



HAL
open science

Caractérisation du thiol protéome chez *Bacillus cereus*

Fella Hamitouche

► **To cite this version:**

Fella Hamitouche. Caractérisation du thiol protéome chez *Bacillus cereus*. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2021. Français. NNT : 2021AVIG0736 . tel-03634951

HAL Id: tel-03634951

<https://hal.inrae.fr/tel-03634951v1>

Submitted on 10 Jun 2023

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.

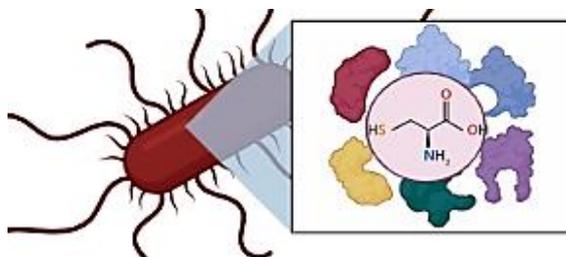
L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Avignon Université
École Doctorale 536 « Sciences et Agro-sciences »

Thèse

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université d'Avignon

Caractérisation du thiol protéome chez *Bacillus cereus*



Par Fella HAMITOUCHE

Préparée à l'UMR408, Sécurité et qualité des produits d'origine végétale, INRAE d'Avignon

Soutenue publiquement le 08 juin 2021 devant le jury :

Béatrice ALPHA-BAZIN
Julie HARDOUIN
Vincent MEJEAN
Michel FONS
Catherine DUPORT
Luc DEDIEU

Chercheur- HDR-CEA –Marcoule
Maitre de conférences-HDR- à l'Université de Rouen
Directeur de Recherche- CNRS-Marseille
Professeur à l'Université d'Aix Marseille
Professeur à l'Université d'Avignon
Maitre de conférences à l'Université d'Avignon

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse
Co-encadrant

Résumé

B*acillus cereus* est un pathogène alimentaire doté d'une grande capacité à s'adapter aux changements environnementaux, et en particulier aux changements de condition d'oxygénation. En réponse à la disponibilité d'oxygène, la bactérie ajuste son métabolisme central pour maintenir l'homéostasie redox cellulaire. Les résidus cystéines sont des éléments centraux de l'homéostasie redox, en raison des propriétés que leur confèrent les groupements thiols (SH). L'ensemble des protéines contenant des résidus cystéines dont l'état redox peut être modifié de manière réversible constitue le thiol protéome.

Afin de comprendre dans quelle mesure le thiol protéome contribue à l'homéostasie redox de *B. cereus* ATCC14579 lors de sa croissance respiratoire aérobie et de sa croissance fermentaire anaérobie, nous avons mis au point et expérimenté une approche de protéomique redox basée sur l'alkylation différentielle des cystéines et la détection des cystéines alkylées par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Le suivi de l'état redox des cystéines réactives au cours de la phase exponentielle de croissance nous a permis de mettre en évidence la spécificité du thiol protéome, sa dépendance à la phase de croissance et sa dynamique en fonction des conditions d'oxygénation. Globalement, la détection des protéines portant des thiols réactifs a apporté des informations prédictives sur les processus biologiques et les voies cellulaires régulés par l'état redox cellulaire. Par ailleurs, nous avons montré que l'état redox global du thiol protéome évoluait au cours de la croissance, vers un état plus réduit en anaérobiose et moins réduit en aérobie. Ceci pourrait être révélateur d'une forte présence d'espèces réactives d'oxygène (ROS) au début de la croissance en anaérobiose et en fin de croissance en aérobie. L'analyse détaillée du protéome aérobie a montré un enrichissement en protéines anti-oxydantes en fin de croissance et une diminution de son contenu en cystéines, suggérant une adaptation du protéome et du thiol protéome aux conditions plus oxydantes rencontrées en fin de croissance.

Ce travail de thèse est la première étude du thiol protéome de *B. cereus*. Il a permis de fournir des cartographies des thiols protéomes aérobie et anaérobie, qui serviront de références aux études visant à élucider l'adaptation cellulaire de *B. cereus* aux changements de son environnement.

Mots clés : *Bacillus cereus*, anaérobiose facultatif, protéomique redox, thiol protéome, cystéines.

Abstract

B*acillus cereus* is a foodborne pathogen, which is able to sense and adapt to changing environments, particularly to changes in oxygenation conditions. In response to oxygen availability, the bacterium adjusts its central metabolism to maintain cellular redox homeostasis. Cysteine residues are central elements of redox homeostasis, owing to the properties of thiol (SH) groups. The set of proteins with cysteine residues whose redox status can be reversibly modified constitutes the thiol proteome.

To understand how the thiol proteome contributes to the redox homeostasis of *B. cereus* ATCC14579 during aerobic respiratory growth and anaerobic fermentative growth, we have implemented and performed a redox proteomics approach based on the differential alkylation of cysteine residues and the detection of alkylated cysteine-containing peptides by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Monitoring the reversible redox status of cysteine residues, as exponential growth progresses, highlighted the specificity and the growth phase dependence of the thiol proteome, and its dynamics in response to oxygenation conditions. Overall, identifying proteins with reactive thiols has provided predictive information on biological processes and cellular pathways that are regulated by the cellular redox status. Furthermore, we observed changes in the global redox status of the thiol proteome, leading to a high and a low reduced status at the end of exponential anaerobic and aerobic growth, respectively. This could be indicative of a high occurrence in reactive oxygen species (ROS) at the beginning of fermentative anaerobic growth and at the end of the aerobic respiratory growth. Comprehensive analysis of the aerobic proteome showed both an enrichment in antioxidant proteins and a decrease in cysteine content at the end of the growth, suggesting a proteome and thiol proteome adaptation to the increasing oxidative conditions encountered at the end of growth.

This PhD work provided the first analysis of *B. cereus* thiol proteome. The maps of the aerobic and anaerobic thiol proteomes could serve as references for further studies aiming to elucidate the cellular adaptation of *B. cereus* to environmental changes.

Keywords: *Bacillus cereus*, facultative anaerobe, redox proteomic, thiol proteome, cysteine.

Laboratoire d'accueil

INRAE – Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement

UMR408 SQPOV – Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale

Equipe, Bactéries Sporulées dans la chaîne Alimentaire

Domaine Saint Paul, INRAE Centre de recherche PACA, 228 route de l'Aérodrome CS 40509.
Avignon – France.

“It takes a dream to get started, desire to keep going and determination to finish”

Eddie Harris

À ma très chère maman

À l'âme de mon père

Remerciements

Cette thèse de doctorat est avant tout une riche expérience humaine. Je profite donc de cet espace pour remercier toutes les personnes qui m'ont soutenu et qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce projet.

Tout d'abord, j'exprime ma reconnaissance au ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique, pour le financement de cette thèse dans le cadre du programme « Bourse d'excellence de doctorat 2017-2018 ». Je tiens à remercier également, l'Université d'Avignon qui m'a permis d'effectuer des heures d'enseignements et de prolonger la durée de ma thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse, Madame Béatrice Alpha-Bazin, Madame Julie Hardouin, Monsieur Vincent Méjean et Monsieur Michel Fons pour avoir accepté de juger mon travail et de participer à ma soutenance de thèse.

Tous mes remerciements, au Professeur émérite, Philippe Schmitt, de m'avoir proposé le sujet de la thèse et d'avoir contribué à mon recrutement à l'UMR 408 : Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale. Je remercie également Madame Catherine Renard et Monsieur Frédéric Carlin, Directeurs successifs de l'UMR408, pour m'avoir accueilli au sein de l'unité de recherche.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Catherine Duport et le Docteur Luc Dedieu, qui m'ont encadré durant cette thèse. Je vous remercie pour le grand soutien académique et scientifique que vous m'avez apporté. Merci pour les nombreuses et riches discussions qu'on a pu avoir. Merci pour votre confiance, vos conseils avisés, et votre disponibilité. Je vous remercie également de m'avoir donné la chance de faire mes premiers pas en enseignement à l'IUT et à l'Université d'Avignon.

Je tiens à adresser mes remerciements à Jean Armangeaud, directeur de la plateforme protéomique au CEA de Marcoule, d'avoir participé à ce projet, d'avoir apporté son expertise en spectrométrie de masse et surtout pour ses encouragements. Je remercie également, Jean Charles-Gaillard, pour son aide, sa disponibilité, et pour les longues heures passées à analyser mes nombreux échantillons protéiques.

Je remercie également, Thierry Clavel, de m'avoir initié à l'utilisation des fermenteurs, et surtout d'avoir répondu à toutes mes questions techniques. Merci également de m'avoir fait confiance lors des TP de microbiologie.

Je tiens à remercier Bénédicte Doublet pour son aide dans les manips de biochimie. Je remercie Éric Piétri pour sa disponibilité et tout le matériel qu'il m'a fourni dont la VM pour réaliser mes gros traitements de données. Un gros Merci à Barbara Le Boursicaud pour son aide précieuse dans toutes les démarches et formalités administratives souvent très complexes.

Un grand merci à Véronique Broussolle pour sa gentillesse et ses encouragements. Merci également à Sandrine Poncet pour sa sympathie, sa bonne humeur et surtout pour la relecture de ce manuscrit.

Je tiens particulièrement à remercier Alice, qui m'a été d'un soutien inébranlable, *Thank you for being the kind and true person you are, thank you for everything you have done for me. Wherever life takes us you have a friend in me.*

Je remercie chaleureusement Odile Berge. Odile merci pour ton aide constante depuis ma première semaine à Avignon. Merci pour ta générosité. Merci d'avoir toujours été souriante et accueillante, et surtout merci pour nos échanges très intéressants.

Un gros merci aux grandes sportives du midi, Stéf et Claire, merci de faire en sorte que l'on ne manque de rien et que l'on soit dans de bonnes conditions de travail. Merci pour votre amitié et votre grande gentillesse. Merci pour tous ces bons moments passés au labo et en dehors.

Un grand merci à tous les CDD (CDI), doctorants et stagiaires de SQPOV particulièrement, Thibaut, Pedro, Ana Paula, Leticia, Alexandra, Carla, Miarka, Charlène, Adriana, Agathe et Jeanne , à qui je dois l'ambiance sympathique dans laquelle j'ai travaillé durant ces années de thèse.

Un immense merci aux doctorants SporAlim, aux anciens et aux nouveaux, Ludivine, Marina, Armand, Boris, Cécile et Imad. J'ai vraiment apprécié toutes ces années pendant lesquelles nous avons tout partagé ensemble, les épreuves de la thèse, les encouragements et les bons moments. Sans vous l'aventure n'aurait pas été la même ! Ce bureau au fond du couloir à droite est devenu un lieu de grande convivialité. Il a connu du *hard work*, pleins de discussions scientifiques et pleins de pause-café/Thé. Il a également connu des éclats de rires, de la déco d'intérieur, du *Ping pong*, des gâteaux, et surtout des expressions Anglo-franco-algériennes. Merci pour tous ces moments, ainsi pour ceux passés en dehors du labo. Merci tout simplement pour votre soutien et votre amitié. Vous êtes des amis en or.

Un grand merci à tous mes chers amis et toutes les belles rencontres que j'ai pu faire à Avignon. Merci à Diassé, Hamed et particulièrement à Tarek, pour leurs conseils judicieux, pour l'amitié et pour leurs aides précieuses durant ces années de thèse.

Un merci tout particulier à tous les doctorants boursiers du programme Algérien d'excellence. La *Team* de Marseille et de Montpellier, Merci d'être une partie importante de cette aventure depuis notre concours pour les majors de promo en 2017. Merci pour tous ces voyages, week-end et moments passés ensemble. Merci d'être si merveilleux. Je suis certaine que vous aurez une carrière scientifique réussie et je vous souhaite le meilleur pour votre avenir.

Merci aux enseignants chercheurs à l'USTHB et aux anciens maitres de stage à l'institut Pasteur qui m'ont transmis leur passion et ont confirmé mon envie de faire une thèse : Mr Kaci, Amina et Mr Drali.

Enfin, je tiens évidemment à remercier ma famille qui a toujours été présente et proche même si elle était loin. Merci beaucoup pour votre amour et de votre soutien inconditionnel au cours de ces dernières années. Merci à ma mère qui a toujours cru en moi, encourager et m'a permis d'aller jusqu'au bout de mes rêves. Merci à ma sœur et à mon frère de m'avoir donné la force de continuer et de surmonter toutes les épreuves.

Fella HAMITOUCHE.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Laboratoire d'accueil..... | III |
| Table des matières..... | IX |
| Liste des figures | XIII |
| Liste des tableaux | XVI |
| Liste des abréviations..... | XVII |
| Chapitre 1. Synthèse bibliographique | 1 |
| 1. <i>Bacillus cereus</i> | 1 |
| 1.1. Découverte de <i>Bacillus cereus</i> | 1 |
| 1.2. Diversité phylogénétique et caractéristiques microbiologiques..... | 1 |
| 1.3. <i>Bacillus cereus</i> : du sol à l'intestin | 4 |
| 1.4. L'incidence des Toxi Infections Alimentaires Collectives à <i>B. cereus</i> | 4 |
| 1.5. Caractéristiques pathogéniques | 4 |
| 1.5.1. Les infections non-gastro-intestinales | 5 |
| 1.5.2. Les infections gastro-intestinales..... | 5 |
| 1.5.2.1. Le syndrome émétique | 5 |
| 1.5.2.2. Le syndrome diarrhéique..... | 6 |
| 1.6. Adaptation de <i>B. cereus</i> à son environnement..... | 8 |
| 1.6.1. La sporulation..... | 8 |
| 1.6.2. Adaptation à la température..... | 9 |
| 1.6.3. Adaptation aux bas pH..... | 9 |
| 1.6.4. Adaptation à la pression en oxygène | 9 |
| 1.7. Adaptation au potentiel redox | 15 |
| 1.7.1. Définition du potentiel d'oxydo-réduction | 15 |
| 1.7.2. Mesure électrochimique du potentiel d'oxydoréduction | 16 |
| 1.7.3. Le potentiel redox des systèmes biologiques..... | 16 |
| 1.7.4. Relation entre le potentiel redox et la croissance bactérienne | 17 |
| 2. L'homéostasie redox et les systèmes antioxydants cellulaires..... | 19 |
| 2.1. L'homéostasie redox et le stress oxydant : une question d'équilibre | 19 |
| 2.3. Les radicaux libres | 19 |
| 2.4. Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) | 20 |
| 2.4.1. Le radical superoxide ($O_2^{\cdot-}$)..... | 20 |
| 2.4.2. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) | 21 |

| | |
|--|----|
| 2.4.3. Le radical hydroxyle (HO·) | 21 |
| 2.4.4. L'oxygène singulet (¹O₂) | 21 |
| 2.5. Les dérivés réactifs de l'azote (RNS) | 22 |
| 2.6. Les dérivés réactifs du chlore (RCS) | 23 |
| 2.7. Les sources de ROS | 23 |
| 2.8. Les effets toxiques des ROS sur les cellules | 24 |
| 2.8.1. Les lipides | 24 |
| 2.8.2. L'ADN | 25 |
| 2.8.3. Les protéines | 25 |
| 2.8.3.1. Oxydation et fragmentation de la chaîne carbonée principale | 26 |
| 2.8.3.2. Oxydation de la chaîne latérale des acides aminés | 26 |
| 2.8.3.3. Carbonylation des protéines | 26 |
| 2.9. Les systèmes impliqués dans l'homéostasie redox et les défenses anti-oxydantes | 27 |
| 2.9.1. Les systèmes enzymatiques | 27 |
| 2.9.1.1. La superoxyde dismutase (SOD) | 27 |
| 2.9.1.2. La catalase (Kat) | 27 |
| 2.9.1.3. Les alkyl hydroperoxide reductases (Ahp) | 28 |
| 2.9.1.4. Les thioredoxines (Trx) | 28 |
| 2.9.2. Les systèmes non enzymatiques | 28 |
| 2.9.2.1. Le système NAD⁺/NADH et le système NADP⁺/NADPH | 28 |
| 2.9.2.2. Les thiols à faible poids moléculaire (LMW thiol) | 29 |
| a. Le Coenzyme A (CoA) | 29 |
| b. Le Bacillithiol (BSH) | 30 |
| c. La cystéine (CySH/CySS) | 31 |
| 3. Les résidus cystéines : chimie, modification et outils de caractérisation | 32 |
| 3.1. Les modifications post-traductionnelles des protéines (PTM) | 32 |
| 3.2. La cystéine : un acide aminé particulier | 33 |
| 3.3. Modifications post traductionnelles des cystéines | 34 |
| 3.3.1. Formation des ponts disulfures | 35 |
| 3.3.2. Formation des oxoacides organosoufrés | 35 |
| 3.3.3. Formation du nitrosothiol | 36 |
| 3.4. Protéomique redox | 37 |
| 3.4.1. Préparation de l'échantillon | 37 |
| 3.4.2. Les différentes approches de marquage des cystéines | 38 |
| 3.4.2.1. Protéomique redox basée sur la séparation en gel polyacrylamide | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.2.1.1. Marquage fluorescent | 38 |
| 3.4.2.2. Protéomique redox basée sur la spectrométrie de masse..... | 40 |
| 3.4.2.2.1. Spectrométrie de masse en protéomique..... | 41 |
| 3.4.2.2.2. Approches de protéomiques quantitatives adaptées à la protéomique redox..... | 42 |
| Objectifs de la thèse | 46 |
| Chapitre 2. Évaluation et optimisation du piégeage des thiols | 48 |
| 2.1. Contexte de l'étude..... | 48 |
| 2.2. La lyse cellulaire | 48 |
| 2.3. Alkylation différentielle des thiols | 48 |
| 2.4. Application du marquage IDN aux cultures anaérobies de <i>B. cereus</i> | 51 |
| 2.5. Effet de la concentration en NEM et du pH sur l'alkylation secondaire des lysines..... | 52 |
| 2.6. Application du marquage IDN aux aérobies de <i>B. cereus</i> | 53 |
| Chapitre 3. Étude du thiol protéome de <i>Bacillus cereus</i> pendant la croissance anaérobie fermentaire | 55 |
| 3.1. Introduction | 55 |
| 3.2. Background..... | 57 |
| 3.3. Methods..... | 58 |
| 3.3.1. Chemicals | 58 |
| 3.3.2. Regulated batch culture..... | 58 |
| 3.3.3. Protein extraction: Quenching cellular thiol-disulfide exchange..... | 59 |
| 3.3.4. Differential thiol trapping method..... | 59 |
| 3.3.5. High-resolution tandem mass spectrometry | 60 |
| 3.3.6. MS/MS spectra interpretation..... | 60 |
| 3.3.7. Data analysis..... | 60 |
| 3.4. Results..... | 61 |
| 3.4.1. Labeling Strategy for global analysis of the <i>B. cereus</i> thiol proteome..... | 61 |
| 3.4.2. <i>B. cereus</i> thiol proteome dynamics | 63 |
| 3.4.3. Components of the <i>B. cereus</i> thiol proteome | 66 |
| 3.5. Discussion..... | 71 |
| 3.6. Conclusions..... | 74 |
| 3.7. Analyse complémentaire du protéome cellulaire de <i>B. cereus</i> au cours de la croissance fermentaire anaérobie : corrélation avec les groupes fonctionnels.. | 75 |
| Chapitre 4. Signature moléculaire de la croissance aérobie chez <i>Bacillus cereus</i> : contribution du thiol protéome | 84 |
| 4.1. Introduction | 84 |

| | |
|---|------------|
| 4.2. Background..... | 86 |
| 4.3. Materials and methods | 87 |
| 4.3.1. <i>B. cereus</i> growth condition | 87 |
| 4.3.2. Protein extraction for proteome analysis..... | 87 |
| 4.3.3. Protein identification and quantification..... | 88 |
| 4.3.4. Bioinformatics analysis..... | 88 |
| 4.5. Results & discussion | 89 |
| 4.5.1. <i>B. cereus</i> proteome is enriched in antioxidant proteins as aerobic growth progresses | 89 |
| 4.5.2. Cysteine content of <i>B. cereus</i> proteome decreases as growth progresses.. | 91 |
| 4.5.3. The thiol reduction status of the <i>B. cereus</i> proteome decreases as aerobic growth progresses | 94 |
| 4.6. Conclusion..... | 102 |
| 4.7. References | 104 |
| Discussion générale | 108 |
| Conclusion et perspectives | 114 |
| Références bibliographiques..... | 116 |
| Annexes..... | 129 |
| Valorisation des travaux de thèse | 133 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1.1. Observation au microscope optique (contraste de phase) des cellules végétatives et des spores de <i>Bacillus cereus</i> | 2 |
| Figure 1.2. Structure chimique de la toxine émétique céréulide..... | 6 |
| Figure 1.3. Organisation génétique des opérons hbl et nhe chez <i>B. cereus</i> et formation de pores transmembranaires. | 7 |
| Figure 1.4. Représentation schématique de la voie de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates | 11 |
| Figure 1.5. Décarboxylation oxydative du pyruvate et cycle de Krebs. | 13 |
| Figure 1.6. Produits finaux de la fermentation des acides mixtes et du butanediol | 15 |
| Figure 1.7. Schéma récapitulatif du métabolisme central de <i>B. cereus</i> | 18 |
| Figure 1.8. Formation des espèces réactives d'oxygènes. | 20 |
| Figure 1.9. Formation des espèces réactives d'azote à partir de l'oxyde nitrique (NO [•])..... | 22 |
| Figure 1.10. La peroxydation des lipides..... | 24 |
| Figure 1.11. Oxydation de la guanine en 8-oxoguanine..... | 25 |
| Figure 1.12. Oxydation de la chaîne polypeptidique | 26 |
| Figure 1.13. Structure du Coenzyme A (CoA)..... | 30 |
| Figure 1.14. Voie de biosynthèse du Bacillithiol..... | 31 |
| Figure 1.15. Structure de la L-cystéine | 33 |
| Figure 1.16. Modifications post-traductionnelles oxydatives des protéines contenant des cystéines. | 34 |
| Figure 1.17. Mécanismes des réactions d'échange thiol- disulfure. | 35 |
| Figure 1.18. Protocole expérimental de la technique redox-DIGE | 39 |
| Figure 1.19. Protocole schématique de la technique biotine switch avec la biotine-HPDP .. | 40 |
| Figure 1.20. Les différentes étapes de l'analyse protéomique « shotgun»..... | 42 |
| Figure 1.21. Schéma simplifié de la stratégie OxICAT | 43 |
| Figure 1.22. Structure chimique du réactif ITRAQ..... | 43 |
| Figure 1.23. Protocole expérimental de la stratégie OxITRAQ | 44 |

| | |
|---|----|
| Figure 1.24 . Les différentes étapes réalisées pour l'étude du thiol protéome chez <i>B. cereus</i> | 47 |
| Figure 2.1 . Réaction des thiols avec les 2 alkylants utilisés le N-éthylmaléimide (NEM) et l'iodoacétamide (IAM).. | 49 |
| Figure 2.2 . Alkylation des cystéines par différentes concentrations de NEM | 50 |
| Figure 2.3 . Marquage différentiel des cystéines suivant la stratégie « double inversée ».... | 50 |
| Figure 2.4 . Nombre de peptides totaux identifiés avec les marquages IDN et DI du thiol protéome de <i>B. cereus</i> en croissance anaérobie. | 52 |
| Figure 2.5 . Evaluation de l'effet du pH et de la concentration en NEM sur l'alkylation des lysines. | 53 |
| Figure 2.6 . Nombre de peptides totaux identifiés après marquage IDN et DI du thiol protéome de <i>B. cereus</i> à EEP, MEP et LEP lors de la croissance en aérobiose. | 54 |
| Figure 3.1 . Growth curve and alterations to extracellular oxidoreduction potential (ORP) of <i>B. cereus</i> ATCC 14579 in regulated anoxic batch cultures. | 61 |
| Figure 3.2 . Schematic workflow used to investigate the <i>B. cereus</i> thiol proteome. | 62 |
| Figure 3.3 . Labeling efficiency of IDN assay compared to IN controls. | 63 |
| Figure 3.4 . Proportion of reduced Cys (RedCys) and oxidized Cys (OxCys) residues identified in samples harvested at early-exponential, mid-exponential and late-exponential growth phases | 64 |
| Figure 3.5 . Growth-phase-distribution of the 74 Cys residues found predominantly as reduced Cys. (RedCys) or oxidized Cys (OxCys). | 66 |
| Figure 3.6 . Functional categorization of reactive Cys-containing proteins at early (EEP), mid (MEP) and late (LEP) exponential growth stages. | 67 |
| Figure 3.7 . Localisation cellulaire des 1157 protéines identifiées en conditions anaérobie fermentaires chez <i>B. cereus</i> . | 75 |
| Figure 3.8 . Analyse GO des catégories fonctionnelles des protéines changeant d'abondance entre EEP, MEP et LEP. | 78 |
| Figure 4.1 . Flowchart of the experimental design. Protein extracts were harvested at early- (EEP), mid- (MEP) and late-exponential growth phase (LEP). | 89 |
| Figure 4.2 . Enriched biological processes for differentially accumulated proteins (DAPs). Green and red bars represent the biological processes (Gene Ontology) significantly enriched and non-enriched (adjusted $p < 0.05$, Fisher's test), respectively in mid-exponential growth phase and late-exponential growth phase compared to early exponential growth phase. | 91 |
| Figure 4.3 . Cysteine content of <i>B. cereus</i> ATCC 14579 proteome. | 93 |
| Figure 4.4 . Temporal dynamics of <i>B. cereus</i> ATCC 14579 thiol proteome. | 94 |

Figure 4.5. Venn diagrams depicting proteins found to be up-regulated ; (a) and down-regulated (b) abundance level (DAP) and Iodoacetamide labelled cysteine residue (IAMCys) level at mid- (MEP) and late-exponential growth phase (LEP)..... 96

Figure 4.6. Schematic representation of the *B. cereus* ATCC 14579 proteome's remodeling between the beginning of the exponential growth phase and the end of exponential growth phase to cope with endogenous ROS production. 102

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1.1. Les sept thermotypes de <i>B. cereus</i> | 3 |
| Tableau 1.2. Caractéristiques des deux types de toxi-infections alimentaires causées par <i>B. cereus</i> | 8 |
| Table 3.1. Numbers of non-redundant peptides, Cys-containing peptides and Cys residues identified in all the three replicates at early-exponential phase (EEP), mid-exponential phase (MEP) and late-exponential phase (LEP)..... | 65 |
| Table 3.2. Cys-proteins harboring specific cysteines detected as RedCys or as OxCys..... | 69 |
| Table 4. 1. Proteins with differentially Iodoacetamide (IAM) labelled cysteine residues at mid-exponential growth phase (MEP) and late exponential growth phase (LEP) compared to early exponential growth phase. | 97 |

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
ARN: Acide ribonucléique
ATP : Adenosine triphosphate
ATR: Acid tolerance resistance
B. cereus: Bacillus cereus
BSH: Bacillithiol
CoA : Coenzyme A
CoADR : Coenzyme A disulfide réductase
Cys : Cysteine
DIGE Differential gel electrophoresis
DTT : Dithiothréitol
FADH : Flavine adénine dinucléotide e
GSH : Glutathione
IAM : Iodoacétamide
LMW thiol: Low-molecular-weight thiols
MLST: Multilocus sequence typing
MS : Spectrométrie de masse
MSH: Mycothiol
NADH :Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH: Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NEM : N-éthylmaléimide
NOX: NADPH oxydase
ORP: Oxydo Reduction Potential
OX:Oxidized
OxCys: Oxidized cysteine
PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis
POR : Potential d'oxydoréduction
PPP : Pentose phosphate pathway
PTM: Post transnational modification
PTS : PhosphoTransférerase

RCS: *Reactive chlorine species*

Red: Reduced

RedCys: Reduced cysteine

RNS: Reactive *nitrogen species*

ROS: *Reactive oxygen species*

SDS-PAGE : Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium

SOD : Superoxydes dismutase

TCA cycle: Cycle de Krebs

TCA: Acide trichloracétique

TCEP : Tris (2-carboxyethyl) phosphine

TIAC : Toxi-infection alimentaire collective

Trx : Thiorédoxine

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

Chapitre 1. Synthèse bibliographique

1. *Bacillus cereus*

1.1. Découverte de *Bacillus cereus*

Bacillus cereus est une bactérie pathogène à Gram positif, dont la cellule végétative est sous forme d'un bacille. *Bacillus cereus* a été isolé pour la première fois en 1887, dans une étable, à partir d'un échantillon d'air. Elle a été nommée "*Bacillus cereus*" en raison de l'aspect cireux des colonies isolées sur milieux gélosés (Frankland and Frankland, 1887). Le caractère pathogénique de la bactérie a été découvert en 1937 suite à la mort de cochons d'Inde auxquels on avait injecté des suspensions de *B. cereus* (Clark, 1937). La première description d'une toxoinfection alimentaire collective (TIAC) remonte à 1950 en Norvège, où Steinar Hauge enquêta sur quatre foyers d'intoxication alimentaire, ayant touché 600 personnes au total. Les malades présentaient des douleurs abdominales, des nausées et des diarrhées suite à la consommation d'une sauce à la vanille à base d'amidon de maïs préparée et conservée à température ambiante pour être servie le lendemain. Hauge (1950) a constaté que l'amidon de maïs utilisé contenait environ 10^4 spores de *B. cereus* par gramme. Pour démontrer que *B. cereus* était la cause de l'intoxication alimentaire, il a inoculé une sauce à la vanille avec 4×10^6 cellules par mL de *B. cereus*, et a bu de 155 à 270 mL de cette suspension bactérienne. Après 13 heures, il a développé les mêmes symptômes (Hauge, 1950).

Plus tard en 1971, il a été démontré pour la première fois que ce bacille pouvait également être responsable d'une intoxication alimentaire de type émétique caractérisée par une crise aiguë de nausées et de vomissements (Melling *et al.*, 1976).

1.2. Diversité phylogénétique et caractéristiques microbiologiques

Le phylum des Firmicutes comprend des bactéries à Gram positif avec un faible taux de GC (36-42%), dont les genres *Clostridium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* et *Bacillus* (De Vos *et al.*, 2009). Le genre *Bacillus* est caractérisé par une sous-division appelée groupe *B. cereus* ou groupe *Bacillus cereus sensu lato* (*sl*), composé essentiellement de 7 espèces bactériennes phylogénétiquement proches : *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* et *B. cereus sensu stricto* (*ss*) (Guinebretière *et al.*, 2008). Toutefois, de nouvelles espèces décrites récemment telles que *B. toyonensis* et *Bacillus wiedmannii* ont été associées à ce groupe (Jiménez *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2016).

La plupart des bactéries de ce groupe ont la capacité de sporuler. Elles sont en forme de bâtonnet d'une taille supérieure à 1,0 μm (**Figure 1.1**), sont anaérobies facultatives et sont mobiles par ciliature péritriche à l'exception de *B. anthracis* et de quelques souches de *B. mycoides* qui sont immobiles (Marston *et al.*, 2006; Nakamura and Jackson, 1995). Elles sont retrouvées dans des habitats très variés et sont fréquemment isolées du sol, des poussières, des surfaces de végétaux et de denrées alimentaires (Ehling-Schulz *et al.*, 2019). La température optimale de croissance des différentes espèces du groupe se situe entre 25°C et 37°C. On trouve cependant des souches thermophiles et psychrophiles pouvant se développer à 50°C et à 4°C respectivement (Guinebretière *et al.*, 2008). Pour isoler les bactéries de ce groupe en laboratoire, on se base sur des propriétés biochimiques comme l'incapacité à dégrader le mannitol, la résistance à la polymixine qui sélectionne les bactéries à Gram positif, et la synthèse d'une lécithinase (phospholipase C). Les autres caractéristiques communément utilisées pour l'identification sont la mobilité, l'hémolyse et la dégradation d'amidon qui peuvent être mis en évidence aisément sur des milieux gélosés (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

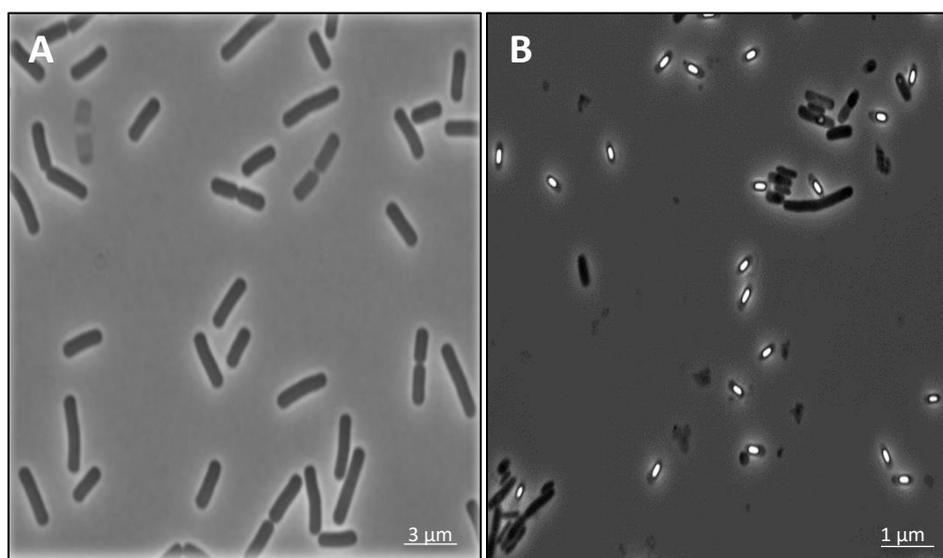


Figure 1.1. Observation au microscope optique (contraste de phase) des cellules végétatives (A) et des spores (B) de *Bacillus cereus* (INRAE, Avignon).

Les espèces du groupe *B. cereus* ont été classées traditionnellement par leurs caractères phénotypiques, physiologiques et principalement par le contenu plasmidique (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008; KOLSTØ *et al.*, 2002). Suite au progrès de la biologie moléculaire, plusieurs méthodes analytiques telles que l'électrophorèse en champ pulsée ou « Pulsed Field Gel Electrophoresis » (PFGE) et le typage génomique multilocus (MLST) ont eu pour objectif de distinguer les espèces du groupe *B. cereus* mais ces études ont révélé la difficulté de distinction entre les espèces au sein du groupe car elles sont très proches phylogénétiquement (Merzougui *et al.*, 2013; Cardazzo *et al.*, 2008; Helgason *et al.*, 2004). Le séquençage du

génomique complet est aujourd'hui fréquemment employé et on dispose des données génomiques de plus de 140 souches du groupe *B. cereus* (Girault *et al.*, 2014).

Parmi les classifications moléculaires du groupe *B. cereus*, le séquençage du gène de ménage *panC* est le plus répandu. En effet, Guinebretière *et al.* (2008) a porté sur 425 souches couvrant la diversité phénotypique et génotypique de *B. cereus* *sl.* Plusieurs techniques ont été utilisées et associées dans cette étude dont le séquençage du gène *panC* qui code pour la pantoate-bêta-alanine ligase C). Cette méthode a permis de distinguer sept groupes phylogénétiques qui possèdent chacun une gamme de croissance bien définie montrant clairement la différence entre les capacités à se développer à basses ou hautes températures (**Tableau 1.1**). Cette classification permet de distinguer quatre thermotypes principaux (les psychrotolérants, les mésophiles, les thermotolérants et les « intermédiaires ») montre également que les différentes souches d'une même espèce peuvent appartenir à un seul groupe, comme elles peuvent être réparties dans plusieurs groupes.

Tableau 1.1. Les sept thermotypes de *B. cereus* D'après (Guinebretière *et al.* 2008).

| Groupes | Espèces | Températures de croissance (°C) | Thermotype |
|---------|--|---------------------------------|-----------------|
| I | <i>B. pseudomycooides</i> | 10-40 | Mésophile |
| II | <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> <i>B. wiedmanii</i> * | 7-40 | Psychrotolérant |
| III | <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> <i>B. anthracis</i> | 15-45 | Mésophile |
| IV | <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> | 10-45 | Mésophile |
| V | <i>B. cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> <i>B. toyonensis</i> * | 8-40 | Intermédiaire |
| VI | <i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycooides</i> <i>B. thuringiensis</i> | 5-37 | Psychrotolérant |
| VII | <i>B. cytotoxicus</i> | 20-50 | Thermotolérant |

**B. wiedmanii* et *B. toyonensis* sont des nouvelles espèces mises en évidence récemment au sein du groupe *cereus*.

1.3. *Bacillus cereus* : du sol à l'intestin

B. cereus est une bactérie ubiquitaire retrouvée principalement dans le sol, qui constitue le réservoir majeur pour les spores. La spore est un élément favorable à la dissémination de la bactérie dans l'environnement (Ehling-Schulz *et al.*, 2019). En effet, au moment de la récolte des produits végétaux, les spores et les cellules végétatives de *B. cereus* peuvent être entraînées dans les zones de production alimentaire. La capacité de la bactérie à sporuler lui confère une forte adhésion aux équipements alimentaires et une résistance aux traitements chimiques et thermiques au cours de la transformation des aliments (Carlin, 2011). En outre, sa capacité à former des biofilms protège les spores et les cellules végétatives des agents de désinfection (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008; Carlin, 2011). Par conséquent, la bactérie est transmise à l'homme *via* divers ingrédients alimentaires crus tels que les légumes, le lait, les herbes et les épices (Six *et al.*, 2012). Le non-respect des règles élémentaires de préparation des aliments, comme la rupture de la chaîne du froid, une cuisson inadaptée, ou encore un stockage à température ambiante, va permettre la croissance de *B. cereus* et la germination des spores. La bactérie peut alors se multiplier et produire une série de facteurs de virulence à l'origine des toxi-infections alimentaires chez l'homme.

1.4. L'incidence des Toxi Infections Alimentaires Collectives à *B. cereus*

Une TIAC est définie par l'apparition, d'au moins deux cas d'une symptomatologie gastro-intestinale dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. Les cas de TIAC à *B. cereus* ont longtemps été sous-estimés, car les symptômes de la maladie sont souvent bénins et de courte durée. Par ailleurs, les symptômes de la forme émétique causés par *B. cereus* ne sont pas faciles à distinguer de ceux causés par l'intoxication à *Staphylococcus aureus*, et la maladie diarrhéique présente les mêmes symptômes que l'intoxication alimentaire à *Clostridium perfringens* de type A (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

Entre 1996 et 2005, selon le rapport de santé publique France, *B. cereus* représentait la quatrième cause de TIAC après *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens*. Entre 2006 et 2010, 50 à 100 de TIAC suspectées ou confirmées à *B. cereus* étaient déclarées chaque année. Depuis 2012, la bactérie devient le deuxième agent causal de TIAC, et le nombre de TIAC notifié chaque année n'a cessé d'augmenter pour atteindre 339 en 2018 (Rapport santé publique France, 2018).

1.5. Caractéristiques pathogéniques

Bien que reconnu comme un pathogène alimentaire, *B. cereus* n'est pas seulement responsable d'infections gastro-intestinales. Elle peut être à la cause d'infections non-gastro-intestinales variées.

1.5.1. Les infections non-gastro-intestinales

B. cereus peut être à l'origine d'infections non gastro-intestinales, peu fréquentes mais souvent graves. Un grand nombre d'études ont montré que la bactérie se comporte comme un pathogène opportuniste chez les personnes immunodéprimées, entraînant des infections locales telles que des endophtalmies et des parodontites (Hemady *et al.*, 1990; Helgason *et al.*, 2000). Elle est également impliquée dans des infections systémiques telles que les endocardites, les septicémies et des infections du système nerveux central (encéphalites et méningites) (Kato *et al.*, 2014).

1.5.2. Les infections gastro-intestinales

B. cereus est responsable de TIAC qui se manifeste par deux types de syndromes bien différents tant au niveau des symptômes que de leurs origines : le syndrome émétique et le syndrome diarrhéique (**Tableau 1.2 cf. p.8**).

1.5.2.1. Le syndrome émétique

Le syndrome émétique est le résultat de l'ingestion d'une toxine appelée céréulide, produite par la bactérie au cours de sa multiplication dans l'aliment. Dans ce cas, la pathologie est une intoxication. Trente minutes à 5h après ingestion de l'aliment contaminé, des nausées et des vomissements apparaissent et peuvent conduire dans certains cas à des insuffisances hépatiques (Dierick *et al.*, 2005). Les aliments amylacés tels que les pâtes et le riz et les aliments lactés sont principalement incriminés dans cette contamination (Ehling-Schulz *et al.*, 2004).

Le céréulide est un dodécadepsipeptide cyclique non ribosomique de 1,2 kDa produit par la céréulide peptide synthétase (Agata *et al.*, 1995; Ehling-Schulz *et al.*, 2006). Il est structuralement apparenté à la valinomycine (Agata *et al.*, 1995). Il est constitué d'un motif de deux acides aminés et de deux hydroxyles acides (D-O-Leu, D-Ala, L-O-Val et L-Val) répété 3 fois (**Figure 1.2**) (Agata *et al.*, 1994). Cette molécule est thermostable, résiste à une large gamme de pH ainsi qu'aux enzymes protéolytiques (Rajkovic *et al.*, 2008). Le céréulide n'est donc pas détruit lors de la cuisson, ni par les enzymes digestives et peut ainsi se retrouver au niveau de l'intestin sans être inactivé (Agata *et al.*, 1994). Son mode d'action n'a pas été complètement élucidé chez l'homme. Cependant, il a été rapporté chez la souris qu'il agit sur des récepteurs spécifiques appelés 5-hydroxytryptamine 3 (5-HT₃) stimulant le nerf vague afférent et entraînant des vomissements (Agata *et al.*, 1995).

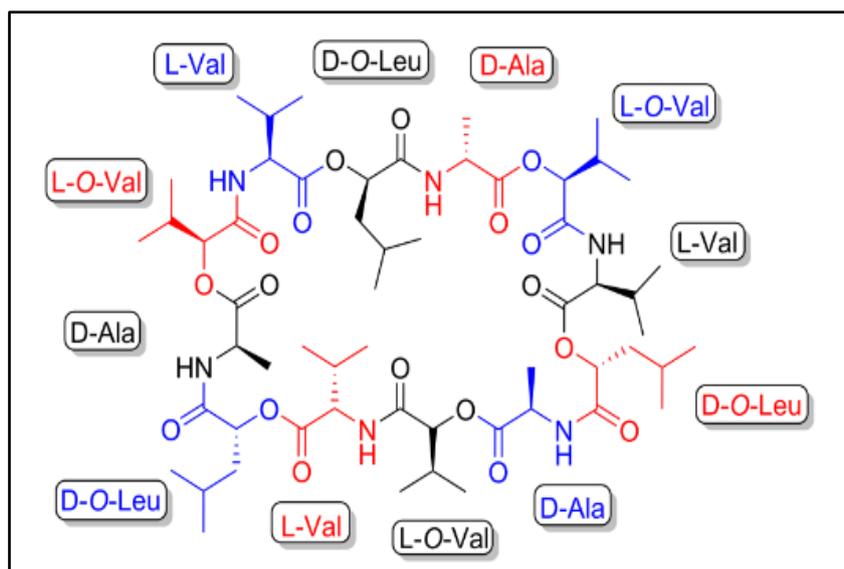


Figure 1.2. Structure chimique de la toxine émétique céréulide (Ulrich *et al.*, 2019). D-O-Leu: D-Oxy-Leucine; D-Ala : D-Alaline; L-O-V:L-Oxy-Valine;L-Val: L-Valine

1.5.2.2. Le syndrome diarrhéique

Le syndrome diarrhéique est la conséquence de l'ingestion de *B. cereus* sous forme de cellules végétatives ou de spores. Il s'agit donc dans ce cas d'une véritable toxi-infection. Elle est caractérisée par des douleurs abdominales, une diarrhée et occasionnellement des nausées et des vomissements (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Contrairement aux syndromes émétiques, les symptômes apparaissent au moins 6h après l'ingestion d'aliments contenant au minimum 10^5 bactéries (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Les produits laitiers, les purées de légumes, ou les plats cuisinés à base de viande sont les aliments le plus souvent associés au syndrome diarrhéique. Ce dernier résulte de la production de facteurs de virulence par la bactérie lors de sa croissance dans l'intestin (Granum and Lund, 1997). Trois entérotoxines jouant un rôle majeur dans le syndrome diarrhéique ont été largement décrites dans la littérature : l'hémolysine BL (HBL), et l'entérotoxine non hémolytique (NHE), qui sont des entérotoxines tripartites (**Figure 1.3**), et la cytotoxine K (CytK) qui est monopartite.

La toxine hémolytique HBL est constituée de deux composants lytiques L1 et L2 codés respectivement par les gènes *hblD* et *hblC*. Ces sous-unités sont liées par la sous-unité B codée par *hblA*, qui a aussi pour rôle la liaison à la cellule cible (Ryan *et al.*, 1997; Jessberger *et al.*, 2020). Ces trois gènes sont organisés en opéron. L'assemblage des trois sous unités confère une activité hémolytique, cytotoxique et dermonécrotique à la toxine HBL. HBL provoque également l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Beecher *et al.*, 1995). Il a été montré également que la souche ATCC 14579 produit une quatrième sous-unité B', codée par le gène *hblB'* (localisée juste en aval de l'opéron) dont la fonction est inconnue (Clair *et al.*, 2010).

La toxine non-hémolytique Nhe est codée par les gènes *nheA*, *nheB* et *nheC* constituant l'opéron *nhe*. Comme pour HBL, l'activation de Nhe est due à la liaison séquentielle de ces trois sous-unités. Nhe induit la lyse cellulaire en formant des pores dans la membrane plasmique des cellules épithéliales cibles (Fagerlund *et al.*, 2008; Fox *et al.*, 2020). La toxine CytK, en revanche, est une protéine monopartite repliée en tonneau bêta capable de former des pores transmembranaires. CytK existe sous deux isoformes (CytK 1 et CytK 2). Elle est caractérisée par une activité dermonécrotique, cytotoxique et hémolytique (Fagerlund *et al.*, 2004). Les trois toxines, HBL, Nhe et CytK présentent une activité cytotoxique sur les cellules de l'épithélium rénal (Vero) et colorectal (Caco-2) ainsi que sur d'autres lignées cellulaires humaines (Fagerlund *et al.*, 2004; Fagerlund *et al.*, 2008). Elles sont retrouvées dans quasiment toutes les souches de *B. cereus* avec des prévalences différentes suivant les toxines.

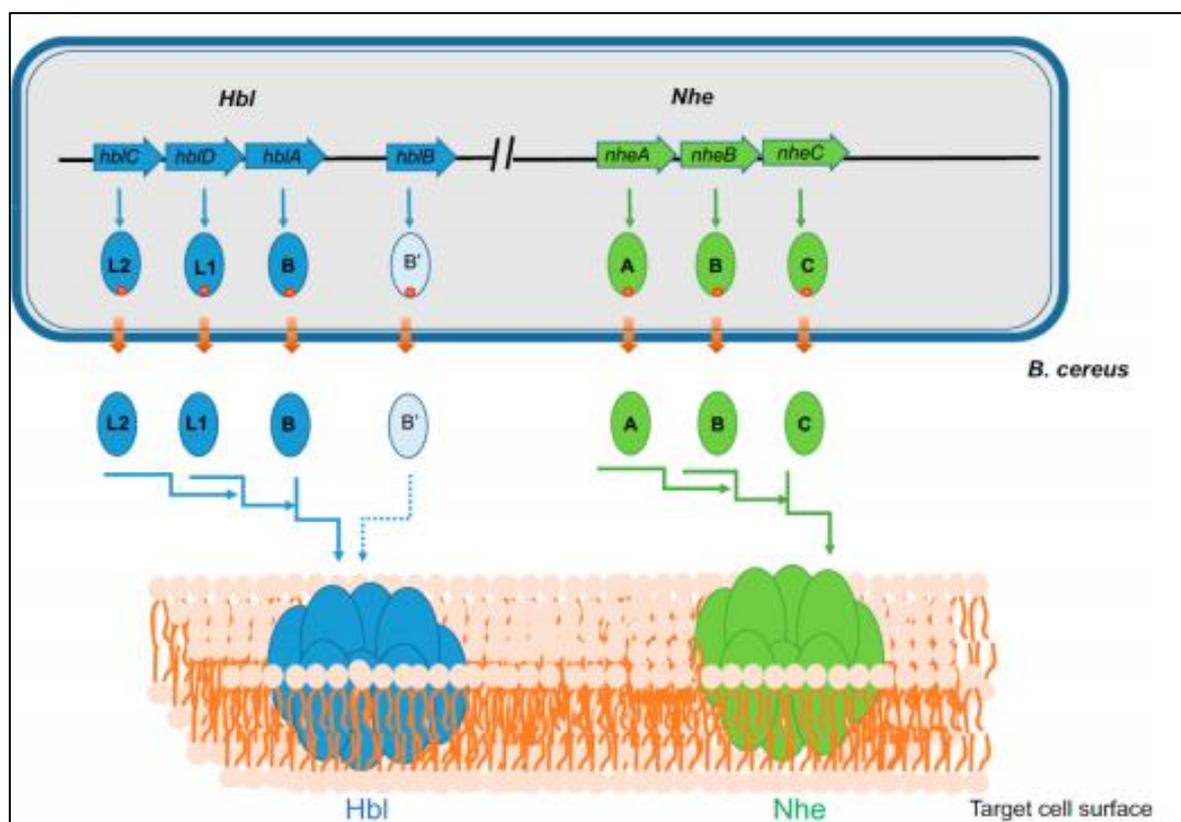


Figure 1.3. Organisation génétique des opérons *hbl* et *nhe* chez *B. cereus* et formation de pores transmembranaires (Duport and Armengaud, 2019).

Les souches de *B. cereus* sécrètent également d'autres facteurs de virulence qui peuvent contribuer à leur pathogénicité en cas de syndrome diarrhéique (Tuipulotu *et al.*, 2020). Ces facteurs de virulence comprennent des phospholipases C (Beecher and Wong, 2000), des hémolysines II /I (céréolysine) et des protéases (Shany *et al.*, 1974; Brillard and Lereclus, 2007; Chitlaru *et al.*, 2006).

Tableau 1.2. Caractéristiques des deux types de toxi-infections alimentaires causées par *B. cereus*. D'après (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

| Caractéristiques | Syndrome émétique | Syndrome diarrhéique |
|--|---|--|
| Type de toxine | Peptide cyclique ; Cereulide | Protéines; Entérotoxines: HBL, Nhe, CytK |
| Lieu de production de la toxine | Préformée dans les aliments | Dans l'intestin grêle de l'hôte |
| Dose infectante | 10 ⁵ -10 ⁸ bactéries/g sont souvent retrouvées dans les aliments impliqués, mais la présence de bactéries vivantes n'est pas nécessaire pour l'intoxication | 10 ⁵ -10 ⁸ UFC (total) |
| Temps d'incubation | 0.5–6 h | 8-16 h (occasionnellement > 24 h) |
| Durée de la maladie | 6–24 h | 2-24h (occasionnellement plusieurs jours) |
| Symptômes | Nausées, vomissements et malaises. Quelques cas mortels | Douleurs abdominales, diarrhée aqueuse et parfois nausées Des cas de létalité ont été observées |
| Aliments les plus fréquemment mis en cause | Aliments riches en amidon : riz, pâtes, pâtisseries et nouilles. | Aliments protéinés ; produits de viande, soupes, légumes, puddings, sauces, lait et produits laitiers. |

1.6. Adaptation de *B. cereus* à son environnement

De nombreuses études ont mis en évidence la capacité des bactéries à s'adapter à des conditions défavorables et fluctuantes dans leurs environnements tels que l'épuisement des nutriments et les variations de température, de pH, et de disponibilité en oxygène. *B. cereus* étant une bactérie sporulée, anaérobie facultative, capable de résister et de se multiplier dans de larges gammes de températures et de pH, elle en est un très bon exemple. Pour faire face à ces changements, elle met en œuvre des stratégies d'adaptation en élaborant différentes réponses physiologiques.

1.6.1. La sporulation

Afin de se protéger des conditions hostiles de l'environnement tel que le manque de nutriments, *B. cereus* se différencie en spores qui sont des formes de résistance métaboliquement inactives. La spore bactérienne résiste à la chaleur et aux procédés de décontamination des produits alimentaires tels que, la pression, les UV et les produits chimiques (Gauvry *et al.*, 2017). Lorsque l'environnement devient à nouveau favorable pour la

croissance, la spore germe pour redonner une nouvelle cellule végétative active (Carlin *et al.*, 2010). Le processus de sporulation a été principalement étudié chez *Bacillus subtilis* et certains mécanismes sont conservés chez les espèces du groupe *B. cereus* *sl.* Les études ont révélé l'intervention d'un grand nombre de senseurs et de régulateurs transcriptionnels (de Vries *et al.*, 2004; Méndez *et al.*, 2004).

1.6.2. Adaptation à la température

La température est un paramètre environnemental impliqué dans la conservation et la transformation des aliments, elle peut également conditionner l'adaptation d'espèces alimentaires pathogènes telles que les bactéries du groupe *B. cereus* (Guinebretière *et al.*, 2008). L'adaptation de *B. cereus* aux fluctuations de température et aux basses températures en particulier a été largement étudiée. Ces travaux ont mis en évidence l'implication de mécanismes mettant en jeu les protéines de choc froid (cold shock protein) induites après la baisse de température (Mayr *et al.*, 1996), les hélicases à ARN (Pandiani *et al.*, 2010), et l'augmentation des acides gras insaturés de la membrane plasmique pour maintenir sa fluidité (Diomande *et al.*, 2015).

1.6.3. Adaptation aux bas pH

La plupart des bactéries se développent de manière optimale à un pH compris entre 7 et 7,5. Les agents pathogènes alimentaires tels que *B. cereus* rencontrent des fluctuations de pH dans les matrices alimentaires et sont exposés à l'acidité gastrique après leur ingestion par l'hôte (Clavel *et al.*, 2004). Les cellules végétatives de *B. cereus* s'adaptent au bas pH en induisant une réponse de tolérance à l'acide (*ATR*, *Acid Tolerance Response*) (Thomassin *et al.*, 2006). Cette réponse implique le maintien de l'homéostasie du pH interne, l'alcalinisation du milieu extérieur, ainsi que des modifications métaboliques. Des modifications de la membrane cellulaire et la synthèse de protéines de stress permettant de protéger, réparer et dégrader les macromolécules ont également été rapportées (Jobin *et al.*, 2002; Le Lay *et al.*, 2015; Duport *et al.*, 2016).

1.6.4. Adaptation à la pression en oxygène

Pour distinguer les différents niveaux d'oxygénation que les cellules bactériennes peuvent rencontrer, trois termes ont été proposés : "normoxie" qui désigne la teneur en oxygène atmosphérique, « l'hypoxie » qui représente des concentrations d'oxygène inférieures à la normale et « l'anoxie » où l'oxygène est totalement absent (Duport *et al.*, 2016; Zeitouni *et al.*, 2016). *B. cereus* est capable de survivre et de se multiplier dans ces différentes conditions qui prévalent dans son environnement naturel ou chez son hôte. L'intestin, par exemple, est particulièrement remarquable en raison de son fort gradient d'oxygénation, s'étendant de la muqueuse sous-épithéliale fortement vascularisée et oxygénée (4-8 %), jusqu'à la lumière

intestinale fortement déficiente en oxygène (<2 %) en raison de la présence d'une flore aéro-anaérobie facultative qui le consomme (Zeitouni *et al.*, 2016).

En plus de son rôle fondamental pour la survie de *B. cereus*, la disponibilité en oxygène conditionne le métabolisme énergétique de la bactérie.

Le métabolisme énergétique de *B. cereus*

B. cereus, comme la plupart des bactéries pathogènes, est capable de cataboliser divers substrats carbonés. La dégradation de ces composés organiques génère de l'énergie sous forme d'équivalent réducteur et d'ATP ainsi que des précurseurs biosynthétiques nécessaires à la cellule. Les travaux d'Ivanova *et al.* en 2003 ont montré que le nombre de gènes codant pour les enzymes impliquées dans le catabolisme des acides aminés est plus élevé que celui des gènes codeant pour les enzymes impliquées dans le catabolisme des glucides, ce qui suggère que *B. cereus* a une prévalence pour le catabolisme des protéines, des peptides et des acides aminés par rapport au catabolisme des glucides (Ivanova *et al.*, 2003). Cependant, le glucose demeure une source de carbone importante, privilégiée par rapport aux acides aminés chez la souche *B. cereus* ATCC14579. C'est pourquoi nous nous focaliserons plus particulièrement sur les différentes voies du catabolisme du glucose chez *B. cereus* (**Figure 1.7 cf. p.18**).

Le catabolisme du glucose

Chez *B. cereus*, la glycolyse (ou voie d'Embden–Meyerhof–Parnas) est la principale voie de dégradation du glucose, la voie secondaire des pentoses phosphates intervenant dans une moindre mesure (Duport *et al.*, 2016; Zigha *et al.*, 2006). Ces deux voies sont contrôlées l'une par rapport à l'autre en fonction des besoins cellulaires en ATP et en précurseurs biosynthétiques (NADPH et ribose-5 phosphate) (Stincone *et al.*, 2015) (**Figure 1.4**).

❖ La glycolyse

La dégradation du glucose se fait dans le cytoplasme, indépendamment des conditions d'oxygénation. La glycolyse fait intervenir 10 enzymes pour métaboliser une molécule de glucose. Elle peut être divisée en deux principales étapes. La première étape implique le transport du glucose vers le cytoplasme et sa phosphorylation par le Système PhosphoTransférase (PTS) (Deutscher *et al.*, 2006; Duport *et al.*, 2016). Il est ensuite clivé en deux triose- phosphates. Dans un deuxième temps, chaque molécule de triose-phosphate est oxydée pour former une molécule de pyruvate qui constitue le produit final de la voie (Romeo and Snoep, 2005).

La première partie de la voie glycolytique, consomme par molécule de glucose, deux molécules d'ATP. Dans la deuxième partie de la voie, il y a une production de quatre molécules d'ATP, deux molécules de pyruvate et deux coenzymes réduits (NADH) (Jurtshuk, 1996) (**Figure 1.4**). Le bilan des réactions pour la glycolyse est donc:



❖ **La voie des pentoses-phosphates**

La voie des pentoses-phosphates (PPP), également connue sous le nom de voie des hexoses monophosphates, est composée de deux phases. La première est une phase oxydative et irréversible au cours de laquelle deux molécules de NADP⁺ sont réduites en NADPH, en utilisant l'énergie provenant de la conversion du glucose-6-phosphate (G6P) en ribulose 5-phosphate qui est un précurseur pour la synthèse des nucléotides. La deuxième phase dite non oxydative donne naissance à des composés pouvant rejoindre la glycolyse ou encore à l'érythrose-4-phosphate, qui peut contribuer à la formation d'acides aminés aromatiques tels que la phénylalanine, le tryptophane, l'histidine et la tyrosine (Stincone *et al.*, 2015) (**Figure 1.4**). L'équation de cette voie est donc :

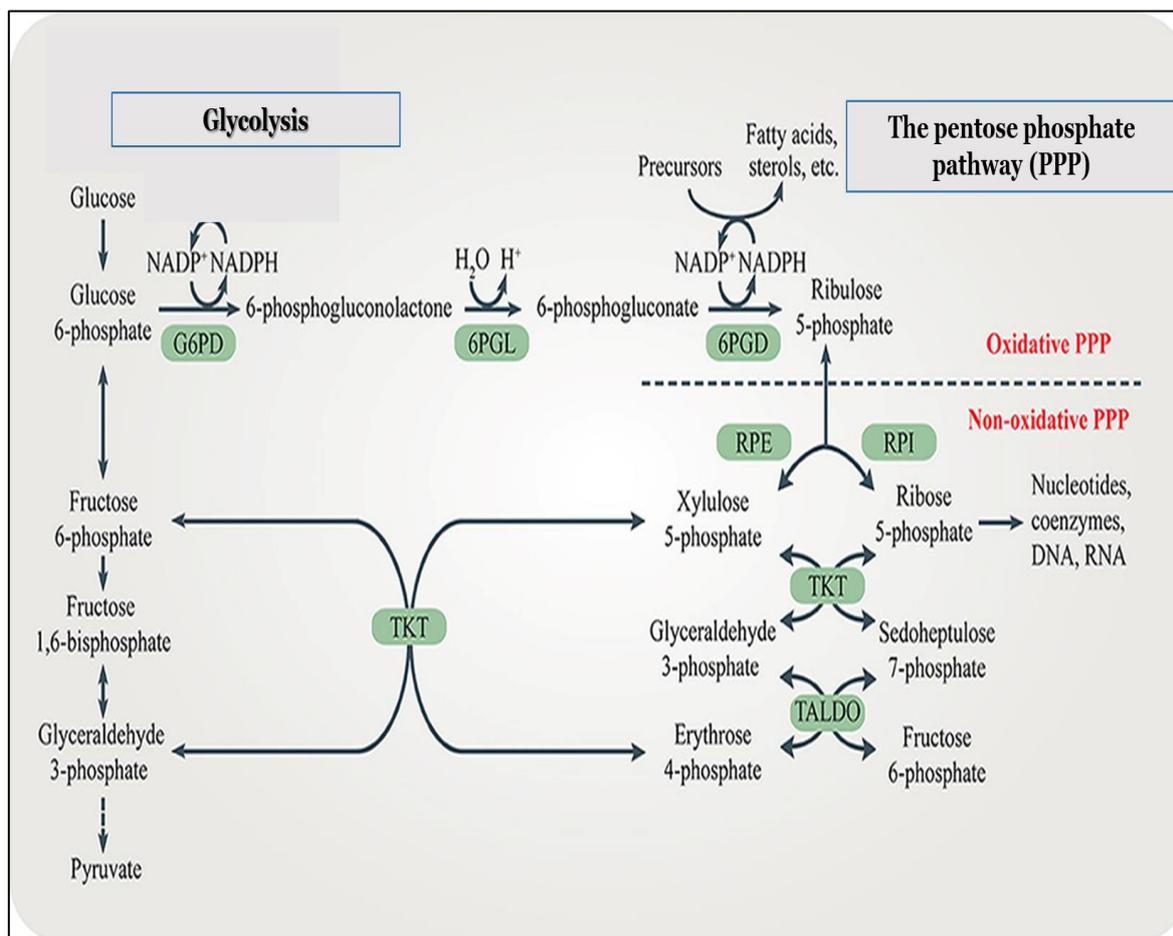
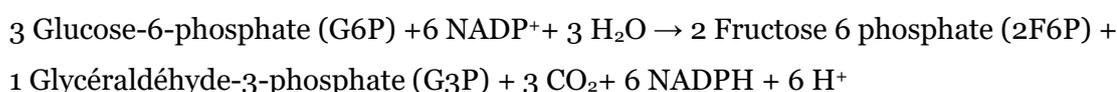


Figure 1.4. Représentation schématique de la voie de la glycolyse et de la voie des pentoses phosphates d'après (Ge *et al.*, 2020). G6PD : Glucose-6 Phosphate Déshydrogénase ; 6PGL : 6-Phosphogluconase ; 6PGD : 6-Phosphogluconate Déshydrogénase ; RPE : Ribulose-5-Phosphate Epimérase ; RPI : Ribulose-5-Phosphate Isomérase ; TKT : Transkétole ; TALDO : Transaldolase.

❖ Le métabolisme du pyruvate

L'acide pyruvique est le plus simple des α -cétoacides. Il est considéré comme le centre du métabolisme, car il est situé dans un nœud appelé nœud anaplérotique qui dirige le flux de carbone vers les directions appropriées (Sauer and Eikmanns, 2005). En fonction de la disponibilité de l'oxygène, les voies empruntées sont différentes.

• Le métabolisme aérobie

En présence d'oxygène, le pyruvate subit une décarboxylation oxydative. Cette réaction est catalysée par le complexe pyruvate déshydrogénase (Pdh) constitué de trois enzymes : la pyruvate déshydrogénase, la dihydrolipoamide acétyltransférase et la dihydrolipoamide déshydrogénase. Elles interviennent de manière séquentielle pour transformer le pyruvate en Acétyl coenzyme A (Acétyl~CoA) (Patel *et al.*, 2014). Le groupe acétyle de l'Acétyl~CoA est ensuite oxydé dans le cycle de Krebs.

a) Le cycle de Krebs

Le cycle de Krebs (appelé aussi cycle des acides tricarboxyliques ou cycle du citrate) est le vecteur central du métabolisme énergétique (**Figure 1.5**). Il permet, à travers une série de 8 réactions, la décarboxylation complète de l'Acétyl~CoA en CO_2 . En effet, le groupement acétyle qui est une molécule à deux carbones réagit avec l'oxaloacétate à quatre carbones pour former le citrate une molécule à six carbones. Cette molécule subit deux réactions d'oxydoréductions et libère deux carbones sous forme de CO_2 et deux molécules de NADH. Ainsi, elle est transformée au cours du cycle pour régénérer une molécule d'oxaloacétate (Alabduladhem and Bordoni, 2020). Dans l'ensemble, les réactions du cycle de Krebs génèrent des intermédiaires tels que l'alpha-cétoglutarate, et le succinate qui sont des éléments de base pour un grand nombre de processus importants, notamment la synthèse des acides gras, des acides aminés et des acides nucléiques utilisés dans la synthèse de l'ADN (Mailloux, 2015). Le cycle de Krebs génère aussi une molécule d'ATP (GTP), et des coenzymes réduits FADH_2 et NADH. L'énergie chimique fournie par le cycle de Krebs est contenue dans les composés réduits (FADH_2 et NADH) qui contiennent une paire d'électrons ayant un haut potentiel de transfert (Duport *et al.*, 2016; Jurtschuk, 1996). Les électrons de ces coenzymes sont transférés *via* une chaîne de transporteurs jusqu'à l'accepteur final d'électron.

Il a été observé chez *B. cereus* que, dans des conditions anaérobies fermentaires, que l'activité du cycle de Krebs est réduite au niveau minimum nécessaire pour alimenter les voies de biosynthèse et fonctionne en deux demi-cycles d'orientations opposées (**Figure 1.5**) (Duport *et al.*, 2016).

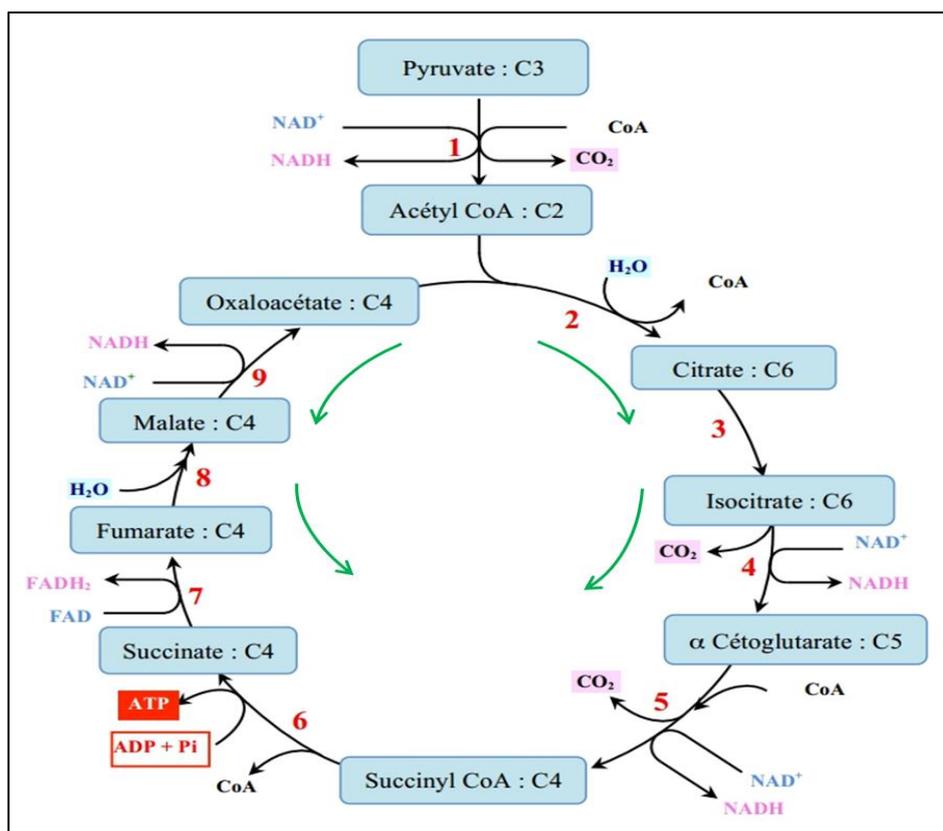


Figure 1.5. Décarboxylation oxydative du pyruvate et cycle de Krebs. Les métabolites et le nombre de carbone correspondant sont encadrés en bleu. Les deux demi-cycles d'orientation opposée mis en jeu lors de la croissance fermentaire sont indiqués en vert. Les noms des enzymes :1) Complexe pyruvate déshydrogénase ;2) Citrate synthétase ; 3) Aconitase ; 4) Isocitrate déshydrogénase ;5) α -cétoglutarate déshydrogénase ;6) Succinyl-CoA synthétase ;7) Succinate déshydrogénase ;8) Fumarase ;9) Malate déshydrogénase. (Source de l'image : Cours CBSV)

b) Respiration aérobie

La réoxydation des coenzymes produits par la glycolyse et le cycle de Krebs s'accompagne du transfert des électrons, *via* la chaîne respiratoire, jusqu'au dioxygène, (O_2) en condition aérobie. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire n'a pas été étudié d'une manière approfondie chez *B. cereus* mais il ressemble à celui décrit chez *Bacillus subtilis* (Melo and Teixeira, 2016). Chez *B. subtilis*, la chaîne respiratoire est composée d'une NADH déshydrogénase membranaire responsable du transfert d'électrons vers la ménaquinone (Q). La ménaquinone sert d'intermédiaire dans le transport d'électrons entre la déshydrogénase et les oxydoréductases terminales chargées de réduire l'accepteur final d'électrons (**Figure 1.7 cf. p.18**). Chez *B. cereus*, le transport d'électrons vers les oxydoréductases se réalise à travers deux voies principales : dans la première, les électrons transitent vers le complexe *bc*, le cytochrome *c* et la cytochrome oxydase *caa3* ; dans la seconde, ils se dirigent vers les quinol oxydases (cytochromes *bd* ou *aa3*)(Duport *et al.*, 2016). La réaction finale est la réduction de

la molécule de dioxygène en une molécule d'eau (H₂O). Ainsi, le transfert d'électrons se fait du composant ayant le plus faible potentiel d'oxydo-réduction vers celui dont le potentiel d'oxydo-réduction est le plus élevé. Ce fonctionnement de la chaîne respiratoire permet de créer un gradient de protons à travers la membrane. Ces protons sont récupérés par l'ATP synthase (F₁F₀-ATPase) qui catalyse la phosphorylation oxydative. Cette protéine est un hétérodimère : la sous-unité F₀ est un canal assurant l'entrée des ions H⁺ et la sous-unité F₁ synthétise les molécules d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Jurtschuk, 1996).

• Le métabolisme anaérobie

En l'absence d'oxygène, la réoxydation des coenzymes réduits générés lors de la glycolyse s'accompagne soit du transport des électrons au travers d'une chaîne respiratoire anaérobie (respiration anaérobie) soit de la réduction du pyruvate ou de ses dérivés (fermentation anaérobie).

a) Respiration anaérobie

L'accepteur final d'électrons est généralement un composé inorganique oxydé qui sert à qualifier le type de respiration. Ainsi, dans la respiration sulfate, l'ion sulfate SO₄²⁻ est réduit en sulfure d'hydrogène H₂S ; dans la respiration fumarate, le fumarate est réduit en succinate. Pour la respiration des nitrates, l'ion nitrate NO₃⁻ est réduit en nitrite NO₂⁻, puis en dioxyde d'azote N₂O ou en azote N₂. *B. cereus* est doté d'une chaîne respiratoire anaérobie fonctionnelle qui utilise NO₃⁻ comme accepteur final d'électrons. Il est réduit en NO₂⁻ grâce au complexe enzymatique nitrate réductase (NarGHI) (Rosenfeld *et al.*, 2005). *B. cereus* peut aussi transformer le nitrite en ion ammonium (NH₄⁺) à travers le complexe nitrite réductase (NasDE) (Duport *et al.*, 2016). La respiration nitrate est privilégiée par rapport à la fermentation car elle génère plus d'énergie (Rosenfeld *et al.*, 2005).

b) Fermentation

L'accepteur d'électrons est le pyruvate ou ses dérivés enzymatiques. La réduction du pyruvate génère différents produits de fermentation tels que l'acide lactique, l'éthanol, l'acide acétique ou l'acide butyrique (Jurtschuk, 1996).

A pH neutre, *B. cereus* catabolise le pyruvate suivant une fermentation de type acide mixte. Elle se caractérise par la production de lactate, d'acétate, de succinate, d'éthanol, de formiate et de CO₂ (**Figure 1.6**). La formation de ces produits finaux dépend de la présence de certaines enzymes clés, leur proportion étant liée aux conditions de croissance de la bactérie (Clair *et al.*, 2012; Duport *et al.*, 2004; Laouami *et al.*, 2011; Messaoudi *et al.*, 2010). La réduction du pyruvate en lactate est catalysée par les lactates déshydrogénase (LdhA, LdhB et LdhC). L'Acétyl~CoA, produit de la décarboxylation du pyruvate qui est catalysée essentiellement par la pyruvate formate lyase (Pfl) en anaérobiose, est converti d'une part en acétate par

l'intermédiaire de la phosphate acétyltransférase et de l'acétate kinase et d'autre part en éthanol *via* l'aldéhyde et l'alcool déshydrogénase. La formation d'une molécule d'acétate s'accompagne de la production d'une molécule d'ATP, celle d'éthanol de la réoxydation de deux molécules de NADH. La formation de formiate est concomitante à la production d'acétyl-CoA et est catalysée par la pyruvate formate lyase (Pfl). Le succinate est généré par la pyruvate carboxylase à partir du pyruvate ou par la phosphoénolpyruvate carboxylase à partir du phosphoénolpyruvate. Le lactate est le métabolite majoritaire chez *B. cereus* à pH7. A pH acide, la bactérie métabolise une partie du pyruvate en acétoine qui est ensuite réduite en 2,3-butanediol (**Figure 1.6**) (Le Lay *et al.*, 2015).

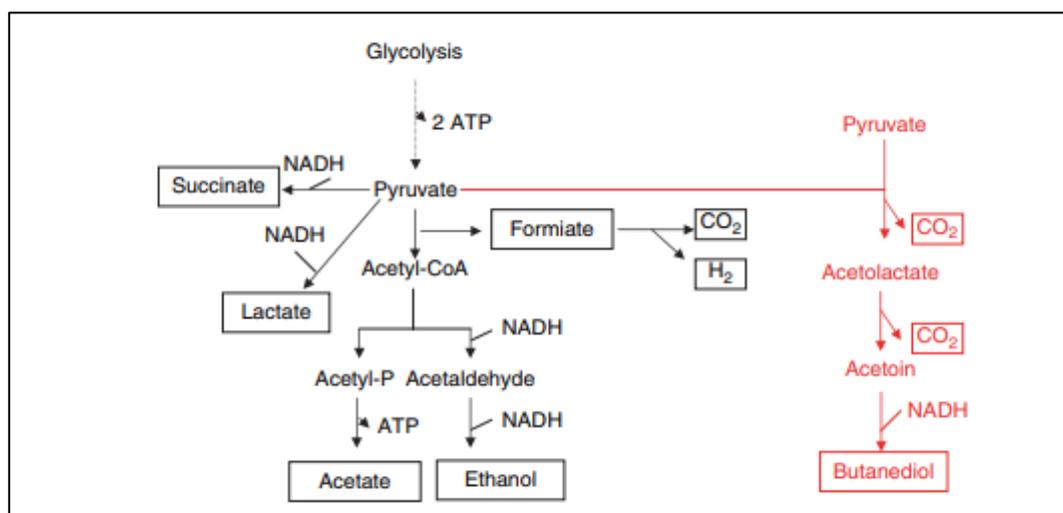


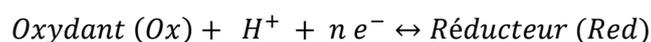
Figure 1.6. Produits finaux de la fermentation des acides mixtes et du butanediol (Ciani *et al.*, 2013).

1.7. Adaptation au potentiel redox

Le potentiel d'oxydation/réduction (POR, potentiel redox ou Eh) comme le pH et la pression d'oxygène (pO₂), est un paramètre intrinsèque d'un milieu biologique, qui influence la croissance des microorganismes, notamment celle de *B. cereus*.

1.7.1. Définition du potentiel d'oxydo-réduction

Le POR est un paramètre physico-chimique permettant de mesurer la disponibilité en électrons dans un système donné. Le POR d'un système est donc une mesure (en millivolts) entre les formes oxydées et réduites dans une solution. Un système réducteur a tendance à céder des électrons, et son potentiel redox est négatif. En revanche, un système oxydant a une valeur de POR positive et capte des électrons (Jacob, 1970). Les réactions d'oxydation-réduction typiques sont représentées par l'équation ci-dessous dans laquelle n représente le nombre d'électrons mis en jeu :



À cette équation est associée l'équation de NERNST qui établit la relation entre le potentiel redox et les concentrations des espèces oxydées et réduites (Reichart *et al.*, 2007).

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \frac{[Ox] \cdot [H^+]}{[Red]}$$

E: potentiel d'oxydoréduction du couple ox/red en volts ; E^o: potentiel de l'électrode de référence en volts ; T: Température exprimée en degrés Kelvin ; F: la constante de Faraday = 96 485 C/mol; R: Constante des gaz parfaits = 8,314 J mol⁻¹ K⁻¹.

1.7.2. Mesure électrochimique du potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel redox est mesuré avec une cellule électrochimique, dans laquelle la différence de potentiel est déterminée entre une électrode inerte en contact avec un couple redox en solution et une électrode de référence (Jacob, 1970).

a) Électrode de mesure

L'électrode de mesure est inerte, c'est-à-dire qu'elle n'intervient pas dans la réactivité du système redox, mais elle agit seulement comme un conducteur d'électrons vers ou depuis le système lorsque le circuit est connecté. L'électrode est donc constituée d'or (Au³⁺/Au) ou de platine (Pt²⁺/Pt) possédant des potentiels standard très élevés (Pt²⁺/Pt : +1118 mV et Au³⁺/Au : +1498 mV), ce qui lui permet d'être électro-chimiquement inerte *vis-à-vis* du milieu. Par conséquent, l'échange d'électrons avec l'environnement, avec les espèces oxydantes ou réductrices, est effectué par l'électrode de mesure (Prévost and Brillet-Viel, 2014).

b) Électrode de référence

Une électrode de référence est caractérisée par un potentiel constant obtenu entre deux composés en concentrations saturantes. Ainsi, les concentrations solubilisées dans l'électrode ne changent pas et l'équation de NERNST donne une valeur constante. L'électrode de référence utilisée pour mesurer le potentiel redox standard est l'électrode à hydrogène gazeux (H₂) (E_o=0). En raison de difficultés dans la technique de mise en œuvre de l'électrode à hydrogène H₂, d'autres électrodes sont utilisées, l'électrode argent/chlorure d'argent (Ag/AgCl) et l'électrode au calomel (HgCl₂) dont les potentiels sont bien connus (les valeurs respectives sont 207 mV et 244 mV à 25°C) (Jacob, 1970; Prévost and Brillet-Viel, 2014).

1.7.3. Le potentiel redox des systèmes biologiques

Les réactions d'oxydoréduction sont à la base des transferts d'énergie dans les systèmes biologiques. Le potentiel redox dépend de plusieurs facteurs dont les caractéristiques physico-chimiques du couple redox, le pH, ainsi que la pression partielle de l'oxygène.

La maîtrise du potentiel redox dépend essentiellement de la maîtrise de l'environnement gazeux, autrement dit de la concentration en oxygène dissout. En effet, l'oxygène est la molécule la plus oxydante d'un système biologique (E_o'= + 815 mV) et la modification de sa

concentration a une forte influence sur le potentiel redox (Prévost and Brillet-Viel, 2014; Tango and Ghaly, 1999). Ainsi, un milieu biologique exposé à l'oxygène à un potentiel redox élevé et la suppression de l'oxygène entraîne la diminution du potentiel redox. La présence d'oxygène dans les aliments entraîne leur oxydation et crée des conditions favorables à la flore bactérienne d'altération. Pour cette raison et afin d'augmenter la durée de conservation des aliments transformés, l'industrie alimentaire utilise différentes techniques pour créer une atmosphère inerte, les plus connues étant : le conditionnement sous vide qui consiste à supprimer l'oxygène de l'environnement de l'aliment et le conditionnement sous atmosphère modifiée qui a pour principe de remplacer l'oxygène par des gaz inertes qui n'ont pas d'effet néfaste sur la stabilité des composés alimentaires (azote, hydrogène, dioxyde de carbone) (Prévost and Brillet-Viel, 2014; Liu *et al.*, 2017).

1.7.4. Relation entre le potentiel redox et la croissance bactérienne

Le POR indique non seulement la capacité de réduction et d'oxydation de l'environnement mais reflète également l'activité métabolique des microorganismes. Les premiers travaux qui ont élucidé la relation entre le POR et la croissance bactérienne ont montré que le potentiel redox d'une culture bactérienne varie au cours de la croissance, et que les activités métaboliques (respiration, fermentation) induisent des variations du POR. L'un des mécanismes importants impliqués dans cette variation du redox est la consommation d'oxygène et/ou la production de composés réducteurs (Jacob, 1970). Des études récentes suggèrent l'implication des thiols situés à la surface des cellules (appelés également thiols exofaciaux) dans la capacité de réduction de *Lactococcus lactis* et *Listeria monocytogenes* (Michelon *et al.*, 2010; Pillot *et al.*, 2018).

Il a été établi que les variations du POR impactent la physiologie des microorganismes, en modifiant les flux carbonés. Ainsi, la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* à bas POR, favorise la production de glycérol aux dépens de la production d'éthanol et d'acétate (Prévost and Brillet-Viel, 2014). En conditions oxydantes (haut POR), les bactéries lactiques telles que *Leuconostoc* et *Lactococcus. lactis subsp. diacetylactis* métabolisent le citrate en diacétyl (Prévost and Brillet-Viel, 2014). Chez *Escherichia coli*, les variations du POR affectent les flux métaboliques en favorisant la formation de lactate au détriment de l'Acétyl-CoA (Riondet *et al.*, 1999)

Les travaux menés au laboratoire sur l'adaptation de *B. cereus* au potentiel redox, ont montré qu'à faible POR, les productions de lactate et d'éthanol sont favorisées ainsi que la synthèse des entérotoxines HBL et Nhe (Zigha *et al.*, 2006).

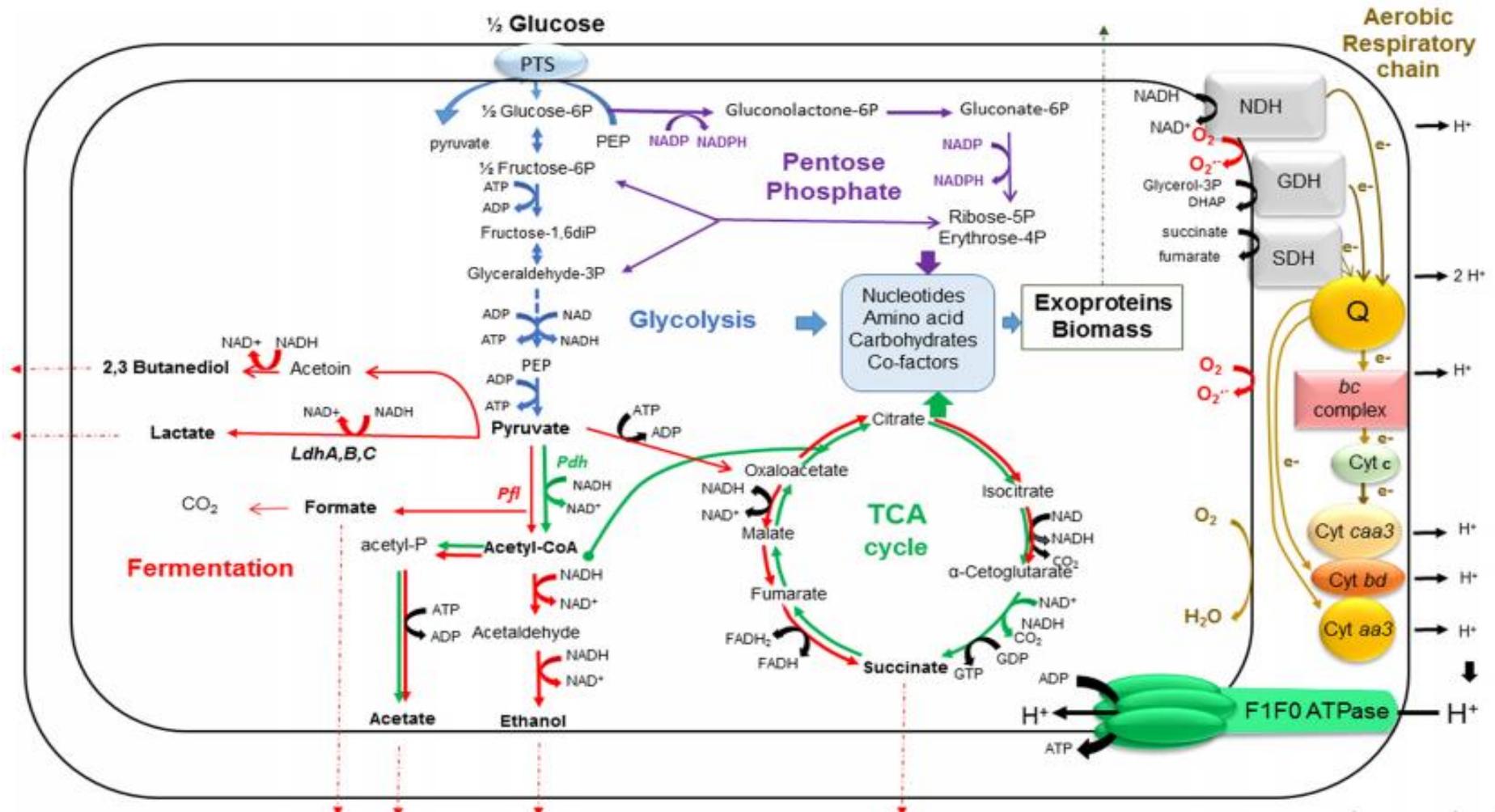


Figure 1.7. Schéma récapitulatif du métabolisme central de *B. cereus*. D'après (Duport *et al.*, 2016). Glycolyse (bleu), PPP (violet), Voies fermentaires (rouge), cycle de Krebs (TCA cycle) (vert), chaîne respiratoire aérobie (marron). PTS : Phosphotransférase. Ldh : lactate déshydrogénase; Pdh : pyruvate déshydrogénase; Pfl : pyruvate formate lyase; NDH, NADH: ménaquinone réductase; SDH, succinate: ménaquinone oxydoréductase; GDH, glycerol-3-P: ménaquinone réductase, Q : ménaquinone. ; Cyt c : cytochrome C ; cytochrome oxydase caa3. Cyt bd /Cyt aa3 : quinol oxydase.

2. L'homéostasie redox et les systèmes antioxydants cellulaires

2.1. L'homéostasie redox et le stress oxydant : une question d'équilibre

Au sein des cellules vivantes, de nombreuses fonctions métaboliques sont assurées en maintenant l'équilibre entre les formes oxydées et réduites des principales couples redox intracellulaires, telles que le nicotinamide adénine dinucléotide (NAD), le nicotinamide adénine dinucléotide phosphatase (NADP) et les thiols de faible poids moléculaire (LMW thiol). Cet état d'équilibre est appelé homéostasie redox (Sporer *et al.*, 2017). Cependant, les cellules vivantes sont toujours exposées à des stimuli intracellulaires et extracellulaires qui génèrent un stress oxydant altérant l'homéostasie redox. Le stress oxydant est principalement dû à la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Forman *et al.*, 2004). En quantités trop élevées, celles-ci peuvent endommager les composants cellulaires. Cependant, en conditions physiologiques, ils sont en quantité moindre et jouent un rôle important dans le maintien de nombreuses fonctions cellulaires (Forman *et al.*, 2004). Pour faire face au stress oxydant, les organismes vivants, dont les bactéries, ont acquis des mécanismes d'adaptation, notamment des systèmes antioxydants, enzymatiques et non enzymatiques.

Nous décrivons dans cette section les mécanismes de production des dérivés de l'oxygène, leurs origines, leurs conséquences sur les cellules et le rôle des systèmes antioxydants.

2.2. Apparition de l'oxygène

Il y a quatre milliards d'années, les procaryotes vivaient sur terre dans une atmosphère dépourvue d'oxygène et utilisaient la fermentation pour produire de l'énergie (Halliwell, 2006b; Kasting, 1993). Quelques millions d'années plus tard, les cyanobactéries ont fait leur apparition et leur métabolisme photosynthétique serait à l'origine de l'arrivée de l'oxygène sur terre (Dismukes *et al.*, 2001). La présence d'oxygène offrait alors la possibilité à des bactéries anaérobies d'améliorer leur production de l'énergie. Ces bactéries se sont adaptées à sa présence et ont utilisé l'oxygène comme accepteur final d'électron (Halliwell, 2006b). Cependant, l'oxygène est également une menace car il est à l'origine de molécules très toxiques : les espèces réactives de l'oxygène et les radicaux libres (Martinez-Cayuela, 1995).

2.3. Les radicaux libres

Le terme radical libre renvoie à un atome ou une molécule contenant un ou plusieurs électrons non appariés (Halliwell, 2006a). Un électron non apparié est un électron qui occupe seul, une orbitale atomique ou moléculaire, ce qui rend le radical instable et très réactif (Phaniendra *et al.*, 2015). Pour se stabiliser, le radical libre se fixe sur une molécule, transformant cette dernière en radical libre à son tour. En raison de leur réactivité, les radicaux libres peuvent causer des dommages aux systèmes biologiques en un temps très bref (Halliwell, 2006b).

2.4. Les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS)

Le dioxygène (O_2), communément appelé « oxygène », est un élément essentiel à la vie et un puissant oxydant (POR = +815 mV). Du point de vue chimique, c'est une molécule biradicalaire possédant 2 électrons non-appariés sur la couche externe qui occupent des orbitales séparées avec des spins parallèles (Martinez-Cayuela, 1995; Imlay, 2003). En raison des directions parallèles des spins de ces électrons, la réactivité de l'oxygène est très faible (Martinez-Cayuela, 1995). Cependant, l'oxygène est susceptible de capter facilement un, puis deux électrons pour être partiellement réduit et former des dérivés d'oxygène appelées les espèces réactives d'oxygène (ROS : *Reactive oxygen species*) (Figure 1.8), qui sont d'une très grande réactivité et d'une courte demi-vie car ils se transforment immédiatement après leur formation.

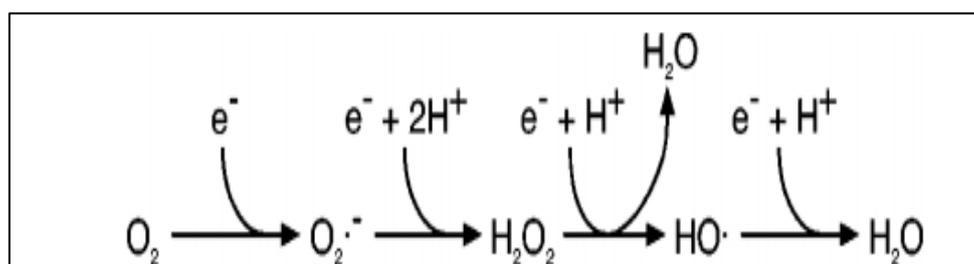
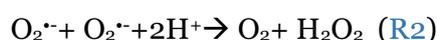
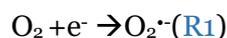


Figure 1.8. Formation des espèces réactives d'oxygènes (Imlay, 2003).

2.4.1. Le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

Le radical anionique superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est le ROS le plus répandu. Il est formé par l'ajout d'un électron à l' O_2 (réaction R1). Il a également la capacité de réagir avec un autre radical superoxyde dans une réaction de dismutation pour former à nouveau de l' O_2 et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (réaction R2). Dans un milieu acide, le radical superoxyde peut exister sous forme protonée et donner le radical hydroperoxyl (HO_2) qui est beaucoup plus réactif que $O_2^{\cdot-}$ (Imlay, 2003).



Le radical superoxyde a été considéré pendant longtemps comme très peu réactif *vis-à-vis* des biomolécules (Bielski and Richter, 1977). Cependant, il a été constaté qu'il oxyde le groupement thiol des protéines à des concentrations physiologiques, estimées à environ 10^{-10} M (Imlay, 2003). Chez les bactéries, le radical superoxyde est généré au niveau des éléments de la chaîne respiratoire tels que le cytochrome de types *b* et du coenzyme Q. Ces éléments peuvent libérer des électrons qui réduisent partiellement l'oxygène menant à la formation du $O_2^{\cdot-}$ (Messner and Imlay, 1999). Chez *E. coli*, il a été estimé que la formation $O_2^{\cdot-}$ représente 0,2 % de l'oxygène respiré au niveau de la chaîne respiratoire (Imlay, 2003).

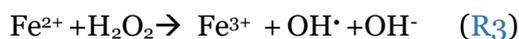
2.4.2. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est formé essentiellement par la dismutation du radical superoxyde qui est catalysé par la superoxyde dismutase (SOD) (R2)(Imlay, 2003). Il peut être généré également par transfert de deux électrons des enzymes de la chaîne respiratoire vers l'oxygène. Cette auto-oxydation se produit essentiellement pour les enzymes contenant des flavines telles que la NADH déshydrogénase II, la succinate déshydrogénase, la sulfite réductase et la fumarate réductase (Messner and Imlay, 1999; González-Flecha and Demple, 1995).

H₂O₂ ne possède pas d'électron célibataire et il n'est pas, à proprement parler, un radical libre. Cependant, il est très nocif pour les cellules car il peut diffuser facilement à travers les membranes biologiques, et générer en présence de cations métalliques tels que Fe²⁺ (réaction dite de Fenton) (R3) ou Cu²⁺, le radical hydroxyle (HO•) qui endommage l'ADN (Seaver and Imlay, 2004).

2.4.3. Le radical hydroxyle (HO•)

Le radical hydroxyle HO• est extrêmement réactif et d'une durée de vie très limitée (10⁻¹⁰ seconde). Il peut réagir avec des molécules organiques et inorganiques et peut causer de graves dommages aux cellules. Il est considéré également comme le plus puissant oxydant généré dans les cellules (Imlay, 2003). La principale source de HO• est la réaction de Fenton dans laquelle H₂O₂ réagit avec des ions métalliques (Fe²⁺) (R3). Il est aussi formé suite à la réaction de Haber-Weiss entre O₂•⁻ et H₂O₂ (R4) (Imlay, 2003).

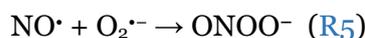


2.4.4. L'oxygène singulet (¹O₂)

L'oxygène singulet (¹O₂) est un dérivé d'oxygène non radicalaire. Il représente un état excité d'O₂ dans lequel le spin d'un des deux électrons non appariés est modifié pour donner deux électrons avec des spins opposés (Martinez-Cayuela, 1995). ¹O₂ apparaît principalement lors des réactions photochimiques (Imlay, 2003), de l'activation des neutrophiles et éosinophiles (Kanofsky, 1989; Hampton *et al.*, 1998) et par des réactions enzymatiques catalysées par des enzymes telles que les lipoxygénases et les dioxygénases (Kanofsky, 1989; Hayaishi and Nozaki, 1969). Il est caractérisé par une durée de vie assez longue dans une cellule et peut diffuser à travers la membrane cytoplasmique vers l'espace extracellulaire. Par ailleurs, une étude sur sa toxicité a montré qu'il peut agir sur l'ADN (Sies and Menck, 1992).

2.5. Les dérivés réactifs de l'azote (RNS)

Les espèces réactives de l'azote (RNS : *Reactive Nitrogen Species*) sont des espèces chimiques azotées très réactives et leur interaction avec les macromolécules peut entraîner différentes altérations (Tharmalingam *et al.*, 2017). L'oxyde nitrique (NO^\bullet) est le principal RNS dans les cellules et est synthétisé par des enzymes telles que les NO synthases et NO_3^- réductases (Tharmalingam *et al.*, 2017). Il est également au centre de la formation des autres RNS (Figure 1.9). Les RNS, présentes en quantité contrôlée dans les cellules, jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus biologiques et participent à des voies de transduction du signal (Tharmalingam *et al.*, 2017). Néanmoins, leur accumulation dans les cellules génère un stress nitrosatif (Martínez and Andriantsitohaina, 2009; Ali *et al.*, 2013). Les RNS sont générés lorsque l'oxyde nitrique NO^\bullet interagit avec des espèces réactives de l'oxygène comme dans l'exemple ci-dessous (R5) où il réagit avec $\text{O}_2^{\bullet-}$ pour produire l'ion peroxyneutre ONOO^- (NO_3^-):



Le peroxyneutre est une molécule très réactive et très toxique qui peut réagir directement avec diverses cibles biologiques et composants cellulaires, comme les lipides, les résidus d'acides aminés, les bases de l'ADN et les antioxydants de faible masse moléculaire (Beckman and Koppenol, 1996; Douki and Cadet, 1996). En outre, le peroxyneutre peut réagir avec CO_2 pour former d'autres types de RNS très réactives, notamment le nitroso-peroxo-carboxylate (ONOOCO_2^-) et l'acide peroxyneutre (ONOOH) (Phaniendra *et al.*, 2015).

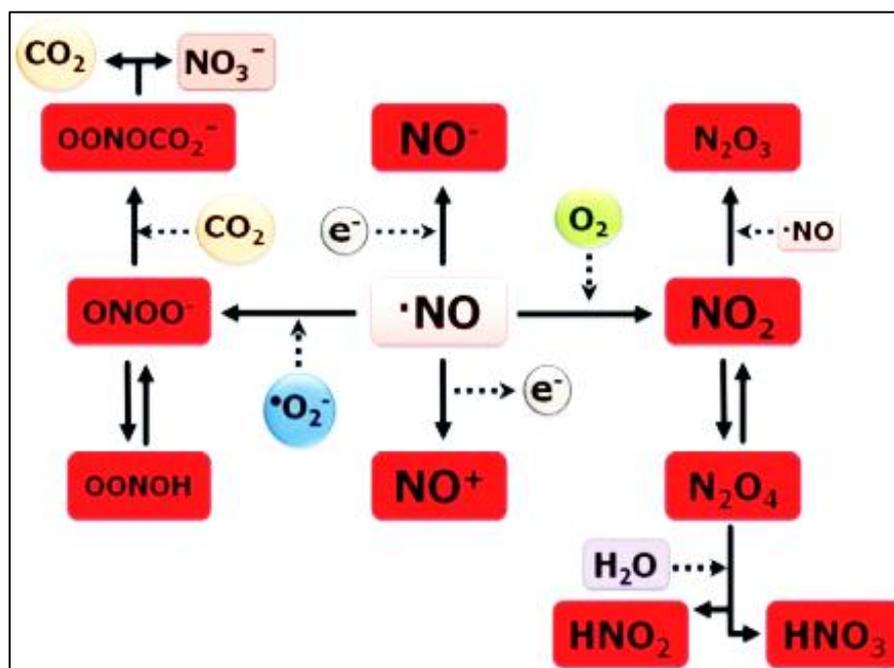


Figure 1.9. Formation des espèces réactives d'azote à partir de l'oxyde nitrique (NO^\bullet) (Tharmalingam *et al.*, 2017).

2.6. Les dérivés réactifs du chlore (RCS)

Le principal dérivé réactif du chlore (RCS : *Reactive Chlorine Species*) est l'acide hypochloreux (HOCl), qui est le principe actif de l'eau de javel (NaOCl). Il est utilisé comme agent désinfectant et contribue d'une manière importante à la destruction des pathogènes par le système immunitaire inné (Gray et al., 2013). Il est produit principalement dans les leucocytes, y compris les neutrophiles. Les neutrophiles détruisent les agents pathogènes envahissants en les ingérant par phagocytose, en libérant des enzymes digestives et en augmentant la consommation d'oxygène, ce qui induit une explosion oxydative (*oxidative burst*) (Hurst, 2012). En effet, l'oxygène est réduit par la NADPH oxydase (NOX), située dans la membrane des phagosomes en $O_2^{\cdot-}$. Ce dernier est dismuté en H_2O_2 qui sert de précurseur à plusieurs espèces toxiques. Parmi celles-ci, HOCl qui est produit à partir de la réaction entre H_2O_2 et l'anion chlorure (Cl), médiée par une enzyme hémique appelée myéloperoxydase (MPO) (R6) (Gray et al., 2013).



HOCl est un puissant oxydant qui interagit avec la plupart des macromolécules cellulaires. Cependant, les cibles les plus réactives sont les composés contenant du soufre tels que la cystéine, la méthionine ou le glutathion (Albrich et al., 1981) ainsi que les amines primaires et secondaires, qui, par réaction avec HOCl génèrent des chloramines considérées comme des RCS car elles sont capables de chlorer et d'oxyder d'autres molécules (Winterbourn, 1985).

2.7. Les sources de ROS

La production des différents ROS endogènes chez les bactéries est liée principalement à l'oxydation accidentelle des enzymes de la chaîne respiratoire telles que la NADH-ubiquinone oxydoréductase ou encore la cytochrome *c* oxydoréductase (Berrisford et al., 2016). En effet, en conditions aérobie la chaîne respiratoire des bactéries réduit continuellement l' O_2 en H_2O mais une petite quantité d'anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est également générée, suite à la réduction mono-électronique de l' O_2 (Seaver and Imlay, 2004). Par ailleurs, les bactéries peuvent rencontrer d'autres sources de ROS exogènes. Par exemple, les bactéries lactiques et les streptocoques buccaux utilisent les ROS comme agents bactéricides pour éliminer les bactéries compétitrices. En effet, lors de la conversion du pyruvate en acétyl-phosphate, la pyruvate oxydase induite par la présence d'oxygène génère des concentrations élevées de H_2O_2 . De son côté, la lactate oxydase catalyse la formation de pyruvate et de H_2O_2 à partir de L-lactate et de O_2 (Taniai et al., 2008). Les ROS participent en outre à la défense immunitaire pour faire face aux agents pathogènes tels que les mycobactéries. Dans ce cas, les cellules phagocytaires et les neutrophiles sont capable de produire un taux élevé de radicaux superoxydes *via* une activité NADPH oxydase membranaire (NOX) afin de tuer les bactéries (Hurst, 2012). Les pathogènes peuvent être éliminés également par les ROS produits par certains tissus non phagocytaires,

comme l'épithélium intestinal (Ha *et al.*, 2005). A ces sources exogènes de ROS, s'ajoutent des facteurs environnementaux, comme l'exposition à des métaux lourds (Markowicz *et al.*, 2010), et aux radiations ionisantes (UV) (De Jager *et al.*, 2017).

2.8. Les effets toxiques des ROS sur les cellules

Toutes les macromolécules cellulaires, (lipides, protéines et acides nucléiques) peuvent être endommagées par les radicaux libres de l'oxygène, ce qui donne lieu à des perturbations métaboliques et cellulaires.

2.8.1. Les lipides

La peroxydation lipidique est une conséquence du stress oxydant et est également un relais pour sa propagation. Ce processus est initié suite à l'attaque des radicaux hydroxyles ($\text{HO}\cdot$) sur les acides gras insaturés des phospholipides et d'autres composés lipidiques membranaires (**Figure 1.10**). Le processus global comprend trois étapes : l'initiation la propagation et la terminaison. Ainsi, au cours de la phase d'initiation, les lipides polyinsaturés (LH) perdent un atome d'hydrogène pour former un radical libre ($\text{L}\cdot$) (radical lipoylé). Ce radical réagit avec l'oxygène pour former un radical peroxyde instable ($\text{LOO}\cdot$). Les acides gras étant à proximité les uns des autres, la réaction va subir une propagation en chaîne où $\text{LOO}\cdot$ arrache un hydrogène à un acide gras insaturé voisin et devient un hydroperoxyde (LOOH), tandis que le deuxième acide gras subit les mêmes modifications (phase de propagation). Dans la réaction de terminaison des produits non radicalaires et des produits secondaires de la peroxydation lipidique sont formés (Cillard and Cillard, 2006). La peroxydation lipidique induit de graves altérations de la membrane cytoplasmique : elle diminue sa fluidité, sa perméabilité et sa capacité à fonctionner correctement (Farr *et al.*, 1988).

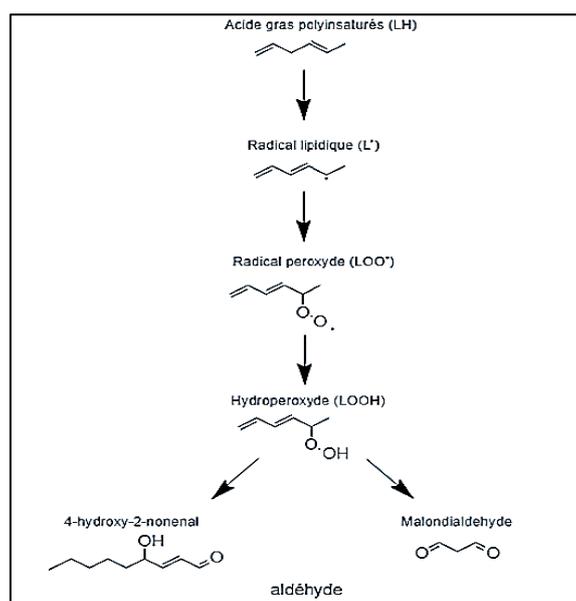


Figure 1.10. La peroxydation des lipides.

2.8.2. L'ADN

Une grande partie des dommages causés à l'ADN peut être attribuée aux ROS. Parmi les espèces réactives de l'oxygène, seul le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) réagit directement avec l'ADN (Marnett, 2000). Il peut agir sur l'ADN par divers mécanismes tels que des coupures de doubles ou simples brins, des pontages protéine-ADN, des dimérisations de deux thymines adjacentes au sein du même brin d'ADN ou encore l'oxydation des bases nucléiques. Parmi les bases azotées, la guanine est la plus susceptible de subir une oxydation vu son faible potentiel redox (1,29V) comparé au trois autres bases (Adénine 1,42V, Cytosine 1,6 V et la thymine 1,7V) (Kawanishi *et al.*, 2001). L'interaction du radical $\text{HO}\cdot$ avec la guanine conduit à la formation de 8-oxoguanine (**Figure 1.11**), un des produits d'oxydation les plus fréquents qui peut entraîner un appariement erroné avec l'adénine, ce qui se traduit par des mutations de type substitutions G vers T et C vers A dans le génome (Kawanishi *et al.*, 2001). Une conséquence directe des dommages causés par les ROS à l'ADN est la mutagenèse et la mort cellulaire. L'ADN étant sujet à des dommages oxydatifs, de nombreux mécanismes de réparation ont évolué pour protéger les cellules, et éviter l'accumulation de mutations au niveau du génome. Ces mécanismes procèdent à la réparation des molécules d'ADN à travers un certain nombre de voies, y compris la réparation par excision de bases et de nucléotides (Marnett, 2000).

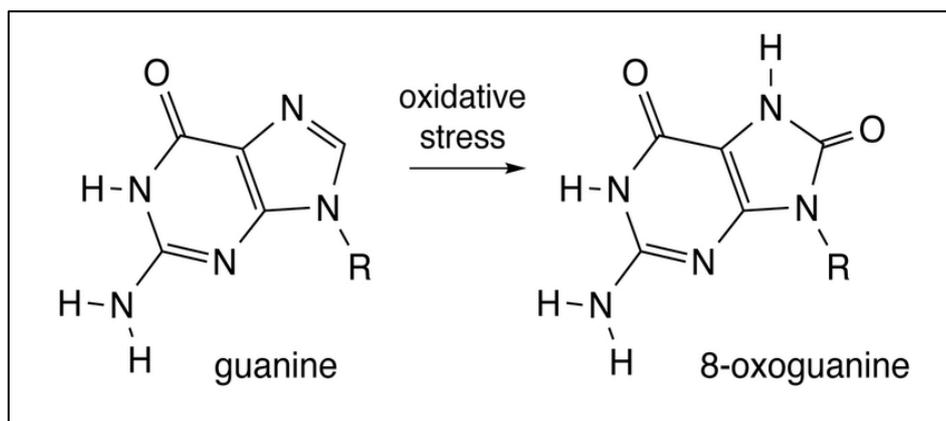


Figure 1.11. Oxydation de la guanine en 8-oxoguanine (Lanier and Williams, 2017).

2.8.3. Les protéines

Les protéines sont des cibles majeures des ROS. En effet, compte tenu de leur abondance, elles constituent environ 70 % des molécules biologiques oxydées dans la cellule. Par ailleurs, selon la nature de l'oxydant et des cibles, les protéines sont modifiées de différentes façons par les espèces réactives de l'oxygène (Davies, 2005). Les modifications des protéines par les ROS sont principalement initiées par la réaction avec $\text{HO}\cdot$. Cependant, le processus d'oxydation est déterminé par la disponibilité d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de H_2O_2 . Ensemble, ces espèces réactives peuvent conduire à différentes modifications, notamment l'oxydation de la chaîne carbonée principale et l'oxydation des chaînes latérales.

2.8.3.1. Oxydation et fragmentation de la chaîne carbonée principale

Le squelette des protéines peut être attaqué par les radicaux HO[•] sur le carbone alpha des acides aminés (le site d'attachement des chaînes latérales), pour former un radical centré sur le carbone. Ce radical peut ensuite réagir selon deux voies principales : en anaérobiose, deux radicaux centrés sur le carbone peuvent réagir entre eux pour former des liaisons croisées intra ou inter-protéiques. En présence d'O₂, le radical centré sur le carbone ainsi formé réagit rapidement avec O₂ pour former un radical peroxy. Ce radical passe par d'autres réactions pour donner naissance à un radical alkoxy qui induit une fragmentation de la chaîne polypeptidique (**Figure 1.12**) (Davies, 2005; Berlett and Stadtman, 1997).

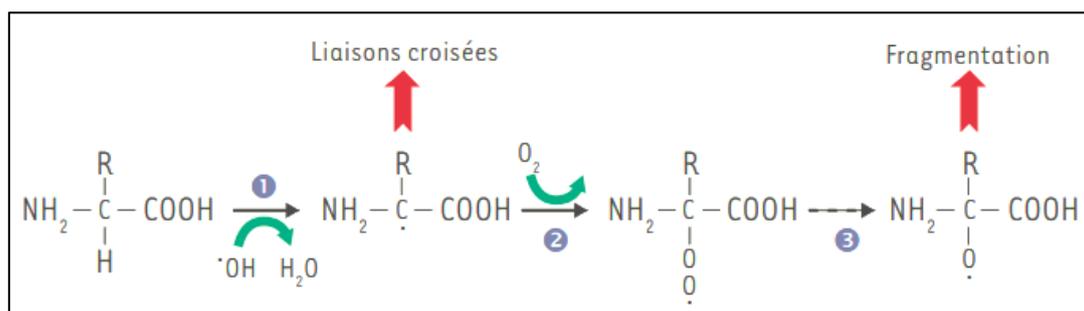


Figure 1.12. Oxydation de la chaîne polypeptidique (Migdal and Serres, 2011).

2.8.3.2. Oxydation de la chaîne latérale des acides aminés

Parmi les 20 acides aminés qui composent les protéines cellulaires, les acides aminés à chaînes latérales aromatiques (phénylalanine, tyrosine, tryptophane) et les acides aminés comportant des groupes sulfhydryles (cystéine et méthionine) sont potentiellement modifiés par les ROS. L'oxydation des phénylalanines entraîne la formation de dérivés mono- et di-hydroxylés, tandis que le résidu tryptophane est transformé en de nombreux dérivés hydroxylés, en formylkynurénine et en nitrotryptophane (Davies, 2005). Les acides aminés constituant la cible majeure des ROS sont ceux qui ont des groupes sulfhydryle. La méthionine oxydée donne majoritairement des méthionines sulfoxides et des méthionines sulfones, et la cystéine qui est l'acide aminé le plus nucléophile donne naissance à une multitude de formes oxydées (Davies, 2005).

2.8.3.3. Carbonylation des protéines

La carbonylation est généralement définie comme une modification post-traductionnelle irréversible qui produit une partie carbonyle réactive dans une protéine. Elle est considérée comme une oxydation globale, qui affecte un nombre considérable d'acides aminés. Les oxydations les plus connues sont celles de la proline, de l'arginine, et de la lysine. Cette modification induit la formation de cétone et d'aldéhyde, qui sont considérés comme des marqueurs généraux du stress oxydant dans les cellules (Stadtman and Levine, 2000).

2.9. Les systèmes impliqués dans l'homéostasie redox et les défenses anti-oxydantes

2.9.1. Les systèmes enzymatiques

Les bactéries synthétisent des enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant, dont les principales sont décrites ci-dessous :

2.9.1.1. La superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase (SOD) est la première enzyme bactérienne impliquée dans la neutralisation du radical superoxyde *via* la réaction de dismutation en O₂ et H₂O₂. Il s'agit d'une métallo enzyme existant sous quatre formes qui diffèrent par leur cofacteur : SOD à cuivre/zinc (Cu/Zn), SOD à manganèse (Mn), SOD à fer (Fe) et SOD à nickel (Ni). Certaines bactéries telles que *E. coli* possèdent plus d'une SOD. Chez *E. coli*, 3 enzymes ont été décrites : la SOD à Fe et la SOD à Mn sont cytoplasmiques, la SOD à Cu/Zn étant localisée dans le périplasma et protégeant la cellule des superoxydes exogènes (Barrière *et al.*, 2001; Benov and Fridovich, 1994). La SOD à Fe est produite indépendamment des conditions d'oxygénation du milieu de culture. La production de la SOD à Mn est dépendante de la phase de croissance et de l'oxygénation (Barrière *et al.*, 2001; Benov and Fridovich, 1994). La SOD à Mn est largement distribuée chez les procaryotes, notamment chez les bactéries à Gram positif telles que *Staphylococcus aureus*, *B. anthracis* et *B. subtilis* (Passalacqua *et al.*, 2006).

2.9.1.2. La catalase (Kat)

La catalase achève la dégradation de H₂O₂, généralement produit par la SOD, en H₂O et O₂. Elle joue également un rôle important dans la diminution de la formation du radical hydroxyle hautement réactif qui provient de H₂O₂ *via* la réaction de Fenton (Imlay, 2003; Chelikani *et al.*, 2004).

Les catalases sont regroupées phylogénétiquement en trois familles, selon leurs propriétés physiques et biochimiques. La catalase monofonctionnelle (KatE) est ubiquitaire chez les microorganismes et comporte de l'hème (noyau porphyrique) comme groupe prosthétique dans son site actif, nécessaire à son activité catalytique. La catalase-peroxydase (KatG), retrouvée uniquement chez les bactéries aérobies, a également un noyau porphyrique mais se distingue par son activité peroxydasique, d'où sa qualification de catalase bifonctionnelle (Chelikani *et al.*, 2004). Ces deux types d'enzymes sont les plus fréquentes chez les bactéries, et ont fait l'objet des premières études sur la régulation des gènes de catalase, notamment chez *E. coli* et *B. subtilis*. En effet, l'expression du gène codant pour KatG est contrôlée par l'activateur transcriptionnel OxyR et est induite en réponse à la présence d'H₂O₂ exogène (Storz and Tartaglia, 1992). Par ailleurs, KatE est produite en entrée de phase stationnaire sous le contrôle du régulateur σ^S (Panek and O'Brian, 2004). La troisième classe regroupe les catalases

contenant du manganèse (Mn) dans leur site actif et ont été découvertes chez des bactéries telles que *Thermus thermophilus* (Antonyuk et al., 2000) ou encore chez *Lactobacillus plantarum* (Barynin et al., 2001).

2.9.1.3. Les alkyl hydroperoxide reductases (Ahp)

La réaction des peroxydes avec les composants cellulaires tels que les lipides pourrait conduire à la production d'hydroperoxyde d'alkyle hautement réactif. L'élimination de ces peroxydes organiques est assurée par des enzymes de type alkyhydroperoxidase (Ahp) qui catalysent la réduction des peroxydes (ROOH) en leurs alcools correspondants (ROH). Chez les bactéries aérobies strictes et facultatives, deux protéines (AhpC et AhpF) agissent ensemble pour assurer cette réaction. AhpC est une petite protéine appartenant à la famille des peroxiredoxines 2-Cys typiques, qui possède une activité peroxydase grâce à ces deux cystéines redox-actives conservées. Elle catalyse la réduction du peroxyde. AhpF est une flavoprotéine de grande taille, liée aux thiorédoxines-réductases, qui restaure l'état réduit d'AhpC en transférant des électrons du NADH à l'AhpC (Rocha and Smith, 1999; Seaver and Imlay, 2001).

2.9.1.4. Les thiorédoxines (Trx)

Les thiorédoxines sont de petites protéines ubiquitaires de 12 kDa, possédant des sites actifs hautement conservés (Cys-Gly-Pro-Cys) utilisés pour coordonner la régulation de l'environnement redox cellulaire. Les résidus de cystéine du motif CGPC sont les éléments clés utilisés par les Trx pour briser les liaisons disulfures dans les protéines oxydées. Les thiorédoxines oxydées sont ensuite réduites par les thiorédoxines réductases (TrxR), en utilisant le NADPH comme cofacteur (Zeller and Klug, 2006).

L'activité réductrice des thiorédoxines a été bien caractérisée chez *E. coli* (Collet and Messens, 2010) et chez *B. subtilis* (Zheng et al., 2019). Les thiorédoxines ne sont pas seulement impliquées dans la réduction des protéines cytoplasmiques. Elles peuvent également fournir des équivalents réducteurs aux peroxiredoxines qui, à leur tour, réduisent l' H_2O_2 (Spector et al., 1988). De plus, elles peuvent neutraliser l'oxygène singulet et les radicaux hydroxyles (Das and Das, 2000). Les thiorédoxines bactériennes contribuent également à de nombreux mécanismes cellulaires tels que la division cellulaire, la régulation transcriptionnelle, la synthèse de l'ADN et la réparation des protéines (Zeller and Klug, 2006).

2.9.2. Les systèmes non enzymatiques

2.9.2.1. Le système $NAD^+/NADH$ et le système $NADP^+/NADPH$

Les systèmes $NAD/NADH$ et $NADP/NADPH$ sont au cœur du métabolisme et des réactions d'oxydo-réduction cellulaires. Ils sont essentiels au maintien de l'homéostasie redox et à la modulation de certains processus biologiques comme le métabolisme glucidique (Xiao et al.,

2018). Le rôle principal du système NAD/NADH est le transfert d'électrons d'une molécule à une autre en association avec un grand nombre d'enzymes de types oxydoréductases ou déshydrogénases (Jones and Sies, 2015). Le couple NAD⁺/NADH est étroitement lié au catabolisme et au besoin cellulaire en énergie. Le potentiel redox du couple NAD⁺/NADH est de -320mV, ce qui fait du NADH un fort agent réducteur (Xiao *et al.*, 2018). Le système NADP/NADPH transporte également des électrons, et a un potentiel redox identique à celui du couple NAD⁺/NADH. Le NADPH est principalement impliqué dans l'anabolisme. Plus précisément, il fournit un pouvoir réducteur dans les réactions de biosynthèse des acides gras et des acides nucléiques (Jones and Sies, 2015). Il est également impliqué dans le maintien de l'équilibre redox des systèmes thiols tels que les thiorédoxines (Trx) comme mentionné précédemment au paragraphe 2.9.1.4 et le glutathion (GSH) (Jones and Sies, 2015).

2.9.2.2. Les thiols à faible poids moléculaire (LMW thiol)

La plupart des organismes vivants contiennent des concentrations élevées de molécules à thiol de bas poids moléculaire (LMW thiol), qui ont un rôle de tampon redox pour éliminer les différentes espèces réactives chimiques (Messens *et al.*, 2013). La production des LMW thiol est différente chez les bactéries. Le glutathion (GSH) est la molécule la plus étudiée et a été isolé chez les eucaryotes, les bactéries Gram négatives, et quelques Gram positives (Ferguson and Bridge, 2019). Les Firmicutes et les Actinomycètes contiennent des concentrations élevées d'autres composées à thiol : le Bacillithiol (BSH) et le mycothiol (MSH) (Imber *et al.*, 2019). Les cystéines et les coenzymes A sont produites chez toutes les espèces bactériennes (Van Laer *et al.*, 2013). Les Firmicutes, et par conséquent, les bactéries du genre *Bacillus* contiennent donc du Coenzyme A (CoA), du Bacillithiol (BSH) et de la cystéine (CySH/CySS). Dans la mesure où, elles ne contiennent ni glutathion, ni mycothiol, ces molécules ne seront plus évoquées par la suite.

a. Le Coenzyme A (CoA)

Le coenzyme A (CoA) est un cofacteur à thiol, impliqué dans le métabolisme énergétique et le métabolisme des acides gras (Keire *et al.*, 1992). CoA a été retrouvé en forte abondance chez les bactéries qui ne produisent pas de GSH et de MSH telles que *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, et *Staphylococcus aureus* (Figure 1.13) (Antelmann, 2015). Alors que son implication dans le métabolisme est largement étudiée, peu de connaissances sont disponibles sur l'implication de la partie thiol du CoA dans l'homéostasie redox et la réponse anti-oxydante. Les études réalisées ont montré sa résistance à l'auto-oxydation (forme thiol non réactive à pH physiologique) (Gout, 2019). Le potentiel redox standard de CoA a été estimé à -234 mV, ce qui lui confère une capacité anti-oxydante importante (Gout, 2019). L'enzyme CoA disulfure réductases (CoADR), identifiée chez *Staphylococcus aureus* puis chez *B. anthracis* (Van Laer *et al.*, 2013; Gout, 2019) semble contribuer à la régulation de son activité.

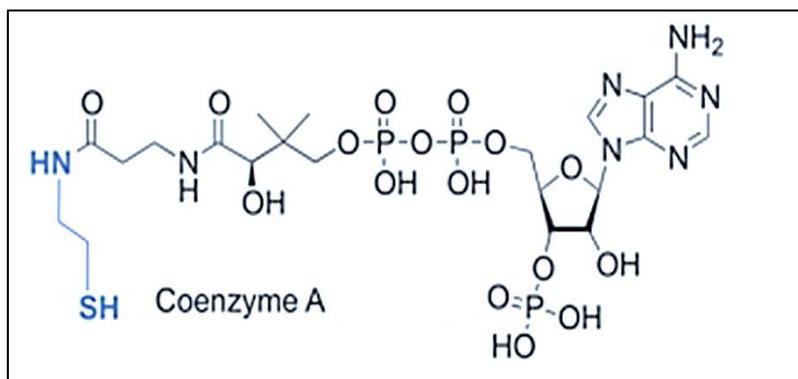


Figure 1.13. Structure du Coenzyme A (CoA) (Van Laer *et al.*, 2013).

b. Le Bacillithiol (BSH)

Le Bacillithiol (BSH) est retrouvé chez plusieurs Firmicutes dont de nombreux *Bacilli* et quelques *Staphylococci* (Newton *et al.*, 2009). La voie de biosynthèse du BSH a été identifiée pour la première fois chez *B. subtilis* (Gaballa *et al.*, 2010). Le Bacillithiol est constitué chimiquement de l'anomère α glycoside, de L-cystéinyl-D-glucosamine et d'un groupe acide L-malique. Le potentiel redox standard du BSH est supérieur à celui du CoA et IL est estimé à -221 mV. Cela signifie qu'il aurait une capacité de protection contre le stress oxydant inférieure à celle de CoA (Gout, 2019).

La biosynthèse du BSH nécessite l'intervention de trois enzymes BshA, BshB, et BshC (**Figure 14**). La première enzyme est une glycosyltransférase (BshA), qui remplace le groupe UDP de la N-acétylglucosamine (UDP-GlcNAc) par un L-malate pour donner du N-acétyl- α -D-glucosaminyl-L-malate (GlcNAc-Mal). Ensuite l'enzyme N-acétyl hydrolase (BshB B1/B2) retire le groupement acétyl de GlcNAc-Ma et génère le D-glucosaminyl-L-malate (GlcN-Mal). BshC intervient en dernier pour rajouter une cystéine à la molécule GlcN-Mal et former le Bacillithiol (Cys-GlcN-Mal). Le mécanisme catalytique de la ligase BshC demeure inconnu (Antelmann, 2015; Gaballa *et al.*, 2010). Comme pour les autres LMW thiols, le BSH peut exister sous forme réduite ou oxydée (BSH/BSSB). Dans le cytoplasme, il est présent principalement sous sa forme réduite avec des ratios, allant de 40:1 (chez *B. anthracis*) à 400:1 (chez *B. subtilis*) (Van Laer *et al.*, 2013). Il a été suggéré que le maintien de l'état réduit est assuré par une BSSB réductase appelée flavine- oxydoréductase NADPH-dépendante (YpdA). Toutefois, son rôle n'a pas encore été prouvé (Imber *et al.*, 2019). En condition de stress oxydant, il a été rapporté que BSH forme des disulfures mixtes avec les thiols protéiques *via* une réaction de S-Bacillithiolation. La réduction de cette liaison est effectuée par une oxydoréductase nommée Bacilirédoxine (Brxs). Une étude phylogénomique a mis en évidence trois enzymes, BrxA, BrxB et BrxC largement conservées parmi les Firmicutes producteurs de BSH (Imber *et al.*, 2019). Ces dernières années, de nombreuses protéines S-Bacillithiolées ont été mises en évidence chez *B. subtilis* après exposition à des composés oxydants comme NaOCl, notamment le régulateur transcriptionnel OhrR (Chi *et al.*, 2011; Chi *et al.*, 2013; Chi *et al.*,

2014). En plus de la régulation redox des protéines, le BSH est impliqué dans la résistance antimicrobienne en détoxifiant les fosfomycines (Gaballa *et al.*, 2010).

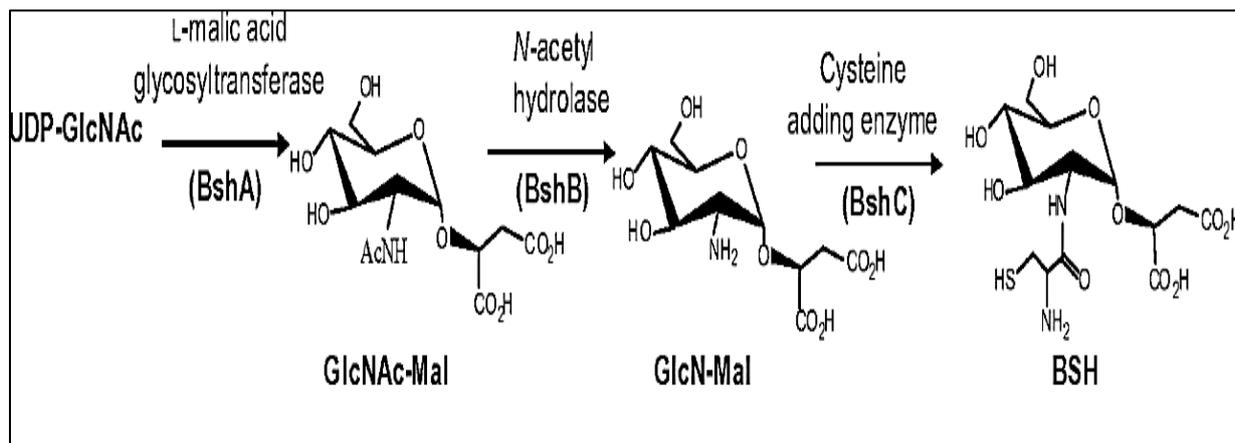


Figure 1.14. Voie de biosynthèse du Bacillithiol (Gaballa *et al.*, 2010).

c. La cystéine (CySH/CySS)

La cystéine est fréquemment présente dans des sites fonctionnellement importants des protéines. Elle peut également se retrouver sous forme libre et sert de tampon redox dans les cellules. Dans la cellule, la cystéine est principalement présente sous forme de cystéine réduite CysSH. Lors de l'oxydation, deux molécules de cystéine peuvent réagir l'une avec l'autre *via* leurs atomes de soufre formant des ponts disulfures CySS (Van Laer *et al.*, 2013). Les niveaux de cystéine libre dans les cellules sont généralement maintenus à un niveau faible car la cystéine est très sensible à l'oxydation catalysée par les métaux (Fahey, 2001). En effet, chez *E. coli*, le GSH et la cystéine ont des potentiels d'oxydoréduction très proches (CysSH/CySS, -250 mV ; GSH/GSSG, -264 mV à pH 7,4). Cependant la concentration de cystéine libre a été estimée entre 0,1 et 0,2 mM, ce qui est très faible comparé à 4mM pour le GSH (Park and Imlay, 2003). Cela peut également expliquer le fait que, chez *E. coli*, GSH soit le principal tampon thiol (Van Laer *et al.*, 2013). Avant la mise en évidence du Bacillithiol (BSH), le tampon CySH/CySS était considéré comme le LMW thiol majeur chez *B. subtilis* (Gaballa *et al.*, 2010).

3. Les résidus cystéines : chimie, modification et outils de caractérisation

3.1. Les modifications post-traductionnelles des protéines (PTM)

La plupart des résidus d'acides aminés contenus dans les protéines sont susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles (PTM), qui sont souvent d'une grande importance pour la fonction biologique des protéines. En effet, elles interviennent dans la régulation des processus cellulaires, notamment la localisation cellulaire des protéines, la régulation de la fonction des protéines et la formation de complexes protéiques. Les acides aminés peuvent subir des centaines de modifications qui changent leur poids moléculaire. Les PTM peuvent résulter du clivage protéolytique de sous-unités régulatrices ou de la dégradation de protéines entières et de l'addition covalente de petits groupes chimiques tels que le méthyl (de masse molaire 14.016 Da) et le phosphate (de masse molaire 79.966 Da) mais aussi de structures oligosaccharidiques complexes de plus de 2000 Da (Macek *et al.*, 2019). Parmi ces PTMs, les plus courantes sont la phosphorylation, l'acétylation, la succinylation et la glycosylation :

- la phosphorylation des protéines est une PTM ubiquitaire et abondante, généralement associée à la transduction des signaux intracellulaires. La fixation et l'élimination des groupes phosphorylés sur les chaînes latérales des acides aminés sont catalysées respectivement par les kinases et les phosphatases. Chez les bactéries, la phosphorylation des protéines a été détectée sur les chaînes latérales de la sérine, de la thréonine, de la tyrosine, de l'histidine, de l'arginine, de la lysine et de l'acide aspartique (Macek *et al.*, 2019).
- L'acétylation se produit principalement sur les chaînes latérales de la lysine et sur les amines primaires des acides aminés N-terminaux. L'acétylation peut se produire d'une manière non-enzymatique *via* un donneur acétyl-CoA et un acétyle phosphate, comme elle peut se produire d'une manière enzymatique où l'acétate peut être ajouté sur la chaîne latérale de la lysine par une lysine acétyltransférase et retiré par une désacétylase (Forrest and Welch, 2020).
- la succinylation est définie comme le transfert d'un groupe succinyle sur la chaîne latérale du résidu lysine augmentant ainsi le décalage de masse de 100,0186 Da. En comparaison avec l'acétylation qui ajoute un groupe de 42.010 Da, la succinylation apporte des changements plus remarquables dans la structure et les charges, ce qui est supposé jouer un rôle plus critique dans la régulation physiologique et pathologique (Sreedhar *et al.*, 2020).
- La glycolysation implique la fixation covalente des glucides au groupe amide de l'asparagine (N-liée) ou au groupe hydroxyle de la sérine ou de la thréonine (O-liée) (Macek *et al.*, 2019). Le processus de glycosylation est étroitement régulé car il s'agit

d'une modification enzymatique qui est spécifique du site et du substrat (Karve and Cheema, 2011). En effet, il est démontré que les glycanes des glycoprotéines sécrétées affectent diverses propriétés des protéines telle que la solubilité, tandis que les protéines glycosylées de la surface cellulaire sont impliquées dans divers processus cellulaires tels que la communication entre les cellules.

Traditionnellement, les PTM sont identifiées par l'analyse des acides aminés, des marquages isotopiques et des méthodes d'immunochimie (Larsen *et al.*, 2006).

Le développement de la spectrométrie de masse (MS) a facilité la détection des PTM en se basant sur l'altération de la masse du peptides ou des protéines, qui résulte d'une modification chimique survenant dans la chaîne latérale des résidus d'acides aminés (Larsen *et al.*, 2006). La spectrométrie de masse est caractérisée par une très grande résolution, elle permet aujourd'hui l'identification, sans à priori, des PTM à partir d'échantillons protéiques complexes, en une seule expérience et dans un temps court.

Cependant, l'analyse des PTM des cystéines, et en particulier leur oxydation, reste complexe notamment du fait de leur labilité sous des conditions redox différentes.

3.2. La cystéine : un acide aminé particulier

La cystéine est un acide aminé, comportant un groupement thiol (-SH) dont l'atome de soufre présente une chimie redox diversifiée (Figure 1.15). Le soufre possédant 6 électrons de valence et une orbitale 3d libre, il peut adopter divers états d'oxydation (le nombre d'oxydation peuvent aller de -2 à +6) (Alcock *et al.*, 2018). Par ailleurs, il peut se lier d'une manière covalente avec les principaux atomes des organismes vivants (C, H, O, N, P), comme il peut former des liaisons avec des métaux tels que le Cu, Zn et Fe (Go *et al.*, 2015).

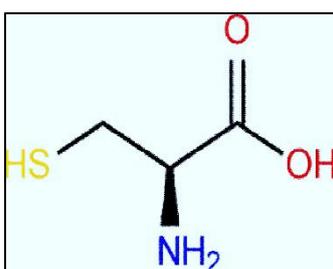


Figure 1.15. Structure de la L-cystéine (Kesarkar *et al.*, 2015).

La fonction thiol cystéines peut s'ioniser et former un thiolate chargé négativement (-S⁻) avec une réactivité élevée *vis-à-vis* des électrophiles dont les oxydants. En effet, cette propriété d'ionisation des thiols est liée au pH physiologique (environ 7). A des pH inférieurs au pKa (pH < pKa), le thiol de la cystéine est essentiellement protoné (SH), alors qu'à des pH supérieurs au pKa (pH > pKa), le thiol est déprotoné (S⁻). Le pKa de la cystéine libre est d'environ 8,3. Par conséquent, à un pH physiologique, les groupes SH sont en grande partie protonés (Paulsen

and Carroll, 2013). Cependant, l'environnement des acides aminés au sein de la protéine modifie considérablement les valeurs du pKa, qui peuvent diminuer et stabiliser la forme thiolate (cas des acides aminés chargés positivement) ou augmenter et stabiliser la forme protonée (Alcock *et al.*, 2018).

Cette polyvalence de propriété chimique et de réactivité de la chaîne latérale de la cystéine conduit à une plus grande variété de modifications post-traductionnelles (PTM) avec des rôles uniques par rapport aux autres acides aminés. La cystéine a de ce fait un rôle primordial dans la structure et l'activité des protéines.

3.3. Modifications post traductionnelles des cystéines

Les PTM de la cystéine peuvent être classées en deux catégories : les modifications catalysées par une enzyme et les modifications spontanées. Les modifications de la cystéine catalysées par des enzymes incluent la prénylation et la palmitoylation, où des enzymes assurent le transfert de la fraction isoprénoïde ou lipidique, respectivement, d'un donneur à la chaîne latérale de la cystéine. Les PTM spontanées des cystéines sont généralement provoquées par des oxydants endogènes et des électrophiles réactifs tels que les ROS et les RNS (Couvertier *et al.*, 2014). Ainsi, l'oxydation des cystéines donne lieu à toute une série de produits contenant du soufre. Dans cette section, un aperçu des formes les plus communes sera donné (Figure 1.16).

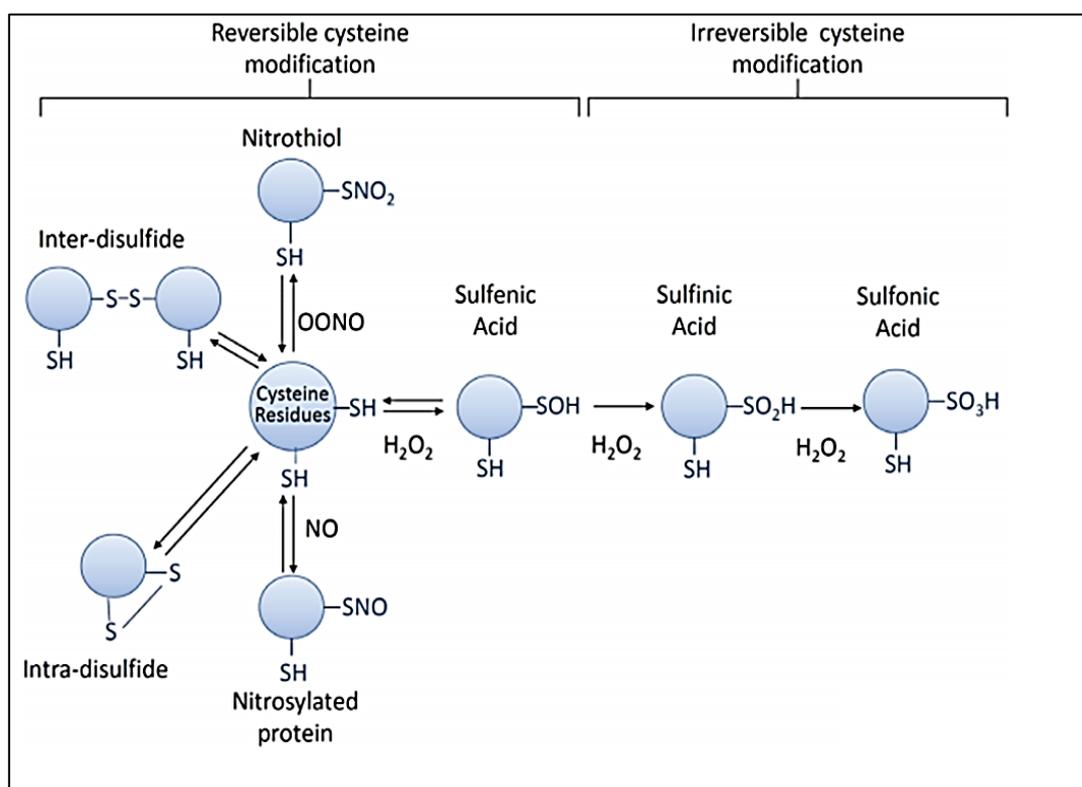


Figure 1.16. Modifications post-traductionnelles oxydatives des protéines contenant des cystéines (Griendling *et al.*, 2016).

3.3.1. Formation des ponts disulfures

Les ponts disulfures (**S-S**) sont des éléments structuraux majeurs stabilisant notamment la structure primaires, tertiaire ou quaternaire de très nombreuses protéines matures. Ils peuvent se former au sein d'un composant protéique, entre deux composants protéiques identiques ou différents, et entre une protéine et un LMW thiol. Les ponts disulfures sont des formes d'oxydation stables mais réversibles. La réduction et l'échange de disulfures sont principalement catalysés par des enzymes contenant des thiols, souvent inclus dans le motif (CX₂₋₆C). Les enzymes majoritairement impliquées dans la réduction et les échanges disulfures sont la thiorédoxine (Trx) et la glutarédoxine (Grx) (Åslund *et al.*, 1997). En effet, dans le cas où un pont disulfure est formé au sein d'une protéine donnée « **S-S Protéine** » (**Figure 1.17**), un groupe thiolate (-S⁻) de l'enzyme réductrice « **Réductase** » attaque un atome de soufre du pont disulfure de la « **S-S Protéine** ». Ainsi, le disulfure d'origine est rompu et une deuxième liaison se forme entre la « **S-S Protéine** » et la « **Réductase** ». Par la suite, un thiolate venant de la « **Réductase** » attaque le deuxième pont disulfure et libère la « **S-S Protéine** » sous forme réduite (**SH**) (**Figure 1.17**) (Fujimoto *et al.*, 2019). Les ponts disulfures sont retrouvés principalement dans les protéines sécrétées et dans les domaines extracellulaires des protéines membranaires. Chez les bactéries à Gram négatif, les ponts disulfures sont catalysés par des oxydoréductases périplasmiques comme DsbA. Chez les bactéries à Gram positif, il n'y a pas d'espace périplasmique et la formation de liaisons disulfures n'est pas totalement comprise. Les ponts disulfures cytoplasmiques y sont rares et se forment d'une manière transitoire car l'environnement est réducteur. La formation et la dissociation de ponts disulfures peut intervenir dans le maintien de l'homéostasie redox, l'activité des protéines chaperonnes, le métabolisme, et la régulation de la transcription (Paulsen and Carroll, 2013).

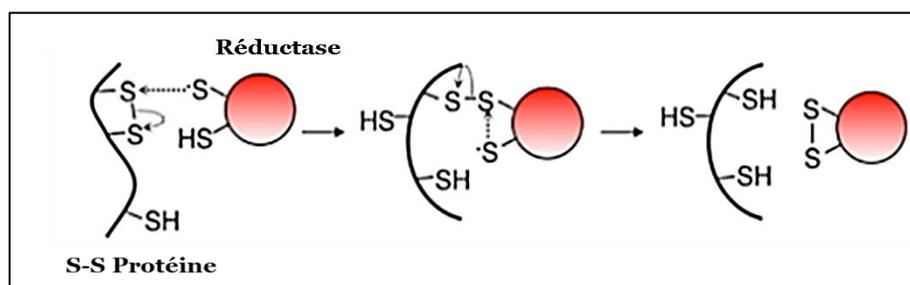


Figure 1.17. Mécanismes des réactions d'échange thiol- disulfure. D'après (Fujimoto *et al.*, 2019)

3.3.2. Formation des oxoacides organosoufrés

L'oxydation des cystéines par les ROS et RNS induit une formation séquentielle d'oxoacides du soufre avec d'abord l'acide sulfénique (R-S-OH), puis l'acide sulfinique (R-SO₂H) et enfin

l'acide sulfonique (R-SO₃H) (Figure 16) (Paulsen and Carroll, 2013). L'acide sulfénique est le plus souvent généré suite à la réaction des thiolates (-S⁻) avec H₂O₂. SOH est la forme oxydée la plus instable et réactive des cystéines, car elle peut être facilement modifiée en thiol ou peut réagir avec les thiols proches pour former des ponts disulfures intramoléculaires et intermoléculaires (Alcock *et al.*, 2018; Paulsen and Carroll, 2013). SOH peut également former des ponts disulfures mixtes avec des LMW thiols. Les différentes S-thiolations obtenues sont ainsi des S-cystéinylations, S-glutathionylations, S-mycothioliations et S-Bacillithiolations. Ces modifications représentent des formes de protection contre la sur-oxydation vers des formes irréversibles comme SO₂H et SO₃H (Loi *et al.*, 2015). Il a été suggéré que SOH serait stabilisée, dans certaines conditions : sa stabilisation étant liée à l'exclusion de l'eau et des thiols dans son microenvironnement (Paulsen and Carroll, 2013). Il a été observé chez *Staphylococcus aureus* que la stabilité de SOH contribuait à la régulation redox du régulateur transcriptionnel SarZ (Poor *et al.*, 2009).

SO₂H et SO₃H sont beaucoup moins réactives que SOH. La présence de ces modifications oxydatives des cystéines a été principalement associée au stress oxydant et à l'altération de l'activité protéique (Alcock *et al.*, 2018). Cependant, chez les Eucaryotes, il a été décrit que la formation SO₂H au niveau de la cystéine catalytique des peroxyrédoxines (2-Cys Prx) était réversible *in vivo* et était potentiellement impliquée dans la régulation redox de la protéine (Woo *et al.*, 2003). Par ailleurs, une enzyme, capable de réduire les SO₂H en SOH, la sulfirédoxine, a été identifiée (Biteau *et al.*, 2003). Il convient également de noter qu'aucune acide sulfonique réductase n'a été identifiée à ce jour et que SO₃H est connue comme la forme la plus oxydée des cystéines.

3.3.3. Formation du nitrosothiol

A la différence des oxoformes décrites précédemment, la formation des nitrosothiols (SNO), communément appelée nitrosylation, est fortement associée aux RNS. SNO est formé par l'ajout d'un groupement fonctionnel nitroso (-NO), issu d'une variété de RNS (cation nitrosonium NO⁺ ou peroxyxynitrite ONOO⁻), aux résidus cystéines sous forme de thiol, de thiolate ou d'acide sulfénique. Le SNO peut également se former par réaction de trans-nitrosylation où un SNO formé peut être transféré sur un autre thiol voisin, dans la même protéine ou dans une protéine adjacente, ou sur un GSH. SNO peut réagir avec un thiolate pour former un pont disulfure, ou avec l'ion Cu⁺, ce qui entraîne la réduction du nitrosothiol (Alcock *et al.*, 2018; Paulsen and Carroll, 2013). La nitrosylation est un mécanisme de signalisation très bien conservé. Des études réalisées chez les Eucaryotes ont montré son implication dans la régulation de l'activité protéique, la localisation subcellulaire et les interactions moléculaires de diverses protéines (Hess *et al.*, 2005). Chez les Bactéries, les études demeurent limitées.

Chez *E. coli*, il a été démontré que la nitrosylation est impliquée dans la régulation de certaines protéines dont le facteur de transcription OxyR (Gusarov and Nudler, 2012).

3.4. Protéomique redox

Afin de caractériser systématiquement les oxydations réversibles des cystéines à l'échelle du protéome, une approche expérimentale appelée la protéomique redox est employée. Elle fait référence à l'état d'oxydation du groupement thiol de la chaîne latérale de la cystéine. Cette méthode analytique tient compte d'un certain nombre de paramètres techniques pour neutraliser la réactivité chimique des cystéines et préserver leur état redox initial avant de perturber le système biologique pour analyser les échantillons protéiques (Chiappetta *et al.*, 2010a).

3.4.1. Préparation de l'échantillon

a) Lyse cellulaire

Du fait de la sensibilité des cystéines à l'oxydation, la préparation des échantillons est cruciale pour la réalisation d'une analyse protéomique redox. Durant la lyse cellulaire, la réactivité des cystéines peut entraîner des modifications redox artéfactuelles telles que l'oxydation par l'air ou des modifications de ponts disulfures réduits par les enzymes anti-oxydantes et réarrangés entre eux par échanges thiol-disulfides (Chiappetta *et al.*, 2010a; Held and Gibson, 2012). Pour limiter ces phénomènes, la lyse des cellules se fait en milieu acide en utilisant de l'acide trichloracétique (TCA), qui précipite les protéines. Par ailleurs, le TCA protone les formes thiolates (S⁻) en abaissant drastiquement le pH (pH<1) bien en dessous du pKa de la cystéine. Ainsi les formes protonées (SH) ne permettent ni l'oxydation des thiols réduits, ni la réduction des thiols oxydés (Chiappetta *et al.*, 2010a).

b) Alkylation différentielle

L'alkylation différentielle est une technique de la protéomique redox qui permet de marquer séquentiellement les cystéines réduites et les cystéines oxydées. En effet, après marquage et blocage des cystéines réduites avec un agent alkylant, les cystéines oxydées sont réduites, puis marquées avec un deuxième marqueur. Cette technique utilise des agents alkylants qui se lient de manière spécifique et irréversible aux cystéines. Parmi les agents alkylants couramment utilisés, on trouve le N-éthylmaleimide (NEM), l'iodoacétamide (IAM) et l'acide iodoacétique (IAA) (Hansen and Winther, 2009). Les agents alkylants peuvent être conjugués à une variété de marqueurs tels que la biotine et des fluorophores pour visualiser les cystéines marquées, notamment sur gel de polyacrylamide (Held and Gibson, 2012). Dans certains protocoles, le NEM et l'IAM sont utilisés pour piéger l'état redox endogène des cystéines sans lyser les cellules du fait de leur capacité à pénétrer dans les cellules (Lind *et al.*, 2002).

Les agents réducteurs les plus couramment utilisés sont le dithiothréitol (DTT) et le tris (2 carboxyéthyl) phosphine (TCEP) qui réduisent la plupart des oxoformes de cystéine, comprenant les ponts disulfures, les cystéines liées au LMW thiol (S-thiolation) et les autres formes oxydées à l'exception de l'acide sulfinique et de l'acide sulfonique (Held and Gibson, 2012). Pour caractériser chaque type d'oxoformes, des agents réducteurs spécifiques sont employés, comme par exemple l'arsénite qui peut réduire sélectivement les acides sulféniques (Saurin *et al.*, 2004) l'ascorbate et les dérivés de phosphines qui peuvent réduire spécifiquement les nitrosylations (Wang and Xian, 2011).

3.4.2. Les différentes approches de marquage des cystéines

Les approches de protéomique redox se sont diversifiées au cours du temps en fonction de l'objectif des études (caractérisation de l'état redox moyen des protéines ou analyse plus fine des différents résidus cystéines et de leur différentes oxoformes). Ces méthodes peuvent se diviser en deux grandes catégories. La première regroupe des analyses après marquage des cystéines et séparation des protéines sur gel d'électrophorèse, la deuxième regroupe les approches axées sur la spectrométrie de masse des échantillons totaux (plus complexes).

3.4.2.1. Protéomique redox basée sur la séparation en gel polyacrylamide

3.4.2.1.1. Marquage fluorescent

La plupart des approches utilisant un marquage fluorescent comprennent une étape de séparation électrophorétique (le plus souvent bidimensionnelle) sur gel de polyacrylamide. Cette approche peut se réaliser avec un seul fluorophore tel que le BODIPY FL C1-IA qui a été utilisé pour marquer les cystéines oxydées (Hochgräfe *et al.*, 2005), ou par l'utilisation de deux fluorophores marquant spécifiquement les cystéines réduites et oxydées (Mermelekas *et al.*, 2013).

L'électrophorèse différentielle redox sur gel ou « redox differential *in-gel* electrophoresis » (Redox-DIGE) est la technique la plus répandue. Initialement, cette méthode a été utilisée pour comparer les niveaux relatifs d'oxydation entre deux échantillons de type contrôle *versus* stress oxydant, en utilisant des marqueurs fluorescents (**Figure 1.18**). Après un premier blocage des cystéines libres par un alkylant, les cystéines oxydées des deux échantillons sont marquées après réduction par deux fluorophores : les Cy3- et Cy5-maléimide. Le Cy3-maléimide émet une fluorescence orange (~570 nm) et le Cy5-maléimide émet une fluorescence rouge (~ 662 nm). Après le marquage, les deux échantillons sont mélangés et analysés sur un même gel d'électrophorèse bidimensionnel. L'acquisition des intensités de fluorescence est réalisée par une technique d'imagerie qui superpose les émissions de signaux des deux fluorophores. Ainsi, l'intensité des spots oranges et rouges représentent les protéines à cystéines potentiellement oxydées dans chaque échantillon (Hurd *et al.*, 2007). Le Maon *et al.* (2008) ont proposé une

autre méthode de type Redox-DIGE qui se base sur l'alkylation différentielle de chaque échantillon avant et après la réduction. Ils ont utilisé des fluorophores absorbant et émettant à différentes longueurs d'onde de la région infrarouge : le DYE-680 (rouge) et le DYE-780 (proche de l'infra-rouge) (Le Moan *et al.*, 2008).

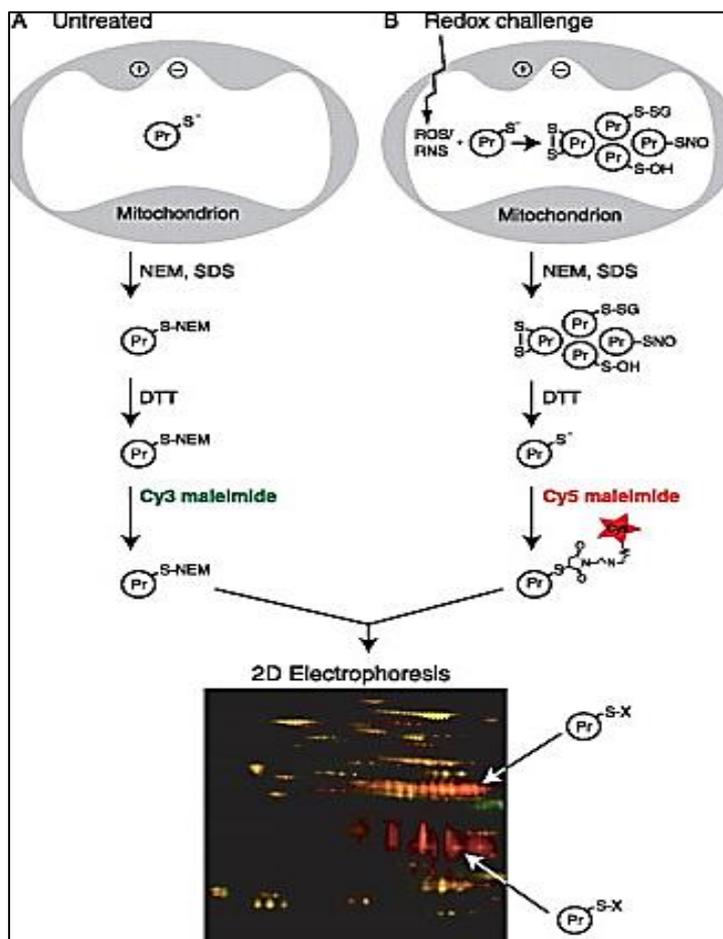


Figure 1.18. Protocole expérimental de la technique redox-DIGE (Hurd *et al.*, 2007). Les thiols protéiques libres (PrS⁻) sont bloqués par le NEM, traités avec du DTT et marqués avec du Cy3 maléimide (orange). Les thiols oxydés (S-S), (SOH) (SNO) (S-SG) sont réduits avec du DTT et marqués avec du Cy5 maléimide (rouge). Les spots rouge et vert représentent respectivement une protéine oxydée et réduite dans les deux échantillons. Les spots protéiques en jaune (mélange des deux signaux fluorescents) représentent les protéines avec un niveau d'oxydation égal dans les deux échantillons.

3.4.2.1.2. Technique de biotine *switch*

Initialement, la technique biotine *switch* a été introduite pour maximiser l'enrichissement des formes nitrosylées des cystéines qui sont présentes en très faible quantité dans les cellules (Jaffrey *et al.*, 2001). Cette technique a ensuite été étendue à d'autres modifications redox. La technique biotine *switch* est une méthode indirecte pour détecter les cystéines oxydées (Figure 1.19). Elle consiste à bloquer les cystéines libres et réduire les cystéines oxydées. Puis, un marquage des formes oxydées nouvellement réduites est réalisé par le N-[6-

(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio) propionamide (biotine HPDP). La biotine-HPDP se lie aux cystéines grâce à sa partie HPDP, qui forme une liaison covalente et réversible sur les thiols par l'intermédiaire d'un pont disulfure. Les protéines marquées sont ensuite adsorbées sur une colonne de streptavidine immobilisée sur une résine de sépharose, ce qui permet d'enrichir les échantillons en protéines biotinylées. Ces protéines sont ensuite éluées après réduction par un agent réducteur (DTT), séparées sur gel d'électrophorèse 2D et révélées, ce qui permet de donner une estimation des protéines contenant des cystéines oxydées. Il existe une autre version de la méthode qui consiste à conserver les protéines biotinylées avec le marqueur de biotine pour les soumettre à une immunodétection (Mermelekas *et al.*, 2013).

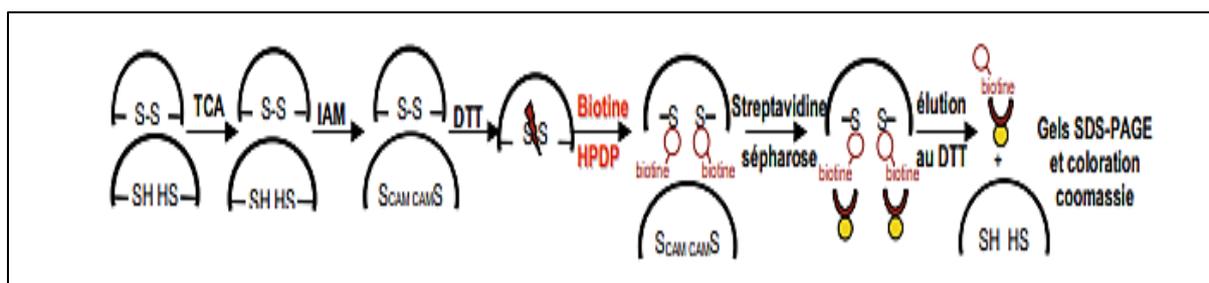


Figure 1.19. Protocole schématique de la technique biotine *switch* avec la biotine-HPDP, et purification des protéines biotinylées par affinité pour la streptavidine immobilisée sur une résine de sépharose. D'après (Le Moan *et al.*, 2006).

Les techniques basées sur la séparation des protéines par électrophorèse ont joué un rôle important dans les premières études de protéomique redox. En effet, leur caractère global d'analyse a permis de détecter des changements dans les profils protéiques dans différentes conditions expérimentales, notamment l'exposition au stress oxydant (Mermelekas *et al.*, 2013; Hurd *et al.*, 2007). Toutefois, elles ont de nombreuses limites qui sont essentiellement liées à la co-migration de plusieurs protéines, au manque de précision concernant l'identification des cystéines sujettes aux modifications oxydantes et à la quantification approximative du taux d'oxydation dans les protéines (Chiappetta *et al.*, 2010a). Ces limitations ont été surmontées grâce au couplage à la spectrométrie de masse (MS) permettant une caractérisation plus fine des modifications sur les protéines.

3.4.2.2. Protéomique redox basée sur la spectrométrie de masse

L'utilisation de la spectrométrie de masse (MS) a offert des améliorations en termes de sensibilité, de résolution et de quantification. Pour ces différentes raisons, la MS se positionne comme la méthode de pointe dans toute analyse d'un protéomique redox.

3.4.2.2.1. Spectrométrie de masse en protéomique

La MS est largement utilisée pour les études protéomiques afin d'identifier et quantifier les protéines dans les lysats de cellules, des organelles et des tissus. Un spectromètre de masse est un appareil comportant plusieurs compartiments qui permettent successivement, l'introduction de l'échantillon, l'ionisation des molécules par une source d'ionisation, l'accélération des ions formés, la séparation de ces ions en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) dans un ou plusieurs analyseurs et enfin leur détection sous forme de spectre (Menet, 2011). Les protéines peuvent être analysées sur la base de leur masse moléculaire totale. Toutefois, l'approche bottom-up est l'approche la plus utilisée en protéomique : elle se base sur l'analyse d'hydrolysats protéiques (peptides) par spectrométrie de masse en tandem. Lorsque l'analyse bottom-up est effectuée sur un mélange de protéines, elle est appelée protéomique shotgun (Zhang *et al.*, 2013). Cette approche comporte différentes étapes d'analyse (Figure 1.20) :

1. Extraction des protéines.
2. Migration des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) et réduction des ponts disulfures afin de réduire la complexité de l'échantillon.
3. Digestion trypsique qui permet d'obtenir des peptides comportant un résidu basique à l'extrémité C-terminale (arginine ou lysine).
4. Séparation du mélange peptidique par chromatographies en phase liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse.
5. Ionisation des peptides par électronebulisation (electrospray ionization ESI).
6. Analyse en spectrométrie de masse en deux étapes dans deux analyseurs distincts :
 - A. Séparation des espèces ionisées en fonction du m/z (mode MS)
 - B. Sélection des ions les plus abondants avec un rapport m/z déterminé, fragmentation et acquisition de nouveaux rapports m/z (mode tandem ou MS/MS)
7. Les spectres MS et MS/MS expérimentaux sont confrontés à des masses théoriques dans les banques de données *via* un algorithme géré par des logiciels tel que Mascot, qui permet ainsi de séquencer la chaîne peptidique, d'identifier le peptide et la localisation des PTMs.
8. L'identification peptidique permet de remonter aux protéines contenues dans l'échantillon.

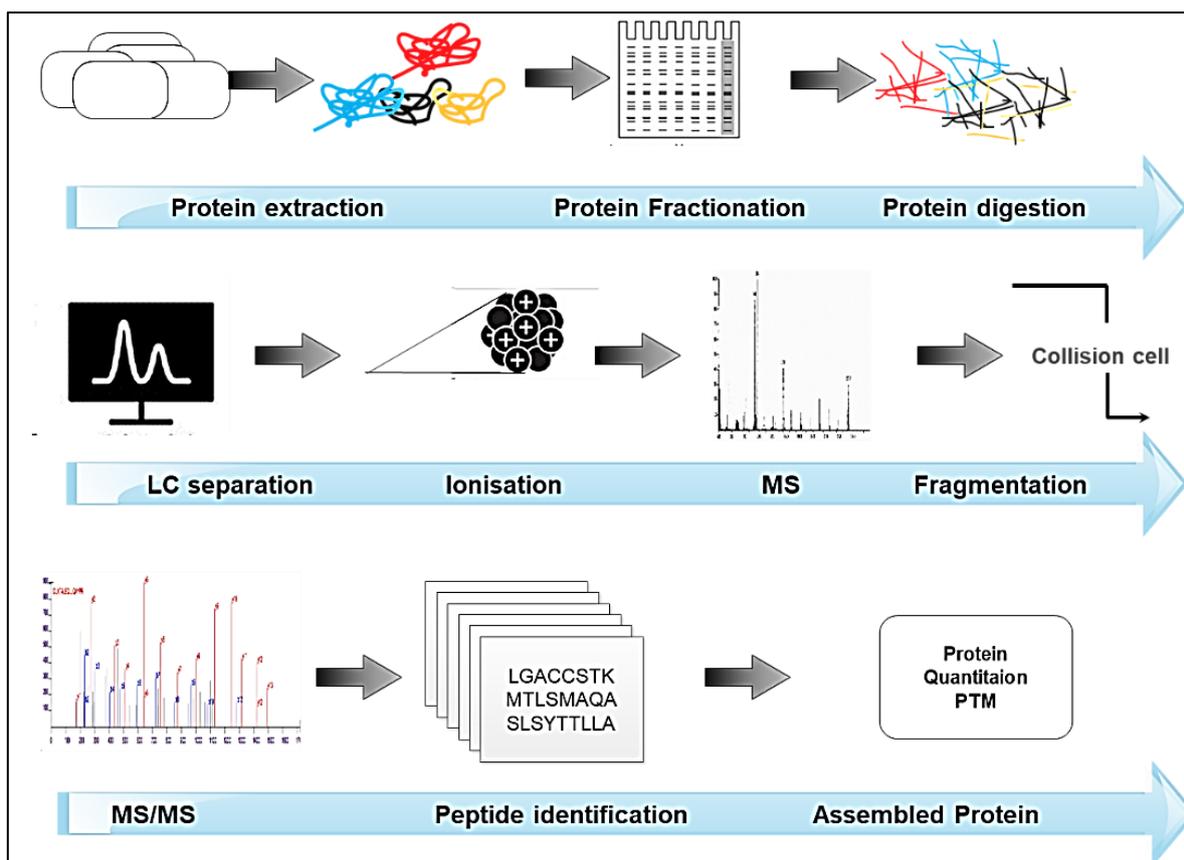


Figure 1.20. Les différentes étapes de l'analyse protéomique « shotgun ».

3.4.2.2.2. Approches de protéomiques quantitatives adaptées à la protéomique redox

Deux approches sont utilisées pour quantifier les protéines : la première utilise des isotopes stables, la deuxième n'utilise pas de marquage et est communément appelée « label free ». La quantification par marquage isotopique consiste à comparer des peptides ou des protéines qui ont la même séquence mais diffèrent par leur masse suite à l'incorporation de différents isotopes. Ces molécules possèdent les mêmes propriétés physico-chimiques et seront donc ionisées de la même manière. Les méthodes de quantification par marquage isotopique les plus connues sont les marquages « Isotope-Coded Affinity Tag » ICAT, « isotope Tags for Relative and Absolute Quantification » ITRAQ et « Stable Isotope Labelling with Amino acids in Cell culture » SILAC. Ces méthodes analytiques ont été adaptées pour la protéomique redox (Mermelekas *et al.*, 2013). Dans la partie suivante nous présentons brièvement quelques techniques du marquage chimique :

❖ Marquage isotopique OxiCAT

La stratégie OxiCAT a été mise au point en combinant une technique de piégeage des thiols avec la technique ICAT. Le marquage ICAT est un marquage chimique, consistant à marquer

les protéines par le réactif ICAT qui se greffe sur les thiols des cystéines par sa fraction iodoacétamide. Ce réactif est constitué également d'un élément de liaison non marqué ou marqué aux isotopes de carbone stables (^{13}C et ^{12}C) et de biotine qui permet d'isoler les peptides marqués (Ramus *et al.*, 2006). Les cystéines réduites sont marquées par la forme légère de l'isotope (ICAT ^{12}C) et les cystéines oxydées sont réduites puis marquées par la forme lourde (différence de 9 Da) de l'isotope (ICAT ^{13}C). Les échantillons protéiques sont digérés à la trypsine puis les Cys-peptides oxydés et réduits sont enrichis par affinité à la streptavidine. Enfin, tous les peptides purifiés marqués par l'ICAT sont identifiés et quantifiés par LC-MS/MS (Figure 1.21) (Leichert *et al.*, 2008).

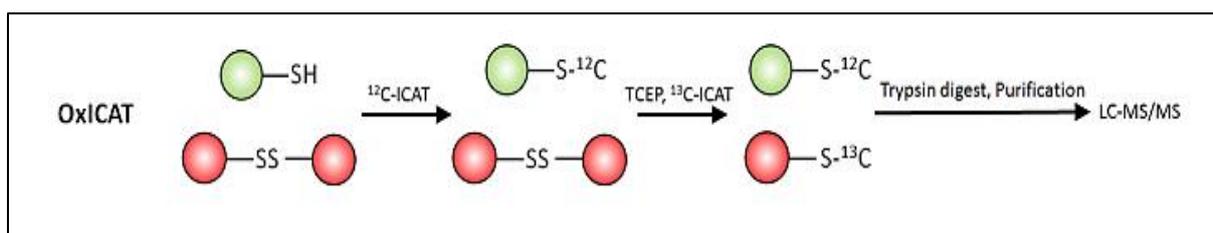


Figure 1.21. Schéma simplifié de la stratégie OxICAT (Yuan *et al.*, 2015). Le réactif ICAT ^{12}C modifie les cystéines réduites. Les cystéines oxydées sont réduites avec le TCEP et modifiées avec le réactif ICAT ^{13}C . Après digestion, les peptides marqués sont enrichis puis analysés par LC-MS/MS.

❖ Marquage isobarique

Le marquage OxiTRAQ est dérivé de la technique ITRAQ, conçue pour multiplexer l'analyse protéomique en tandem et comparer plusieurs conditions expérimentales en une seule analyse protéomique. Ce marquage utilise le réactif ITRAQ qui se lie aux peptides par un groupe réactif spécifique des amines primaires (N-terminal des peptides et chaîne latérale de la lysine). Il comporte également un reporteur qui diffère entre les quatre formes du réactif par sa masse ($m=114, 115, 116$ et 117 Da) et un groupement « balance » dont la masse varie de 28 à 31 Da, qui joue le rôle de « contrepoids » afin que les peptides marqués aient la même masse d'étiquette (145 Da) (Figure 1.22) (Wiese *et al.*, 2007).

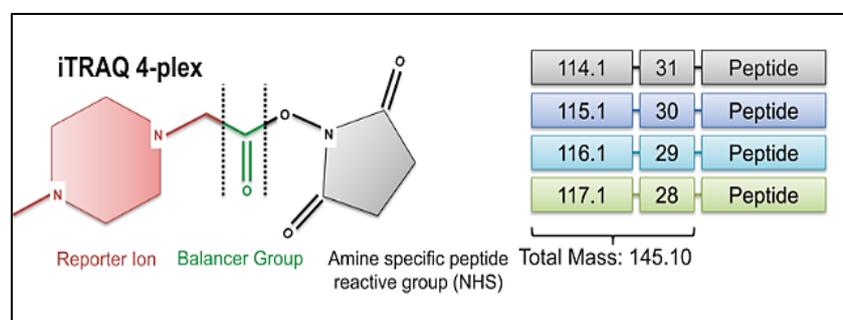


Figure 1.22. Structure chimique du réactif ITRAQ. (Source de l'image : creative proteomics)

Le marquage OxiTRAQ a été décrit pour la première fois par (Liu *et al.*, 2014). Dans cette étude, les cystéines libres ont été bloquées par un alkylant et les cystéines oxydées ont été réduites puis marquées à la biotine HPDP. Après enrichissement, la biotine est éliminée et les protéines

sont digérées. Les peptides obtenus sont ainsi enrichis en peptides marqués par le réactif iTRAQ. La quantité relative des cystéines oxydées est reflétée par l'intensité des pics dans le spectre MS/MS (**Figure 1.23**).

Récemment, une technique IodoTMT a été développée à partir de la technique Tandem Mass Tag (TMT) et utilise un réactif isobarique constitué de trois éléments comme le réactif ITRAQ. Le réactif IodoTMT possède un groupement réactif au thiol, l'iodoacétamide. Les versions isobariques du réactif permettent de marquer différenciellement les cystéines réduites et oxydées et de comparer jusqu' à 6 échantillons (126–131 Da) (Pan *et al.*, 2014).

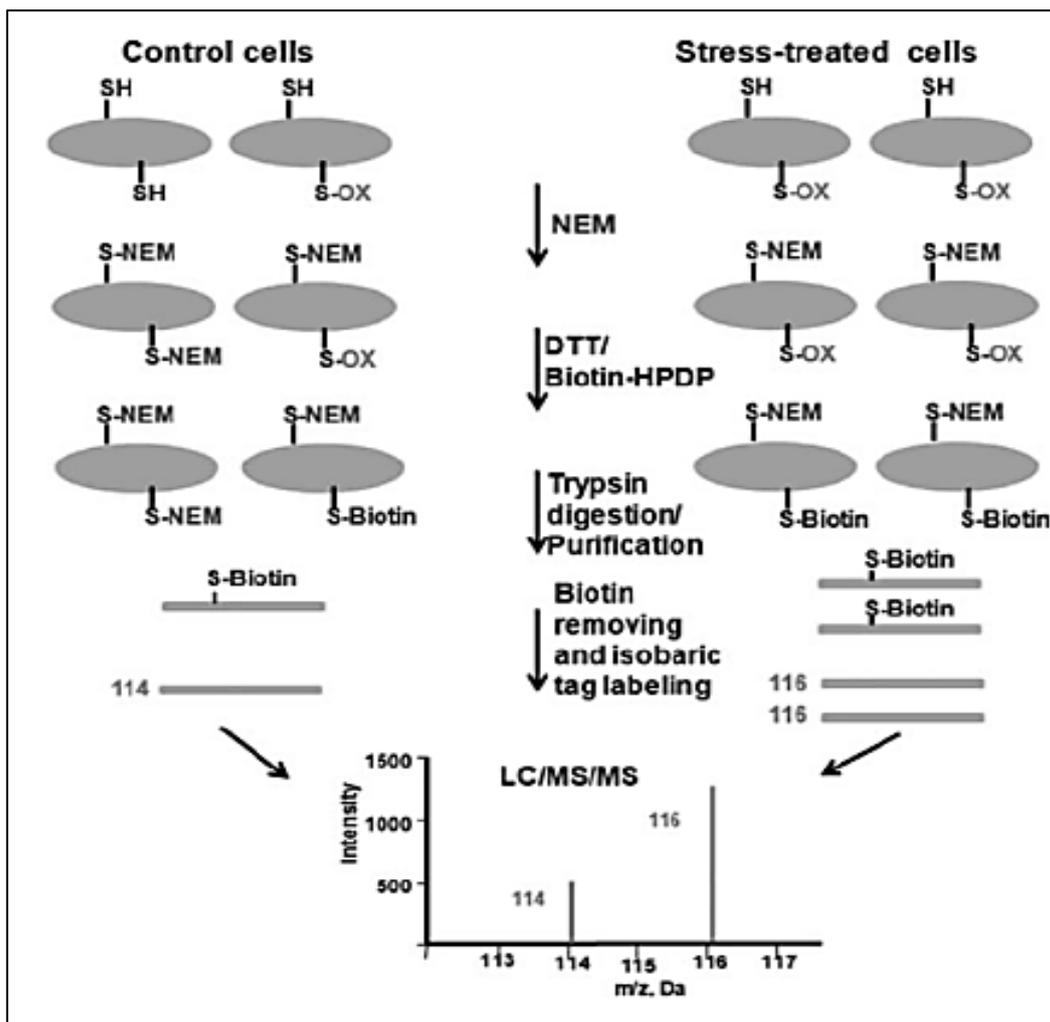


Figure 1.23. Protocole expérimental de la stratégie OxiTRAQ (Liu *et al.*, 2014). Les cystéines réduites et oxydées dans les cellules témoins et les cellules soumises à un stress sont marquées différenciellement par le NEM et la biotine-HPDP. Après digestion avec la trypsin et la purification des peptides biotinylés, les différents échantillons sont marqués avec iTRAQ. Les peptides sont identifiés et quantifiés par LC-MS/MS.

❖ Quantification sans marquage « label free »

Les approches de marquage avec les isotopes stables sont les méthodes les plus répandues pour la quantification des protéines. Cependant, les protocoles expérimentaux sont complexes, et nécessitent une quantité importante de matériel biologique et des réactifs très coûteux (Bantscheff *et al.*, 2007). Par conséquent, la quantification relative des protéines à l'aide d'approches sans marquage est très fréquemment utilisée. La quantification « label free » a permis de contourner certains inconvénients des marquages isotopiques (Gouveia *et al.*, 2020). Elle consiste à comparer la quantité relative d'un peptide dans un échantillon par rapport à l'autre comme elle permet de comparer un nombre infini d'échantillons. Cette approche peut se baser sur deux méthodes : la mesure de l'aire sous la courbe des pics du signal MS, nommée AUC (Area Under the Curve) ou par le décompte des spectres MS/MS nommée spectral count (Arike and Peil, 2014). La technique « label free » pour la protéomique redox consiste à préparer les échantillons en prenant les mesures nécessaires pour éviter l'oxydation artéfactuelle, à réaliser des marquages différentiels des cystéines oxydées et réduites, à digérer par la trypsine les protéines et à mesurer l'étendue de l'oxydation et de la réduction par MS. Par la suite, la détection des résidus cystéines modifiées est attribuée par l'analyse MS/MS. L'étape d'interrogation des banques est très importante et doit tenir compte de la masse des modifications post-traductionnelles, mais aussi de la masse des molécules greffées sur le peptide. Cette approche peut être appliquée avec ou sans enrichissement peptidique sélectif (Mermelekas *et al.*, 2013).

Objectifs de la thèse

Objectifs de la thèse

Le maintien d'une homéostasie redox intracellulaire est essentiel à la survie des bactéries quelles que soient les conditions environnementales et les stress rencontrés. Pour cela, elles disposent de systèmes de régulation complexes qui leur permettent de répondre de manière appropriée aux changements de leur environnement.

Bacillus cereus est un pathogène responsable de toxi-infection alimentaire chez l'homme. Cette bactérie ubiquitaire est capable de se développer en présence et en absence d'oxygène. Sa croissance en aérobiose comme en anaérobiose a fait l'objet de plusieurs études protéomiques lors de la dernière décennie. Jusqu'à présent, les recherches se sont principalement concentrées sur les adaptations métaboliques qui sont gouvernées par des régulateurs transcriptionnels tels que Fnr, ResDE, et OhrR, capables de détecter et de répondre à des changements redox. Avant ce travail, aucune donnée n'était disponible sur le thiol protéome, qui est un élément central de l'homéostasie redox.

Le thiol protéome est constitué des protéines dont la fonction est dépendante de l'état redox des thiols de leurs résidus cystéines. Il représente donc une jonction adaptative entre le protéome et l'environnement redox de la bactérie, qui peut être sujet à des variations entre autre liées aux effets des ROS et des RNS exogènes et endogènes. Malgré l'intérêt grandissant pour les PTM, la caractérisation de l'état redox des thiols des cystéines fait toujours face à des défis techniques liés à la chimie complexe de cet acide aminé.

L'objectif général de mon travail de thèse était de caractériser le thiol protéome de *B. cereus* ATCC14579, dans deux conditions de croissance bien distinctes : la croissance fermentaire anaérobie et la croissance respiratoire aérobie. Mon travail a consisté, dans une première partie, à mettre en œuvre et optimiser une stratégie de piégeage de l'état redox des cystéines dans les cellules au cours de la croissance (**Chapitre 2**). La deuxième partie de mon travail a consisté à quantifier l'état redox des résidus cystéines pendant la phase exponentielle de croissance et à établir le lien entre la dynamique du thiol protéome et les croissances anaérobie (**Chapitre 3**) et aérobie (**Chapitre 4**). Les protéines à cystéines dont l'état redox varie au cours de la croissance et les voies métaboliques qui les impliquent ont été identifiées dans les deux conditions d'oxygénation (**Chapitre 3 et Chapitre 4**).

Au cours de projet de thèse, les cultures de *B. cereus*, les traitements biochimiques et l'exploitation des données ont été réalisés dans notre laboratoire à l'UMR « Sécurité et qualité des produits d'origine végétale ». Les analyses protéomiques allant de la digestion trypsique *in gel* des protéines jusqu'à l'analyse en spectrométrie de masse ont été réalisées en collaboration avec la plateforme ProGénoMix du SPI/LI2D(CEA/Marcoule).

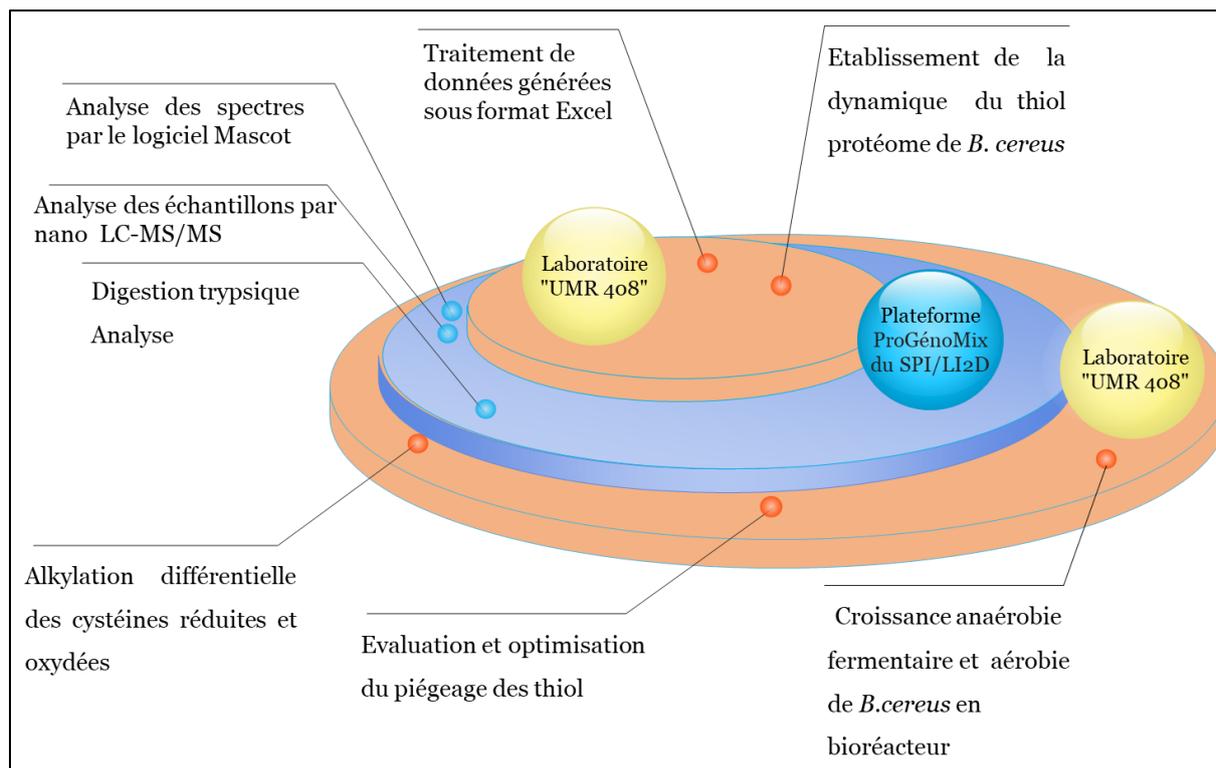


Figure 1.24 . Les différentes étapes réalisées pour l'étude du thiol protéome chez *B. cereus*.

***Chapitre 2. Évaluation et
optimisation du piégeage des
thiols***

Chapitre 2. Évaluation et optimisation du piégeage des thiols

2.1. Contexte de l'étude

L'étude globale de l'état redox des résidus cystéines est complexe à mettre en œuvre. Cela est dû, non seulement à la chimie complexe des cystéines, mais aussi au nombre important d'étapes expérimentales depuis le prélèvement des cellules jusqu'à l'échantillon analysable. En raison de leur réactivité intrinsèque, les thiols et leurs modifications oxydatives sont très labiles et peuvent subir des modifications artéfactuelles lors de la préparation des échantillons protéiques. Par conséquent, un piégeage efficace de l'état redox natif des cystéines est une condition nécessaire à l'étude du thiol protéome (Wojdyla and Rogowska-Wrzesinska, 2015). Dans ce chapitre, nous allons détailler notre approche et les problèmes expérimentaux auxquels nous avons dû faire face.

2.2. La lyse cellulaire

Pour bloquer la réactivité des thiols dans les échantillons à analyser et conserver leur état redox, il est nécessaire de réaliser des prélèvements cellulaires à pH acide. La littérature préconisant de rajouter de l'acide trichloracétique (TCA) à 25 %, pour réduire les artefacts d'oxydation au moment de la lyse des cellules (Wojdyla and Rogowska-Wrzesinska, 2015; Paulsen and Carroll, 2013), nous avons choisi de pré-remplir les flacons de prélèvement des cellules bactériennes avec du TCA. Ainsi, les cellules étant immédiatement en contact avec du TCA, la lyse cellulaire, l'extraction des protéines et le blocage des échanges thiol-disulfure sont réalisés en une seule étape et instantanément dans le flacon de prélèvement afin de préserver l'état redox *in vivo* des cystéines.

2.3. Alkylation différentielle des thiols

Nous avons choisi de caractériser l'état redox des cystéines en adaptant la méthode de l'alkylation différentielle des thiols avant et après réduction, décrite par Wholey et al. (2012). Les protéines précipitées au TCA ont été solubilisées et dénaturées dans un tampon appelé DAB contenant un agent chaotrope et un détergent qui facilitent l'accès aux cystéines (6M urée, 200 mM tris-HCl (pH8.5), 2% W/V SDS, EDTA 10mM) (Wholey and Jakob, 2012). Puis, pour réaliser le marquage différentiel des cystéines réduites et oxydées nous avons utilisé deux agents alkylants différents.

Wholey et ses collaborateurs ont utilisé du N-éthylmaléimide (NEM) et du 4-acétamido-4'-maléimidylstilbène-2,2'-disulfonic acid (AMdiS). Lors d'une étude préalable à mon travail de thèse, quatre réactifs alkylants ont été comparés, à savoir le 4-acétamido-4'-maléimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid (AMdiS), l'orégon green maléimide (OGM), l'iodoacétamide(IAM) et le N-éthylmaléimide (NEM). Parmi les quatre réactifs d'alkylation, l'IAM et le NEM ont donné les meilleurs taux de détection en spectrométrie de masse. Ainsi, ces réactifs ont été choisis pour la réalisation de l'alkylation différentielle des cystéines.

La réaction des deux molécules avec les thiols est une attaque nucléophile qui se produit par une addition de Michael pour le NEM (1) et une substitution pour l'IAM (2) (**Figure 2.1**). Ces réactions entraînent alors la modification covalente et irréversible de la cystéine par formation des adduits (Cys-S-N-éthylmaléimide) et (Cys-S-carbamidométhyl) respectivement (Paulsen and Carroll, 2013).

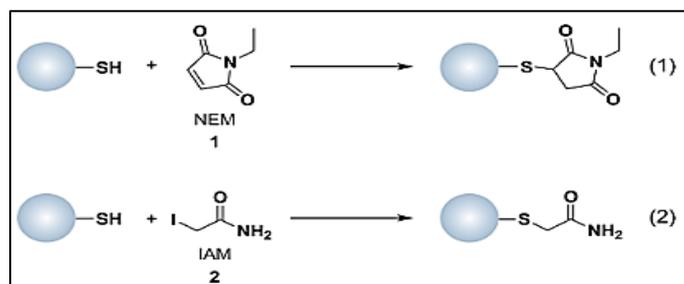


Figure 2.1. Réaction des thiols avec les 2 alkylants utilisés dans cette étude : (1) le N-éthylmaléimide (NEM) ; (2) l'iodoacétamide (IAM). D'après (Paulsen and Carroll, 2013).

Malgré leur utilisation répandue, l'analyse des conditions optimales d'alkylation avec ces deux réactifs est limitée et à notre connaissance, aucune étude comparant directement l'alkylation différentielle des cystéines réduites et oxydées avec IAM et NEM n'a été publiée. Nous avons réalisé dans notre étude une comparaison de ces deux alkylants à partir d'extraits de culture de *B. cereus*.

L'IAM est le réactif le plus couramment utilisé dans les approches « bottom-up » des études protéomiques et la concentration utilisée de manière consensuelle par la communauté scientifique est de 50 mM finale pour alkyler les cystéines dans les échantillons biologiques (de Groot *et al.*, 2009). En revanche, les données que l'on peut trouver dans la littérature sur les concentrations en NEM sont variables. Nous avons testé dans ce protocole des concentrations finales de NEM allant de 10 à 150 mM pour alkyler les cystéines des extraits protéiques de *B. cereus*.

L'effet de la concentration en NEM sur l'alkylation des cystéines a été déterminé en quantifiant les cystéines modifiées par le NEM (Cys-S-N-éthylmaléimide), après normalisation par les peptides totaux de l'échantillon. Nous avons observé une tendance à l'augmentation des cystéines marquées lorsque la concentration de NEM augmente (**Figure 2.2**). L'alkylation

avec 150 mM de NEM étant moins sujette à variation au sein des réplicats, elle a été appliquée pour le marquage différentiel des cystéines dans la suite de l'étude.

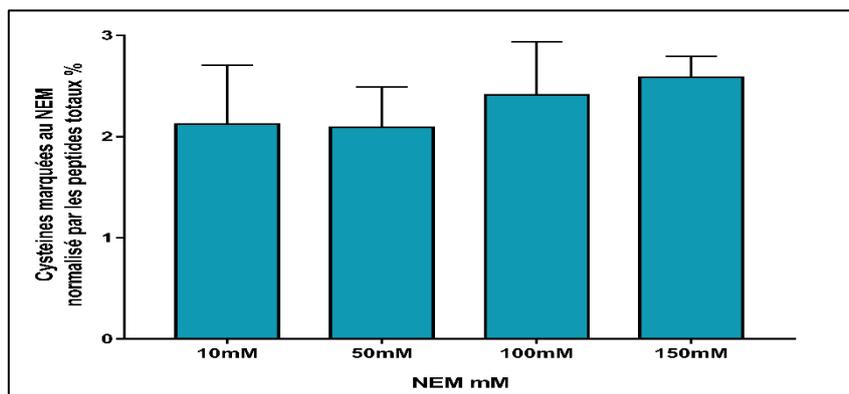


Figure 2.2. Alkylation des cystéines par différentes concentrations de NEM (10, 50, 100, 150mM). Les données correspondent aux valeurs moyennes calculées pour des triplicats. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. Un test *t de Student* pour échantillons appariés a été réalisé. Aucune différence significative n'a été observée.

Les réactions d'alkylation par l'IAM et le NEM ayant été validées, nous avons entrepris d'étudier l'efficacité d'alkylation dans le cadre d'une stratégie de marquage différentiel des cystéines « en double et inversée ». « En double et inversée » signifie qu'un même échantillon subit deux stratégies de marquage (**Annexe 1 cf. p.128**). Dans une première stratégie de marquage, les thiols libres sont alkylés avec du NEM, les modifications réversibles des thiols sont réduites avec du dithiothréitol (DTT), et alkylées avec de l'IAM (marquage NDI). Dans la 2ème stratégie, l'ordre des agents alkylants est inversé (marquage IDN) (**Figure 2.3**).

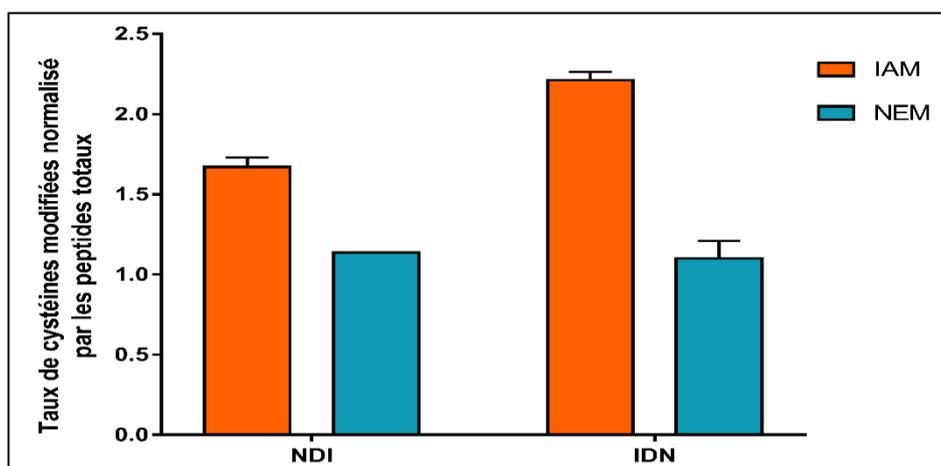


Figure 2.3. Marquage différentiel des cystéines suivant la stratégie « double inversée ». Des duplicats biologiques ont été réalisés. NDI : NEM 150mM puis le DTT 25M puis IAM50mM/ IDN : IAM50mM puis le DTT 25M puis NEM 150mM.

Nos résultats ont révélé que l'IAM (marquage IDN) est nettement plus efficace que le NEM (marquage NDI) pour la première alkylation, et ceci même si la concentration de NEM est 3

fois plus élevée que celle de l'IAM. Le taux élevé d'alkylation avec IAM dans la deuxième alkylation (marquage NDI) peut s'expliquer par un premier marquage incomplet par le NEM. Le NEM a, de manière imagée, « laissé de la place à l'IAM » qui marque les cystéines oxydées et les cystéines réduites résiduelles de la première alkylation. Ces résultats soulignent l'importance de la première alkylation des cystéines dans les approches de protéomique redox, car une première alkylation incomplète des cystéines, aboutie à une sous-estimation des formes réduites et une surestimation des formes oxydées. IDN permettant non seulement une meilleure couverture des formes réduites lors de la première alkylation mais aussi de marquer plus de cibles, nous avons utilisé cette stratégie pour l'étude de la dynamique du thiol protéome de *Bacillus cereus* en croissance fermentaire anaérobie et respiratoire aérobie.

2.4. Application du marquage IDN aux cultures anaérobies de *B. cereus*

Trois cultures de *B. cereus* ont été réalisées en batch régulé pH=7 en absence (pO₂=0%) et en présence d'oxygène (pO₂=20%). Trois échantillons ont été prélevés en début (EEP), milieu (MEP) et fin (LEP) de phase exponentielle de croissance pour chaque culture, et les protéines ont été traitées parallèlement suivant un marquage IDN et un marquage IN (alkylation à l'IAM puis au NEM sans réduction intermédiaire au DTT) ; le marquage IN permet d'évaluer et de quantifier précisément l'efficacité de l'IAM à bloquer les thiols libres (**Chapitre 3 cf. p.54**). Pour les trois échantillons issus de la croissance de *B. cereus*, nous avons également réalisé des préparations nommées DI qui ont subi une réduction au DTT 25mM puis une alkylation à l'IAM 50mM dans le gel (traitement réalisé par le personnel de la plateforme protéomique du CEA Marcoule). Ce marquage est un traitement hautement optimisé de l'analyse protéomique en « bottom-up » et il est utilisé pour maximiser la couverture peptidique (Choksawangarn *et al.*, 2012; Sechi and Chait, 1998).

Les données issues de la croissance anaérobie de *B. cereus* ont permis de réaliser une comparaison des nombres de peptides totaux identifiés dans chaque marquage (IDN et DI). Curieusement, le nombre total de peptides identifiés après le marquage IDN représentait un nombre total de peptides plus faible que le nombre des peptides identifiés après le marquage DI (**Figure 2.4**). En examinant le taux d'attribution des spectres, nous avons constaté que celui-ci était particulièrement bas pour IDN. Ce résultat pouvait s'expliquer par un défaut de coupure tryptique dû à des modifications sur les lysines ou les arginines.

En effet, des alkylation secondaires peuvent se produire avec les agents alkylants qui se fixent sur d'autres groupes chimique et acides aminés que la cystéine (Boja and Fales, 2001). Peu de données existent sur les alkylations indésirables dans les complexes biologiques. Cependant, une étude a montré qu'une alkylation secondaire peut se produire de manière importante, notamment avec le NEM qui se fixe non seulement sur les cystéines mais également sur l'extrémité N-terminal des peptides et sur les lysines (Suttapitugsakul *et al.*, 2017).

Ainsi, nos données brutes issues du marquage IDN des cystéines en croissance anaérobie de *B. cereus* ont été ré-analysées. Des recherches Mascot ont été effectuées avec l'inclusion de l'alkylation NEM sur les lysines et cette dernière a été abondamment retrouvée. La nouvelle analyse a largement amélioré les taux d'attribution des spectres et a permis d'augmenter le nombre de peptides totaux identifiés avec le marquage IDN. Cependant, elle n'a pas permis d'atteindre les valeurs obtenues avec DI (**Figure 2.4**).

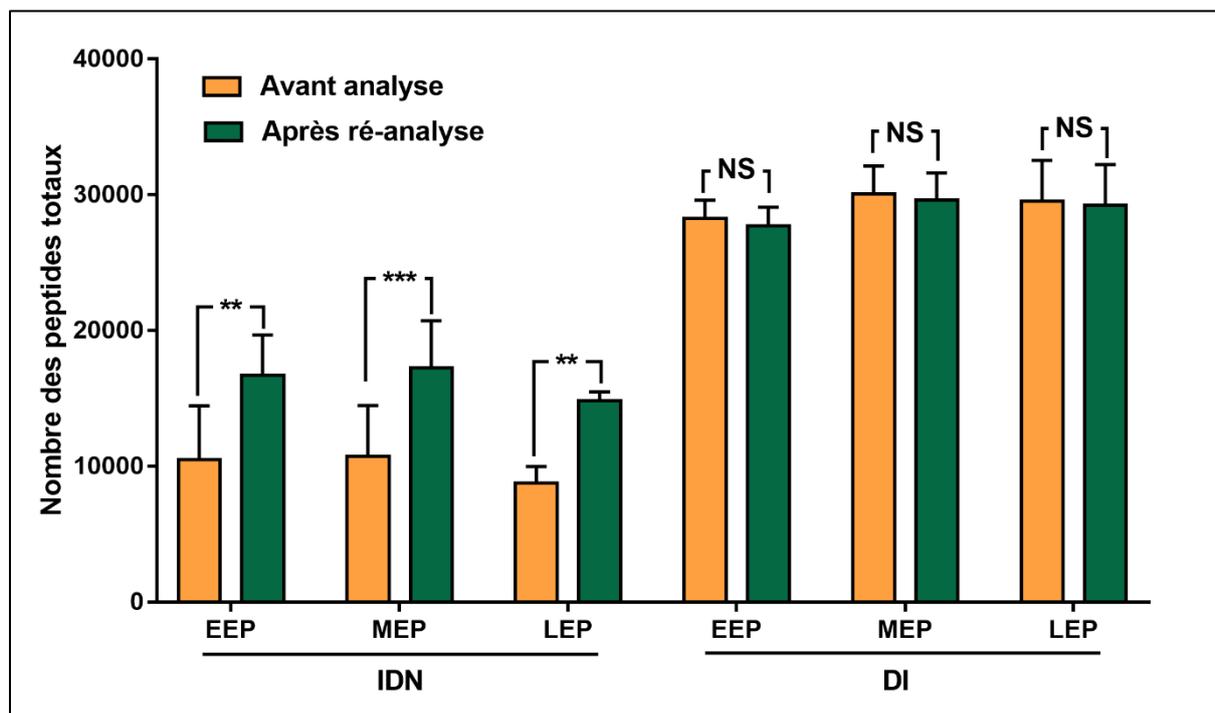


Figure 2.4. Nombre de peptides totaux identifiés avec les marquages IDN et DI du thiol protéome de *B. cereus* en croissance anaérobie. Les données correspondent aux valeurs moyennes calculées pour des triplicats. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. Un test *t* de Student pour échantillons appariés a été réalisé pour déterminer la significativité statistique (*: $0.01 < p < 0.05$; **: $0.001 < p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; NS : non significative). Le nombre de peptides totaux a été quantifié en EEP, MEP et LEP avant (orange) et après (vert) ré-analyse de l'alkylation secondaire de la lysine par le NEM.

2.5. Effet de la concentration en NEM et du pH sur l'alkylation secondaire des lysines

Après avoir identifié l'alkylation des lysines par le NEM, nous avons examiné les effets de la concentration en NEM et du pH sur cette alkylation indésirable lors du marquage IDN.

Des extraits protéiques de *B. cereus* ont été alkylés par l'IAM, réduits par le DTT, puis alkylés par le NEM à 3 concentrations différentes : 10 mM, 50mM et 150mM. Le nombre de lysine alkylées a été quantifié et normalisé par les peptides totaux identifiés (**Figure 2.5**). A pH 8.5, nous avons observé que le nombre d'alkylation sur les lysines augmentait avec la concentration

en NEM. L'alkylation des lysines étant très élevée avec le NEM lorsque la réaction s'effectue à pH 8,5, nous avons testé l'impact d'un pH plus bas (pH 7). Les résultats ont montré qu'à pH 7, l'alkylation des lysines est très faible.

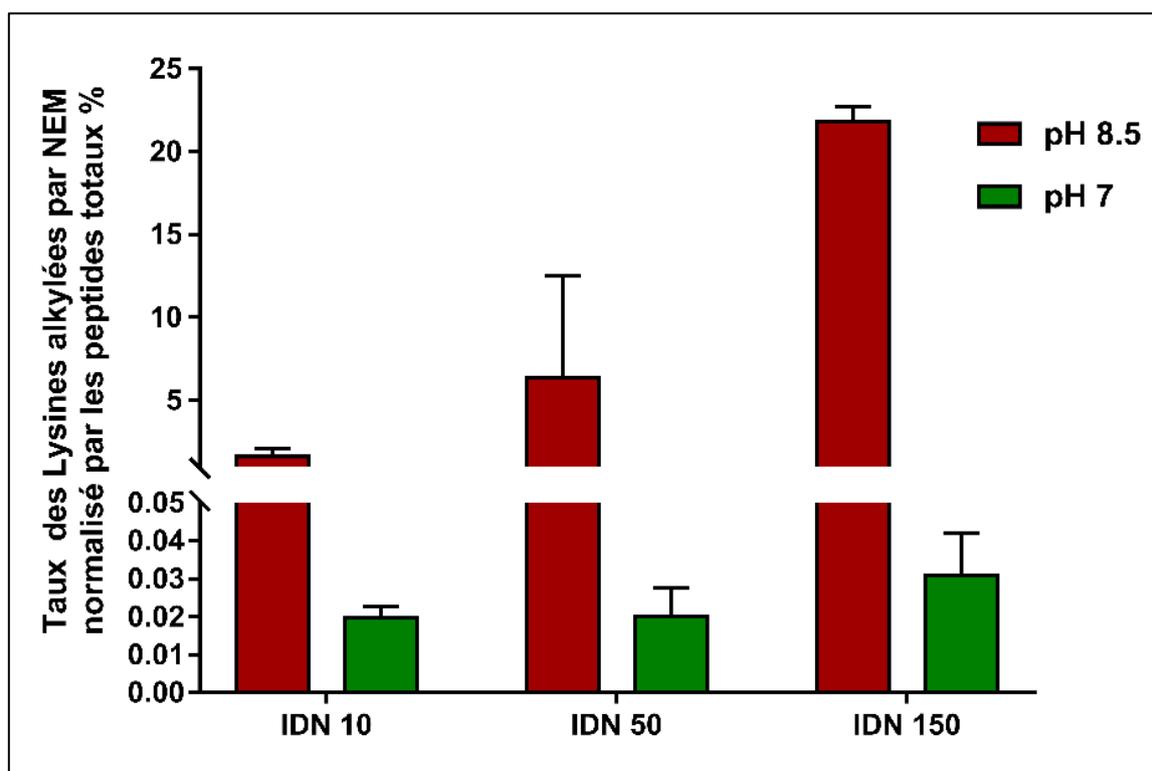


Figure 2.5. Evaluation de l'effet du pH (pH 8.5 et pH 7) et de la concentration en NEM (10 mM ; 50mM ; 150mM) sur l'alkylation des lysines. Les données correspondent aux valeurs moyennes calculées pour des duplicats biologique.

2.6. Application du marquage IDN aux cultures aérobies de *B. cereus*

Les résultats obtenus précédemment ont ensuite été utilisés pour réaliser un marquage différentiel optimal (IDN) du thiol protéome provenant de la croissance aérobique de *B. cereus* (pH=7, pO₂=20%) (**Chapitre 4 cf. p.83**). Les premiers résultats de cette analyse ont révélé que le nombre de peptides totaux identifiés avec le marquage IDN à pH7 est comparable au nombre de peptides totaux identifiés avec le marquage DI (**Figure 2.6**). Nous en concluons que l'optimisation du pH a contribué à l'amélioration de l'identification peptidique par l'approche d'alkylation différentielle des cystéines, IDN.

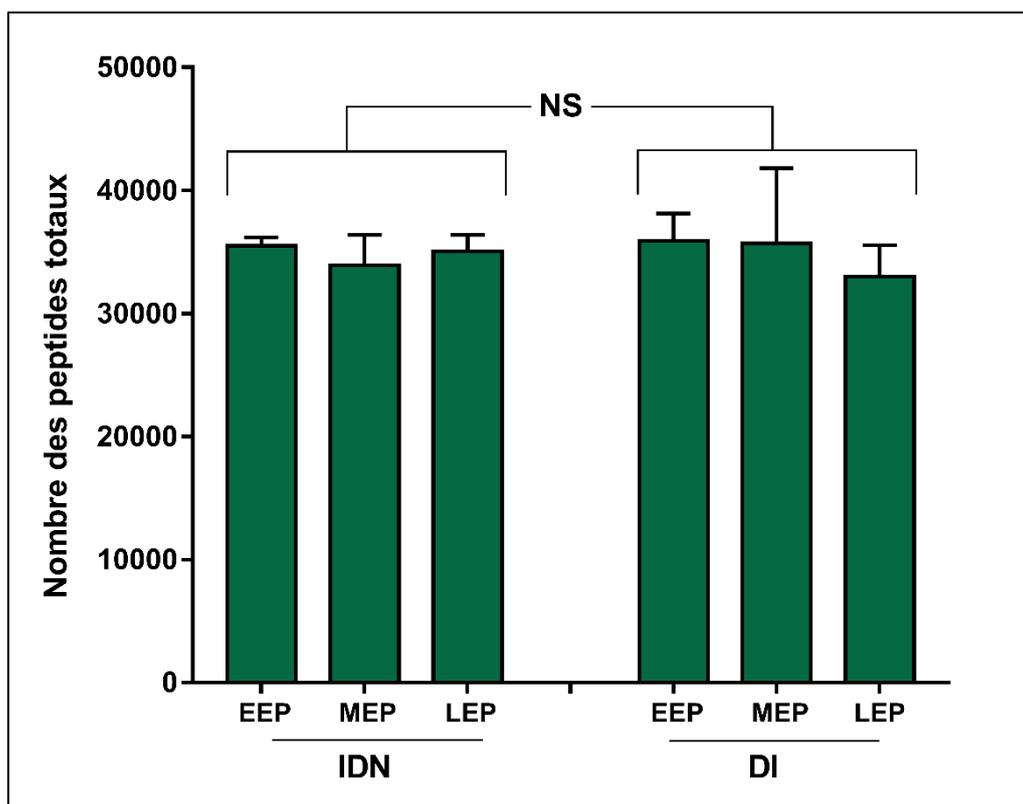


Figure 2.6. Nombre de peptides totaux identifiés après marquage IDN et DI du thiol protéome de *B. cereus* à EEP, MEP et LEP lors de la croissance en aérobiose. Les données correspondent aux valeurs moyennes calculées pour des triplicats. Les barres d'erreur indiquent l'écart-type. Un test *t* de Student pour échantillons appariés a été réalisé. Aucune différence significative n'a été observée (NS : non significative). Le nombre des peptides totaux (vert) a été quantifié en EEP, MEP et LEP dans le marquage IDN et DI.

***Chapitre 3. Étude du thiol
protéome de *Bacillus cereus*
pendant la croissance
anaérobie fermentaire***

Chapitre 3. Étude du thiol protéome de *Bacillus cereus* pendant la croissance anaérobie fermentaire

3.1. Introduction

Les caractéristiques structurales et fonctionnelles des protéines dépendent, non seulement de leur séquence en acides aminés, mais aussi des modifications post-traductionnelles (PTM). Les modifications redox des résidus cystéines figurent parmi les PTM les plus déterminantes dans la régulation de la fonction des protéines (Paulsen and Carroll, 2013; Klomsiri *et al.*, 2011; Groitl and Jakob, 2014). Les modifications redox s'opèrent sur les groupes thiols réactifs des résidus cystéines, qui peuvent passer d'un état réduit vers un état oxydé et *vice versa*.

Il est aujourd'hui admis que les modifications redox du thiol protéome sont au cœur du réseau qui contrôle l'homéostasie redox cellulaire (Jones and Sies, 2015). Des études visant à quantifier les modifications redox à l'échelle du thiol protéome ont été réalisées chez différents microorganismes (Leichert *et al.*, 2008; Brandes *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2014), mais aucune n'a été réalisée chez le pathogène alimentaire anaérobie facultatif *B. cereus*.

Malgré l'intérêt porté à l'identification et à la caractérisation des modifications redox des cystéines, leur étude à l'échelle du protéome reste difficile à mettre en œuvre du fait de la réactivité élevée des thiols. L'article présenté dans ce chapitre de thèse (i) présente la stratégie de marquage différentiel des cystéines suivie d'une détection en spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) (ii) expose comment les défis techniques rencontrés pour étudier la dynamique du thiol protéome au cours de la croissance fermentaire anaérobie de *B. cereus* ont été relevés, et (iii) établit le lien entre la croissance fermentaire anaérobie et la dynamique du thiol protéome chez *B. cereus*.

En complément de l'article, nous avons analysé le protéome de *B. cereus* ATCC14579 d'une manière détaillée afin de fournir une cartographie de référence couvrant le protéome et le thiol protéome.

“Redox proteomic study of *Bacillus cereus* thiol proteome during fermentative anaerobic growth”

Article accepté dans *BMC Genomics*

Fella Hamitouche ^a, Jean-Charles Gaillard ^b, Philippe Schmitt ^a, Jean Armengaud ^b, Catherine Duport ^{a*}, and Luc Dedieu ^{a**}

^a, Avignon Université, INRAE, UMR SQPOV, Avignon, France

^b Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France.

* These co-authors should be considered as co-last authors.

**Corresponding author: Luc Dedieu: Avignon Université, INRAE, UMR SQPOV, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cedex 9, France. Tel.: +33 (0)4 32 72 25 55. E-mail: luc.dedieu@univ-avignon.fr

Abstract

Background: *Bacillus cereus* is a notorious foodborne pathogen, which can grow under anoxic conditions. Anoxic growth is supported by endogenous redox metabolism, for which the thiol redox proteome serves as an interface. Here, we studied the cysteine (Cys) proteome dynamics of *B. cereus* ATCC 14579 cells grown under fermentative anoxic conditions. We used a quantitative thiol trapping method combined with proteomics profiling.

Results: In total, we identified 153 reactive Cys residues in 117 proteins participating in various cellular processes and metabolic pathways, including translation, carbohydrate metabolism, and stress response. Of these reactive Cys, 72 were detected as reduced Cys. The *B. cereus* Cys proteome evolved during growth both in terms of the number of reduced Cys and the Cys-containing proteins identified, reflecting its growth-phase-dependence. Interestingly, the reduced status of the *B. cereus* thiol proteome increased during growth, concomitantly to the decrease of extracellular oxidoreduction potential.

Conclusions: Taken together, our data show that the *B. cereus* Cys proteome during unstressed fermentative anaerobic growth is a dynamic entity and provide an important foundation for future redox proteomic studies in *B. cereus*.

Keywords: *Bacillus cereus*; thiol proteome; anaerobiosis; fermentative growth; differential labeling strategy

3.2. Background

Bacillus cereus is a Gram positive bacterium, which is recognized as a major foodborne pathogen responsible for two types of syndrome: emetic and diarrheal [1]. As well as being a facultative anaerobe, *B. cereus* can adapt to a wide range of environmental conditions allowing it to multiply in a number of food products and in the human intestine [2, 3]. In these environments, *B. cereus* adapts its metabolism to variations in temperature [4], pH, oxygen level, and oxidoreduction potential (ORP) [2]. *B. cereus* uses aerobic respiratory pathways to grow under aerobiosis, and mixed acid fermentation pathways to grow under anaerobiosis in the absence of an external electron acceptor. The main product of fermentation is lactate, which is synthesized alongside acetate, ethanol, formate, succinate, and small amounts of 2, 3-butanediol [5]. *B. cereus* re-oxidizes the reducing equivalent NADH, generated by glucose catabolism from NAD⁺, through the respiratory chain under aerobiosis, and during the formation of end-products under anaerobiosis [6]. Thus, NAD⁺/NADH is central to catabolism and energy supply, whereas the NADP⁺/NADPH couple plays an important role in biosynthesis and detoxification of cells [7]. Consequently, both the NAD and NADP systems play major roles in redox homeostasis [8]. Low-molecular weight compounds, such as coenzyme A, free cysteines, and bacillithiol (BSH) are also major contributors to redox homeostasis [9], in particular through their regulation of the redox status of the two amino-acids containing thiol (SH) groups, methionine (Met) and cysteine (Cys). Together, Cys and Met fulfill important roles in cells thanks to their redox chemistry [10]. Although the two residues are subject to redox regulation, the thioether form of the Met sulfur atom is less reactive than the sulfhydryl (thiol, SH) form of the Cys sulfur atom [10].

The redox status of Cys SH in proteins contributes significantly to protein folding [11], metal binding [12], and regulating protein function [10]. Thus, oxidation of Cys SH groups can result in the formation of reversible modifications such as disulfide bridges (S-S), sulfenic acid (S-OH) and nitrosylation (-SNO) groups, and irreversible oxidations such as sulfinic (R-SO₂H) and sulfonic acid (R-SO₃H) species [10]. The set of proteins containing reversibly modified thiols is referred to as the thiol proteome [13], or redoxome [14].

Attempts to study the thiol proteome have taken several approaches. Due to their high lability, cysteine modifications are challenging to analyze. Methods to identify Cys redox modifications have progressed over the years, ranging from the estimation of SH groups using colorimetric tests [15], and monitoring protein cysteine oxidation by loss of reactivity with thiol reagents [16], to accurately identifying sites of thiol redox modifications in numerous proteins [17]. The differential thiol labeling method constituted a major advance in the depth of analysis possible. The first step involves irreversibly blocking reduced-Cys thiols with an alkylating agent, subsequently the oxidized thiols are reduced, and finally labeled with a different alkylating agent [17]. This method has been combined with 2D gel-based methods [18, 19], to identify

several redox-sensitive proteins. However, this combination presented limitations, mainly in the identification of cysteines. Today, the combination of differential thiol labeling with tandem mass spectrometry is a powerful means to overcome the limitations of previous methods and to provide broad coverage of the thiol proteome [14]. At the proteome level, reduced and oxidized Cys can be distinguished thanks to the use of different alkylating agents [13]. They can thus be quantified and the abundance of the proteins bearing these residues can be estimated [20].

Large-scale redox proteomic analysis has been used to investigate the relationships between the thiol proteome status in (i) cyanobacteria, focusing on photosynthesis and the response to nutrient limitation [21, 22], and (ii) *Clostridium difficile* [23], *Saccharomyces cerevisiae* [24], *Escherichia coli* [25, 26], and Firmicutes including *Bacillus subtilis* [27], to investigate responses to oxidative stress. These studies revealed that the thiol proteome modifies key biological processes through alterations to redox-sensitive proteins such as the elongation factor EF-Tu (Tuf), a key component of translation [28]; alcohol dehydrogenase (AdhA), which is involved in energy metabolism [23]; and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC), a key player in defensive mechanisms [21].

Previous studies investigated the redox status of Met residues in unstressed *B. cereus* cells at both the cellular proteome and exoproteome levels [29, 30]. However, the thiol proteome of unstressed *B. cereus* cells has not yet been investigated. In this study, we used a thiol trapping method combined with shotgun proteomics analyses to decipher the *B. cereus* thiol proteome during fermentative anaerobic growth. Our results show that the *B. cereus* thiol proteome is growth-phase-dependent and contains higher number of reduced Cys in the later stages of growth.

3.3. Methods

3.3.1. Chemicals

Trichloroacetic acid (TCA), dithiothreitol (DTT), Trifluoroacetic acid (TFA), and iodoacetamide (IAM) were purchased from Sigma (St-Quentin-Fallavier, France). N-ethylmaleimide (NEM) and bicinchoninic acid assay (BCA) were purchased from Fisher Scientific (France). Trypsin and ProteaseMax reagent used for proteolysis were purchased from Promega (France).

3.3.2. Regulated batch culture

B. cereus was grown in regulated batch conditions (pH 7, temperature= 37 °C, pO₂= 0%) in MOD medium supplemented with 30 mM glucose [6]. Briefly, *B. cereus* ATCC 14579 strain [31] was grown in batch cultures under anoxic conditions in a 3-L-capacity bioreactor (My-control, Applikon technology) equipped with a pH electrode (405-DPAS-SC-K8S/225, Mettler

Toledo), a pO₂ polarographic oxygen electrode (ZO10023525, Applisens), and an AgCl ORP electrode (pT4805-SC-DPAS-K8S/225, Mettler Toledo). All batch culture experiments were conducted in 2 L MOD medium supplemented with 30 mM glucose, as described previously [29]. Continuous sparging of pure N₂ (10 L/h) was maintained to generate anoxic conditions (pO₂ = 0%). Cultures were stirred at 300 rpm, and temperature was set to 37 °C. The pH of the cell culture medium was maintained at 7 by adding 1 M HCl and 3 M KOH.

B. cereus cultures were performed in biological triplicates and the optical density (OD) at 600 nm was measured every 30 min. ORP values were corrected based on the value recorded by the reference electrode (+207 mV at 37 °C). The specific maximum growth rate (μ_{\max}) was determined using the Zwietering growth model [32].

3.3.3. Protein extraction: Quenching cellular thiol-disulfide exchange

Culture extracts were harvested anaerobically during the early-exponential growth phase (EEP) (at μ_{\max}), mid-exponential growth phase (MEP), and late-exponential growth phase (LEP) in vials containing 25% trichloroacetic acid (TCA). Extracts were incubated with TCA overnight at -20 °C to maximize protein precipitation. Proteins were pelleted by centrifugation (13,800 x g, 15 min, 4 °C) and washed twice with ice-cold acetone to remove excess TCA. Supernatants were discarded, and protein pellets were air-dried.

3.3.4. Differential thiol trapping method

Differential thiol labeling was performed as described previously [33, 34], with minor modifications. Briefly, protein extracts resuspended in denaturing buffer were divided between two tubes, labeled IDN, and IN (Fig. 2). Free cysteine residues were alkylated with 50 mM iodoacetamide (IAM), at room temperature in the dark for 1 h. Proteins were precipitated once again with 25% (w/v) TCA and washed twice with ice-cold acetone. Protein pellets were resuspended in the same buffer, and the IN samples were incubated with 150 mM N-ethylmaleimide (NEM). IDN samples were first reduced by adding 25 mM dithiothreitol (DTT), and incubating at room temperature for 1 h. Reduced proteins were TCA precipitated (25%), and resuspended before alkylation with 150 mM NEM.

The protein concentration of each sample was estimated using the bicinchoninic acid assay (BCA), according to the manufacturer's protocol (Thermo-Fisher). A 100- μ g aliquot of proteins was loaded onto a 12% SDS-PAGE for a short migration at 90 V (15-20 min). Gels were stained with imperial™ protein stain (Thermo-Fisher) for 1 h and destained with water. Protein bands were excised from gels. IDN and IN samples were digested with trypsin using the ProteaseMax surfactant (Promega) as described elsewhere [35] without further reduction/alkylation. For all samples, the resulting peptide mixtures were dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) prior to nano LC-MS/MS analyses.

3.3.5. High-resolution tandem mass spectrometry

Peptides were identified using a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Scientific) coupled to an ultimate 3000 nano LC system (Thermo Scientific). The system was essentially operated as previously described [36] with minor modifications. The peptide mixtures (10 μ L) were loaded and desalted online on a reverse-phase precolumn (Acclaim Pepmap 100 C18 5 μ m bead size, 100- \AA pore size, 5 mm \times 300 μ m, Thermo). They were then resolved on a nanoscale Acclaim Pepmap 100 C18 column (3 μ m bead size, 100- \AA pore size, 50 cm \times 75 μ m) at a flow rate of 200 nl/min using a 120-min gradient combining buffer B (0.1% HCOOH, 80% CH₃CN) and buffer A (0.1% HCOOH, 100% H₂O): 4 - 25% B in 100 min, followed by 25 - 40% B in 20 min. The mass spectrometer was operated in the Top20 data-dependent acquisition mode with full MS scans acquired from 350 to 1,800 m/z at 60,000 resolution, and after each scan, selection of the 20 most abundant precursor ions for fragmentation and MS/MS acquisition at 15,000 resolution. An intensity threshold of 9×10^4 was applied. A 10-s dynamic exclusion was used to increase the detection of low-abundance peptides. Only double- and triple-charged ions were selected for MS/MS analysis.

3.3.6. MS/MS spectra interpretation

MS/MS spectra were queried against the theoretical *B. cereus* ATCC 14579 proteome (5,216 sequences) with the Mascot Daemon software, version 2.6.1 (Matrix Science). The parameters were: full trypsin specificity, only 2+ and 3+ peptide charges, a mass tolerance of 5 ppm on the parent ion, a mass tolerance of 0.02 Da on the MS/MS ions, a maximum of two missed cleavages, no static modifications, and dynamic modifications were N-ethylmaleimide (C), Carbamidomethyl (C), Carbamyl (K), Oxidation (M), Deamidation (NQ). All peptide matches with a peptide score associated with a *p*-value of less than 0.05 were parsed using IRMa 1.31.1c software [37]. Proteins were considered valid when at least two different peptides were detected in the same sample. The proteomics datasets were submitted to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository [38], under dataset identifiers PXD022049 and 10.6019/PXD022049. [The dataset can be accessed with the Username: reviewer_pxd022049@ebi.ac.uk and Password: NFX3eY3n].

3.3.7. Data analysis

All experiments were replicated three times. For each Cys residues, we compared the mean value of the number of reduced Cys residues with the mean value of the number of oxidized Cys residues. Statistical analysis was performed using the paired Student t-test, setting the threshold for statistical significance at *p* less than 0.05. For proteome profiling, data were normalized relative to the total spectral count. Protein abundances were compared between two growth stages, as previously described [39]. Proteins for which abundances changed by more than 1.5 were considered significant when the *p*-value was less than 0.05. Protein

functions were assigned based on information from the Clusters of Orthologous Groups (COG) database [40].

3.4. Results

3.4.1. Labeling Strategy for global analysis of the *B. cereus* thiol proteome

Fermentative growth of *B. cereus* ATCC 14579 is illustrated in **Figure 3.1**. It was accompanied by a decrease in extracellular ORP ($\Delta\text{ORP} = 217 \pm 20$ mV). Culture samples were collected anaerobically, in TCA-containing vials at early- (EEP), mid- (MEP) and late-exponential (LEP) growth phases. Mixing with TCA resulted in immediate lysis of cells and precipitation of proteins, thus preserving the *in vivo* redox status of proteins containing Cysteine (Cys) residues [41].

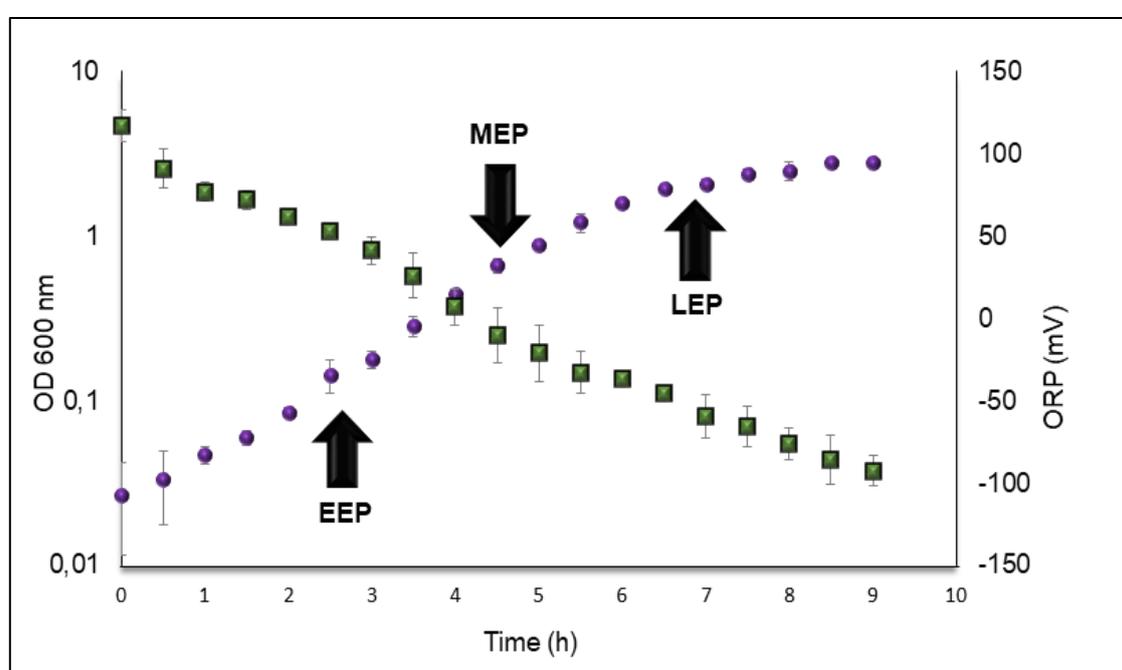


Figure 3.1. Growth curve and alterations to extracellular oxidoreduction potential (ORP) of *B. cereus* ATCC 14579 in regulated anoxic batch cultures. Circles represent optical densities at 600 nm (OD_{600}) and squares correspond to extracellular ORP. Black arrows indicate cell harvesting, at early-exponential growth phase (EEP), mid-exponential growth phase (MEP), and late-exponential growth phase (LEP). Data correspond to mean values calculated for biological triplicates \pm SD.

Reactive Cys residues were labeled using a three-step sequential strategy as previously described [34], and named IDN in our study (**Fig.3.2**): First, iodoacetamide (IAM) was used to label and block free Cys thiol groups (SH). Then, reversibly-oxidized thiol (S-OX) were reduced by exposure to DTT, and finally the corresponding thiol groups were labeled using N-ethylmaleimide (NEM). The IN control omitted the DTT reduction step, and was used to assess how efficiently IAM blocked Cys SH. All proteins were digested with trypsin, and the resulting peptides were submitted to extensive LC-MS/MS analysis. A total of 354,684 peptides were identified from the 18 samples (3 cultures \times 3 time-points \times 2 labels), including 9531 Cys-containing peptides.

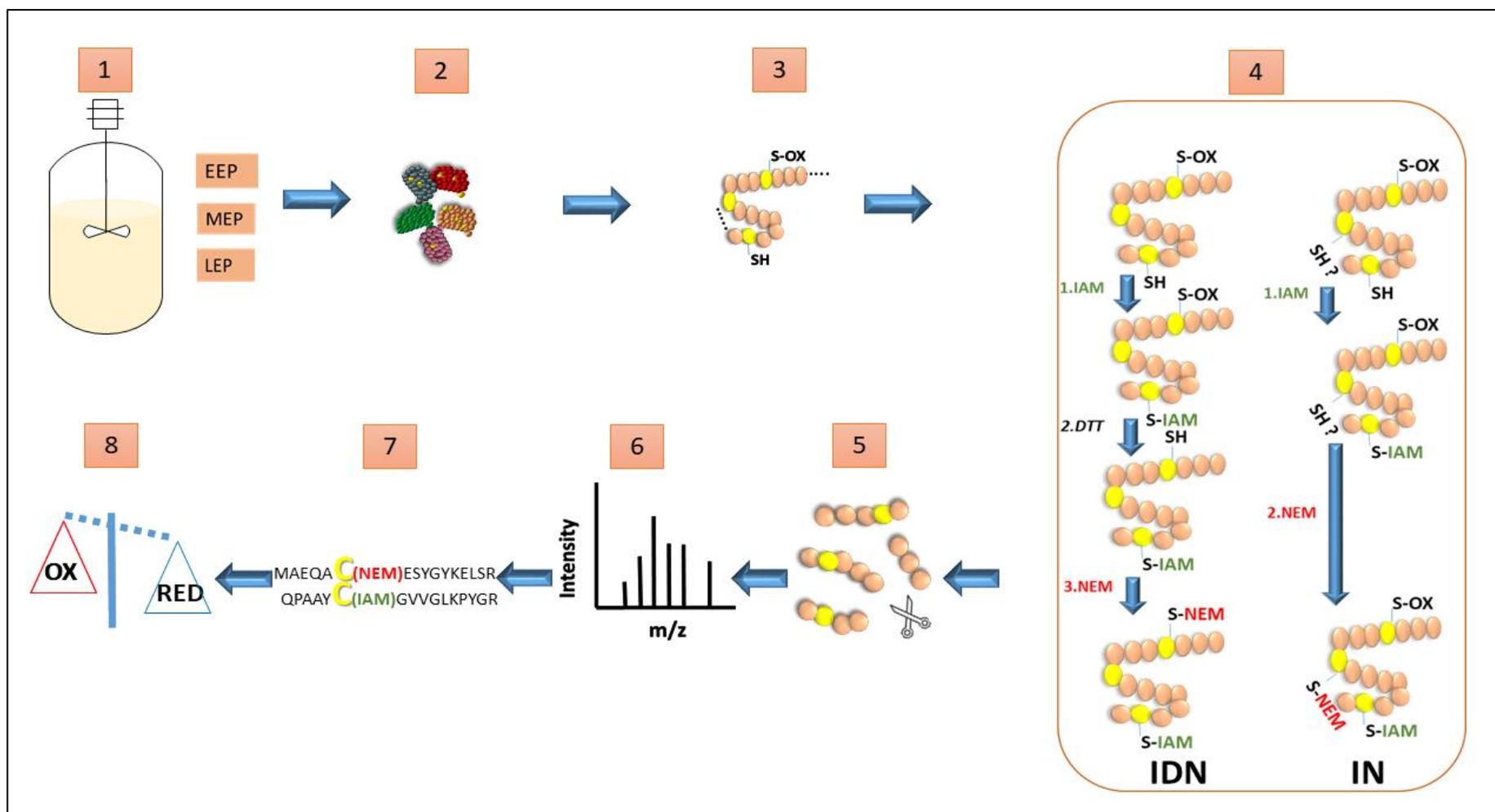


Figure 3.2. Schematic workflow used to investigate the *B. cereus* thiol proteome. 1/Samples were harvested from the bioreactor at early- (EEP), mid- (MEP) and late-exponential growth phase (LEP); 2/Proteins were extracted and thiol-disulfide exchanges were quenched by addition of TCA; 3/Denatured proteins were obtained; 4/Proteins with reactive Cys residues were labeled using two strategies. IDN) Reduced-Cys thiol (SH) were blocked with IAM; oxidized Cys thiols (S-OX) were then reduced with DTT and alkylated with NEM. IN) Reduced-Cys thiol were alkylated with IAM and remaining non-alkylated Cys thiols were blocked with NEM; 5/Proteins were digested with trypsin; 6/Peptides were analyzed by LC-MS/MS; 7/Modified Cys were identified; 8/ Proteins were identified and the thiol proteome profiled. TCA: trichloroacetic acid; IAM: iodoacetamide; DTT: dithiothreitol; NEM: N-ethylmaleimide.

The number of IAM-labeled Cys residues (IAMCys) was not significantly different in IDN-treated samples and IN controls, whatever the growth phase (**Fig. 3.3**). In contrast, as expected, the number of NEM-labeled Cys residues (NEMCys) detected was higher in IDN samples than in the IN control, for samples harvested during the EEP and MEP growth phases. Taken together, these results indicate that IAM alkylation stabilizes free sulfhydryl groups, but that a small number of Cys residues escape IAM alkylation and remain available for alkylation with NEM.

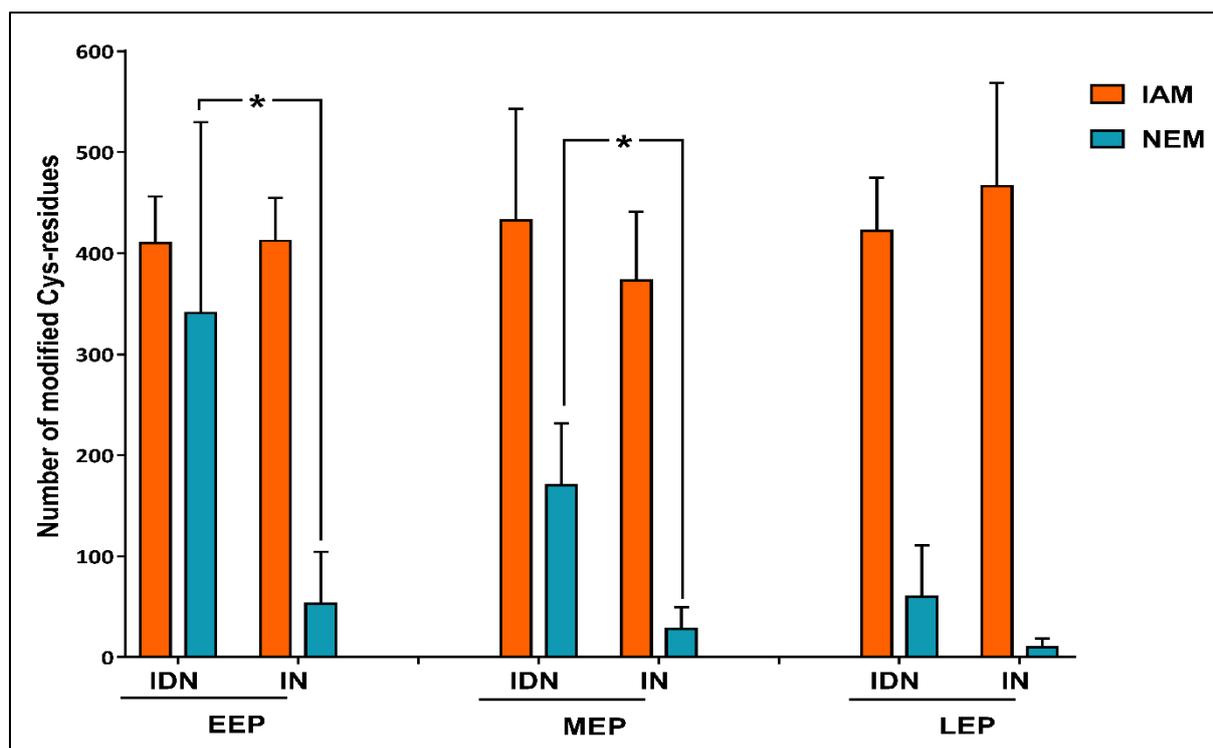


Figure 3.3. Labeling efficiency of IDN assay compared to IN controls. IDN: reduced Cys were labeled with IAM and reversibly-oxidized Cys were reduced with DTT prior to labeling with NEM. IN: reduced Cys were first labeled with IAM and then with NEM without reduction between steps. The labeled Cys-containing peptides and Cys residues were quantified in samples harvested at early-exponential phase (EEP), mid-exponential phase (MEP) and late-exponential phase (LEP). Data correspond to mean values calculated for triplicates. Error bars show standard deviation. Paired Student *t*-test was performed to determine statistical significance (*: $0.01 < p < 0.05$; **: $0.001 < p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

3.4.2. *B. cereus* thiol proteome dynamics

NEMCys in IDN samples correspond to either *in vivo* oxidized Cys or insensitive IAM residues. To retain only *in vivo* oxidized Cys residues, we corrected the IDN data by subtracting NEMCys detected in the IN dataset from the list of NEMCys detected in the IDN dataset. The corrected IDN dataset (IDNc) is shown in **Table S1 (cf. Excel file: Supplementary data Chapitre 3)**

Analysis of the IDNc dataset shows that the numbers of RedCys (labeled with IAM) and OxCys (labeled with NEM after reduction) were significantly different at both MEP and LEP (**Fig.**

3.4A). In addition, the number of OxCys residues decreased during growth and the number of RedCys tend to increase as growth progresses.

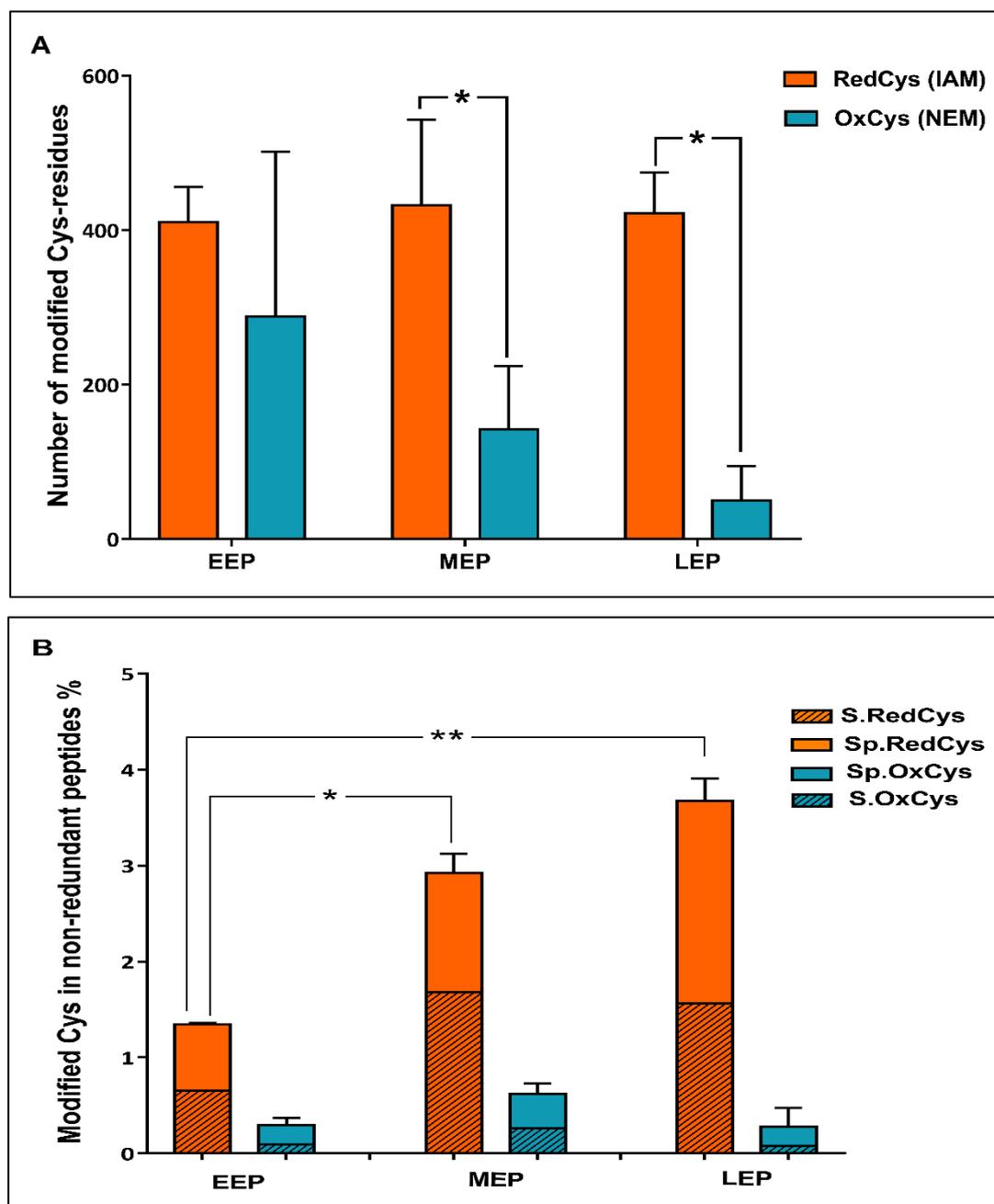


Figure 3.4. Proportion of reduced Cys (RedCys) and oxidized Cys (OxCys) residues identified in samples harvested at early-exponential, mid-exponential and late-exponential growth phases (EEP, MEP, and LEP, respectively). **A)** Number of modified cysteines: RedCys and OxCys in samples. **B)** Proportion of non-redundant RedCys and non-redundant OxCys residues. S.RedCys/S.OxCys: Shared reduced/oxidized cysteines; Sp.RedCys/Sp.OxCys: Specific reduced/oxidized cysteines. Data correspond to mean values calculated for three replicates. Error bars show standard deviation. Paired Student t-test was performed to determine statistical significance (*: $0.01 < p < 0.05$; **: $0.001 < p < 0.01$; ***: $p < 0.001$).

These data suggest that the thiol proteome evolved toward a highly reduced status as growth progressed. We next focused on non-redundant redox-sensitive Cys residues identified in the three replicates. The data in **Table 3.1** show that the number of these Cys residues decreased

during growth due to an overall decrease in peptide detection; the labeling efficiency remained stable ($3 \pm 0.1\%$).

Table 3.1. Numbers of non-redundant peptides, Cys-containing peptides and Cys residues identified in all the three replicates at early-exponential phase (EEP), mid-exponential phase (MEP) and late-exponential phase (LEP).

| | EEP | MEP | LEP |
|----------------------------|-------|-------|-------|
| Non-redundant peptides | 3,673 | 3,330 | 3,087 |
| Non-redundant Cys-peptides | 109 | 95 | 88 |
| Non-redundant Cys residues | 110 | 99 | 93 |

We compared the numbers of RedCys and OxCys of each non-redundant Cys residue. Based on this analysis, we identified 74 Cys residues for which the mean of RedCys number was significantly different from the mean of OxCys number ($p < 0.05$). Figure 3.5 shows their growth stage distribution (**Fig.3.5A**), their RedCys vs OxCys distribution and the peptide sequences in which they were identified (**Fig.3.5B**). The data indicate that (i) most of the 74 Cys residues were identified in only one growth phase and only two Cys residues had a higher number of OxCys compared to RedCys: one at EEP and the other at MEP. (ii) LEP samples supported the largest number of Cys residues, and (iii) the 74 Cys residues were contained in 72 non-redundant peptides.

If we consider all the 74 Cys residues, we do not observe any change in the total number of OxCys number during growth. In contrast, we observe a significant increase in the total number of RedCys at MEP and LEP, compared to EEP (**Fig. 3.4B**). This overall increase results from an increase in the number of RedCys residues identified in samples from at least two growth stages (hatched bars in **Fig.3.4B**), and RedCys residues identified specifically in samples from only one growth stage (plain bars in **Fig. 3.4B**).

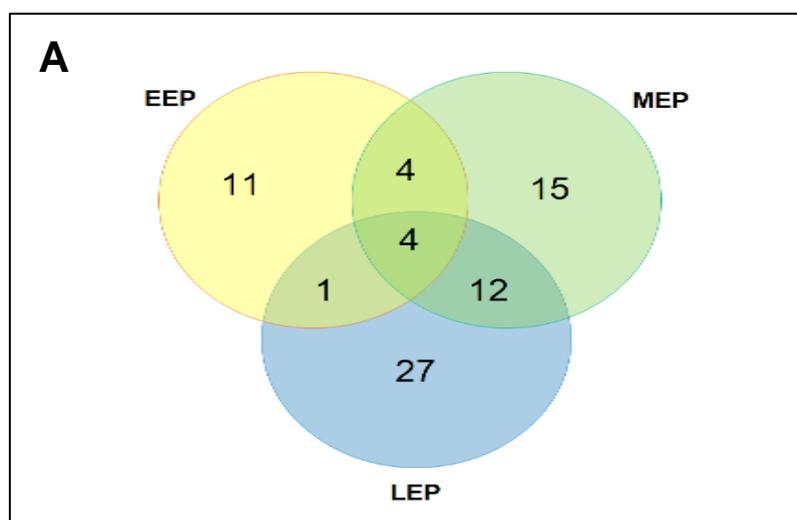




Figure 3.5. Growth-phase-distribution of the 74 Cys residues found predominantly as reduced Cys (RedCys) or oxidized Cys (OxCys). A) Venn diagram showing the growth-phase-distribution of the 74 Cys residues. B) Heat map visualization of the 72 peptides containing the 74 Cys residues. EEP, early-exponential growth phase; MEP, mid-exponential growth phase; LEP, late-exponential growth phase. Colors represent the redox detected form. Blue: oxidized; red: reduced; gray: no significant difference.

3.4.3. Components of the *B. cereus* thiol proteome

According to our results, the *B. cereus* thiol proteome includes 153 reactive Cys-containing peptides, of which 70 were detected mainly in the reduced form, and 2 in the oxidized form. We assigned these 153 peptides to their corresponding proteins. The resulting set consisted of 117 proteins (Table S2) (cf. Excel file: Supplementary data Chapitre 3), of which 64 contained the 74 Cys residues identified above (Table 2). These proteins were mainly involved in translation, amino acid, nucleotide and carbohydrate metabolism, as well as defense mechanisms, whatever the growth stage (Fig. 3.6).

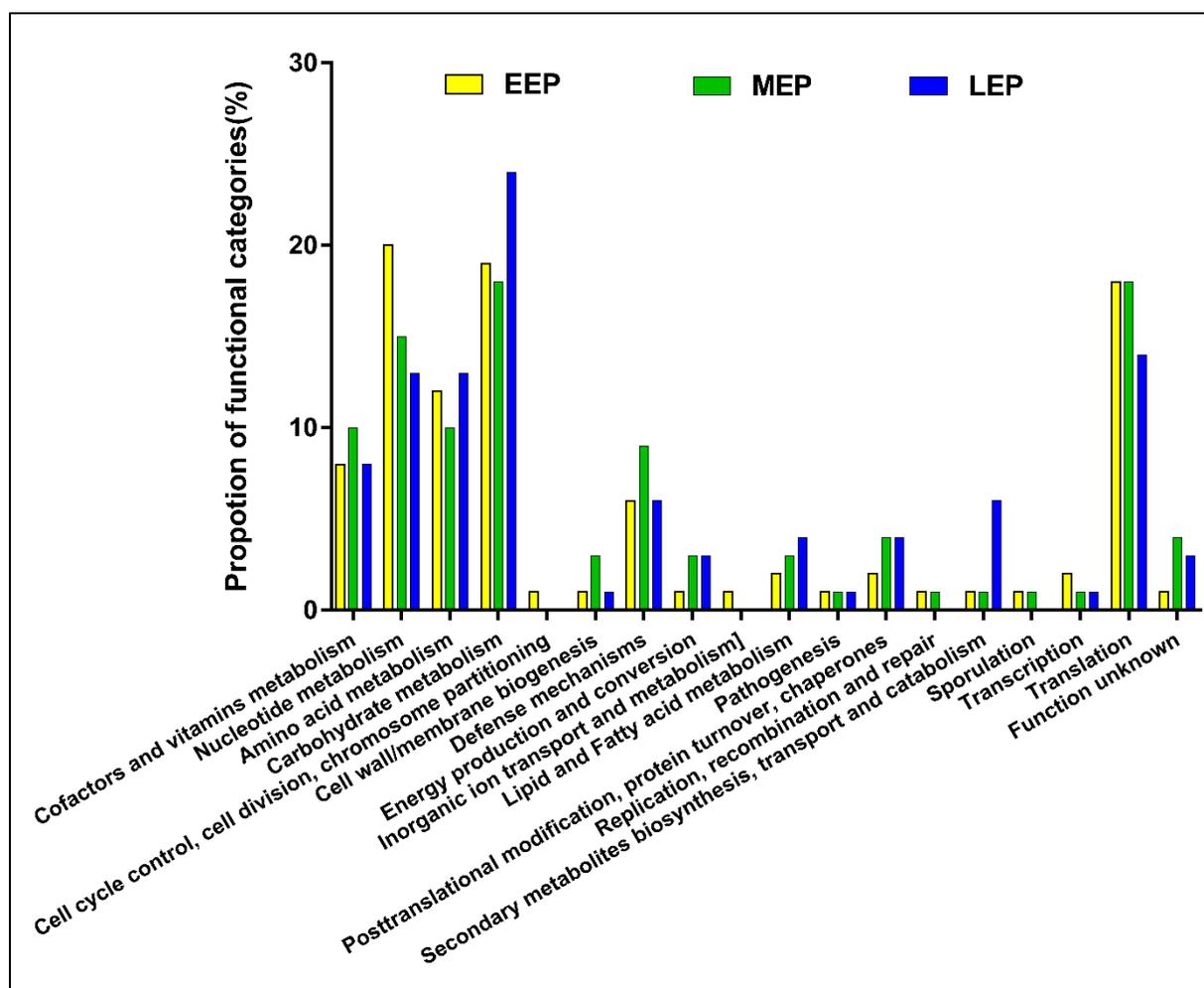


Figure 3.6. Functional categorization of reactive Cys-containing proteins at early (EEP), mid (MEP) and late (LEP) exponential growth stages.

Proteins related to carbohydrate metabolism include the glycolytic enzymes phosphofruktokinase PfkA (Q817F3) and phosphoenolpyruvate PtsI (Q819D7), the fermentative enzyme pyruvate formate-lyase PflA (Q81IA2), and alcohol dehydrogenase (AdhA, Q81DX6), which also plays an important role in fermentative metabolism. Three distinct modified cysteines were identified in AdhA: Cys²⁵⁵ was mainly detected as RedCys at MEP, whereas the two others (Cys⁹⁷ at EEP and Cys⁹¹ at MEP) were mainly detected as OxCys. Several proteins were categorized in functional groups related to defense mechanisms. Superoxide dismutase SodA2 (Q814I6) contains a Cys residue (Cys⁶⁰) identified as redox-sensitive at MEP, this protein was more abundant during LEP than during EEP (**Table S2**). The abundance of catalase (Kat, Q81GN6) increased during the LEP compared to both EEP and MEP, it harbors two redox-sensitive residues, Cys³⁵⁷, which are mainly detected as RedCys both at MEP and LEP; and Cys⁴⁵⁸, which is mainly detected as RedCys both at EEP and LEP. Thiol peroxidase (Tpx, Q817B8) contains two redox-sensitive Cys residues (Cys⁶⁰ and Cys⁹⁴),

indifferently detected as RedCys and OxCys throughout growth. Finally, alkyl hydroperoxide reductase C (AhpC, Q81IK9) contains one Cys residue (Cys¹⁶⁶), which was identified as redox-sensitive in the three growth stages, and mainly detected as RedCys at LEP.

Among the proteins categorized in the translation-related functional group, three are known to bind tRNA. These proteins harbored RedCys residues at EEP and MEP: Cys¹⁷⁰ in PheT1 (Q812N7), Cys¹²⁴ in IleS1 (Q819R4) and Cys¹⁵³ in ArgS (Q814Q8). The elongation factor Fusa (Q814C5) contains a Cys residue (Cys²⁵⁸) that was mainly detected as RedCys at EEP. The elongation factor Tuf (Q814C4) was associated with two redox-sensitive Cys residues (Cys⁸² and Cys¹³⁸), which were mainly detected as RedCys at MEP and LEP, respectively.

Several proteins involved in nucleotide metabolism were identified in our study, these included PurD (Q81IP8), Adk (Q81J22) and GuaB (Q81JC8). Interestingly, the three Cys residues present in Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (GuaB) were found to be redox-sensitive at all three growth stages: Cys³⁰⁸, which contributes to the active site, indifferently detected as RedCys and OxCys throughout growth, whereas Cys⁴⁴⁶ was detected as RedCys at all three growth phases, and Cys³²⁷ was detected mainly as RedCys specifically at LEP.

Five proteins involved in amino acid metabolism were also identified. TrpA (Q81GG4), TrpB (Q81GG5), TrpC (Q81GG7), and PabA (Q81GG9). These proteins were more abundant in samples harvested at LEP compared to both EEP and MEP. Anthranilate synthase component I TrpE (Q81GHO) was more abundant at LEP than at MEP (**Table 3.2**).

In addition to these classes of proteins, we identified RedCys residues in iron-sulfur cluster proteins such as NifU (Q816B6), which is involved in the biogenesis of bacterial Fe/S proteins, and is thus responsible for several functions, including redox catalysis [42]. The abundance of NifU increased significantly during LEP compared to EEP and MEP.

Interestingly, based on Cys-peptides and spectral count analysis, we detected three proteins involved in the assembly of the bacillibactin siderophore during the LEP. These proteins, the isochorismate synthase Dhbc (Q81DQ3), the isochorismatase Dhbb (Q81DQ1) and the 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase Dhbe (Q81DQ2) were only detected in samples harvested during the LEP. In Dhbe, Cys⁴⁷³ was indifferently detected as RedCys and OxCys. Dhbb harbors two Cys residues, Cys⁶⁷ and Cys¹⁹⁷, indifferently detected as RedCys and OxCys. In contrast, Cys¹⁴ in Dhbc was mainly detected as RedCys.

Table 3.2. Cys-proteins harboring specific cysteines detected as RedCys or as OxCys

| | Cys position | Protein | Description | Log ₂ (FC) | | |
|--|--------------|---------|-------------|--|---------|-------|
| | | | | EEP/LEP | MEP/LEP | |
| Cys proteins in EEP,MEP,LEP | | | | | | |
| Nucleotide metabolism | | | | | | |
| | Q81IP8 | 381 | PurD | Phosphoribosylamine--glycine ligase | NS | NS |
| | Q81JC8 | 446 | GuaB | Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase | NS | NS |
| Defense mechanisms | | | | | | |
| | Q81IE6 | 123 | TerD | Tellurium resistance protein | NS | NS |
| Translation | | | | | | |
| | Q812N7 | 170 | PheT_1 | Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit | NS | NS |
| Cys proteins in EEP,MEP | | | | | | |
| Cofactors and vitamins metabolism | | | | | | |
| | Q81J74 | 60 | | 7,8-dihydroneopterin aldolase | NS | NS |
| Translation | | | | | | |
| | Q819R4 | 124 | IleS1 | Isoleucine--tRNA ligase 1 | NS | NS |
| | Q814Q8 | 153 | ArgRS | Arginine--tRNA ligase | NS | NS |
| Amino acid metabolism | | | | | | |
| | Q814Q2 | 159 | SpeB | Agmatinase | NS | NS |
| Cys proteins in EEP,LEP | | | | | | |
| Defense mechanisms | | | | | | |
| | Q81GN6 | 458 | Kat | Catalase | -2,46 | -1,93 |
| Cys proteins in MEP,LEP | | | | | | |
| Nucleotide metabolism | | | | | | |
| | Q817X3 | 64 | Apt | Adenine phosphoribosyltransferase | NS | NS |
| | Q81IQ3 | 464 | PurL | Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit | NS | NS |
| Carbohydrate metabolism | | | | | | |
| | Q818T4 | 111 | | 2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit | NS | NS |
| | Q81IA3 | 123 | | Formate acetyltransferase | NS | NS |
| Cofactors and vitamins metabolism | | | | | | |
| | Q818X5 | 92 | RibH | 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase | NS | NS |
| | Q818R9 | 405 | Dxs | 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase | NS | NS |
| Amino acid metabolism | | | | | | |
| | Q817H8 | 189 | | Deblocking aminopeptidase | NS | NS |
| Lipid and Fatty acid metabolism | | | | | | |
| | Q81IN1 | 38 | | DAGKc domain-containing protein | NS | NS |
| Pathogenesis | | | | | | |
| | Q81I63 | 184 | | Microbial collagenase | NS | NS |
| | Q81JC7 | 266 | | D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase | NS | NS |
| Defense mechanisms | | | | | | |
| | Q81GN6 | 357 | Kat | Catalase | -2,46 | -1,93 |
| Transcription | | | | | | |
| | Q81J66 | 312 | MecB | Negative regulator of genetic competence | NS | NS |
| Cys proteins in EEP | | | | | | |
| Nucleotide metabolism | | | | | | |
| | Q81IQ6 | 169 | PurC | Phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthase | NS | NS |
| | Q819S3 | 1034 | CarB | Carbamoyl-phosphate synthase large chain | NS | NS |
| | Q819S0 | 264 | PyrB | Aspartate carbamoyltransferase | NS | NS |

| | | | | | |
|--|---------|--------------|--|-------|-------|
| Q81FV5 | 38 | DeoD | Purine nucleoside phosphorylase | NS | NS |
| Translation | | | | | |
| Q81IN3 | 185 | GatA | Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A | NS | NS |
| Q814C5 | 258 | FusA | Elongation factor G | NS | NS |
| Transcription | | | | | |
| Q81J47 | 892 | RpoC | DNA-directed RNA polymerase subunit beta | NS | NS |
| Amino acid metabolism | | | | | |
| Q816W9 | 315 | | Deblocking aminopeptidase | NS | NS |
| Defense mechanisms | | | | | |
| Q81IE5 | 110 | TerD | Tellurium resistance protein | NS | NS |
| Function unknown | | | | | |
| Q81IG4 | 65 | | Thiamine_BP domain-containing protein | NS | NS |
| Carbohydrate metabolism | | | | | |
| Q81DX6 | 97 | AdhA | Alcohol dehydrogenase | NS | NS |
| Cys proteins in MEP | | | | | |
| Nucleotide metabolism | | | | | |
| Q81J22 | 153 | Adk | Adenylate kinase | NS | NS |
| Q81IS3 | 250 | GuaA | GMP synthase | NS | NS |
| Q81IQ3 | 527 | PurL | Phosphoribosyl formylglycinamide synthase subunit | NS | NS |
| Translation | | | | | |
| Q814G7 | 15 | RpsR | 30S ribosomal protein S18 | NS | NS |
| Q81J29 | 27 | RpsZ | 30S ribosomal protein S14 type Z | NS | NS |
| Q814C4 | 82 | Tuf | Elongation factor Tu | NS | NS |
| Transcription | | | | | |
| Q81J47 | 818 | RpoC | DNA-directed RNA polymerase subunit beta | NS | NS |
| Q81CE5 | 158 | PpaC | Probable manganese-dependent inorganic pyrophosphatase | NS | NS |
| Amino acid metabolism | | | | | |
| Q81GG4 | 115 | TrpA | Tryptophan synthase alpha chain | -3.08 | -2.14 |
| Carbohydrate metabolism | | | | | |
| Q818P6 | 194 | | Phosphoglycolate phosphatase | NS | NS |
| Q81DX6 | 91/255 | AdhA | Alcohol dehydrogenase | NS | NS |
| Cofactors and vitamins metabolism | | | | | |
| Q818X3 | 115 | Biob | Biotin synthase | NS | NS |
| Protein folding | | | | | |
| Q819C5 | 73 | | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase | NS | NS |
| Cys proteins in LEP | | | | | |
| Amino acid metabolism | | | | | |
| Q81GG5 | 378 | TrpB | Tryptophan synthase beta chain | -2,24 | -2,26 |
| Q81GH0 | 168/65 | TrpE | Anthranilate synthase component 1 | -2,17 | -2,17 |
| Q81GG7 | 108 | TrpC PabA | Indole-3-glycerol phosphate synthase | -2,55 | -2,26 |
| Q81GG9 | 62 | (TrpGD) | Anthranilate synthase component II | -1,93 | -1,39 |
| Q814M2 | 364 | | O-acetylhomoserine sulfhydrylase | NS | NS |
| Carbohydrate metabolism | | | | | |
| Q819M9 | 262 | | Pyruvate carboxylase | NS | NS |
| Q81FZ7 | 124 | | Glycerate dehydrogenase | NS | NS |
| Q81A22 | 50 | PorB | Pyruvate synthase subunit | NS | NS |
| Q81IA2 | 12 | PflA | Pyruvate formate lyase activating enzyme | NS | NS |
| Q817F3 | 283 | PfkA | ATP-dependent 6-phosphofructokinase | NS | NS |
| Q819D7 | 365 | PtsI | Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase | NS | NS |
| Cofactors and vitamins metabolism | | | | | |
| Q81JC6 | 128/130 | PdxS | Pyridoxal 5'-phosphate synthase lyase | NS | NS |
| Q816H9 | 71 | MenB | 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase | NS | NS |

| | | | | | |
|---|-------|-------------|--|-------|-------|
| Q818W9 | 69 | BioD | ATP-dependent dethiobiotin synthetase | NS | NS |
| Transcription | | | | | |
| Q81J18 | 265 | RpoA | DNA-directed RNA polymerase subunit alpha | NS | NS |
| Translation | | | | | |
| Q814C4 | 138 | Tuf | Elongation factor Tu | NS | NS |
| Nucleotide metabolism | | | | | |
| Q81JC8 | 327 | GuaB | Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase | NS | NS |
| Defense mechanisms | | | | | |
| Q81IK9 | 166 | AhpC | Alkyl hydroperoxide reductase C | NS | NS |
| Lipid and Fatty acid metabolism | | | | | |
| Q814Y7 | 91 | FabZ | 3-hydroxyacyl-[acyl-carrier-protein] dehydratase | NS | NS |
| Q816B6 | 46/49 | NfuA (YutI) | NifU protein | -1.9 | -1,68 |
| Q816D2 | 117 | | HESB protein | NS | NS |
| Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism | | | | | |
| Q81DQ3 | 14 | DhbC | Isochorismate synthase | -2.71 | -3.06 |
| Q81DQ1 | 67 | DhbB | Isochorismatase | -2.55 | -2.52 |
| Energy production and conversion | | | | | |
| Q814U7 | 135 | | Nitritotriacetate monooxygenase component B | NS | NS |

3.5. Discussion

Thiol redox modifications play important roles in regulating proteins that sustain bacterial growth. However, despite its importance, and mainly due to technical challenges, few studies have attempted to quantify changes in the bacterial thiol redox proteome during growth. The first hurdle relates to the extreme sensitivity of Cys residues to artefactual oxidation. For our study, we circumvented this problem by performing rapid quenching with TCA [43]. A second challenge is to use an efficient strategy to profile thiol redox modifications in the whole organism. We adopted a strategy without peptide enrichment steps to avoid introducing quantitative bias which could lead to deviations from physiological conditions, as we wished to conserve the situation in the cell at the time of harvesting as far as possible. To achieve our aims, we implemented a differential thiol trapping technique, the IDN strategy, which relies on irreversible modifications of reduced and oxidized Cys residues using the two common alkylating agents, IAM and NEM [34, 44].

In any differential labeling strategy, the first alkylation – to block free thiols – must be highly efficient. Indeed, incomplete alkylation would increase the number of Cys available for NEM-labeling, leading to incorrect identification of oxidized residues [17]. In a previous study, Shaker *et al.* [25] used a sulfhydryl reactive dye (DyLight 550 maleimide) to estimate the proportion of free thiols after IAM labeling as a means to assess the efficiency of IAM alkylation. Here, we included a control sample (IN) to demonstrate and precisely quantify how efficiently IAM blocked free thiols. We were thus able to correct the data and obtain accurate quantifications of the NEMCys target. Through our approach, we identified 153 reactive Cys residues in *B.*

cereus thiol proteome. This relatively low number of redox-target Cys may be explained by the overall low Cys content of proteins in *B. cereus* (less than 1%) [23]. Like the other facultative anaerobic Gram positive Firmicutes, *B. cereus* probably promotes cysteine exclusion from both its cytoplasmic and exported proteins due to their high sensitivity to reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) [45]. Indeed, any such sensitivity could pose problems for an organism that can survive in a wide variety of, sometimes hostile, environments. Another possibility is that by restricting our analysis to Cys residues identified in all three replicates at each stage of growth to ensure the data generated were reliable and reproducible, we may have excluded some redox-sensitive Cys residues. However, our results are of the same order of magnitude as those reported for *Caenorhabditis elegans*, for which fewer than 200 redox-sensitive Cys residues were identified during its lifespan [46].

Our study revealed that the number of detected reduced Cys residues increased as growth progressed. Extracellular ORP decreased at the same time, thus *B. cereus* growth under anaerobiosis is accompanied by a significant decrease in extracellular ORP, especially between the beginning and the end of exponential growth [29]. The ability to decrease extracellular ORP is common to many bacteria, and may be related to the consumption of oxidizing compounds or the production of reducing end-products, as reported for *E. coli* [47]. In *Lactococcus lactis* and *Listeria monocytogenes* the decrease in extracellular ORP has been shown to depend on the presence of reduced thiol groups present on proteins located at the bacterial cell surface [48, 49]. If the number of reduced thiol groups of these proteins increases as growth progresses, as in the case of the thiol groups in the proteins identified in this study, it could drive the reduction in extracellular ORP. However, this hypothesis will need to be proven through future research.

Overall, redox-sensitive Cys residues were mainly detected in their reduced forms, according to the reducing environment of cytoplasm [43], and the extracellular milieu in our condition. Only two Cys residues were detected more frequently as OxCys than as RedCys. In addition to being dependent of cellular conditions, the reactivity of Cys residues is partly controlled by the intrinsic properties of the sulfur atom and by the position of the Cys residue in the three-dimensional protein structure [50, 51]. Reactivity can also be modulated by proximity to a metal ion [52]. Interestingly, the two Cys residues, which were mainly detected as OxCys in our samples both belonged to alcohol dehydrogenase AdhA (Q81DX6). The predicted three-dimensional structure of the protein (data not shown) localizes these two residues, Cys⁹¹ and Cys⁹⁷, near a Zn²⁺ binding site, which is assumed to promote oxidation [53].

Several redox-sensitive Cys-containing proteins identified in this study (Adk, PpaC, PurL, GuaB) were previously reported to undergo thiol modifications under oxidizing conditions in *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium glutamicum*, and *E. coli* [27, 28,

54, 55]. These reports suggest that these proteins could undergo specific redox regulation in response to variations in environmental conditions.

Our quantitative analysis of the thiol proteome underscores its growth-phase-specificity, which may be explained by a distinct reactivity of Cys residues in individual proteins [56] and/or changes to protein composition. Our results show, in particular, that the high detection of RedCys residues at LEP was mainly due to (i) the presence of Cys-containing proteins that were detected exclusively at LEP, and (ii) the increased detection of RedCys in some Cys-containing proteins, and to a lesser extent, (iii) to changes in both RedCys vs OxCys distribution of proteins (RedCys and OxCys moieties shift from an undifferentiated proportion to a predominant one of either) and abundance of some proteins, and (iv) to an increase in abundance for some Cys containing proteins.

Many abundant Cys-proteins, such as those involved in carbohydrate metabolism (PtsI and PfkA) and translation (FusA and Tuf), harbored cysteines displaying an increasing RedCys residues as growth progressed. These results suggest that these proteins may be redox-regulated to ensure efficient glucose uptake and protein biosynthesis over the course of growth. Moreover, redox regulation of PtsI and PfkA could potentially divert the metabolic flux toward post-translational modifications [57]. Interestingly, the modifications observed on Cys⁸² and Cys¹³⁸ in the elongation factor Tuf at MEP, and LEP, respectively, could reflect two different sites of potential redox regulation during anaerobic growth. A growth-phase-dependent modification of Cys residues in Tuf could be the result of a growth-phase-dependent regulation network, as previously described [58, 59]. The redox-sensitive Cys residues in the Tuf protein were previously described to be S-bacillithiolated and S-mycothiolated in response to hypochlorite stress [28, 60]. In addition, Cys⁸² in Tuf was identified as a conserved S-bacillithiolated site among *Bacillus spp.* and *Staphylococcus carnosus* [61].

Our data showed that some redox-sensitive Cys-containing proteins were detected during LEP, due to their high abundance at this stage of growth, such as Kat, NifU, Dhbc, and Dhbb, which had at least one Cys detected mainly as RedCys during LEP. From a physiological point of view, these data support the entry of bacteria into the stationary phase [62, 63] in response to stress and nutrient starvation. The Fe-S-containing protein NifU is involved in sensing iron and superoxide levels [64], catalase is produced to deal with oxidative stress [65], and the enzymes involved in bacillibactin biosynthesis circumvent iron starvation [63]. To our knowledge, this is the first study to demonstrate the presence of reactive cysteine residues in Dhbc and Dhbb. Redox regulation of Dhbb (Q81DQ1) remains uncharacterized, but might be important since this enzyme uses a thiolation mechanism to activate siderophore assembly [66].

3.6. Conclusions

In summary, we presented an overview of the *B. cereus* ATCC 14579 thiol proteome, which is mainly defined by a subset of redox-sensitive Cys residues differing from one growth stage to another, and functionally related to growth-stage-dependent cellular events. This work represents an essential step for researchers in the fields of bacterial physiology toward understanding and predicting the effect of changing redox conditions.

Declarations

Contributions

CD and LD conceived and designed the experiments. FH and JCG performed the experiments. JA, JCG, PS contributed (reagents/materials/analysis tools). FH, JCG, JA, CD and LD analyzed the data. FH, CD and LD wrote the paper.

Funding

This work was supported by Avignon-University and the Algerian government.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Data and materials availability

All data and materials are fully available without restriction. The proteomics datasets were submitted to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository [Project accession: PXD022049; Project DOI: 10.6019/PXD022049] and can be accessed with the Username: reviewer_pxd022049@ebi.ac.uk and Password: NFX3eY3n.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Algerian government for supporting Fella Hamitouche's thesis fellowship. We are also grateful to Bénédicte Doublet for technical assistance and to Joëlle Vinh and Vincent Méjean for helpful discussions.

3.7. Analyse complémentaire du protéome cellulaire de *B. cereus* au cours de la croissance fermentaire anaérobie : corrélation avec les groupes fonctionnels

L'analyse protéomique a permis d'identifier 1157 protéines différentes (**Table S3**) (cf. **Excel file: Supplementary data Chapitre 3**) représentant 22 % du protéome de référence de *B. cereus* [31]. L'évaluation de la localisation cellulaire des protéines identifiées à l'aide de l'outil PSORTdb [67], a révélé une présence majoritaire de protéines cytoplasmiques (63 %). Les protéines associées à la membrane, les protéines extracellulaires et celles associées à la paroi cellulaire représentent 12%, 3% et 1% des protéines identifiées, respectivement (**Figure 3.7**).

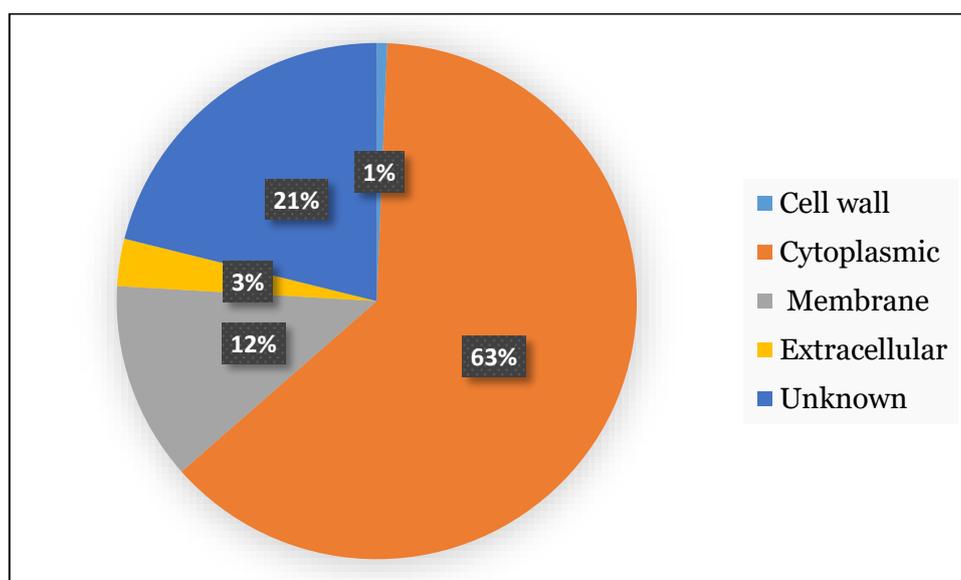


Figure 3.7. Localisation cellulaire des 1157 protéines identifiées en conditions anaérobies fermentaires chez *B. cereus*.

L'abondance des protéines identifiées a été déterminée au début de la phase exponentielle de croissance (EEP), au milieu de la phase exponentielle de croissance (MEP) et à la fin de la phase exponentielle de croissance (LEP). Les changements d'abondance de chacune des protéines ont été évalués au cours de la croissance. Ces changements d'abondance ont été jugés significatifs s'ils étaient supérieurs ou égaux à 1.5 ($FC \geq 1.5$) et si la valeur de p était inférieure ou égale à 0.05 ($p \leq 0,05$). En fonction de ces critères, 42 et 107 protéines ont montré une diminution de leur abondance au cours de la croissance, i.e. à MEP et LEP comparativement à EEP. Au contraire, 82 et 152 protéines sont plus abondantes à MEP et LEP respectivement qu'à EEP. Par ailleurs, 52 protéines sont plus abondantes à LEP qu'à MEP, alors que 37 sont moins abondantes (**Table S4**) (cf. **Excel file: Supplementary data Chapitre 3**).

L'enrichissement en groupe fonctionnel obtenu en utilisant « Gene Ontology » (GO) a mis en évidence qu'un large éventail de processus cellulaires était affecté au cours de la croissance exponentielle. Nous notons cependant que (i) la majorité des protéines dont l'abondance

décroit avec le temps sont impliquées dans le métabolisme des nucléotides et des acides aminés ou encore dans la glycolyse et dans le processus de traduction ; (ii) la majorité des protéines dont l'abondance augmente en fin de croissance exponentielle sont impliquées dans la virulence de la bactérie et la synthèse des protéines chaperones, du sidérophore bacillibactine et du tryptophane (**Figure 3.8**).

Les principales voies biologiques potentiellement impactées par les changements d'abondance des protéines sont décrites ci-dessous :

❖ Le métabolisme des nucléotides

Nos résultats montrent que l'abondance de protéines impliquées dans le métabolisme de *novo* des nucléotides diminue significativement au cours de la croissance (**Table S4**). Parmi ces protéines, nous avons identifié des protéines impliquées dans la biosynthèse de la pyrimidine telles que PyrD (BC3884) et PyrE (BC3882) et des protéines impliquées dans la biosynthèse de la purine telles que PurL (BC0329) et PurA (BC5468) [68]. Ce résultat indique que les cellules ont des besoins importants en nucléotides au début de croissance, ceux-ci étant les précurseurs des acides nucléiques. Il est particulièrement intéressant de noter que l'abondance des enzymes GuaA (BC0296) et Adk (BC0152) requises pour la conversion de l'inosine monophosphate (IMP) en GTP et ATP dans la voie de biosynthèse des purines est restée constante au cours de la croissance. Ce maintien pourrait refléter un besoin énergétique des systèmes de réparation à la fin de croissance.

❖ Le métabolisme des acides aminés

Sachant que *B. cereus* est cultivé dans un milieu (milieu MOD) contenant un mélange de 15 acides aminés, leur assimilation est préférée à leur synthèse [5]. Ceci explique pourquoi l'abondance de certaines enzymes de dégradation d'acides aminés telles que la glutamate déshydrogénase (BC1491), une sous-unité de la carbamoyl-phosphate synthase (BC3886) et l'aspartokinase (BC3798) sont plus grandes au début de la phase de croissance. En revanche, nous avons observé une augmentation significative de l'abondance de plusieurs protéines impliquées dans la biosynthèse du tryptophane en fin de croissance exponentielle (LEP). Cette voie inclut TrpD (BC1234), TrpE (BC1232) et TrpC (BC1235) qui sont des enzymes codées par l'opéron *trp* [69]. Au-delà du besoin métabolique de la cellule en tryptophane, la biosynthèse de cet acide aminé en fin de croissance pourrait être révélatrice de son implication dans la réponse au stress lié à l'entrée en phase stationnaire de croissance comme cela a été décrit lors de la croissance aérobie de *B. cereus* (**chapitre 4**).

❖ Le métabolisme des glucides

Les enzymes fermentaires clés, telles que les L-lactate déshydrogénases Ldh1 et Ldh2 (BC1924, BC4870), la pyruvate formate lyase PflA (BC0492) et l'alcool déshydrogénase (BC2220)

entrent dans la composition du protéome anaérobie [5,70]. L'abondance de ces protéines n'est pas significativement différente entre les trois phases de croissance exponentielle. Par contre, l'aldéhyde-alcool déshydrogénase (BC4365), la glucokinase (BC4260) et la pyruvate kinase (PykA, BC4599), qui sont des enzymes glycolytiques, ont des abondances qui diminuent entre EEP et LEP (**Table S4**). La citrate synthase (BC4594), l'isocitrate déshydrogénase (BC4593) et la malate déshydrogénase Mdh (BC4592) sont plus abondantes à LEP comparativement à EEP et MEP. Ces enzymes contribuent au fonctionnement du cycle de Krebs et à la synthèse des précurseurs biosynthétiques en anaérobiose (**Figure 3.8**) [2]

❖ Les facteurs de virulence

Parmi les protéines de virulence dont l'abondance augmente en fin de croissance, on retrouve des protéines flagellaires (BC1638 et BC1657), des enzymes de dégradation (BC0671 et BC5101) et des toxines diarrhéiques, dont le composant L1 de l'hémolysine BL (BC3103) et la sous-unité L1 de l'enterotoxine non hémolytique Nhe (BC1810). Ces protéines sont des protéines qui sont sécrétées dans le milieu extracellulaire et qui sont impliquées dans la virulence et la survie de *B. cereus* [71]. Des travaux précédemment réalisés au laboratoire ont montré que l'abondance des toxines est plus élevée en phase exponentielle de croissance qu'en phase stationnaire dans l'exoprotéome [29]. Dans notre étude, les protéines du protéome intracellulaire et de l'exoprotéome n'ont pas été analysées séparément, ce qui peut expliquer pourquoi la dynamique des toxines n'est pas la même que celle décrite précédemment.

❖ Les protéines chaperonnes et les protéines de réponse au stress oxydant

Lors de la phase avancée de la croissance (LEP) nous avons observé une augmentation de l'abondance des protéines telle que CspB (BC3539) et GroES (BC0294). Ces protéines chaperonnes contribuent au repliement des protéines, à la fois pendant et après le processus de traduction. En outre, elles contribuent à la réparation des protéines endommagées ou mal repliées suite à un stress thermique, acide ou encore oxydant [72]. L'augmentation de leur abondance est probablement le reflet de l'activation de la réponse au stress induit par l'épuisement des nutriments [72,73].

Parmi les protéines impliquées dans la réponse au stress oxydant, l'alkyl hydroperoxyde réductase AhpF (BC0377) est plus abondante à LEP qu'à EEP. D'autre part, la super oxyde dismutase SodA2 (BC5445) et la catalase KatA (BC1155) sont plus abondantes à LEP qu'à EEP et MEP. L'augmentation de la production de ces protéines en anaérobiose suggère un stress oxydant qui pourrait être généré à partir d'un stress nutritif /énergétique lié à l'épuisement du glucose [74,75].

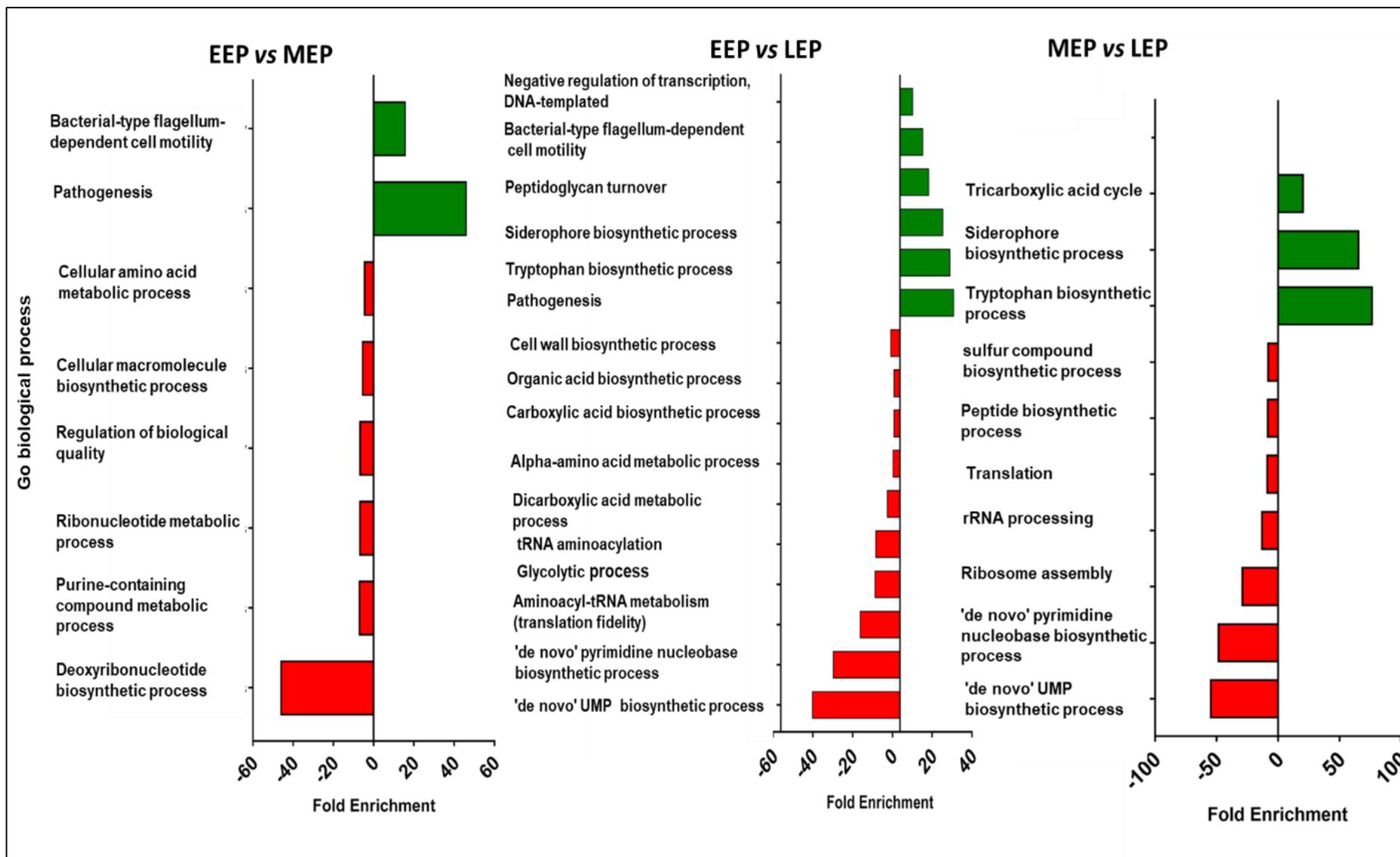


Figure 3.8. Analyse GO des catégories fonctionnelles des protéines changeant d'abondance entre EEP, MEP et LEP.

References

1. Ehling-Schulz M, Fricker M, Scherer S. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *FEMS microbiology letters*. 2004;232(2):189-95.
2. Duport C, Jobin M, Schmitt P. Adaptation in *Bacillus cereus*: From Stress to Disease. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1550.
3. Jeßberger N, Rademacher C, Krey VM, Dietrich R, Mohr A-K, Böhm M-E, et al. Simulating intestinal growth conditions enhances toxin production of enteropathogenic *Bacillus cereus*. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:627.
4. Diomande SE, Guinebretière M-H, Broussolle V, Brillard J. Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:813.
5. Rosenfeld E, Duport C, Zigha A, Schmitt P. Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Canadian journal of microbiology*. 2005;51(2):149-58.
6. Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Archives of microbiology*. 2006;185(3):222-33.
7. Agledal L, Niere M, Ziegler M. The phosphate makes a difference: cellular functions of NADP. *Redox Report*. 2010;15(1):2-10.
8. Xiao W, Wang RS, Handy DE, Loscalzo J. NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxid Redox Signal*. 2018;28(3):251-72.
9. Reniere ML. Reduce, Induce, Thrive: Bacterial Redox Sensing during Pathogenesis. *Journal of bacteriology*. 2018;200(17).
10. Poole LB. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free radical biology & medicine*. 2015;80:148-57.
11. Noiva R. Enzymatic catalysis of disulfide formation. *Protein expression and purification*. 1994;5(1):1-13.
12. Giles NM, Watts AB, Giles GI, Fry FH, Littlechild JA, Jacob C. Metal and Redox Modulation of Cysteine Protein Function. *Chemistry & Biology*. 2003;10(8):677-93.
13. Yang J, Carroll KS, Liebler DC. The expanding landscape of the thiol redox proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2016;15(1):1-11.
14. Chiappetta G, Ndiaye S, Igarria A, Kumar C, Vinh J, Toledano MB. Proteome screens for Cys residues oxidation: the redoxome. *Methods in enzymology*. 473: Elsevier; 2010. p. 199-216.
15. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1959;82(1):70-7.
16. Lee S-R, Kwon K-S, Kim S-R, Rhee SG. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(25):15366-72.
17. Wojdyla K, Rogowska-Wrzesinska A. Differential alkylation-based redox proteomics--Lessons learnt. *Redox biology*. 2015;6:240-52.
18. Le Moan N, Clement G, Le Maout S, Tacnet F, Toledano MB. The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(15):10420-30.

19. Baty JW, Hampton MB, Winterbourn CC. Detection of oxidant sensitive thiol proteins by fluorescence labeling and two-dimensional electrophoresis. *PROTEOMICS: International Edition*. 2002;2(9):1261-6.
20. Wojdyla K, Williamson J, Roepstorff P, Rogowska-Wrzesinska A. The SNO/SOH TMT strategy for combinatorial analysis of reversible cysteine oxidations. *Journal of proteomics*. 2015;113:415-34.
21. Guo J, Nguyen AY, Dai Z, Su D, Gaffrey MJ, Moore RJ, et al. Proteome-wide light/dark modulation of thiol oxidation in cyanobacteria revealed by quantitative site-specific redox proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2014;13(12):3270-85.
22. Ansong C, Sadler NC, Hill EA, Lewis MP, Zink EM, Smith RD, et al. Characterization of protein redox dynamics induced during light-to-dark transitions and nutrient limitation in cyanobacteria. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:325.
23. Sievers S, Dittmann S, Jordt T, Otto A, Hochgräfe F, Riedel K. Comprehensive redox profiling of the thiol proteome of *Clostridium difficile*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2018;17(5):1035-46.
24. Brandes N, Reichmann D, Tienson H, Leichert LI, Jakob U. Using quantitative redox proteomics to dissect the yeast redoxome. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(48):41893-903.
25. Shakir S, Vinh J, Chiappetta G. Quantitative analysis of the cysteine redoxome by iodoacetyl tandem mass tags. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2017;409(15):3821-30.
26. Leichert LI, Gehrke F, Gudiseva HV, Blackwell T, Ilbert M, Walker AK, et al. Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(24):8197-202.
27. Chi BK, Gronau K, Mäder U, Hessling B, Becher D, Antelmann H. S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in *Bacillus subtilis* as revealed by transcriptomics and redox proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011;10(11).
28. Imber M, Pietrzyk-Brzezinska AJ, Antelmann H. Redox regulation by reversible protein S-thiolation in Gram-positive bacteria. *Redox biology*. 2019;20:130-45.
29. Madeira JP, Alpha-Bazin B, Armengaud J, Duport C. Time dynamics of the *Bacillus cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:342.
30. Madeira J-P, Armengaud J, Duport C. Methionine residues in exoproteins and their recycling by methionine sulfoxide reductase AB serve as an antioxidant strategy in *Bacillus cereus*. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1342.
31. Ivanova N, Sorokin A, Anderson I, Galleron N, Candelon B, Kapatral V, et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*. 2003;423(6935):87-91.
32. Zwietering M, Jongenburger I, Rombouts F, Van't Riet K. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol*. 1990;56(6):1875-81.
33. Wholey W-Y, Jakob U. Hsp33 confers bleach resistance by protecting elongation factor Tu against oxidative degradation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*. 2012;83(5):981-91.
34. Kuo Y-H, Konopko AM, Borotto NB, Majmudar JD, Haynes SE, Martin BR. Profiling protein S-sulfination with maleimide-linked probes. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*. 2017;18(20):2028.

35. de Groot A, Dulermo R, Ortet P, Blanchard L, Guérin P, Fernandez B, et al. Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. PLoS genetics. 2009;5(3).
36. Klein G, Mathé C, Biola-Clier M, Devineau S, Drouineau E, Hatem E, et al. RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts. Nanotoxicology. 2016;10(10):1555-64.
37. Dupierris V, Masselon C, Court M, Kieffer-Jaquinod S, Bruley C. A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMa. Bioinformatics. 2009;25(15):1980-1.
38. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, Bernal-Llinares M, Hewapathirana S, Kundu DJ, et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. Nucleic acids research. 2019;47(D1):D442-D50.
39. Rousset L, Alpha-Bazin B, Château A, Armengaud J, Clavel T, Berge O, et al. Groundwater promotes emergence of asporogenic mutants of emetic *Bacillus cereus*. Environmental Microbiology. 2020.
40. Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. Nucleic acids research. 2015;43(D1):D261-D9.
41. Chiappetta G, Ndiaye S, Igbaria A, Kumar C, Vinh J, Toledano MB. Proteome Screens for Cys Residues Oxidation. 2010;473:199-216.
42. Blanc B, Gerez C, Ollagnier de Choudens S. Assembly of Fe/S proteins in bacterial systems: Biochemistry of the bacterial ISC system. Biochimica et biophysica acta. 2015;1853(6):1436-47.
43. Leichert LI, Jakob U. Protein thiol modifications visualized *in vivo*. PLoS Biol. 2004;2(11):e333.
44. Hansen RE, Winther JR. An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations. Analytical biochemistry. 2009;394(2):147-58.
45. Daniels R, Mellroth P, Bernsel A, Neiers F, Normark S, von Heijne G, et al. Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria. The Journal of biological chemistry. 2010;285(5):3300-9.
46. Knoefler D, Thamsen M, Koniczek M, Niemuth NJ, Diederich AK, Jakob U. Quantitative *in vivo* redox sensors uncover oxidative stress as an early event in life. Molecular cell. 2012;47(5):767-76.
47. Jacob H. Redox potential. Methods in microbiology. 1970;2:91-123.
48. Michelon D, Abraham S, Ebel B, De Coninck J, Husson F, Feron G, et al. Contribution of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Lactococcus lactis*. The FEBS journal. 2010;277(10):2282-90.
49. Pillot G, Brillet-Viel A, Prévost H. Implication of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Listeria monocytogenes*. bioRxiv. 2018:353409.
50. Fowler NJ, Blanford CF, de Visser SP, Warwicker J. Features of reactive cysteines discovered through computation: from kinase inhibition to enrichment around protein degrons. Scientific reports. 2017;7(1):16338.
51. Netto LE, de Oliveira MA, Monteiro G, Demasi AP, Cussiol JR, Discola KF, et al. Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more.

- Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology : CBP. 2007;146(1-2):180-93.
52. Stewart MD, Igumenova TI. Reactive cysteine in the structural Zn²⁺ site of the C1B domain from PKC α . *Biochemistry*. 2012;51(37):7263-77.
 53. Tamarit J, Cabisco E, Ros J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(5):3027-32.
 54. Loi VV, Rossius M, Antelmann H. Redox regulation by reversible protein S-thiolation in bacteria. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:187.
 55. Xie K, Bunse C, Marcus K, Leichert LI. Quantifying changes in the bacterial thiol redox proteome during host-pathogen interaction. *Redox biology*. 2019;21:101087.
 56. Go Y-M, Chandler JD, Jones DP. The cysteine proteome. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015;84:227-45.
 57. Ralser M, Wamelink MM, Latkolik S, Jansen EE, Lehrach H, Jakobs C. Metabolic reconfiguration precedes transcriptional regulation in the antioxidant response. *Nature biotechnology*. 2009;27(7):604-5.
 58. Talavera A, Hendrix J, Versées W, Jurénas D, Van Nerom K, Vandenberg N, et al. Phosphorylation decelerates conformational dynamics in bacterial translation elongation factors. *Science advances*. 2018;4(3):eaap9714.
 59. Kraal B, Lippmann C, Kleanthous C. Translational regulation by modifications of the elongation factor Tu. *Folia microbiologica*. 1999;44(2):131-41.
 60. Chi BK, Busche T, Van Laer K, Bäsell K, Becher D, Clermont L, et al. Protein S-mycothiolation functions as redox-switch and thiol protection mechanism in *Corynebacterium glutamicum* under hypochlorite stress. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(4):589-605.
 61. Chi BK, Roberts AA, Huyen TTT, Bäsell K, Becher D, Albrecht D, et al. S-bacillithiolation protects conserved and essential proteins against hypochlorite stress in firmicutes bacteria. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;18(11):1273-95.
 62. Jaishankar J, Srivastava P. Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2000.
 63. Lee JY, Passalacqua KD, Hanna PC, Sherman DH. Regulation of petrobactin and bacillibactin biosynthesis in *Bacillus anthracis* under iron and oxygen variation. *PLoS One*. 2011;6(6):e20777.
 64. Fontecave M. Iron-sulfur clusters: ever-expanding roles. *Nature chemical biology*. 2006;2(4):171-4.
 65. Heo YJ, Chung IY, Cho WJ, Lee BY, Kim JH, Choi KH, et al. The major catalase gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is under both positive and negative control of the global transactivator OxyR in response to hydrogen peroxide. *Journal of bacteriology*. 2010;192(2):381-90.
 66. May JJ, Wendrich TM, Marahiel MA. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(10):7209-17.
 67. Peabody MA, Laird MR, Vlasschaert C, Lo R, Brinkman FS. PSORTdb: expanding the bacteria and archaea protein subcellular localization database to better reflect diversity in cell envelope structures. *Nucleic acids research*. 2016;44(D1):D663-D8.

68. Armenta-Medina D, Segovia L, Perez-Rueda E. Comparative genomics of nucleotide metabolism: a tour to the past of the three cellular domains of life. *BMC genomics*. 2014;15(1):1-16.
69. Babitzke P, Gollnick P. Posttranscription Initiation Control of Tryptophan Metabolism in *Bacillus subtilis* by the trp RNA-Binding Attenuation Protein (TRAP), anti-TRAP, and RNA Structure. *Journal of bacteriology*. 2001;183(20):5795-802.
70. Clair G, Armengaud J, Duport C. Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(6).
71. Clair G, Roussi S, Armengaud J, Duport C. Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2010;9(7):1486-98.
72. Susin MF, Baldini RL, Gueiros-Filho F, Gomes SL. GroES/GroEL and DnaK/DnaJ have distinct roles in stress responses and during cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. *Journal of bacteriology*. 2006;188(23):8044-53.
73. Mazzon RR, Lang EA, Silva CA, Marques MV. Cold shock genes *cspA* and *cspB* from *Caulobacter crescentus* are posttranscriptionally regulated and important for cold adaptation. *Journal of bacteriology*. 2012;194(23):6507-17.
74. Mols M, Abee T. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental microbiology*. 2011;13(6):1387-94.
75. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*. 2003;57(1):395-418.

***Chapitre 4. Signature
moléculaire de la croissance
aérobie chez *Bacillus cereus* :
contribution du thiol protéome***

Chapitre 4. Signature moléculaire de la croissance aérobie chez *Bacillus cereus* : contribution du thiol protéome

4.1. Introduction

Lors d'une croissance aérobie, *B. cereus* est continuellement exposé aux espèces réactives de l'oxygène (ROS), produites par la respiration. La production de niveaux élevés de ROS ou l'altération des défenses anti-oxydantes cellulaires entraînent un stress oxydant qui peut endommager les macromolécules telles que les protéines, les acides nucléiques et les lipides. En revanche, la production des ROS à des niveaux moindres, est impliquée dans la signalisation cellulaire *via* l'oxydation des acides aminés. Au premier rang, figure la cystéine qui présente une réactivité élevée *vis-à-vis* des oxydants et qui peut être sujette à différentes modifications oxydatives.

L'objectif de cet article est de caractériser les évolutions du protéome de *B. cereus* et de l'état redox du thiol protéome au cours de la croissance aérobie. Les résultats ont révélé la capacité de *B. cereus* à moduler son protéome tant au niveau de l'abondance des protéines qu'au niveau de l'abondance des résidus de cystéines pour faire face aux ROS, qui augmentent avec le temps pendant la croissance aérobie.

“Cysteine proteome response to endogenous reactive oxygen species”

Article publié dans International Journal of Molecular Sciences

Fella Hamitouche^a, Jean Armengaud^b, Luc Dedieu^{a*} and Catherine Duport^{a*+}

a, Avignon Université, INRAE, UMR SQPOV, Avignon, France

b Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France.

* These co-authors should be considered as co-last authors.

+Corresponding author: Catherine Duport, Avignon University, INRAE, UMR SQPOV, Site Agroparc, F-84914 Avignon Cedex 9, France. E-mail: catherine.cuport@univ-avignon.fr

Abstract

Aerobic bacteria have to cope with endogenous reactive oxygen species (ROS) that accumulate at the end of exponential growth. Cysteine residues of proteins are one of the main targets of ROS. Here, we used high-resolution tandem mass spectrometry coupled to liquid chromatography to detect significant changes in protein abundance and thiol status of cysteine-containing proteins from *Bacillus cereus* during aerobic exponential growth. The proteomic profiles at early, middle, and late exponential growth phases revealed i) enrichment along growth in proteins dedicated to fighting ROS, ii) decrease of proteome cysteine content, and iii) changes of the reduced thiol status of some key proteins, such as the transition state regulator AbrB. Taken together, our data indicate that growth under oxic conditions requires increased allocation of the proteome for attenuation of ROS negative effects. Our data also provide a source of information on redox-sensitive proteins in *B. cereus*, and their possible involvement in the growth phase dependent proteome remodeling.

Key words: aerobic growth, *Bacillus cereus*, proteome, cysteines, ROS

4.2. Background

For aerobic bacteria, oxygen (O_2) is an essential element that acts as a final acceptor of electron transport through respiratory chain, enabling an efficient production of energy [1]. During a normal electron transport, oxygen is partially reduced into H_2O [2] and generates a small quantity of reactive oxygen species (ROS) [3]. The superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), which is the product of one-electron reduction of oxygen, is the precursor of the other ROS [3]. $O_2^{\cdot-}$ generates hydrogen peroxide (H_2O_2) by spontaneous dismutation or catalyzed dismutation by superoxide dismutase (SOD). H_2O_2 can be fully reduced to H_2O or react with ferrous ion (i.e. the Fenton reaction) to generate the highly reactive hydroxyl radical ($OH\cdot$) [3, 4]. H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, and $OH\cdot$ are highly reactive molecules that can oxidize all macromolecules including DNA, RNA, lipids and proteins. Oxidation of macromolecules can provoke damages to multiple cellular processes [4, 5]. Consequently, bacteria have evolved mechanisms to counteract ROS production and minimize their harmful effect. These mechanisms constitute a complex network of enzymatic and non-enzymatic detoxifying systems. The enzymatic systems include SOD, catalase and alkyl hydroperoxide reductase, which are proteins widely distributed in aerobic bacteria. The SOD enzyme is considered as the first line in the antioxidant system because it detoxifies $O_2^{\cdot-}$ into H_2O_2 . Both catalase and alkyl hydroperoxide are then required to detoxify H_2O_2 [6, 7]. Major components of the non-enzymatic antioxidant systems are low molecular weight thiols (LMW thiol). LMW thiols function as cellular redox buffers to maintain the reduced status of the cytoplasm [8]. The best characterized LMW thiol is glutathione (GSH), which is widely found in eukaryotes and Gram-negative bacteria but rarely in Gram positive bacteria [9]. Gram positive bacteria utilize LMW thiols such as Bacillithiol (BSH) and mycothiol (MSH) [10]. While ROS are mainly associated with oxidative stress, they also serve as signaling molecule to regulate cellular processes [11, 12]. Among ROS, H_2O_2 emerged as the major metabolite operating in redox signaling, especially due to its ability to rapidly and specifically mediate the reversible oxidation of cysteine thiol in proteins [13]. Cysteine can exist in several oxidation states in response to H_2O_2 oxidation such as sulfenic acid ($-SOH$), disulfide bond ($-S-S-$), and mixed disulfide bond with a LMW thiol [14]. These oxidative cysteine modifications can constitute a facile switch for modulating protein function, and signal transduction cascades [15, 16]. Numerous reports from the recent literature illustrate how cysteine switches can regulate intracellular processes in response to external stimuli [17, 18]. However, few publications focused on cysteine-mediated redox signalization under physiological conditions, mainly because detection of redox status of cysteines is challenging [19]. *Bacillus cereus* is a facultative aerobic foodborne pathogen, whose metabolism is well characterized [20]. *B. cereus* growth in O_2 -regulated batch culture stops after exhaustion of the carbon source and ROS accumulation [21, 22]. Despite decades of extensive investigations, which unraveled several regulatory processes, environmental sensors and repairing

mechanisms [20, 23-25], we still lack information on the link between cysteine residues content and cellular physiology and redox homeostasis.

Herein, we used a quantitative global proteomics strategy to investigate protein abundance change and cysteine redox state changes during *B. cereus* aerobic growth. We explored the thiol proteome using a differential labeling strategy and the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) technology, which is a powerful tool to detect redox modifications on cysteine residues [26, 27]. Our results highlighted that *B. cereus* modulates its proteome both at the protein abundance level and cysteine residue level to face ROS, which increase along time during aerobic growth.

4.3. Materials and methods

4.3.1. *B. cereus* growth condition

B. cereus ATCC14579 batch culture was carried out in Bioreactor (My-control, Applikon technology, equipped with Mettler Toledo Dissolved oxygen and pH probes) containing 1.5 L of MOD medium supplemented with 30mM glucose [19, 69]. Culture medium was inoculated at an OD₆₀₀ of 0.03 from overnight preculture. Medium was buffered at pH7 with KOH and HCl. Temperature was maintained at 37 °C. Oxygen was maintained at pO₂ closer to 20% *via* a sequential cascade control of airflow rate and agitation speed. Cultures were performed in triplicates.

4.3.2. Protein extraction for proteome analysis

Samples were harvested at three points of time: the early-exponential growth phase (EEP), mid-exponential growth phase (MEP), and late-exponential growth phase (LEP). Cell lysis, and protein extraction were performed in TCA vial as previously described [71]. Extracted proteins were denatured with DAB buffer (6M urea, 200mM Tris-HCl pH 8.5, 10mM EDTA, and 2% w/w SDS) adjusted at pH 7. Subsequently, samples were labeled by a differential thiol trapping methods. Detailed thiol labeling strategy, named IDN, was described previously [71]. In brief, each sample was first labeled with 50 mM iodoacetamide (IAM) that alkylates reduced cysteine residues, then treated with 25 mM DTT to reduce oxidized cysteine residues, and finally DTT-reduced cysteine residues were labelled with 150 mM N-ethylmaleimide (NEM). The efficiency of the IAM alkylation step was evaluated for each sample by using an IN labelling, i.e. without DTT reduction between IAM and NEM labeling. This control generated a dataset used to subtract from NEM dataset cysteine residues that have escaped IAM labeling. Protein concentration was determined using BCA protein assay kit (Pierce) as recommended by the supplier, and a total of 100 µg of proteins was used for the subsequent protein digestion.

4.3.3. Protein identification and quantification

Proteins were digested in-gel with sequencing grade, modified trypsin as previously described [70]. The digested peptides were separated and analyzed using a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo Scientific) coupled to an ultimate 3000 nano LC system (Thermo Scientific). Peptide mixtures (10 μ L) were loaded, desalted online, and then resolved along their hydrophobicity on a nanoscale Acclaim Pepmap 100 C18 column (3 μ m bead size, 100-Å pore size, 50 cm \times 75 μ m) at a flow rate of 200 nl/min using a bi-modal 120-min gradient combining buffer B (0.1% HCOOH, 80% CH₃CN, 20% H₂O) and buffer A (0.1% HCOOH, 100% H₂O): 4 - 25% B in 100 min, followed by 25 - 40% B in 20 min. Mass spectrometry was performed in data-dependent acquisition mode following a Top20 strategy with full MS scans acquired from 350 to 1,800 m/z at 60,000 resolution, and after each scan, sequential selection of each of the 20 most abundant precursor ions for fragmentation and MS/MS acquisition at 15,000 resolution. An intensity threshold of 9×10^4 was applied. A 10-s dynamic exclusion was used to increase the detection of low-abundance peptides. Only double- and triple-charged ions were selected for MS/MS analysis.

The MS/MS data were searched against the theoretical *B. cereus* ATCC 14579 annotated theoretical proteome (5,216 sequences) using the Mascot software, version 2.5.1 (Matrix Science). The search followed the enzymatic cleavage rule for trypsin, only 2⁺ and 3⁺ peptide charges, 5 ppm mass tolerance for the parent ion, 0.02 Da mass tolerance for MS/MS ions and a maximum of two missed cleavage sites. For the database search, only the following variable modifications were considered: N-ethylmaleimide (C), Carbamidomethyl (C), Carbamyl (K), Oxidation (M), Deamidation (NQ). All peptide matches with a peptide score associated with a Mascot *p*-value of less than 0.05 were retained. Proteins were considered valid when at least two different peptides were detected in the same sample. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository with the dataset identifier PXD025504 and 10.6019/PXD025504. [The reviewers may access this private dataset using reviewer_pxd025504@ebi.ac.uk as Username and APQW12z7 as Password].

4.3.4. Bioinformatics analysis

Only proteins identified by at least two different peptides were regarded as present and reliably identified. Protein quantification and statistical significance analysis were performed using limma package for R. Proteins that were quantified with fold-change (FC) ≥ 1.5 and *p*-value < 0.05 on one growth stage compared to the other growth stages were designated as differentially abundant proteins (DAPs). Log₂ (FC) was used for further analysis. Quantification of labelled cysteine-containing peptides were restricted to peptides identified in at least three replicates of a sample. Gene Ontology enrichment analysis was performed using the Panther Gene

Ontology tool (<http://geneontology.org/>). The FactomineR package for R was used for principal component analysis (PCA). PCA was carried out with biological replicates of each growth phase as individuals and the IAMCys and NEMCys values assigned to proteins as quantitative variables. Principal components 1 (PC1) and 2 (PC2) define the plane that maximizes the variance of the individuals when projected into a 2-dimensional space. Each PC defines a proportion of the total variance, with PC1 explaining the greatest amount of variation. Applied to our data of 18 individuals, PC1 and PC2 explained 52.06 % and 14.27% of the total variation, respectively, and separate NEM-individuals from IAM individuals. *In silico* analysis for cysteine composition in the identified proteome was performed through cysteine occurrence calculation on sequences from the data files created by the Uniprot database. The Venn diagram was drawn with Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

4.5. Results & discussion

4.5.1. *B. cereus* proteome is enriched in antioxidant proteins as aerobic growth progresses

B. cereus ATCC 14579 was grown in pO₂-regulated conditions as described previously [19]. Three independent biological replicates were collected at early (EEP), middle (MEP) and late exponential (LEP) growth phase (**Annexe 2 (Fig. S1). cf. p.129**).

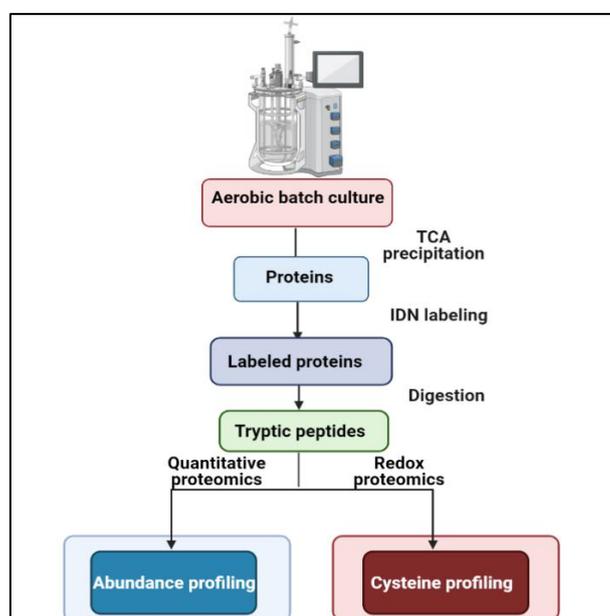


Figure 4.1. Flowchart of the experimental design. Protein extracts were harvested at early- (EEP), mid- (MEP) and late-exponential growth phase (LEP). IDN differential cysteine trapping method consisted of labeling reduced cysteines with Iodoacetamide, reducing oxidized cysteines with DTT, and then labeling them with N-ethylmaleimide.

Protein extracts were prepared without separating cell pellets and culture supernatants, in contrast to previous studies [19, 21], to get a comprehensive view of the proteome changes. Cell lysis and protein extractions were performed in TCA sampling vial to quench the *in vivo* redox status of cysteine residues [16, 23]. Cysteine thiol were labelled sequentially using a differential alkylation technique [71]. The identification and quantification of proteins and cysteine thiol modifications were performed from tryptic peptides analyzed by LC-MS/MS (**Fig. 4.1**).

In total, 1648 proteins were confidently identified with at least two peptides (**Table S1**) (**cf. Excel file: Supplementary data Chapitre 4**). We compared the abundance of these proteins between the three growth stages. A protein was considered as a differentially accumulated protein (DAP), when the fold-change ratio is larger than 1.5 ($|FC| \geq 1.5$) and $p\text{-value} \leq 0.05$. Based on these criteria, we identified 134 down- and 145 up- DAPs in MEP compared to EEP and, 226 down- and 224 up- DAPs in LEP compared to EEP. Among DAPs identified at LEP, 40 showed decreased levels during the transition from MEP and LEP, 57 showed increased levels and 1203 had no significant change (**Table S2**). (**cf. Excel file: Supplementary data Chapitre 4**)

Taken together, the data indicate that *B. cereus* proteome is highly dynamics during exponential growth, and changes in protein abundances become more pronounced with increasing culture age. Such changes during growth generally reflect a sequential activation and repression of specific cellular processes. To identify these cellular processes, we carried out a statistical enrichment of DAPs in gene ontology (GO) biological process and cellular component. The number of biological processes mapped by DAPs between LEP and EEP was higher than between MEP and EEP, consistent with the numbers of DAPs identified from the differential analysis (**Fig.4.2**). Several biological processes associated with primary metabolism showed significant depletion in proteins, including nucleotide metabolism when cells enter MEP, translation and fatty acid metabolism when cells enter LEP. This reflects a lower demand for macromolecule synthesis at the end of growth, particularly upon entry into stationary phase [25, 26].

Several processes associated with virulence such as pathogenesis and especially enterotoxin biosynthesis, motility and proteolysis showed significant enrichment in proteins as soon as the cells entered in MEP (**Fig. 4.2**), according to previous studies [19, 21]. These biological processes are known to be growth phase dependent and controlled by a variety of pleiotropic regulators [17, 27]. Interestingly, we note that tryptophan biosynthesis pathway and response to oxidative stress pathway were enriched in proteins when cells enter MEP and LEP, respectively. This most likely reflect the accumulation of ROS at the end of growth, the possibility that tryptophan metabolic enzymes are attractive targets for ROS, and the attempt of bacteria to counteract oxidative stress to limit cellular damages [28, 29]. To limit cellular damages, cells have evolved mechanisms ranging from repairing systems, induction of cross

protection between starvation and oxidative stress, while strengthening the cell wall for maintaining bacterial morphology [30, 31]. Finally, *B. cereus* could adjust its proteome during growth to ensure a rapid and robust response to gradually deteriorating conditions, which include carbon starvation and ROS accumulation [17, 18, 32].

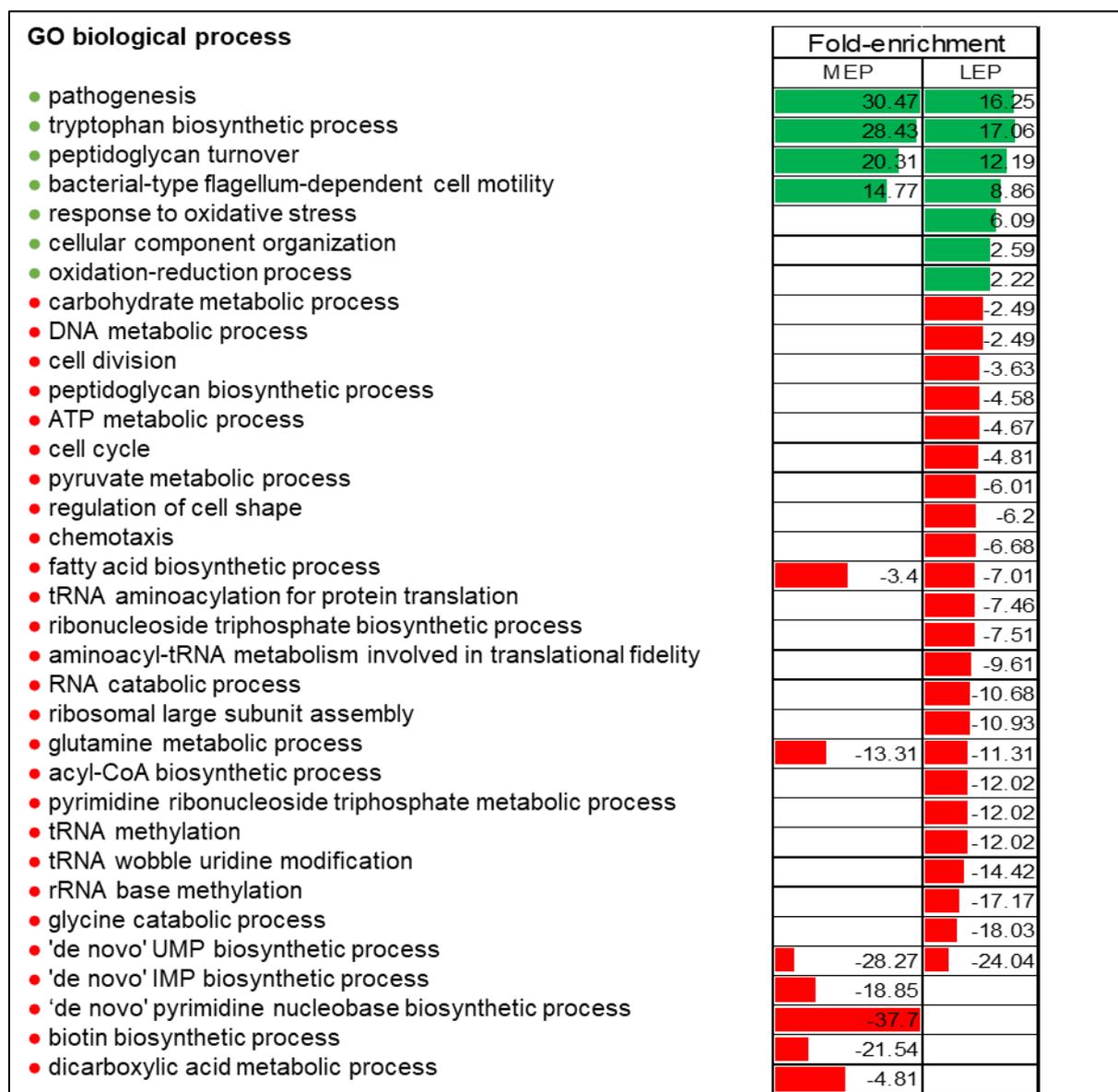


Figure 4.2. Enriched biological processes for differentially accumulated proteins (DAPs). Green and red bars represent the biological processes (Gene Ontology) significantly enriched and non-enriched (adjusted $p < 0.05$, Fisher's test), respectively in mid-exponential growth phase and late-exponential growth phase compared to early exponential growth phase.

4.5.2. Cysteine content of *B. cereus* proteome decreases as growth progresses

Although antioxidant systems are induced at the end of growth, protein cysteine residues are subject to further oxidation through ROS, and a cysteine rich proteome will be a prime target for these ROS. We analyzed the cysteine content of *B. cereus* proteome and its change during growth by focusing on DAPs. The contribution of each DAP was calculated by multiplying its

normalized spectral abundance factor (NSAF) value by its cysteine number (**Table S3**) (**cf. Excel file: Supplementary data Chapitre 4**).

Figure **4.3A** shows that the cysteine content of DAPs decreased as growth progressed, and as a result that the cysteine content of proteome was reduced by 47 ± 11 % at LEP compared to EEP. The classification of proteins into COG functional groups shows that proteins associated with transcription, and to a lesser extent protein associated with biosynthetic pathways (nucleotide and coenzyme metabolism functional groups) are the main contributors to the cysteine content decrease of *B. cereus* proteome (**Fig. 3b**). Proteins classified in these categories are globally cysteine-rich proteins (more than 2 cysteine residues per proteins, **Table S3**). Interestingly, pathogenesis and defense mechanism functional classes showed increased cysteine content at LEP (**Fig. 3b**). Increased cysteine level associated with proteins categorized in pathogenesis was mainly due to their abundance increase (**Fig. 2**). Indeed, most of the proteins categorized in this functional class are cysteine-poor proteins, especially the components L2, B and B' of Hemolysin BL (BC3101, BC3102 and BC3104, no cysteine residue), and the components NheA (BC1809, one cysteine residue) and NheB (BC1810, no cysteine residue) of non-hemolytic enterotoxin Nhe (**Table S3**). Enterotoxins are typically extracellular proteins, which are exported from cytoplasm to extracellular milieu [33, 34].

By excluding cysteine residues from its secreted enterotoxins, *B. cereus* could protect them from both cytoplasmic oxidation [19] and extracellular oxidation [35]. However, the cholesterol-dependent hemolysin, cereolysin O (CLO, HlyI, and BC5101) is an exception, because it contains 3 cysteines and is known to be thiol-activated pore-forming toxin [36].

In contrast to pathogenesis-associated proteins, most of the enzymes categorized in defense mechanisms are cysteine rich proteins such as the alkyl hydroperoxide reductase subunit F (BC0376, 5 cysteine residues), and glutathione peroxidase (BC2114, 3 cysteine residues). The antioxidant activity of these proteins depends on their cysteine residues [37]. In summary, our data indicated that *B. cereus* decreases the cysteine content of its proteome by decreasing the abundance of cysteine-rich proteins as growth progresses, with the exception of antioxidant proteins, which play crucial roles in the later stages of growth. By decreasing the cysteine content of its proteome, *B. cereus* may be attempting to avoid oxidative damage to cysteine residues through their thiol functional groups.

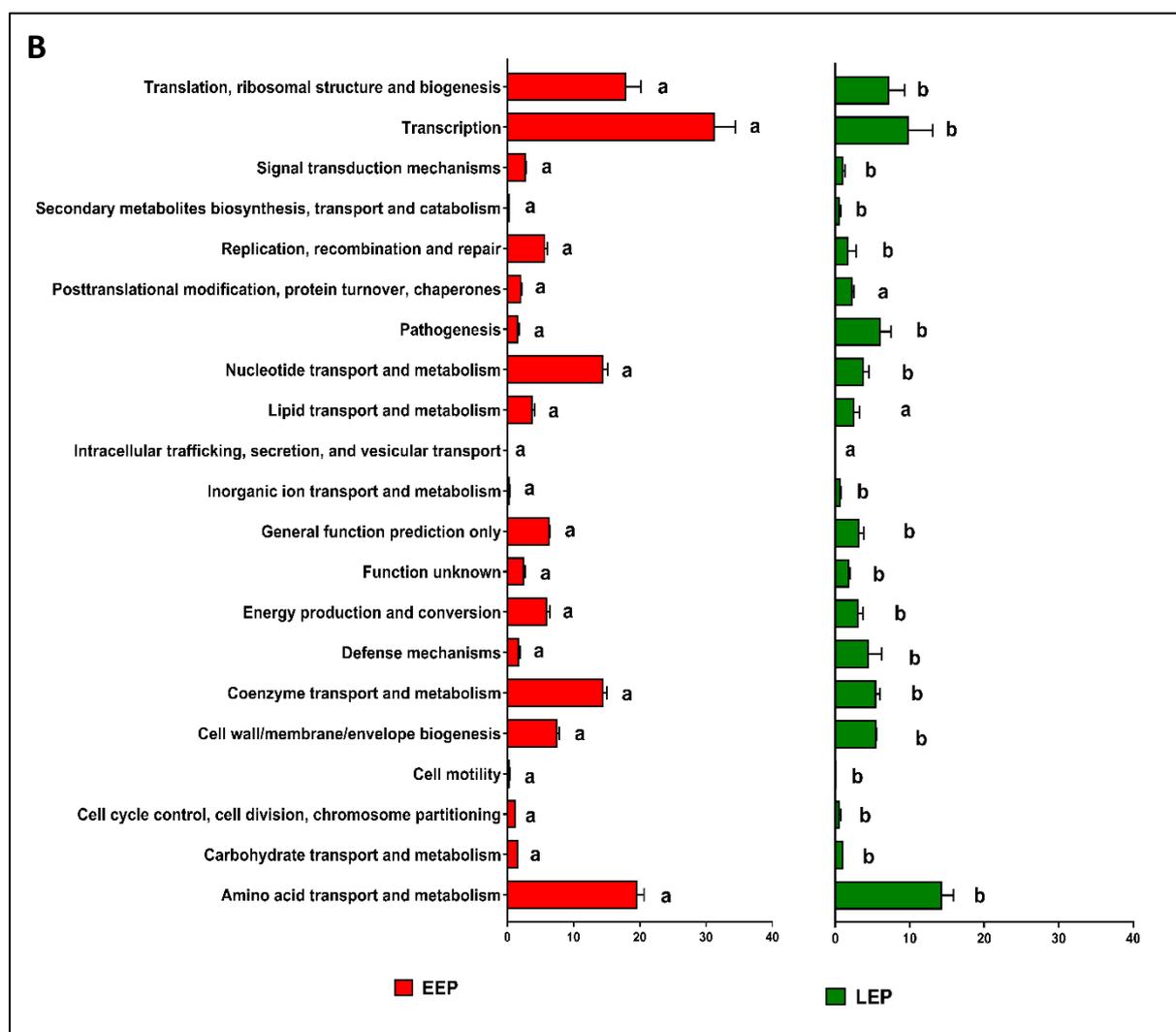
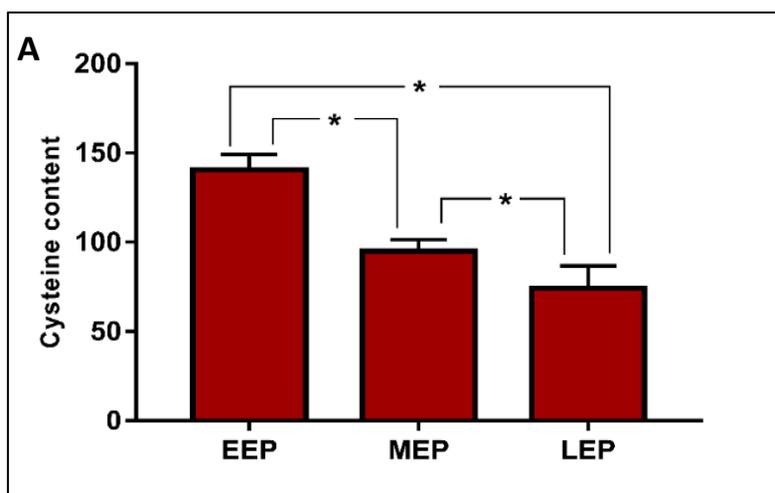


Figure 4.3. Cysteine content of *B. cereus* ATCC 14579 proteome. Global (A) and COG pathways associated cysteine contents (B) were determined at early-(EEP), mid- (MEP) and late-exponential growth phase (LEP). Reported values are the products of normalized spectral abundance factor (NSAF) values and number of cysteines obtained for up-DAPs (green) and down-DAPs (red). Units are arbitrary units. Asterisks in (a) indicate a significant difference (p-value<0.05). Different Letters in (b) indicate a significant difference between EEP and LEP COG biological process. The same letter indicate no statistical difference.

4.5.3. The thiol reduction status of the *B. cereus* proteome decreases as aerobic growth progresses

To understand the full scope of ROS effects during aerobic growth, comprehensive identification of proteins that contain reactive cysteine residues is essential. We identified reactive Cys residues as reported previously [71]. In brief, we tagged reactive Cys residues *via* differential thiol alkylation: Iodoacetamide (IAM) was used to label reduced cysteine thiols (IAMCys) and N-ethylmaleimide (NEM) was used to label oxidized cysteine thiols (NEMCys) after DTT reduction [38]. In total, we detected 1886 ± 278 , 1339 ± 28 and 1190 ± 286 labeled cysteines residues at EEP, MEP and LEP, respectively. This represents a total of 746 ± 94 , 559 ± 2 and 479 ± 95 unique cysteine containing peptides at EEP, MEP and LEP, respectively (**Table S4**) (**cf. Excel file: Supplementary data Chapitre 4**). To ensure robust analysis, we focused on the labeled cysteine residues detected in the three replicates at each growth stage. Based on these criteria, we obtained a dataset comprising 462 labelled cysteine residues belonging to 286 proteins (**Table S5**) (**cf. Excel file: Supplementary data Chapitre 4**). Principal component analysis (PCA) revealed that these 286 proteins have distinguishable IAMCys and NEMCys profiles (**Fig. 4.4a**). We thus analyzed separately the growth phase dependent change of IAMCys and NEMCys residue levels within the 286 proteins.

Figure 4b shows that the total number of NEMCys remained constant throughout growth, whereas the number of total IAMCys decreased as growth progressed. In addition, LEP was found to be associated with a lower IAMCys/NEMCys ratio than MEP and EEP, indicating that the oxidation status of the *B. cereus* thiol proteome had increased at the end of exponential growth.

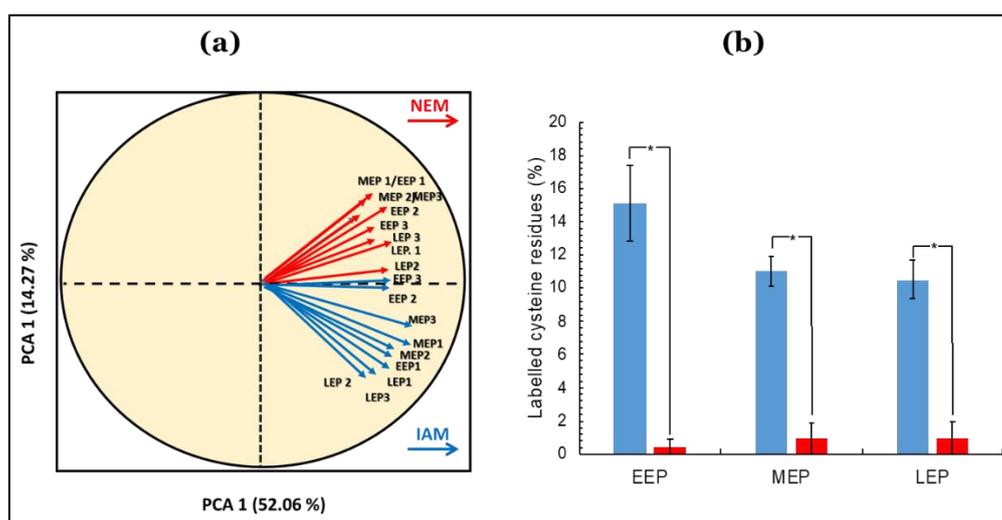


Figure 4.4. Temporal dynamics of *B. cereus* ATCC 14579 thiol proteome. (a) Individuals factor map (PCA). PCA was carried out from a dataset including 18 individuals (3 replicates x 3 protein samples harvested at early- (EEP), mid- (MEP) and late- (LEP) exponential growth phases x 2 cysteine residue labeling) and 286 variables. Arrows show the projection of Iodoacetamide (IAM, blue) and N-ethylmaleimide (NEM, red) labelled individuals in the PC1 and PC2 plane. PC2 opposes IAM and NEM-labelled individuals. (b) Temporal changes to non-redundant IAMCys (blue) and NEMCys (red) proteins. Asterisks indicate a significant difference (Student t-test, p -value ≤ 0.05).

• **Temporal dynamics of NEMCys-labeled proteins (NEMCys proteins).** Filtering for NEMCys proteins that are detected in all replicates of at least one growth phase, identified 87 NEMCys proteins, from which 15 showed significant NEMCys level changes at MEP and LEP compared to EEP ($p \leq 0.05$, $|FC| \geq 1.5$) as growth progresses (**Table S6**) (*cf.* **Excel file : Supplementary data Chapitre 4**). Late exponential growth phase sustains a higher number of proteins with increasing NEMCys residues than MEP (5 proteins compared to 2 proteins). Only NEMCys level increase of inosine -5'-monophosphate dehydrogenase (GuaB) could be due to the accumulation of ROS at LEP, since for the 4 other proteins, we have detected a simultaneous increase in their abundance (**Table S6**). GuaB is a key component of purine biosynthesis pathway, which begins with the conversion of the intermediate of the phosphate pentose pathway (PPP), ribose-5 phosphate, to inosine monophosphate (IMP) and subsequently to guanosine and adenine monophosphate (GMP and AMP) [39]. This pathway was reported to be involved in adaptation of cells to stress [42]. GuaB has a redox sensitive thiol at its active site cysteine (Cys³⁰⁸) in *B. subtilis* [40], and has been reported to be S-thiolated in oxidative environment [36]. Finally, considering the NEMCys proteins as sole variables is not indicative of growth phase dependent change and ROS accumulation at the end of growth. Nevertheless, the low level of NEMCys in proteins is indicative of the low level of oxidized Cys residues in cells, which is due to the efficiency of antioxidant systems that maintain the high reduced status of the cytoplasm [41, 42].

• **Temporal dynamics of IAMCys-labeled proteins (IAMCys proteins).** We identified 278 proteins with IAMCys residues detected in all the 3 replicates at a least one growth phase. The important difference between IAMCys and NEMCys numbers (278 compared to 87) suggests that proteins with reduced thiols are the most abundant in cells, regardless of the growth phase. Of the IAMCys proteins, 146 showed differentially accumulated IAMCys residues as growth progresses: 113 proteins showed decreased IAMCys levels in LEP while 33 proteins showed increased IAMCys levels (**Table S7**) (*cf.* **Excel file : Supplementary data Chapitre 4**). We then identified redox-sensitive proteins, i.e. proteins for which the observed differences in the level of IAMCys were not biased by any difference in protein abundance (**Fig. 4.5**). Of the 71 proteins identified, 60 proteins showed significant decreased IAMCys levels (**Fig.4.5b**) and 11 proteins showed significant increased IAMCys level (**Fig.4.5a**).

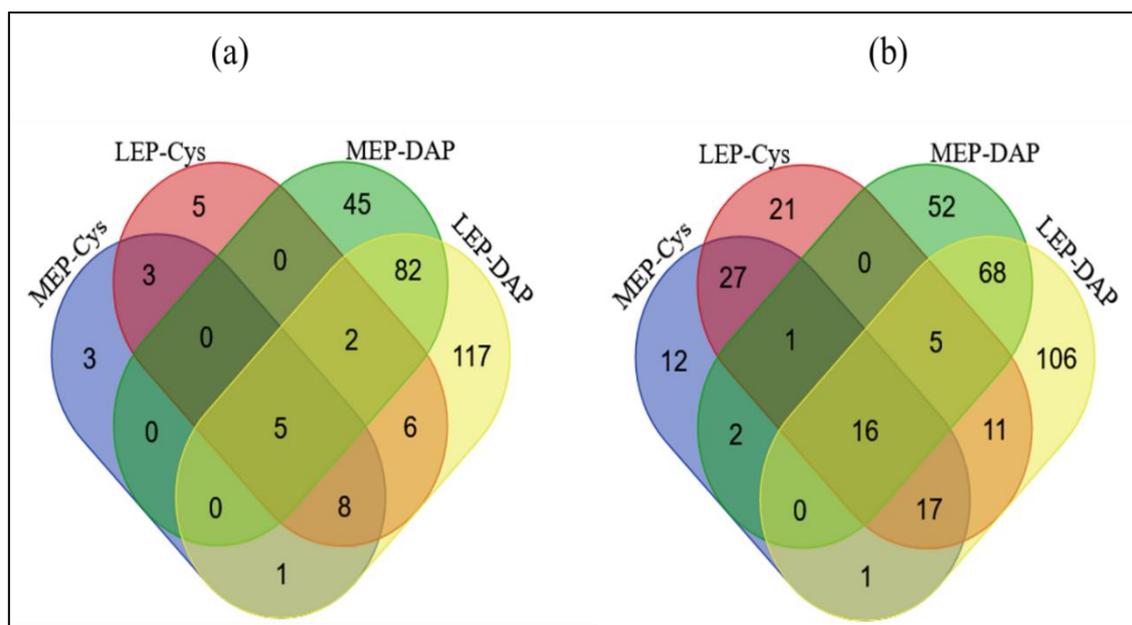


Figure 4.5. Venn diagrams depicting proteins found to be up-regulated; (a) and down-regulated (b) abundance level (DAP) and Iodoacetamide labelled cysteine residue (IAMCys) level at mid-exponential growth phase (MEP) and late-exponential growth phase (LEP).

We noted that LEP supported a higher number of proteins with decreased IAMCys than MEP, when compared to EEP (48 vs 39). If we consider that the relative change of IAM modification within a protein is as a readout for cysteine thiol oxidation [38], our results indicate that there are more proteins subjected to thiol oxidation than thiol reduction as growth progresses. Proteins sensitive to growth phase-dependent thiol oxidation are mainly associated with metabolic functions, including translation machinery, amino-acid, carbohydrate, nucleotide and lipid metabolism and energy metabolism processes (**Table 4.1**). Translation machinery includes ribosomal proteins and biosynthetic enzymes. Among them, the elongation factor Ts (EF-Ts) was reported to be redox regulated [43]. Redox regulation of EF-Ts activity is attributable to Cys²² residue that we found modified by IAM, and significantly less modified by IAM at the end of growth (**Table 4.1**). This suggest that this elongation factor, together with other factors of translational machinery can act as sensor for growth phase dependent oxidative stress in order to mediate a direct and thus quick decrease in translation [44].

Among the proteins classified in nucleotide metabolism, we identified the GMP synthase GuaA (BCO296) as a redox sensitive protein. GuaA, like GuaB, is an enzyme involved in purine metabolism that is inactivated by oxidants and involved in early morphogenic steps in cytokinesis [45].

Energy metabolism refers to metabolic pathways involved in ATP synthesis linked to NADH turnover [46]. It comprises metabolic pathways involved in ROS production, as well as metabolic pathways that are targets of oxidant species. Among the key oxidant targets are glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, tricarboxylic acid enzymes and succinate

dehydrogenase [47], which we identified as redox sensitive proteins in our study (**Table 4.1**). We also identified dihydrolipoamide dehydrogenase (DLDH, BC3970) as a redox sensitive protein. DLDH is a flavoprotein that catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of dihydrolipoamide in a number of protein complexes. It can serve as the E2 subunit of the pyruvate dehydrogenase complex that converts pyruvate into acetyl-CoA and links glycolysis to TCA cycle [48]. DLDH has two redox-sensitive cysteine residues at its active center that are indispensable for its catalytic function [49]. These two Cys residues (Cys⁴⁷ and Cys⁵²) are separated by 4 amino acid residues (CLNVGC in *B. cereus*) and are significantly more labelled with IAM at EEP than at later stage growth (**Table 4.1**), suggesting their vulnerability to oxidative inactivation [50, 51]. Redox-dependent inactivation of DLDH could help the cells to reroute metabolism at the end of growth to face starvation but also limit ROS production since DLDH can be a source of ROS [52]. Interestingly, in human mitochondria, inhibition of DLDH induced antioxidant responses [53]. Proliferating bacterial cells must coordinate energy metabolism with the cell cycle and cell shape [54], possibly at the redox level as we identified redox sensitive protein in all these functional classes.

Post-translational modification and activation of chaperones are part of strategies developed by bacteria to protect proteins against oxidative damages [55]. DnaK and DnaJ are components of the DnaK/DnaJ/GrpE chaperone system that refold proteins to their native conformation [56]. Unlike, Hsp33, which transfers client proteins to DnaK/DnaJ/GrpE, the chaperon activity of DnaK and DnaJ was not reported as dependent on oxidation [57], while containing redox sensitive thiol (**Table 4.1**).

Several transcriptional factors are known to be redox sensitive, and necessary to counteract oxidative stress [58]. Here, we identified AbrB as a redox sensitive transcriptional regulator, due to its lone Cys⁵⁴ residue. AbrB is a central transcription state regulatory protein that represses the expression of stationary phase-specific genes during the exponential growth of *B. subtilis* cells [59, 60], as well as the synthesis of virulence factors in *B. cereus* [61, 62]. The integrity of the Cys⁵⁴ residue is required for the DNA binding and regulatory activity of AbrB. It was suggested that the free sulfhydryl group of Cys⁵⁴ was important for the structure and stability of the active form of the native protein [63]. Therefore, the repressing effect of free SH group decreases, i.e. as growth progresses.

Table 4. 1 : Proteins with differentially Iodoacetamide (IAM) labelled cysteine residues at mid-exponential growth phase (MEP) and late exponential growth phase (LEP) compared to early exponential growth phase.

| Gene ID | Protein | IAM labelled Cys peptide | Log ₂ (FC) * | |
|---|---|---|----------------------------|------|
| | | | MEP | LEP |
| Proteins with increased levels of IAMCys residues | | | | |
| Transcription | | | | |
| BC4603 | Transcriptional regulator, GntR family | IVC ¹¹³ NLPK | 1.0 | |
| Translation, ribosomal structure and biogenesis | | | | |
| BC0155 | 50S ribosomal protein L36 (RpmJ) | VRPSVKPIC ¹⁴ EK GKVMVIC ²⁷ ENPK | 2.2 | |
| Signal transduction mechanisms | | | | |
| BC0442 | Tellurium resistance protein (TerD) | LSTC ⁷⁹ GSIIHSGDNLTGEGAGDDETIFVELHK LVFVVNIYDC ¹²³ VNR | 1.6 | |
| Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism | | | | |
| BC2305 | Isochorismatase (DhbB) | C ¹⁹⁷ AVTTSTNLLK C ⁶⁷ KELGIPVVYTAQPGGQTLQR | 1.7 | |
| Coenzyme transport and metabolism | | | | |
| BC4853 | 1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase (MenB) | EIWYLC ¹⁷⁴ R AFC ⁷¹ SGGDQKVR | 1.0 | 1.6 |
| BC1086 | Lipoate--protein ligase | INLAIEEYC ²⁷⁴ VK | 1.6 | |
| Posttranslational modification, protein turnover, chaperones | | | | |
| BC0517 | Thioredoxin-dependent thiol peroxidase | DMTPGC ⁴⁷ TTEAC ⁵² DFR | 2.0 | |
| Amino acid transport and metabolism | | | | |
| BC1182 | Oligopeptide transport ATP-binding protein (OppD) | VVIAMALAC ¹⁷² NPK | 1.7 | 1.2 |
| Function unknown | | | | |
| BC5199 | Xaa-Pro dipeptidase | FIC ²⁵ YISR | 1.6 | 1.1 |
| BC4341 | GTP pyrophosphokinase | ITC ⁸⁸ C ⁸⁹ FVEDIYHLK | | |
| BC3302 | Pentapeptide repeat containing protein | SC ⁷⁸ NLEEIHIADC ⁸⁸ R ASFFDC ⁶⁸ DFEFADFR | 1.8 | 2.1 |
| Proteins with decreased levels of IAMCys residues | | | | |
| Amino acid transport and metabolism | | | | |
| BC1740 | Aspartate ammonia-lyase | AFTDNC ³⁹³ LK | -0.8 | |
| BC1546 | Aminotransferase | DQGIAYDPSEIIVC ⁹⁶ NGAK | -1.3 | |
| BC0055 | D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (DacA) | TGSTPEAGDC ¹⁶⁹ FTGTVER | | |
| BC4981 | Cysteine desulfurase (Sufs) | VDVQDLNC ²¹⁵ DFYALSAHK MC ²²⁶ GPTGIGVLYGK AGHHC ³⁶¹ AQPLMK | -1.3 | |
| BC3798 | Aspartokinase (DapG) | HLQTVTYNEIC ²⁰⁶ NMAYQGAK LLQNLGYEPIVTEHC ³³⁹ AK | -2.6 | -2.1 |
| BC4936 | Diaminopimelate epimerase (DapF) | GPAEVIC ²⁷⁸ R | -1.0 | |
| BC0747 | Glycine oxidase (ThiO) | IENNKVTGVITSEGIVTC ²⁰¹ EK | -2.1 | -1.7 |

| | | | | |
|--|--|---|------|-----------|
| BC3799 | Aspartate-semialdehyde dehydrogenase (Asd B) | KIMHMPELEVAATC ²⁴⁴ VR | -1.3 | -1.8 |
| Energy production and conversion | | | | |
| BC3970 | Dihydrolipoyl dehydrogenase | GIIEIDEQC ³⁰³ R ANLGGVC ⁴⁷ LNVGC ⁵² IPSK VAVEAISGHASAIIDYIGIPAVC ³⁵³ FTDPELASVGYTK | | -1.7 |
| BC4157 | Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex | VLDGLIC ⁴¹⁷ GK DMVNLC ⁴⁰⁴ LSLDHR | | -1.1 |
| BC2826 | Probable manganese-dependent inorganic pyrophosphatase (PpaC) | NPDTDAIC ¹⁸ SAIAYAEKK SPTC ¹⁵⁸ TEQDVAAAR C ¹¹³ EPVGC ¹¹⁸ TATILNK | | -0.9 |
| BC4980 | IscU protein | C ¹²⁷ ATLAWK NHGVLEDSVTVNLLNNPTC ⁴⁰ GDR | | -1.4 |
| BC3773 | Pyruvate synthase subunit | AAANVGLNPDELAVISGIGC ⁵⁰ SGR NSVKPNWCPGC ¹⁶ GDFSVQAAIQR | | -2.4 |
| BC3616 | Aconitate hydratase | VVEEYC ³⁴⁶ K | | -1.0 |
| BC3833 | Succinate--CoA ligase subunit alpha (SucD) | LLGPNC ¹²⁴ PGVITPDEC ¹³³ K IKTMEAC ²⁶⁹ GIK GLFETC ²⁹⁷ K | | -1.2 |
| BC5387 | Phosphate acetyltransferase | GC ³⁰⁶ NEEEVYK EEEKYVFADC ¹⁶⁷ AINIAPNSQDLAEIGIESAK | | -1.7 -1.9 |
| BC4517 | Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit | EIFDVC ²⁹⁵ VEQK AMC ¹⁸⁵ EAAPGIIHLMDR AVVDDEGVC ¹⁷⁰ R | | -1.4 -1.8 |
| BC4604 | Malate dehydrogenase | LMEPTFGGVNLEDIAAPNC ¹⁴¹ FIIIEER DLSLAYSPGVAEPC ⁴⁵ KEIYDDKSK DIIMC ²¹⁵ DR | | -2.1 -2.5 |
| BC4158 | 2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit | SNNDWTC ¹¹¹ PVTIR | | -1.1 -1.1 |
| Carbohydrate transport and metabolism | | | | |
| BC4599 | Pyruvate kinase (Pyk) | IVC ⁸ TIGPASESIEKLEQLIEAGMNVAR C ²⁶⁵ NVLGKPVITATQMLDSMQR | | -2.8 |
| BC5135 | Enolase (Eno B) | TGLTSAEMVDFYEELC ²⁷⁹ K | | -2.3 |
| BC5140 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gap1) | GILGYSEEPLVSIDYNGC ¹⁴⁵ TASSTIDALSTMVM EGNMVK | | -1.6 -1.5 |
| BC5335 | Fructose-bisphosphate aldolase (Fba) | NVSVEAELGTVGGQEDDVIAEGVIYADPAEC ¹⁶¹ K C ⁹² KEAIDAGFTSVMIDASHHPFEENVETTK HLVEATGIDC ¹⁷² LAPALGSVHGPK | | -1.2 -1.3 |
| BC4571 | Deblocking aminopeptidase | IGC ¹⁸⁹ AIAIDVLK | | -1.1 |
| BC5318 | Ribose 5-phosphate isomerase (RpiB) | GILVC ⁶⁶ GTGIGMSIAANK C ⁸⁴ ALVHDTFSAK | | -2.0 -2.1 |
| BC4600 | ATP-dependent 6-phosphofructokinase (PfkA) | C ²⁸³ VGIQDNK | | -2.0 -1.4 |

| Coenzyme transport and metabolism | | | |
|--|--|--|-------------------|
| BC5413 | Phosphomethylpyrimidine kinase (ThiD) | GADEALHPETNDC ¹²⁶ LR | -1.3 |
| BC0621 | Putative pyridoxal phosphate-dependent acyltransferase | SRPFLFSTALTPADAAAC ²⁸⁴ MR | -1.1 |
| BC4468 | Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2 (HemL2) | VAYNC ²⁵¹ GQGYGVTPLDTC ²⁶⁵ LGK | -1.6 |
| BC4111 | Riboflavin biosynthesis protein (RibBA) | GLVC ⁵⁶ VPITEGYAER VPDLIEC ¹⁷⁹ AK | -1.8 -1.6 |
| Uncategorized | | | |
| BC3977 | Ribonuclease J (RnjB) | VVILC ²⁹⁷ TGSQGEPMALSR MAEIGKDGVL ¹⁹¹ LLSDSTNSEVPNFTMSER | -2.5 |
| BC4425 | Hypothetical transcriptional regulator | VIVC ⁸⁴ QHKPAEVR EKLDAAC ¹⁶⁹ EALDK | -0.9 |
| BC3854 | Predicted kinase related to hydroxyacetone kinase | DTEIDGVAIQKDDFMC ²⁸⁰ IADGK YGYC ²⁴⁴ TEFMVK | -2.3 |
| BC0049 | DUF3797 domain-containing protein Protein (SpfF) | TLYYVQC ²⁰ PVC ²³ K LC ¹³³ GATPVFVDVR | -0.9 -1.3 -1.0 |
| Nucleotide transport and metabolism | | | |
| BC4402 | Adenine phosphoribosyltransferase (Apt B) | GFIIGC ⁶⁴ PVSYALEVGFAPVRK | -1.4 |
| BC0296 | GMP synthase (GuaA) | VLC ²²⁵ ALSGGVDSSVAVLIHK AIGDQLTC ²⁵⁰ IFVDHGLLR GIIFSGGPNSVYEGEGALHC ⁷² DEK | -1.1 |
| BC5315 | Uracil phosphoribosyltransferase (UppB) | LMC ¹⁵⁹ IVAAPGK | -1.3 |
| BC0331 | Phosphoribosylformylglycin amidine cyclo-ligase (PurM) | GISEGC ⁸⁸ R | -1.1 -1.2 |
| Translation, ribosomal structure and biogenesis | | | |
| BC0153 | Methionine aminopeptidase (Map) | SLVAQC ²³¹ EHTVVVTR LC ¹²¹ QAAVDFAFWAAMK | -1.9 |
| BC0144 | 30S ribosomal protein S14 type Z (RpsZ) | C ²⁷ GRPHSVYR | -2.4 |
| BC4391 | tRNA-specific 2-thiouridylase (MnmA) | KDSTGIC ²⁰⁰ FIGER ILC ³³⁰ DEPIR | -1.4 |
| BC3824 | Elongation factor Ts (EF-Ts) | FFEEIC ²³⁹ LLDQAFVKNPDMK EKTGAGMMDC ²² KK | -1.7 -1.4 |
| BC0153 | Methionine--tRNA ligase 2 (MetG2) | VIC ⁵⁰⁶ VTNLKPVK SWESLSTIGC ⁶¹⁷ IPAGTK | -1.9 |
| BC0352 | Aspartyl/glutamyl-Trna (GatB) | SHIYQTGVSDC ¹⁸² K C ¹⁹¹ DANISLRPVGQEK AAMALNC ⁶⁸ EIATETK | -1.2 -2.8 |
| BC0108 | Glutamate-tRNA ligase (GltX2) | C ¹⁰⁸ YMTEEELEAEREGQIAR | -1.7 -1.6 |

| | | | | |
|--|---|--|------|------|
| BC3923 | 50S ribosomal protein L32 (RpmF) | VC ⁴² KAC ⁴⁵ GTYK | -1.5 | -1.9 |
| Cell wall/membrane/envelope biogenesis | | | | |
| BC0054 | Bifunctional protein (GlmU) | EINTGTYC ¹⁷⁵ FDNK | | -1.4 |
| BC4444 | Rod shape-determining protein (MreD) | TITVC ²⁴⁰ SEEITEALKENAAVIVQAAK | -3.2 | -3.3 |
| | | ILIC ¹⁰¹ C ¹⁰² PTNITSVEQK | | |
| BC0257 | D-alanine-D-alanine ligase B (DdlB) | LGYPC ¹⁸⁰ FVKPANLGSSVGINK | -1.1 | -1.7 |
| | | C ²³⁹ SVVGEIVPK | | |
| Transcription | | | | |
| BC0042 | Transcription state regulatory protein (AbrB) | YKPNMTC ⁵⁴ QVTGEVSDGNLSLAEGK | | -2.3 |
| Lipid transport and metabolism | | | | |
| BC2302 | 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase | C ¹⁸² NLVSPGSTETEMQR | | -1.6 |
| BC4276 | 4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl diphosphate synthase (IspG) | VAVLGC ³⁰³ AVNGPGEAR | | -1.6 |
| | | RLEEAGC ⁵⁴ QVVR | | |
| | | SFGLASNAATLISC ²⁶⁸ PTCGR | | |
| BC0353 | DAGKc domain-containing protein | LEQAGYETSC ³⁸ HATTGPGDATVAAR | 1.0 | |
| | | SIEEAADIIC ¹¹⁶ EGK | | |
| Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning | | | | |
| BC4442 | Cell division inhibitor (MinD) | QDYDYILIDC ¹²⁰ PAGIEQGFK | | -1.2 |
| | | C ⁶⁸ RLPQALIK | | |
| BC4446 | Cell shape-determining protein (MreB) | MPVLVAEDPLDC ³¹⁹ VAIGTGK | -1.0 | -1.4 |
| | | KPYVMVC ¹⁰⁸ VPSGITAVER | | |
| Post translational modification, protein turnover, chaperones | | | | |
| BC4312 | Chaperone protein (DnaK) | SKIIGIDLGTNSC ⁴⁵ VAVMEGGEPK | | -0.9 |
| BC4311 | Chaperone protein (DnaJ) | HC ¹⁹² SGSGQVSVEQNTPFGR | -2.5 | -2.2 |
| | | ELNVEIPVEDPC ¹⁴⁶ DTC ¹⁴⁹ K | | |
| Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport | | | | |
| BC3845 | Signal recognition particle receptor (FtsY) | KVDVLLC ²⁰⁸ DTAGR | -1.1 | -1.1 |
| Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism | | | | |
| BC1372 | D-alanine--D-alanyl carrier protein ligase (DltA) | SLPVGYC ³²⁴ K | | -2.9 |
| | | TFLFC ²⁶⁹ GEVLPNEVAR | | |
| | | AC ⁴²¹ SYVEGAVIVPIKK | | |

* Only fold-change (FC) equal or higher than 1.5 with $p < 0.05$ are indicated.

4.6. Conclusion

Aerobic bacteria have to deal with endogenous ROS, which are mainly generated as by-products of respiratory metabolism. To minimize the damage caused by these molecules, bacteria can implement various strategies [4, 64]. Our proteomics analysis showed that *B. cereus* increases production of proteins with functions related to oxidative stress and detoxification of ROS as aerobic growth progresses. Among these antioxidant proteins, tryptophan metabolic enzymes could be key elements [65-67]. Enrichment of proteome in antioxidant proteins at the end of exponential growth is accompanied by a depletion of cysteine-rich proteins, in particular proteins required for central metabolism. This global change allows a decrease of about 47% of the cysteine residue content of the proteome. This could contribute to maintain a healthy proteome, since cysteine residues are the most sensitive targets of ROS (**Fig.4.6**) [37]. However, cysteine proteome remodeling does not allow the thiol proteome to entirely maintain its reduced status during exponential growth. Consequently, the strategy implemented by *B. cereus* at the proteome level to cope with ROS may not be sufficient to maintain the redox status of the thiol proteome.

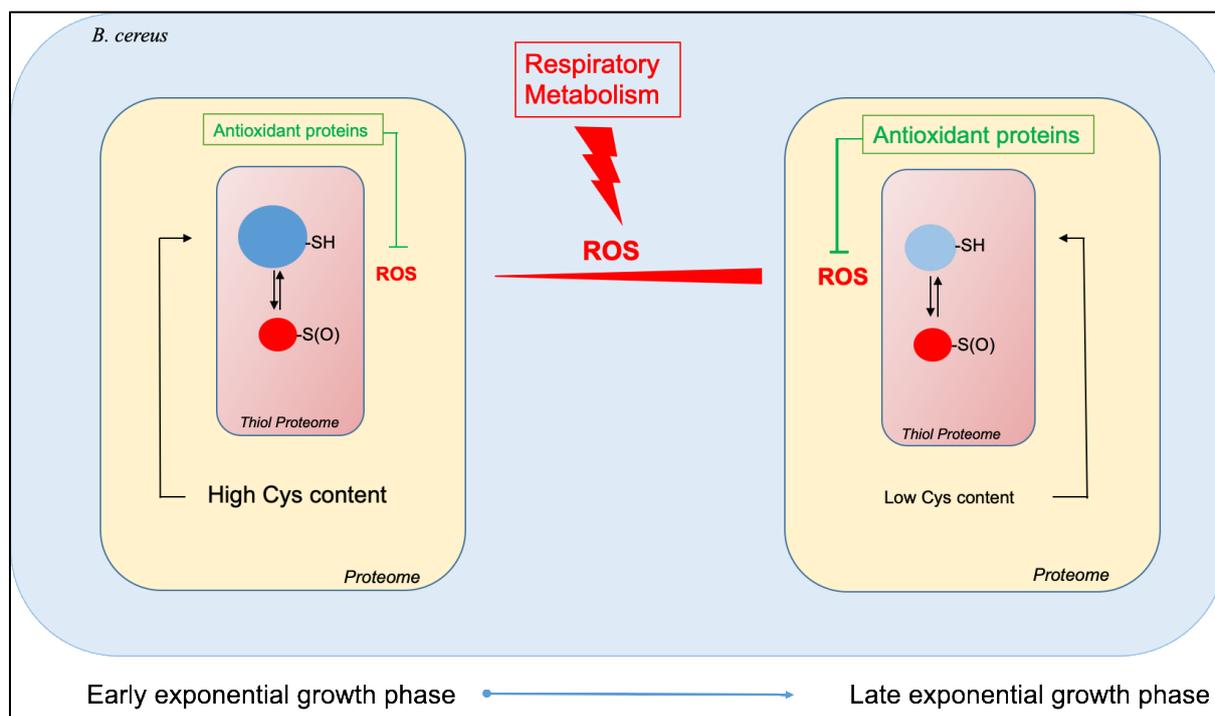


Figure 4.6. Schematic representation of the *B. cereus* ATCC 14579 proteome's remodeling between the beginning of the exponential growth phase and the end of exponential growth phase to cope with endogenous ROS production.

Proteome remodeling at the end of exponential growth is known to be orchestrated by several pleiotropic regulators, including the transition state regulator AbrB [68]. Our work indicates that the thiol reduction status of AbrB changes during growth. Although reports suggest a

possible redox regulation of DNA binding activity of AbrB, future works will have to be conducted in order to obtain pieces of evidence of the role of thiol reduction status of its lone cysteine residue and the associated molecular mechanisms. Importantly, analysis of the thiol proteome dynamics suggests that reprogramming of biological functions during aerobic growth, including those involved in endogenous ROS fighting, and cysteine sparing in the proteome, could be orchestrated by changes in the thiol reduction status of key proteins, such as AbrB. Finally, the profiling strategy used in this study may be thus of generic utility for gaining a better understanding of molecular adaptation in other bacteria.

Author contribution

"Conceptualization, F.H., L.D. and C.D.; Methodology, F.H.; Software, F.H and C.D.; Validation, F.H., J.A., L.D. and C.D.; Formal Analysis, F.H and C.D.; Writing – Original Draft Preparation, F.H. and C.D.; Writing – Review & Editing, F.H., J.A., L.D. and C.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments

Fella Hamitouche has been supported by an Algerian doctoral Fellowship and a funding from Avignon University. The authors thank Jean-Charles Gaillard for help with the mass spectrometry measurements.

4.7. References

1. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*. 2006;141(2):312-22.
2. Bueno E, Mesa S, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ. Bacterial adaptation of respiration from oxic to microoxic and anoxic conditions: redox control. *Antioxidants & redox signaling*. 2012;16(8):819-52.
3. Lemire J, Alhasawi A, Appanna V, Tharmalingam S, Appanna V. Metabolic defence against oxidative stress: the road less travelled so far. *Journal of applied microbiology*. 2017;123(4):798-809.
4. Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology*. 2003;57(1):395-418.
5. Baatout S, De Boever P, Mergeay M. Physiological changes induced in four bacterial strains following oxidative stress. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006;42(4):369-77.
6. Pamplona R, Costantini D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2011;301(4):R843-R63.
7. Seaver LC, Imlay JA. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 2001;183(24):7173-81.
8. Van Laer K, Hamilton CJ, Messens J. Low-molecular-weight thiols in thiol–disulfide exchange. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;18(13):1642-53.
9. Messens J, Rouhier N, Collet J-F. Redox homeostasis. *Oxidative Stress and Redox Regulation*: Springer; 2013. p. 59-84.
10. Zhang J, Wang X, Vikash V, Ye Q, Wu D, Liu Y, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016;2016.
11. Bae YS, Oh H, Rhee SG, Do Yoo Y. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling. *Molecules and cells*. 2011;32(6):491-509.
12. Rhee SG. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 2006;312(5782):1882-3.
13. Poole LB. The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free radical biology & medicine*. 2015;80:148-57.
14. Cross JV, Templeton DJ. Regulation of signal transduction through protein cysteine oxidation. *Antioxidants & redox signaling*. 2006;8(9-10):1819-27.
15. Kim HJ, Ha S, Lee HY, Lee KJ. ROSics: chemistry and proteomics of cysteine modifications in redox biology. *Mass spectrometry reviews*. 2015;34(2):184-208.
16. Chiappetta G, Ndiaye S, Igarria A, Kumar C, Vinh J, Toledano MB. Proteome Screens for Cys Residues Oxidation. 2010;473:199-216.
17. Duport C, Jobin M, Schmitt P. Adaptation in *Bacillus cereus*: From Stress to Disease. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1550.
18. Mols M, Abee T. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental microbiology*. 2011;13(6):1387-94.
19. Madeira JP, Alpha-Bazin B, Armengaud J, Duport C. Time dynamics of the *Bacillus cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:342.

20. Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P, Duport C. The redox regulator Fnr is required for fermentative growth and enterotoxin synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *Journal of bacteriology*. 2007;189(7):2813-24.
21. Clair G, Armengaud J, Duport C. Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2012;11(6).
22. Duport C, Zigha A, Rosenfeld E, Schmitt P. Control of enterotoxin gene expression in *Bacillus cereus* F4430/73 involves the redox-sensitive ResDE signal transduction system. *Journal of bacteriology*. 2006;188(18):6640-51.
23. Wojdyla K, Rogowska-Wrzesinska A. Differential alkylation-based redox proteomics--Lessons learnt. *Redox biology*. 2015;6:240-52.
24. Wholey WY, Jakob U. Hsp33 confers bleach resistance by protecting elongation factor Tu against oxidative degradation in *Vibrio cholerae*. *Molecular microbiology*. 2012;83(5):981-91.
25. Eymann C, Dreisbach A, Albrecht D, Bernhardt J, Becher D, Gentner S, et al. A comprehensive proteome map of growing *Bacillus subtilis* cells. *Proteomics*. 2004;4(10):2849-76.
26. Folio P, Chavant P, Chafsey I, Belkorchia A, Chambon C, Hébraud M. Two-dimensional electrophoresis database of *Listeria monocytogenes* EGDe proteome and proteomic analysis of mid-log and stationary growth phase cells. *Proteomics*. 2004;4(10):3187-201.
27. Ceuppens S, Rajkovic A, Heyndrickx M, Tsilia V, Van De Wiele T, Boon N, et al. Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical reviews in microbiology*. 2011;37(3):188-213.
28. Jaishankar J, Srivastava P. Molecular basis of stationary phase survival and applications. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:2000.
29. Xu K, Liu G, Fu C. The tryptophan pathway targeting antioxidant capacity in the placenta. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018.
30. Nyström T. Stationary-phase physiology. *Annu Rev Microbiol*. 2004;58:161-81.
31. Cohen DP, Renes J, Bouwman FG, Zoetendal EG, Mariman E, de Vos WM, et al. Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database. *Proteomics*. 2006;6(24):6485-93.
32. Mols M, Abee T. *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environmental Microbiology*. 2011;13(11):2835-43.
33. Anastasiou D, Poulogiannis G, Asara JM, Boxer MB, Jiang J-k, Shen M, et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science*. 2011;334(6060):1278-83.
34. Clair G, Roussi S, Armengaud J, Duport C. Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2010;9(7):1486-98.
35. Daniels R, Mellroth P, Bernsel A, Neiers F, Normark S, von Heijne G, et al. Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(5):3300-9.
36. Billington SJ, Jost BH, Songer JG. Thiol-activated cytolysins: structure, function and role in pathogenesis. *FEMS microbiology letters*. 2000;182(2):197-205.
37. Groitl B, Jakob U. Thiol-based redox switches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2014;1844(8):1335-43.

38. van der Reest J, Lilla S, Zheng L, Zanivan S, Gottlieb E. Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress. *Nature communications*. 2018;9(1):1-16.
39. Peifer S, Barduhn T, Zimmet S, Volmer DA, Heinzle E, Schneider K. Metabolic engineering of the purine biosynthetic pathway in *Corynebacterium glutamicum* results in increased intracellular pool sizes of IMP and hypoxanthine. *Microbial cell factories*. 2012;11(1):1-14.
40. Hochgräfe F, Mostertz J, Pöther D-C, Becher D, Helmann JD, Hecker M. S-cysteinylation is a general mechanism for thiol protection of *Bacillus subtilis* proteins after oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(36):25981-5.
41. Leichert LI, Jakob U. Protein thiol modifications visualized *in vivo*. *PLoS Biol*. 2004;2(11):e333.
42. Toledano MB, Kumar C, Le Moan N, Spector D, Tacnet F. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS letters*. 2007;581(19):3598-607.
43. Hwang Y-W, Sanchez A, Hwang M-CC, Miller DL. The role of cysteinyl residues in the activity of bacterial elongation factor Ts, a guanosine nucleotide dissociation protein. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1997;348(1):157-62.
44. Topf U, Suppanz I, Samluk L, Wrobel L, Böser A, Sakowska P, et al. Quantitative proteomics identifies redox switches for global translation modulation by mitochondrially produced reactive oxygen species. *Nature communications*. 2018;9(1):1-17.
45. Jones-Carson J, Yahashiri A, Kim J-S, Liu L, Fitzsimmons LF, Weiss DS, et al. Nitric oxide disrupts bacterial cytokinesis by poisoning purine metabolism. *Science advances*. 2020;6(9):eaaz0260.
46. Rigoulet M, Bouchez C, Paumard P, Ransac S, Cuvellier S, Duvezin-Caubet S, et al. Cell energy metabolism: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2020;1861(11):148276.
47. Quijano C, Trujillo M, Castro L, Trostchansky A. Interplay between oxidant species and energy metabolism. *Redox biology*. 2016;8:28-42.
48. DANSON MJ. Dihydrolipoamide dehydrogenase: a 'new' function for an old enzyme? *Biochemical Society transactions*. 1988;16(2):87-9.
49. Vettakkorumakankav N, Patel M. Dihydrolipoamide dehydrogenase: structural and mechanistic aspects. *Indian journal of biochemistry & biophysics*. 1996;33(3):168-76.
50. Gutierrez-Correa J, Stoppani A. Inactivation of heart dihydrolipoamide dehydrogenase by copper Fenton systems. Effect of thiol compounds and metal chelators. *Free radical research*. 1995;22(3):239-50.
51. Yan L-J, Sumien N, Thangthaeng N, Forster MJ. Reversible inactivation of dihydrolipoamide dehydrogenase by mitochondrial hydrogen peroxide. *Free radical research*. 2013;47(2):123-33.
52. Gazaryan IG, Krasnikov BF, Ashby GA, Thorneley RN, Kristal BS, Brown AM. Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(12):10064-72.
53. Yang X, Song J, Yan L-J. Chronic inhibition of mitochondrial dihydrolipoamide dehydrogenase (DLDH) as an approach to managing diabetic oxidative stress. *Antioxidants*. 2019;8(2):32.

54. Grünenfelder B, Rummel G, Vohradsky J, Röder D, Langen H, Jenal U. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(8):4681-6.
55. Varatnitskaya M, Degrossoli A, Leichert LI. Redox regulation in host-pathogen interactions: thiol switches and beyond. *Biological chemistry*. 2021;402(3):299-316.
56. Dahl J-U, Gray MJ, Jakob U. Protein quality control under oxidative stress conditions. *Journal of Molecular Biology*. 2015;427(7):1549-63.
57. Winter J, Linke K, Jatzek A, Jakob U. Severe oxidative stress causes inactivation of DnaK and activation of the redox-regulated chaperone Hsp33. *Molecular cell*. 2005;17(3):381-92.
58. Imlay JA. Transcription factors that defend bacteria against reactive oxygen species. *Annual review of microbiology*. 2015;69:93-108.
59. Perego M, Spiegelman G, Hoch J. Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*. 1988;2(6):689-99.
60. Strauch M, Spiegelman G, Perego M, Johnson W, Burbulys D, Hoch J. The transition state transcription regulator *abrB* of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. *The EMBO journal*. 1989;8(5):1615-21.
61. Dietrich R, Jessberger N, Ehling-Schulz M, Märtlbauer E, Granum PE. The food poisoning toxins of *Bacillus cereus*. *Toxins*. 2021;13(2):98.
62. Ehling-Schulz M, Frenzel E, Gohar M. Food–bacteria interplay: pathometabolism of emetic *Bacillus cereus*. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:704.
63. Phillips ZE, Strauch MA. Role of Cys54 in *AbrB* multimerization and DNA-binding activity. *FEMS microbiology letters*. 2001;203(2):207-10.
64. Imlay JA. Where in the world do bacteria experience oxidative stress? *Environmental microbiology*. 2019;21(2):521-30.
65. Perez-Gonzalez A, Muñoz-Rugeles L, Alvarez-Idaboy J. Tryptophan: antioxidant or target of oxidative stress? A quantum chemistry elucidation. *RSC Advances*. 2014;4(99):56128-31.
66. Genestet C, Le Gouellec A, Chaker H, Polack B, Guery B, Toussaint B, et al. Scavenging of reactive oxygen species by tryptophan metabolites helps *Pseudomonas aeruginosa* escape neutrophil killing. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014;73:400-10.
67. Xu K, Liu H, Bai M, Gao J, Wu X, Yin Y. Redox properties of tryptophan metabolism and the concept of tryptophan use in pregnancy. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(7):1595.
68. Strauch MA, Hoch JA. Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post-exponential gene expression. *Molecular microbiology*. 1993;7(3):337-42.
69. Rosenfeld E, Duport C, Zigha A, Schmitt P. Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Canadian journal of microbiology*. 2005;51(2):149-58.
70. Hartmann EM, Allain F, Gaillard J-C, Pible O, Armengaud J. Taking the shortcut for high-throughput shotgun proteomic analysis of bacteria. *Host-Bacteria Interactions*: Springer; 2014. p. 275-85.
71. Hamitouche F, Gaillard J-C, Philippe Schmitt P, Armengaud J, Duport C, Dedieu L. Redox proteomic study of *Bacillus cereus* thiol proteome during fermentative anaerobic growth. Submitted to *BMC genomics*.

Discussion générale

Discussion générale

Aspect méthodologique

Depuis le développement des approches de protéomique redox, la plupart des études se sont intéressées à la réponse cellulaire au stress oxydant. Peu d'études se sont intéressées aux modifications redox résultant de l'activité métabolique dans des conditions physiologiques, i.e. dans des conditions où les cellules ne sont pas perturbées par des stimuli exogènes. Une explication est la difficulté technique, liée à la réactivité intrinsèque des groupes thiols des cystéines (Paulsen and Carroll, 2013). En effet, la grande réactivité des thiols les rend particulièrement difficiles à étudier car ils sont très sensibles aux réactions artéfactuelles, qui altèrent l'état redox intrinsèque des protéines (Held and Gibson, 2012).

L'étude de la dynamique du thiol protéome de *B. cereus* est au cœur du travail exposé dans ce manuscrit. La dynamique du thiol protéome au cours de la croissance exponentielle de *B. cereus* a été étudiée en identifiant et quantifiant les changements redox des thiols des cystéines. Cette étude a nécessité une mise au point préalable des conditions expérimentales, une manipulation délicate des échantillons et un traitement rigoureux des données.

Pour analyser le thiol protéome de *B. cereus*, nous avons utilisé une approche basée sur l'alkylation différentielle des cystéines couplée à une analyse protéomique en *shotgun*. Des précautions ont été prises pour éviter les oxydations artéfactuelles (Wojdyla and Rogowska-Wrzesinska, 2015; Held and Gibson, 2012).

La technique d'alkylation différentielle des cystéines expérimentée dans cette étude utilise successivement de l'IAM, du DTT et du NEM et a été nommée IDN. Elle nous a permis d'identifier les thiols réactifs des protéines et de quantifier les formes réduites et oxydées de ces thiols. Dans une approche d'alkylation différentielle, l'efficacité de la première alkylation doit être maximale. En effet, tout échec au blocage (alkylation) d'un thiol libre augmentera artificiellement les résultats finaux sur l'oxydation des cystéines. Les méthodes décrites dans la littérature pour vérifier l'efficacité de la première alkylation des thiols s'appuient sur une vérification biochimique telle que le rajout d'un fluorophore maléïmide qui réagit avec les thiols libres résiduels de la première alkylation. Dans ce type de méthode, la présence des thiols libres résiduels est évaluée par fluorescence sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE et les thiols non alkylés ne sont pas identifiés individuellement (Shakir *et al.*, 2017; Wojdyla *et al.*, 2015). A notre connaissance, aucune étude n'a évalué le nombre de thiols non alkylés après une analyse LC-MS/MS. Notre approche, qui inclut un témoin de marquage IN pour chaque échantillon marqué avec la stratégie IDN, se distingue donc des approches généralement utilisées. Le marquage IN correspond à l'alkylation des cystéines libres par l'IAM et le NEM

sans réduction intermédiaire au DTT. Le marquage IN permet d'estimer le nombre total de cystéines non alkylées par IAM dans chaque échantillon et donc d'identifier les thiols des cystéines qui ont échappé au marquage IAM. Le contrôle IN a permis d'exclure de nos jeux de données les modifications qui auraient pu être erronément interprétées comme des oxydations dans IDN.

Afin de cibler les modifications les plus significatives du thiol protéome au cours de la croissance de *B. cereus*, nous avons sélectionné uniquement les modifications identifiées dans les 3 réplicats biologiques de chaque phase de croissance. Ainsi, nous avons identifié 153 cystéines réactives non-redondantes appartenant à 117 protéines en anaérobiose et 462 cystéines réactives non-redondantes appartenant à 286 protéines en aérobiose. La différence observée entre les deux conditions peut s'expliquer dans un premier temps par l'amélioration du marquage différentielle IDN que nous avons réalisé et qui a permis de couvrir plus de cibles cystéines en aérobie par rapport à l'anaérobiose (**cf. Chapitre 2**).

La dynamique du protéome

Plusieurs études menées au laboratoire se sont intéressées à la dynamique du protéome de *B. cereus* ATCC14579 lors de sa croissance tant en conditions anaérobies qu'aérobies. Dans ces études, le protéome intracellulaire et l'exoprotéome ont été analysés séparément (Clair *et al.*, 2012; Laouami *et al.*, 2014; Madeira *et al.*, 2015). Dans notre étude, dont la finalité était de conserver l'état redox natif des cystéines, l'analyse protéomique n'a pas séparé les protéines intracellulaires et extracellulaires. Elle a permis d'identifier 1157 protéines différentes en croissance anaérobie et 1648 en aérobie couvrant respectivement plus du 22 % et 30 % du protéome théorique de *B. cereus* (avec 5240 protéines annotées) (Ivanova *et al.*, 2003). Le nombre de protéines identifiées reflète d'une part une différence de détection peptidique entre les deux conditions (**cf. Chapitre 2**), d'autre part elle peut refléter une production plus importante de protéines en conditions de croissance aérobie.

Les résultats obtenus sont illustratifs de nos conditions de culture en milieu synthétique, pH et température régulés avec deux types d'oxygénations différentes. Cependant, ils ne représentent pas toutes les conditions de croissance utilisées au laboratoire ni les conditions rencontrées par *B. cereus* dans son environnement naturel (Carlin *et al.*, 2010) ; le protéome étant très dépendant des conditions de croissance.

En aérobiose comme en anaérobiose, le protéome de *B. cereus* ATCC14579, tel qu'analysé dans cette étude, est composé majoritairement de protéines cytoplasmiques. Les protéines extracellulaires, telles que les protéines flagellaires et les entérotoxines sont des composants minoritaires.

La dynamique protéique obtenue en phase exponentielle de croissance dans des conditions aérobies et anaérobies vient en confirmation des travaux réalisés précédemment au laboratoire

sur *B. cereus* ATCC14579. Elle montre également son efficacité pour capturer les changements les plus drastiques du protéome de *B. cereus* lors de la croissance en batch. En effet, quelle que soit la condition d'oxygénation, *B. cereus* contrôle la production des enzymes du métabolisme primaire et du métabolisme secondaire en réponse à l'épuisement des nutriments et au stress oxydant qui peut être primaire ou secondaire (**cf. Chapitre 3 et 4**). Concernant le métabolisme primaire, le principal changement observé entre les deux conditions d'oxygénation se situe au niveau du métabolisme glucidique qui nécessite la production des enzymes de la chaîne respiratoire en aérobiose, et la production des enzymes fermentaires en anaérobiose (Clair *et al.*, 2012; Madeira *et al.*, 2015; Duport *et al.*, 2016) (**Annexe 3 cf. p.130**).

La dynamique du thiol protéome

L'analyse du thiol protéome de *B. cereus* présentée dans ce travail a permis de distinguer, les formes redox des thiols réactifs (réduites *vs* oxydées) et les protéines les contenant. Les formes réduites sont les plus abondantes chez *B. cereus*, quelles que soient les conditions et la phase de croissance ; ceci est en accord avec le fait que la majorité des protéines détectées sont des protéines cytoplasmiques et que le cytoplasme constitue un environnement réducteur. Des résultats similaires ont été reportés dans la littérature pour d'autres organismes (Brandes *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2014; Leichert and Jakob, 2004).

La fraction de formes oxydées étant très faible, notre étude sur la dynamique du thiol protéome de *B. cereus* repose principalement sur les changements d'abondance des formes réduites (thiols SH alkylés par l'IAM) entre le début, le milieu et la fin de la phase exponentielle de croissance. Cette étude donne une vue globale de l'évolution de l'état redox dans les cellules. Nous avons choisi de l'étudier sans recourir à une étape d'enrichissement car cette dernière rajoute une étape lors de la préparation des échantillons (van der Reest *et al.*, 2018). Ce qui peut, non seulement accroître le risque de perte de protéines, mais aussi peut rajouter un biais supplémentaire incompatible avec notre objectif de restituer le plus fidèlement possible l'image du thiol protéome natif.

Notre étude est l'une des rares études à avoir examiné l'état réduit global des protéines cellulaires lors d'une croissance non perturbée par un stress exogène. Lors de la croissance aérobie, l'abondance des thiols réduits diminue au cours de la phase exponentielle de croissance; ce qui suggère une augmentation de l'oxydation à la fin de la croissance. Cette oxydation peut être due à l'accumulation des ROS générés principalement par l'activité respiratoire aérobie mais aussi par l'épuisement des substrats de croissance et l'accumulation des métabolites toxiques (Desnues *et al.*, 2003). En croissance anaérobie, l'accumulation de ROS a également été décrite mais les causes ne sont pas connues (Dirmeier *et al.*, 2002).

L'augmentation de l'état réduit du protéome lors de la croissance fermentaire anaérobie découle en partie d'une diminution de la fraction oxydée visualisée en début de croissance. Cela indique que les cellules sont confrontées à une oxydation dès le début de la croissance exponentielle et que l'absence d'oxygène n'induit pas une suppression complète de l'oxydation des protéines. Ces résultats sont en accord avec une étude réalisée au laboratoire, qui a montré que la fraction des méthionines oxydées était plus importante en début qu'en fin de croissance (Article soumis). Il est possible que des oxydants autres que les ROS puissent être impliqués dans l'oxydation des cystéines en anaérobiose, notamment les RNS. En effet, les cellules de *B. cereus* génèrent des RNS comme produits de certaines réactions enzymatiques ; en particulier celles catalysées par l'oxyde nitrique synthase qui transforme la L-arginine en citrulline et en oxyde nitrique qui est une espèce réactive d'azote (Mols and Abee, 2011). Il est également possible que cette oxydation soit plus forte au début de la phase exponentielle de croissance car l'arginine est présente dans le milieu de croissance à une concentration de 0.46g/L (Rosenfeld *et al.*, 2005).

Autrefois considérés comme des produits indésirables du métabolisme aérobie, il est désormais envisagée que les ROS et les RNS soient produites par les cellules est impliqués dans les voies de signalisation cellulaire, et qu'elles fassent partie intégrante de l'équilibre redox de la cellule (Forman *et al.*, 2004). Bien que leur production semble moduler la dynamique du thiol protéome de *B. cereus*, leur implication dans la sélectivité et la spécificité des cystéines modifiées est moins claire. Notre étude a fourni des exemples montrant que dans chaque condition de croissance des sous-ensembles très spécifiques de résidus cystéines sont sensibles aux conditions redox. Même si le lien direct de cause à effet entre la génération du ROS et les modifications redox des cystéines n'est pas établi, on peut supposer que les ROS /RNS modifient les résidus cystéines de manière sélective. Cette sélectivité est modulée par plusieurs facteurs qui constituent le microenvironnement du résidu cystéine. En effet, son accessibilité, la présence d'autres PTMs sur la protéine cible ou encore les charges des acides aminés voisins, influencent le pKa du résidu cystéine (Paulsen and Carroll, 2013). Il est possible également que la sélectivité de chaque cystéine modifiée soit régie par une balance entre ce microenvironnement et la quantité de ROS/RNS produite (Forman *et al.*, 2004; Gould *et al.*, 2015). Ce qui pourrait contribuer à la différence observée entre les nombres de cystéines modifiées en anaérobiose et en aérobie. En effet, en anaérobiose, bien qu'une protéine donnée puisse contenir de nombreuses cystéines, seule une minorité d'entre elles a été modifiée. Il peut s'agir de sites insensibles au changement redox ou potentiellement de sites non spécifiques au ROS/RNS, particulièrement lorsqu'ils sont produits à des niveaux physiologiques (Forman *et al.*, 2004; Finelli, 2020; Chung *et al.*, 2013).

La recherche de règles communes régissant la spécificité des modifications redox à l'échelle du protéome reste un défi majeur (Chung *et al.*, 2013). Notre étude pourrait être complétée par

des études bio-informatiques et biochimiques pour caractériser les propriétés des résidus cystéines modifiées ainsi que de certaines protéines d'une manière individuelle.

Les données de mes travaux de thèse ont révélé la sensibilité redox d'un nombre important de protéines à cystéines impliquées dans divers processus biologiques, notamment la biosynthèse des nucléotides (Adk, PurL), le métabolisme des carbohydrates (PfkA, AdhA, GAPDH) et les facteurs d'élongations (EF-Tu, EF-Ts). Ces protéines sont décrites dans la littérature comme étant particulièrement sujettes aux changements redox et aux ROS, ce qui indique la préservation des mécanismes de sensibilité au redox entre les différents organismes (Imber *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2014; Brandes *et al.*, 2011). Plus globalement, le thiol protéome reflète l'état redox cellulaire et les changements observés au cours de la croissance de *B. cereus*, a permis de révéler les protéines et/ou de voies qui sont potentiellement régulées par l'état redox de leur cystéines. Nos résultats ont fourni des informations prédictives sur la régulation redox de certaines protéines telles que le facteur transcriptionnel (AbrB) et des voies cellulaires telles que la voie de biosynthèse des bacillibactines et du tryptophane où des cystéines sensibles au redox ont été identifiées pour la première fois. En conclusion, le thiol protéome est une image du métabolisme, et pourrait fonctionner comme un senseur redox pour la régulation des voies fonctionnelles. Probablement, c'est une interface qui lie l'exposome à la réponse cellulaire (Go *et al.*, 2015).

L'exclusion des cystéines dans le protéome de *B. cereus*

La cystéine est un acide aminé peu abondant chez les bactéries et en particulier chez *B. cereus* (seul acide aminé constituant moins de 1 % des protéines). Les protéines extracellulaires de *B. cereus* sont par ailleurs moins riches en cystéines que les protéines intracellulaires. En particulier, les facteurs de virulences telles que les toxines et les protéines flagellaires ne contiennent pas de cystéines. Ces résultats sont en accord avec des études publiées précédemment qui ont révélé que les protéines extracellulaires des bactéries Gram positives sont confrontées à un phénomène d'exclusion de cystéines et sont plus pauvres en résidus cystéines que les protéines extracellulaires des bactéries Gram négatives (Daniels *et al.*, 2010; Dutton *et al.*, 2008). En effet, la grande réactivité des thiols et leur sensibilité à l'attaque des ROS/RNS les exposent à l'oxydation qui inactive les protéines. Par conséquent, les bactéries à Gram-négatif ont développé des systèmes périplasmiques tels que le système DsB (Disulfide Bond formation) chez *E. coli* qui répare les protéines exportées mal repliées et maintient le bon état d'oxydation des cystéines des protéines extracellulaires (Kadokura *et al.*, 2003). Chez les bactéries à Gram positif comme *B. cereus*, dépourvues d'espace périplasmique, il n'y a pas de mécanismes connus pour protéger les cystéines, ce qui explique l'exclusion des cystéines dans leurs protéines extracellulaires. Toutefois, un système de réparation des protéines a été

identifié chez *B. subtilis* (le système BdB) et pourrait être une exception à la norme (Kouwen *et al.*, 2007).

Notre étude a montré qu'un autre niveau d'exclusion pouvait exister au niveau des protéines cytoplasmiques chez *B. cereus* en réponse à la production et l'accumulation de ROS. En effet, grâce à une analyse *in silico*, nous avons pu mettre en évidence une diminution du nombre global de résidus cystéines dans le protéome aérobie de *B. cereus* à la fin de la phase exponentielle de croissance. En anaérobiose, aucune différence significative dans le contenu de cystéines n'a été observée entre les 3 phases de croissance (**Annexe 4 cf.p.131**). Cette diminution du nombre de cystéines limite la formation inadéquate de ponts disulfures pouvant altérer l'activité des protéines et accroître leur sensibilité aux attaques protéolytiques (Dukan and Nyström, 1998; Nyström, 2004). Par conséquent, en réduisant l'abondance des cystéines au cours de la croissance, *B. cereus* protège son protéome contre les oxydants.

L'étude du thiol protéome chez *B. cereus* a complété notre compréhension de la réponse cellulaire aux conditions d'oxygénation. Elle a permis, non seulement d'avoir une image de ce thiol protéome et de sa dynamique en anaérobiose et en aérobie, mais aussi de montrer qu'il est étroitement connecté à l'état physiologique, au métabolisme et au stress rencontrés par la cellule.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les résidus cystéines sont hautement fonctionnels dans les protéines. Ils ont des fonctions structurales, catalytiques et de liaison aux métaux, et par conséquent, sont souvent des résidus conservés. Au cours de la dernière décennie, l'étude de leur PTM a permis de montrer leur rôle de commutation redox (*redox switch*) qui régule dynamiquement l'activité des protéines.

Les progrès de la protéomique redox ont permis d'explorer à grande échelle les modifications redox des résidus cystéines chez divers organismes eucaryotes et procaryotes. On connaît aujourd'hui leur implication dans de multiples processus biologiques, et l'impact de différents stimuli sur ces résidus influencent la physiologie des organismes. Avant mes travaux de thèse, l'identification des protéines à cystéine réactive chez *B. cereus* et leurs formes redox n'avaient pas encore été rapportée.

Cette thèse était consacrée à l'optimisation et l'application d'une méthode de protéomique redox permettant d'étudier la dynamique du thiol protéome de *B. cereus* ATCC14579. Cela a impliqué, au niveau expérimental, de mettre au point et optimiser les étapes clés dans l'étude : (i) l'extraction protéique en milieu acide (ii) l'optimisation des réactions d'alkylation et en particulier la première alkylation pour établir avec précision l'état redox des cystéines et (iii) un traitement original et rigoureux des données.

Les verrous techniques ayant été levés, notre approche nous a permis d'analyser la dynamique du thiol protéome de *B. cereus* en se basant principalement sur la fraction de cystéines réduites. La faible proportion des formes oxydées était attendue, notamment du fait de l'environnement réducteur du cytoplasme. Cependant, cette fraction oxydée pourrait être mieux caractérisée en utilisant un protocole d'enrichissement des formes oxydées des cystéines. Il serait également possible de caractériser finement les formes oxydées telles que la sulfénylation (SOH) ou la nitrosylation (SNO) en utilisant des agents réducteurs spécifiques tels que l'arsénite pour SOH et l'ascorbate pour SNO (Wojdyla *et al.*, 2015). Il convient de noter que la nature instable de ces modifications qui sont sujettes à des ré-oxydations irréversibles peut conduire à des mauvaises estimations du taux de modifications redox de cystéines. Ainsi, les données présentées dans cette thèse pourraient servir de référence avant de cibler ces différentes formes d'oxydations.

Notre méthode globale, pourra être adaptée pour analyser plus en détails d'autres compartiments cellulaires, notamment la membrane plasmique pour étendre la couverture du thiol-protéome. Cela pourra nous renseigner sur la dynamique redox des protéines à thiol

présent à la surface des cellules (exo faciaux) que nous supposons être en lien direct avec la diminution du potentiel redox extracellulaire au cours de la croissance de *B. cereus* (**chapitre 3**). Pour réaliser cette étude, il serait nécessaire d'optimiser une technique de marquage sur cellules entières et un protocole de préparation des membranes permettant de conserver l'état redox des thiols. Pour cela, une alkylation pourrait être réalisée directement lors du prélèvement avant la précipitation au TCA.

Il est intéressant de noter que nos données sur l'évolution de l'état redox du thiol protéome de *B. cereus* au cours de la croissance aérobie et anaérobie sont en accord avec les études menées au laboratoire sur la dynamique de l'oxydation des méthionines chez *B. cereus* (Madeira *et al.*, 2015; Madeira *et al.*, 2017). Ce qui suggère que les PTM des cystéines et des méthionines sont intimement liées. La réalisation d'une étude combinée pourrait mettre en évidence d'éventuelles interactions ("cross-talk") entre les PTM de ces deux résidus.

Notre étude a permis d'obtenir une première cartographie des résidus cystéines réactifs chez *B. cereus* lors d'une croissance anaérobie et aérobie sans l'intervention de stress exogène de type choc oxydant. Toutefois, au sein de son environnement naturel, *B. cereus* peut rencontrer des conditions où les fluctuations de la teneur en oxygène sont fréquentes et rapides. Il serait intéressant dans ce cas de compléter notre étude en soumettant *B. cereus* à un changement rapide de conditions d'oxygénation (présence d'oxygène vs absence d'oxygène et *vice versa*) ; ce qui pourrait permettre de mieux comprendre la régulation redox du thiol protéome.

Finalement, ce travail de thèse ouvre de nouvelles perspectives sur le rôle des modifications redox des résidus cystéine chez *B. cereus*, et fournit une base moléculaire pour déchiffrer le réseau redox complexe chez la bactérie. Il pourra également être utilisé comme une référence pour les recherches visant à identifier, dans une condition donnée, l'ensemble des protéines dont l'activité est dépendante de l'état redox des cystéines, et plus largement les recherches visant à comprendre comment *B. cereus* s'adapte aux changements de son environnement.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. & Isobe, M. (1994). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS microbiology letters* 121(1): 31-34.
- Agata, N., Ohta, M., Mori, M. & Isobe, M. (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS microbiology letters* 129(1): 17-19.
- Alabduladhem, T. O. & Bordoni, B. (2020). Physiology, Krebs Cycle. *StatPearls [Internet]*.
- Albrich, J. M., McCarthy, C. A. & Hurst, J. K. (1981). Biological reactivity of hypochlorous acid: implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78(1): 210-214.
- Alcock, L. J., Perkins, M. V. & Chalker, J. M. (2018). Chemical methods for mapping cysteine oxidation. *Chemical Society Reviews* 47(1): 231-268.
- Ali, A. A., Coulter, J. A., Ogle, C. H., Migaud, M. M., Hirst, D. G., Robson, T. & McCARTHY, H. O. (2013). The contribution of N₂O₃ to the cytotoxicity of the nitric oxide donor DETA/NO: an emerging role for S-nitrosylation. *Bioscience reports* 33(2).
- Antelmann, H. (2015). Oxidative Stress Responses and Redox Signalling Mechanisms in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. In *Molecular Medical Microbiology*, 249-274: Elsevier.
- Antonyuk, S., Melik-Adamyan, V., Popov, A., Lamzin, V., Hempstead, P., Harrison, P., Artymyuk, P. & Barynin, V. (2000). Three-dimensional structure of the enzyme dimanganese catalase from *Thermus thermophilus* at 1 Å resolution. *Crystallography Reports* 45(1): 105-116.
- Arike, L. & Peil, L. (2014). Spectral counting label-free proteomics. In *Shotgun Proteomics*, 213-222: Springer.
- Åslund, F., Berndt, K. D. & Holmgren, A. (1997). Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductases of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria. *Journal of biological chemistry* 272(49): 30780-30786.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 389(4): 1017-1031.
- Barrière, C., Brückner, R. & Talon, R. (2001). Characterization of the single superoxide dismutase of *Staphylococcus xylosus*. *Applied and environmental microbiology* 67(9): 4096-4104.
- Barynin, V. V., Whittaker, M. M., Antonyuk, S. V., Lamzin, V. S., Harrison, P. M., Artymiuk, P. J. & Whittaker, J. W. (2001). Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. *Structure* 9(8): 725-738.
- Beckman, J. S. & Koppenol, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 271(5): C1424-C1437.
- Beecher, D. J., Schoeni, J. L. & Wong, A. (1995). Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infection and immunity* 63(11): 4423-4428.
- Beecher, D. J. & Wong, A. C. (2000). Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. *Microbiology* 146(12): 3033-3039.
- Benov, L. T. & Fridovich, I. (1994). *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *Journal of biological chemistry* 269(41): 25310-25314.

- Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of biological chemistry* 272(33): 20313-20316.
- Berrisford, J. M., Baradaran, R. & Sazanov, L. A. (2016). Structure of bacterial respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1857(7): 892-901.
- Bielski, B. H. & Richter, H. W. (1977). A study of the superoxide radical chemistry by stopped-flow radiolysis and radiation induced oxygen consumption. *Journal of the American Chemical Society* 99(9): 3019-3023.
- Biteau, B., Labarre, J. & Toledano, M. B. (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* 425(6961): 980-984.
- Boja, E. S. & Fales, H. M. (2001). Overalkylation of a protein digest with iodoacetamide. *Analytical chemistry* 73(15): 3576-3582.
- Brandes, N., Reichmann, D., Tienson, H., Leichert, L. I. & Jakob, U. (2011). Using quantitative redox proteomics to dissect the yeast redoxome. *J Biol Chem* 286(48): 41893-41903.
- Brillard, J. & Lereclus, D. (2007). Characterization of a small PlcR-regulated gene co-expressed with cereolysin O. *BMC microbiology* 7(1): 1-8.
- Cardazzo, B., Negrisolo, E., Carraro, L., Alberghini, L., Patarnello, T. & Giaccone, V. (2008). Multiple-locus sequence typing and analysis of toxin genes in *Bacillus cereus* food-borne isolates. *Applied and environmental microbiology* 74(3): 850-860.
- Carlin, F. (2011). Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food microbiology* 28(2): 177-182.
- Carlin, F., Brillard, J., Broussolle, V., Clavel, T., Duport, C., Jobin, M., Guinebretière, M.-H., Auger, S., Sorokine, A. & Nguyen-Thé, C. (2010). Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International* 43(7): 1885-1894.
- Chelikani, P., Fita, I. & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 61(2): 192-208.
- Chi, B. K., Busche, T., Van Laer, K., Bäsell, K., Becher, D., Clermont, L., Seibold, G. M., Persicke, M., Kalinowski, J. & Messens, J. (2014). Protein S-mycothiolation functions as redox-switch and thiol protection mechanism in *Corynebacterium glutamicum* under hypochlorite stress. *Antioxidants & redox signaling* 20(4): 589-605.
- Chi, B. K., Gronau, K., Mäder, U., Hessling, B., Becher, D. & Antelmann, H. (2011). S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in *Bacillus subtilis* as revealed by transcriptomics and redox proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 10(11).
- Chi, B. K., Roberts, A. A., Huyen, T. T. T., Bäsell, K., Becher, D., Albrecht, D., Hamilton, C. J. & Antelmann, H. (2013). S-bacillithiolation protects conserved and essential proteins against hypochlorite stress in firmicutes bacteria. *Antioxidants & redox signaling* 18(11): 1273-1295.
- Chiappetta, G., Ndiaye, S., Igbaria, A., Kumar, C., Vinh, J. & Toledano, M. B. (2010a). Proteome Screens for Cys Residues Oxidation. 473: 199-216.
- Chiappetta, G., Ndiaye, S., Igbaria, A., Kumar, C., Vinh, J. & Toledano, M. B. (2010b). Proteome screens for Cys residues oxidation: the redoxome. In *Methods in enzymology*, Vol. 473, 199-216: Elsevier.
- Chitlaru, T., Gat, O., Gozlan, Y., Ariel, N. & Shafferman, A. (2006). Differential proteomic analysis of the *Bacillus anthracis* secretome: distinct plasmid and chromosome CO₂-dependent cross talk mechanisms modulate extracellular proteolytic activities. *J Bacteriol* 188(10): 3551-3571.
- Choksawangkarn, W., Edwards, N., Wang, Y., Gutierrez, P. & Fenselau, C. (2012). Comparative study of workflows optimized for in-gel, in-solution, and on-filter proteolysis in the

- analysis of plasma membrane proteins. *Journal of proteome research* 11(5): 3030-3034.
- Chung, H. S., Wang, S.-B., Venkatraman, V., Murray, C. I. & Van Eyk, J. E. (2013). Cysteine oxidative posttranslational modifications: emerging regulation in the cardiovascular system. *Circulation research* 112(2): 382-392.
- Ciani, M., Comitini, F. & Mannazzu, I. (2013). Fermentation.
- Cillard, J. & Cillard, P. (2006). Mécanismes de la peroxydation lipidique et des anti-oxydations. *Oleagineux, corps gras, lipides* 13(1): 24-29.
- Clair, G., Armengaud, J. & Duport, C. (2012). Restricting fermentative potential by proteome remodeling: an adaptive strategy evidenced in *Bacillus cereus*. *Molecular & Cellular Proteomics* 11(6).
- 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* 9(7): 1486-1498.
- Clark, F. E. (1937). The relation of *Bacillus siamensis* and similar pathogenic spore-forming bacteria to *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 33(4): 435.
- 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. *Journal of applied microbiology* 97(1): 214-219.
- Collet, J.-F. & Messens, J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxidants & redox signaling* 13(8): 1205-1216.
- Couvertier, S. M., Zhou, Y. & Weerapana, E. (2014). Chemical-proteomic strategies to investigate cysteine posttranslational modifications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1844(12): 2315-2330.
- Daniels, R., Mellroth, P., Bernsel, A., Neiers, F., Normark, S., von Heijne, G. & Henriques-Normark, B. (2010). Disulfide bond formation and cysteine exclusion in gram-positive bacteria. *J Biol Chem* 285(5): 3300-3309.
- Das, K. C. & Das, C. K. (2000). Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: redox independent functions. *Biochemical and biophysical research communications* 277(2): 443-447.
- Davies, M. J. (2005). The oxidative environment and protein damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1703(2): 93-109.
- de Groot, A., Dulermo, R., Ortet, P., Blanchard, L., Guérin, P., Fernandez, B., Vacherie, B., Dossat, C., Jolivet, E. & Siguier, P. (2009). Alliance of proteomics and genomics to unravel the specificities of Sahara bacterium *Deinococcus deserti*. *PLoS genetics* 5(3).
- De Jager, T., Cockrell, A. & Du Plessis, S. (2017). Ultraviolet light induced generation of reactive oxygen species. *Ultraviolet Light in Human Health, Diseases and Environment*: 15-23.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H. & Whitman, W. B. (2009). The firmicutes.
- de Vries, Y. P., Hornstra, L. M., de Vos, W. M. & Abee, T. (2004). Growth and sporulation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 under defined conditions: temporal expression of genes for key sigma factors. *Applied and environmental microbiology* 70(4): 2514-2519.
- Desnues, B., Cuny, C., Grégori, G., Dukan, S., Aguilaniu, H. & Nyström, T. (2003). Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO reports* 4(4): 400-404.

- Deutscher, J., Francke, C. & Postma, P. W. (2006). How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and molecular biology Reviews* 70(4): 939-1031.
- Dierick, K., Van Coillie, E., Swiecicka, I., Meyfroidt, G., Devlieger, H., Meulemans, A., Hoedemaekers, G., Fourie, L., Heyndrickx, M. & Mahillon, J. (2005). Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of clinical microbiology* 43(8): 4277-4279.
- Diomande, S. E., Guinebretière, M.-H., Broussolle, V. & Brillard, J. (2015). Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Front Microbiol* 6: 813.
- Dirmeier, R., O'Brien, K. M., Engle, M., Dodd, A., Spears, E. & Poyton, R. O. (2002). Exposure of yeast cells to anoxia induces transient oxidative stress implications for the induction of hypoxic genes. *Journal of biological chemistry* 277(38): 34773-34784.
- Dismukes, G. C., Klimov, V., Baranov, S., Kozlov, Y. N., DasGupta, J. & Tyryshkin, A. (2001). The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(5): 2170-2175.
- Douki, T. & Cadet, J. (1996). Peroxynitrite mediated oxidation of purine bases of nucleosides and isolated DNA. *Free radical research* 24(5): 369-380.
- Dukan, S. & Nyström, T. (1998). Bacterial senescence: stasis results in increased and differential oxidation of cytoplasmic proteins leading to developmental induction of the heat shock regulon. *Genes & development* 12(21): 3431-3441.
- Duport, C. & Armengaud, J. (2019). Advanced proteomics as a powerful tool for studying toxins of human bacterial pathogens. *Toxins* 11(10): 576.
- Duport, C., Jobin, M. & Schmitt, P. (2016). Adaptation in *Bacillus cereus*: From Stress to Disease. *Front Microbiol* 7: 1550.
- 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(1): 90-95.
- Dutton, R. J., Boyd, D., Berkmen, M. & Beckwith, J. (2008). Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(33): 11933-11938.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Grallert, H., Rieck, P., Wagner, M. & Scherer, S. (2006). Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC microbiology* 6(1): 1-11.
- Ehling-Schulz, M., Fricker, M. & Scherer, S. (2004). *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Mol Nutr Food Res* 48(7): 479-487.
- Ehling-Schulz, M., Lereclus, D. & Koehler, T. M. (2019). The *Bacillus cereus* group: *Bacillus* species with pathogenic potential. *Gram-Positive Pathogens*: 875-902.
- Fagerlund, A., Lindbäck, T., Storset, A. K., Granum, P. E. & Hardy, S. P. (2008). *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the ClyA (HlyE, SheA) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. *Microbiology* 154(3): 693-704.
- Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S. P. & Granum, P. E. (2004). Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology* 150(8): 2689-2697.
- Fahey, R. C. (2001). Novel thiols of prokaryotes. *Annual Reviews in Microbiology* 55(1): 333-356.

- Farr, S. B., Touati, D. & Kogoma, T. (1988). Effects of oxygen stress on membrane functions in *Escherichia coli*: role of HPI catalase. *J Bacteriol* 170(4): 1837-1842.
- Ferguson, G. D. & Bridge, W. J. (2019). The glutathione system and the related thiol network in *Caenorhabditis elegans*. *Redox Biol* 24: 101171.
- Finelli, M. J. (2020). Redox Post-translational Modifications of Protein Thiols in Brain Aging and Neurodegenerative Conditions—Focus on S-Nitrosation. *Frontiers in Aging Neuroscience* 12: 254.
- Forman, H. J., Fukuto, J. M. & Torres, M. (2004). Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 287(2): C246-C256.
- Forrest, S. & Welch, M. (2020). Arming the troops: Post-translational modification of extracellular bacterial proteins. *Science Progress* 103(4): 0036850420964317.
- Fox, D., Mathur, A., Xue, Y., Liu, Y., Tan, W. H., Feng, S., Pandey, A., Ngo, C., Hayward, J. A. & Atmosukarto, I. I. (2020). *Bacillus cereus* non-haemolytic enterotoxin activates the NLRP3 inflammasome. *Nature communications* 11(1): 1-16.
- Frankland, G. C. & Frankland, P. F. (1887). XI. Studies on some new micro-organisms obtained from air. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.(B.)* (178): 257-287.
- Fujimoto, T., Inaba, K. & Kadokura, H. (2019). Methods to identify the substrates of thiol-disulfide oxidoreductases. *Protein Science* 28(1): 30-40.
- Gaballa, A., Newton, G. L., Antelmann, H., Parsonage, D., Upton, H., Rawat, M., Claiborne, A., Fahey, R. C. & Helmann, J. D. (2010). Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in *Bacilli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(14): 6482-6486.
- Gauvry, E., Mathot, A.-G., Leguérinel, I., Couvert, O., Postollec, F., Broussolle, V. & Coroller, L. (2017). Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment. *Research in microbiology* 168(4): 369-378.
- Ge, T., Yang, J., Zhou, S., Wang, Y., Li, Y. & Tong, X. (2020). The role of the pentose phosphate pathway in diabetes and cancer. *Frontiers in Endocrinology* 11: 365.
- Girault, G., Blouin, Y., Vergnaud, G. & Derzelle, S. (2014). High-throughput sequencing of *Bacillus anthracis* in France: investigating genome diversity and population structure using whole-genome SNP discovery. *BMC genomics* 15(1): 1-10.
- Go, Y.-M., Chandler, J. D. & Jones, D. P. (2015). The cysteine proteome. *Free Radical Biology and Medicine* 84: 227-245.
- González-Flecha, B. & Demple, B. (1995). Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of biological chemistry* 270(23): 13681-13687.
- Gould, N. S., Evans, P., Martínez-Acedo, P., Marino, S. M., Gladyshev, V. N., Carroll, K. S. & Ischiropoulos, H. (2015). Site-specific proteomic mapping identifies selectively modified regulatory cysteine residues in functionally distinct protein networks. *Chemistry & biology* 22(7): 965-975.
- Gout, I. (2019). Coenzyme A: a protective thiol in bacterial antioxidant defence. *Biochemical Society transactions* 47(1): 469-476.
- Gouveia, D., Grenga, L., Pible, O. & Armengaud, J. (2020). Quick microbial molecular phenotyping by differential shotgun proteomics. *Environmental Microbiology* 22(8): 2996-3004.
- Granum, P. E. & Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS microbiology letters* 157(2): 223-228.

- Gray, M. J., Wholey, W.-Y. & Jakob, U. (2013). Bacterial responses to reactive chlorine species. *Annual review of microbiology* 67: 141-160.
- Griendling, K. K., Touyz, R. M., Zweier, J. L., Dikalov, S., Chilian, W., Chen, Y.-R., Harrison, D. G. & Bhatnagar, A. (2016). Measurement of reactive oxygen species, reactive nitrogen species, and redox-dependent signaling in the cardiovascular system: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation research* 119(5): e39-e75.
- Groitel, B. & Jakob, U. (2014). Thiol-based redox switches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1844(8): 1335-1343.
- Guinebretière, M. H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C. & Heyndrickx, M. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environmental Microbiology* 10(4): 851-865.
- Guo, J., Nguyen, A. Y., Dai, Z., Su, D., Gaffrey, M. J., Moore, R. J., Jacobs, J. M., Monroe, M. E., Smith, R. D. & Koppenaal, D. W. (2014). Proteome-wide light/dark modulation of thiol oxidation in cyanobacteria revealed by quantitative site-specific redox proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* 13(12): 3270-3285.
- Gusarov, I. & Nudler, E. (2012). S-nitrosylation signaling in *Escherichia coli*. *Science signaling* 5(228): pe26-pe26.
- Ha, E.-M., Oh, C.-T., Bae, Y. S. & Lee, W.-J. (2005). A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science* 310(5749): 847-850.
- Halliwell, B. (2006a). Free radicals in biochemistry and medicine. *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*.
- Halliwell, B. (2006b). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology* 141(2): 312-322.
- Hampton, M. B., Kettle, A. J. & Winterbourn, C. C. (1998). Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 92(9): 3007-3017.
- Hansen, R. E. & Winther, J. R. (2009). An introduction to methods for analyzing thiols and disulfides: Reactions, reagents, and practical considerations. *Anal Biochem* 394(2): 147-158.
- Hauge, S. (1950). Food Poisoning caused by *Bacillus cereus*. A Preliminary Report. *Nordisk Hygienisk Tidskrift* (6): 189-206.
- Hayaishi, O. & Nozaki, M. (1969). Nature and mechanisms of oxygenases. *Science* 164(3878): 389-396.
- Held, J. M. & Gibson, B. W. (2012). Regulatory control or oxidative damage? Proteomic approaches to interrogate the role of cysteine oxidation status in biological processes. *Molecular & Cellular Proteomics* 11(4): R111. 013037.
- Helgason, E., Caugant, D. A., Olsen, I. & Kolstø, A.-B. (2000). Genetic structure of population of *Bacillus cereus* and *B. thuringiensis* isolates associated with periodontitis and other human infections. *Journal of clinical microbiology* 38(4): 1615-1622.
- Helgason, E., Tourasse, N. J., Meisal, R., Caugant, D. A. & Kolstø, A.-B. (2004). Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Applied and environmental microbiology* 70(1): 191-201.
- Hemady, R., Zaltas, M., Paton, B., Foster, C. S. & Baker, A. S. (1990). *Bacillus*-induced endophthalmitis: new series of 10 cases and review of the literature. *British journal of ophthalmology* 74(1): 26-29.

- Hess, D. T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H. E. & Stamler, J. S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews Molecular cell biology* 6(2): 150-166.
- Hochgräfe, F., Mostertz, J., Albrecht, D. & Hecker, M. (2005). Fluorescence thiol modification assay: oxidatively modified proteins in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 58(2): 409-425.
- Hurd, T. R., Prime, T. A., Harbour, M. E., Lilley, K. S. & Murphy, M. P. (2007). Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: implications for mitochondrial redox signaling. *Journal of biological chemistry* 282(30): 22040-22051.
- Hurst, J. K. (2012). What really happens in the neutrophil phagosome? *Free Radical Biology and Medicine* 53(3): 508-520.
- Imber, M., Pietrzyk-Brzezinska, A. J. & Antelmann, H. (2019). Redox regulation by reversible protein S-thiolation in Gram-positive bacteria. *Redox Biol* 20: 130-145.
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual Reviews in Microbiology* 57(1): 395-418.
- Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N. & Lapidus, A. (2003). Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* 423(6935): 87-91.
- Jacob, H. (1970). Redox potential. *Methods in microbiology* 2: 91-123.
- Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P. & Snyder, S. H. (2001). Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature cell biology* 3(2): 193-197.
- Jessberger, N., Dietrich, R., Granum, P. E. & Märklbauer, E. (2020). The *Bacillus cereus* food infection as multifactorial process. *Toxins* 12(11): 701.
- Jiménez, G., Urdiain, M., Cifuentes, A., López-López, A., Blanch, A. R., Tamames, J., Kämpfer, P., Kolstø, A.-B., Ramón, D. & Martínez, J. F. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Systematic and applied microbiology* 36(6): 383-391.
- Jobin, M.-P., Clavel, T., Carlin, F. & Schmitt, P. (2002). Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415. *International journal of food microbiology* 79(1-2): 65-73.
- Jones, D. P. & Sies, H. (2015). The redox code. *Antioxidants & redox signaling* 23(9): 734-746.
- Jurtshuk, P. (1996). Bacterial metabolism. *Medical Microbiology* 4.
- Kadokura, H., Katzen, F. & Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annual review of biochemistry* 72(1): 111-135.
- Kanofsky, J. R. (1989). Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-biological interactions* 70(1-2): 1-28.
- Karve, T. M. & Cheema, A. K. (2011). Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *Journal of amino acids* 2011.
- Kasting, J. F. (1993). Earth's early atmosphere. *Science* 259(5097): 920-926.
- Kato, K., Matsumura, Y., Yamamoto, M., Nagao, M., Ito, Y., Takakura, S. & Ichiyama, S. (2014). Seasonal trend and clinical presentation of *Bacillus cereus* bloodstream infection: association with summer and indwelling catheter. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 33(8): 1371-1379.

- Kawanishi, S., Hiraku, Y. & Oikawa, S. (2001). Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 488(1): 65-76.
- Keire, D. A., Robert, J. M. & Rabenstein, D. L. (1992). Microscopic protonation equilibria and solution conformations of coenzyme A and coenzyme A disulfides. *The Journal of Organic Chemistry* 57(16): 4427-4431.
- Kesarkar, R., Yeole, M., Dalvi, B., Sharon, M. & Chowdhary, A. (2015). Simplistic approach towards synthesis of highly stable and biocompatible L-cysteine capped gold nanosphere intermediate for drug conjugation. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res* 31: 143-146.
- Klomsiri, C., Karplus, P. A. & Poole, L. B. (2011). Cysteine-based redox switches in enzymes. *Antioxidants & redox signaling* 14(6): 1065-1077.
- KOLSTØ, A.-B., Lereclus, D. & Mock, M. (2002). Genome structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *Current topics in microbiology and immunology* 264: 95-108.
- Kouwen, T. R., Van Der Goot, A., Dorenbos, R., Winter, T., Antelmann, H., Plaisier, M. C., Quax, W. J., Van Dijl, J. M. & Dubois, J. Y. F. (2007). Thiol-disulphide oxidoreductase modules in the low-GC Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 64(4): 984-999.
- Lanier, K. A. & Williams, L. D. (2017). The origin of life: models and data. *Journal of molecular evolution* 84(2-3): 85-92.
- 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(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(7): 1757-1766.
- Larsen, M. R., Trelle, M. B., Thingholm, T. E. & Jensen, O. N. (2006). Analysis of posttranslational modifications of proteins by tandem mass spectrometry: Mass Spectrometry For Proteomics Analysis. *Biotechniques* 40(6): 790-798.
- Le Lay, J., Bahloul, H., Sérino, 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 microbiology* 46: 314-321.
- Le Moan, N., Clement, G., Le Maout, S., Tacnet, F. & Toledano, M. B. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* proteome of oxidized protein thiols: contrasted functions for the thioredoxin and glutathione pathways. *Journal of biological chemistry* 281(15): 10420-10430.
- Le Moan, N., Tacnet, F. & Toledano, M. B. (2008). Protein-thiol oxidation, from single proteins to proteome-wide analyses. In *Redox-Mediated Signal Transduction*, 175-192: Springer.
- Leichert, L. I., Gehrke, F., Gudiseva, H. V., Blackwell, T., Ilbert, M., Walker, A. K., Strahler, J. R., Andrews, P. C. & Jakob, U. (2008). Quantifying changes in the thiol redox proteome upon oxidative stress in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(24): 8197-8202.
- Leichert, L. I. & Jakob, U. (2004). Protein thiol modifications visualized in vivo. *PLoS Biol* 2(11): e333.
- Lind, C., Gerdes, R., Hammell, Y., Schuppe-Koistinen, I., von Löwenhielm, H. B., Holmgren, A. & Cotgreave, I. A. (2002). Identification of S-glutathionylated cellular proteins during oxidative stress and constitutive metabolism by affinity purification and proteomic analysis. *Archives of biochemistry and biophysics* 406(2): 229-240.
- Liu, C.-G., Qin, J.-C. & Lin, Y.-H. (2017). Fermentation and Redox Potential.

- Liu, P., Zhang, H., Wang, H. & Xia, Y. (2014). Identification of redox-sensitive cysteines in the Arabidopsis proteome using OxiTRAQ, a quantitative redox proteomics method. *Proteomics* 14(6): 750-762.
- Loi, V. V., Rossius, M. & Antelmann, H. (2015). Redox regulation by reversible protein S-thiolation in bacteria. *Front Microbiol* 6: 187.
- Macek, B., Forchhammer, K., Hardouin, J., Weber-Ban, E., Grangeasse, C. & Mijakovic, I. (2019). Protein post-translational modifications in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 17(11): 651-664.
- Madeira, J.-P., Armengaud, J. & Duport, C. (2017). Methionine residues in exoproteins and their recycling by methionine sulfoxide reductase AB serve as an antioxidant strategy in *Bacillus cereus*. *Front Microbiol* 8: 1342.
- Madeira, J. P., Alpha-Bazin, B., Armengaud, J. & Duport, C. (2015). Time dynamics of the *Bacillus cereus* exoproteome are shaped by cellular oxidation. *Front Microbiol* 6: 342.
- Mailloux, R. (2015). Still at the center of it all; novel functions of the oxidative krebs cycle. *Bioenergetics* 4(1): 1-14.
- Markowicz, A., Płociniczak, T. & Piotrowska-Seget, Z. (2010). Response of bacteria to heavy metals measured as changes in FAME profiles. *Polish Journal of Environmental Studies* 19(5): 957-965.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *carcinogenesis* 21(3): 361-370.
- Marston, C. K., Gee, J. E., Popovic, T. & Hoffmaster, A. R. (2006). Molecular approaches to identify and differentiate *Bacillus anthracis* from phenotypically similar *Bacillus* species isolates. *BMC microbiology* 6(1): 22.
- Martinez-Cayueta, M. (1995). Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie* 77(3): 147-161.
- Martínez, M. C. & Andriantsitohaina, R. (2009). Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease. *Antioxidants & redox signaling* 11(3): 669-702.
- Mayr, B., Kaplan, T., Lechner, S. & Scherer, S. (1996). Identification and purification of a family of dimeric major cold shock protein homologs from the psychrotrophic *Bacillus cereus* WSBC 10201. *J Bacteriol* 178(10): 2916-2925.
- Melling, J., Capel, B., Turnbull, P. & Gilbert, R. (1976). Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with *Bacillus cereus*. *Journal of Clinical Pathology* 29(10): 938-940.
- Melo, A. M. & Teixeira, M. (2016). Supramolecular organization of bacterial aerobic respiratory chains: From cells and back. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1857(3): 190-197.
- Méndez, M. B., Orsaria, L. M., Philippe, V., Pedrido, M. E. & Grau, R. R. (2004). Novel roles of the master transcription factors SpooA and σ B for survival and sporulation of *Bacillus subtilis* at low growth temperature. *J Bacteriol* 186(4): 989-1000.
- Menet, M.-C. (2011). Principes de la spectrométrie de masse. *Revue francophone des laboratoires* 2011(437): 41-53.
- Mermelekas, G., Makridakis, M., Koeck, T. & Vlahou, A. (2013). Redox proteomics: from residue modifications to putative biomarker identification by gel-and LC-MS-based approaches. *Expert Review of Proteomics* 10(6): 537-549.
- Merzougui, S., Lkhider, M., Grosset, N., Gautier, M. & Cohen, N. (2013). Differentiation by molecular typing of *Bacillus cereus* isolates from food in Morocco: PFGE-Eric PCR. *Food Public Health* 3: 223-227.

- Messaoudi, K., Clavel, T., Schmitt, P. & Duport, C. (2010). Fnr mediates carbohydrate-dependent regulation of catabolic and enterotoxin genes in *Bacillus cereus* F4430/73. *Research in microbiology* 161(1): 30-39.
- Messens, J., Rouhier, N. & Collet, J.-F. (2013). Redox homeostasis. In *Oxidative Stress and Redox Regulation*, 59-84: Springer.
- Messner, K. R. & Imlay, J. A. (1999). The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. *Journal of biological chemistry* 274(15): 10119-10128.
- Michelon, D., Abraham, S., Ebel, B., De Coninck, J., Husson, F., Feron, G., Gervais, P. & Cachon, R. (2010). Contribution of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Lactococcus lactis*. *FEBS J* 277(10): 2282-2290.
- Migdal, C. & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* 27(4): 405-412.
- Miller, R. A., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J. & Kovac, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 66(11): 4744.
- Mols, M. & Abee, T. (2011). Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental Microbiology* 13(6): 1387-1394.
- Nakamura, L. & Jackson, M. (1995). Clarification of the taxonomy of *Bacillus mycoides*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 45(1): 46-49.
- Newton, G. L., Rawat, M., La Clair, J. J., Jothivasan, V. K., Budiarto, T., Hamilton, C. J., Claiborne, A., Helmann, J. D. & Fahey, R. C. (2009). Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in *Bacilli*. *Nature chemical biology* 5(9): 625-627.
- Nyström, T. (2004). Stationary-phase physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 58: 161-181.
- Pan, K.-T., Chen, Y.-Y., Pu, T.-H., Chao, Y.-S., Yang, C.-Y., Bomgarden, R. D., Rogers, J. C., Meng, T.-C. & Khoo, K.-H. (2014). Mass spectrometry-based quantitative proteomics for dissecting multiplexed redox cysteine modifications in nitric oxide-protected cardiomyocyte under hypoxia. *Antioxidants & redox signaling* 20(9): 1365-1381.
- Pandiani, F., Brillard, J., Bornard, I., Michaud, C., Chamot, S. & Broussolle, V. (2010). Differential involvement of the five RNA helicases in adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to low growth temperatures. *Applied and environmental microbiology* 76(19): 6692-6697.
- Panek, H. R. & O'Brian, M. R. (2004). KatG is the primary detoxifier of hydrogen peroxide produced by aerobic metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 186(23): 7874-7880.
- Park, S. & Imlay, J. A. (2003). High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *J Bacteriol* 185(6): 1942-1950.
- Passalacqua, K. D., Bergman, N. H., Herring-Palmer, A. & Hanna, P. (2006). The superoxide dismutases of *Bacillus anthracis* do not cooperatively protect against endogenous superoxide stress. *J Bacteriol* 188(11): 3837-3848.
- Patel, M. S., Nemeria, N. S., Furey, W. & Jordan, F. (2014). The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *Journal of biological chemistry* 289(24): 16615-16623.
- Paulsen, C. E. & Carroll, K. S. (2013). Cysteine-mediated redox signaling: chemistry, biology, and tools for discovery. *Chemical reviews* 113(7): 4633-4679.

- Phaniendra, A., Jestadi, D. B. & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry* 30(1): 11-26.
- Pillot, G., Brillet-Viel, A. & Prévost, H. (2018). Implication of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Listeria monocytogenes*. *bioRxiv*: 353409.
- Poor, C. B., Chen, P. R., Duguid, E., Rice, P. A. & He, C. (2009). Crystal structures of the reduced, sulfenic acid, and mixed disulfide forms of SarZ, a redox active global regulator in *Staphylococcus aureus*. *Journal of biological chemistry* 284(35): 23517-23524.
- Prévost, H. & Brillet-Viel, A. (2014). Ecology of bacteria and fungi in foods| influence of redox potential.
- Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., In 't Veld, P., Denon, Q., Verhe, R. & Debevere, J. (2008). Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in applied microbiology* 46(5): 536-541.
- Ramus, C., de Peredo, A. G., Dahout, C., Gallagher, M. & Garin, J. (2006). An optimized strategy for ICAT quantification of membrane proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* 5(1): 68-78.
- Reichart, O., Szakmár, K., Jozwiak, Á., Felföldi, J. & Baranyai, L. (2007). Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination. *International journal of food microbiology* 114(2): 143-148.
- Riondet, C., Cachon, R., Waché, Y., Alcaraz, Gérard & Diviès, C. (1999). Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. *European Journal of Biochemistry* 262(2): 595-599.
- Rocha, E. R. & Smith, C. J. (1999). Role of the alkyl hydroperoxide reductase (ahpCF) gene in oxidative stress defense of the obligate anaerobe *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 181(18): 5701-5710.
- Romeo, T. & Snoep, J. L. (2005). Glycolysis and Flux Control. *EcoSal Plus* 1(2).
- Rosenfeld, E., Duport, C., Zigha, A. & Schmitt, P. (2005). Characterization of aerobic and anaerobic vegetative growth of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* F4430/73 strain. *Can J Microbiol* 51(2): 149-158.
- Ryan, P. A., Macmillan, J. D. & Zilinskas, B. A. (1997). Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L1 and L2 components of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 179(8): 2551-2556.
- Sauer, U. & Eikmanns, B. J. (2005). The PEP—pyruvate—oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria: We dedicate this paper to Rudolf K. Thauer, Director of the Max-Planck-Institute for Terrestrial Microbiology in Marburg, Germany, on the occasion of his 65th birthday. *FEMS Microbiol Rev* 29(4): 765-794.
- Saurin, A. T., Neubert, H., Brennan, J. P. & Eaton, P. (2004). Widespread sulfenic acid formation in tissues in response to hydrogen peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(52): 17982-17987.
- Seaver, L. C. & Imlay, J. A. (2001). Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183(24): 7173-7181.
- Seaver, L. C. & Imlay, J. A. (2004). Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *Journal of biological chemistry* 279(47): 48742-48750.
- Sechi, S. & Chait, B. T. (1998). Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Analytical chemistry* 70(24): 5150-5158.
- Shakir, S., Vinh, J. & Chiappetta, G. (2017). Quantitative analysis of the cysteine redoxome by iodoacetyl tandem mass tags. *Anal Bioanal Chem* 409(15): 3821-3830.

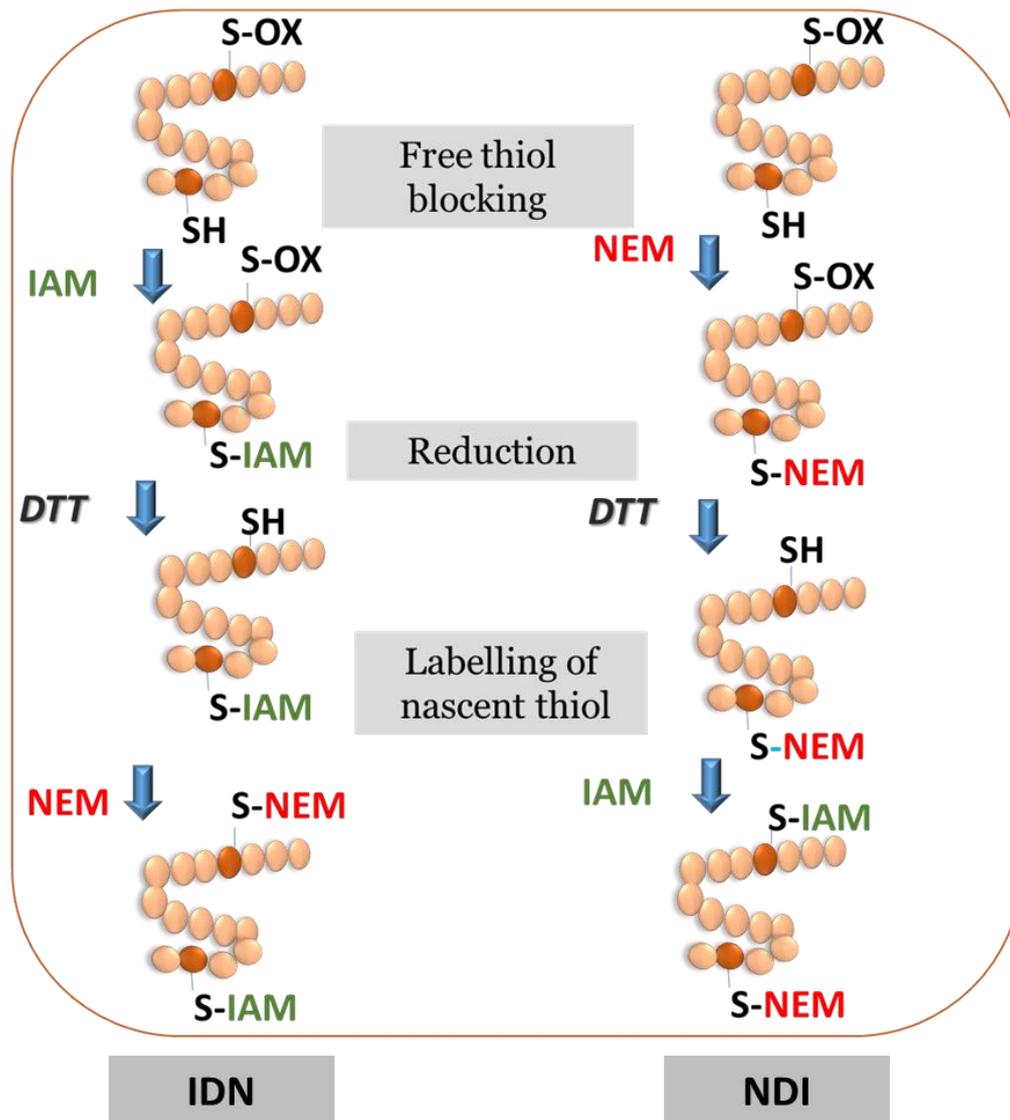
- Shany, S., Bernheimer, A. W., Grushoff, P. S. & Kim, K.-S. (1974). Evidence for membrane cholesterol as the common binding site for cereolysin, streptolysin O and saponin. *Molecular and cellular biochemistry* 3(3): 179-186.
- Sies, H. & Menck, C. F. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research/DNAging* 275(3-6): 367-375.
- Six, S. C., Buysler, M., Vignaud, M., Dao, T. T., Messio, S. & Payraud, S. (2012). Toxi-infections alimentaires collectives à *Bacillus cereus*: bilan de la caractérisation des souches de 2006 à 2010. *Bull. Épidémiol. Anim. Aliment* 50: 57-61.
- Spector, A., Yan, G.-Z., Huang, R.-R., McDermott, M. J., Gascoyne, P. & Pigiet, V. (1988). The effect of H₂O₂ upon thioredoxin-enriched lens epithelial cells. *Journal of biological chemistry* 263(10): 4984-4990.
- Sporer, A. J., Kahl, L. J., Price-Whelan, A. & Dietrich, L. E. (2017). Redox-based regulation of bacterial development and behavior. *Annual review of biochemistry* 86: 777-797.
- Sreedhar, A., Wiese, E. K. & Hitosugi, T. (2020). Enzymatic and metabolic regulation of lysine succinylation. *Genes & diseases* 7(2): 166-171.
- Stadtman, E. R. & Levine, R. L. (2000). Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899(1): 191-208.
- Stenfors Arnesen, L. P., Fagerlund, A. & Granum, P. E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* 32(4): 579-606.
- Stinccone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A. & Tauqeer Alam, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews* 90(3): 927-963.
- Storz, G. & Tartaglia, L. A. (1992). OxyR: a regulator of antioxidant genes. *The Journal of nutrition* 122(suppl_3): 627-630.
- Suttapitugsakul, S., Xiao, H., Smeekens, J. & Wu, R. (2017). Evaluation and optimization of reduction and alkylation methods to maximize peptide identification with MS-based proteomics. *Molecular BioSystems* 13(12): 2574-2582.
- Tango, M. & Ghaly, A. (1999). Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration. *Biomass and Bioenergy* 17(3): 221-238.
- Taniai, H., Iida, K.-i., Seki, M., Saito, M., Shiota, S., Nakayama, H. & Yoshida, S.-i. (2008). Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of *Streptococcus pneumoniae*: role of lactate as an energy source. *J Bacteriol* 190(10): 3572-3579.
- Tharmalingam, S., Alhasawi, A., Appanna, V. P., Lemire, J. & Appanna, V. D. (2017). Reactive nitrogen species (RNS)-resistant microbes: adaptation and medical implications. *Biol Chem* 398(11): 1193-1208.
- Thomassin, S., Jobin, M. P. & Schmitt, P. (2006). The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH. *Arch Microbiol* 186(3): 229-239.
- Tuipulotu, D. E., Mathur, A., Ngo, C. & Man, S. M. (2020). *Bacillus cereus*: epidemiology, virulence factors, and host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology*.
- Ulrich, S., Gottschalk, C., Dietrich, R., Märklbauer, E. & Gareis, M. (2019). Identification of cereulide producing *Bacillus cereus* by MALDI-TOF MS. *Food microbiology* 82: 75-81.
- van der Reest, J., Lilla, S., Zheng, L., Zanivan, S. & Gottlieb, E. (2018). Proteome-wide analysis of cysteine oxidation reveals metabolic sensitivity to redox stress. *Nature communications* 9(1): 1-16.

- Van Laer, K., Hamilton, C. J. & Messens, J. (2013). Low-molecular-weight thiols in thiol–disulfide exchange. *Antioxidants & redox signaling* 18(13): 1642-1653.
- Wang, H. & Xian, M. (2011). Chemical methods to detect S-nitrosation. *Curr Opin Chem Biol* 15(1): 32-37.
- Wholey, W. Y. & Jakob, U. (2012). Hsp33 confers bleach resistance by protecting elongation factor Tu against oxidative degradation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 83(5): 981-991.
- Wiese, S., Reidegeld, K. A., Meyer, H. E. & Warscheid, B. (2007). Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 7(3): 340-350.
- Winterbourn, C. C. (1985). Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride, and similarity of oxidant to hypochlorite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 840(2): 204-210.
- Wojdyla, K. & Rogowska-Wrzesinska, A. (2015). Differential alkylation-based redox proteomics--Lessons learnt. *Redox Biol* 6: 240-252.
- Wojdyla, K., Williamson, J., Roepstorff, P. & Rogowska-Wrzesinska, A. (2015). The SNO/SOH TMT strategy for combinatorial analysis of reversible cysteine oxidations. *J Proteomics* 113: 415-434.
- Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K.-S., Kang, S. W., Kim, K. & Rhee, S. G. (2003). Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 300(5619): 653-656.
- Xiao, W., Wang, R. S., Handy, D. E. & Loscalzo, J. (2018). NAD(H) and NADP(H) Redox Couples and Cellular Energy Metabolism. *Antioxid Redox Signal* 28(3): 251-272.
- Yuan, K., Liu, Y., Chen, H. N., Zhang, L., Lan, J., Gao, W., Dou, Q., Nice, E. C. & Huang, C. (2015). Thiol-based redox proteomics in cancer research. *Proteomics* 15(2-3): 287-299.
- Zeitouni, N. E., Chotikatum, S., von Kockritz-Blickwede, M. & Naim, H. Y. (2016). The impact of hypoxia on intestinal epithelial cell functions: consequences for invasion by bacterial pathogens. *Mol Cell Pediatr* 3(1): 14.
- Zeller, T. & Klug, G. (2006). Thioredoxins in bacteria: functions in oxidative stress response and regulation of thioredoxin genes. *Naturwissenschaften* 93(6): 259-266.
- Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M.-C. & Yates III, J. R. (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical reviews* 113(4): 2343-2394.
- Zheng, C., Guo, S., Tennant, W. G., Pradhan, P. K., Black, K. A. & Dos Santos, P. C. (2019). The thioredoxin system reduces protein persulfide intermediates formed during the synthesis of thio-cofactors in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* 58(14): 1892-1904.
- Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P. & Dupont, 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(3): 222-233.

Annexes

Annexes

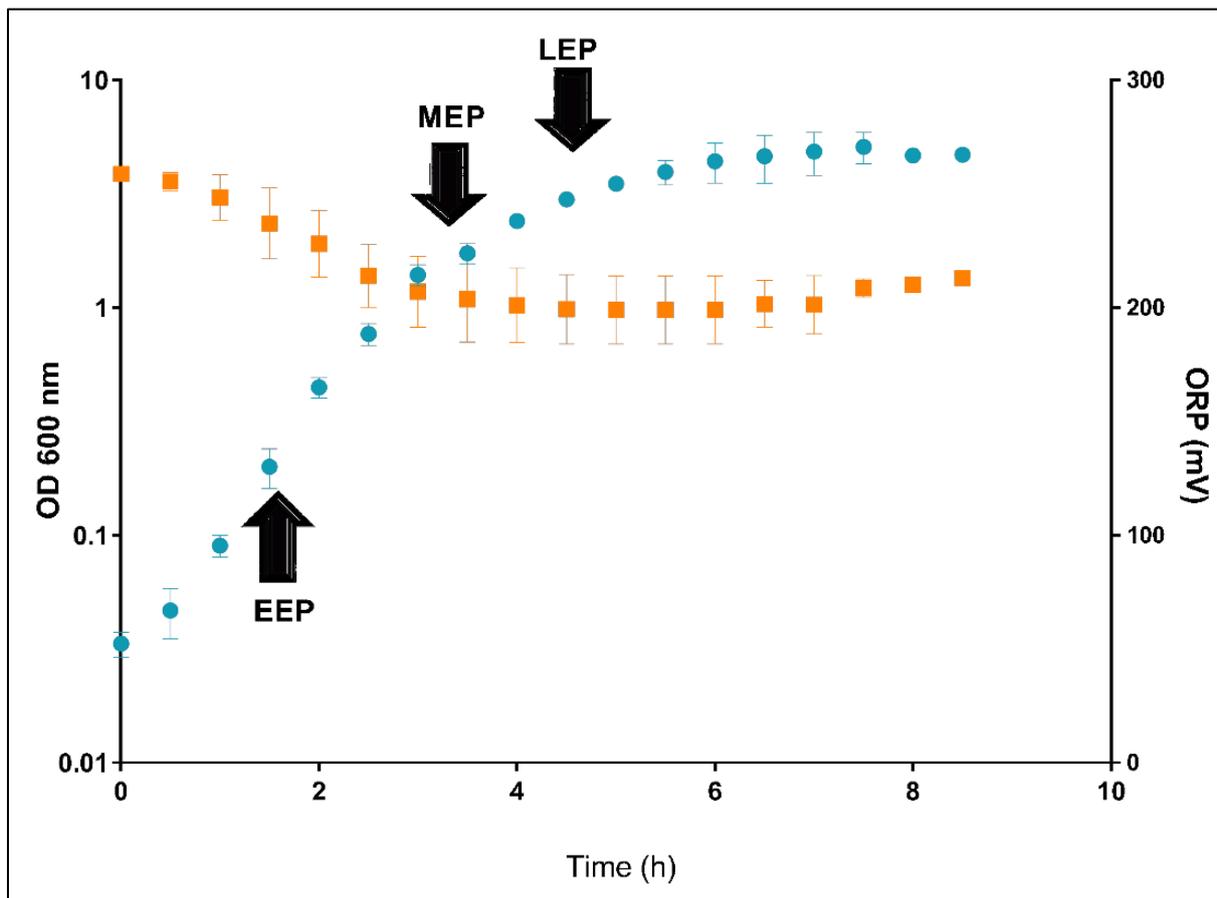
Annexe 1. Résumé des principes de l'alkylation différentielle en double inversée pour l'analyse des modifications réversibles de la cystéine



IDN : les cystéines initialement réduites sont alkylées avec l'IAM. Les cystéines oxydées sont réduites au DTT puis alkylées avec le NEM.

NDI : les cystéines initialement réduites sont alkylées avec le NEM. Les cystéines oxydées sont réduites au DTT puis alkylées avec le IAM.

Annexe 2. Figure S1. Growth curve and evolution of extracellular oxidoreduction potential (ORP) of *B. cereus* ATCC 14579 in regulated oxic batch cultures. Circles represent optical densities at 600 nm (OD₆₀₀) and squares correspond to extracellular ORP. Black arrows indicate cell harvesting, at early-exponential growth phase (EEP), mid-exponential growth phase (MEP), and late-exponential growth phase (LEP). Data correspond to mean values calculated from biological triplicates ± SD.

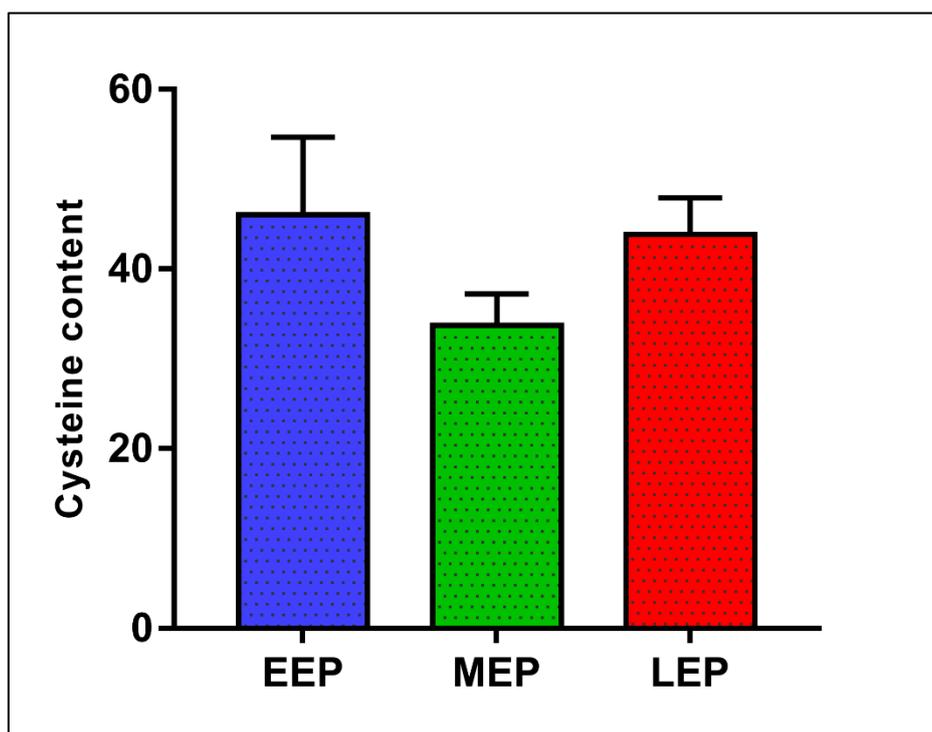


Annexe 3. Protéines du métabolisme énergétique propres identifiées à chaque condition de croissance (anaérobie et aérobie).

| Gene | Protein |
|-------------------------|---|
| Anaerobic growth | |
| BC5311 | ATP synthase subunit c (atpE) |
| BC4996 | L-lactate dehydrogenase 3 ldh3 |
| BC0802 | alcohol dehydrogenase (Adh) |
| BC0809 | PTS system, diacetylchitobiose-specific IIC component (licC_3) |
| BC3570 | formate dehydrogenase accessory protein (fdhD) |
| BC2118 | respiratory nitrate reductase alpha chain (narG) |
| BC0612 | L-lactate permease (Cox1) |
| BC4792 | cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I (cydA) |
| BC2136 | nitrite reductase [NAD(P)H] large subunit (nirB) |
| BC0981 | dihydroxyacetone kinase (dhaL2) |
| BC3555 | aldehyde dehydrogenase (dhaS) |
| BC2121 | respiratory nitrate reductase gamma chain (narI) |
| BC4167 | glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (ugpQ_2) |
| BC1940 | transport ATP-binding protein (cydD) |
| BC2119 | respiratory nitrate reductase beta chain |
| Aerobic growth | |
| BC4866 | Glucose-1-phosphate adenylyltransferase (glgC) |
| BC2537 | acetamidase |
| BC2225 | 6-phosphogluconate dehydrogenase-like protein (gnd) |
| BC0482 | PTS system, N-acetylglucosamine-specific IIBC component |
| BC0357 | succinate-semialdehyde dehydrogenase [NADP+] |
| BC2464 | S-layer protein / peptidoglycan endo-beta-N-acetylglucosaminidase |
| BC2029 | phosphatase PhoE (COI) |
| BC3647 | N-ethylmaleimide reductase |
| BC3380 | quinone oxidoreductase |
| BC5374 | glycerophosphoryl diester phosphodiesterase |
| BC4925 | NADH dehydrogenase |
| BC2155 | HEAT repeat-containing PBS lyase |
| BC0361 | polysaccharide deacetylase |
| BC1448 | Flavohemoprotein |
| BC5271 | UDP-N-acetylglucosamine 4-epimerase |
| BC3541 | flavodoxin |
| BC4863 | glycogen phosphorylase |
| BC1035 | Glycerol kinase |
| BC1983 | putative cytoplasmic protein |
| BC1199 | Probable inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase 1 |
| BC3321 | NAD(P)H-dependent flavin reductase |
| BC0786 | nitroreductase family protein |
| BC3410 | D-threo-aldose 1-dehydrogenase |
| BC1285 | aldehyde dehydrogenase |
| BC1974 | peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase |

| | |
|--------|---|
| BC5187 | cytochrome c-551 |
| BC5153 | phosphocarrier protein Chr |
| BC3958 | myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase |
| BC0698 | Quinol oxidase subunit 2 |
| BC2262 | thioredoxin |
| BC4340 | NAD(P)H nitroreductase |
| BC0697 | cytochrome aa3 quinol oxidase polypeptide I |
| BC0622 | L-threonine 3-dehydrogenase |
| BC4509 | Sodium export permease protein |
| BC3934 | phosphoglycerate mutase |
| BC3498 | quinone oxidoreductase |
| BC1522 | menaquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit |
| BC3372 | 6-phosphogluconate dehydrogenase-like protein |
| BC3368 | 6-phosphogluconolactonase |

Annexe 4. Evolution du contenu de cystéines chez *B. cereus* ATCC14579 pendant la croissance fermentaire anaérobie.



***Supplementary data**

L'ensemble des données protéomiques sont disponibles sous format Excel fourni aux membres de jury et à l'école doctorale Sciences et Agro science. Toute personne en faisant la demande pourra les obtenir.

Valorisation des travaux de thèse

Publications scientifiques

- Hamitouche F, Gaillard J-C, Schmitt P, Armengaud J, Duport C, Dedieu L. Redox proteomic study of *Bacillus cereus* thiol proteome during fermentative anaerobic growth. *BMC Genomics*. 2021. (Accepté)
- Hamitouche F, Armengaud J, Dedieu L, Duport C. Cysteine proteome reveals response to endogenous oxidative stress in *Bacillus cereus*. *International journal of molecular sciences*. 2021. (publié)

Communications scientifiques

2020

Présentation orale (vidéo): “Characterization of *Bacillus cereus* thiol proteome dynamics during anaerobic growth”. Fella Hamitouche, Jean Armengaud, Catherine Duport, and Luc Dedieu. Colloque de la société Française, Espagnole et Portugaise de protéomique. Proteovideo.14novembre2020.Webinaire.

Présentation orale: “Characterization of *Bacillus cereus* thiol proteome”. Hamitouche F, Gaillard J-C, Schmitt P, Dedieu L, Duport C. Journée des doctorants de l’UMR408 SQPOV, Avignon, 14 janvier 2020.

2019

Présentation affichée: “Linking extracellular redox dynamic with *Bacillus cereus* Redoxome”. Fella HAMITOUCHE, Philippe SCHMITT, Catherine DUPORT, and Luc DEDIEU. Congrès international Bacell. Ljubljana (Slovenija). 9-10 avril.2019.

Présentation orale: “Dual strategy for mapping the *Bacillus cereus* thiol proteome”. Fella HAMITOUCHE, Philippe SCHMITT, Catherine DUPORT, and Luc DEDIEU. Congrès National de la Société Française de Microbiologie, Paris, 30 septembre-2 octobre 2019.

Présentation orale: “Understanding the reducing activity of *Bacillus cereus*: involvement of the redoxome in the extracellular redox potential decrease?”. Hamitouche F, Gaillard J-C, Schmitt P, Dedieu L, Duport C. Journée des doctorants de l’UMR408 SQPOV, Avignon, 28 février 2019.

2018

Présentation orale: “Etude du redoxome chez *Bacillus cereus*: Compréhension du pouvoir réducteur”. Fella Hamitouche, Philippe SCHMITT, Catherine DUPORT, and Luc DEDIEU. Journée des doctorants de l’UMR408 SQPOV, Avignon, 16 Janvier 2018.



Article

Cysteine Proteome Reveals Response to Endogenous Oxidative Stress in *Bacillus cereus*

Fella Hamitouche ¹, Jean Armengaud ², Luc Dedieu ^{1,†} and Catherine Duport ^{1,*,†}

¹ Biology Department, Campus Jean-Henri Fabre, Avignon University, INRAE, UMR SQPOV, CEDEX 09, 84911 Avignon, France; fella.hamitouche@univ-avignon.fr (F.H.); luc.dedieu@univ-avignon.fr (L.D.)

² Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), Université Paris-Saclay, CEA, INRAE, SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France; jean.armengaud@cea.fr

* Correspondence: catherine.duport@univ-avignon.fr

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: At the end of exponential growth, aerobic bacteria have to cope with the accumulation of endogenous reactive oxygen species (ROS). One of the main targets of these ROS is cysteine residues in proteins. This study uses liquid chromatography coupled to high-resolution tandem mass spectrometry to detect significant changes in protein abundance and thiol status for cysteine-containing proteins from *Bacillus cereus* during aerobic exponential growth. The proteomic profiles of cultures at early-, middle-, and late-exponential growth phases reveals that (i) enrichment in proteins dedicated to fighting ROS as growth progressed, (ii) a decrease in both overall proteome cysteine content and thiol proteome redox status, and (iii) changes to the reduced thiol status of some key proteins, such as the transition state transcriptional regulator AbrB. Taken together, our data indicate that growth under oxic conditions requires increased allocation of protein resources to attenuate the negative effects of ROS. Our data also provide a strong basis to understand the response mechanisms used by *B. cereus* to deal with endogenous oxidative stress.

Keywords: aerobic growth; *Bacillus cereus*; proteome; cysteine; ROS



Citation: Hamitouche, F.; Armengaud, J.; Dedieu, L.; Duport, C. Cysteine Proteome Reveals Response to Endogenous Oxidative Stress in *Bacillus cereus*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 7550. <https://doi.org/10.3390/ijms22147550>

Academic Editors: Seung-II Kim and Ha-young Lee

Received: 23 June 2021

Accepted: 12 July 2021

Published: 14 July 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

For aerobic bacteria, oxygen (O₂) is an essential element that acts as the final ac-ceptor in respiratory chain electron transport to efficiently produce energy [1]. During normal electron transport, oxygen is partially reduced to H₂O [2], and small quantities of reactive oxygen species (ROS) are produced [3]. The superoxide anion (O₂⁻)—the product of one-electron reduction of oxygen—is the precursor to all the other ROS [3]. Thus, O₂ generates hydrogen peroxide (H₂O₂) by dismutation—either spontaneous or catalyzed by superoxide dismutase (SOD). H₂O₂ can subsequently be fully reduced to H₂O, or it can react with ferrous ion (through the Fenton reaction) to generate the highly reactive hydroxyl radical (OH[•]) [3,4]. H₂O₂, O₂⁻, and OH[•] are all highly reactive molecules that can oxidize any macromolecule, including DNA, RNA, lipids, and proteins. Oxidation of any of these macromolecules can have a deleterious effect on multiple cellular processes [4,5]. To avoid these effects, bacteria have evolved mechanisms to counteract ROS production and minimize their harmful consequences. These mechanisms constitute a complex network of enzymatic and non-enzymatic detoxification systems. Among the enzymatic systems identified, many are widely distributed across aerobic bacteria (e.g., SOD, catalase, and alkyl hydroperoxide reductase). SOD is considered the first line of defense in the antioxidant system because it detoxifies O₂ by producing H₂O₂. This molecule can then be further detoxified through the action of both catalase and alkyl hydroperoxide [6,7]. In parallel, the non-enzymatic antioxidant systems mainly rely on low molecular weight (LMW) thiols. These molecules function as cellular redox buffers to maintain the reduced




Linking extracellular redox dynamic with *Bacillus cereus* redoxome

Fella HAMITOUCHE, Philippe SCHMITT, Catherine DUPORT, and Luc DEDIEU
fella.hamitouche@inra.fr, philippe.schmitt@univ-avignon.fr, catherine.duport@univ-avignon.fr, and luc.dedieu@univ-avignon.fr

**UMR408 "Sécurité et qualité des Produits d'Origine Végétale",
Avignon Université, INRA, F-84000 Avignon, France**

INTRODUCTION

Bacillus cereus is able to face with various oxygenation conditions, such encountered in foods and the human intestine. *B. cereus* growth is coupled with the decrease of the extracellular redox potential (ORP) whatever the oxygenation condition. Extracellular ORP decrease is still poorly understood.

Extracellular ORP is probably shaped by changes in intracellular redox metabolism, which impacts the equilibrium between oxidized versus reduced states of cysteines in proteins, i.e. the so-called Redoxome [1].

The aim of our project is to define the dynamic of *B. cereus* ATCC 14579 redoxome to characterize the redox-sensitive networks that could regulate the extracellular redox potential.

RESULTS

1 • *B. cereus* anaerobic growth in defined MOD medium is coupled with a decrease of extracellular ORP

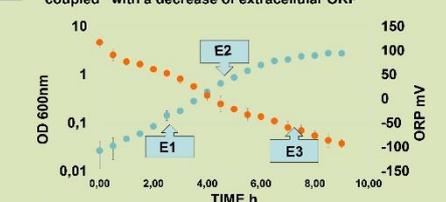
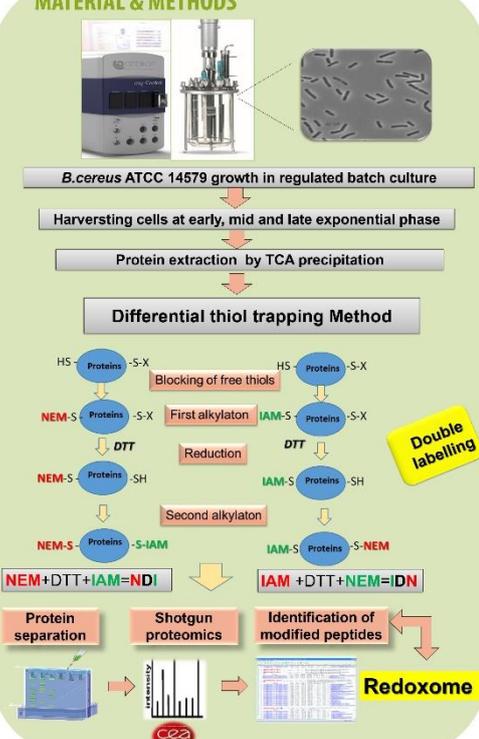


Fig 1. Growth curve of *B. cereus* ATCC 14579 and ORP evolution in regulated batch culture under anaerobiosis

2 • Cells were harvested at three growth times (E1 :Early exponential phase ; E2 :Mid-exponential phase ; E3 :Late exponential phase).
 • A double labelling strategy for trapping thiols was used .

MATERIAL & METHODS



Differential thiol trapping Method:

- Starting with HS-Proteins-S-X
- Blocking of free thiols
- First alkylation: NEM-S-Proteins-S-X
- Reduction: DTT
- Second alkylation: IAM-S-Proteins-S-IAM
- Final products: NEM+DTT+IAM=NDI and IAM+DTT+NEM=IDN

Double labelling: NDI and IDN strategies.

REFERENCES

[1] Chiappetta, G., Ndiaye, S., Igbaria, A., Kumar, C., Vinh, J., Toledano, M.B (2010) Chapter 10 Proteome Screens for Cys Residues Oxidation: The Redoxome. In: Enrique Cadenas and Lester Packer, editor. Methods in Enzymology [Internet]. Academic Press; [cited 2013 Oct 21]. p. 199-216.

CONCLUSIONS

- IDN labelling seems more efficient than NDI labelling to detect differential redox state of cysteine.
- The redoxome coverage depends on the applied differential labelling.
- The reduced vs oxidized ratio of cysteine is higher at low ORP.
- According to IDN labelling, the dynamic of the redoxome may be linked to extracellular ORP decrease.

RESULTS (continued)

A



B

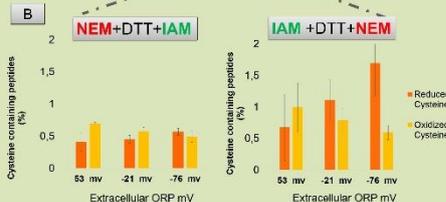


Fig 2. A. Distribution of unique peptide sequences containing cysteine after double labelling; B. Assessment of the double labelling of peptides with both NDI and IDN strategy at 3 growth phases.

- NDI labelling detected more cysteine containing peptides than IDN labelling.
- NDI and IDN labellings detected similar and different targets.
- IDN labelling detected more reduced cysteine containing peptides than oxidized ones at late exponential growth phase (ORP =-76mV).



Centre Inra Provence-Alpes-Côte d'Azur
Domaine Saint-Paul
Site Agroparc
CS 40509
84914 Avignon Cedex 9



Université d'Avignon-Pôle Agro sciences,
84140 Avignon



135

Résumé, congrès national de la société française de Microbiologie. Paris 2019.

Dual strategy for mapping the *Bacillus cereus* thiol proteome

Fella HAMITOUCHE, Philippe SCHMITT, Catherine DUPORT, and Luc DEDIEU.

UMR408 SQPOV Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, Université d'Avignon, F84000 Avignon, France.

Bacillus cereus is a foodborne pathogen able to grow under various oxygenation conditions, such as those encountered in foods and the human intestine. Under anaerobiosis, *B. cereus* growth is coupled with a decrease in extracellular redox potential [1]. We hypothesized that this redox potential decrease is linked to the redox state of the thiol proteome, i.e. the set of proteins with reversibly modified thiols [2]. The analysis of thiol proteome is a challenge. Here, we present a dual strategy for the differential trapping of *B. cereus* thiols.

Cells were collected at early, mid- and late exponential growth phase from regulated batch cultures and treated with TCA to quench thiol-disulfide exchange reactions. Cysteines were labelled using two strategies before detection using shotgun proteomics [3]. In the first one, thiols were alkylated with IAM, then reversible thiol modifications were reduced with DTT, and alkylated with NEM. In the second strategy, the order of alkylating agents has been reversed.

At the protein level, our results identified nearly 1000 proteins in each strategy. We analyzed the modified cysteines detected during each growth phase. In early exponential growth phase, the first and the second methods detected 167 and 366 unique cysteine containing peptides corresponding to 121 and 256 proteins, respectively. The second growth phase revealed in the first labelling 161 unique cysteine peptides representing 121 modified proteins while the second labelling detected a number of 260 cysteine peptides corresponding to 170 proteins. During the third phase of growth, the two strategies identified around 200 unique cysteine peptides corresponding to 150 proteins. Our data showed that, despite differences in the target number detected, each strategy allowed to obtain a large number of proteins. This work is the first to specifically target the thiol proteome of *B. cereus*. In addition, we used a novel model of the broadly applied differential cysteine labeling approach.

We have developed a dual cysteine labeling approach to determine the redox state of *B. cereus* protein thiols during anoxic growth. Applicability and robustness of this technique were demonstrated despite the low number of Cys residues in *B. cereus* proteome.

Keywords: *B. cereus*, redox, thiol

**Résumé, colloque de la société française, espagnole et portugaise de
protéomique. Webinaire.2020.**

**Characterization of *Bacillus cereus* thiol proteome dynamics
during anaerobic growth.**

Fella Hamitouche¹, Jean Armengaud², Catherine Duport¹, and Luc Dedieu¹

¹ Avignon Université, INRAE, UMR Sécurité et qualité des produits d'origine végétale, Avignon, France

² Université Paris Saclay, CEA, INRAE, Département Médicaments et Technologies pour la Santé (DMTS), SPI, 30200 Bagnols-sur-Cèze, France.

Bacillus cereus is a notorious foodborne pathogen (Ehling-Schulz *et al.*, 2019) able to grow under various oxygenation conditions such as encountered in foods and the human gastrointestinal tract (Duport *et al.*, 2016). Growth reflects the ability of the bacteria to adapt and respond to external cues. One major component of the cellular adaptive response is the thiol proteome, i.e. the set of proteins with reversibly modified cysteines thiols (Chiappetta *et al.*, 2010b; Go *et al.*, 2015). Here, we tackled the thiol proteome of *B. cereus* ATCC 14579 and its modifications during fermentative anaerobic growth.

Our technical approach relied on a quantitative thiol trapping method coupled to a proteomic profiling. Cells were collected at early, mid- and late exponential growth phase from regulated batch cultures ($pO_2 = 0$) and treated with TCA to quench thiol-disulfide exchange reactions (Leichert and Jakob, 2004). *In vivo* reduced cysteines were labelled using iodoacetamide (IAM), then oxidized cysteines were reduced with dithiothreitol (DTT), and alkylated with N-ethylmaleimide (NEM). Subsequently, a shotgun proteomic analysis was applied to visualize cysteine residue reversible modifications.

In total, we identified 153 redox sensitive cysteine residues in 117 proteins that participate in many cellular processes and metabolic pathways such as translation, carbohydrate metabolism and stress response. Growth phase dependent analysis of *B. cereus* thiol proteome showed that it evolved during growth both in term of protein composition and redox status, revealing its plasticity. Importantly, we showed that it reached a more reduced status upon entry of the bacteria in stationary growth phase.

Together, our finding represents a unique map for individual cysteines residues and provide an important background for futures redox proteomic studies in *B. cereus*.

Keywords : *B. cereus*, thiol proteome, redox, anaerobic fermentation.

Résumé

Bacillus cereus est un pathogène alimentaire doté d'une grande capacité à s'adapter aux changements environnementaux, et en particulier aux changements de condition d'oxygénation. En réponse à la disponibilité d'oxygène, la bactérie ajuste son métabolisme central pour maintenir l'homéostasie redox cellulaire. Les résidus cystéines sont des éléments centraux de l'homéostasie redox, en raison des propriétés que leur confèrent les groupements thiols (SH). L'ensemble des protéines contenant des résidus cystéines dont l'état redox peut être modifié de manière réversible constitue le thiol protéome. Afin de comprendre dans quelle mesure le thiol protéome contribue à l'homéostasie redox de *B. cereus* ATCC14579 lors de sa croissance respiratoire aérobie et de sa croissance fermentaire anaérobie, nous avons mis au point et expérimenté une approche de protéomique redox basée sur l'alkylation différentielle des cystéines et la détection des cystéines alkylées par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS). Le suivi de l'état redox des cystéines réactives au cours de la phase exponentielle de croissance nous a permis de mettre en évidence la spécificité du thiol protéome, sa dépendance à la phase de croissance et sa dynamique en fonction des conditions d'oxygénation. Globalement, la détection des protéines portant des thiols réactifs a apporté des informations prédictives sur les processus biologiques et les voies cellulaires régulés par l'état redox cellulaire. Par ailleurs, nous avons montré que l'état redox global du thiol protéome évoluait au cours de la croissance, vers un état plus réduit en anaérobiose et moins réduit en aérobie. Ceci pourrait être révélateur d'une forte présence d'espèces réactives d'oxygène (ROS) au début de la croissance en anaérobiose et en fin de croissance en aérobie. L'analyse détaillée du protéome aérobie a montré un enrichissement en protéines anti-oxydantes en fin de croissance et une diminution de son contenu en cystéines, suggérant une adaptation du protéome et du thiol protéome aux conditions plus oxydantes rencontrées en fin de croissance. Ce travail de thèse est la première étude du thiol protéome de *B. cereus*. Il a permis de fournir des cartographies des thiols protéomes aérobie et anaérobie, qui serviront de références aux études visant à élucider l'adaptation cellulaire de *B. cereus* aux changements de son environnement.

Abstract

Bacillus cereus is a foodborne pathogen, which is able to sense and adapt to changing environments, particularly to changes in oxygenation conditions. In response to oxygen availability, the bacterium adjusts its central metabolism to maintain cellular redox homeostasis. Cysteine residues are central elements of redox homeostasis, owing to the properties of thiol (SH) groups. The set of proteins with cysteine residues whose redox status can be reversibly modified constitutes the thiol proteome.

To understand how the thiol proteome contributes to the redox homeostasis of *B. cereus* ATCC14579 during aerobic respiratory growth and anaerobic fermentative growth, we have implemented and performed a redox proteomics approach based on the differential alkylation of cysteine residues and the detection of alkylated cysteine-containing peptides by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Monitoring the reversible redox status of cysteine residues, as exponential growth progresses, highlighted the specificity and the growth phase dependence of the thiol proteome, and its dynamics in response to oxygenation conditions. Overall, identifying proteins with reactive thiols has provided predictive information on biological processes and cellular pathways that are regulated by the cellular redox status. Furthermore, we observed changes in the global redox status of the thiol proteome, leading to a high and a low reduced status at the end of exponential anaerobic and aerobic growth, respectively. This could be indicative of a high occurrence in reactive oxygen species (ROS) at the beginning of fermentative anaerobic growth and at the end of the aerobic respiratory growth. Comprehensive analysis of the aerobic proteome showed both an enrichment in antioxidant proteins and a decrease in cysteine content at the end of the growth, suggesting a proteome and thiol proteome adaptation to the increasing oxidative conditions encountered at the end of growth.

This PhD work provided the first analysis of *B. cereus* thiol proteome. The maps of the aerobic and anaerobic thiol proteomes could serve as references for further studies aiming to elucidate the cellular adaptation of *B. cereus* to environmental changes.

