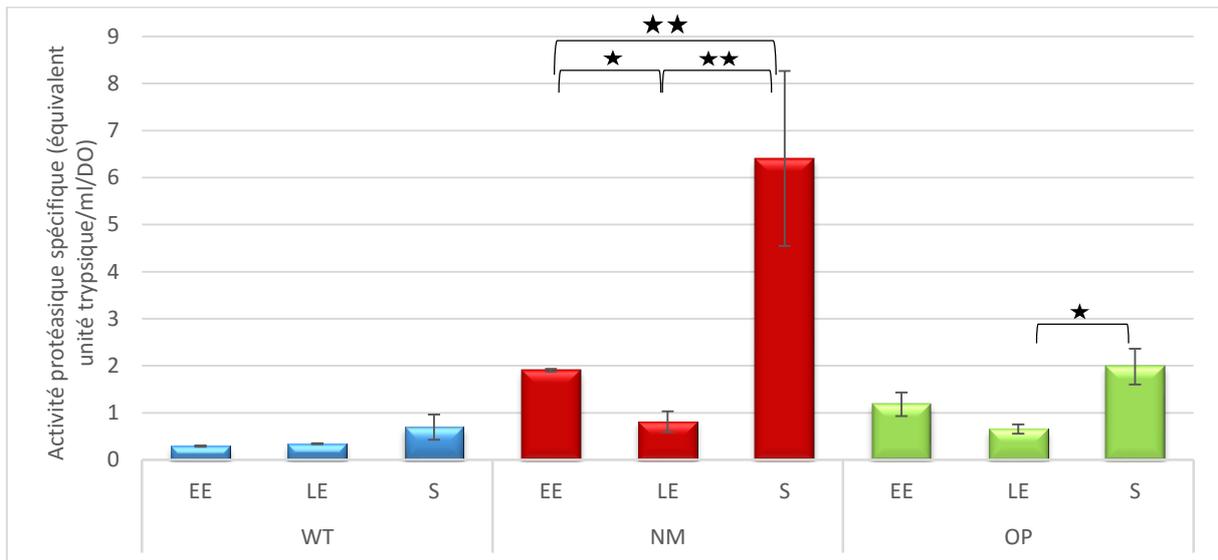


Figure 39: Comparaison de l'activité protéasique du surnageant au cours de la croissance des souches WT, NM et OP en aérobiose

★★ p -value du test de Student $< 0,01$

★ p -value du test de Student $< 0,05$

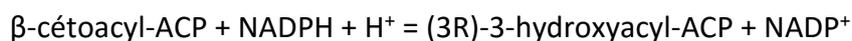
Analyse du protéome cellulaire des souches WT, NM et OP

L'analyse en spectrométrie de masse des échantillons issus de l'extraction des protéines intracellulaires ont permis d'obtenir 200746 spectres MS/MS. Ils ont été attribués à 922 protéines différentes et validées par au moins deux peptides protéotypiques. Les analyses d'abondances des protéines ont été réalisées à partir des nombres de spectres MS/MS pour chaque protéine sous R à l'aide du package LIMMA (Law, *et al.*, 2014, Ritchie, *et al.*, 2015) implémenté avec le package edgeR (Robinson, *et al.*, 2010). La significativité statistique a été déterminée pour les différences d'abondances des protéines de la souche NM (absence du *msrAB* chromosomique) vs. la souche WT (présence de la copie sauvage de *msrAB* chromosomique), et de la souche OP (absence du *msrAB* chromosomique et présence de 3 ± 1 copies de *msrAB* plasmidique) vs. NM pour les trois phases de croissance. Les résultats pour les protéines avec une différence significative d'abondance ($|lfc| > 2$ et p -value $< 0,05$) sont regroupés dans le **Tableau 8**.

Tableau 8: Tableau récapitulatif des 33 protéines intracellulaires significativement impactées par MsrAB en aérobiose

Phase de croissance	Numéro NP	Numéro gène	Identifiant	annotation fonctionnelle	NM vs WT			OP vs NM		
					logFC	t	P.Value	logFC	t	P.Value
EE	NP_830777.1	BC0991	SlpA	protéine SlpA	2.21	2.63	2.47E-02	-2.40	-3.04	1.20E-02
	NP_830015.1	BC0135	RpsS	protéine ribosomale SSU 19P	2.06	3.17	9.51E-03	-1.88	-2.82	1.75E-02
	NP_834043.1	BC4331	AroE	shikimate 5-déshydrogénase	2.06	3.89	2.80E-03	-1.77	-3.17	9.56E-03
	NP_831123.1	BC1342	-	6-pyruvoyl tétrahydrobioptérine synthase	2.16	3.55	4.98E-03	-1.71	-2.41	3.59E-02
	NP_834730.1	BC5062	TyrS	tyrosyl-ARNT synthétase	-2.13	-2.48	3.16E-02	2.08	2.43	3.46E-02
	NP_834134.1	BC4422	NadC	nicotinate-nucléotide pyrophosphorylase	-2.25	-2.54	2.88E-02	2.09	2.51	3.02E-02
	NP_831277.1	BC1498	RrpsA	protéine ribosomale RrpsA	-3.21	-3.56	4.85E-03	2.35	2.52	2.96E-02
NP_834331.1	BC4625	-	protéine de stress universelle	-3.19	-5.24	3.38E-04	3.17	5.57	2.09E-04	
LE	NP_835071.1	BC5410	azoR3	azoréductase	4.87	7.10	1.55E-05	-2.84	-2.87	1.47E-02
	NP_831124.1	BC1343	QueE	7-carboxy-7-déazaguanine synthase	2.11	2.21	4.79E-02	-2.39	-2.71	1.95E-02
	NP_834058.1	BC4346	-	protéine transmembranaire hypothétique	2.19	2.70	1.99E-02	-2.19	-2.68	2.08E-02
	NP_831190.1	BC1410	HisF	imidazole glycérol phosphate synthase	2.05	3.23	7.55E-03	-2.12	-3.33	6.26E-03
S	NP_835071.1	BC5410	azoR3	azoréductase	5.83	9.21	5.43E-05	-4.23	-3.87	6.96E-03
	NP_833827.1	BC4109	RibD	riboflavine synthase RibD	4.42	4.89	2.14E-03	-1.68	-3.45	1.19E-02
	NP_832675.1	BC2927	-	prolyl endopeptidase	4.18	7.30	2.22E-04	-3.23	-4.01	5.83E-03
	NP_831186.1	BC1406	HisD	histidinol déshydrogénase	3.41	6.17	5.92E-04	-2.38	-3.12	1.84E-02
	NP_831124.1	BC1343	QueE	7-carboxy-7-déazaguanine synthase	2.63	8.49	8.92E-05	-2.07	-5.92	7.46E-04
	NP_833828.1	BC4110	RibE	riboflavine synthase RibE	2.20	6.68	3.72E-04	-0.92	-3.79	7.67E-03
	NP_830401.1	BC0584	-	acétyltransférase	-2.04	-4.12	5.15E-03	1.34	2.58	3.88E-02
	NP_830063.1	BC0195	-	3-oxoacyl-ACP réductase	-2.12	-3.19	1.67E-02	2.22	3.48	1.14E-02

Sur les 922 protéines, seulement 33 sont impactées directement par MsrAB en aérobiose. Ces protéines sont impliquées dans les processus métaboliques et les mécanismes de lutte contre le stress. En phase exponentielle de croissance, la protéine la plus impactée est une protéine liée au stress (NP_834331.1). Elle est plus abondante chez la souche WT et OP que chez la souche NM avec un lfc de -3,19 et 3,17 respectivement. Cette protéine fait partie de la superfamille UspA (Universal stress protein A). Chez *E. coli*, la forte abondance des Usp est induite lors de la mise en place des mécanismes de défense contre le stress oxydant. Elles sont également impliquées dans la mobilité et l'adhésion (Nachin, *et al.*, 2005). Dans la souche NM, cette protéine est très peu représentée en phase exponentielle de croissance (un seul peptide observé sur les trois réplicats). L'insertion de copies plasmidiques du gène *msrAB* permet de rétablir son niveau d'abondance identique à celui de la souche WT (21± 3 spectres au total pour les trois réplicats). La synthèse de la protéine Usp est donc dépendante de l'expression de *msrAB*. En phase de ralentissement et en phase stationnaire, la concentration cellulaire de l'azoréductase Azor3 est plus élevée dans NM que WT. L'azoréductase est une NADPH : quinone oxydoréductase jouant un rôle dans la protection contre le stress spécifique des groupements thiols (Liu, *et al.*, 2009). En phase stationnaire, l'absence de MsrAB entraîne une diminution de l'abondance d'une oxydoréductase, la 3-oxoacyl-ACP réductase (NP_830063.1) qui catalyse la réaction :



C'est l'une des enzymes du complexe acide gras synthase qui régule la biosynthèse des acides gras saturés et polyinsaturés (Diomandé, *et al.*, 2015). L'activité de la 3-oxoacyl-ACP réductase est NADPH dépendante tout comme MsrAB. L'absence de MsrAB chez le mutant impacte directement l'abondance de cette protéine mais probablement aussi la constitution et les

propriétés de la membrane de *B. cereus*. L'acétyltransférase (NP_830401.1) codé par le gène BC0584 est également moins abondante chez le mutant. Cette protéine participe à l'acétylation des protéines en N-terminal. L'acétylation fait partie des modifications post-traductionnelles tout comme la régulation de l'oxydo-réduction des résidus méthionines par MsrAB. La modalité d'interaction avec MsrAB de cet acétyltransférase reste à être déterminée.

Analyse de l'exoprotéome des souches $\Delta pBClin15$, $\Delta msrAB$ et $\Delta msrAB$ -pHT304msrAB

L'analyse en spectrométrie de masse des échantillons issus de l'extraction des protéines extracellulaires a permis d'obtenir 71676 spectres MS/MS attribués à 371 protéines validées par au moins deux peptides protéotypiques. La classification fonctionnelle des 371 protéines intracellulaires a mis en évidence un impact de l'absence ou surexpression de *msrAB* sur l'abondance des 8 groupes fonctionnels de protéines (**Figure 40**).

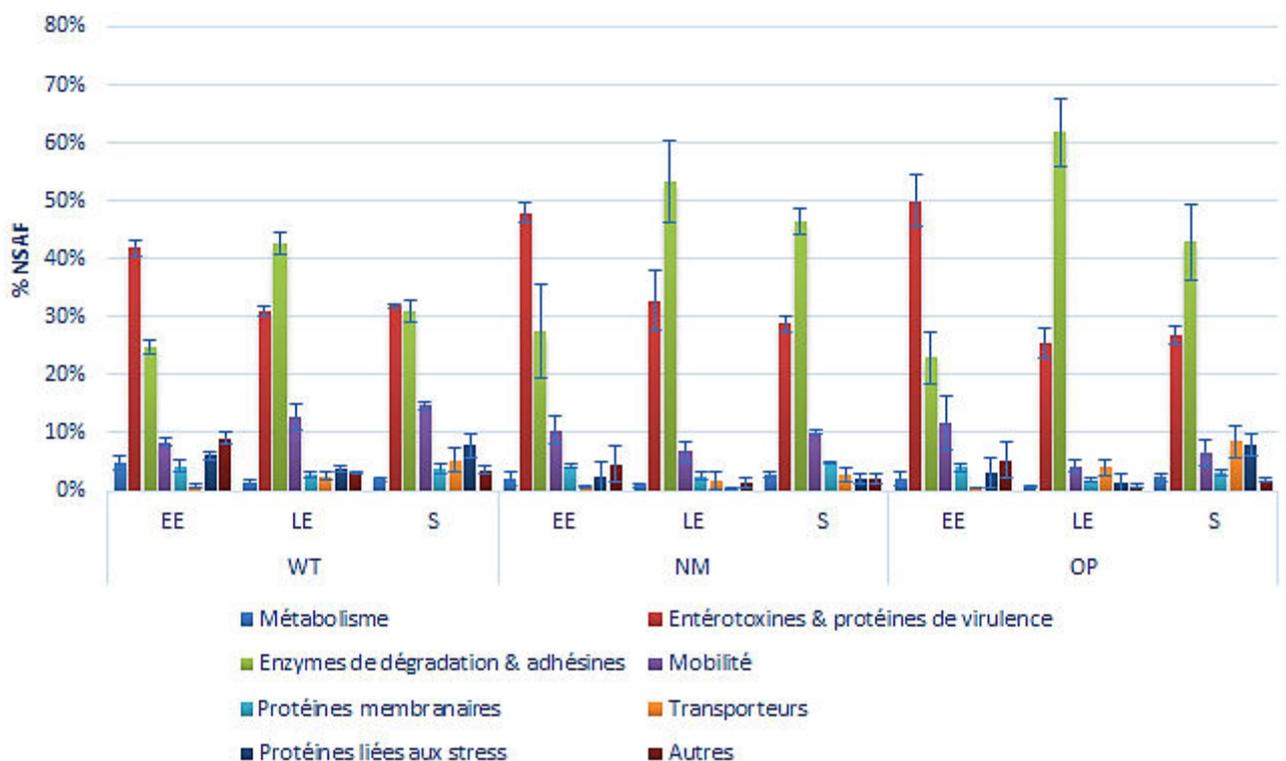


Figure 40 : Abondance des familles fonctionnelles des protéines extracellulaires au cours de la croissance des WT, NM et OP en aérobiose

Tout le long de la croissance, il y a une plus faible quantité relative de protéines liées au métabolisme central et aux stress chez la souche NM que WT. Pour la souche OP, la quantité de ces deux familles fonctionnelles est également plus faible que chez la souche sauvage sauf en phase stationnaire où elle est équivalente. Il y a moins de protéines liées à la mobilité chez NM et OP que WT en phase de ralentissement et stationnaire. Les enzymes de dégradation et adhésines sont significativement plus abondantes en phase de ralentissement et stationnaire chez NM et OP par rapport à WT. Les toxines sont plus abondantes chez NM et OP en phase

exponentielle de croissance que chez la souche WT. Ces résultats révèlent une forte implication de MsrAB sur la dynamique et la composition de l'exoprotéome.

Le **Tableau 9** regroupe toutes les protéines ayant une *p*-value inférieure à 0,05 et de lfc supérieur à 2 en valeur absolue pour au moins un groupe de comparaison. En phase de ralentissement, il y a plus de bacillolysine chez la souche NM par rapport aux souches WT (2,70 lfc) et OP (1,77 lfc). La bacillolysine (EC 3.4.24.28) est classée dans la famille des métalloprotéases. Cette protéase extracellulaire hydrolyse les liaisons peptidiques de la leucine et phénylalanine (Huang, *et al.*, 2012). La forte activité protéasique du surnageant en phase de ralentissement chez la souche NM pourrait s'expliquer par la forte abondance de cette protéine. Le bacillolysine est un facteur de virulence chez plusieurs bactéries pathogènes. Cette métalloprotéase spécifique est un puissant éliciteur de la réponse immunitaire innée et joue un rôle important dans l'issue fatale de l'infection chez les Lépidoptères (Altincicek, *et al.*, 2007). D'autres facteurs de virulence sont impactés par l'absence de MsrAB chez le mutant. La protéine flagellaire FlgK est moins abondante chez la souche NM par rapport à la souche WT (-3,63 lfc) en phase de ralentissement. La protéine adhésive au collagène CnaA est plus abondante (3,19 lfc) en phase stationnaire chez NM que WT. Les protéines liées au stress (CspB, Dps et NifU) et au repliement des protéines (Tig et GroES) sont moins abondantes chez la souche NM qu'OP. Le remodelage de l'exoprotéome en l'absence de MsrAB se met en place dès la fin de la phase exponentielle de croissance et concerne principalement les protéines annotées comme cytosoliques.

Tableau 9: Tableau récapitulatif des 20 protéines de l'exoprotéome significativement impactées par MsrAB en aérobiose

Phase de croissance	Numéro NP	Numéro gène	Identifiant	annotation fonctionnelle	NM vs WT			OP vs NM		
					logFC	t	P.Value	logFC	t	P.Value
EE	5041359-5040562	BC5137	Tpi	triosephosphate isomérase	-1.83	-2.58	2.03E-02	-2.18	-3.24	5.25E-03
	NP_834255.1	BC4548	lsdA1	protéine de surface	-1.88	-2.47	2.57E-02	2.00	2.60	1.97E-02
	NP_831022.1	BC1238	TrpA	tryptophane synthase sous-unité alpha	-2.21	-3.00	8.75E-03	1.67	2.26	3.83E-02
LE	NP_830419.1	BC0602	Npr	bacillolysine	2.70	3.99	3.44E-03	-1.77	-2.40	4.08E-02
	1603696-1604316	BC1596	-	protéine hypothétique	2.54	3.86	4.19E-03	-1.62	-2.34	4.55E-02
	NP_832991.1	BC3251	-	protéine hypothétique	-2.71	-6.55	1.29E-04	2.21	4.33	2.12E-03
	3670539-3669162	BC3705	glnA1	glutamine synthétase type I	-3.45	-5.54	4.26E-04	3.05	4.38	1.97E-03
	NP_834714.1	BC5044	Dps	protéine de l'homéostasie du fer Dps	-3.47	-10.47	3.49E-06	1.38	2.58	3.06E-02
	NP_831414.1	BC1636	FlgK	protéine flagellaire	-3.63	-6.87	9.10E-05	2.29	3.22	1.11E-02
S	NP_833272.1	BC3539	CspB	protéine de choc thermique	-5.13	-10.13	4.52E-06	3.27	3.51	7.06E-03
	NP_830673.1	BC0887	CnaA	protéine adhésive au collagène	3.19	3.96	1.68E-03	-2.33	-2.77	1.62E-02
	NP_830674.1	BC0888	CwlA	N-acétylmuramoyl-L-alanine amidase	2.67	2.81	1.48E-02	-2.45	-2.66	1.99E-02
	NP_833426.1	BC3698	CwpC	endopeptidase de la paroi	2.34	2.99	1.05E-02	-2.24	-3.07	8.98E-03
	NP_833521.1	BC3799	Asd	aspartate-semialdéhyde déshydrogenase	2.30	3.02	9.91E-03	-2.04	-2.80	1.50E-02
	NP_834000.1	BC4228	cccA	cytochrome c550	2.22	2.83	1.43E-02	-2.08	-2.80	1.52E-02
	NP_832874.1	BC3133	-	hydrolase putative	-1.86	-3.25	6.42E-03	2.52	4.49	6.24E-04
	NP_830145.2	BC0294	GroES	co-chaperonine GroES	-1.96	-2.62	2.12E-02	2.41	3.22	6.79E-03
	5297186-5296971	BC5379	-	transporteur ABC	-2.08	-2.56	2.41E-02	2.26	2.68	1.90E-02
	NP_834192.1	BC4480	Tig	protéine ribosomale Tig	-2.14	-4.14	1.18E-03	3.06	6.34	2.73E-05
	NP_834623.1	BC4952	NifU	protéine NifU	-2.16	-2.58	2.28E-02	2.07	2.34	3.58E-02
NP_833272.1	BC3539	CspB	protéine de choc thermique	-3.92	-7.82	3.08E-06	4.09	8.06	2.21E-06	

Implication de *msrAB* dans la dynamique des résidus méthionines oxydées en aérobiose

L'abondance des résidus méthionines oxydées dans l'exoprotéome et le protéome cellulaire a été estimée en rapportant le nombre de Met(O) au nombre total de résidus méthionines pour chaque réplicat biologique et chaque phase de croissance pour les trois souches (**Figure 41**).

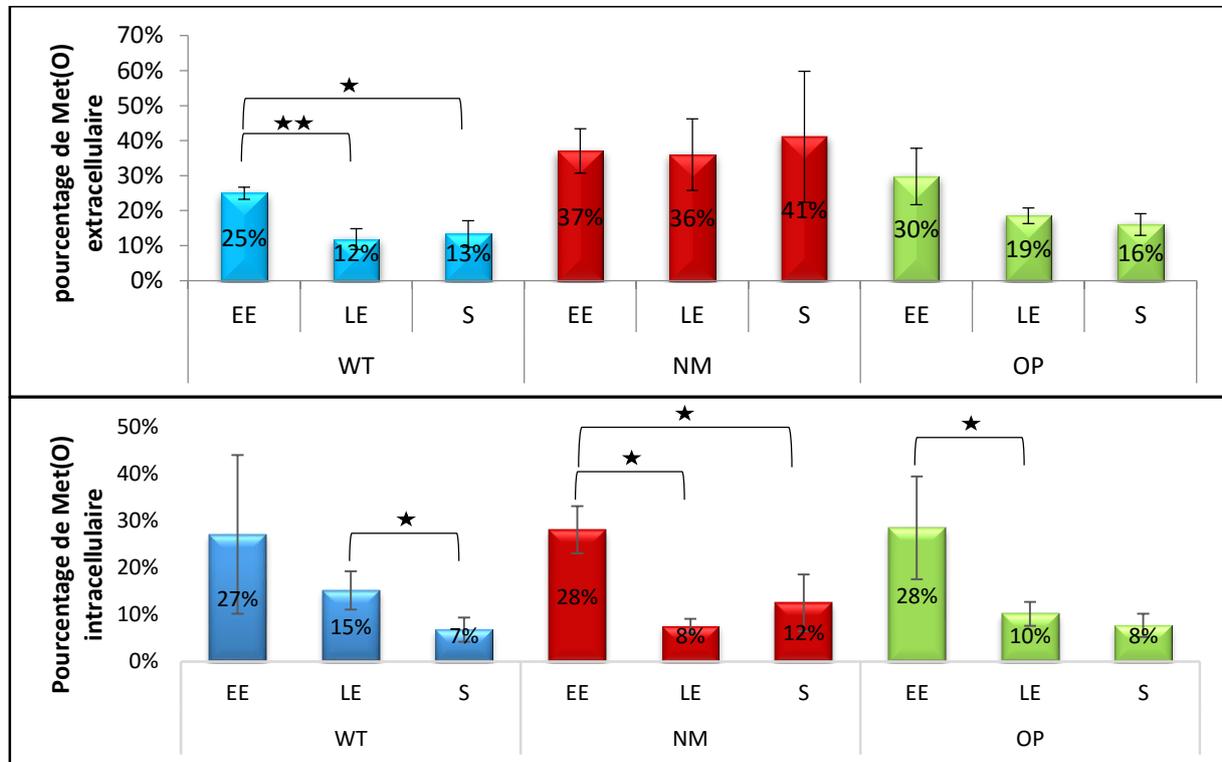


Figure 41: Dynamique des résidus méthionines oxydés dans l'exoprotéome et le protéome cellulaire des souches WT, NM et OP en aérobiose

★★ p -value du test de Student < à 0,01

★ p -value du test de Student < à 0,05

Le pourcentage de résidus méthionines oxydés diminue entre la phase exponentielle et stationnaire pour la souche WT et OP au niveau intracellulaire (de 27-28% à 7-8%) et extracellulaire (de 25-30% à 13-16%). Cette diminution du niveau d'oxydation des résidus méthionines peut s'expliquer par l'augmentation de l'expression de *msrAB* mais également par la réduction de la génération de ROS liée à l'activité de la chaîne respiratoire. Pour la souche NM, le taux de résidus méthionines oxydés diminue significativement au niveau intracellulaire entre la phase exponentielle et de ralentissement. Au niveau extracellulaire, le taux de Met(O) de la souche NM reste stable tout au long de la croissance (39±2%). La forte diminution de l'oxydation des résidus méthionines au niveau intracellulaire peut être corrélée à la forte sécrétion des protéines extracellulaires. Si les résidus méthionines des protéines extracellulaires jouent un rôle d'antioxydant, une sécrétion plus élevée des protéines extracellulaires permettrait de maintenir l'homéostasie redox au niveau intracellulaire en l'absence de MsrAB. Les toxines et enzymes de dégradation représentent jusqu'à 87% de l'exoprotéome. En phase exponentielle de croissance, 11-12% des peptides appartenant à des toxines sont oxydés pour les trois souches (**Figure 42**).

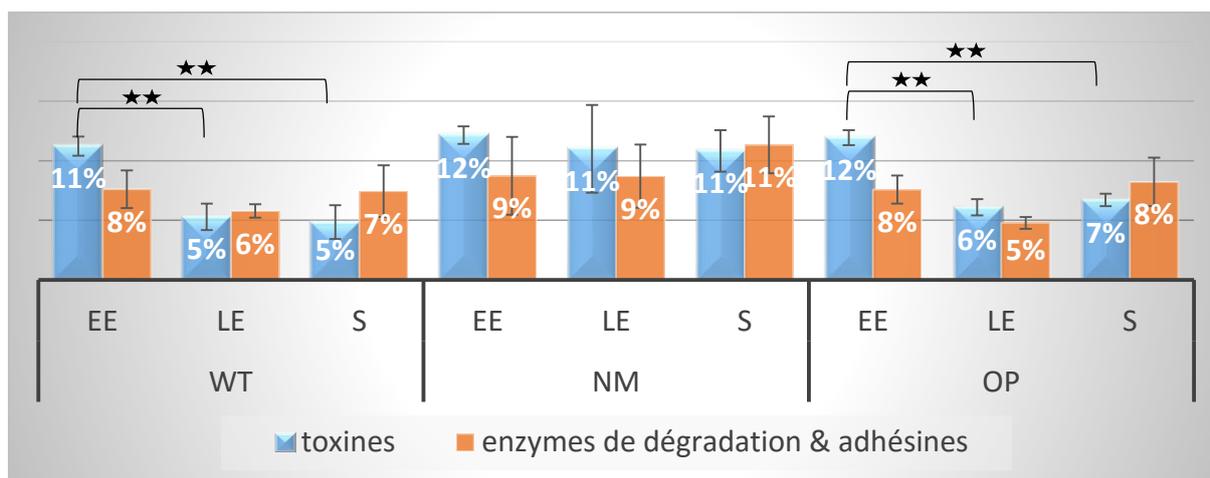


Figure 42: Dynamique de l'oxydation des résidus méthionines des peptides appartenant aux toxines et enzymes de dégradation dans l'exoprotéome des souches WT, NM et OP en aérobiose

★★ p -value du test de Student $< 0,01$

★ p -value du test de Student $< 0,05$

Ce taux reste stable pour la souche NM tout le long de la croissance. Pour les souches WT et OP, il diminue de moitié entre la phase exponentielle et de ralentissement. Pour les enzymes de dégradation et adhésines, il n'y a pas de différences significatives de l'oxydation de leurs peptides entre les trois souches sauf en phase de ralentissement. Il y a deux fois plus de peptides oxydés chez la souche NM par rapport à OP. Les résidus méthionines des facteurs de virulence et principalement des toxines sont des cibles privilégiées de MsrAB.

Des études d'abondances de l'oxydation d'un ou plusieurs résidus méthionines des peptides détectés et quantifiés en spectrométrie de masse ont été réalisées pour les comparaisons des souches NM vs. WT et OP vs. NM du protéome cellulaire et exoprotéome. Le **Tableau 10** regroupe les résultats pour le protéome cellulaire avec une p -value $< 0,05$.

Tableau 10: Tableau récapitulatif des peptides oxydés du protéome cellulaire significativement impactés par MsrAB en aérobiose

Phase de croissance	séquence	Position	Numéro			NM vs WT			OP vs NM		
			Numéro NP	gène	Identifiant	annotation fonctionnelle	logFC	t	P.Value	logFC	t
EE	HTAPHVTLMDEVDTVELVAHR	[9]	NP_833690.1BC3971	PdhC	dihydropolyl transacylase	-1.77	-2.51	1.97E-02	1.55	2.26	3.40E-02
	MTLEEILAK	[1]	NP_830215.1BC0376	AhpF	alkyl hydroperoxyde réductase AhpF	-1.83	-2.53	1.90E-02	1.64	2.27	3.36E-02
LE	GSVMNPVDHPHGGEGRSPIGR	[4]	NP_830014.1BC0134	RplB	protéine L2 de la sous-unité ribosomique 50S	1.51	2.35	2.92E-02	-1.81	-2.74	1.25E-02
	EIELEDAFENMGAK	[11]	NP_830146.1BC0295	GroEL	protéine GroEL	-1.36	-2.16	4.34E-02	1.62	2.64	1.55E-02
S	AGNKGYESAIAIEMAHLK	[15]	NP_833830.1BC4112	RibH	riboflavine synthase sous-unité bêta	2.88	6.85	1.05E-11	-1.86	-3.39	7.21E-04
	GVASLSLQMDIPVIFGVLTTETIEQAIER	[9]				2.75	10.23	8.13E-24	-1.92	-3.34	8.42E-04
	EGLLSMLLSVLQAPIR	[6]	NP_830000.1BC0119	RplJ	protéine L10 de la sous-unité ribosomique 50S	1.31	2.10	3.59E-02	-1.45	-2.24	2.54E-02
	VSAGDDNVSKDMLALVDELATMSSK	[22]	NP_830215.1BC0376	AhpF	alkyl hydroperoxyde réductase AhpF	1.14	4.22	2.57E-05	-1.04	-2.64	8.45E-03
	GIVKVGDDVVEIIGLAEENASTVTGVEMFR	[28]	NP_830009.1BC0129	Tuf	facteur d'élongation Tu	1.11	2.02	4.39E-02	-1.30	-2.39	1.69E-02
	VTYSYFNMSDEQLSK	[8]	NP_831760.1BC1991	TgC	endopeptidase TgC	-1.40	-2.49	1.29E-02	1.16	1.99	4.72E-02

La dihydropolyl transacétylase PdhC est moins oxydée chez la souche NM par rapport à la souche WT (1,77 lfc) et OP (1,55 lfc) en phase exponentielle de croissance. Cet enzyme fait partie du complexe pyruvate déshydrogénase faisant le lien entre la glycolyse et le cycle de

Krebs. En l'absence de MsrAB, le résidu méthionine en position 9 du peptide HTAPHVTLMDVDVTELVVAHR n'est pas oxydé. Au cours de cette phase de croissance, la vitesse de glycolyse et la sécrétion d'acétate sont plus élevées chez la souche NM. La régulation de l'activité de PdhC par l'oxydation d'un résidu méthionine spécifique pourrait expliquer les caractéristiques phénotypiques observées (Martin, *et al.*, 2005, Miernyk, *et al.*, 2009). En phase stationnaire, deux peptides appartenant à la protéine RibH sont plus oxydés chez la souche NM. La protéine RibH est une riboflavine synthase participant à la biosynthèse des riboflavines et par ce biais, à la biosynthèse des cofacteurs, notamment des coenzymes FMN et FAD (Abbas & Sibirny, 2011). RibH interagit avec RibE pour former un complexe (Ritsert, *et al.*, 1995). En phase stationnaire, la protéine RibE est plus abondante chez la souche NM (**Tableau 8**). MsrAB régule à la fois l'abondance des flavodoxines mais aussi probablement leurs activités par l'intermédiaire de l'oxydation de leurs résidus méthionines. Le **Tableau 11** regroupe les résultats pour l'exoprotéome avec une p -value < 0,05 et une valeur absolue de $lfc > 2$.

Tableau 11: Tableau récapitulatif des peptides oxydés de l'exoprotéome significativement impactés par MsrAB en aérobiose

Phase de croissance	séquence	Position	Numéro			NM vs WT			OP vs NM			
			Numéro NP	gène	Identifiant	annotation fonctionnelle	logFC	t	P.Value	logFC	t	P.Value
EE	GNKIDVLMPPDK	[8]	NP_830603.1	BC0813	EntC	EntC	2.32	7.32	5.55E-05	-1.59	-3.33	9.38E-03
	DIEYFDQSIDMLK	[11]	NP_834895.1	BC5232	YvgJ2	phosphoglycérol transférase	2.18	10.84	2.54E-06	-2.18	-10.84	2.54E-06
	LDHNLNNVTSQATNMAASAASQIEDADMAK	[15]	NP_831434.1	BC1657	FlaA	flagelline	-2.21	-6.61	1.18E-04	1.52	3.13	1.28E-02
	TQTEYLNTDITAITALQNISNQWYTMGSK	[27]	NP_831583.1	BC1810	NheB	entérottoxine Nhe composant B	-2.21	-3.98	3.46E-03	2.02	3.25	1.06E-02
	EGLLSMILLSVLQAPIR	[6]	NP_830000.1	BC0119	RplJ	protéine L10 de la sous-unité ribosomique 50S	-2.21	-5.60	3.86E-04	1.73	3.25	1.05E-02
	SMLLLTQNDLHTFANQIDVELDLLK	[2]					-2.21	-6.78	9.81E-05	1.48	3.10	1.34E-02
	SMLLLTQNDLHTFANQIDVELDLLKR	[2]	NP_832847.1	BC3104	HblI2	hémolysine BL composant L2	-2.49	-5.57	4.01E-04	1.87	2.89	1.88E-02
LIQTYIDQSLMSPNVQLLEVTALNTNQFLIK	[11]					-3.10	-8.17	2.40E-05	2.02	3.23	1.08E-02	
LE	ILNEAGISMLSQANQTPQMVS	[9], [19]	NP_831434.1	BC1657	FlaA	flagelline	2.92	6.14	4.82E-05	-1.98	-3.45	4.79E-03
	WNQPIPDNIPLAR	[2]	NP_833485.1	BC3761	PlcA	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase	2.39	5.24	2.01E-04	-1.72	-3.26	6.79E-03
	SMNAYSMLIK	[2], [8]	NP_832845.1	BC3102	HblB	protéine de liaison de l'hémolysine BL	2.39	5.59	1.15E-04	-1.14	-2.18	4.96E-02
	LIDLNQEMMR	[8], [9]	NP_831582.1	BC1809	NheA	entérottoxine Nhe composant A	2.21	5.22	2.08E-04	-1.33	-2.62	2.20E-02
	NIMDQLYGFENKIVDADEYVK	[3]	NP_831760.1	BC1991	TgC	endopeptidase TgC	-2.09	-4.84	3.97E-04	1.79	3.96	1.87E-03
	TQTEYLNTDITAITALQNISNQWYTMGSK	[27]	NP_831583.1	BC1810	NheB	non hémolytique entérottoxine composant L1	-2.27	-5.37	1.64E-04	1.53	3.20	7.49E-03
S	QLESDFNVMK	[10]	NP_832845.1	BC3102	HblB	hémolysine BL composant B	2.21	6.49	3.92E-05	-1.32	-2.48	2.99E-02
	QDMKEWSSELYPQLLNSK	[3]	NP_832847.1	BC3104	HblI2	hémolysine BL composant L2	2.09	5.99	7.96E-05	-1.32	-2.42	3.33E-02
	VLTAMGHDLTANPNMK	[15]	NP_834902.1	BC5239	EntA	entérottoxine putative EntA	-2.47	-5.61	1.42E-04	1.80	2.90	1.41E-02
	LGANAILGVSMVAHAHAADFVGLPLYR	[11]	NP_834803.1	BC5135	Eno	phosphopyruvate hydratase	-2.73	-6.58	3.43E-05	1.81	2.80	1.69E-02

Les peptides les plus impactés par MsrAB au niveau de l'oxydation de leurs résidus méthionines sont des facteurs de virulence. Parmi les toxines, MsrAB a un impact important sur l'oxydation des résidus méthionines des composants de Nhe et Hbl. Le rôle de l'oxydation de certains résidus méthionines spécifiques de ces toxines n'a pas encore été établi. Le niveau d'oxydation de résidus méthionines spécifiques de EntA et EntC est différent de ceux des toxines Hbl et Nhe au début et fin de la croissance de *B. cereus* en aérobiose. La régulation de l'oxydation de leurs résidus méthionines ne fait probablement pas intervenir les mêmes facteurs. Le rôle biologique de ces protéines reste encore à être établi.

CHAPITRE IV – Rôle de la méthionine sulfoxyde réductase *msrAB* de *B. cereus* en anaérobiose à haut POR

III.1 Problématique et objectifs

En anaérobiose et en absence d'accepteur final d'électrons tel que le nitrate, *B. cereus* met en place une fermentation de type acide mixte. Ce type de métabolisme n'est pas connu pour être une source de ROS. Cependant, des ROS peuvent être générés en anaérobiose à la suite d'un stress réducteur (Clair, *et al.*, 2012) ou d'un stress primaire non oxydant converti en un stress oxydant secondaire (Imlay, 2003). Pour certains stress primaires non oxydant, les bactéries du genre *Bacillus* disposent d'enzymes permettant leurs conversions en stress oxydant notamment les oxydases e.g. l'oxyde nitrique synthase (Mols & Abee, 2011). L'activité de cet enzyme a été décrite chez plusieurs bactéries appartenant au genre *Bacillus* (Adak, *et al.*, 2002, Gusarov, *et al.*, 2008). Elle catalyse l'oxydation de l'arginine en oxyde nitrique, une espèce réactive de l'azote. L'arginine présent dans le milieu MOD a une concentration de 0,46 g.L⁻¹. Parmi les modifications induites par l'oxyde nitrique, celui-ci peut entraîner une oxydation des thiols (les résidus cystéines et méthionines) et de la tyrosine (Gow, *et al.*, 2004). La génération de radicaux libres oxygénés ou azotés engendre une oxydation des macromolécules dont les protéines. Différentes études suggèrent une implication de leur oxydation dans les processus cellulaires de signalisation redox et de régulation de la fonction des protéines par une modification de leur structure et activité (Kaya, *et al.*, 2015). En plus de l'oxydation des méthionines par les radicaux libres, quelques études ont mis en évidence une activité méthionine oxydase des Msr (Lim, *et al.*, 2013). Chez *E. coli*, il a été démontré que la méthionine sulfoxyde réductase MsrA a une activité oxydase stéréospécifique en plus de son activité réductase sur les méthionines libres et incorporées (Lim, *et al.*, 2011). L'activité de MsrA chez *E. coli* est donc stéréospécifique et bidirectionnelle.

Lors de notre première étude, nous avons pu déterminer le taux de méthionines oxydées dans trois conditions de croissance, à savoir en aérobiose, anaérobiose à haut POR et anaérobiose à bas POR (Madeira, *et al.*, 2015). En anaérobiose, le premier résultat est la présence de résidus méthionines oxydées dans l'exoprotéome. Il y a donc une oxydation intracellulaire des résidus méthionines des protéines avant leur exportation. Cette oxydation peut être due à la génération de ROS au niveau intracellulaire ou la présence de méthionines oxydases. Les ACP réalisés à partir des données de spectrométrie de masse ont mis en évidence une dynamique équivalente des protéines liées aux stress en aérobiose et anaérobiose à bas POR dans l'exoprotéome. Ce résultat suggère une réponse au stress réducteur équivalente à celle engendrée par le métabolisme respiratoire en aérobie. En anaérobiose à haut POR (sous azote), la dynamique de l'exoprotéome est différente par rapport aux autres conditions et le niveau d'oxydation des résidus méthionines est élevé tout au long de la croissance. La quantification de l'expression de *msrAB* par RT-qPCR a révélé une expression importante de

msrAB en anaérobiose à haut POR en phase exponentielle et de ralentissement (**Figure 32**). Aucune étude n'a été réalisée sur le rôle de MsrAB en anaérobiose. Le rôle de MsrAB et de ses cibles à l'échelle du protéome reste encore indéterminé en anaérobiose.

Résultats

Dynamique de l'expression de *msrAB* chez *B. cereus* en anaérobiose

Le niveau d'expression relatif des gènes *msrAB* (BC5436) a été déterminé par RT-qPCR quantitative pour les trois prélèvements réalisés au cours de la croissance et pour les deux souches (**Figure 43**). Les ARN du gène *msrAB* n'ont pas été détectés chez la souche NM. Chez la souche WT, l'expression de *msrAB* est la plus élevée en phase exponentielle de croissance. Elle diminue significativement en phase de ralentissement puis augmente en phase stationnaire sans atteindre le niveau de départ.

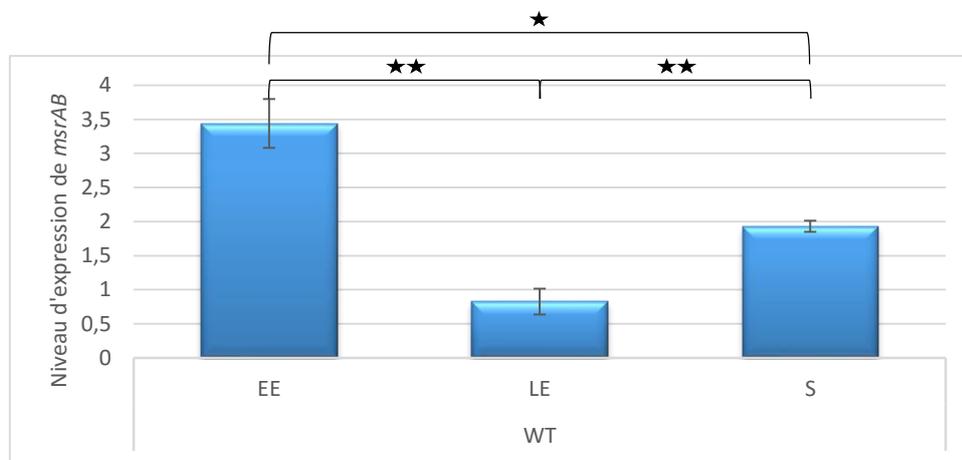


Figure 43: Comparaison du niveau d'expression du gène *msrAB* en phase exponentielle (EE), de ralentissement (LE) et stationnaire (S) de WT en anaérobiose

Implication de MsrAB sur la croissance et l'activité réductrice de *B. cereus* en anaérobiose

Les cultures cellulaires de la souche sauvage (WT) et du mutant $\Delta msrAB$ (NM) ont été réalisées en fermenteur dans du milieu MOD contenant 30 mM de glucose à une température de 37°C et un pH de 7,2 sous flux constant d'azote. La comparaison des courbes de croissance des deux souches a révélé une baisse significative du taux de croissance (μ_{max}), de NM comparativement à WT (**figure 44, Tableau 12**).

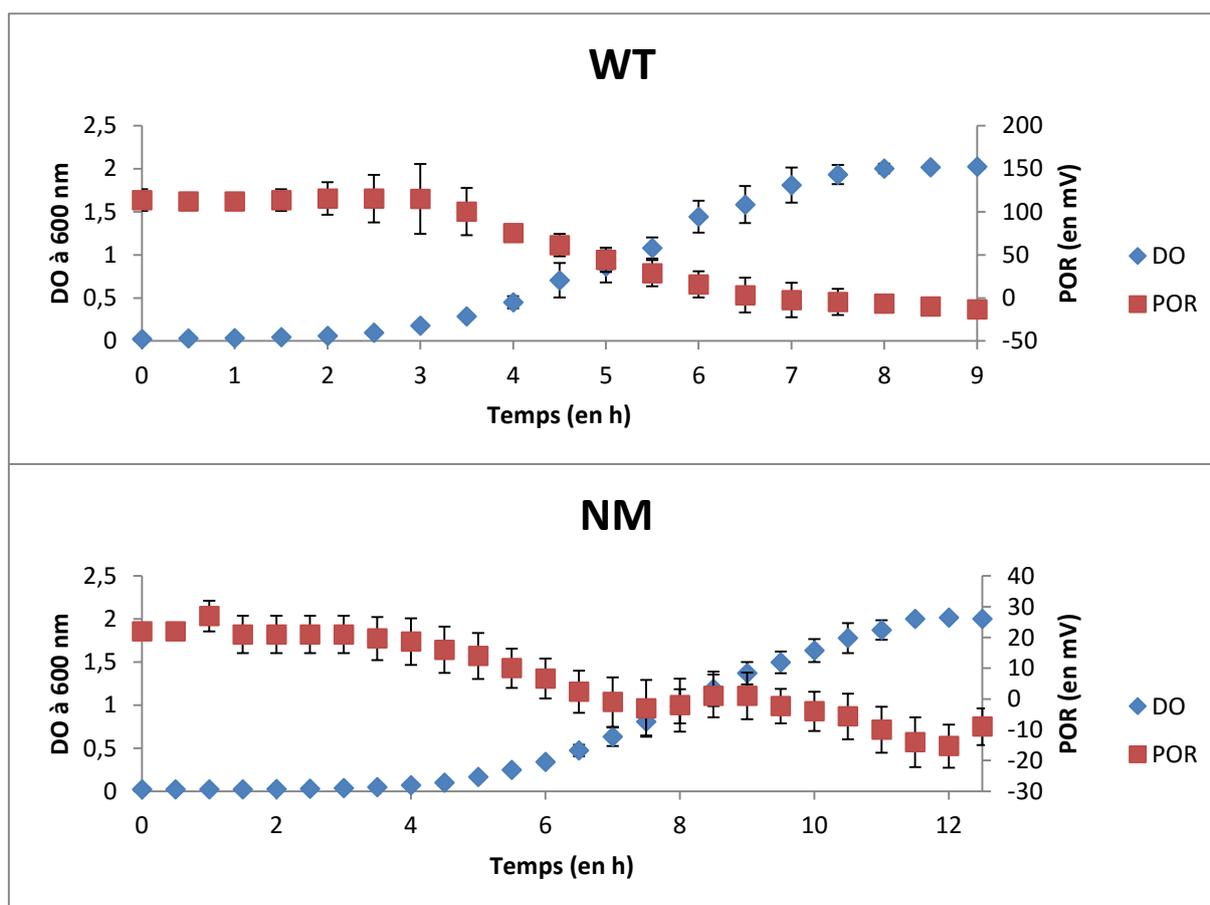


Figure 44: Courbe de croissance des souches WT et NM en anaérobiose à haut POR

Tableau 12: Caractéristiques de croissance des souches WT et NM en anaérobiose à haut POR

	$\Delta pBClin15$	$\Delta msrAB$
ΔPOR (mV)	125 ± 13	30 ± 11
l (h)	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.7
μ_{max} (h^{-1})	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1
DO final	2.02 ± 0.03	2.02 ± 0.03

La DO finale atteinte est identique entre les deux souches. A partir de la phase exponentielle de croissance, le POR diminue pour les deux souches. Il diminue continuellement pour la souche WT alors qu'il y a un arrêt temporaire de la chute du POR en phase de ralentissement pour la souche NM. Le ΔPOR est environ quatre fois plus élevé chez la souche WT. La différence de l'activité réductrice entre les deux souches de *B. cereus* peut être due à une implication de MsrAB dans l'activité réductrice des thiols exofaciaux membranaires (Michelon, *et al.*, 2010, Le Lay, *et al.*, 2015).

La vitesse de consommation du glucose est significativement plus élevée en phase de ralentissement chez la souche WT (**Figure 45**). La phase stationnaire est atteinte pour les deux souches une fois que tout le glucose est consommé. Le glucose constitue le facteur limitant de la croissance dans nos conditions d'études en anaérobiose alors que ce n'était pas le cas en aérobie (**Figure 37**).

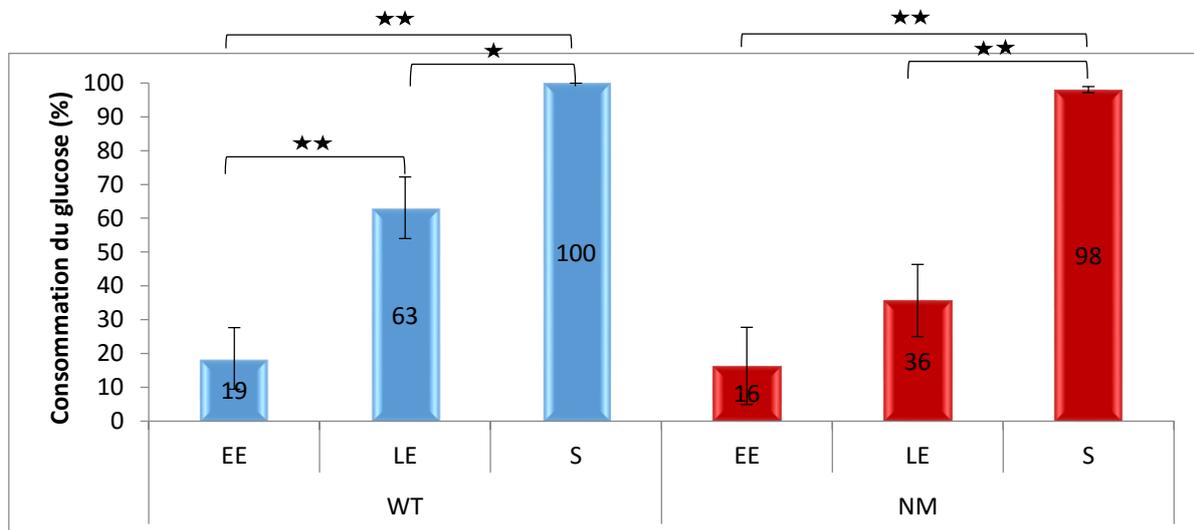


Figure 45: Consommation du glucose au cours de la croissance des souches WT et NM en anaérobiose

★★ p -value du test de Student $< 0,01$

★ p -value du test de Student $< 0,05$

Le dosage des métabolites sécrétés au cours de la croissance n'a pas révélé de différences significatives pour le formiate, l'acétate, le lactate et l'éthanol. La sécrétion du succinate est plus élevée chez la souche NM par rapport à OP tout au long de la croissance (**Figure 46**).

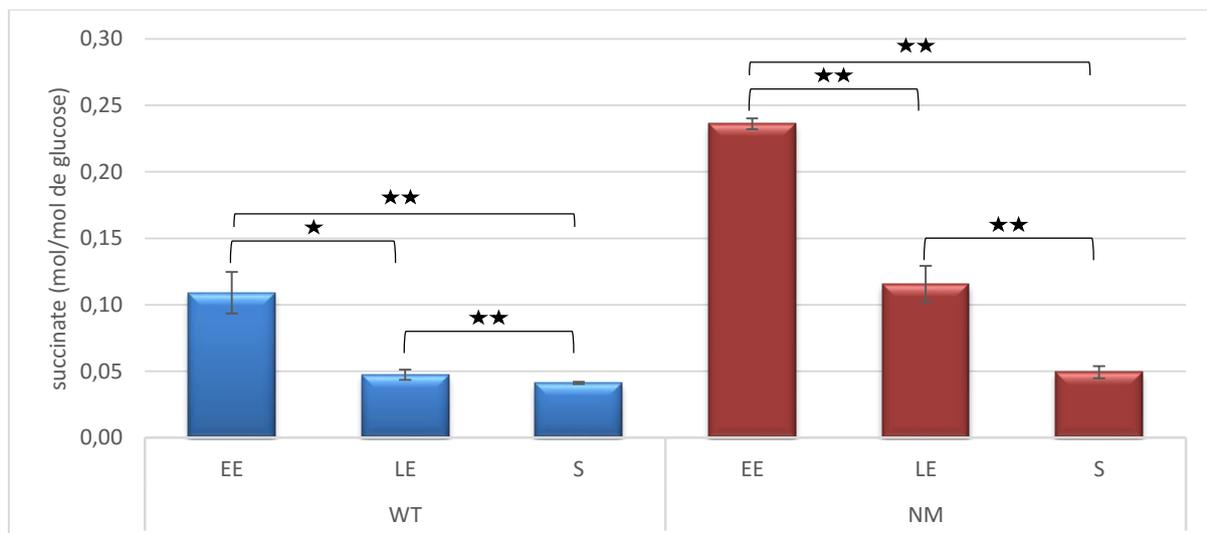


Figure 46: Stœchiométrie du succinate au cours de la croissance des souches WT et NM en anaérobiose

★★ p -value du test de Student $< 0,01$

★ p -value du test de Student $< 0,05$

Chez *S. cerevisiae*, la production du succinate est indispensable pour la réoxydation du cofacteur FADH₂ en anaérobiose (Camarasa, *et al.*, 2007). La forte production du succinate chez le mutant pourrait être due à une sollicitation plus importante du FAD pour la régénération des flavodoxines.

Implication de MsrAB dans la sécrétion des protéines extracellulaires en anaérobiose

La quantité de protéines extracellulaires a été déterminée à partir des surnageants filtrés. La **figure 47** montre que l'absence de MsrAB n'a pas d'impact sur la sécrétion des protéines extracellulaires contrairement à ce qui a pu être observé en aérobiose en phase de ralentissement (**Figure 39**). Le dosage de l'activité protéasique du surnageant n'a pas révélé de différences significatives entre les deux souches.

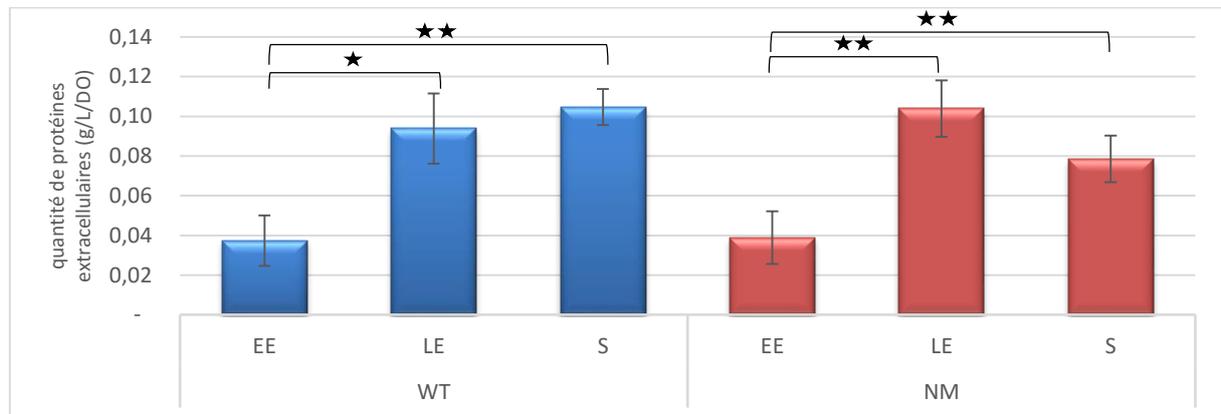


Figure 47: Comparaison de la quantité de protéines extracellulaires des souches WT et NM en anaérobiose

★★ p -value du test de Student < à 0,01

★ p -value du test de Student < à 0,05

Analyse du protéome cellulaire des souches WT et NM en anaérobiose

L'analyse en spectrométrie de masse des échantillons issus de l'extraction des protéines intracellulaires a permis d'obtenir 389815 spectres MS/MS attribués à 902 protéines différentes et validées par au moins deux peptides protéotypiques. La classification fonctionnelle des 902 protéines intracellulaires a mis en évidence un impact de MsrAB sur l'abondance des protéines chaperonnes et des transporteurs (**Figure 48**). En phase exponentielle, il y a une plus grande quantité relative de protéines chaperonnes chez la souche NM. L'abondance de ces protéines augmente au cours de la croissance pour les deux souches. L'abondance des transporteurs est plus élevée en phase stationnaire chez la souche WT par rapport à NM.

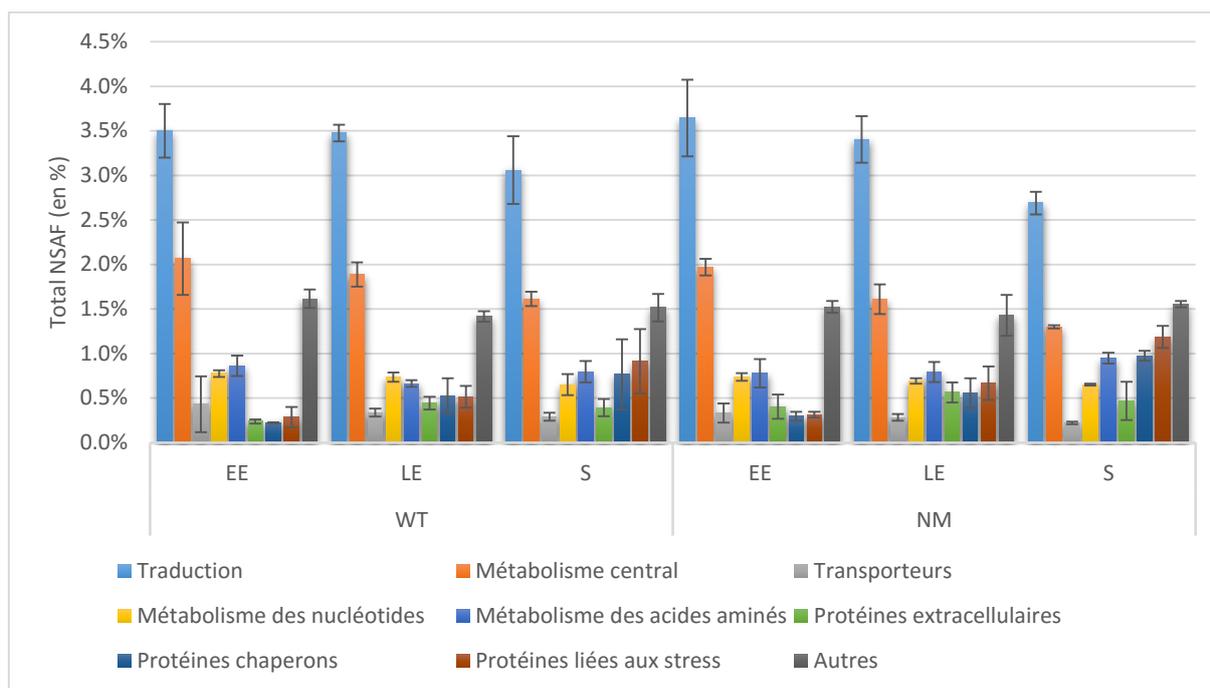


Figure 48: Abondance des familles fonctionnelles des protéines intracellulaires au cours de la croissance des souches WT et NM en anaérobiose

Les analyses d'abondances des protéines ont été réalisées à partir des nombres de spectres MS/MS pour chaque protéine à l'aide du logiciel R. Le **Tableau 13** regroupe toutes les protéines du protéome cellulaire ayant une valeur de *p*-value inférieure à 0,05 et de lfc supérieure à 2 en valeur absolue. Les protéines intracellulaires les plus impactées en phase exponentielle de croissance sont la protéine CapA (-2,52 lfc) impliquée dans la biosynthèse des polysaccharides de la paroi, le régulateur transcriptionnel membranaire LytR (-2,16 lfc) et l'octanoyltransférase LipM (-2,13) impliquée dans la biosynthèse d'acide lipoïque. L'absence de MsrAB chez la souche NM entraîne probablement une modification de la composition et propriété de la membrane plasmique et paroi. Le flux carboné est potentiellement modifié avec une différence d'abondance significative du L-lactate déshydrogénase Ldh2 (2,01 lfc) et de la fumarate hydratase FumC (-2,22 lfc). FumC catalyse la synthèse du (S)-malate à partir du fumarate. La sécrétion plus élevée du succinate chez la souche NM en phase exponentielle de croissance pourrait être liée à l'abondance différente de cet enzyme entre les deux souches. En phase de ralentissement, les 6 enzymes impliquées dans la biosynthèse du tryptophane, à savoir TrpA, TrpB, TrpC, TrpD, TrpE et TrpF sont plus abondantes chez la souche NM que chez la souche WT avec un lfc compris entre 1,00 pour TrpB et 2,85 pour TrpF. Des études suggèrent un rôle de système antioxydant des métabolites issus de la voie de biosynthèse du tryptophane notamment au niveau des membranes lors de la peroxydation lipidique (Perez-Gonzalez, *et al.*, 2014). Leurs plus fortes abondances chez la souche NM en phase de ralentissement suggèrent une implication de cette voie pour pallier l'absence de MsrAB. Un régulateur de réponse du système à deux composants YycF est également plus abondant chez la souche NM que WT en phase de ralentissement (2,1 lfc). Le système à deux composants YycF-YycG est un système à deux composants très répandu chez les bactéries Gram positive.

Chez *S. aureus*, le régulateur de ce système est impliqué dans la régulation de la composition et synthèse membranaire. La délétion de ce gène entraîne une hypersensibilité aux chaînes aliphatiques insaturés des acides gras (Martin, *et al.*, 1999, Winkler & Hoch, 2008). En phase stationnaire, les protéines impliquées dans la biosynthèse du NADPH comme la transaldolase Tal1 et le NAD kinase NadK2 sont plus abondantes chez la souche NM avec un lfc de 2,51 et 2,24 respectivement. La sécrétion est également impactée avec une plus faible abondance des protéines membranaires SecD/SecF (-2,10 lfc) impliquées dans le système Sec.

Tableau 13: Tableau récapitulatif des 10 protéines cellulaires de chaque phase de croissance les plus significativement impactées (p -value) par MsrAB en anaérobiose

Phase de croissance	numéro gène	numéro NP	ID	Annotation fonctionnelle	logFC	t	P.Value
EE	BC5351	NP_835012.1	NprB	bacillolysine	3.00	2.56	2.18E-02
	BC2932	NP_832680.1		phosphoglycérol transférase	2.79	2.83	1.26E-02
	BC1811	NP_831584.1	NheC	non hémolytique entérotoxine NheC	2.73	3.05	8.01E-03
	BC3603	NP_833335.1		ribonucléoside triphosphate réductase anaérobie	2.30	2.35	3.25E-02
	BC1161	NP_830947.1	PrsA2	foldase	2.11	2.98	9.38E-03
	BC5075/BC5078	NP_834743.1	RplK2/RplK3	protéine L11-2/L11-3 de la sous-unité 50S	2.03	3.08	7.66E-03
	BC4870	NP_834568.1	Ldh2	L-lactate déshydrogénase 2	2.01	2.14	4.88E-02
	BC4256	NP_833970.1	ArsR2	régulateur transcriptionnel	-2.05	-2.20	4.40E-02
	BC4209	NP_833923.1	LipM	octanoyltransférase LipM	-2.13	-4.01	1.13E-03
	BC5265	NP_834928.1	LytR	régulateur transcriptionnel LytR	-2.16	-3.40	3.91E-03
	BC1712	NP_831487.1	FumC	fumarate hydratase classe II	-2.22	-2.50	2.47E-02
	BC5278	NP_834941.1	CapA	protéine CapA (Capsular polysaccharide biosynthesis)	-2.52	-3.74	1.98E-03
	LE	BC1236	NP_831020.1	TrpF	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomérase	2.85	3.21
BC2303		NP_832066.1	DhbC	isochorismate synthase	2.62	2.15	4.86E-02
BC1154		NP_830940.1	HemH2	ferrochélatase 2	2.62	2.78	1.40E-02
BC2305		NP_832068.1	DhbB	isochorismatase	2.50	2.13	4.99E-02
BC1406		NP_831186.1	HisD	histidinol déshydrogénase	2.26	3.61	2.58E-03
BC5196		NP_834860.1	CwlD	N-acétylmuramoyl-L-alanine amidase	2.23	2.30	3.61E-02
BC2304		NP_832067.1		2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	2.18	2.40	3.00E-02
BC0666		NP_830479.1	InhA	inhibiteur immune A	2.16	2.40	2.99E-02
BC5463		NP_835122.1	YycF	régulateur de réponse du système à deux composants YycF	2.09	3.61	2.57E-03
BC0883		NP_830669.1		acétolactate synthase	-2.01	-2.29	3.66E-02
BC5432		NP_835093.1	CsbB	bactoprénol glucosyl transférase	-2.19	-2.79	1.36E-02
BC0558		NP_830375.1		flottiline	-2.21	-2.42	2.84E-02
BC0698		NP_830511.1	QoxA	quinol oxidase sous-unité 2	-2.33	-3.65	2.34E-03
BC0668		NP_830481.1	BdhA	(R,R)-butanediol déshydrogénase	-2.38	-2.71	1.62E-02
BC1252		NP_831036.1	OdhA	2-oxoglutarate déshydrogénase	-2.48	-3.09	7.46E-03
BC0697		NP_830510.1		cytochrome aa3 quinol oxydase polypeptide I	-2.50	-4.22	7.37E-04
S		BC0665	NP_830478.1	Tal1	transaldolase 1	2.51	3.41
	BC0880	NP_830666.1		protéine non caractérisée	2.39	3.50	3.20E-03
	BC4642	NP_834348.1	NadK2	NAD kinase 2	2.24	4.42	4.92E-04
	BC1396	NP_831177.1		aminotransférase	2.18	4.37	5.42E-04
	BC2259	NP_832022.1	SpoOM	protéine de contrôle de la sporulation	2.10	4.94	1.76E-04
	BC0451	NP_830290.1		protéine non caractérisée	2.08	2.42	2.86E-02
	BC1409	NP_831189.1	HisA	1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino)méthylidèneamino]imidazole-4-carboxamide isomérase	2.07	2.67	1.74E-02
	BC2229	NP_831994.1		azoréductase	2.06	3.55	2.93E-03
	BC4405	NP_834117.1	SecD/SecF	translocase bifonctionnelle sous-unité SecD/SecF	-2.10	-2.40	2.98E-02
	BC1289	NP_831071.1		spermidine	-2.12	-2.37	3.16E-02
	BC4517	NP_834226.1	SdhB	succinate déshydrogénase	-2.16	-2.87	1.17E-02
	BC1252	NP_831036.1	OdhA	2-oxoglutarate déshydrogénase	-2.34	-2.75	1.50E-02
	BC0446	NP_830285.1		protéine hypothétique de résistance au tellurium	-2.41	-2.96	9.76E-03
	BC0558	NP_830375.1		flottiline	-2.59	-2.63	1.87E-02
	BC4224	NP_833938.1	GcvPB	glycine déshydrogénase	-3.00	-3.34	4.48E-03
	BC3886	NP_833606.1	CarB	grande sous-unité de carbamoyl-phosphate synthase	-3.06	-3.16	6.40E-03

Analyse de l'exoprotéome des souches WT et NM en anaérobiose

L'analyse en spectrométrie de masse des échantillons issus de l'extraction des protéines extracellulaires a permis d'obtenir 83852 spectres MS/MS attribués à 215 protéines validées par au moins deux peptides protéotypiques. La classification fonctionnelle des 215 protéines identifiées dans l'exoprotéome a mis en évidence une différence significative de l'abondance des protéines liées à la membrane et des transporteurs en phase stationnaire (**Figure 49**). Il y a plus de protéines membranaires et de transporteurs chez la souche NM en phase stationnaire que chez la souche WT: 10,8 et 3,0% vs 8,2 et 1,8% respectivement.

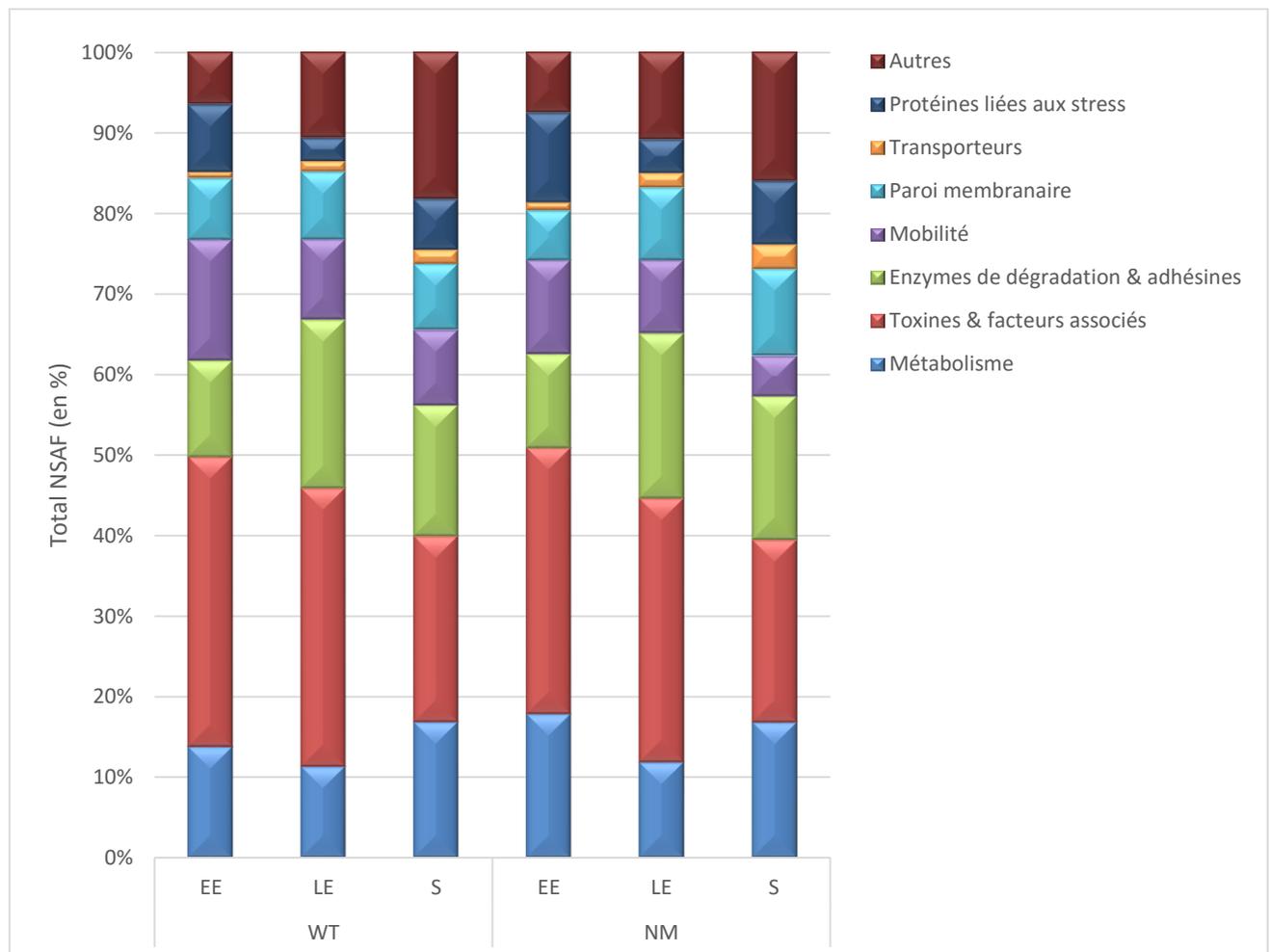


Figure 49: Abondance des familles fonctionnelles des protéines extracellulaires au cours de la croissance des souches WT et NM en anaérobiose

La **Table 14** regroupe les protéines extracellulaires ayant une *p*-value inférieure à 0,05. En phase exponentielle de croissance, il y a moins de phosphoglycérol transférases YvgJ1 et YvgJ2 chez le mutant avec des lfc respectivement de -4,77 et -2,34. Ces protéines participent à la synthèse des acides lipotéichoïques membranaires, un composant majeur de la paroi et membrane des bactéries Gram positives (Percy & Grundling, 2014). Les acides téchoïques contribuent à la charge négative de la paroi. En retenant les protons extrudés à la surface membranaire, ils forment un gradient de pH et une zone tampon entre la cellule et

l'environnement. Ces différences significatives d'abondances suggèrent une modification de la composition et des propriétés de la paroi chez le mutant. Il y a également moins de D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (-2,33 lfc), une protéine participant à la D-alanylation des acides lipotéichoïques. La D-alanylation des acides lipotéichoïques permet aux bactéries à Gram positif de moduler leur charge de surface, de réguler la fixation de ligands et de contrôler les propriétés électromécaniques de leur paroi (Percy & Grundling, 2014). En phase de ralentissement et stationnaire, il y a moins de CytK chez la souche NM avec un lfc de -2,23 et -1,91 respectivement. MsrAB est donc impliqué dans la pathogénicité de *B. cereus* en aérobiose mais également en anaérobiose. En phase stationnaire, il y a une abondance plus élevée de PgdA (1,65 lfc) chez la souche NM. Cette protéine est impliquée dans les mécanismes de résistance à la digestion par les lysozymes (Psylinakis, *et al.*, 2005, Balomenou, *et al.*, 2013). La surexpression de PdgA et du facteur de virulence ESAT-6 (Early Secreted Antigen 6 kDa) avec un lfc de 2,40 en phase stationnaire peut être due à un phénomène de compensation issue de la modification de la paroi et membrane des cellules de *B. cereus* ne possédant plus le gène *msrAB*.

Tableau 14: Tableau récapitulatif des exoprotéines les plus significativement impactées à chaque phase de croissance par MsrAB en anaérobiose

Phase de croissance	numéro gène	numéro NP	ID	Annotation fonctionnelle	logFC	t	P.Value
EE	BC5232	NP_834895.1	YvgJ2	phosphoglycérol transférase	-4.77	-8.21	2.93E-08
	BC0687	NP_830500.1		protéine hypothétique	-2.60	-3.04	5.92E-03
	BC1658	NP_831435.1	FlaB	flagelline	-1.87	-3.03	6.03E-03
	BC1649	1603188-1604316		protéine hypothétique	-2.33	-3.02	6.07E-03
	BC2932	NP_832680.1	YvgJ1	phosphoglycérol transférase	-2.34	-2.78	1.08E-02
	BC4514	NP_834223.1	VanY4	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	-2.33	-2.47	2.16E-02
	BC0200	NP_830068.1		protéine hypothétique	-2.08	-2.34	2.85E-02
	BC0383	NP_830222.1		ferrichrome	1.81	2.13	4.41E-02
LE	BC3251	NP_832991.1		protéine hypothétique	-2.38	-2.88	8.52E-03
	BC4547	NP_834254.1	LsdA	protéine de surface	2.70	2.62	1.52E-02
	BC1110	NP_830896.1	CytK	cytotoxine K	-2.23	-2.61	1.59E-02
	BC4548	NP_834255.1	LsdA1	protéine de surface	2.34	2.28	3.22E-02
	BC0687	NP_830500.1		protéine hypothétique	-1.72	-2.15	4.26E-02
S	BC1687	NP_831462.1		protéine hypothétique	3.05	4.36	2.34E-04
	BC1510	NP_831289.1	Hup	protéine de fixation à l'ADN HU	-2.52	-3.02	6.21E-03
	BC1110	NP_830896.1	CytK	cytotoxine K	-1.91	-2.62	1.54E-02
	BC3699	NP_833427.1	BC3699	antigène	-3.09	-2.41	2.43E-02
	BC2929	NP_832677.1	pgdA	peptidoglycane N-acétylglucosamine déacétylase	1.65	2.31	3.01E-02
	BC1638	NP_831416.1	FliD	crochet flagellaire	-2.31	-2.23	3.60E-02
	BC2077	NP_831845.1	ESAT-6	facteur de virulence	2.40	2.09	4.81E-02

Implication de *msrAB* dans la dynamique des résidus méthionines oxydées en anaérobiose

L'abondance des résidus méthionines oxydées dans l'exoprotéome et le protéome cellulaire a été estimée en rapportant le nombre de Met(O) au nombre total de résidus méthionines pour chaque réplicats biologiques et chaque phase de croissance pour les deux souches (**Figure 50**). Le pourcentage de résidus méthionines oxydés dans le protéome cellulaire et l'exoprotéome ne varie pas significativement au cours de la croissance pour les deux souches.

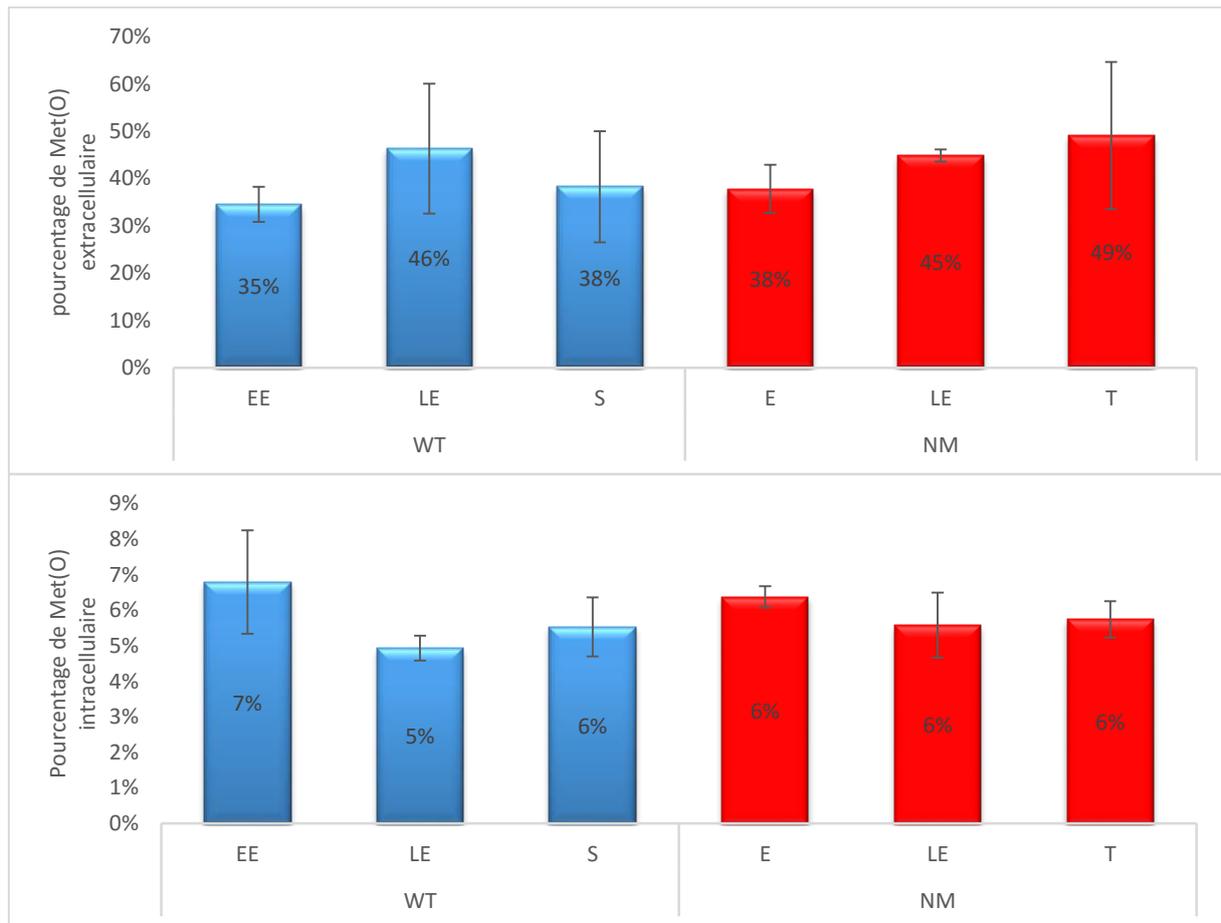


Figure 50: Dynamique des résidus méthionines oxydés dans l'exoprotéome et le protéome cellulaire des souches WT et NM en anaérobiose

D'après ces résultats, l'absence de MsrAB n'impacte pas de manière significative le niveau d'oxydation aussi bien des protéines intracellulaires qu'extracellulaires à l'échelle du protéome.

La classification fonctionnelle des peptides contenant des résidus méthionines oxydés du protéome cellulaire et de l'exoprotéome a mise en évidence au niveau du protéome cellulaire une différence d'oxydation des peptides de protéines impliquées dans le métabolisme central et liés aux stress (**Figure 51**).

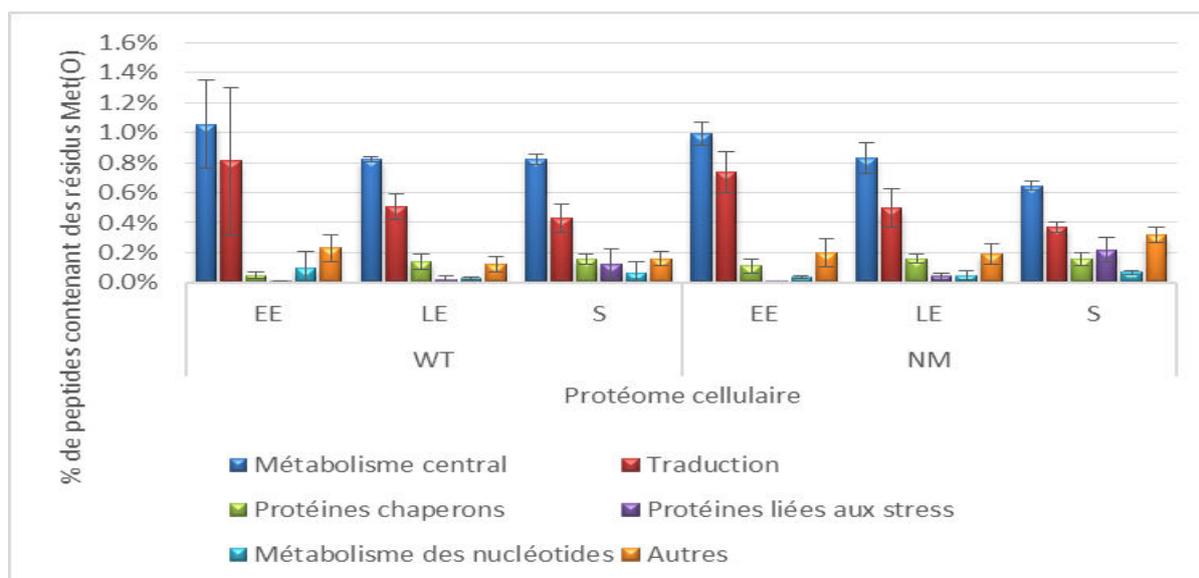


Figure 51: Dynamique de l'oxydation des résidus méthionines des peptides du protéome cellulaire classés dans 5 familles fonctionnelles des souches WT et NM en anaérobiose

La famille fonctionnelle de protéines la plus impactée par l'oxydation de leurs résidus méthionines est le métabolisme central chez les deux souches. En phase stationnaire, il y a significativement plus de peptides oxydés chez la souche sauvage (0,8%) que chez le mutant (0,6%). Cette différence est due à une oxydation du résidu méthionine en position 16 du peptide VNQIGTLTETFEAIEMAK de l'énolase qui n'est jamais oxydé chez le mutant (**Tableau 15**).

Tableau 15: Tableau récapitulatif des peptides oxydés les plus impactés du protéome cellulaire des souches WT et NM en anaérobiose

Phase de croissance	séquence	Position	Numéro NP	Numéro gène	Identifiant	annotation fonctionnelle	logFC	t	P.Value	adj.P.Val	B
EE	TLQTPVIGGNVSMYNER	[13]	NP_830168.1	BC0329	PurL	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase sous-unité PurL	-1.51	-5.80	4.82E-05	4.39E-03	2.24
	SALQNAASVAAMFLTTEAVVADKPEP NAPAMPDMGGMGMMGGMM	[37]	NP_830146.1	BC0295	GroEL	protéine GroEL	2.19	12.81	1.01E-03	3.96E-02	-0.88
	GLEMEGDSFVLPTVHEALAPLVAVIPL QLISYYAALHR	[4]	NP_830058.1	BC0190	GlmS	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransférase	-1.26	10.77	1.30E-03	3.96E-02	-1.11
LE	TMATGIAGLSVVADSLSAIK	[2]	NP_830328.1	BC0491	_	Formate acétyltransférase	-1.55	-4.80	2.94E-04	2.68E-02	0.51
S	SLGVTSESDMK	[10]	NP_831020.1	BC1236	TrpF	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomérase	3.15	8.28	1.01E-06	9.21E-05	5.99
	VNQIGTLTETFEAIEMAK	[16]	NP_834803.1	BC5135	Eno	Enolase	-3.50	-5.80	4.8E-05	2.19E-03	2.06
	TTDVTGIIQLPEGTEMVMPGDNIEMT IELIPIAIEEGTK	[18]	NP_830009.1	BC0129	Tuf	facteur d'élongation Tu	-2.18	-3.98	1.40E-03	0.042618	-1.20

Ce peptide est localisé en position C-terminale et ne se situe pas sur un domaine d'interaction protéine-protéine. Il n'y a pas de différence significative d'exportation de l'énolase en phase stationnaire entre le mutant et la souche sauvage. Le rôle de l'oxydation de ce résidu méthionine reste à être déterminé. En phase exponentielle de croissance, il y a plus de peptides oxydés appartenant à des protéines liées aux stress chez le mutant (0,11%) que chez la souche sauvage (0,05%) alors qu'il n'y a pas de différence significative d'abondance de ces protéines. La protéine la plus oxydée est la protéine GroEL avec un lfc de 2,2 pour un peptide. L'absence de MsrAB engendre donc une oxydation plus importante de GroEL en début de croissance.

Au niveau de l'exoprotéome, les familles fonctionnelles de protéines les plus impactées par l'oxydation des résidus méthionines sont les toxines, les enzymes de dégradation et les protéines liées à la mobilité et chimiotaxie (Figure 52).

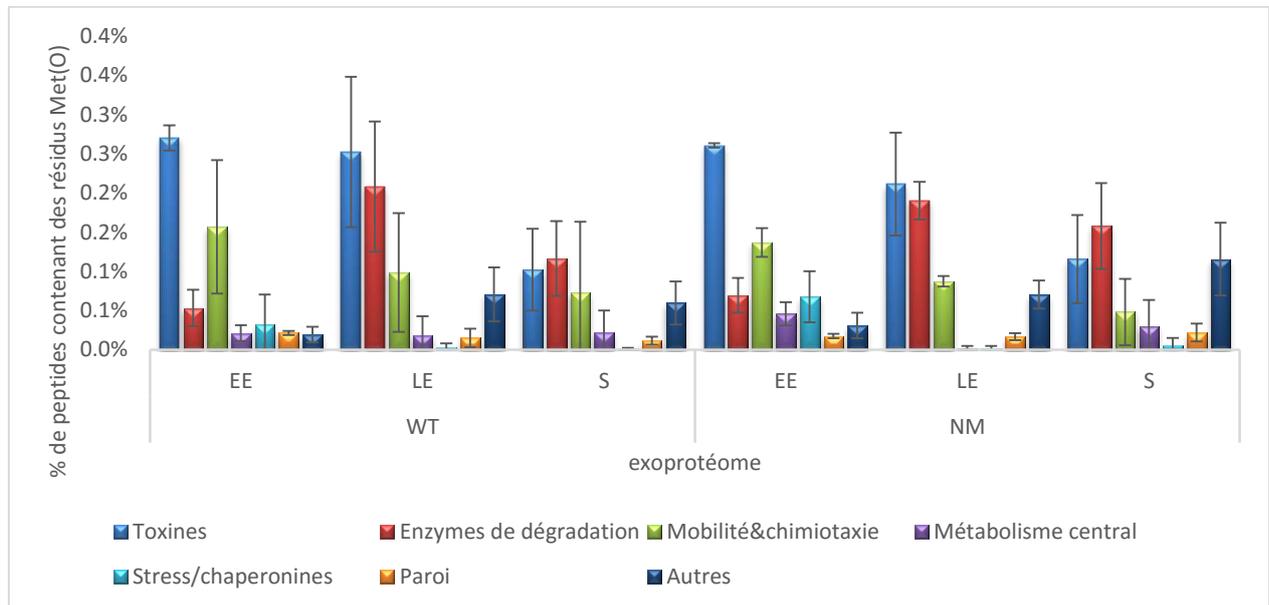


Figure 52: Dynamique de l'oxydation des résidus méthionines des peptides de l'exoprotéome classés dans 6 familles fonctionnelles des souches WT et NM en anaérobiose

En phase exponentielle de croissance, il y a deux fois plus de peptides oxydés appartenant à des protéines impliquées dans le métabolisme central chez le mutant (0,46%) que chez la souche sauvage (0,21%). Les protéines principalement impliquées sont l'énolase (Eno), le phosphoglucose isomérase (Pgi), le phosphofruktokinase (Pfk), le phosphoglycérate kinase (Pkg) et le glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Toutes ces protéines évoluent au niveau de la glycolyse. Il y a également une différence significative de l'oxydation des peptides de la protéine flagellaire FlaB en phase exponentielle de croissance (Tableau 16). Les peptides sont moins oxydés chez la souche NM avec un lfc compris entre -2,1 et -2,8. En phase stationnaire, les peptides d'EntA sont moins oxydés chez la souche NM. Les enzymes SipA, TgC et InhA sont en revanche plus oxydés avec un lfc respectivement de 1,9, 1,7 et 1,5. En anaérobiose, le rôle de MsrAB sur la dynamique de l'oxydation des résidus méthionines de l'exoprotéome est moins importante comparé en aérobie.

Tableau 16: Tableau récapitulatif des peptides oxydés les plus impactés de l'exoprotéome des souches WT et NM en anaérobiose

Phase de croissance	Séquence	Position	Numéro NP	Numéro gène	Identifiant	Annotation fonctionnelle	logFC	t	P.Value	adj.P.Val	B
EE	INTNINSMR	[8]					-2.74	-5.12	5.08E-05	6.86E-03	2.07
	ILNEAGISMLSQANQTPQMVS	[9]	NP_831435.1	BC1658	FlaB	flagelline	-2.09	-4.35	3.04E-04	1.43E-02	0.43
	NTQDAMSALR	[6]					-2.78	-4.33	3.18E-04	1.43E-02	0.34
S	MFGFISEDEIVGK	[1]	NP_832816.1	BC3070	SipA	peptidase signal I	1.91	5.08	5.69E-05	7.68E-03	1.97
	SIVGSIVKPGMDEHEKVK	[11]	NP_831760.1	BC1991	TgC	endopeptidase TgC	1.72	4.33	3.20E-04	2.16E-02	0.34
	VLTAMGHDLTANPNMK	[15]	NP_834902.1	BC5239	EntA	entérotoxine putative	-2.26	-4.11	5.40E-04	2.43E-02	-0.19
	MIAVDPK	[1]					-1.64	-3.70	1.42E-03	4.29E-02	-1.05
	GDDMHTTLETFFDLTK	[4]	NP_830479.1	BC0666	InhA	inhibiteur immune A	1.51	3.65	1.59E-03	4.29E-02	-1.17

Conclusions et perspectives

Le protéome de *B. cereus*

Le séquençage du génome de *B. cereus* souche ATCC 14579 en 2003 a permis d'identifier 5473 gènes chromosomiques et 21 gènes plasmidiques (Ivanova, *et al.*, 2003). Parmi ces 5494 gènes, 5240 gènes codent pour des protéines. L'ensemble de ces protéines forment le protéome de *B. cereus*. Le protéome est modulé tout au long de la croissance, faisant de celui-ci une entité dynamique et complexe. Tout l'intérêt de l'étude du protéome repose sur le fait qu'il correspond aux produits finaux de l'expression des gènes à un instant donné. L'intérêt porté à l'étude du protéome des organismes vivants a connu un essor dans les années 90 avec l'avènement des spectromètres de masse. Les travaux de John B. Fenn, colauréat avec Kōichi Tanaka du prix Nobel de chimie en 2002 ont permis l'emploi de la spectrométrie de masse sur ces macromolécules, ce qui auparavant était impossible. Le développement de la protéomique reliée à la génomique a facilité l'identification et la caractérisation du protéome des micro-organismes (Armengaud, 2013). Aujourd'hui, il est possible de déterminer la structure primaire des protéines et l'abondance relative de chacune d'entre-elles au niveau du protéome cellulaire, exoprotéome et protéome membranaire. Pour explorer en profondeur le protéome de *B. cereus*, nous avons choisi une stratégie *shotgun* pour l'analyse des échantillons de protéines issus du surnageant de culture et de l'extraction des protéines intracellulaires.

Les études menées au cours de cette thèse correspondent aux études les plus exhaustives du protéome de *B. cereus* souche ATCC 14579. Dans les surnageants des cultures, 479 protéines validées ont été observées dont 98 disposent d'un peptide signal. La stratégie mise en place lors de l'analyse de l'exoprotéome de *B. cereus* dans différentes conditions et tout au long de la croissance ainsi que l'appareillage sont probablement à l'origine de l'exhaustivité de ces études. D'après la collection de séquences protéiques et annotations UniProt (UniProt, 2015), 320 protéines disposent d'un peptide signal. Malgré le fait que le nombre de protéines observées dans l'exoprotéome est 2,6 fois supérieur à celui obtenu lors des travaux antérieurs avec 181 protéines différentes secrétées dont 72 possédant un peptide signal (Clair, *et al.*, 2010, Clair, *et al.*, 2012, Clair, *et al.*, 2013), le nombre de protéines disposant d'un peptide signal n'a pas considérablement augmenté. Les 222 protéines non observées sont probablement sous-représentées dans l'exoprotéome ou exprimées puis secrétées dans des conditions particulières non rencontrées lors de nos études. A l'heure actuelle, le système Sec est le seul système de sécrétion des facteurs de virulence connu chez les bactéries Gram positives (Fagerlund, *et al.*, 2010, Schneewind & Missiakas, 2012). Parmi les 381 protéines ne disposant pas de peptides signaux, des protéines impliquées dans la pathogénicité ou associées à la virulence sont détectées en spectrométrie de masse avec une abondance élevée. C'est le cas de la protéase HhoA (NP_833332.1) et du facteur de virulence ESAT-6 ou EsxA (NP_831845.1). Leur abondance relative dans l'exoprotéome suggère l'implication d'un système de sécrétion indépendant du système Sec.

La présence de protéines d'origine cytoplasmique dans le milieu extracellulaire dès le début de la croissance n'est pas dû à de la lyse cellulaire. D'autres études ont également rapporté la présence de protéines intracellulaires dans le milieu (Gohar, *et al.*, 2005, Clair, *et al.*, 2010, Laouami, *et al.*, 2014, Omer, *et al.*, 2015). Les analyses en composantes principales de l'exoprotéome de *B. cereus* ont révélé des différences au niveau de l'abondance des protéines liées au métabolisme central et du stress en phase exponentielle de croissance en fonction des conditions de culture (Madeira, *et al.*, 2015). Les protéines intracellulaires peuvent également avoir un rôle au niveau extracellulaire et participer à la virulence des agents pathogènes (Henderson & Martin, 2011, Henderson & Martin, 2013). En phase stationnaire, certaines protéines cytoplasmiques comme GroEL, DnaK et l'é nolase sont sécrétées grâce à un système de sécrétion des protéines non classiques. Par exemple, l'é nolase possède un domaine hélice alpha hydrophobe contribuant à sa sécrétion (Yang, *et al.*, 2011). Hormis ces cas de figures, la présence dans l'exoprotéome des protéines cytoplasmiques ne possédant pas de peptides signaux peut être due à la formation de vésicules membranaires extracellulaires (Yanez-Mo, *et al.*, 2015). Ces nano-vésicules ont été observés chez *B. anthracis* (Rivera, *et al.*, 2010) et *S. aureus* (Lee, *et al.*, 2013).

1159 protéines ont été identifiées et validées dans le protéome cellulaire de *B. cereus* lors des travaux de thèse soit environ un quart du protéome théorique de *B. cereus*. Les conditions de culture dans un milieu minimum à pH optimal et température de 37°C en fermenteur ne sont pas représentatives de l'ensemble des conditions pouvant être rencontrées par la bactérie dans son milieu naturel, les lignes de production agroalimentaire et chez ses hôtes. De plus, nous n'avons pas réalisé l'analyse du protéome membranaire. Il est donc possible que l'ensemble de ses gènes n'ont pas été exprimés lors de nos cultures bactériennes. Un grand nombre de protéines détectées en spectrométrie de masse n'ont pas pu être validées de par leur faible abondance et l'absence d'au moins deux peptides protéotypiques différents. Le développement de nouveaux appareillages en spectrométrie de masse et la mise au point de nouvelles stratégies d'analyse des échantillons comme la stratégie « top-down » devraient permettre dans un futur proche d'aller encore plus loin dans l'exploration du protéome de *B. cereus* et aussi l'étude du protéome membranaire (Gregorich & Ge, 2014).

Le rôle du plasmide pBclin15

Les résultats obtenus pour les souches construites en laboratoire ont révélé la perte du plasmide pBclin15. Ces résultats ont conduit à mener une étude sur le rôle du plasmide pBclin15 chez *B. cereus* en aérobiose à partir des données protéomiques et des caractéristiques phénotypiques. La conclusion de cette étude est que le plasmide confère un avantage compétitif à son hôte en réprimant l'expression et la sécrétion de protéines phagiques. Le plasmide pBclin15 est proche du plasmide PGIL01 de *B. thuringiensis*, un plasmide/prophage appartenant à la famille des *Tectiviridae*. Une étude a révélé que la souche curée du plasmide ne pouvait être infectée à partir des particules virales présentes dans le surnageant (Verheust, *et al.*, 2005). Les protéines phagiques présentes dans l'exoprotéome de la souche curée sont donc des phages cryptiques incapables de s'encapsuler et induire la lyse cellulaire de l'hôte. Le détournement du métabolisme de l'hôte vers les voies de synthèse

des protéines phagiques se fait au détriment des protéines impliquées dans la détoxification et réponses aux stress. La perte du plasmide chez la souche NM est donc probablement due aux manipulations réalisées lors de sa construction ou à l'incompatibilité mutation – plasmide.

Le rôle antioxydant des résidus méthionines

Parmi les résidus protéiques, la méthionine est l'acide aminé le plus susceptible d'être oxydé par les ROS (Davies, 2004). La méthionine avec la cystéine sont les deux seuls acides aminés dont l'oxydation est réversible grâce à l'action de réductases. Au niveau de l'exoprotéome, les toxines et toxines putatives possèdent dix fois plus de résidus méthionines que de résidus cystéines. Sur les 14 toxines, 9 toxines ne possèdent pas de résidus cystéines. L'absence de résidus cystéines semble indiquer que ces 9 toxines doivent impérativement maintenir leur fonction même dans un milieu oxydant. Les résidus méthionines peuvent constituer un système antioxydant de par leur plus forte abondance relative au niveau des facteurs de virulence, représentant un tiers de l'exoprotéome et leur plus grande susceptibilité face aux ROS générés au cours de la croissance. Plusieurs études ont suggéré un rôle des résidus méthionines dans l'élimination des ROS (Levine, *et al.*, 1996, Levine, *et al.*, 1999, Luo & Levine, 2009, Kim, *et al.*, 2014). Les résultats obtenus lors de la comparaison de l'exoprotéome de *B. cereus* selon les trois conditions de POR ont révélé une interconnexion entre la dynamique des toxines et celle des résidus méthionines oxydés dans l'exoprotéome. Il est donc possible que les résidus méthionines des toxines soient oxydés par des ROS endogènes avant leur sécrétion dans le milieu extracellulaire. La forte abondance des toxines dès le début de la croissance et le pourcentage élevé d'oxydations de leurs résidus méthionines observées peuvent contribuer à la protection des cellules de *B. cereus* contre le stress oxydant en maintenant bas le taux de protéines intracellulaires oxydées. En phase stationnaire, le niveau d'oxydation des résidus Met est moins élevé qu'en phase exponentielle de croissance. Les conséquences de l'oxydation des résidus méthionines peuvent varier depuis des changements structurels conduisant à une modification de l'activité protéique jusqu'à l'inactivation totale et dégradation par des protéases (Levine, *et al.*, 2000). Ce résultat soulève des questions sur le rôle de l'oxydation des résidus méthionines des toxines dans la virulence de *B. cereus* et particulièrement sur sa cytotoxicité. Il est possible qu'en plus d'un rôle antioxydant, l'oxydation des résidus méthionines des toxines permet également de contrôler la pathogénicité de la bactérie déclenchée en entrée de phase stationnaire.

En anaérobiose, il y a également des résidus méthionines oxydés. Le métabolisme fermentaire n'est pas connu pour être générateur de ROS. L'une des possibilités expliquant l'origine de l'oxydation des résidus méthionines est la conversion d'un stress primaire non oxydant en un stress secondaire oxydant (Mols & Abee, 2011). Ce stress primaire peut résulter dans nos études d'un stress réducteur comme c'est le cas en anaérobiose à bas POR (Clair, *et al.*, 2010) et/ou d'un stress nutritionnel en entrée de la phase stationnaire. En anaérobiose à haut POR sous flux d'azote, le niveau d'oxydation des résidus méthionines est élevé dès le début de la croissance et reste constant contrairement en anaérobiose à bas POR où il diminue. Des espèces réactives de l'azote peuvent être produites tel que l'oxyde nitrique (NO) par l'intermédiaire des NOS (NO synthase). L'activité de cet enzyme a été décrite chez plusieurs

bactéries dont *B. anthracis* et *B. subtilis* (Adak, et al., 2002, Gusarov, et al., 2008). Elle catalyse l'oxydation de l'arginine en oxyde nitrique. L'arginine est présent dans le milieu MOD à une concentration de 0,46 g.L⁻¹. Parmi les modifications induites par l'oxyde nitrique, celui-ci peut entraîner une oxydation des thiols (les résidus cystéines et méthionines) et de la tyrosine (Gow, et al., 2004). Il existe chez *B. cereus* une protéine impliquée dans la détoxification de l'oxyde nitrique. Il s'agit d'une flavohémoprotéine codée par le gène *hmp* (BC1448) qui utilise l'oxygène moléculaire et le cofacteur NADPH pour convertir l'oxyde nitrique en nitrate. En l'absence d'un tel système en anaérobiose, l'oxydation des résidus méthionines des protéines extracellulaires peut être due à la génération au niveau intracellulaire d'oxyde nitrique.

Le rôle de MsrAB dans l'homéostasie redox

Les méthionines sulfoxydes réductases sont des enzymes ubiquitaires stéréospécifiques catalysant la réduction des méthionines sulfoxydes en méthionine. Deux méthionines sulfoxydes réductases ont été annotées chez *B. cereus*: MsrAB (NP_835097.1) et MsrA (NP_831549.1). MsrA catalyse la réduction de méthionine (S)-sulfoxyde libre ou incorporée en méthionine et la sous-unité MsrB est spécifique à la méthionine (R)-sulfoxyde liée à une protéine (Boschi-Muller & Branlant, 2014). Pour confirmer le rôle d'antioxydants des résidus méthionines, nous avons entrepris de construire des mutants *msrAB*, *msrA* et le double mutant n'exprimant plus de Msr. Le mutant *msrA* n'a pas pu être obtenu au cours de la thèse. L'analyse des transcrits de MsrA chez le mutant *msrAB* et la souche sauvage a révélé qu'il y avait une augmentation de l'expression de *msrA* chez le mutant en aérobiose. L'hypothèse pouvant expliquer ce résultat est une complémentation de l'activité de la sous-unité MsrA de MsrAB par la deuxième méthionine sulfoxyde réductase MsrA. La complémentation de l'activité d'une Msr par une deuxième Msr a déjà été décrite notamment de MsrB par fRMsR sur les résidus méthionines (R)-sulfoxydes (Lin, et al., 2007). En anaérobiose, il y a une forte diminution de l'expression de *msrA* chez le mutant en phase stationnaire. En l'absence de *msrAB* et en anaérobiose, son expression est réprimée. Son rôle reste à être déterminé.

L'expression de *msrAB* chez la souche WT est induite au cours de la croissance en aérobiose alors qu'elle est constitutive en anaérobiose. D'après la base de données STRING version 10 (Szklarczyk, et al., 2015), il n'y a pas de partenaires connus activant MsrAB. Les seuls partenaires prédits de MsrAB sont la protéase ClpX (NP_834191.1) pouvant avoir une activité chaperonne en l'absence de ClpP, la glutarédoxine Cmk9 (NP_834807.1), une thiorédoxine (NP_832025.1) et la thiol-disulfide oxydoréductase ResA (NP_831252.1) participant au complexe d'assemblage du cytochrome c (Magrane & Consortium, 2011). Ces interactions ont été observées chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Helicobacter pylori* (Rain, et al., 2001, Ma, et al., 2011). Hormis ClpX, ces protéines participent au maintien de l'homéostasie redox intracellulaire. Dans nos données protéomiques, ces protéines ainsi que les deux Msr de *B. cereus* n'ont pas été détectées dans le protéome cellulaire et l'exoprotéome. La protéine ResA est une protéine transmembranaire. L'interaction possible entre MsrAB et ResA au niveau de la membrane est probablement à l'origine de la non-détection de la présence de MsrAB dans le protéome cellulaire. L'analyse du protéome membranaire pourrait apporter des données

complémentaires sur le rôle de MsrAB dans le maintien de l'homéostasie cellulaire ainsi que sur la dynamique des protéines membranaires.

En plus de son rôle dans le maintien de l'homéostasie rédox, MsrAB participe à la réorganisation du protéome en fonction du potentiel rédox. Au niveau extracellulaire, MsrAB intervient principalement dans l'abondance des facteurs de virulence en agissant sur la sécrétion/exportation des protéines. L'augmentation de la sécrétion des toxines et enzymes de dégradation pourrait (i) permettre à la bactérie de lutter plus efficacement contre les systèmes de défense de l'hôte et libérer des nutriments lors de la colonisation de son tractus digestif (ii) conférer un avantage compétitif en éliminant les autres micro-organismes pour coloniser une niche écologique (iii) augmenter la biodisponibilité des nutriments. Au niveau intracellulaire, MsrAB module les voies métaboliques en fonction de la génération de ROS endogènes. La régulation fine du métabolisme est probablement réalisée par l'intermédiaire des flavodoxines. Ils permettent de contrôler le couplage entre la glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire. En condition de stress, la déviation du flux carboné vers des voies métaboliques fournissant de l'énergie et non génératrices de ROS est favorisée.

Références bibliographiques

- Abbas CA & Sibirny AA (2011) Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 321-360.
- Abraham S, Cachon R, Jeanson S, *et al.* (2013) A procedure for reproducible measurement of redox potential (E_h) in dairy processes. *Dairy Science & Technology* **93**: 675-690.
- Abulimiti A, Qiu X, Chen J, Liu Y & Chang Z (2003) Reversible methionine sulfoxidation of Mycobacterium tuberculosis small heat shock protein Hsp16.3 and its possible role in scavenging oxidants. *Biochem Biophys Res Commun* **305**: 87-93.
- Adak S, Aulak KS & Stuehr DJ (2002) Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from Bacillus subtilis. *J Biol Chem* **277**: 16167-16171.
- Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB & Lereclus D (1999) PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in Bacillus thuringiensis. *Mol Microbiol* **32**: 1043-1053.
- Agata N, Ohta M, Mori M & Isobe M (1995) A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of Bacillus cereus. *FEMS Microbiology Letters* **129**: 17-19.
- Albenberg L, Esipova TV, Judge CP, *et al.* (2014) Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology* **147**: 1055-1063 e1058.
- Albrich JM, McCarthy CA & Hurst JK (1981) Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 210-214.
- Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L & Olmedo G (2010) Understanding the evolutionary relationships and major traits of Bacillus through comparative genomics. *BMC Genomics* **11**: 332.
- Altincicek B, Linder M, Linder D, Preissner KT & Vilcinskas A (2007) Microbial metalloproteinases mediate sensing of invading pathogens and activate innate immune responses in the lepidopteran model host Galleria mellonella. *Infect Immun* **75**: 175-183.
- Anbar AD (2008) Oceans. Elements and evolution. *Science* **322**: 1481-1483.
- Andreeva ZI, Nesterenko VF, Fomkina MG, *et al.* (2007) The properties of Bacillus cereus hemolysin II pores depend on environmental conditions. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 253-263.
- Antelmann H (2015) Oxidative Stress Responses and Redox Signalling Mechanisms in Bacillus subtilis and Staphylococcus aureus. 249-274.
- Aranes O & Lereclus D (1991) Construction of cloning vectors for Bacillus thuringiensis. *Gene* **108**: 115-119.
- Argyrou A & Blanchard JS (2004) Flavoprotein disulfide reductases: advances in chemistry and function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **78**: 89-142.
- Armengaud J (2013) Microbiology and proteomics, getting the best of both worlds! *Environ Microbiol* **15**: 12-23.
- Arnaud M, Chastanet A & Debarbouille M (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**: 6887-6891.
- Asano SI, Nukumizu Y, Bando H, Iizuka T & Yamamoto T (1997) Cloning of novel enterotoxin genes from Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1054-1057.
- Ash C, Farrow JA, Dorsch M, Stackebrandt E & Collins MD (1991) Comparative analysis of Bacillus anthracis, Bacillus cereus, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 343-346.
- Baida G, Budarina ZI, Kuzmin NP & Solonin AS (1999) Complete nucleotide sequence and molecular characterization of hemolysin II gene from Bacillus cereus. *FEMS Microbiol Lett* **180**: 7-14.
- Baida GE & Kuzmin NP (1995) Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from Bacillus cereus. *Biochim Biophys Acta* **1264**: 151-154.
- Baida GE & Kuzmin NP (1996) Mechanism of action of hemolysin III from Bacillus cereus. *Biochim Biophys Acta* **1284**: 122-124.
- Baillie L & Rice EW (2014) BACILLUS | Bacillus anthracis. 118-123.

Balomenou S, Fouet A, Tzanodaskalaki M, Couture-Tosi E, Bouriotis V & Boneca IG (2013) Distinct functions of polysaccharide deacetylases in cell shape, neutral polysaccharide synthesis and virulence of *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol* **87**: 867-883.

Bandyopadhyay U, Das D & Banerjee RK (1999) Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. *Current Science* **77**: 658-666.

Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JE & Jacobsen BJ (2003) Oxidative burst elicited by *Bacillus mycoides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 1145-1153.

Baughn AD & Malamy MH (2004) The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature* **427**: 441-444.

Beasley DE, Koltz AM, Lambert JE, Fierer N & Dunn RR (2015) The Evolution of Stomach Acidity and Its Relevance to the Human Microbiome. *PLoS One* **10**: e0134116.

Beecher DJ & Macmillan JD (1991) Characterization of the components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* **59**: 1778-1784.

Beecher DJ, Schoeni JL & Wong AC (1995) Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* **63**: 4423-4428.

Beecher DJ, Pulido JS, Barney NP & Wong AC (1995) Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: methods and implication of involvement of hemolysin BL. *Infect Immun* **63**: 632-639.

Beecher DJ, Olsen TW, Somers EB & Wong ACL (2000) Evidence for Contribution of Tripartite Hemolysin BL, Phosphatidylcholine-Preferring Phospholipase C, and Collagenase to Virulence of *Bacillus cereus* Endophthalmitis. *Infection and Immunity* **68**: 5269-5276.

Begley M, Gahan CG & Hill C (2005) The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 625-651.

Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, et al. (2003) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular Microbiology* **51**: 659-674.

Benov LT & Fridovich I (1994) *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* **269**: 25310-25314.

Bernheimer AW & Grushoff P (1967) Cereolysin: production, purification and partial characterization. *J Gen Microbiol* **46**: 143-150.

Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293-300.

Berthold-Pluta A, Pluta A & Garbowska M (2015) The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. *Microb Pathog* **82**: 7-14.

Bigelow DJ & Squier TC (2005) Redox modulation of cellular signaling and metabolism through reversible oxidation of methionine sensors in calcium regulatory proteins. *Biochim Biophys Acta* **1703**: 121-134.

Boschi-Muller S & Branlant G (2014) Methionine sulfoxide reductase: chemistry, substrate binding, recycling process and oxidase activity. *Bioorg Chem* **57**: 222-230.

Boschi-Muller S, Gand A & Branlant G (2008) The methionine sulfoxide reductases: Catalysis and substrate specificities. *Arch Biochem Biophys* **474**: 266-273.

Bottone EJ (2010) *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev* **23**: 382-398.

Boylan JA, Hummel CS, Benoit S, Garcia-Lara J, Treglown-Downey J, Crane EJ, 3rd & Gherardini FC (2006) *Borrelia burgdorferi* bb0728 encodes a coenzyme A disulphide reductase whose function suggests a role in intracellular redox and the oxidative stress response. *Mol Microbiol* **59**: 475-486.

Bravo A, Likitvivanavong S, Gill SS & Soberon M (2011) *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem Mol Biol* **41**: 423-431.

Brekasis D & Paget MS (2003) A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J* **22**: 4856-4865.

Brot N, Weissbach L, Werth J & Weissbach H (1981) Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 2155-2158.

Brot N, Werth J, Koster D & Weissbach H (1982) Reduction of N-acetyl methionine sulfoxide: a simple assay for peptide methionine sulfoxide reductase. *Anal Biochem* **122**: 291-294.

Budarina ZI, Nikitin DV, Zenkin N, *et al.* (2004) A new *Bacillus cereus* DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of *B. cereus* haemolysin II. *Microbiology* **150**: 3691-3701.

Cabiscol E, Tamarit J & Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* **3**: 3-8.

Cadet J, Bellon S, Berger M, *et al.* (2002) Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem* **383**: 933-943.

Callegan MC, Gilmore MS, Gregory M, *et al.* (2007) Bacterial endophthalmitis: therapeutic challenges and host-pathogen interactions. *Prog Retin Eye Res* **26**: 189-203.

Camarasa C, Faucet V & Dequin S (2007) Role in anaerobiosis of the isoenzymes for *Saccharomyces cerevisiae* fumarate reductase encoded by OSM1 and FRDS1. *Yeast* **24**: 391-401.

Carrion V & Egan EA (1990) Prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **11**: 317-323.

Ceragioli M, Mols M, Moezelaar R, Ghelardi E, Senesi S & Abee T (2010) Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of *Bacillus cereus* to various disinfectant treatments. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3352-3360.

Ceuppens S, Boon N & Uyttendaele M (2013) Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiol Ecol* **84**: 433-450.

Ceuppens S, Rajkovic A, Hamelink S, Van de Wiele T, Boon N & Uyttendaele M (2012) Enterotoxin production by *Bacillus cereus* under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits. *Foodborne Pathog Dis* **9**: 1130-1136.

Ceuppens S, Uyttendaele M, Drieskens K, Rajkovic A, Boon N & Wiele TV (2012) Survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and spores during in vitro simulation of gastric passage. *J Food Prot* **75**: 690-694.

Chen M & Cook KD (2007) Oxidation artifacts in the electrospray mass spectrometry of Abeta Peptide. *Anal Chem* **79**: 2031-2036.

Chi BK, Gronau K, Mader U, Hessling B, Becher D & Antelmann H (2011) S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in *Bacillus subtilis* as revealed by transcriptomics and redox proteomics. *Mol Cell Proteomics* **10**: M111 009506.

Chi BK, Roberts AA, Huyen TT, *et al.* (2013) S-bacillithiolation protects conserved and essential proteins against hypochlorite stress in firmicutes bacteria. *Antioxid Redox Signal* **18**: 1273-1295.

Chiao JS & Peterson WH (1953) Yeasts, Methionine and Cystine Contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1**: 1005-1008.

Christensen GA, Zane GM, Kazakov AE, *et al.* (2015) Rex (encoded by DVU_0916) in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough is a repressor of sulfate adenyl transferase and is regulated by NADH. *J Bacteriol* **197**: 29-39.

Chung BH, Cannon RY & Smith RC (1976) Influence of growth temperature on glucose metabolism of a psychotrophic strain of *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* **31**: 39-45.

Ciorba MA, Heinemann SH, Weissbach H, Brot N & Hoshi T (1999) Regulation of voltage-dependent K⁺ channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *FEBS Lett* **442**: 48-52.

Clair G, Armengaud J & Duport C (2012) Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Mol Cell Proteomics* **11**: M111 013102.

Clair G, Roussi S, Armengaud J & Duport C (2010) Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Mol Cell Proteomics* **9**: 1486-1498.

- Clair G, Roussi S, Armengaud J & Duport C (2010) Expanding the Known Repertoire of Virulence Factors Produced by *Bacillus cereus* through Early Secretome Profiling in Three Redox Conditions. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* **9**: 1486-1498.
- Clair G, Lorphelin A, Armengaud J & Duport C (2013) OhrRA functions as a redox-responsive system controlling toxinogenesis in *Bacillus cereus*. *J Proteomics* **94**: 527-539.
- Clavel T, Carlin F, Lairon D, Nguyen-The C & Schmitt P (2004) Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol* **97**: 214-219.
- Cohn F (1872) Untersuchungen über Bakterien. *Beitrage zur Biologie der Pflanzen Heft 2* **1**: 127-224.
- Coman I & Touati D (1993) Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **175**: 1687-1696.
- Crack J, Green J & Thomson AJ (2004) Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *J Biol Chem* **279**: 9278-9286.
- Cui Y, Liu W, Qu X, Chen Z, Zhang X, Liu T & Zhang L (2012) A two component system is involved in acid adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Microbiol Res* **167**: 253-261.
- Cussiol JR, Alves SV, de Oliveira MA & Netto LE (2003) Organic hydroperoxide resistance gene encodes a thiol-dependent peroxidase. *J Biol Chem* **278**: 11570-11578.
- Dalrymple GB (2001) The age of the Earth in the twentieth century: a problem (mostly) solved. *Geological Society, London, Special Publications* **190**: 205-221.
- Davies MJ (1996) Protein and peptide alkoxyl radicals can give rise to C-terminal decarboxylation and backbone cleavage. *Arch Biochem Biophys* **336**: 163-172.
- Davies MJ (2004) Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochem Photobiol Sci* **3**: 17-25.
- Davies MJ (2005) The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta* **1703**: 93-109.
- Deffert C, Cachat J & Krause KH (2014) Phagocyte NADPH oxidase, chronic granulomatous disease and mycobacterial infections. *Cell Microbiol* **16**: 1168-1178.
- Demple B (1991) Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu Rev Genet* **25**: 315-337.
- Demple B & Harrison L (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* **63**: 915-948.
- Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, et al. (2005) Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol* **43**: 4277-4279.
- Diomandé SE, Nguyen-The C, Guinebretière M-H, Broussolle V & Brillard J (2015) Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Frontiers in Microbiology* **6**: 813.
- Dommel MK, Lucking G, Scherer S & Ehling-Schulz M (2011) Transcriptional kinetic analyses of cereulide synthetase genes with respect to growth, sporulation and emetic toxin production in *Bacillus cereus*. *Food Microbiol* **28**: 284-290.
- Drake H, Schramm A & Horn M (2006) Earthworm Gut Microbial Biomes: Their Importance to Soil Microorganisms, Denitrification, and the Terrestrial Production of the Greenhouse Gas N₂O. *Intestinal Microorganisms of Termites and Other Invertebrates*, Vol. 6 (König H & Varma A, ed. eds.), p. pp. 65-87. Springer Berlin Heidelberg.
- Dupierris V, Masselon C, Court M, Kieffer-Jaquinod S & Bruley C (2009) A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. *Bioinformatics* **25**: 1980-1981.
- Duport C, Thomassin S, Bourel G & Schmitt P (2004) Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Arch Microbiol* **182**: 90-95.
- Duport C, Zigha A, Rosenfeld E & Schmitt P (2006) Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *J Bacteriol* **188**: 6640-6651.
- Dutta S, Rani TS & Podile AR (2013) Root exudate-induced alterations in *Bacillus cereus* cell wall contribute to root colonization and plant growth promotion. *PLoS One* **8**: e78369.

Eklund H, Gleason FK & Holmgren A (1991) Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* **11**: 13-28.

Ekman JV, Kruglov A, Andersson MA, Mikkola R, Raulio M & Salkinoja-Salonen M (2012) Cereulide produced by *Bacillus cereus* increases the fitness of the producer organism in low-potassium environments. *Microbiology* **158**: 1106-1116.

Ellis RJ (2004) Artificial soil microcosms: a tool for studying microbial autecology under controlled conditions. *J Microbiol Methods* **56**: 287-290.

Ellison DW & Miller VL (2006) Regulation of virulence by members of the MarR/SlyA family. *Curr Opin Microbiol* **9**: 153-159.

Esbelin J, Jouanneau Y & Duport C (2012) *Bacillus cereus* Fnr binds a [4Fe-4S] cluster and forms a ternary complex with ResD and PlcR. *BMC Microbiol* **12**: 125.

Esbelin J, Jouanneau Y, Armengaud J & Duport C (2008) ApoFnr binds as a monomer to promoters regulating the expression of enterotoxin genes of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **190**: 4242-4251.

Esbelin J, Armengaud J, Zigha A & Duport C (2009) ResDE-dependent regulation of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus*: evidence for multiple modes of binding for ResD and interaction with Fnr. *J Bacteriol* **191**: 4419-4426.

Ezraty B, Aussel L & Barras F (2005) Methionine sulfoxide reductases in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* **1703**: 221-229.

Fagerlund A, Lindback T & Granum PE (2010) *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC Microbiol* **10**: 304.

Fagerlund A, Lindback T, Storset AK, Granum PE & Hardy SP (2008) *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* **154**: 693-704.

Farr SB, Touati D & Kogoma T (1988) Effects of oxygen stress on membrane functions in *Escherichia coli*: role of HPI catalase. *J Bacteriol* **170**: 1837-1842.

Favier A (2003) The oxidative stress: concept and experimental interest to understand diseases mechanisms and therapeutic approaches. *L'actualité chimique* 108-115.

Fernandes AP & Holmgren A (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* **6**: 63-74.

Fitzpatrick DJ, Turnbull PCB, Keane CT & English LF (1979) Two gas-gangrene-like infections due to *Bacillus cereus*. *British Journal of Surgery* **66**: 577-579.

Flannery DT & Walter MR (2012) Archean tufted microbial mats and the Great Oxidation Event: new insights into an ancient problem. *Australian Journal of Earth Sciences* **59**: 1-11.

Fleischmann RD, Adams MD, White O, *et al.* (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269**: 496-512.

Flint HJ, Scott KP, Louis P & Duncan SH (2012) The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **9**: 577-589.

Fouet A (2010) AtxA, a *Bacillus anthracis* global virulence regulator. *Res Microbiol* **161**: 735-742.

Frankland GC & Frankland PF (1887) Studies on Some New Micro-Organisms Obtained from Air. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **178**: 257-287.

Gaballa A, Newton GL, Antelmann H, *et al.* (2010) Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 6482-6486.

Galperin MY (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* **5**: 35.

Ganash M, Phung D, Sedelnikova SE, Lindback T, Granum PE & Artymiuk PJ (2013) Structure of the NheA component of the Nhe toxin from *Bacillus cereus*: implications for function. *PLoS One* **8**: e74748.

Garcia AV & Hirt H (2014) *Salmonella enterica* induces and subverts the plant immune system. *Front Microbiol* **5**: 141.

Garrison WM (1987) Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews* **87**: 381-398.

Ghelardi E, Celandroni F, Salvetti S, *et al.* (2002) Requirement of flhA for swarming differentiation, flagellin export, and secretion of virulence-associated proteins in *Bacillus thuringiensis*. *J Bacteriol* **184**: 6424-6433.

Ghesquiere B, Jonckheere V, Colaert N, *et al.* (2011) Redox proteomics of protein-bound methionine oxidation. *Mol Cell Proteomics* **10**: M110 006866.

Gilbert HF (1990) Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **63**: 69-172.

Gilmore MS, Cruz-Rodz AL, Leimeister-Wächter M, Kreft J & Goebel W (1989) A *Bacillus cereus* cytolytic determinant, cereolysin AB, which comprises the phospholipase C and sphingomyelinase genes: nucleotide sequence and genetic linkage. *Journal of Bacteriology* **171**: 744-753.

Gilois N, Ramarao N, Bouillaut L, *et al.* (2007) Growth-related variations in the *Bacillus cereus* secretome. *Proteomics* **7**: 1719-1728.

Glatz BA & Goepfert JM (1977) Production of *Bacillus cereus* enterotoxin in defined media in fermenter-grown cultures. *J Food Prot* **40**: 472-474.

Gohar M, Okstad OA, Gilois N, Sanchis V, Kolsto AB & Lereclus D (2002) Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics* **2**: 784-791.

Gohar M, Gilois N, Graveline R, Garreau C, Sanchis V & Lereclus D (2005) A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics* **5**: 3696-3711.

Gohar M, Faegri K, Perchat S, *et al.* (2008) The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS One* **3**: e2793.

Gominet M, Slamti L, Gilois N, Rose M & Lereclus D (2001) Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis* plcR regulon and for virulence. *Molecular Microbiology* **40**: 963-975.

Gonzalez-Flecha B & Demple B (1995) Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**: 13681-13687.

Gonzalez-Flecha B & Demple B (1997) Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 382-388.

Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA & Ischiropoulos H (2004) Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**: L262-268.

Granum PE & Lund T (2006) *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters* **157**: 223-228.

Grass JE, Gould LH & Mahon BE (2013) Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Clostridium perfringens*, United States, 1998-2010. *Foodborne Pathog Dis* **10**: 131-136.

Gregorich ZR & Ge Y (2014) Top-down proteomics in health and disease: challenges and opportunities. *Proteomics* **14**: 1195-1210.

Grenha R, Slamti L, Nicaise M, Refes Y, Lereclus D & Nessler S (2013) Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 1047-1052.

Grimaud R, Ezraty B, Mitchell JK, Lafitte D, Briand C, Derrick PJ & Barras F (2001) Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J Biol Chem* **276**: 48915-48920.

Guan P, Ai P, Dai X, *et al.* (2012) Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar Sichuansis strain MC28. *J Bacteriol* **194**: 6975.

Guan Z, Yates NA & Bakhtiar R (2003) Detection and characterization of methionine oxidation in peptides by collision-induced dissociation and electron capture dissociation. *J Am Soc Mass Spectrom* **14**: 605-613.

Guillemet E, Tran SL, Cadot C, Rognan D, Lereclus D & Ramarao N (2013) Glucose 6P binds and activates HlyIIIR to repress *Bacillus cereus* haemolysin hlyII gene expression. *PLoS One* **8**: e55085.

Guinebretiere MH & Nguyen-The C (2003) Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* **43**: 207-215.

Guinebretiere MH, Thompson FL, Sorokin A, *et al.* (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol* **10**: 851-865.

Guinebretiere MH, Auger S, Galleron N, *et al.* (2013) *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 31-40.

Gusarov I, Starodubtseva M, Wang ZQ, McQuade L, Lippard SJ, Stuehr DJ & Nudler E (2008) Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner. *J Biol Chem* **283**: 13140-13147.

Ha EM, Oh CT, Bae YS & Lee WJ (2005) A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* **310**: 847-850.

Halgand F, Zabrouskov V, Bassilian S, *et al.* (2010) Micro-heterogeneity of human saliva Peptide P-C characterized by high-resolution top-down Fourier-transform mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* **21**: 868-877.

Hall JW, Yang J, Guo H & Ji Y (2015) The AirSR two-component system contributes to *Staphylococcus aureus* survival in human blood and transcriptionally regulates *sspABC* operon. *Front Microbiol* **6**: 682.

Halliwell B & Gutteridge J (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine* OUP Oxford.

Han CS, Xie G, Challacombe JF, *et al.* (2006) Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* **188**: 3382-3390.

Hardy SP, Lund T & Granum PE (2001) CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiology Letters* **197**: 47-51.

Hartmann EM & Armengaud J (2014) N-terminomics and proteogenomics, getting off to a good start. *Proteomics* **14**: 2637-2646.

Harvie DR, Vilchez S, Steggles JR & Ellar DJ (2005) *Bacillus cereus* Fur regulates iron metabolism and is required for full virulence. *Microbiology* **151**: 569-577.

Hassouni ME, Chambost JP, Expert D, Van Gijsegem F & Barras F (1999) The minimal gene set member *msrA*, encoding peptide methionine sulfoxide reductase, is a virulence determinant of the plant pathogen *Erwinia chrysanthemi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 887-892.

Hauge S (1950) Matforgiftninger fremkalt av *bacillus cereus*. Forelopig meddelelse. *Nordisk Hygienisk Tidsskrift* **6**: 189-206.

Hauge S (1955) Food Poisoning Caused by Aerobic Spore-Forming Bacilli. *Journal of Applied Bacteriology* **18**: 591-595.

Hawkins CL & Davies MJ (2001) Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta* **1504**: 196-219.

Henderson B & Martin A (2011) Bacterial virulence in the moonlight: multitasking bacterial moonlighting proteins are virulence determinants in infectious disease. *Infect Immun* **79**: 3476-3491.

Henderson B & Martin A (2013) Bacterial moonlighting proteins and bacterial virulence. *Curr Top Microbiol Immunol* **358**: 155-213.

Hilliard NJ, Schelonka RL & Waites KB (2003) *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. *J Clin Microbiol* **41**: 3441-3444.

Holmgren A (1985) Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* **54**: 237-271.

Hondal RJ, Zhao Z, Kravchuk AV, *et al.* (1998) Mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C: a unified view of the mechanism of catalysis. *Biochemistry* **37**: 4568-4580.

Hoshi T & Heinemann S (2001) Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *J Physiol* **531**: 1-11.

- Hu Y, He LH, Xiao D, Liu GD, Gu YX, Tao XX & Zhang JZ (2012) Bacterial flora concurrent with *Helicobacter pylori* in the stomach of patients with upper gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* **18**: 1257-1261.
- Huang S, Ding X, Sun Y, Yang Q, Xiao X, Cao Z & Xia L (2012) Proteomic Analysis of *Bacillus thuringiensis* at Different Growth Phases by Using an Automated Online Two-Dimensional Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Strategy. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 5270-5279.
- Husebye E, Skar V, Høverstad T & Melby K (1992) Fasting hypochlorhydria with gram positive gastric flora is highly prevalent in healthy old people. *Gut* **33**: 1331-1337.
- Imlay JA (2003) Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol* **57**: 395-418.
- Imlay JA (2006) Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Mol Microbiol* **59**: 1073-1082.
- Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, *et al.* (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**: 87-91.
- Jessberger N, Dietrich R, Bock S, Didier A & Martlbauer E (2014) *Bacillus cereus* enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon* **77**: 49-57.
- Jessberger N, Krey VM, Rademacher C, *et al.* (2015) From genome to toxicity: a combinatory approach highlights the complexity of enterotoxin production in *Bacillus cereus*. *Front Microbiol* **6**: 560.
- Jimenez G, Blanch AR, Tamames J & Rossello-Mora R (2013) Complete Genome Sequence of *Bacillus toyonensis* BCT-7112T, the Active Ingredient of the Feed Additive Preparation Toyocerin. *Genome Announc* **1**.
- Jones DP, Go YM, Anderson CL, Ziegler TR, Kinkade JM, Jr. & Kirlin WG (2004) Cysteine/cystine couple is a newly recognized node in the circuitry for biologic redox signaling and control. *FASEB J* **18**: 1246-1248.
- Kasai H (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **387**: 147-163.
- Kaya A, Lee BC & Gladyshev VN (2015) Regulation of protein function by reversible methionine oxidation and the role of selenoprotein MsrB1. *Antioxid Redox Signal* **23**: 814-822.
- Kim G, Weiss SJ & Levine RL (2014) Methionine oxidation and reduction in proteins. *Biochim Biophys Acta* **1840**: 901-905.
- Koch R (1876) Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. *Cohns Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **2**: 277-310.
- Kojetin DJ, Sullivan DM, Thompson RJ & Cavanagh J (2007) Classification of response regulators based on their surface properties. *Methods Enzymol* **422**: 141-169.
- Kolter R, Siegele DA & Tormo A (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* **47**: 855-874.
- Konig H (2006) *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. *J Appl Microbiol* **101**: 620-627.
- Korner H, Sofia HJ & Zumft WG (2003) Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol Rev* **27**: 559-592.
- Korshunov S & Imlay JA (2010) Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **75**: 1389-1401.
- Kreft J, Berger H, Hartlein M, Muller B, Weidinger G & Goebel W (1983) Cloning and expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* of the hemolysin (cereolysin) determinant from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **155**: 681-689.

Kristoffersen SM, Ravnum S, Tourasse NJ, Okstad OA, Kolsto AB & Davies W (2007) Low concentrations of bile salts induce stress responses and reduce motility in *Bacillus cereus* ATCC 14579 [corrected]. *J Bacteriol* **189**: 5302-5313.

Kroten MA, Bartoszewicz M & Swiecicka I (2010) Cereulide and valinomycin, two important natural dodecadepsipeptides with ionophoretic activities. *Pol J Microbiol* **59**: 3-10.

Kryukov GV, Kumar RA, Koc A, Sun Z & Gladyshev VN (2002) Selenoprotein R is a zinc-containing stereo-specific methionine sulfoxide reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 4245-4250.

Kurtz DM, Jr. (2004) Microbial detoxification of superoxide: the non-heme iron reductive paradigm for combating oxidative stress. *Acc Chem Res* **37**: 902-908.

Ladenstein R, Epp O, Bartels K, Jones A, Huber R & Wendel A (1979) Structure analysis and molecular model of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* **134**: 199-218.

Lamb C & Dixon RA (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275.

Laouami S, Clair G, Armengaud J & Duport C (2014) Proteomic evidences for rex regulation of metabolism in toxin-producing *Bacillus cereus* ATCC 14579. *PLoS One* **9**: e107354.

Laouami S, Messaoudi K, Alberto F, Clavel T & Duport C (2011) Lactate dehydrogenase A promotes communication between carbohydrate catabolism and virulence in *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* **193**: 1757-1766.

Law CW, Chen Y, Shi W & Smyth GK (2014) voom: Precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biol* **15**: R29.

Le DT, Liang X, Fomenko DE, *et al.* (2008) Analysis of methionine/selenomethionine oxidation and methionine sulfoxide reductase function using methionine-rich proteins and antibodies against their oxidized forms. *Biochemistry* **47**: 6685-6694.

Le Lay J, Bahloul H, Serino S, Jobin M & Schmitt P (2015) Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels. *Food Microbiol* **46**: 314-321.

Lê S, Josse J & Husson F (2008) FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* **25**: 1-18.

Lechner S, Mayr R, Francis KP, *et al.* (1998) *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 4**: 1373-1382.

Lechner S, Muller-Ladner U, Schlottmann K, *et al.* (2002) Bile acids mimic oxidative stress induced upregulation of thioredoxin reductase in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis* **23**: 1281-1288.

Lee BC, Dikiy A, Kim HY & Gladyshev VN (2009) Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases. *Biochim Biophys Acta* **1790**: 1471-1477.

Lee J, Lee EY, Kim SH, *et al.* (2013) *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles carry biologically active beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 2589-2595.

Lee JW, Soonsanga S & Helmann JD (2007) A complex thiolate switch regulates the *Bacillus subtilis* organic peroxide sensor OhrR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 8743-8748.

Lereclus D, Agaisse H, Gominet M, Salamitou S & V. S (1996) Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *Journal of Bacteriology* **178**: 2749-2756.

Lesniak J, Barton WA & Nikolov DB (2002) Structural and functional characterization of the *Pseudomonas hydroperoxide* resistance protein Ohr. *EMBO J* **21**: 6649-6659.

Levine RL, Moskovitz J & Stadtman ER (2000) Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation. *IUBMB Life* **50**: 301-307.

Levine RL, Mosoni L, Berlett BS & Stadtman ER (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15036-15040.

Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L & Stadtman ER (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mech Ageing Dev* **107**: 323-332.

- Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L & Stadtman ER (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of Ageing and Development* **107**: 323-332.
- Liang X, Kaya A, Zhang Y, Le DT, Hua D & Gladyshev VN (2012) Characterization of methionine oxidation and methionine sulfoxide reduction using methionine-rich cysteine-free proteins. *BMC Biochem* **13**: 21.
- Lim JC, Kim G & Levine RL (2013) Stereospecific oxidation of calmodulin by methionine sulfoxide reductase A. *Free Radic Biol Med* **61**: 257-264.
- Lim JC, You Z, Kim G & Levine RL (2011) Methionine sulfoxide reductase A is a stereospecific methionine oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 10472-10477.
- Lin Z, Johnson LC, Weissbach H, Brot N, Lively MO & Lowther WT (2007) Free methionine-(R)-sulfoxide reductase from *Escherichia coli* reveals a new GAF domain function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 9597-9602.
- Lindback T, Fagerlund A, Rodland MS & Granum PE (2004) Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology* **150**: 3959-3967.
- Liu G, Zhou J, Fu QS & Wang J (2009) The *Escherichia coli* azoreductase AzoR Is involved in resistance to thiol-specific stress caused by electrophilic quinones. *J Bacteriol* **191**: 6394-6400.
- Logan NA & Rodríguez-Díaz M (2006) *Bacillus* spp. and Related Genera. 139-158.
- Luby S, Jones J, Dowda H, Kramer J & Horan J (1993) A large outbreak of gastroenteritis caused by diarrheal toxin-producing *Bacillus cereus*. *J Infect Dis* **167**: 1452-1455.
- Lumppio HL, Shenvi NV, Summers AO, Voordouw G & Kurtz DM, Jr. (2001) Rubrerythrin and rubredoxin oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a novel oxidative stress protection system. *J Bacteriol* **183**: 101-108.
- Lund T & Granum PE (1996) Characterisation of a non-haemolytic enterotoxin complex from *Bacillus cereus* isolated after a foodborne outbreak. *FEMS Microbiology Letters* **141**: 151-156.
- Lund T, De Buyser M-L & Granum PE (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology* **38**: 254-261.
- Luo S & Levine RL (2009) Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J* **23**: 464-472.
- Lutgerink JT, van den Akker E, Smeets I, *et al.* (1992) Interaction of singlet oxygen with DNA and biological consequences. *Mutat Res* **275**: 377-386.
- Ma XX, Guo PC, Shi WW, Luo M, Tan XF, Chen Y & Zhou CZ (2011) Structural plasticity of the thioredoxin recognition site of yeast methionine S-sulfoxide reductase Mxr1. *J Biol Chem* **286**: 13430-13437.
- Ma Z, Chandrangu P, Helmann TC, Romsang A, Gaballa A & Helmann JD (2014) Bacillithiol is a major buffer of the labile zinc pool in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **94**: 756-770.
- Madegowda M, Eswaramoorthy S, Burley SK & Swaminathan S (2008) X-ray crystal structure of the B component of Hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Proteins* **71**: 534-540.
- Madeira JP, Alpha-Bazin B, Armengaud J & Duport C (2015) Time dynamics of the *Bacillus cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation. *Front Microbiol* **6**: 342.
- Magrane M & Consortium U (2011) UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. *Database (Oxford)* **2011**: bar009.
- Margulis L, Jorgensen JZ, Dolan S, Kolchinsky R, Rainey FA & Lo SC (1998) The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 1236-1241.
- Marteyn B, West NP, Browning DF, *et al.* (2010) Modulation of *Shigella* virulence in response to available oxygen in vivo. *Nature* **465**: 355-358.
- Martin E, Rosenthal RE & Fiskum G (2005) Pyruvate Dehydrogenase Complex: Metabolic Link to Ischemic Brain Injury and Target of Oxidative Stress. *Journal of neuroscience research* **79**: 240-247.
- Martin PK, Li T, Sun D, Biek DP & Schmid MB (1999) Role in cell permeability of an essential two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **181**: 3666-3673.

- Martin SF, Follows BC, Hergenrother PJ & Trotter BK (2000) The choline binding site of phospholipase C (*Bacillus cereus*): insights into substrate specificity. *Biochemistry* **39**: 3410-3415.
- Masse E, Vanderpool CK & Gottesman S (2005) Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 6962-6971.
- McLaughlin KJ, Strain-Damerell CM, Xie K, Brekasis D, Soares AS, Paget MS & Kielkopf CL (2010) Structural basis for NADH/NAD⁺ redox sensing by a Rex family repressor. *Mol Cell* **38**: 563-575.
- Melkani GC, McNamara C, Zardeneta G & Mendoza JA (2004) Hydrogen peroxide induces the dissociation of GroEL into monomers that can facilitate the reactivation of oxidatively inactivated rhodanese. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 505-518.
- Messaoudi K, Clavel T, Schmitt P & Duport C (2010) Fnr mediates carbohydrate-dependent regulation of catabolic and enterotoxin genes in *Bacillus cereus* F4430/73. *Res Microbiol* **161**: 30-39.
- Messner KR & Imlay JA (2002) In vitro quantitation of biological superoxide and hydrogen peroxide generation. *Methods Enzymol* **349**: 354-361.
- Michelon D, Abraham S, Ebel B, *et al.* (2010) Contribution of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Lactococcus lactis*. *FEBS J* **277**: 2282-2290.
- Miernyk JA, Johnston ML, Huber SC, Tovar-Méndez A, Hoyos E & Randall DD (2009) Oxidation of an Adjacent Methionine Residue Inhibits Regulatory Seryl-Phosphorylation of Pyruvate Dehydrogenase. *Proteomics Insights* **2**: 15-22.
- Mikkola R, Saris NE, Grigoriev PA, Andersson MA & Salkinoja-Salonen MS (1999) Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*. *Eur J Biochem* **263**: 112-117.
- Miller JM, Hair JG, Hebert M, Hebert L, Roberts FJ & Weyant RS (1997) Fulminating bacteremia and pneumonia due to *Bacillus cereus*. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 504-507.
- Milner JL, Silo-Suh L, Lee JC, He H, Clardy J & Handelsman J (1996) Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3061-3065.
- Minetti G, Balduini C & Brovelli A (1994) Reduction of DABS-L-methionine-dl-sulfoxide by protein methionine sulfoxide reductase from polymorphonuclear leukocytes: stereospecificity towards the l-sulfoxide. *Ital J Biochem* **43**: 273-283.
- Mishra S & Imlay J (2012) Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide? *Arch Biochem Biophys* **525**: 145-160.
- Miyoshi S & Shinoda S (2000) Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes Infect* **2**: 91-98.
- Mojzsis SJ, Harrison TM & Pidgeon RT (2001) Oxygen-isotope evidence from ancient zircons for liquid water at the Earth's surface 4,300[thinsp]Myr ago. *Nature* **409**: 178-181.
- Mols M & Abee T (2011) Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environ Microbiol* **13**: 1387-1394.
- Mols M, de Been M, Zwietering MH, Moezelaar R & Abee T (2007) Metabolic capacity of *Bacillus cereus* strains ATCC 14579 and ATCC 10987 interlinked with comparative genomics. *Environ Microbiol* **9**: 2933-2944.
- Morand K, Talbo G & Mann M (1993) Oxidation of peptides during electrospray ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom* **7**: 738-743.
- Moriarty-Craige SE & Jones DP (2004) Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr* **24**: 481-509.
- Mortimer PR & McCann G (1974) Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet* **1**: 1043-1045.
- Moskovitz J (2005) Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim Biophys Acta* **1703**: 213-219.
- Moskovitz J, Berlett BS, Poston JM & Stadtman ER (1997) The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9585-9589.

Moskovitz J, Berlett BS, Poston JM & Stadtman ER (1997) The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 9585-9589.

Moskovitz J, Bar-Noy S, Williams WM, Requena J, Berlett BS & Stadtman ER (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12920-12925.

Moskovitz J, Rahman MA, Strassman J, Yancey SO, Kushner SR, Brot N & Weissbach H (1995) Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J Bacteriol* **177**: 502-507.

Murphy E (1985) Nucleotide sequence of a spectinomycin adenylyltransferase AAD(9) determinant from Staphylococcus aureus and its relationship to AAD(3") (9). *Mol Gen Genet* **200**: 33-39.

Nachin L, Nannmark U & Nystrom T (2005) Differential roles of the universal stress proteins of Escherichia coli in oxidative stress resistance, adhesion, and motility. *J Bacteriol* **187**: 6265-6272.

Nakamura LK (1998) Bacillus pseudomycooides sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 3**: 1031-1035.

Newton GL, Rawat M, La Clair JJ, et al. (2009) Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nat Chem Biol* **5**: 625-627.

Newton GL, Rawat M, La Clair JJ, et al. (2009) Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nat Chem Biol* **5**: 625-627.

Newton GL, Arnold K, Price MS, et al. (1996) Distribution of thiols in microorganisms: mycothiol is a major thiol in most actinomycetes. *Journal of Bacteriology* **178**: 1990-1995.

Niederhoffer EC, Naranjo CM, Bradley KL & Fee JA (1990) Control of Escherichia coli superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus. *J Bacteriol* **172**: 1930-1938.

Nielsen HK, Loliger J & Hurrell RF (1985) Reactions of proteins with oxidizing lipids. 1. Analytical measurements of lipid oxidation and of amino acid losses in a whey protein-methyl linolenate model system. *Br J Nutr* **53**: 61-73.

Nieselt K, Battke F, Herbig A, et al. (2010) The dynamic architecture of the metabolic switch in Streptomyces coelicolor. *BMC Genomics* **11**: 10.

Oien DB, Canello T, Gabizon R, Gasset M, Lundquist BL, Burns JM & Moskovitz J (2009) Detection of oxidized methionine in selected proteins, cellular extracts and blood serums by novel anti-methionine sulfoxide antibodies. *Arch Biochem Biophys* **485**: 35-40.

Okinaka RT, Cloud K, Hampton O, et al. (1999) Sequence and organization of pXO1, the large Bacillus anthracis plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J Bacteriol* **181**: 6509-6515.

Olry A, Boschi-Muller S, Yu H, Burnel D & Branlant G (2005) Insights into the role of the metal binding site in methionine-R-sulfoxide reductases B. *Protein Sci* **14**: 2828-2837.

Omer H, Alpha-Bazin B, Brunet JL, Armengaud J & Duport C (2015) Proteomics identifies Bacillus cereus EntD as a pivotal protein for the production of numerous virulence factors. *Front Microbiol* **6**: 1004.

Pagels M, Fuchs S, Pane-Farre J, et al. (2010) Redox sensing by a Rex-family repressor is involved in the regulation of anaerobic gene expression in Staphylococcus aureus. *Mol Microbiol* **76**: 1142-1161.

Pajares M, Jimenez-Moreno N, Dias IH, et al. (2015) Redox control of protein degradation. *Redox Biol* **6**: 409-420.

Papazisi L, Rasko DA, Ratnayake S, et al. (2011) Investigating the genome diversity of B. cereus and evolutionary aspects of B. anthracis emergence. *Genomics* **98**: 26-39.

Passalacqua KD, Bergman NH, Herring-Palmer A & Hanna P (2006) The superoxide dismutases of Bacillus anthracis do not cooperatively protect against endogenous superoxide stress. *J Bacteriol* **188**: 3837-3848.

Percy MG & Grundling A (2014) Lipoteichoic acid synthesis and function in gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* **68**: 81-100.

Perez-Gonzalez A, Muñoz-Rugeles L & Alvarez-Idaboy JR (2014) Tryptophan: antioxidant or target of oxidative stress? A quantum chemistry elucidation. *RSC Adv.* **4**: 56128-56131.

Pericone CD, Overweg K, Hermans PW & Weiser JN (2000) Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect Immun* **68**: 3990-3997.

Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM & Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**: 3551-3567.

Pinto AF, Rodrigues JV & Teixeira M (2010) Reductive elimination of superoxide: Structure and mechanism of superoxide reductases. *Biochim Biophys Acta* **1804**: 285-297.

Poole LB, Reynolds CM, Wood ZA, Karplus PA, Ellis HR & Li Calzi M (2000) AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**: 6126-6133.

Psylinakis E, Boneca IG, Mavromatis K, *et al.* (2005) Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*, highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *J Biol Chem* **280**: 30856-30863.

Rada B & Leto TL (2008) Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol* **15**: 164-187.

Rain JC, Selig L, De Reuse H, *et al.* (2001) The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*. *Nature* **409**: 211-215.

Ramarao N & Lereclus D (2006) Adhesion and cytotoxicity of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* to epithelial cells are FlhA and PlcR dependent, respectively. *Microbes Infect* **8**: 1483-1491.

Ramarao N & Sanchis V (2013) The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins (Basel)* **5**: 1119-1139.

Rasko DA, Altherr MR, Han CS & Ravel J (2005) Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews* **29**: 303-329.

Ravindra Kumar S & Imlay JA (2013) How *Escherichia coli* tolerates profuse hydrogen peroxide formation by a catabolic pathway. *J Bacteriol* **195**: 4569-4579.

Read TD, Peterson SN, Tourasse N, *et al.* (2003) The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* **423**: 81-86.

Reents H, Gruner I, Harmening U, *et al.* (2006) *Bacillus subtilis* Fnr senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state. *Mol Microbiol* **60**: 1432-1445.

Reyes-Ramirez A & Ibarra JE (2008) Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. *Appl Environ Microbiol* **74**: 125-129.

Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W & Smyth GK (2015) limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **43**: e47.

Ritsert K, Huber R, Turk D, Ladenstein R, Schmidt-Base K & Bacher A (1995) Studies on the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*: crystal structure analysis of reconstituted, icosahedral beta-subunit capsids with bound substrate analogue inhibitor at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* **253**: 151-167.

Rivera J, Cordero RJ, Nakouzi AS, Frases S, Nicola A & Casadevall A (2010) *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 19002-19007.

Robinson MD, McCarthy DJ & Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139-140.

Rolfe MD, Rice CJ, Lucchini S, *et al.* (2012) Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology* **194**: 686-701.

Roos D & Winterbourn CC (2002) Immunology. Lethal weapons. *Science* **296**: 669-671.

Rosen H, Klebanoff SJ, Wang Y, Brot N, Heinecke JW & Fu X (2009) Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 18686-18691.

- Rosslund E, Andersen Borge GI, Langsrud T & Sorhaug T (2003) Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *Int J Food Microbiol* **89**: 205-212.
- Rosslund E, Langsrud T, Granum PE & Sorhaug T (2005) Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *Int J Food Microbiol* **98**: 193-200.
- Rusnak F, Ascenso C, Moura I & Moura JJ (2002) Superoxide reductase activities of neelaredoxin and desulfoferrodoxin metalloproteins. *Methods Enzymol* **349**: 243-258.
- Russell TL, Berardi RR, Barnett JL, Dermentzoglou LC, Jarvenpaa KM, Schmaltz SP & Dressman JB (1993) Upper gastrointestinal pH in seventy-nine healthy, elderly, North American men and women. *Pharm Res* **10**: 187-196.
- Saint-Ruf C, Pesut J, Sopta M & Matic I (2007) Causes and consequences of DNA repair activity modulation during stationary phase in *Escherichia coli*. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**: 259-270.
- Sajous L, Botta A & Sari-Minodier I (2008) [Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: a biomarker of environmental oxidative stress?]. *Ann Biol Clin (Paris)* **66**: 19-29.
- Salamitou S, Ramiisse F, Brehelin M, *et al.* (2000) The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. *Microbiology* **146 (Pt 11)**: 2825-2832.
- Sastalla I, Maltese LM, Pomerantseva OM, Pomerantsev AP, Keane-Myers A & Leppla SH (2010) Activation of the latent *PlcR* regulon in *Bacillus anthracis*. *Microbiology* **156**: 2982-2993.
- Sawyer DT (1990) The Chemistry of Dioxygen Species (and HOOH) and Their Activation by Transition Metals. **31**: 109-131.
- Sawyer DT (2014) Superoxide chemistry. ed.^eds.), p.^pp.
- Scarano C, Viridis S, Cossu F, Frongia R, De Santis EP & Cosseddu AM (2009) The pattern of toxin genes and expression of diarrheal enterotoxins in *Bacillus thuringiensis* strains isolated from commercial bioinsecticides. *Vet Res Commun* **33 Suppl 1**: 257-260.
- Schau M, Chen Y & Hulett FM (2004) *Bacillus subtilis* YdiH is a direct negative regulator of the *cydABCD* operon. *J Bacteriol* **186**: 4585-4595.
- Schneewind O & Missiakas DM (2012) Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**: 1123-1139.
- Schoeni JL & Wong AC (1999) Heterogeneity observed in the components of hemolysin BL, an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* **53**: 159-167.
- Schuch R, Pelzek AJ, Kan S & Fischetti VA (2010) Prevalence of *Bacillus anthracis*-like organisms and bacteriophages in the intestinal tract of the earthworm *Eisenia fetida*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2286-2294.
- Seaver LC & Imlay JA (2001) Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 7182-7189.
- Sevim A, Eryuzlu E, Demirbag Z & Demir I (2012) A novel *cry2Ab* gene from the indigenous isolate *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J Microbiol Biotechnol* **22**: 133-140.
- Sharma SV, Arbach M, Roberts AA, Macdonald CJ, Groom M & Hamilton CJ (2013) Biophysical features of bacillithiol, the glutathione surrogate of *Bacillus subtilis* and other firmicutes. *Chembiochem* **14**: 2160-2168.
- Sickmier EA, Brekasis D, Paranawithana S, Bonanno JB, Paget MS, Burley SK & Kielkopf CL (2005) X-ray structure of a Rex-family repressor/NADH complex insights into the mechanism of redox sensing. *Structure* **13**: 43-54.
- Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SJ, He H, Clardy J & Handelsman J (1994) Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2023-2030.
- Sinev MA, Budarina Zh I, Gavrilenko IV, Tomashevskii A & Kuz'min NP (1993) [Evidence of the existence of hemolysin II from *Bacillus cereus*: cloning the genetic determinant of hemolysin II]. *Mol Biol (Mosk)* **27**: 1218-1229.

Sineva E, Shadrin A, Rodikova EA, *et al.* (2012) Iron regulates expression of Bacillus cereus hemolysin II via global regulator Fur. *J Bacteriol* **194**: 3327-3335.

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

Sosa Torres ME, Saucedo-Vazquez JP & Kroneck PM (2015) The magic of dioxygen. *Met Ions Life Sci* **15**: 1-12.

St John G, Brot N, Ruan J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Weissbach H & Nathan C (2001) Peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli and Mycobacterium tuberculosis protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9901-9906.

Stael S, Kmieciak P, Willems P, Van Der Kelen K, Coll NS, Teige M & Van Breusegem F (2015) Plant innate immunity--sunny side up? *Trends Plant Sci* **20**: 3-11.

Steen MK, Bruno-Murtha LA, Chaux G, Lazar H, Bernard S & Sulis C (1992) Bacillus cereus endocarditis: report of a case and review. *Clin Infect Dis* **14**: 945-946.

Stenfors Arnesen LP, Fagerlund A & Granum PE (2008) From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 579-606.

Storz G & Tartaglia LA (1992) OxyR: a regulator of antioxidant genes. *J Nutr* **122**: 627-630.

Stouthamer AH (1973) A theoretical study on the amount of ATP required for synthesis of microbial cell material. *Antonie Van Leeuwenhoek* **39**: 545-565.

Swidsinski A, Loening-Baucke V, Verstraelen H, Osowska S & Doerffel Y (2008) Biostructure of fecal microbiota in healthy subjects and patients with chronic idiopathic diarrhea. *Gastroenterology* **135**: 568-579.

Swiecicka I, Bideshi DK & Federici BA (2008) Novel isolate of Bacillus thuringiensis subsp. thuringiensis that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of Trichoplusia ni. *Appl Environ Microbiol* **74**: 923-930.

Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, *et al.* (2015) STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res* **43**: D447-452.

Takeuchi T, Nakaya Y, Kato N, Watanabe K & Morimoto K (1999) Induction of oxidative DNA damage in anaerobes. *FEBS Lett* **450**: 178-180.

Tarrago L, Kaya A, Weerapana E, Marino SM & Gladyshev VN (2012) Methionine sulfoxide reductases preferentially reduce unfolded oxidized proteins and protect cells from oxidative protein unfolding. *J Biol Chem* **287**: 24448-24459.

Tarrago L, Peterfi Z, Lee BC, Michel T & Gladyshev VN (2015) Monitoring methionine sulfoxide with stereospecific mechanism-based fluorescent sensors. *Nat Chem Biol* **11**: 332-338.

Tempelaars MH, Rodrigues S & Abee T (2011) Comparative analysis of antimicrobial activities of valinomycin and cereulide, the Bacillus cereus emetic toxin. *Appl Environ Microbiol* **77**: 2755-2762.

Torres MA (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* **138**: 414-429.

Tourasse NJ, Helgason E, Klevan A, *et al.* (2011) Extended and global phylogenetic view of the Bacillus cereus group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiol* **28**: 236-244.

Tran SL, Guillemet E, Gohar M, Lereclus D & Ramarao N (2010) CwpFM (EntFM) is a Bacillus cereus potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation, and virulence. *J Bacteriol* **192**: 2638-2642.

Tran SL, Guillemet E, Ngo-Camus M, *et al.* (2011) Haemolysin II is a Bacillus cereus virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cell Microbiol* **13**: 92-108.

Turnbull PC & Kramer JM (1985) Intestinal carriage of Bacillus cereus: faecal isolation studies in three population groups. *J Hyg (Lond)* **95**: 629-638.

Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**: 335-344.

Turrens JF & Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* **191**: 421-427.

UniProt C (2015) UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res* **43**: D204-212.

Van der Auwera GA, Andrup L & Mahillon J (2005) Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the Bacillus anthracis virulence plasmid pXO2 and of the Bacillus thuringiensis plasmid pBT9727. *BMC Genomics* **6**: 103.

Vandenesch F, Lina G & Henry T (2012) Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? *Front Cell Infect Microbiol* **2**: 12.

Verheust C, Fornelos N & Mahillon J (2005) GIL16, a New Gram-Positive Tectiviral Phage Related to the Bacillus thuringiensis GIL01 and the Bacillus cereus pBClin15 Elements. *Journal of Bacteriology* **187**: 1966-1973.

Vilain S, Luo Y, Hildreth MB & Brozel VS (2006) Analysis of the life cycle of the soil saprophyte Bacillus cereus in liquid soil extract and in soil. *Appl Environ Microbiol* **72**: 4970-4977.

Vinogradov AD & Grivennikova VG (2015) Oxidation of NADH and ROS production by respiratory complex I. *Biochim Biophys Acta*.

Vogt W (1995) Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radic Biol Med* **18**: 93-105.

Voros A, Simm R, Kroeger JK & Kolsto AB (2013) Gene transcription from the linear plasmid pBClin15 leads to cell lysis and extracellular DNA-dependent aggregation of Bacillus cereus ATCC 14579 in response to quinolone-induced stress. *Microbiology* **159**: 2283-2293.

Walter J & Ley R (2011) The human gut microbiome: ecology and recent evolutionary changes. *Annu Rev Microbiol* **65**: 411-429.

Wang E, Bauer MC, Rogstam A, Linse S, Logan DT & von Wachenfeldt C (2008) Structure and functional properties of the Bacillus subtilis transcriptional repressor Rex. *Mol Microbiol* **69**: 466-478.

Wehr NB & Levine RL (2012) Wanted and wanting: antibody against methionine sulfoxide. *Free Radic Biol Med* **53**: 1222-1225.

Weissbach H, Resnick L & Brot N (2005) Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* **1703**: 203-212.

Wenzel M, Schonig I, Berchtold M, Kampf P & Konig H (2002) Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite Zootermopsis angusticollis. *J Appl Microbiol* **92**: 32-40.

Wijnands LM, Pielaat A, Dufrenne JB, Zwietering MH & van Leusden FM (2009) Modelling the number of viable vegetative cells of Bacillus cereus passing through the stomach. *J Appl Microbiol* **106**: 258-267.

Williams LD, Burdock GA, Jimenez G & Castillo M (2009) Literature review on the safety of Toyocerin, a non-toxicogenic and non-pathogenic Bacillus cereus var. toyoi preparation. *Regul Toxicol Pharmacol* **55**: 236-246.

Winkler ME & Hoch JA (2008) Essentiality, bypass, and targeting of the YycFG (VicRK) two-component regulatory system in gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **190**: 2645-2648.

Winterbourn CC (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* **4**: 278-286.

Wizemann TM, Moskovitz J, Pearce BJ, et al. (1996) Peptide methionine sulfoxide reductase contributes to the maintenance of adhesins in three major pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7985-7990.

Wong ACL (1997) Tripartite Hemolysin BL from Bacillus cereus. HEMOLYTIC ANALYSIS OF COMPONENT INTERACTIONS AND A MODEL FOR ITS CHARACTERISTIC PARADOXICAL ZONE PHENOMENON. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 233-239.

Wood PM (1988) The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochemical Journal* **253**: 287-289.

Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J & Poole LB (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* **28**: 32-40.

- Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, *et al.* (2015) Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* **4**: 27066.
- Yang CK, Ewis HE, Zhang X, *et al.* (2011) Nonclassical protein secretion by *Bacillus subtilis* in the stationary phase is not due to cell lysis. *J Bacteriol* **193**: 5607-5615.
- Zheng J, Guan Z, Cao S, Peng D, Ruan L, Jiang D & Sun M (2015) Plasmids are vectors for redundant chromosomal genes in the *Bacillus cereus* group. *BMC Genomics* **16**: 6.
- Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P & Duport C (2006) Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Arch Microbiol* **185**: 222-233.
- Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P & Duport C (2007) The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *J Bacteriol* **189**: 2813-2824.
- Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM & van 't Riet K (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* **56**: 1875-1881.

Bacillus cereus est une bactérie aéro-anaérobie facultative à Gram positif ubiquiste pouvant s'adapter à de nombreux environnements et s'y développer. C'est un agent pathogène de l'homme capable de produire tout un éventail de protéines extracellulaires et de toxines jouant un rôle majeur dans la pathogénicité de ce micro-organisme. *B. cereus* croît suivant un métabolisme de type respiratoire en aérobiose et fermentaire en anaérobiose en l'absence d'accepteur final d'électrons. En aérobiose, la chaîne respiratoire est une source majeure des dérivés réactifs de l'oxygène endogènes. En anaérobiose, ceux-ci sont générés en réponse au stress oxydant secondaire au stress nutritionnel et au stress réducteur, lorsque les cultures sont réalisées à bas potentiel d'oxydo-réduction (POR). Les résidus méthionines (Met) sont particulièrement sensibles à l'oxydation par les ROS. L'oxydation des Met conduit à la formation de méthionine sulfoxyde, un dérivé oxydé stable détectable par spectrométrie de masse (MS). L'oxydation des résidus Met est réversible : leur réduction est catalysée par des méthionines sulfoxyde réductases (Msr). Pour déterminer le rôle de l'oxydation des résidus Met, nous avons réalisé une étude détaillée de la dynamique de l'exoprotéome de la souche ATCC 14579 (pBClin 15) de *B. cereus* en aérobiose ($pO_2 = 100\%$) et en anaérobiose ($pO_2 = 0\%$) à haut et bas potentiel redox. L'analyse protéomique comparative et biostatistique a montré que la dynamique des toxines (15 protéines) était représentative de la dynamique de l'exoprotéome (392 protéines) à la fois en termes d'abondance relative de protéines et d'oxydation des Met dans les trois conditions testées. Les résultats suggèrent que (i) l'abondance des toxines et leur taux de méthionines oxydés reflètent le niveau d'oxydation cellulaire et (ii) la sécrétion de toxines au cours de la croissance cellulaire contribue au maintien de l'homéostasie redox intracellulaire en piégeant les ROS endogènes, en particulier en phase active de croissance en aérobiose et en fin de croissance en anaérobiose. Pour étayer l'hypothèse selon laquelle, les Met des protéines extracellulaires, et des toxines en particuliers sont des composants de la machinerie cellulaire antioxydante, nous avons construit une souche mutante ne synthétisant plus MsrAB et comparé le protéome (902 protéines) et l'exoprotéome (215 protéines) de cette souche mutante avec celle de la souche parentale en aérobiose et anaérobiose à haut POR. Cette étude a mis en évidence l'implication de MsrAB mais également celle du plasmide cryptique pBClin15 dans la sécrétion des toxines et le maintien de l'homéostasie redox intracellulaire.

Mots clés : *Bacillus cereus*, protéomique comparative, homéostasie redox, méthionine sulfoxyde réductase, oxydation des méthionines, spectrométrie de masse.

Abstract

Bacillus cereus is a Gram-positive aerobic or facultative anaerobic worldwide-distributed bacterium. In addition, *B. cereus* is a human pathogen able to produce a range of extracellular enzymes and toxins playing a major role in the virulence of the bacteria. In presence of oxygen, *B. cereus* performs respiration. Without oxygen or other electron acceptors, it performs mixed-acid fermentation. Under aerobiosis, the respiratory electron transport chain is a major source of endogenous reactive oxygen species (ROS). Under anaerobiosis, endogenous ROS are generated in response to reductive stress (mainly under high-reductive anaerobiosis) and to starvation (nutrient stress), i.e. in response to secondary oxidative stresses. Methionine residues (Met) of proteins are vulnerable to oxidation by free radicals. Oxidation of Met leads to the formation of methionine sulfoxide (Met (O)), a stable by-product detectable by mass spectrometry (MS). Met(O) can be reduced back to Met by the action of methionine sulfoxide reductase (Msr). To determine the role of oxidation of Met residues, *B. cereus* exoproteome time courses were monitored by MS under low oxidation-reduction potential (ORP) anaerobiosis (initial ORP = +140 mV and $pO_2 = 0\%$), high-ORP anaerobiosis (iORP = -350 mV and $pO_2 = 0\%$), and aerobiosis ($pO_2 = 100\%$). The results indicated that toxin-related proteins were the most representative of the exoproteome changes, both in terms of protein abundance and their Met(O) content in the presence and in the absence of oxygen. The analysis results suggest that (i) the abundance of toxins and their oxidized methionines rates reflect the cellular oxidation level and (ii) the secretion of toxins during growth helps to maintain redox homeostasis by keeping endogenous ROS at bay, during the exponential growth phase under aerobic conditions and at the end of growth under anaerobiosis. To support our hypothesis that Met residues of extracellular proteins, particulars of toxins are components of the cellular machinery antioxidant, we constructed a mutant strain by deleting the gene of MsrAB and compare the cellular proteome and exoproteome of this mutant strain with the wild-type strain under aerobiosis and high-ORP anaerobiosis. This study highlighted the involvement of MsrAB but also pBClin15 plasmid in the secretion of toxins and maintain of the intracellular redox homeostasis.

Key words: *Bacillus cereus*, comparative proteomics, redox homeostasis, methionine sulfoxide reductase, oxidation of methionines