

**Compréhension des mécanismes impliqués dans l'activité réductrice et dans les adaptations métaboliques à pH acide de *Bacillus cereus* : implication des thiols exofaciaux**

Julien Le Lay

► **To cite this version:**

Julien Le Lay. Compréhension des mécanismes impliqués dans l'activité réductrice et dans les adaptations métaboliques à pH acide de *Bacillus cereus* : implication des thiols exofaciaux. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2014. Français. NNT : 2015AVIG0331 . tel-01163585

**HAL Id: tel-01163585**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01163585>**

Submitted on 15 Jun 2015

**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.

Ecole doctorale :

“Agroscience et Science”

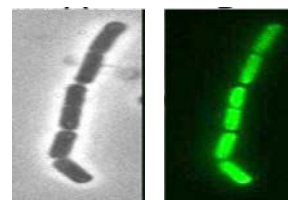
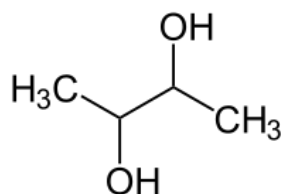
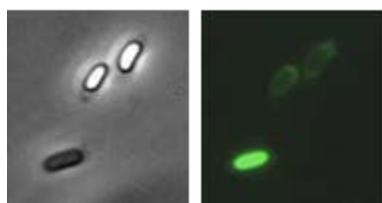
Thèse

Pour obtenir le titre de

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

Discipline : Biotechnologie et Microbiologie

**Julien Le Lay**




---

**Compréhension des mécanismes impliqués dans l'activité réductrice et dans les adaptations métaboliques à pH acide de *Bacillus cereus* : implication des thiols exofaciaux**

---

Soutenue publiquement le 9 décembre 2014 devant le jury composé de :

<b>Rapporteurs</b>	<b>M. Jean-Francois CAVIN</b>	<b>Professeur, Université de Dijon</b>
	<b>M. Hervé PREVOST</b>	<b>Professeur, Université de Nantes</b>
<b>Examineurs</b>	<b>M. Remy CACHON</b>	<b>Professeur, Université de Dijon</b>
	<b>M. Didier MAJOU</b>	<b>Directeur général de l'ACTIA</b>
	<b>Mme Catherine DUPORT</b>	<b>Professeur, Université d'Avignon</b>
	<b>M. Michel JOBIN</b>	<b>MCF, Université d'Avignon</b>
<b>Directeur de thèse</b>	<b>M. Philippe SCHMITT</b>	<b>Professeur, Université d'Avignon</b>

Thèse réalisée au sein de l'UMR A408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA PACA Avignon / Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse.



## **Un peu d'esprit**

Le succès c'est être capable d'aller d'échec en échec sans perdre son enthousiasme.

Winston Churchill

Même l'affaire la plus facile se confrontera à des imprévus qui rendront, au final, son application difficile.

Carl Von Clausewitz. Théorie de la friction

L'oreille des sages cherche la science

Auteur anonyme

## Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Jean-Francois Cavin et Hervé Prevost pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse, ainsi que Catherine Duport, Didier Majou et Remy Cachon pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie également madame Catherine Renard pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Mes remerciements vont ensuite à Monsieur Philippe Schmitt pour m'avoir soutenu et fait entièrement confiance durant cette thèse. Merci Philippe pour tes conseils, tes connaissances, ta disponibilité et pour la liberté que tu m'as accordé tout au long de ce projet.

Je remercie également Michel Jobin pour ses conseils avisés et sa gentillesse. Merci Michel de m'avoir permis de découvrir le monde de l'enseignement à l'IUT d'Avignon, j'en garde un souvenir impérissable.

Merci également à Luc Dedieux pour son regard neuf sur le projet de thèse et ses remarques judicieuses lors de la correction de ce manuscrit. Bon courage pour la suite Luc, j'espère que tes projets de recherches seront couronnés de succès.

Je tiens à chaleureusement remercier tous les acteurs du projet Food-Redox, en particulier Monsieur Remy Cachon, pour son implication et ses excellents conseils et les voyages à travers la France lors des comités ANR. Merci également à Messieurs Philippe Gaudu, Yvan Leguerinel, Hervé Prevost, Didier Majou, Eric Beuvier, Stephane Gavoye, Erwann Hamon et Mesdames Catherine Denis, Valérie Stahl, Joëlle De Coninck, Karine Le Barillec et Dominique Ibarra.

Merci également à Célia et Anne pour les prises de notes conjointes et la rédaction des comptes rendus de comité ANR. Bon courage pour la suite Célia et merci pour ta gentillesse.

Merci à tous ceux qui ont également participé directement à ce travail, Sylvie Sérino de l'unité PSH pour l'HPLC, Alain Guillot de l'unité PAPPISO pour la spectro de masse et Clément Trunet de l'unité LUBEM pour m'avoir initié à la cytométrie en flux. Merci enfin à *B. cereus* lui même pour s'être laissé (contre sa volonté) sacrifier sur l'autel de la science.

Cette thèse est également l'aboutissement de 8 ans d'étude et je tiens à remercier tout ceux qui m'ont entouré en licence et en master et qui sont maintenant aux quatre coins de la France ou du monde. Merci Thomas et Céline (Spielberg !), Thib, Yaya, Claire, Clothilde, Emilie, Julien (padre !) et à tout ceux que j'aurais pu oublier. Merci également à Sandrine Castella qui m'a fait découvrir les joies du Western blot et de la co-IP il ya quelques années à Jussieu et qui m'a donné goût à la science.

Au cours de cette thèse j'ai rencontré un grand nombre de personne au laboratoire SQPOV qui m'on chacune apporté beaucoup sur le plan intellectuel et personnel. Merci à tous les chercheurs du laboratoire SQPOV, Thierry, Frederic, Marie-Hélène, Véro, Julien, Christophe,

Alain, Caroline et à tous les chimistes. Merci également aux techniciennes, Claire (oui oui on fera un jour ce fameux bivouac !), les deux stephanie, Sabine et Bénédicte. Je tiens aussi à remercier tous les thésards croisés au cours de ces trois ans, Benoit (Petit poney !), Geremy, Sabrina, Amina, Loïc, Alyzée, Cécile, Christelle, Katerina, Refka et Oana. Merci également aux différents stagiaires rencontrés ces dernières années, Nico, Elodie, Ouria, Afsouati, Hadrien, Djidji, Guillaume, Jean-Luc, Jordane, Florian, Mickael, Christian, Adeline...

Pensée spéciale pour mes deux stagiaires de choc Halim et Kélétigui. Sans votre engagement et votre curiosité, ce travail n'aurait jamais été aussi abouti. J'espère que vous aussi vous pourrez bientôt vous mesurer à la thèse.

Merci également à Hélène pour toutes les aventures vécues à Avignon en Italie ou à la Grande Motte. Bon courage pour la suite !

Comment ne pas parler de petit Jean-Paul. Merci Mad pour ton amitié, les fous rire, l'initiation à la musculation (oui il y a encore du boulot !), et nos débats éclectiques. Courage pour la fin de ta thèse, en Septembre prochain c'est ton tour !

Il me faudrait bien plus que la taille de cette thèse pour avoir la place d'écrire tous les remerciements que j'adresse à Sara. Merci pour avoir été là tout au long de cette thèse. Merci pour tes encouragements, ton soutien, ton humour et surtout pour tout l'amour que tu m'as donné tout au long de ces trois années. Ton rire résonnera pour toujours dans les couloirs de SQPOV et tintera à jamais dans mon coeur. Black pearl tu as su me remonter le moral quand rien ne marchais, tu m'as tiré vers le haut quand rien n'allais. Ton beau sourire a illuminé ces longues journées, ton caractère bien trempé m'a remotivé. Ensemble on a traversé les Pays-bas (sans batterie et sans carte !), l'Allemagne, l'Italie, l'Espagne, la Belgique, la Côte d'Ivoire. Côte à Côte on a gravi le ventoux, fait du ski de fond à Briançon, roulé en vélo à deux sur un seul vélo à Wageningen, fait du cheval sous l'équateur, déménagé en bus, passé notre code de la route et cartonné à Food-Micro. La vie à tes côtés est une merveilleuse aventure, une joie et un bonheur renouvelé chaque jour. Tu es le soleil de ma vie, un ciel sans nuage ou jamais la nuit ne tombe, une étoile incandescente qui illumine mon univers, ma Khaleesi, ma princesse, mon amour. Je t'aime.

Enfin merci à ma famille. Merci à mes parents, Maman, Gégé, Papa et Catherine, et mes grands parents pour tous vos encouragements, pour m'avoir soutenu tout au long de mes études et avoir toujours cru en moi. Merci tout particulièrement à mes soeurs, Emilie, Caroline, Victoria et à mes frères Nicolas et Vincent pour la super famille que nous formons.



# Sommaire

.....	1
Liste des figures.....	1
Liste des tableaux.....	3
Liste des abréviations.....	4
<b>CONTEXTE DE L'ETUDE ET OBJECTIFS.....</b>	<b>5</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>9</b>
<b>1 : BACILLUS CEREUS.....</b>	<b>11</b>
1.1: Généralités.....	11
1.2: Phylogénie du groupe <i>Bacillus cereus sensu lato</i> .....	12
1.3: Cycle de vie.....	14
1.4: Présence dans l'aliment.....	15
1.5: Pouvoir pathogène.....	15
1.6: Toxines de <i>B. cereus</i> .....	16
1.6.a: La toxine émétique .....	16
1.6.b: Les toxines diarrhéiques.....	17
1.7: Adaptations de <i>B. cereus</i> au tube digestif humain .....	17
<b>2: ADAPTATIONS AU PH ACIDE.....</b>	<b>19</b>
2.1: Le stress acide .....	19
2.2: La réponse générale aux stress .....	20
2.2.a: Les facteurs $\sigma$ .....	20
2.2.b: La régulation de $\sigma^B$ .....	22
2.2.c: Le régulon $\sigma^B$ .....	23
2.3: Systèmes de réparations .....	25
2.3.a: Systèmes de réparation de l'ADN.....	25
2.3.b: Protéines chaperonnes et protéolyse.....	25
2.4: Homéostasie du pH interne .....	27
2.4.a: Les $F_1F_0$ ATP synthases.....	27
2.4.b: Autres transporteurs .....	29
2.4.c: Systèmes de décarboxylations.....	29
2.5: Production de molécules alcalines .....	32
2.5.a: Arginine déïminases .....	32
2.5.b: Agmatine déïminase.....	33
2.5.c: Uréases .....	34



2.6: Modifications membranaires.....	35
2.7: Adaptations métaboliques .....	37
2.7.a: Respiration aérobie.....	38
II.7.b: Respiration anaérobie .....	39
2.7.c: Fermentation des acides mixtes.....	40
2.7.d: Métabolisme et stress acide.....	40
2.8: La fermentation butanediolique.....	41
2.8.a : Généralités.....	41
2.8.b: Origine des différents isomères du 2,3 BD .....	44
2.9 La réponse de tolérance à l'acide (ATR).....	45
<b>3 ADAPTATIONS AUX VARIATIONS DE POTENTIEL D'OXYDO-REDUCTION (<math>E_h</math>).....</b>	<b>47</b>
3.1 Le potentiel d'oxydo-réduction .....	47
3.2 Exemples de $E_h$ dans quelques aliments et environnements.....	47
3.3 Variations de $E_h$ dans les milieux biologiques .....	48
3.4 Adaptations des bactéries aux variations de $E_h$ .....	49
3.5 l'activité réductrice des bactéries.....	51
3.6 Les groupements thiols.....	52
3.7 Les domaines thiorédoxines .....	53
3.8. Les Thiols disulfide oxydo-réductases (TDORs) chez les bactéries à coloration de Gram positive. ....	55
3.8.a Le système BdbD / BdbC .....	55
3.8.b ResA.....	57
3.8.c CcdA.....	58
3.8.d Schéma récapitulatif.....	60
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>61</b>
1 Souches et milieux de culture utilisés.....	63
2 Précultures .....	63
3 Croissance en batch régulés et non régulés .....	63
4 Mesure du $E_h$ .....	64
5 Chocs acides et thermiques .....	64
6 Détermination de la concentration en métabolites .....	65
7 Calcul de l'activité enzymatique de l'acétoïne réductase.....	65
8 Dosage des thiols exofaciaux .....	66
9 Filtration et expériences utilisant les bloquants des thiols .....	66

10 Marquage fluorescent des thiols exofaciaux à la surface des cellules bactériennes.....	67
11 Extraction des protéines membranaires.....	67
12 Analyse par spectrométrie de masse.....	67
13 analyses <i>In silico</i> .....	69
14 Obtention de spores en culture bi-phasiques .....	69
15 Cytométrie en flux.....	69
<b>RESULTATS</b> .....	<b>71</b>
<b>CHAPITRE 1 : INFLUENCE DU E<sub>h</sub> ET DU PH SUR L'ACTIVITE REDUCTRICE, LE METABOLISME DU GLUCOSE ET L'ATR DE BACILLUS CEREUS</b> .....	<b>71</b>
1 Objectif de l'étude :.....	73
2 Stratégie d'étude :.....	74
3 Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of <i>Bacillus cereus</i> grown at various pH and oxydo-reduction potential levels.....	75
4 Présentation synthétique des résultats et conclusions de l'étude :.....	98
5 Fermentation butanediolique et stéréoisomères de 2,3 BD produits en milieux chimiquement définis:.....	99
5.1 Dosage du 2,3 BD produit en milieu synthétique AOAC par <i>B. cereus</i> ATCC14579.....	99
5.2 Stéréo-isomérisation du 2,3 BD produit par <i>B. cereus</i> .....	100
5.3 Dosage de l'activité acétoïne réductase.....	101
<b>CHAPITRE 2 : IMPLICATIONS DES THIOLS EXOFACIAUX DANS L'ACTIVITE REDUCTRICE DE B. CEREUS</b> .....	<b>103</b>
1 Objectif de l'étude.....	105
2 Implication of exofacial thiols groups in the reducing activity of <i>Bacillus cereus</i> .....	106
3 Conclusion principales et discussion de l'étude.....	127
<b>CHAPITRE 3 : SEPARATION DES SPORES GERMEES ET NON GERMEES DE B. CEREUS PAR CYTOMETRIE EN FLUX</b> .....	<b>129</b>
1 Introduction à l'article.....	131
2 A non destructive method to separate germinated and non germinated spores of <i>Bacillus cereus</i> using flow cytometry.....	132
3 Principaux résultats de l'étude.....	144
<b>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>147</b>
1 Discussion générale et perspectives .....	149
1.1 Impact du E <sub>h</sub> sur l'ATR et sur l'adaptation croisée et les paramètres de croissance de <i>B. cereus</i> . .....	149
1.2 Adaptations métaboliques de <i>B. cereus</i> à pH 5.5. ....	150
1.3 Régulation de la voie du 2,3 BD .....	151

1.4 Rôles supposés de la voie du 2,3 BD .....	152
1.4.a Rôle dans l'homéostasie du pH .....	152
1.4.b Rôle dans l'homéostasie du $E_h$ .....	153
1.4.c Rôle dans le stockage d'énergie .....	153
1.4.d Rôle dans les interactions Plante/Microorganismes du sol.....	154
1.5 Implication des thiols exofaciaux dans l'activité réductrice de <i>B. cereus</i> .....	155
1.6 Les protéines impliquées dans l'activité réductrice de <i>B.cereus</i> .....	156
1.7 Détection des thiols exofaciaux à la surface des spores de <i>B. cereus</i> .....	159
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	161
<b>VALORISATION DE LA THESE</b> .....	181

## Liste des figures

### Chapitre I

<b>Figure 1 :</b> Représentation des cycles de vie de différentes espèces du groupe <i>B. cereus sensu lato</i> .....	14
<b>Figure 2 :</b> Présentation de la structure de la toxine céréulide.....	16
<b>Figure 3 :</b> Gradient de pH entre les différentes couches de la muqueuse gastrique humaine et du lumen stomacal.....	18
<b>Figure 4 :</b> Les différentes sous unités $\alpha$ , $\beta$ , $\beta'$ et $\sigma$ d'une ARN polymérase de <i>Bacillus subtilis</i> .....	21
<b>Figure 5 :</b> Modèle simplifié de l'activation de $\sigma^B$ chez <i>B. cereus</i> suite à un stress.....	23
<b>Figure 6 :</b> Représentation schématique du protéasome d' <i>E. coli</i> .....	26
<b>Figure 7 :</b> Structure d'une $F_1F_0$ ATP synthase bactérienne.....	28
<b>Figure 8 :</b> Système de type glutamate décarboxylase d' <i>E. coli</i> .....	30
<b>Figure 9 :</b> Fonctionnement de trois systèmes de décarboxylation dans une cellule bactérienne.....	32
<b>Figure 10 :</b> Voie de l'arginine déiminase chez <i>Lactobacillus sakei</i> .....	33
<b>Figure 11 :</b> Voie de l'agmatine déiminase chez <i>Lb. sakei</i> .....	34
<b>Figure 12 :</b> Conformations possibles des acides gras dans les membranes bactériennes..	36
<b>Figure 13 :</b> Voies respiratoires et fermentaires de <i>B. cereus</i> .....	39
<b>Figure 14 :</b> Etapes de la voie directe de la fermentation butanediolique.....	42
<b>Figure 15 :</b> Cycle du 2,3-butanediol.....	43
<b>Figure 16 :</b> Représentation selon les règles CIP des trois stéréo-isomères du 2,3-butanediol. .....	44
<b>Figure 17 :</b> Voies de formation des différents stéréo-isomères du 2,3-butanediol.....	45
<b>Figure 18 :</b> Survie à un choc acide à pH 4 de cellules de <i>B. cereus</i> ATCC14579.....	46
<b>Figure 19 :</b> Mode de fonctionnement du système à deux composants ResDE.....	50
<b>Figure 20 :</b> Mode de fonctionnement du système OhrR.....	51
<b>Figure 21 :</b> Réaction d'échange thiol-disulfure entre deux protéines.....	53
<b>Figure 22 :</b> Fonctionnement du système BdbC/BdbD chez <i>B. subtilis</i> en anaérobiose....	56

<b>Figure 23</b> : Fonctionnement du système ResA chez <i>B. subtilis</i> .....	58
<b>Figure 24</b> : Schéma récapitulatif.....	60

### *Chapitre III*

<b>Figure 25</b> : Dosage par HPLC du 2,3-butanediol présent dans des surnageants de culture de <i>B. cereus</i> .....	101
--	-----

### *Chapitre V*

<b>Figure 26</b> : Dégradation du 2,3-butanediol.....	154
<b>Figure 27</b> : Microenvironnement réducteur autours de la cellule bactérienne.....	156

## Liste des tableaux

### *Chapitre I*

<b>Tableau 1 :</b> Structure phylogénétique du groupe <i>B. cereus</i> .....	13
<b>Tableau 2 :</b> Présence de <i>B. cereus</i> dans certains aliments.....	15
<b>Tableau 3 :</b> Gènes membres du régulon $\sigma$ B chez <i>B.cereus</i> ATCC14579.....	24
<b>Tableau 4 :</b> Isomères de 2,3-butanediol produits par différentes bactéries à partir d'un substrat de type glucose.....	44
<b>Tableau 5 :</b> Valeurs d'E <sub>h</sub> dans différents aliments.....	48
<b>Tableau 6 :</b> E <sub>h</sub> initial et final obtenus après croissance de quelques bactéries classées selon leur type respiratoire.....	52
<b>Tableau 7 :</b> Classification des protéines portant des domaines thiorédoxines en 10 familles .....	57

### *Chapitre III*

<b>Tableau 8 :</b> Dosage par HPLC du 2,3-butanediol et de l'acétoïne produit par <i>B. cereus</i> ATCC14579.....	100
<b>Tableau 9 :</b> Mesure de l'activité acétoïne réductase de <i>B. cereus</i> ATCC14579.....	102

## Liste des abréviations

**2,3-BD** : 2,3-butanediol.

**ADN** : Acide désoxyribonucléique.

**ADP** : Adénosine diphosphate.

**AMdiS** : 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, disodium salt.

**ANR** : Agence Nationale de la Recherche.

**AOAC** : Milieu de culture synthétique AOAC (pour Association of Official Analytical Chemists).

**AR** : Acétoïne réductase.

**ARN** : Acide ribonucléique.

**ATCC** : American type culture collection.

**ATP** : Adénosine-5'-triphosphate.

**ATR** : Acid Tolerance Response (Réponse de tolérance à l'acide)

**BDH** : 2,3-butanediol déshydrogénase

**CIP** : nomenclature Cahn-Ingold-Prelog

**DO** : Densité optique.

**DTNB** : 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).

**DTT** : Dithiothréitol.

**E<sub>h7</sub>** : Potentiel d'oxydo-réduction rapport à pH 7.

**E<sub>h</sub>** : Potentiel d'oxydo-réduction.

**H<sup>+</sup>** : Ion hydrogène.

**HPLC** : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

**InVS** : Institut de Veille Sanitaire.

**JB** : Milieu de culture J-Broth.

**LB** : Milieu de culture Luria-Bertani.

**MOD** : Milieu de culture chimiquement défini modifié.

**μMax** : Vitesse spécifique maximale.

**NADH / NAD<sup>+</sup>** : Nicotinamide adénine dinucléotide.

**NEM** : N-ethylmaleimide.

**OG** : Oregon Green 488 maléimide.

**PH** : Potentiel hydrogène.

**PMSF** : Phenylmethylsulfonyl fluoride.

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

**TDORs** : Thiol disulfide oxydo-réductase.

**TIAC** : Toxi infection alimentaires collectives

## **CONTEXTE DE L'ETUDE ET OBJECTIFS**

En 2012, le New England Journal of Medicine publiait, au sein d'un numéro spécial 200<sup>ème</sup> anniversaire, un tableau comparant les principales causes de mortalité en 1812 et en 2012 à Boston. Il est flagrant de constater qu'au début du XIX<sup>ème</sup> siècle une large part des décès était due aux fièvres, en particulier typhoïde, mais également aux infections pulmonaires telles que la tuberculose (25% du total des décès juste pour cette dernière). La naissance de la microbiologie en 1865, les premières vaccinations en 1885 et la découverte des antibiotiques en 1928 ont bouleversé notre compréhension des pathologies infectieuses. De nos jours, dans les pays occidentaux, les décès attribués aux maladies microbiennes arrivent loin derrière les cancers, les maladies cardio-vasculaires ou les diabètes, reflets éclatants des progrès que la médecine et la microbiologie ont accomplis en 200 ans. Cependant, comme le rappelle l'OMS, les maladies infectieuses sont toujours les premières causes de mortalité dans les pays les plus pauvres du globe. L'explication est multi factorielle mais se résume dans la majorité des cas par une simple phrase : si la médecine a progressé, encore faut il y avoir accès (Jones *et al.*, 2012, Hanna *et al.*, 2001).

Parmi les maladies infectieuses, les infections bactériennes d'origine alimentaires sont particulièrement étudiées depuis une quarantaine d'années du fait de leur recrudescence comme de leur coût social et économique élevé. En 2012, en France, 1288 foyers de toxi-infections alimentaires collectives ont été déclarés, affectant 10 258 personnes et conduisant à 6 décès (InVS, 2012). Ces chiffres sont en constante augmentation depuis la fin des années 1980. En parallèle, il y a depuis plusieurs années une demande du consommateur pour des produits les moins transformés possibles. Les traitements thermiques ou d'acidification des aliments sont particulièrement visés alors qu'ils représentent la majorité des procédés de stérilisation alimentaires.

Ceci oblige les industriels et les professionnels de la sécurité alimentaire à une constante recherche de méthodes innovantes pour contrôler le développement des micro-organismes dans l'aliment tout en préservant les qualités nutritionnelles et organoleptiques du produit. Parmi ces nouvelles méthodes figurent l'utilisation de la lumière pulsée (Chaine *et al.*, 2012) ou encore le contrôle du potentiel d'oxydo-réduction.



Le potentiel d'oxydo-réduction ou  $E_h$  est une variable physico chimique bien étudiée en science de l'alimentation qui impacte les qualités physico-chimiques et sensorielles d'un grand nombre d'aliments tels que le lait (Bolduc *et al.*, 2006), le jus d'orange (Alwazeer *et al.*, 2003) ou encore les fromages (Ledon H, 2006). Mais l' $E_h$  n'est pas pris en compte par les principaux outils de modélisation du risque microbiologique en industrie agro-alimentaire et est rarement étudié en physiologie des microorganismes alimentaires. Les quelques études menées montrent pourtant que les variations d' $E_h$  impactent, entre autre, le métabolisme des acides gras, le métabolisme du glucose, l'expression de nombreux gènes, augmente la production de toxines chez certaines bactéries (Feron *et al.*, 2007, Zigha *et al.*, 2006) et entraîne la modification de leur structure cellulaire (Pham *et al.*, 2008).

L'ensemble de ces données permet de supposer que le potentiel d'oxydo-réduction pourrait être une nouvelle barrière physico-chimique, en combinaison avec d'autres facteurs, permettant de contrôler le développement des microorganismes alimentaires. C'est le postulat initial du projet **ANR Food-Redox** dont le but est d'obtenir des données sur : (i) les adaptations physiologiques de trois microorganismes modèles (*Listeria monocytogenes*, *Lactococcus lactis* et *Bacillus cereus*) aux variations de  $E_h$  combiné à d'autres stress (ii) l'impact du  $E_h$  sur la reprise de croissance de microorganismes pathogènes (iii) la mesure fiable du  $E_h$  et son évolution au cours des procédés de fabrication dans des produits de consommation courante (fromages, mayonnaise, chair à saucisse, desserts lactés) (iiii) l'amélioration des modèles de prévision du risque microbiologique dans l'aliment par ajout du facteur  $E_h$  dans les calculs effectués.

Les modèles bactériens étudiés au cours du projet ANR Food-Redox sont *Lactococcus Lactis*, une bactérie d'intérêt biotechnologique, *Listeria monocytogenes*, et *Bacillus cereus* deux bactérie pathogènes des aliments.

*B. cereus* est étudié depuis plusieurs années au laboratoire SQPOV de l'INRA d'Avignon. Cette bactérie à coloration de Gram positive est la deuxième cause de toxi-infection alimentaire en France en 2012 (InVS, 2012). Sa prévalence dans les aliments à base de végétaux (Mortimer and McCann, 1974) est conférée par des structures de résistances appelées spores. Ce microorganisme est également capable de s'adapter à des variations de  $E_h$  telles que celles rencontrées lors du passage de l'estomac humain ( $E_h$  oxydant) vers l'intestin ( $E_h$  réducteur) (Moriarty-Craige and Jones, 2004, Rosenfeld *et al.*, 2005) et à des changement de pH comme ceux observés lors de son passage dans l'estomac de son hôte ou lors des

procédés de transformation alimentaire (Clavel *et al.*, 2004, Derossi *et al.*, 2011). Ces deux derniers points font de *B. cereus* une bactérie d'intérêt pour le projet ANR Food-Redox.

Les adaptations de *B. cereus* exposé au stress acide ont fait l'objet de nombreuses études. Ces adaptations comprennent des mécanismes de la réponse générale aux stress (facteurs  $\sigma$ ) et de l'homéostasie du pH interne. Ces adaptations conduisent à l'observation d'une réponse de tolérance à l'acide où des cellules pré-adaptées par des pH acides non létaux ont une meilleure survie que des cellules non pré-adaptées lors d'un choc acide léthal.

Les adaptations de *B. cereus* aux variations d' $E_h$  ont également fait l'objet d'études dont les conclusions sont été décrites dans cette thèse. Peuvent être citée des variations dans la production de toxines et des adaptations métaboliques médiées par différents systèmes moléculaires comme ResDE ou FNR.

Néanmoins, les effets du stress acide et des variations d' $E_h$  appliqués simultanément n'ont jamais été étudiés. **Le premier objectif de cette thèse** est donc de comprendre comment vont évoluer les mécanismes d'adaptations au pH acide de *B. cereus*, en particulier la réponse de tolérance à l'acide et les adaptations métaboliques, sous différents niveaux de  $E_h$ . De même l'impact de différents niveaux de pH et d' $E_h$  sur les paramètres de croissance de *B. cereus* sera étudié en utilisant des bioréacteurs régulés ou non régulés.

En plus de s'adapter aux variations de  $E_h$  *B. cereus* est également capable d'interagir avec le  $E_h$  de son milieu de culture et d'en modifier la valeur depuis des niveaux oxydants vers des valeurs réductrices. L'origine moléculaire de ce phénomène n'a jamais été étudiée chez *B. cereus*. En conséquence, **le second objectif de ce travail** sera de déterminer si les groupements thiols exofaciaux sont impliqués dans l'activité réductrice de *B. cereus*. Pour ce faire, les données obtenues sur l'origine moléculaire de l'activité réductrice de *L. lactis* serviront de base pour les travaux chez *B. cereus*, tel que cela a été définie dans les lignes directrices du projet ANR Food-redox.



# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



## **1 : BACILLUS CEREUS**

### **1.1: Généralités**

*Bacillus cereus* est une bactérie pathogène à coloration de Gram positive, de métabolisme aéro-anaérobie facultatif et capable de produire des spores dans des conditions défavorables de croissance. C'est un micro-organisme mobile, en forme de bâtonnet de grande taille (>1.0 µm), parfois en chaînette et aux colonies à l'aspect cireux et opaque sur milieux gélosés. C'est également une bactérie ubiquitaire retrouvée, principalement sous forme de spores, dans un grand nombre d'environnements tels que le sol (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008), la surface des végétaux (Kouamé *et al.*, 2013) ou encore l'air ambiant (Lues *et al.*, 2007).

*B. cereus* fut isolé pour la première fois en 1887 par Frankland, G.C. et Frankland, P.F. dans l'air d'une étable au Royaume-Uni. La souche alors isolée appelée ATCC14579 est considérée comme une des souches types du groupe *B. cereus* et est utilisée comme souche modèle par de nombreux laboratoires. Le caractère pathogène de cette bactérie fut décrit pour la première fois en 1937 après la mort de cochons d'Inde auxquels des suspensions de *B. cereus* avaient été injectées (Clark, 1937). C'est en 1950 qu'une étude mit en lien une Toxi Infection Alimentaire Collective (TIAC) et la présence de *B. cereus* dans une crème à la vanille (Hauge, 1950). Les toxines responsables des symptômes diarrhéiques et émétiques des infections à *B. cereus* furent respectivement décrites pour la première fois en 1990 et 1995 (Beecher and MacMillan, 1990, Agata *et al.*, 1995).

En 2012, un rapport de l'Institut National de Veille Sanitaire (InVS) indique que *B. cereus* est la deuxième cause de TIAC en France juste derrière *Staphylococcus aureus* et devant le genre *Salmonella* (InVS, 2012). Néanmoins, l'incidence réelle de *B. cereus* en tant que pathogène alimentaire reste difficile à évaluer pour plusieurs raisons. Premièrement les toxi-infections à *B. cereus* ne sont pas à déclaration obligatoire et sont donc probablement sous estimées dans les décomptes officiels. Deuxièmement la courte durée et la bénignité des symptômes des infections à *B. cereus* encouragent rarement le malade à consulter un médecin. Enfin les symptômes des infections à *B. cereus* sont régulièrement associés à tort à des toxi-infections à *S. aureus* ou à *Clostridium perfringens*.

## 1.2: Phylogénie du groupe *Bacillus cereus sensu lato*

*B. cereus*, aussi dénommé *B. cereus sensu stricto*, fait partie du groupe *B. cereus sensu lato*. Ce groupe comprend 7 espèces génétiquement proches et différenciées principalement par des caractères phénotypiques tels que des différences physiologiques, morphologiques ou de virulence. Ces 7 espèces sont :

-*Bacillus anthracis*, non hémolytique et responsable de la maladie du charbon.

-*Bacillus thuringiensis*, caractérisés par la production d'un cristal parasporal létal pour les insectes.

-*Bacillus mycoïdes* et *Bacillus pseudomycoïdes* capables de former des rhizoïdes sur milieux gélosés.

-*Bacillus weihenstephanensis*, une espèce psychrotolérante capable de croître à des températures minimales comprises entre 4 et 7°C.

-*Bacillus cytotoxicus*, une nouvelle espèce récemment décrite (Guinebretière *et al.*, 2012).

-*Bacillus cereus sensu stricto*, hémolytique.

Désormais dans la suite de ce manuscrit, l'appellation *B. cereus* se rapportera toujours à *B. cereus sensu stricto*. Dans le cas contraire, le nom *B. cereus sensu lato* sera indiquée.

Récemment, des études phylogénétiques basées sur la gamme de température de croissance des différentes souches et espèces du groupe *B. cereus sensu lato* ont mis en évidence l'existence de sept sous-groupes caractérisés par différents thermotypes (Guinebretière *et al.*, 2008). Les différents groupes sont présentés dans le Tableau 1. Les groupes I, II, IV et V rassemblent des souches dont les gammes de températures de croissance sont respectivement comprises entre 10 et 43°C, 7 et 40°C, 10 et 45°C et 8 et 40°C. Ces groupes sont intermédiaires. Le groupe VI est plus psychrotrophe avec une gamme de température de croissance comprise entre 7 et 37°C. Les groupes III et VII sont les plus thermophiles avec des gammes de température de croissance comprise respectivement entre 15 et 45°C et 20 et 50°C.

Différentes espèces du groupe *B. cereus sensu lato* peuvent être retrouvées dans plusieurs groupes phylogénétiques. Ainsi *B. weihenstephanensis* et *B. mycoïdes* correspondent au

groupe VI. *B. pseudomycoïdes* est retrouvé dans le groupe I. *B. anthracis* se retrouve uniquement dans le groupe III tandis que *B. cytotoxicus* correspond au groupe VII. *B. cereus sensu stricto* se retrouve à la fois dans les groupes II, III, IV et V tandis que *B. thuringiensis* est observé dans les groupes II, III, IV, V et VI.

Dernièrement il a été constaté que la séquence du gène de ménage *panC* permet d'affecter précisément une souche de *B. cereus sensu lato* à son groupe phylogénétique (Guinebretiere *et al.*, 2010).

TABLEAU 1 : Structure phylogénétique du groupe *B. cereus* présentant les 7 groupes phylogénétiques du groupe *B. cereus sensu lato* et leurs principales caractéristiques. D'après (Guinebretiere *et al.*, 2010).

Phylogenetic group	A				No. of tested strains
	Species	subgroup	Other designation	Range of growth T°C	
I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	BC10	I-1	10-43	17
		BC13	I-2		7
II	<i>B. cereus</i> II, <i>B. thuringiensis</i> II	BC06	II	7-40	31
III	<i>B. cereus</i> III <i>B. thuringiensis</i> III,	BC12	III-1	15-45	15
		BC05	III-2		26
	BC09	III-3	14		
	<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> III-4, <i>B. thuringiensis</i> III-4	BC08	III-4		28
IV	<i>B. cereus</i> IV, <i>B. thuringiensis</i> IV	BC04	IV-1	10-45	34
		BC03	IV-2		32
		BC07	IV-3		29
V	<i>B. cereus</i> V, <i>B. thuringiensis</i> V	BC11	V	8-40	17
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycoïdes</i> , <i>B. thuringiensis</i> VI	BC01	VI-1	5-37	93
		BC02	VI-2		43
VII	<i>B. cytotoxicus</i> (sp. nov.)	BC14	VII	20-50	5



### 1.3: Cycle de vie

L'écologie de *B. cereus* dans le sol est loin d'être intégralement connue. Plusieurs travaux accréditent un modèle où *B. cereus sensu lato* serait contenu dans le sol sous forme de spores (où jusqu'à 10 000 spores de *B. cereus* ont été dénombrées par gramme de sol (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003)) avant de germer et de croître sous forme de cellules végétatives en interaction symbiotique dans un hôte invertébré ou en tant que pathogène chez un invertébré ou un vertébré (Margulis *et al.*, 1998). Il a également été prouvé que *B. cereus* pouvait avoir un mode de vie saprophyte en se développant sous formes de cellules végétatives dans le sol. Dans cet environnement, *B. cereus* interagit avec les microorganismes présents dans la rhizosphère des végétaux (Silo-Suh *et al.*, 1994) (FIGURE 1). Sa présence diminue la prévalence de maladies végétales causées par certains oomycètes et certains champignons, probablement par sécrétion de deux antibiotiques : la zwittermycine A et la Kanosamine (Jensen *et al.*, 2003). Des interactions de type commensalisme ont même été découvertes entre *B. cereus* et des bactéries à coloration de Gram négative membres du groupe Cytophaga-Flavobacterium. Dans cet exemple, le peptidoglycane de *B. cereus* est utilisé comme source de carbone par les Cytophaga sans que cela soit délétère pour la croissance de *B. cereus*. Ce fait illustre l'importance des relations de commensalismes entre les microorganismes du sol (Peterson *et al.*, 2006).

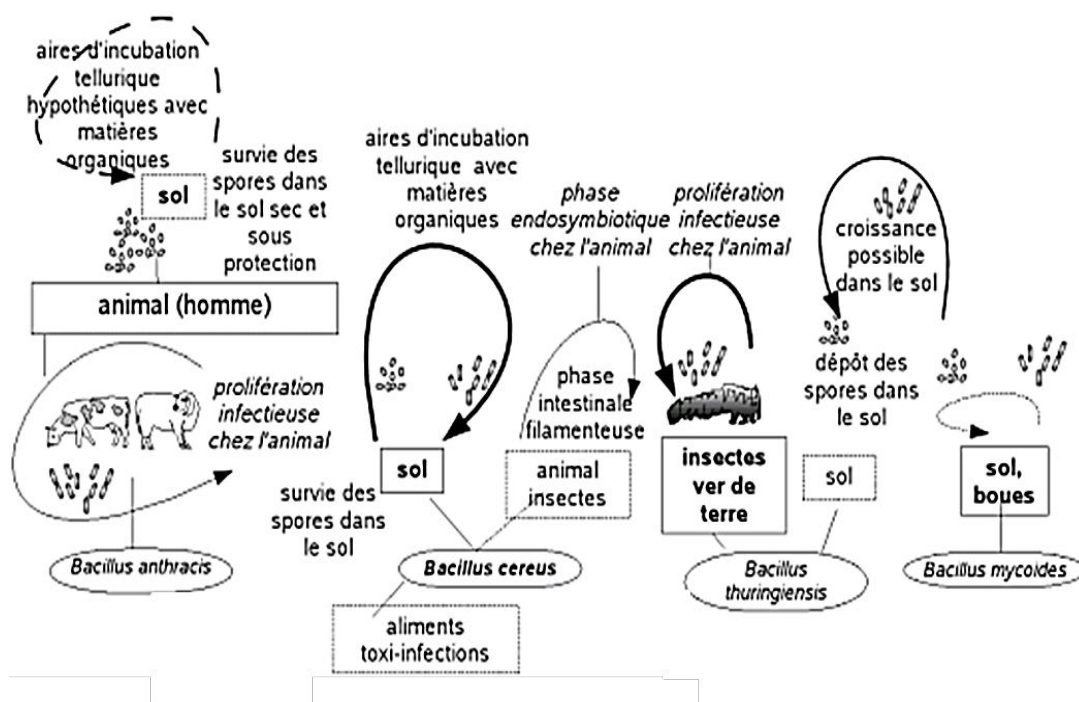


FIGURE 1 : Représentation des cycles de vie de différentes espèces du groupe *B. cereus sensu lato*. D'après (Dromigny, 2008).

#### 1.4: Présence dans l'aliment

Du fait de son caractère ubiquitaire et de sa capacité à sporuler, *B. cereus* est présent dans un grand nombre d'environnements et en particulier les sols. En conséquence de nombreuses matières premières agricoles ou provenant du sol peuvent être potentiellement contaminées par cette bactérie sous sa forme végétative ou sa forme sporulée. Des études décrivent la présence de *B. cereus* dans une large gamme d'aliments d'origine non animales et peu transformés allant des graines fermentées jusqu'aux morceaux de poulet (TABLEAU 2).

Aliment	%age d'échantillons contaminés par <i>B. cereus</i>	Source
Graines fermentées	39%	Agbobatinkpo <i>et al.</i> , 2013
Semoule de manioc	jusqu'à 36 %	Kouamé <i>et al.</i> , 2013
Riz	58%	Mortimer and McCann, 1974, Kim <i>et al.</i> , 2014
Poivre frais	100%	Valero <i>et al.</i> , 2002
Pomme de terre déshydraté	71%	Sagong <i>et al.</i> , 2013, Contzen <i>et al.</i> , 2014
Lait pasteurisé / UHT / en poudre	25%	Reis <i>et al.</i> , 2014
Poulet	45%	Smith <i>et al.</i> , 2004

TABLEAU 2 : Présence de *B. cereus* dans certains aliments.

#### 1.5: Pouvoir pathogène

D'après les données de l'INVS pour l'année 2012, *B. cereus* était confirmé ou suspecté comme responsable de 21 % des foyers de TIAC en France pour un total de 20 foyers confirmés (349 cas) et 198 foyers suspectés (1673 cas). Ces infections ont occasionné 3 décès (InVS, 2012). Les symptômes résultants d'une infection à *B. cereus* peuvent être de type émétiques, caractérisée par des nausées et vomissements, ou de type diarrhéiques. Les symptômes émétiques résultent de l'ingestion de la céréulide, une toxine thermostable produite par les cellules végétatives de *B. cereus* lors de sa croissance sur l'aliment avant ou après traitement thermique. Les aliments amylacés (pâtes, riz...) sont des matrices alimentaires favorables au développement de *B. cereus* qui ont été régulièrement associées à des syndromes émétiques (données *B. cereus* ANSES). Le syndrome diarrhéique fait suite à l'ingestion d'environ  $10^5$  à  $10^8$  UFC par gramme d'aliment et est causé par la production, dans l'intestin, d'un ensemble de toxines lors de la reprise de croissance de cellules végétatives ou de spores de *B. cereus* ayant survécu au passage de l'estomac. Trois toxines

diarrhéiques sont aujourd’hui connues : l’hémolysine BL (HBL), l’entérotoxine non hémolytique (NHE) et la cytotoxine K (CytK). Les symptômes liés à une infection à *B. cereus* durent en général moins d’une journée et sont la plupart du temps bénins. Néanmoins dans certains cas des complications sévères peuvent survenir comme des insuffisances hépatiques (Mahler *et al.*, 1997) ou encore des septicémies (Tatara *et al.*, 2013). Indépendamment d’une contamination par l’aliment, certaines infections locales ou systémiques à *B. cereus* peuvent survenir *via* un corps étranger exogène comme une branche d’arbre, des cathéters ou encore d’autres dispositifs médicaux. Ces infections (méningites, fasciites nécrosantes, atteintes pulmonaires...) qui surviennent la plupart du temps chez des patients immunodéprimés et/ou atteints d’autres pathologies (cancer, naissance prématurée...) peuvent être gravissimes (Rosenbaum *et al.*, 2013) (Stevens *et al.*, 2012) (Turabelidze *et al.*, 2013) (Hansford *et al.*, 2014).

## 1.6: Toxines de *B. cereus*

### 1.6.a: La toxine émétique

La toxine responsable du syndrome émétique est la céréulide. Cette toxine est un cyclo-dodecadepsipeptide cyclique composé d’une triple alternance de 12 acides aminés et esters de formule suivante : [D-Ala-D-O-Leu-L-Val-L-O-Val]\*3. Sa structure est présentée Figure 2.

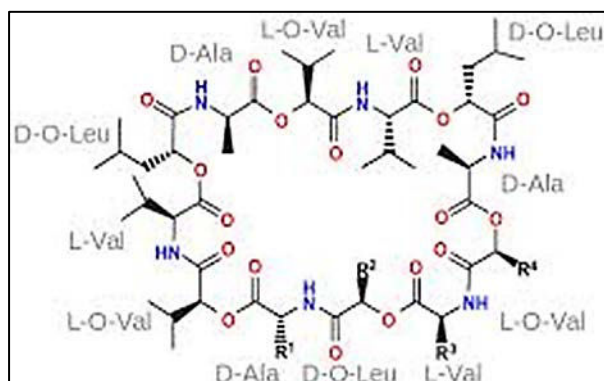


FIGURE 2 : Présentation de la structure de la toxine céréulide.

La céréulide est une molécule extrêmement stable capable de résister à des pH compris entre 2 et 11, à 30 minutes de chauffage à 121°C et aux enzymes protéolytiques comme la pepsine et la trypsine (Agata *et al.*, 1995, Shinagawa *et al.*, 1996). Bien que le mécanisme conduisant à la nausée chez l’homme ne soit pas connu, des résultats obtenus chez la souris montrent que cette toxine se fixe au récepteur 5-HT<sub>3</sub> des terminaison vagales du tube digestif ce qui

entraîne une stimulation du nerf vague afférent et provoque les vomissements (Agata *et al.*, 1995)

#### 1.6.b: Les toxines diarrhéiques

L'hémolysine BL (Hbl) est la première des trois entérotoxines décrite chez *B. cereus*. C'est une protéine composée de trois sous unités (composants lytiques L2 et L1 ainsi que la protéine de liaison B) et capable de former des pores transmembranaires dans des cellules d'épithélium intestinal de lapin (Beecher and MacMillan, 1990).

L'entérotoxine non hémolytique (Nhe) se présente sous la forme d'un complexe protéique comprenant les protéines NheA, NheB et NheC. Ce complexe protéique est capable de former des pores dans la membrane plasmique des cellules épithéliales, ce qui entraîne une perturbation de l'intégrité des membranes et donc une lyse cellulaire (Fagerlund *et al.*, 2008). Des similarités entre les composants de Nhe et Hbl suggèrent une origine commune entre les gènes *hbl* et *nhe*.

La cytotoxine K (CytK) est une protéine à structure en tonneau  $\beta$  de 34 kDa également capable de former des pores dans les membranes des cellules épithéliales. Cette protéine est nécrotique, hémolytique et cytotoxique pour l'épithélium intestinal (Hardy *et al.*, 2001).

#### 1.7: Adaptations de *B. cereus* au tube digestif humain

*B. cereus* peut rencontrer au cours de sa croissance dans l'aliment, ou lors son cycle infectieux, des conditions de croissance défavorables comme des basses ou hautes températures, des variations de concentration en oxygène ou encore des baisses de pH. Ce dernier cas est observé lors du passage dans l'estomac, où *B. cereus* va être confronté au pH acide de ce milieu. Le pH du lumen intestinal varie de 1.5 à jeun jusqu'à 5 lors de la digestion (Lopes *et al.*, 2014), néanmoins un gradient de pH est observé entre l'environnement adjacent à l'épithélium gastrique (pH 7), la couche de mucus gastrique dont le pH est compris entre 4 et 6 et le lumen qui est plus acide (Allen and Flemstrom, 2005) (FIGURE 3). En se développant dans la couche de mucus gastrique moins acide que le lumen de l'estomac certaines bactéries telles qu'*Helicobacter pylori* peuvent survivre et se multiplier au sein de l'environnement stomacal. Il a été démontré que les spores de *B. cereus* pouvaient survivre plusieurs heures dans un environnement acide mimant le milieu stomacal avec une réduction de viabilité modérée (1.5 log de mortalité au bout de 6 heures d'exposition à des pH allant de

1 à 1.5). Les cellules végétatives de *B. cereus* sont beaucoup plus sensibles au pH de ce milieu avec une réduction de viabilité de 3 à 4 log après 30 min d'exposition à pH 3.5. La survie des spores ou cellules végétatives de *B. cereus* est dépendante de la matrice alimentaire ingérée et du pH de l'estomac au moment de l'ingestion (Clavel *et al.*, 2004). Les adaptations de *B. cereus* aux pH acides ont été en partie étudiées et comprennent un ensemble d'adaptations conduisant à une régulation du pH intracellulaire et à une réponse de tolérance à l'acide (ATR) (Jobin *et al.*, 2002, Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011). Ces mécanismes seront l'objet de la partie I.II de ce manuscrit.

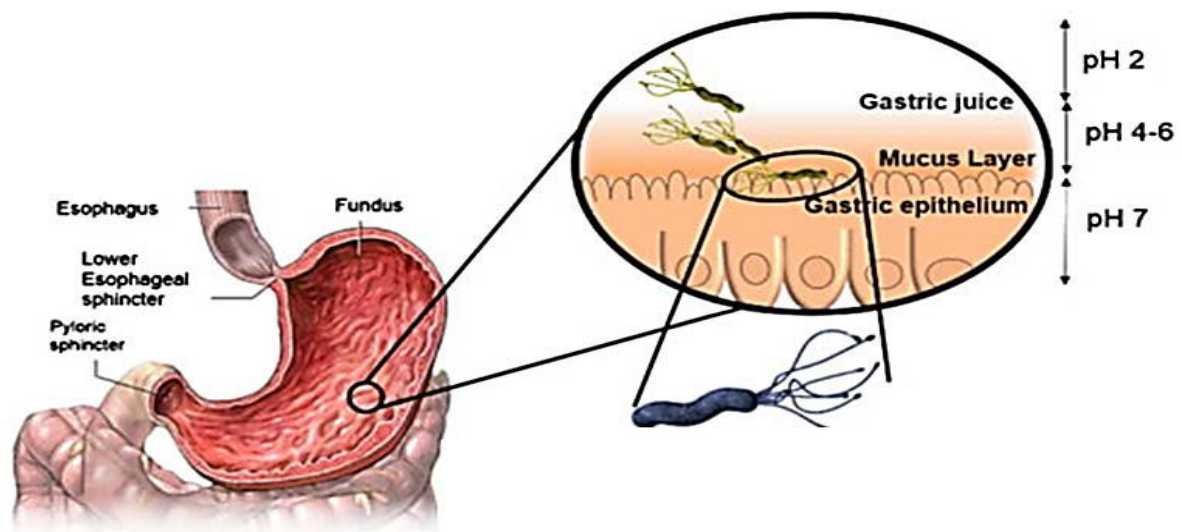


FIGURE 3: Schéma décrivant le gradient de pH entre les différentes couches de la muqueuse gastrique humaine et le lumen stomacal. La bactérie représentée est *H. pylori*. D'après (Lopes *et al.*, 2014).

Au cours de son cycle infectieux dans le tube digestif humain *B. cereus* va être confronté à la variation d'un autre facteur abiotique important : le potentiel d'oxydo-réduction ( $E_h$ ). Cette variable physico-chimique décrit la réactivité des espèces chimiques entre elles et permet donc de mesurer la capacité d'un milieu à être oxydé ou réduit. Le  $E_h$  d'un milieu dépendra des réactions d'oxydo-réduction qui s'y dérouleront. La seule valeur d' $E_h$  à ce jour disponible pour le  $E_h$  du lumen intestinal humain est de -150 mV (Moriarty-Craige and Jones, 2004). Le microbiote intestinal contribue à ce bas  $E_h$  par consommation de l'oxygène et production au cours de la fermentation de composés réducteurs tels que le dihydrogène ou le sulfure d'hydrogène (Edwards *et al.*, 1985). Le  $E_h$  intestinal est également stabilisé par certains couples rédox de type thiol/disulfite présents en fortes concentrations comme le glutathion ( $E^{\circ} = -240$  mV) ou les cystéines ( $E^{\circ} = -340$  mV). Ces deux molécules sont produites par les cellules intestinales elles-mêmes ou apportées par l'alimentation (Circu and Aw, 2011,

Martensson *et al.*, 1990) Il est également probable qu'un gradient d' $E_h$  existe dans l'intestin avec un lumen fortement réducteur du à la présence du microbiote intestinal et des zones à  $E_h$  localement plus oxydant en bordure des microvillosités intestinales où l'oxygène pourrait diffuser depuis les vaisseaux sanguins (Moriarty-Craige and Jones, 2004). Des études ont démontré que *B. cereus* pouvait s'adapter à des variations de  $E_h$  en modifiant son métabolisme central, son protéome et la production de facteurs de virulence tels que les toxines (Zigha *et al.*, 2006, Clair *et al.*, 2012). Les adaptations de *B. cereus* à bas  $E_h$  seront décrites plus en détail dans la partie I.III de cette thèse.

Enfin, dans l'intestin grêle *B. cereus* est exposé aux acides biliaries. Ces molécules sécrétées chez l'homme par la vésicule biliaire ont pour but d'émulsionner et de dissoudre les graisses ingérées. Les acides biliaries présentent également un caractère bactéricide par désagrégation des lipides de la membrane bactérienne ou par génération de stress oxydant suite à leur internalisation dans la cellule bactérienne (Merritt and Donaldson, 2009). Des travaux ont montré que la résistance de cellules végétatives de *B. cereus* aux sels biliaries porcins était dépendante de la souche bactérienne considérée et du type de nourriture ingérée. Ainsi, les souches *B. cereus* F4433/73 et F4430/73 sont plus résistantes à la bile porcine que la souche TZ415 (Clavel *et al.*, 2007).

## **2: ADAPTATIONS AU PH ACIDE**

### **2.1: Le stress acide**

*B. cereus* est confronté à de nombreux environnements à pH acide que ce soit dans les aliments comme les tomates (pH 4.1) (Beuchat and Mann, 2008) ou encore les jus de pomme (pH 4) (Ryu and Beuchat, 1998), dans certains sols (pH proche de 4) (Neumann and Martinoia, 2002, Rousk *et al.*, 2009) ou dans l'estomac de son hôte. La croissance de *B. cereus* est rapidement affectée par les pH acides. La limite basse de pH pour laquelle une croissance de *B. cereus* peut être observée est de 4.3 bien que cette valeur soit variable selon la souche bactérienne considérée (Kramer and Gilbert, 1989). Les effets observés après exposition de cellules de *B. cereus* à des pH acides comprennent une diminution du taux de croissance et de la biomasse finale des cultures ainsi qu'une augmentation du temps de latence (Biesta-Peters *et al.*, 2011). Ces effets varient selon la souche utilisée, la molécule acidifiante utilisée ainsi que le taux de croissance initial. Dans ce dernier cas, il a été observé que des cellules végétatives de *B. cereus* cultivées en chemostat à pH 5.5 étaient plus

sensibles à des chocs acides de 20 minutes à pH 4 pour des taux de croissance de l'ordre 0,4 à 0,6 h<sup>-1</sup> comparé à un taux de croissance de 0,1 h<sup>-1</sup> (Thomassin *et al.*, 2006).

Les effets du pH acide sur la cellule bactérienne sont multiples. Le stress acide survient quand les acides organiques faibles, présents dans le milieu environnant, sous forme non dissociée et non chargée traversent la membrane plasmique bactérienne par diffusion simple (Cotter and Hill, 2003). Du fait du pH, théoriquement plus alcalin du cytoplasme cellulaire, ces acides organiques vont se dissocier en anions et protons H<sup>+</sup>. Ces nouvelles molécules sont chargées et ne peuvent désormais plus retraverser la membrane plasmique par diffusion simple. L'excès de proton H<sup>+</sup> engendré va entraîner une acidification continue du cytoplasme bactérien déclenchant ainsi un stress acide (Mols and Abee, 2011a). Les acides forts ne peuvent pas traverser la membrane plasmique par diffusion. Néanmoins en diminuant le pH externe, ils augmentent le  $\Delta$ pH (différence entre le pH externe et le pH interne). Cette augmentation de  $\Delta$ pH conduit à une augmentation de l'entrée de protons H<sup>+</sup> dans le cytoplasme et donc à son acidification (Beales, 2004). La diminution du pH cytoplasmique est préjudiciable à l'intégralité des activités cellulaires et les conséquences de ce stress sont multiples : altération des fonctions des enzymes glycolytiques, perturbations de la chaîne de transport des électrons et production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), déclenchement de stress oxydants secondaires... Toutes les macromolécules sont affectées par le stress acide (i) les protéines cytoplasmiques peuvent être dénaturées, (ii) les acides nucléiques peuvent être dégradés suite à la rupture des liaisons osidiques reliant le ribose ou le désoxyribose à la base azotée (iii) la structure des membranes bactérienne est altérée (Audia *et al.*, 2001, Cotter and Hill, 2003, Mols and Abee, 2011b, Mols and Abee, 2011a, Quivey *et al.*, 2001).

## 2.2: La réponse générale aux stress

### 2.2.a: Les facteurs $\sigma$

Répondre rapidement à un changement environnemental est un prérequis indispensable pour que les microorganismes puissent survivre dans leur niche écologique. Le changement des conditions physico-chimiques de croissance d'une bactérie va induire rapidement une cascade d'évènements conduisant à une résistance de la bactérie au stress rencontré mais également à d'autres stress environnementaux. Cette réponse, appelée réponse générale au stress permet

l'adaptation rapide des bactéries à une grande variété de conditions environnementales défavorables. La stratégie employée lors de la réponse générale au stress est l'activation de facteurs  $\sigma$  alternatifs. Les facteurs  $\sigma$  sont des sous-unités des ARN polymérases (FIGURE 4) capables de reconnaître des séquences spécifiques situées en amont ou au niveau des promoteurs de certains gènes et appelées boîtes  $\sigma$ . En fonction du facteur  $\sigma$  associé aux ARN polymérases les panels de gènes transcrits, appelés régulons, diffèrent ce qui permettra à la cellule de s'adapter à différentes conditions.

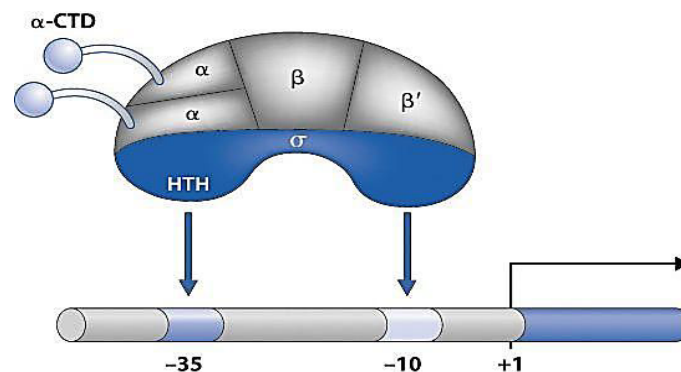


FIGURE 4 : Représentation des différentes sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$  et  $\sigma$  d'une ARN polymérase de *Bacillus subtilis*. +1 représente le +1 de transcription. Les séquences nucléotidiques situées en position -35 et -10 par rapport au +1 de transcription indiquent les séquences en amont du gène d'intérêt où la polymérase se lie à l'ADN.  $\alpha$ -CTD : domaine carboxy-terminal de la sous-unité alpha. HTH : domaine hélice-tour-hélice, impliqué dans la fixation du facteur  $\sigma$  à l'ADN. Image d'après [http://www.genesandsignals.org/\\_gs\\_image.php?file=GS\\_CH05/5.13.jpg](http://www.genesandsignals.org/_gs_image.php?file=GS_CH05/5.13.jpg)

Chez les bactéries à coloration de Gram négative, de nombreux facteurs sigma tels que  $\sigma^E$ ,  $\sigma^H$  ou encore  $\sigma^S$  sont impliqués dans la réponse générale au stress avec chacun des fonctions spécifiques (Hengge, 2009). Chez les bactéries à coloration de Gram positive le facteur  $\sigma$  alternatif contrôlant la réponse générale au stress est le facteur  $\sigma^B$  (Scott and Dyer, 2012). Des études ont montré que  $\sigma^B$  était activé en conditions de stress osmotique, oxydatif, thermique, éthanolique et également lors du stress acide (van Schaik *et al.*, 2004). Cette propriété des facteurs  $\sigma$  est également à l'origine des mécanismes de protection croisée, ou un stress en générant l'activation d'un facteur  $\sigma$  conduit à la protection contre d'autre stress. Ce mécanisme de protection croisée a été observé chez *Listeria monocytogenes* entre le stress froid et le stress osmotique (Pittman *et al.*, 2014). Chez *Escherichia coli* entre le stress nutritionnel, le stress thermique et le stress oxydatif (Jenkins *et al.*, 1988) ou encore chez



*Salmonella Typhimurium* entre le stress acide et le stress osmotique (Leyer and Johnson, 1993). Chez *B. cereus*, le phénomène de protection croisée a été suggéré (Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011) mais n'a pour le moment pas été formellement démontré.

### 2.2.b: La régulation de $\sigma^B$

L'activité de  $\sigma^B$  chez les bactéries à coloration de Gram positive est contrôlée par l'anti facteur  $\sigma$  RsbW et son antagoniste RsbV. Quand la cellule n'est pas stressée,  $\sigma^B$  est complexé avec RsbW qui le séquestre, l'empêche de se lier aux ARN polymérase et ainsi bloque la transcription des gènes  $\sigma^B$  dépendants. Dans ces conditions, RsbV est phosphorylé et inactif. En conditions de stress, RsbV est activé par déphosphorylation par une phosphatase et peut ainsi se complexer avec RsbW libérant de fait  $\sigma^B$ . Ce dernier peut alors se lier aux ARN polymérase et ainsi déclencher la transcription des gènes  $\sigma^B$  dépendants (van Schaik *et al.*, 2005). Ce mécanisme de séquestration / libération de  $\sigma^B$  est conservé chez la majorité des bactéries à coloration de Gram positive telles que les *Bacilli*, *S. aureus* ou encore *L. monocytogenes* (Ferreira *et al.*, 2004). Néanmoins les événements précédant la libération de  $\sigma^B$  varient selon le microorganisme étudié. Les événements précédant l'activation de  $\sigma^B$  chez *B. cereus* sont décrits dans la figure 5. En absence de stress, la protéine RsbK est méthylée par RsbM, ce qui inhibe son activité. Dans ces conditions, les protéines RsbY et RsbV sont inactives.  $\sigma^B$  est donc séquestré par RsbW. Lors d'un stress intracellulaire ou extracellulaire, RsbK est activée par phosphorylation. Le phosphate est ensuite transféré directement sur la phosphatase RsbY. RsbY est activé et peut dé-phosphoryler RsbV. RsbV va séquestrer RsbW, ce qui libèrera ainsi  $\sigma^B$  de son association avec RsbW et lui permettra de s'associer à l'ARN polymérase (Chen *et al.*, 2012, de Been *et al.*, 2010).

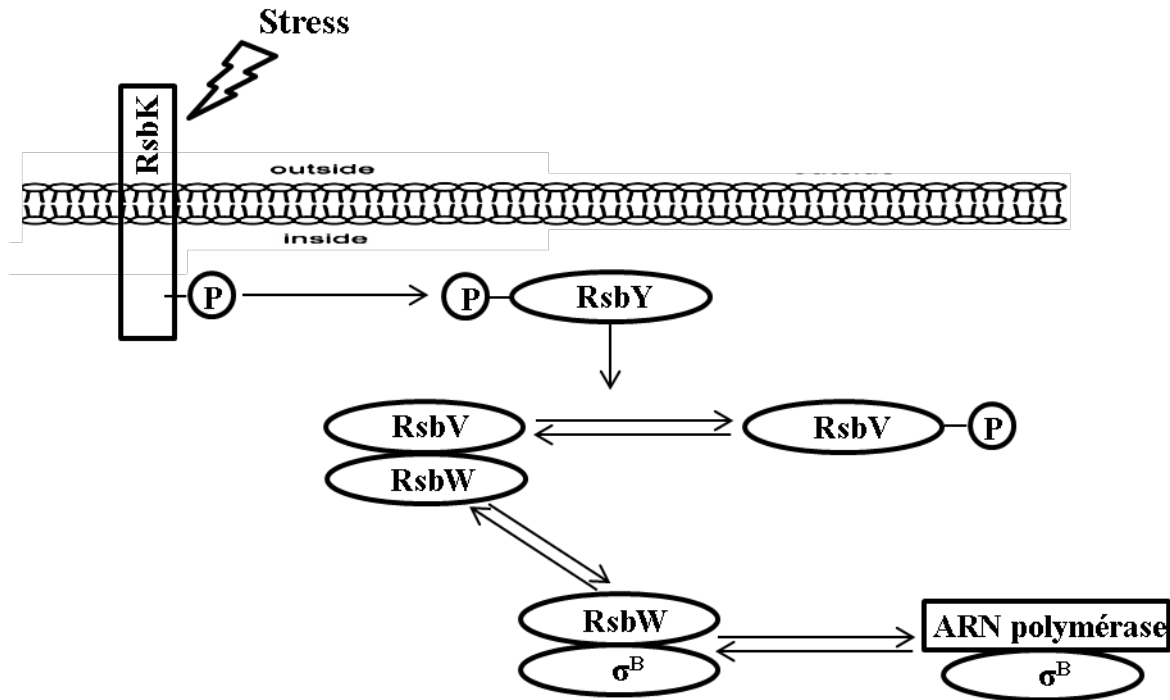


FIGURE 5 : Modèle simplifié de l'activation de  $\sigma^B$  chez *B. cereus* suite à un stress. D'après (Chen *et al.*, 2012).

### 2.2.c: Le régulon $\sigma^B$

L'ensemble des gènes dont l'expression est régulée par  $\sigma^B$ , aussi appelée régulon  $\sigma^B$ , a été mis en évidence chez plusieurs bactéries à coloration de Gram positive *via* la technologie des puces à ADN. Environ 100 gènes sont dépendants du régulon  $\sigma^B$  chez *Bacillus subtilis* et *S. aureus* contre 54 chez *L. monocytogenes* (Pane-Farre *et al.*, 2006, Helmann *et al.*, 2001, Kazmierczak *et al.*, 2003). Néanmoins, la portion de génome étudiée chez cette dernière bactérie était limitée. Il est donc probable que le nombre de gènes dépendants du régulon  $\sigma^B$  soit plus important chez *L. monocytogenes*. Chez *B. cereus* seule une trentaine de gènes ont été détectés comme dépendants du régulon  $\sigma^B$  (van Schaik *et al.*, 2007). Ces gènes sont retrouvés majoritairement en opérons. Parmi eux, 14 gènes codant pour des protéines hypothétiques dont le rôle n'a pas été étudié en détail ont été retrouvés (TABLEAU 3) (Desriac *et al.*, 2013). Sont également détectés les gènes codant pour RsbV, RsbW, RsbY, RsbK, précédemment décrites pour leurs rôles dans la libération / séquestration de  $\sigma^B$ , ainsi que le gène *sigB* codant pour le facteur  $\sigma^B$  lui-même. Les gènes codant pour les protéines YlfT et YfkM font aussi partis du régulon  $\sigma^B$ . La première de ces protéines est connue pour être inductible par le stress thermique mais son rôle dans la réponse au stress générale est

inconnu. YfkM est une protéase chargée de dégrader les protéines mal conformées produites suite à un stress. Les gènes BC1154, BC1155 et BC0863 codent pour des catalases. Ces protéines dégradent le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en H<sub>2</sub>O et O<sub>2</sub>. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et autres dérivés réactifs de l'oxygène sont produits lors des stress, probablement par perturbation du transport des électrons dans la chaîne respiratoire (Mols and Abee, 2011b). De la même manière, les gènes BC1005 et BC1154 codent respectivement pour orf4, une bactérioferritine, et pour une ferrocélatase. Ces deux protéines sont impliquées dans la protection de la cellule contre le stress oxydant (Hochgräfe *et al.*, 2008) et également contre les carences en fer (Smith, 2004). Enfin le gène BC3129 code pour CorA, un transporteur cobalt / magnésium.

TABLEAU 3 : gènes membres du régulon  $\sigma^B$  chez *B.cereus* ATCC14579. D'après (Desriac *et al.*, 2013).

Numéro d'accesion	Alias	Annotation
BC0861		Hypotetical protein
BC0862	<i>yfkM</i>	Protease I
BC0863	<i>katE</i>	Catalase
BC0995		Hypotetical protein
BC0996		Hypotetical protein
BC0998	<i>yflT</i>	General stress protein
BC0999	<i>csbD</i>	Hypotetical protein
BC1000		Hypotetical protein
BC1001		Hypotetical protein
BC1002	<i>rsbV</i>	Anti- $\sigma^B$ factor antagonist
BC1003	<i>rsbW</i>	Anti- $\sigma^B$ factor
BC1004	<i>sigB</i>	RNA polymerase sigma factor $\sigma^B$
BC1005	<i>orf4</i>	Putative bacterioferritin
BC1006	<i>rsbY</i>	PP <sub>2</sub> C-type RR, regulates $\sigma^B$ activity
BC1007	<i>cheR</i>	Chemotaxis protein methyltransferase
BC1008	<i>rsbK</i>	Multi-sensor hybrid kinase
BC1009		Hypotetical protein
BC1010		Hypotetical protein
BC1011		Hypotetical protein
BC1012	<i>ybjQ</i>	Hypotetical protein
BC1154	<i>hemH-2</i>	Ferrocélatase
BC1155	<i>katA</i>	Catalase
BC2108	<i>sigZ</i>	ECF sigma factor
BC2638		Spore germination protein LC
BC3129	<i>corA</i>	Mg <sup>2+</sup> and Co <sup>2+</sup> transporter
BC3130		Hypotetical protein
BC3131		Hypotetical protein
BC3132	<i>yflT</i>	General stress protein
BC4640	<i>yfjJ</i>	Hypotetical protein
BC4641	<i>yfjI</i>	Hypotetical protein
BC5390	<i>cwlJ</i>	Cell wall hydrolase
BC5391	<i>gerQ</i>	Spore coat protein

### 2.3: Systèmes de réparations

#### 2.3.a: Systèmes de réparation de l'ADN

Suite à un stress acide, l'ADN subit des pertes de bases puriques et pyrimidiques par rupture de la liaison glycosidique. Il a été démontré que le système UvrA-UvrB est impliqué dans la réparation des dommages causés à l'ADN suite à différents stress (Lage *et al.*, 2003). Le complexe UvrA-UvrB détecte les modifications de conformation ou de structure de l'ADN endommagé et se fixe sur la région à réparer. Cette fixation entraîne la dissociation d'UvrA qui est remplacé par la protéine UvrC. Cette dernière protéine va exciser la région de l'ADN endommagé avant d'être évacuée par UvrD. La région supprimée par UvrC est alors re-synthétisée par une ADN polymérase sous sa forme non endommagée (Hanna *et al.*, 2001). Chez *Methylobacterium dichloromethanicum* la mutation d'*uvrA* augmente la sensibilité aux pH acides (Kayser *et al.*, 2002). De la même manière, le gène *recA*, codant pour une protéine impliquée dans la recombinaison homologue semble également être impliqué dans la réponse au stress acide chez *H. pylori* (Thompson and Blaser, 1995). Chez *B. cereus* il a été démontré que le système UvrA-UvrB ainsi que la protéine RecA étaient surexprimés après exposition des cellules à de l'acide peracétique (Mols *et al.*, 2010a). Ces résultats suggèrent l'implication de ces systèmes dans la résistance au stress acide de *B. cereus*.

#### 2.3.b: Protéines chaperonnes et protéolyse

Des stress environnementaux comme les stress thermique ou le stress pH peuvent conduire à la déstabilisation des structures protéiques. Dans certains cas l'altération des structures tertiaires des protéines peut conduire à l'exposition en surface de résidus hydrophobes normalement situés au cœur de la protéine. A forte concentration, les régions hydrophobes de plusieurs peptides mal conformés peuvent former irréversiblement des agrégats. Ces agrégats interfèrent avec d'autres fonctions cellulaires de la bactérie et peuvent également être toxiques pour la cellule. Afin de se protéger contre les erreurs de conformations des protéines et leur agrégation, les cellules ont développées deux systèmes principaux : les protéines chaperonnes et la machinerie de protéolyse (Dougan *et al.*, 2002). Les chaperonnes telles que les protéines DnaK vont stabiliser les régions mal conformées des peptides et empêcher leur association avec d'autres séquences peptidiques hydrophobes (Bukau *et al.*, 2006). D'autres chaperonnes, comme le système GroEL-GroES, vont isoler les protéines mal conformées du reste de l'environnement cytoplasmique afin que ces protéines puissent être correctement structurées

(Young *et al.*, 2004). Une autre chaperonne liée au ribosome et appelée Trigger Factor participe au repliement conformationnel des protéines lors de la synthèse peptidique (Kramer *et al.*, 2009). Enfin les chaperonnes de la famille HSP100 comme ClpB vont désagréger les amas protéiques formés dans la cellule en s'associant avec DnaK et d'autres protéines de choc thermique (HSP). Néanmoins, il arrive que les amas de protéines mal conformées ne puissent pas être traitées par les chaperonnes. Dans ce cas, des protéases faisant partie de la machinerie de protéolyse entrent en jeu. Ces protéases vont dégrader les amas de protéines en petits fragments de peptides. Plusieurs monomères ClpP vont s'assembler en un complexe multimérique (le protéasome) en forme de tonneau. Dans cette structure protéique, les sites actifs de protéolyse sont placés à l'intérieur du tonneau de façon à éviter la dégradation des protéines cytoplasmiques (FIGURE 6). L'entrée des substrats à dégrader dans cette cavité est permise par reconnaissance entre un anneau de chaperonne de la famille HSP100 entourant le substrat et le multimère de ClpP. Le substrat est ensuite dégradé par ClpP en petits peptides ce qui conduit *in fine* à la dégradation des amas de protéines mal conformées (Baker and Sauer, 2006, Kirstein *et al.*, 2009, Weibezahn *et al.*, 2005). Ces systèmes de chaperonnes et de machinerie de protéolyse sont présents chez la majorité des bactéries. Néanmoins, de grandes différences de régulation ou de structure protéique existent selon le microorganisme considéré. C'est le cas entre *E. coli* et *B. subtilis* (Molière and Turgay, 2009). Chez *B. cereus* il a été montré que les gènes codants pour les protéines chaperonnes DnaK, DnaJ, GroEL, GroES et ClpP étaient surexprimées après un choc acide à pH 4 (Mols *et al.*, 2010a) ce qui accrédite un rôle de ces systèmes dans la résistance au stress acide de *B. cereus*.

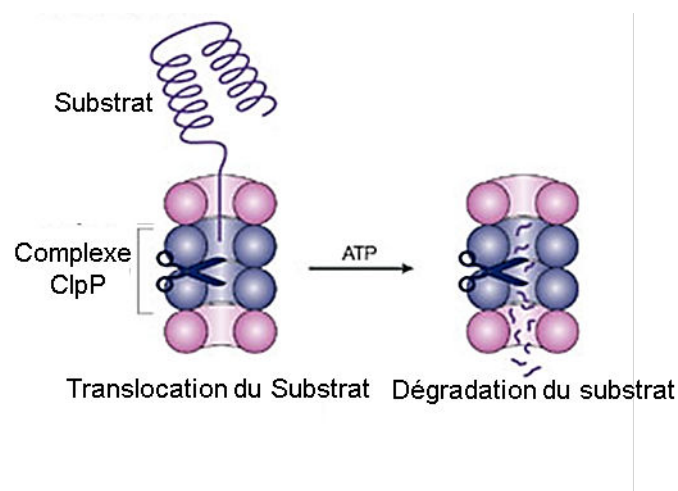


FIGURE 6 : Représentation schématique du protéasome d'*E. coli*. D'après (Pickart and Cohen, 2004)

## 2.4: Homéostasie du pH interne

Le pH interne est un facteur physico-chimique primordial de la cellule bactérienne qui va impacter un nombre important d'activités cellulaires. En conséquence, le pH interne d'une cellule est finement régulé. Selon les microorganismes, la valeur physiologique du pH interne est différente. Les bactéries acidophiles ont un pH interne compris entre 6,5 et 7, les bactéries neutrophiles entre 7,5 et 8 et les bactéries alcalophiles entre 8,4 et 9 (Booth, 1985). Lors du passage de la bactérie dans un milieu acide le  $\Delta\text{pH}$  existant entre le pH externe et le pH interne va générer un gradient de pH favorisant l'entrée de protons  $\text{H}^+$  dans le cytoplasme par diffusion passive. Ces protons vont diminuer le pH intracellulaire. Selon le microorganisme considéré une baisse plus ou moins forte du pH interne peut être tolérée de façon à diminuer le gradient de pH existant tout en restant compatible avec la poursuite des activités cellulaires. Par exemple, chez *Streptococcus bovis* le pH interne passe de 7,8 à 5,6 selon le pH de son milieu de culture (Russell, 1991). Cette observation est similaire pour *Lactococcus lactis* où le pH interne peut varier de 7,24 à 5,19. A l'inverse le pH interne de *Listeria innocua* reste toujours proche de 7 quelque soit le pH externe (Siegumfeldt *et al.*, 2000). Dans le cas de *B. cereus* le pH interne est égal à 7,1 quand la bactérie est cultivé à pH 7 et diminue jusqu'à une valeur de 6,2 quand les cellules sont cultivées à pH 5,5 (Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011). Toute diminution du pH interne au delà de ces valeurs minimales pourrait être préjudiciable aux activités cellulaires de la cellule bactérienne. Une régulation efficace et précise de la concentration des protons  $\text{H}^+$  intracellulaire est donc nécessaire. Ces régulations sont médiées par des protéines membranaires comme les  $\text{F}_1\text{F}_0$  ATP synthases ainsi que par des systèmes de transport membranaire spécifiques de la décarboxylation de certains acides aminés.

### 2.4.a: Les $\text{F}_1\text{F}_0$ ATP synthases

Les  $\text{F}_1\text{F}_0$  ATP synthases sont des protéines enchâssées dans la membrane plasmique et qui peuvent synthétiser de l'ATP à partir de l'ADP lors de l'entrée de protons  $\text{H}^+$  dans le cytoplasme. Ces protéines peuvent également effectuer l'opération inverse, à savoir expulser des protons  $\text{H}^+$  depuis le cytoplasme vers l'extérieur de la cellule tout en consommant de l'ATP (Hicks *et al.*, 2010). La structure schématisée d'une  $\text{F}_1\text{F}_0$  ATP synthase est présentée dans la figure 7. Le domaine soluble  $\text{F}_1$  est localisé dans le cytoplasme. Chaque domaine  $\text{F}_1$  contient trois paires de sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  et d'un exemplaire de chaque sous unités  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ . Le domaine  $\text{F}_0$  est inséré dans la membrane bactérienne et est composé d'une sous unité  $a$ , de

deux sous unités *b*, et d'un nombre variable, selon l'organisme considéré, de sous unités *c* organisées en anneau. Les sous unités *b* et  $\delta$  forment une tige qui relie les domaines  $F_1$  et  $F_0$  (Deckers-Hebestreit and Altendorf, 1996). Dans le cas de l'activité d'ATP synthase, les protons  $H^+$  traversent la membrane au niveau du domaine  $F_0$ . Ce flux entraîne la rotation de l'anneau des sous unités *c*. Cette rotation va modifier la conformation des sous unités du domaine  $F_1$  qui vont successivement fixer l'ADP et le phosphate, condenser ces deux molécules pour former de l'ATP et enfin libérer l'ATP dans le cytoplasme (Nakanishi-Matsui *et al.*, 2010). Les mécanismes impliqués dans l'activité inverse, à savoir l'expulsion de protons  $H^+$  en dehors du cytoplasme avec consommation d'ATP, sont peu connus.

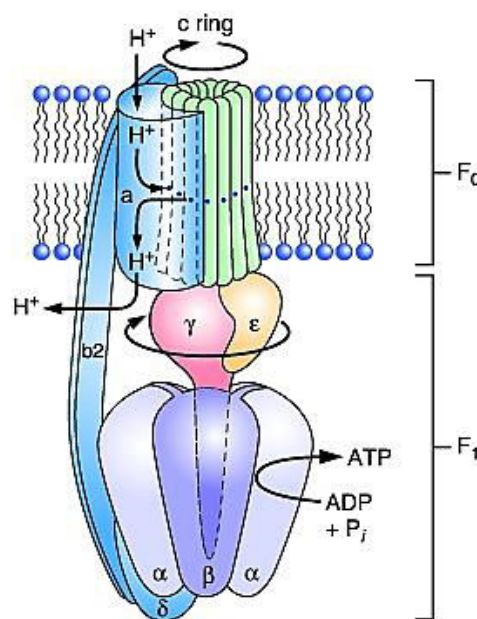


FIGURE 7 : Schéma décrivant la structure d'une  $F_1F_0$  ATP synthase bactérienne. Le sens de rotation représenté correspond à l'activité ATP synthase. En vert : anneau de sous unités *c*. En bleu : Tige formée des sous unités *b* et  $\delta$ . En violet : assemblage des sous unités  $\alpha$  et  $\beta$ . En rose et jaune : sous unités  $\gamma$  et  $\epsilon$  respectivement.  $H^+$  : cheminement des protons  $H^+$  à travers la structure du complexe protéique. D'après (Hicks *et al.*, 2010).

L'expulsion de protons hors du cytoplasme par les  $F_0F_1$  ATPases est un mécanisme décrit comme impliqué dans la réponse au stress acide chez *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Enterococcus hirae* ou encore *E. coli* (Shabala *et al.*, 2002, Cotter and Hill, 2003, Mnatsakanyan *et al.*, 2002). En éliminant par cette voie les protons  $H^+$  présents dans le cytoplasme, les cellules bactériennes diminuent leur concentration intracellulaire en protons et ainsi maintiennent leur pH interne à des valeurs physiologiquement viables. Ce mécanisme pourrait également exister chez *B. cereus*. Des données transcriptomiques démontrent cependant que l'expression des gènes codant pour les  $F_1F_0$  ATPases est légèrement diminuée

en aérobiose lors d'un stress acide non létal (Mols *et al.*, 2010a) et inchangée dans le cas d'un stress acide létal. Cependant, des résultats obtenus chez *B. cereus* montrent une augmentation de l'activité  $F_1F_0$  ATPase lors de cultures en anaérobiose en chémostat à pH 5.5 (Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011) ce qui suggèrent l'idée d'une participation de ces protéines dans le maintien du pH intracellulaire.

#### 2.4.b: Autres transporteurs

D'autres transporteurs membranaires peuvent être impliqués dans la régulation du pH interne. Il est connu depuis longtemps que certains antiports couplent le transport du  $Na^+$  avec celui des protons  $H^+$  ce qui permet à ces protéines de gérer l'homéostasie de chacune de ces deux molécules (Mitchell, 1961). L'implication de ces protéines dans l'homéostasie du pH interne de certains bacilles alcalophiles a été clairement démontrée lors de stress alcalin (Krulwich *et al.*, 1999). Chez *B. cereus* il a été observé lors d'un choc acide que le gène *napA*, qui code pour un antiport  $Na^+ / H^+$ , était surexprimé ce qui accrédite l'idée d'une implication de ces transporteurs dans l'homéostasie du pH interne (Mols *et al.*, 2010b). Il a également été montré chez *Streptococcus mutans* et *L. lactis* que les ATPases  $K^+ / H^+$  étaient impliquées dans le maintien du pH interne par extrusion de protons  $H^+$  (Dashper and Reynolds, 1992, Kashket, 1981).

#### 2.4.c: Systèmes de décarboxylations

Depuis plusieurs années il a été montré que les systèmes de décarboxylation des acides aminés étaient impliqués dans l'évolution du pH de l'environnement bactérien en consommant des protons  $H^+$  au cours des réactions de décarboxylation (Beales, 2004). Parmi ces systèmes figurent les glutamates décarboxylases, les arginines décarboxylases et les lysines décarboxylases. Au sein du cytoplasme bactérien, ces systèmes enzymatiques vont internaliser un acide aminé, le combiner avec un proton  $H^+$  et expulser le produit résultant à l'extérieur de la cellule. La consommation de  $H^+$  au cours de la réaction va diminuer la concentration en proton dans le cytoplasme et permettre une meilleure régulation du pH interne.

Les systèmes de type glutamate carboxylase (GAD) sont composés de deux protéines : un antiport membranaire et l'enzyme cytoplasmique glutamate décarboxylase (Cotter and Hill, 2003) (FIGURE 8). Ce système est retrouvé chez de nombreuses bactéries comme *E. coli*, *L.*



*lactis* ou encore *Cl. perfringens* (Bearson *et al.*, 1997). Ce système fonctionne en transportant du glutamate dans le cytoplasme où cette molécule va être décarboxylée en acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) avec consommation d'un  $H^+$ . Le GABA est ensuite expulsé à l'extérieur de la cellule grâce à l'antiport membranaire tout en étant échangée avec une nouvelle molécule de glutamate. Ce système est important pour la survie à un choc acide de *L. monocytogenes* ou d'*E. coli* (Richard and Foster, 2003). Chez *B. cereus* ATCC 14579 le système GAD n'est pas retrouvé après une analyse bio-informatique par BLAST (Mols *et al.*, 2010b). Néanmoins, il a été prouvé que la présence de glutamate dans le milieu de culture de *B. cereus* ATCC 14579 augmentait la résistance au stress acide de cellules cultivées à pH 7 (Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011).

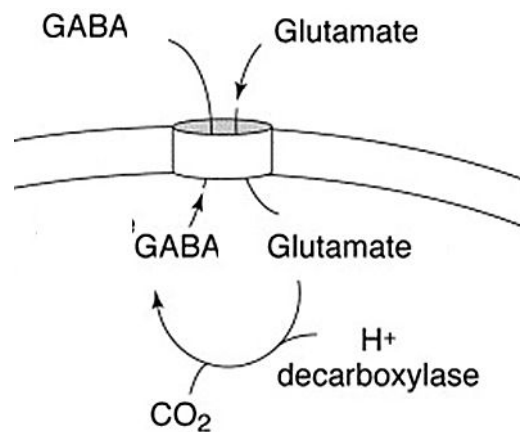


FIGURE 8 : Schéma simplifié d'un système de type glutamate décarboxylase d'*E. coli*. D'après (Small and Waterman, 1998).

Le système de décarboxylation de l'arginine est lui aussi composé de deux protéines, un antiport membranaire et l'enzyme arginine décarboxylase qui est cytoplasmique. Ce système fonctionne en important de l'arginine qui va être décarboxylée en agmatine avec consommation d'un  $H^+$ . L'agmatine est ensuite sécrétée dans le milieu extracellulaire et échangée contre une nouvelle molécule d'arginine. Ce système a été identifié chez *Salmonella enterica* ou encore chez *E. coli* (Kieboom and Abee, 2006). Chez *E. coli*, la présence du système arginine décarboxylase permet un maintien du pH interne à des valeurs physiologiques viables. Ce système est donc important dans l'homéostasie du pH interne (Richard and Foster, 2003). Chez *B. cereus* les arginines décarboxylases sont codées par les gènes *speA* et *yaaO*. Néanmoins, le gène correspondant à l'antiport arginine / agmatine n'a pas encore été identifié. Des résultats ont cependant montrés que la présence d'arginine

augmentait la résistance au stress acide de *B. cereus* ce qui indique un rôle important des arginine décarboxylases dans la résistance de cette bactérie aux bas pH (Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011).

Les systèmes lysine décarboxylases comportent un antiport membranaire lysine / cadavérine et une enzyme cytoplasmique, la lysine décarboxylase. Ce système fonctionne en transportant la lysine qui est décarboxylée à l'intérieur du cytoplasme en cadavérine avec consommation d'un H<sup>+</sup>. La cadavérine est ensuite expulsée hors de la cellule et échangée contre une nouvelle molécule de lysine. Ce système est retrouvé chez *S. typhimurium* (Park *et al.*, 1996) ou encore *Vibrio parahaemolyticus* (Tanaka *et al.*, 2008). Chez ce dernier microorganisme, il a été démontré que la mutation du gène codant pour la lysine décarboxylase induisait une diminution de la résistance au choc acide. Chez *B. cereus*, il a été démontré que l'ajout de lysine dans le milieu de culture de *B. cereus* augmentait la résistance au stress acide de cette bactérie ce qui supporte l'idée d'un rôle de ce système dans l'homéostasie du pH interne (Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011). Chez *B. cereus* le gène codant pour la lysine décarboxylase est nommé *yvdD* (BC5046) (Ivanova *et al.*, 2003). Néanmoins le gène codant pour l'antiport lysine / cadavérine n'a pas encore été identifié.

Il a également été démontré que d'autres systèmes de types décarboxylases participant à l'homéostasie du pH interne étaient présent chez certaines bactéries lactiques. *Lactobacillus plantarum* et *L. lactis* sont capables d'utiliser la fermentation malolactique au cours de laquelle le malate est décarboxylé en lactate avec consommation de proton. Le lactate est ensuite éliminé du cytoplasme *via* un antiport malate / lactate (FIGURE 9) (Poolman *et al.*, 1991, Olsen *et al.*, 1991). De la même manière, chez certaines sous espèces de *L. lactis* un système de type citrate / lactate existe et conduit à une décarboxylation d'une molécule d'oxaloacétate en pyruvate couplée à une consommation de protons (Garcia-Quintans *et al.*, 1998). Ce système est également retrouvé chez *Klebsiella pneumoniae* (van Geest and Lolkema, 1996). Cependant, l'existence de ces deux voies de décarboxylation n'a jamais été démontrée chez *B. cereus*.

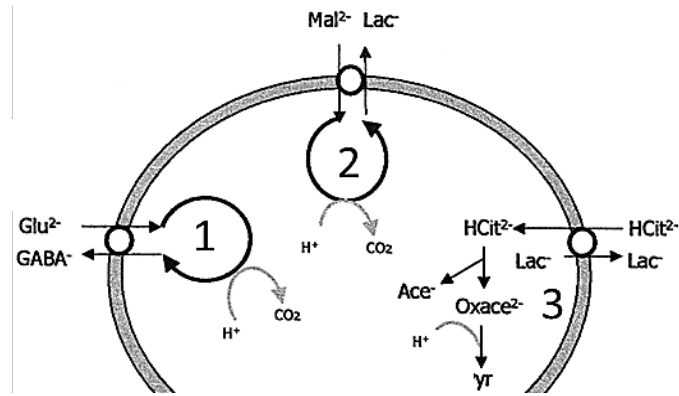


FIGURE 9 : Représentation schématique du fonctionnement de trois systèmes de décarboxylation dans une cellule bactérienne. **1** : Système Glutamate décarboxylase. Glu : glutamate. **2** : Système malate décarboxylase. Mal : malate. Lac : lactate. **3** : Système oxaloacetate décarboxylase. Cit : citrate. Ace : acetate. Oxace : oxaloacetate. Pyr : pyruvate. Adapté de (Cotter and Hill, 2003).

## 2.5: Production de molécules alcalines

### 2.5.a: Arginine déïminases

Les systèmes type arginine déïminases (ADI) sont des protéines qui convertissent l'arginine en citrulline. La citrulline est ensuite métabolisée en ornithine qui va être rejetée en dehors de la cellule *via* un antiport arginine/ornithine. Ces réactions génèrent en parallèle du CO<sub>2</sub>, de l'ATP et deux molécules d'ammoniac (NH<sub>3</sub>) (FIGURE 10). Le NH<sub>3</sub> produit est une molécule qui va contrer les effets acidifiants des protons présents dans la cellule en les consommant pour former des ions ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ce qui va conduire à l'alcalinisation du cytoplasme. De plus, l'ATP formé au cours de la réaction pourra être utilisée par les F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPases pour expulser des protons en dehors du cytoplasme (voir section I.II.3), comme cela a été démontré chez *L. monocytogenes* (van de Guchte *et al.*, 2002). Les systèmes de types arginine déïminase sont retrouvés chez de nombreux microorganismes comme les bactéries lactiques, les espèces du genre *Bacillus*, ou encore celles du genre *Pseudomonas* (Ding *et al.*, 2012, Lu, 2006). Ces systèmes se composent de trois enzymes : l'arginine déïminase, l'ornithine transcarbamylyase, et la carbamate kinase, codés respectivement par les gènes *arcA*, *arcB* et *arcC*. Le rôle du système ADI dans la résistance au stress acide des bactéries a été mis en évidence chez *L. monocytogenes* et *Streptococcus sanguis* par des mesures d'activité enzymatique à des pH de plus en plus faible, allant jusqu'à 3.5, et qui montraient une augmentation de l'activité des trois enzymes du système ADI à mesure que le pH diminuait. Ces résultats ont été confortés par l'obtention de mutants de ce système qui étaient plus sensibles au stress acide que les bactéries sauvages (Curran *et al.*, 1995, Ryan *et al.*, 2009).

Chez *B. cereus*, il a été démontré que le gène *arcA*, codant pour l'arginine déiminase, était surexprimé après exposition des cellules à des chocs acides non létaux (pH 5,4) ainsi que chez des cellules cultivées à pH 5,5 par rapport à celles cultivées à pH 7 (Mols *et al.*, 2010b, Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011). Ces données suggèrent que les systèmes ADI sont impliqués dans la survie de *B. cereus* au stress acide.

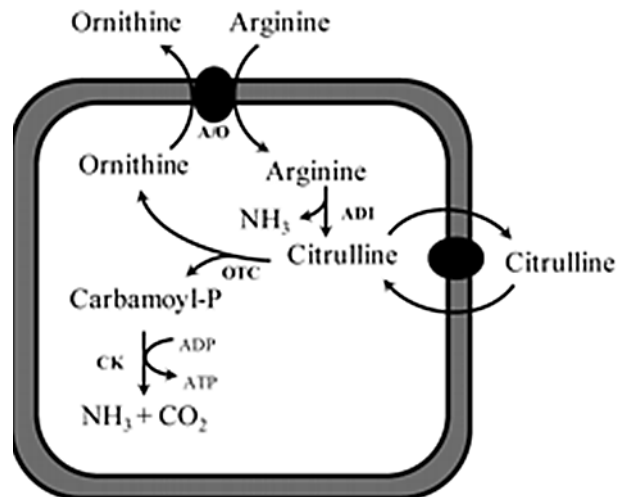


FIGURE 10 : Représentation schématique de la voie de l'arginine déiminase chez *lactobacillus sakei*. A/O : antiport arginine / ornithine. ADI : arginine déiminase. OTC : ornithine carbamoyltransferase. CK : carbamate kinase. D'après (Rimaux *et al.*, 2012).

### 2.5.b: Agmatine déiminase

Les systèmes Agmatine déiminase (AgDI) peuvent transformer l'Agmatine en carbamoyl-putrescine. Cette dernière molécule sera ensuite divisée en carbamoyl et en putrescine. La putrescine est alors rejetée en dehors de la cellule et échangée contre une nouvelle molécule d'Agmatine tandis que le carbamoyl est dégradé en  $\text{NH}_3$  et  $\text{CO}_2$  tout en générant de l'ATP. Comme pour les systèmes de type arginine déiminase, le  $\text{NH}_3$  produit par les agmatine déiminases pourra participer à l'alcalinisation du cytoplasme en consommant des protons pour former des ions ammonium. Les systèmes AgDI sont retrouvés chez de nombreux microorganismes comme *Lb. sakei* (Rimaux *et al.*, 2012), *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* ou encore *B. cereus* ATCC 14579 (Landete *et al.*, 2008, Landete *et al.*, 2010). Le système AgDI est composé de trois enzymes : l'agmatine déiminase, la putrescine carbamoyltransférase et la carbamate kinase (FIGURE 11). Il a été démontré chez *S. mutans* que les gènes codant pour les différentes enzymes du système AgDI étaient surexprimés quand les cellules étaient cultivées à bas pH et participaient à la résistance au stress acide de cette bactérie (Griswold *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2009, Suarez *et al.*, 2013). Chez *B.*

*cereus* peu d'informations sont disponibles sur le rôle du système AgDI dans la résistance au stress acide. Les seules données disponibles semblent indiquer que la résistance au stress acide de *B. cereus* ATCC14579 est diminuée quand de l'agmatine est ajoutée au milieu de culture (Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011) lors d'un choc acide de 20 minutes à pH 4. Ces données sont insuffisantes pour conclure sur l'implication système AgDI dans la survie de *B. cereus* à pH acide.

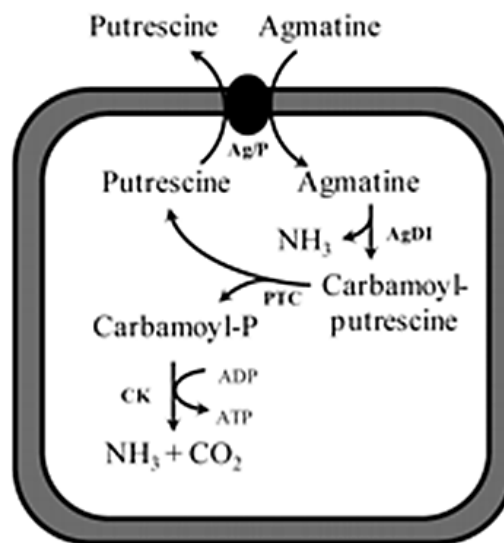


FIGURE 11 : Représentation schématique de la voie de l'agmatine déiminase chez *Ib. sakei*. Ag/P : antiporteur agmatine / putrescine. AgDI : agmatine déiminase . PTC : putrescine carbamoyltransférase. CK : carbamate kinase. D'après (Rimaux *et al.*, 2012).

### 2.5.c: Uréases

Les systèmes de type uréases catalysent l'hydrolyse de l'urée en deux molécules d'ammoniac et une molécule de CO<sub>2</sub>. Comme pour les systèmes présentés dans les paragraphes précédents, l'ammoniac produit pourra capturer des protons intracellulaires pour former des ions ammonium et ainsi conduire à l'alcalinisation du cytoplasme. L'urée est une molécule retrouvée dans de nombreux environnements (sols et eaux en particulier) et qui est naturellement produite par le corps humain (jusqu'à 30 g par jour (Konieczna *et al.*, 2012)). Les uréases ont été particulièrement étudiées car elles sont un facteur de virulence majeur chez de nombreux pathogènes comme *H. pylori*, où elles jouent un rôle important dans la résistance au stress acide lors de la colonisation de l'estomac par les bactéries (Eaton *et al.*, 1991, Pflock *et al.*, 2006), ainsi que chez *S. aureus* (Murchan *et al.*, 2004). Cette enzyme est

également active chez *Mycobacterium tuberculosis*, *Cl. perfringens* et les *E. coli* enterohémorragiques (Clemens *et al.*, 1995, Dupuy *et al.*, 1997, Orth *et al.*, 2006). Dix gènes codant pour des systèmes de type uréases ont été identifiés chez *B. cereus* ATCC 10987 (de BCE3657 à BCE3666) (Rasko *et al.*, 2004). Néanmoins, ces gènes ne sont pas distribués uniformément au sein du groupe *B. cereus* : 9 souches sur 49 souches testées possédaient une activité uréasique. De plus, des expérimentations ont démontrées que les uréases de *B. cereus* ne jouaient pas de rôle majeur dans la survie au choc acide mais étaient probablement utilisées pour favoriser la respiration anaérobie de *B. cereus* dans des environnements pauvre en azote et riche en urée (Mols and Abee, 2008).

## 2.6: Modifications membranaires

La membrane cytoplasmique bactérienne joue un rôle primordial chez tous les organismes en protégeant la cellule et en assurant un grand nombre de fonctions (contrôle des flux d'ions, captation des éléments nutritifs, reconnaissance de signaux moléculaires externes...). La membrane cytoplasmique est majoritairement composée de phospholipides organisés en bicouche. Ces lipides sont des triesters de glycérol ; c'est-à-dire un glycérol estérifié en position *sn1* et *sn2* par deux chaînes hydrocarbonées d'acides gras et en *sn3* par un acide phosphorique. Il existe une grande variété de phospholipides dans les membranes bactériennes en fonction du type d'acide phosphorique et du type d'acides gras. Les acides gras peuvent être saturés ou insaturés, posséder des ramifications ou encore un cycle propane (FIGURE 12).

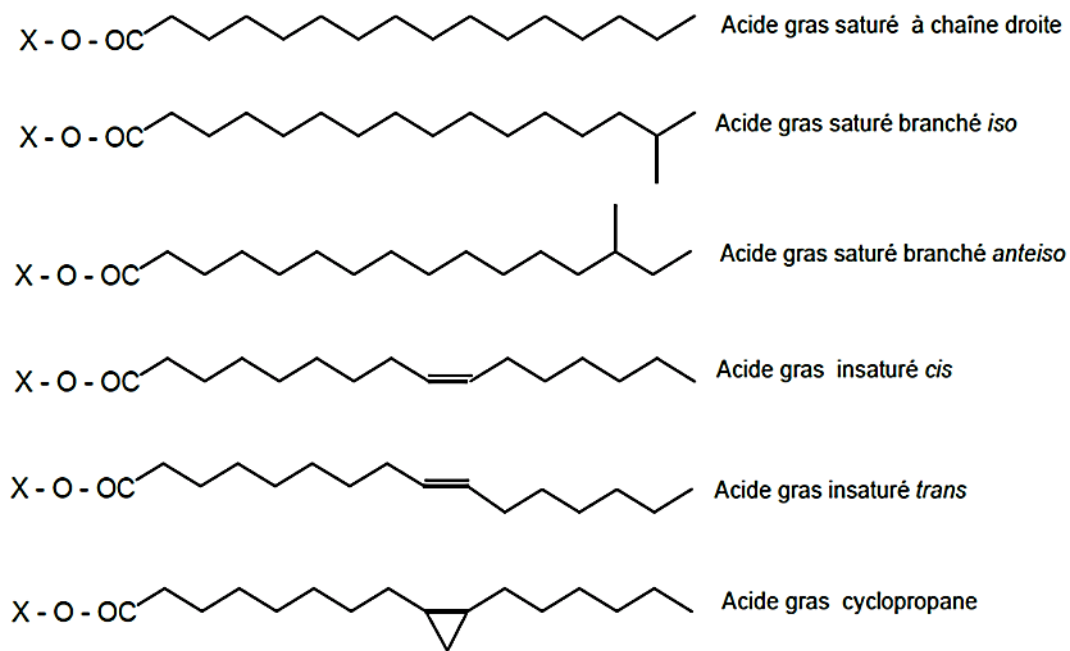


FIGURE 12 : Schéma présentant les différentes conformations possibles des acides gras dans les membranes bactériennes

D'autres lipides existent dans les membranes bactériennes tels que les sphingolipides, les glycolipides, les hopanoïdes ou encore les caroténoïdes. De nombreuses protéines sont également enchâssées ou liées dans la membrane bactérienne (Alberts *et al.*, 2005).

Deux paramètres physiques de la membrane plasmique sont essentiels pour la cellule car intimement liés aux fonctions des protéines membranaires : la fluidité et la perméabilité membranaire. La fluidité membranaire permet aux protéines membranaires de diffuser rapidement dans la bicouche lipidique ce qui est important pour la signalisation cellulaire, la division cellulaire ou encore l'adressage des protéines néosynthétisées vers leur lieu d'action. La fluidité de la membrane plasmique dépend de sa composition en phospholipides et en particulier de sa composition en acides gras. La perméabilité membranaire permet à la cellule d'ajuster les concentrations intracellulaires de différentes molécules présentes dans son cytoplasme. Les molécules chargées comme les ions ou les macromolécules (glucose, acides aminés, protéines...) ne peuvent traverser la membrane cytoplasmique par diffusion simple. Ces molécules sont transportées dans le cytoplasme par une grande variété de transporteurs protéiques présents dans la membrane cytoplasmique (Alberts *et al.*, 2005).

La membrane étant la première structure cellulaire en contact avec le milieu extérieur, elle sera la première à être affectée par des conditions environnementales néfastes qui vont altérer sa composition et ses propriétés physiques. Les effets du stress thermique sur la membrane cytoplasmique sont bien documentés. L'augmentation de la température suffit à faire passer les chaînes d'acides gras saturés d'une conformation *trans* à une conformation *cis* ce qui entraîne une désorganisation de la bicouche lipidique et conduit à une augmentation de la fluidité membranaire.

Les adaptations membranaires au(x) stress acide(s) sont peu décrites dans la littérature. Les données existantes montrent trois stratégies principales d'adaptation. Premièrement une augmentation de la longueur des chaînes carbonées d'acides gras est observée quand le pH diminue chez *Streptococcus macedonicus* et *S. mutans* (Papadimitriou *et al.*, 2007, Fozo and Quivey, 2004). Deuxièmement, il a été observé chez *E. coli* une augmentation de la formation des acides gras cyclopropanes lors de chocs acides. Un mutant du gène *cfa*, défaillant dans la synthèse de ces acides gras cyclopropanes, est plus sensible au stress acide que la souche sauvage (Chang and Cronan, 1999). A l'inverse chez *L. lactis* la cyclopropanation des acides gras n'est pas indispensable à la survie aux pH acide chez cette bactérie (To *et al.*, 2011). Troisièmement, chez *L. monocytogenes* il a été montré une augmentation de la proportion d'acides gras *iso* par rapport aux acides gras *anteiso* pour des cellules cultivées à pH acide. Quand les cellules sont cultivées à pH alcalin, on observe l'effet inverse, c'est la proportion d'acide gras branchés *antéiso* qui augmente (Giotis *et al.*, 2007). Ces trois types d'adaptations au stress acide conduisent toutes à une diminution de la fluidité membranaire et donc à une diminution de la perméabilité membranaire aux protons (Shechter, 1999). De cette manière les bactéries peuvent limiter l'acidification de leur cytoplasme lors d'un stress acide.

Les adaptations membranaires de *B. cereus* aux pH acides n'ont pas été étudiées. Néanmoins, il a déjà été démontré, pour d'autres stress, que cette bactérie modifiait sa composition en phospholipides membranaires de façon à augmenter sa fluidité membranaire (de Sarrau *et al.*, 2012b).

## 2.7: Adaptations métaboliques

Les microorganismes possèdent différents types de métabolismes qui permettront à la cellule de produire l'énergie nécessaire à sa croissance, à la synthèse de macromolécules et à un



grand nombre de fonctions essentielles. Le type de métabolisme utilisé va être influencé par les paramètres environnementaux physico-chimiques et nutritionnels.

L'un des objectifs de ce travail de thèse étant d'étudier l'effet de l'atmosphère sur la physiologie de *B. cereus*, ce paragraphe sera axé sur le comportement des microorganismes vis-à-vis de l'atmosphère.

*B. cereus* possède un métabolisme aéro/anaérobie facultatif. En présence d'oxygène la bactérie adoptera un métabolisme de type respiratoire tandis qu'en anaérobiose un métabolisme fermentaire sera utilisé. *B. cereus* est également capable d'adopter un métabolisme respiratoire anaérobie en présence de nitrate (Rosenfeld *et al.*, 2005).

### 2.7.a: Respiration aérobie

En présence d'oxygène le métabolisme respiratoire aérobie se décompose en une série de réactions d'oxydo-réduction qui vont emprunter successivement trois grandes voies métaboliques : la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) et la chaîne respiratoire (FIGURE 13). L'accepteur final d'électrons est l'oxygène. La chaîne respiratoire de *B. cereus* est composée de plusieurs NADH déshydrogénases membranaires codées par les gènes *yumB*, *yjID*, *yutJ* et *yrkE*, d'une succinate déshydrogénase codée par *sdhABC*, du cytochrome  $bc_1$  qui transfère les électrons au cytochrome c oxydase (gène *ctaDEF*), au cytochrome bd quinol oxydase (gène *cydAB*) et enfin au cytochrome  $aa_3$  quinol oxydase (gène *qoxABCD*) (Zigha *et al.*, 2007). En présence d'oxygène, les différents cofacteurs réduits, générés par la glycolyse et le cycle des acides tricarboxyliques (NADH et FADH), sont ré-oxydés par la chaîne respiratoire ce qui conduit à la libération de protons dans le milieu extracellulaire et à la création d'une force proton motrice. L'oxygène présent va capter les électrons libérés dans le milieu intra cellulaire avant d'être réduit en  $H_2O$  grâce à l'entrée des protons  $H^+$  dans le cytoplasme via la force proton motrice qui génère en parallèle de l'ATP via les ATPases (Prescott *et al.*, 2007). La respiration aérobie est également caractérisée par l'absence de synthèse d'acides organiques, via la fermentation des acides mixtes, exception faite de l'acétate qui peut être produit en aérobiose quand le flux de carbone issue de la glycolyse dépasse les capacités du TCA (Clair *et al.*, 2012).

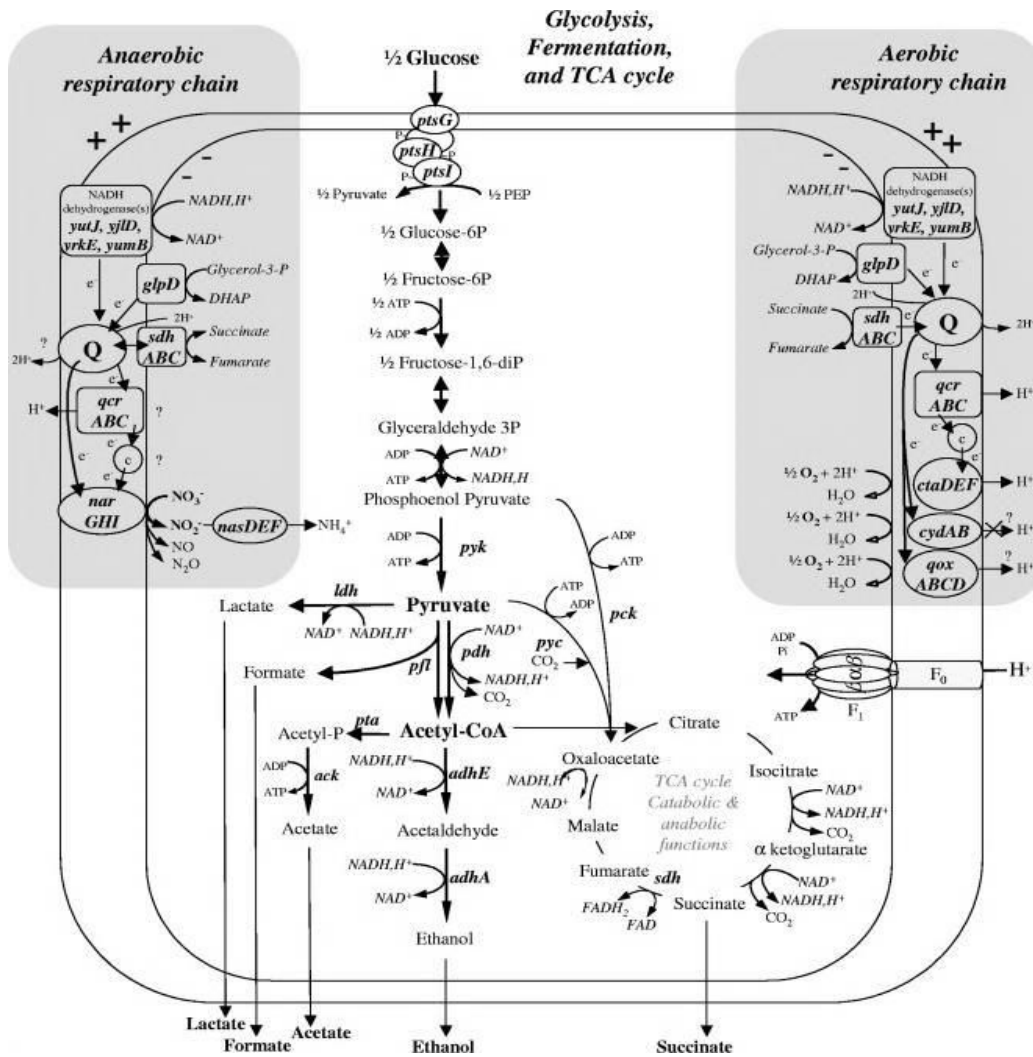


FIGURE 13 : Schéma représentant les voies respiratoires et fermentaires de *B. cereus*. D'après (Duport *et al.*, 2006)

### II.7.b: Respiration anaérobie

En absence d'oxygène la mise en place d'une chaîne respiratoire doit se dérouler avec un accepteur d'électron autre que l'oxygène. Ces composés peuvent être : le nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), le nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), les ions ferriques ( $\text{Fe}_3^+$ ), les sulfites ( $\text{SO}_3^-$ ), le thiosulfate ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), le fumarate ou encore le carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) (Singleton. and Sainsbury., 2001). Néanmoins, l'énergie produite étant dépendante du potentiel d'oxydo-réduction du couple d'accepteurs finaux, l'utilisation de ces molécules à la place de l'oxygène entrainera une efficacité moindre de la chaîne respiratoire (Ferguson and richardson, 2004). *B. cereus* est capable d'utiliser le nitrate comme accepteur final d'électron. Cette capacité lui est conférée par les opérons *narGHIJ* et *nasDEF* codant pour des sous unités de la nitrate et nitrite réductase (FIGURE 13). Lors de la respiration anaérobie en présence de nitrate *B. cereus* réduit sa production de lactate, de

formiate et d'éthanol et augmente sa production d'acétate génératrice d'ATP *via* l'acétate kinase (Rosenfeld *et al.*, 2005).

### 2.7.c: Fermentation des acides mixtes

En l'absence d'accepteurs d'électrons *B. cereus* a la capacité de s'orienter vers un métabolisme de type fermentaire de type acide mixte à partir de sources d'énergies carbonées telles que le glucose. La première phase de la fermentation des acides mixtes correspond à la glycolyse qui est une phase commune avec le métabolisme respiratoire. Au cours de cette phase deux molécules d'ATP, deux molécules de pyruvate et deux molécules de NADH + H<sup>+</sup> sont formées par molécule de glucose consommée (FIGURE 13). Dans une seconde phase, le pyruvate est catabolisé en métabolites finaux et notamment en acides organiques. Les molécules produites à l'issue de la fermentation des acides mixtes sont :

- le lactate, qui résulte de la réduction du pyruvate *via* la lactate déshydrogénase. Cette réaction permet la régénération d'une molécule de NAD<sup>+</sup> à partir du NADH + H<sup>+</sup>.
- le formiate, formé *via* la pyruvate formiate lyase à partir du pyruvate. Une molécule d'acétyl-CoA est également formée au cours de la réaction.
- le succinate, généré par la pyruvate carboxylase à partir du pyruvate ou par la phosphoénolpyruvate carboxylase à partir du phosphoénolpyruvate. La production de succinate est une voie minoritaire de la fermentation des acides mixtes chez *B. cereus* (Zigha *et al.*, 2007).
- l'acétate, successivement synthétisé à partir de l'acétyl-CoA par la phosphotransacétylase et l'acétate kinase. La synthèse d'une molécule d'acétate est accompagnée par la production d'une molécule d'ATP.
- l'éthanol, successivement formé à partir de l'acétyl-CoA par les alcools déshydrogénase E et A. La synthèse d'une molécule d'éthanol régénère deux molécules de NAD<sup>+</sup> à partir du NADH + H<sup>+</sup>.

### 2.7.d: Métabolisme et stress acide

Le stress acide peut induire des modifications du métabolisme central des bactéries. Ainsi chez *S. mutans* cultivé à pH 5.5 en anaérobiose, une diminution de la production de formiate

et d'acétate est observée en parallèle d'une augmentation de la production de lactate (Iwami *et al.*, 1992). A l'inverse, chez *L. plantarum* une diminution de la production de lactate est observée tandis que la production d'acétate reste inchangée (Heunis *et al.*, 2014). Chez *B. cereus* les seules données disponibles sont des données transcriptomiques. Ces données montrent que les gènes impliqués dans la fermentation butanediolique sont surexprimés lors de cultures à pH 5.5 en comparaison à pH 7. Une diminution de l'expression des gènes codant pour la lactate déshydrogénase est observée en parallèle (Mols *et al.*, 2010a). L'influence du pH acide sur le métabolisme du glucose n'a pas été plus étudiée chez *B. cereus*.

## 2.8: La fermentation butanediolique

### 2.8.a : Généralités

La fermentation butanediolique est une voie métabolique annexe à la fermentation des acides mixtes qui conduit à la formation de molécules de 2,3 BD, une molécule d'intérêt industriel utilisée comme agent anti-gel, comme additif pour les carburants liquides ou comme précurseur de butadiène, utilisés pour la synthèse de caoutchouc. Cette voie est utilisée par certaines bactéries appartenant aux genres *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* ou encore *Serratia*. La fermentation butanediolique débute après la conversion de monosaccharides (hexoses ou pentoses) en pyruvate *via* la glycolyse ou la voie des pentoses phosphates. Cette fermentation peut suivre une voie directe ou une voie cyclique. Ces voies sont représentées FIGURE 14 et 15.

La voie directe est la plus fréquemment utilisée par les microorganismes capables de faire la fermentation butanediolique. Elle débute par la condensation de deux molécules de pyruvate en  $\alpha$ -acétolactate grâce à l'enzyme  $\alpha$ -acétolactate synthase (ALS). La réaction s'accompagne du relargage d'une molécule de  $\text{CO}_2$  et de la consommation d'un proton  $\text{H}^+$ . En conditions d'aérobiose, l' $\alpha$ -acétolactate peut spontanément se décarboxyler pour former une molécule de diacétyle qui est convertie en acétoïne par l'enzyme acétoïne (diacetyl) réductase (BUTA). En anaérobiose, l' $\alpha$ -acétolactate est décarboxylé en acétoïne par l' $\alpha$ -acétolactate décarboxylase (ALD) avec rejet d'une molécule de  $\text{CO}_2$  et consommation d'un proton  $\text{H}^+$ . Quelle que soit l'atmosphère considérée et en conditions légèrement acide (PH optimum = 6), l'acétoïne est réduite en 2,3 BD par l'acétoïne réductase (aussi appelée 2,3 BD déshydrogénase) (AR ou BDH), avec régénération d'une molécule de  $\text{NAD}^+$  *via* le  $\text{NADH} + \text{H}^+$  (FIGURE 14). Cette dernière étape de la voie du 2,3 BD est réversible, en effet L'AR est capable de transformer le

2,3 BD en acétoïne en conditions de pH alcalin via son activité 2,3 BD deshydrogénase (Ji *et al.*, 2011). Dans la suite de ce manuscrit il sera convenue que l'acronyme AR sera sélectionné pour signifier acétoïne réductase..

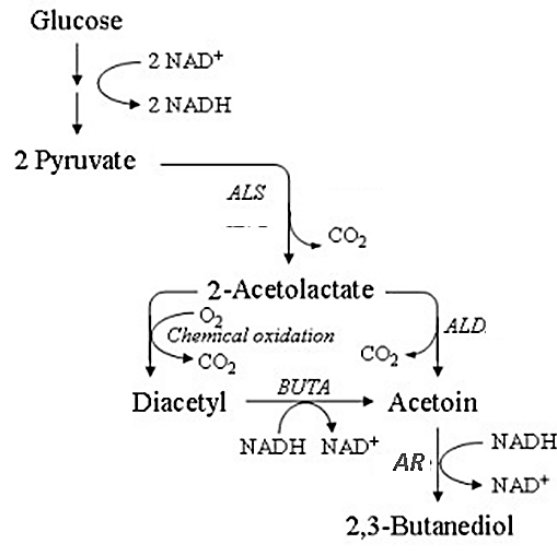


FIGURE 14 : Schéma représentant les différentes étapes de la voie directe de la fermentation butanediolique. ALS :  $\alpha$ -acétolactatesynthase. ALD :  $\alpha$ -acétolactatedécarboxylase. BUTA : acétoïne (diacétyl) réductase. AR : Acétoïne réductase / 2,3-butanediol déshydrogénase. D'après (Oliveira *et al.*, 2005).

Initialement, les activités acétoïne-diacétyl reductase et acétoïne réductase étaient attribuées à deux enzymes différentes (Strecker and Harary, 1954). Des recherches postérieures démontrent cependant que ces deux enzymes ne font en réalité qu'une (Bryn *et al.*, 1971). Il a été également montré que l'acétoïne réductase avait plus de substrats qu'initialement envisagés. Il conviendrait donc d'appeler cette enzyme la L-glycol déhydrogenase (Carballo *et al.*, 1991).

La voie cyclique du 2,3 BD est une voie annexe, moins fréquemment utilisée, qui a été théorisée en 1956 pour expliquer la dégradation de composés à 4 carbones en acétate chez *Acinetobacter calcoaceticus* (Heym and Juni, 1956). Cette hypothèse a rapidement été consolidée par la détection de métabolites intermédiaires et d'activités enzymatiques caractéristiques de ce cycle chez *Pseudomonas putida*, *Klebsiella oxytoca*, *B. subtilis* ou encore *B. cereus* (Hosaka *et al.*, 1999, Hosaka *et al.*, 2001, Kominek and Halvorson, 1965, Juni and Heym, 1956). Il semble désormais accepté que ce soit la décarboxylation spontanée de l' $\alpha$ -acétolactate en diacétyl qui initie le cycle du 2,3 BD uniquement quand les

répressions cataboliques liées à la présence du glucose (Carbon catabolite repression) sont levées. Ces répressions sont médiées par le répresseur catabolique CcpA, qui contrôle l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans la réponse catabolique, en interagissant avec les sites *cre* de leurs promoteurs (Kim *et al.*, 2005). Cependant en raison de l'effet toxique du diacétyle pour de nombreuses bactéries et à la faible efficacité de conversion de l' $\alpha$ -acétolactate en diacétyle il est communément admis que le cycle du 2,3 BD n'explique pas à lui seul la production d'acétate à partir de la dégradation de molécules à 4 carbones (Xiao and Xu, 2007).

La première réaction du cycle consiste en la transformation du diacétyle en acétylacétoïne grâce au système enzymatique acétoïne déshydrogénase. La réaction se déroule en deux étapes. La première entraîne la formation d'une molécule d'hydroxyméthyl-TPP et libère une molécule d'acétate. La seconde étape est la dégradation de l'hydroxyméthyl-TPP en acétylacétoïne avec consommation d'une molécule supplémentaire de diacétyle et libération d'une molécule de thiamine pyrophosphate. Dans une seconde réaction l'acétylacétoïne est réduite en acétylbutanediol par l'acétoïne réductase. Enfin l'acétylbutanediol est décarboxylé en 2,3 BD par l'acétylbutanediol déshydrogénase avec rejet d'une molécule d'acétate (FIGURE 15).

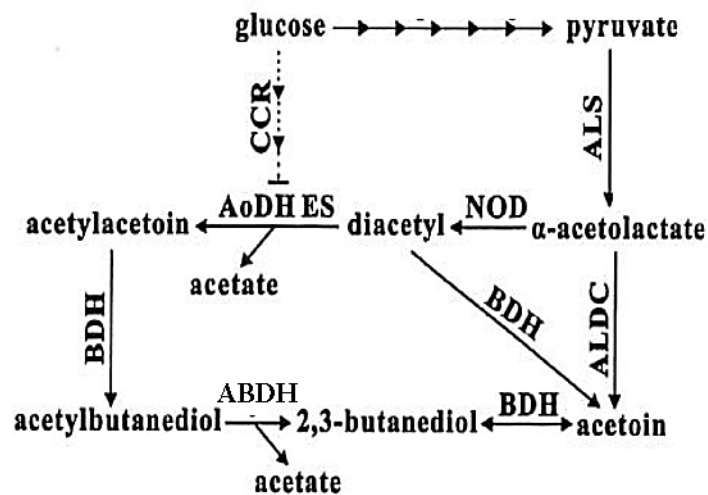


FIGURE 15 : Représentation schématique du cycle du 2,3-butane-1,2-diol. ALS :  $\alpha$ -acétolactate synthase; ALDC:  $\alpha$ -acétolactate décarboxylase; BDH: acétoïne réductase; AoDH ES: acétoïne déshydrogénase enzyme system; ABDH: acétylbutanediol déshydrogénase. NOD : non enzymatic oxydative decarboxylation. CCR : carbon catabolite repression. D'après (Xiao and Xu, 2007)

### 2.8.b: Origine des différents isomères du 2,3 BD

Trois stéréo-isomères du 2,3 BD existent : le (2R,3R)-2,3 BD, le (2S,3S)-2,3 BD et le (2R,3S)-2,3 BD aussi appelé méso-2,3 BD (FIGURE 16).

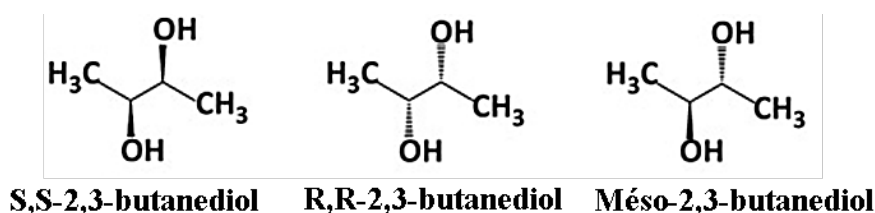


FIGURE 16 : Représentation selon les règles CIP des trois stéréo-isomères du 2,3 BD.

L'isomère du 2,3 BD produit à l'issue de la fermentation butanediolique est dépendant du microorganisme étudié. Les données disponibles sur l'isomère de 2,3 BD produit en fonctions de la bactérie étudiée sont résumées dans le tableau 4.

Organisme	Méso-2,3-BD	R,R-2,3-BD	S,S-2,3-BD
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+		+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+		+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+		+
<i>Enterobacter cloacae</i>			+
<i>Paenibacillus polymyxa</i>		+	
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
<i>Bacillus licheniformis</i>		+	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		+	

TABLEAU 4: Tableau résumant les isomères de 2,3 BD produits par différentes bactéries à partir d'un substrat de type glucose. Inspiré de (Ji *et al.*, 2011).

Si la stéréo-isomérisation du 2,3 BD à un intérêt pour l'industrie chimique, les formes R,R et S,S-2,3 BD semblent plus indiquées pour la synthèse chimique d'hydrocarbures (Wang *et al.*, 2013). Il n'a jamais été démontré que ces stéréo-isomères avaient des rôles différents dans la physiologie bactérienne. L'origine de ces différents isomères est due à l'existence chez les bactéries de trois types d'enzyme 2,3 BD déshydrogénase, les R,R, les S,S et les R,S-2,3 BD déshydrogénase. Aucune 2,3 BD racémase n'a jamais été détectée. La FIGURE 17 illustre les voies de synthèse ou sont impliquées les différentes enzymes 2,3 BD déshydrogénases.

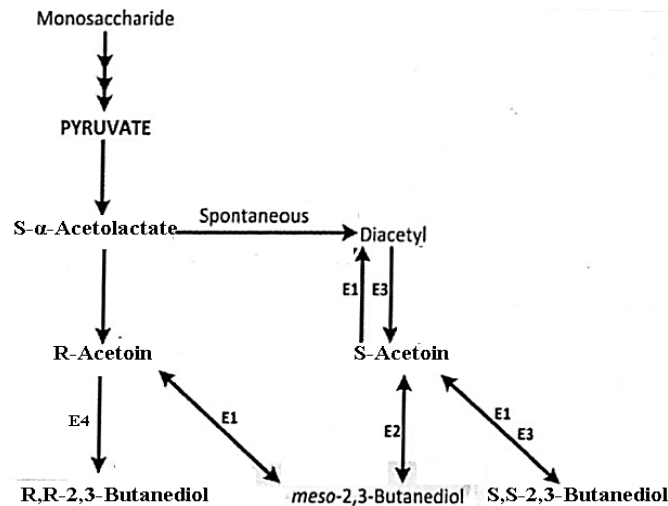


FIGURE 17 : Schéma récapitulant les voies de formation des différents stéréo-isomères du 2,3 BD. E1 : meso-2,3 BD déshydrogénase (R-acétoin forming). E2 : meso-2,3 BD déshydrogénase (S-acétoin forming). E3 : S-S-2,3 BD déshydrogénase (S-acétoin forming). E4 : R,R-2,3 BD déshydrogénase (R-acétoin forming). D'après (Ji *et al.*, 2011).

La distribution stéréo-isomérique du 2,3 BD n'a jamais été étudiée chez *B. cereus*. Sur la base des données génétiques disponibles pour la souche ATCC14579 l'enzyme codée par le gène BC0668 est prédite comme étant une R,R-2,3 BD déshydrogénase.

## 2. 9 La réponse de tolérance à l'acide (ATR)

La réponse de tolérance à l'acide, aussi appelée ATR (pour Acide Tolerance Response), est un phénomène observé quand des bactéries cultivées à pH neutre ou à pH acide non létal sont exposées à un choc acide létal (FIGURE 18). Les bactéries cultivées à pH acide non létal ont une meilleure survie que les cellules cultivées à pH neutre. L'ATR est observé chez un grand nombre de bactérie comme *Serratia plymuthica* (Vivijs *et al.*, 2014), *L. monocytogenes* (Smith *et al.*, 2013), *Bifidobacterium longum* (Jin *et al.*, 2012), *B. cereus* (Jobin *et al.*, 2002)... Cette meilleure survie des cellules cultivées à pH acide non létal s'explique par la mise en place lors de la culture à bas pH, d'un ensemble de mécanismes d'adaptation au stress acide (dont peuvent faire partie les mécanismes décrits dans la partie I.II de ce manuscrit) et qui permettront à la cellule d'être parée pour affronter des pH encore plus acides.



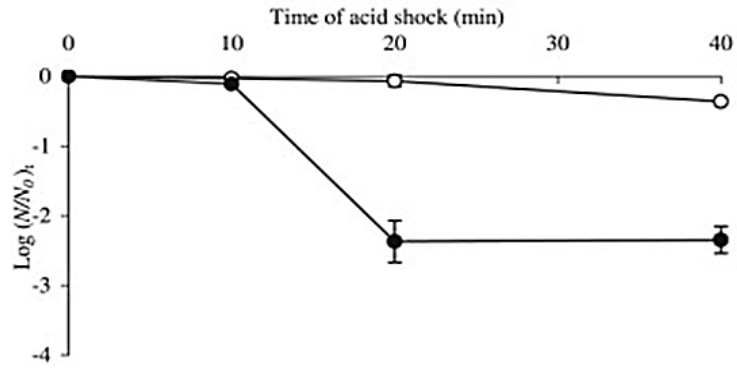


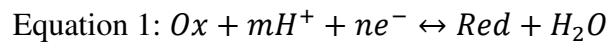
FIGURE 18 : Graphique représentant la survie à un choc acide à pH 4 de cellules de *B. cereus* ATCC14579 cultivées à pH 7 (ronds noirs) ou à pH 5.5 (rond blanc) en fonction du temps de choc (Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011).

### 3 ADAPTATIONS AUX VARIATIONS DE POTENTIEL D'OXYDO-REDUCTION ( $E_h$ )

En plus de s'adapter aux bas pH, les microorganismes, tels *B. cereus*, ont la capacité de s'adapter aux variations de  $E_h$ .

#### 3.1 Le potentiel d'oxydo-réduction

Le potentiel d'oxydo-réduction est une variable physico-chimique, généralement exprimée en millivolt, qui décrit la réactivité des espèces chimiques entre elles et permet donc de mesurer la capacité d'un milieu à être oxydé ou réduit. Le  $E_h$  en milieu aqueux est définie par les équations 1 et 2 dérivées de l'équation de Nernst où Ox = oxydant, Red = réducteur, R = constante universelle des gaz parfaits, F= constante de Faraday.



$$\text{Equation 2: } Eh = E^{\circ}h - \frac{2,3mRT}{nF} pH + \frac{2,3RT}{nF} \log \frac{Ox}{Red}$$

Ainsi l'influence du pH sur l'activité redox est un élément pris en considération dans l'équation permettant le calcul du  $E_h$ . En 1959 une équation permettant de calculer le  $E_h$  à pH 7 pour des milieux à un pH X a été établie (Equation 3). La valeur ainsi obtenue et appelée  $E_{h7}$  permet de s'affranchir de l'effet du pH du milieu aqueux considéré sur la mesure du  $E_h$  (Leistner and Mirna, 1959).

$$\text{Equation 3: } E_{h7} = E_h - [(7 - pHx) * \alpha]$$

Cette dernière équation met en évidence un coefficient  $\alpha$  appelé coefficient de Nernst. Ce coefficient est dépendant du milieu biologique utilisé et doit être déterminé expérimentalement, sa valeur correspondant au coefficient  $E_h$ -pH de déviation propre à ce milieu biologique.  $\alpha$  est égal à 59 mV par unité pH pour les couples redox faisant intervenir un même nombre de protons que d'électrons.

#### 3.2 Exemples de $E_h$ dans quelques aliments et environnements

Le  $E_h$  des produits laitiers a été particulièrement étudié. Quelques données disponibles sont représentées dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU 5 : Valeurs d' $E_h$  dans différents aliments.

Produit	$E_h$ (mV)	Référence
Lait	+100 à +400 mV	(Aubert <i>et al.</i> 2002)
Camembert	-360 mV à +360 mV	(Abraham <i>et al.</i> 2007)
Cheddar	-140 mV à -340 mV	(Topcu <i>et al.</i> 2008)
Eau du robinet	+500 mV	(Abraham <i>et al.</i> 2013)
Jus d'Orange	-180 à +360 mV	(Alwazeer <i>et al.</i> 2003)

### 3.3 Variations de $E_h$ dans les milieux biologiques

Le  $E_h$  d'un milieu biologique peut varier au cours du temps car il est fonction de la composition chimique et en particulier en oxygène dissous du milieu. L'oxygène dissous étant une molécule parmi les plus oxydante ( $E_0' = +815$  mV), la modification de sa concentration dans le milieu, par divers procédés (électro-réduction, dégazage...) peut entraîner de fortes variations de  $E_h$  (entre 50 à 60 mV par log d'oxygène dissous éliminé) (Tango and Ghaly, 1999). En conséquence la surface de contact entre un milieu et l'air ambiant peut être un facteur déterminant pour la valeur de son  $E_h$  (Jacob, 1970).

C'est pourquoi, l'une des méthodes couramment utilisée pour modifier le  $E_h$  des aliments consiste à chasser l'oxygène dissous et le remplacer par des gaz neutres ou réducteurs comme le dioxyde de carbone ou le dihydrogène. Ces gaz ont l'avantage d'avoir peu d'impacts sur la composition des produits et permettent donc de moduler le  $E_h$  d'un aliment sans modifier ses autres paramètres qualitatifs. De même certains gaz comme l'hydrogène permettent d'atteindre des valeurs fortement réductrices favorables à la croissance de bactéries ou levures comme *Sporidiobolus ruinerii* et n'ont pas d'effet toxique sur les cellules comme pourraient l'avoir certaines molécules réductrices comme le DTT (Feron *et al.*, 2007). Néanmoins l'utilisation de gaz pour contrôler ou modifier le  $E_h$  d'un aliment représente un cout non négligeable en terme d'infrastructure et de sécurité.

Certaines molécules chimiques peuvent modifier le  $E_h$  d'un milieu ou d'un aliment. Parmi les molécules oxydantes figurent le peroxyde d'hydrogène ( $E_0' = +1362$  mV), le ferricyanure de potassium ( $E_0' = +435$  mV) ou encore l'acide ascorbique ( $E_0' = +58$  mV). Parmi les molécules réductrices figurent le glutathion ( $E_0' = -230$  mV), la cystéine ( $E_0' = -340$  mV) ou bien le dihydrogène ( $E_0' = -414$  mV) (Vanysek, 1994). Ces molécules ont été utilisées en industrie laitière principalement pour réduire le  $E_h$  du lait lors de la fabrication des yaourts (Dave and

Shah, 1998). Si ces molécules permettent en effet d'obtenir des niveaux de  $E_h$  réducteurs, elles entraînent également des modifications dans les cinétiques de fermentation voire inhibent la croissance bactérienne comme c'est le cas pour le DTT et certaines molécules oxydantes (Cesselin *et al.*, 2009).

### 3.4 Adaptations des bactéries aux variations de $E_h$

Les variations d' $E_h$  peuvent affecter la physiologie des microorganismes de plusieurs manières. Chez *E. coli* il a été démontré que des  $E_h$  oxydants, générés en aérobiose par ajout de composés oxydants, inhibaient le transport de certains ions comme le  $K^+$  et  $H^+$ . Il semble en effet que la balance thiol : disulfure des sites actifs de certains transporteur soient affectées par le  $E_h$  oxydant ce qui limite leur efficacité (Riondet *et al.*, 1999). A l'inverse des  $E_h$  réducteurs augmentaient la perméabilité membranaire aux protons  $H^+$  ce qui affecte la régulation du PH interne (Riondet *et al.*, 1999). Chez *S. typhimurium* il a été observé que les conditions réductrices pouvaient induire l'activation de la réponse générale aux stress par activation de l'expression gène codant pour le facteur  $\sigma^S$  (Komitopoulou *et al.*, 2004). De nouveau chez *E. coli*, il a été démontré que les variations de  $E_h$  affectaient les flux métaboliques en favorisant la formation de lactate au détriment de l'acetyl-CoA (Riondet *et al.*, 1999).

Cette modification des flux métabolique en fonction du  $E_h$  a également été observée chez *B. cereus*. En effet, l'étude de l'adaptation de la souche *B. cereus* F4430/73 cultivée en anaérobiose à des conditions initiales d' $E_h$  faiblement réduit (+45 mV) ou fortement réduit (-150 mV) a mis en évidence plusieurs phénomènes : Une vitesse de croissance plus faible lors d'une exposition à des  $E_h$  fortement réduits que pour des  $E_h$  faiblement réduits, la biomasse finale restant identique. Des adaptations métaboliques sont également observées. En effet, la production de lactate et d'éthanol est sensiblement augmentée à bas  $E_h$  de façon à obtenir une meilleure régénération du  $NAD^+$  intracellulaire. Enfin, *B. cereus* module la production de ses toxines en fonction du  $E_h$  de son milieu. En conditions d' $E_h$  fortement réduit la production de la toxine Hbl est fortement augmentée par rapport à sa production dans des conditions de  $E_h$  faiblement réduits. Cette observation est également vérifiée, mais dans une moindre mesure pour la toxine Nhe (Zigha *et al.*, 2006).

Il a été démontré chez *B. cereus* qu'au moins trois systèmes de régulation sensibles aux variations d' $E_h$  sont impliqués dans la modulation du catabolisme et la production de facteurs

de virulence. Il s'agit du système à deux composants ResD/ResE, du régulateur FnR (Duport *et al.*, 2006, Esbelin *et al.*, 2009, Esbelin *et al.*, 2008, Zigha *et al.*, 2007) et de la protéine OhrR (Clair *et al.*, 2013) Les figure 19 et 20 récapitulent les données disponibles sur le mode d'action de ces protéines.

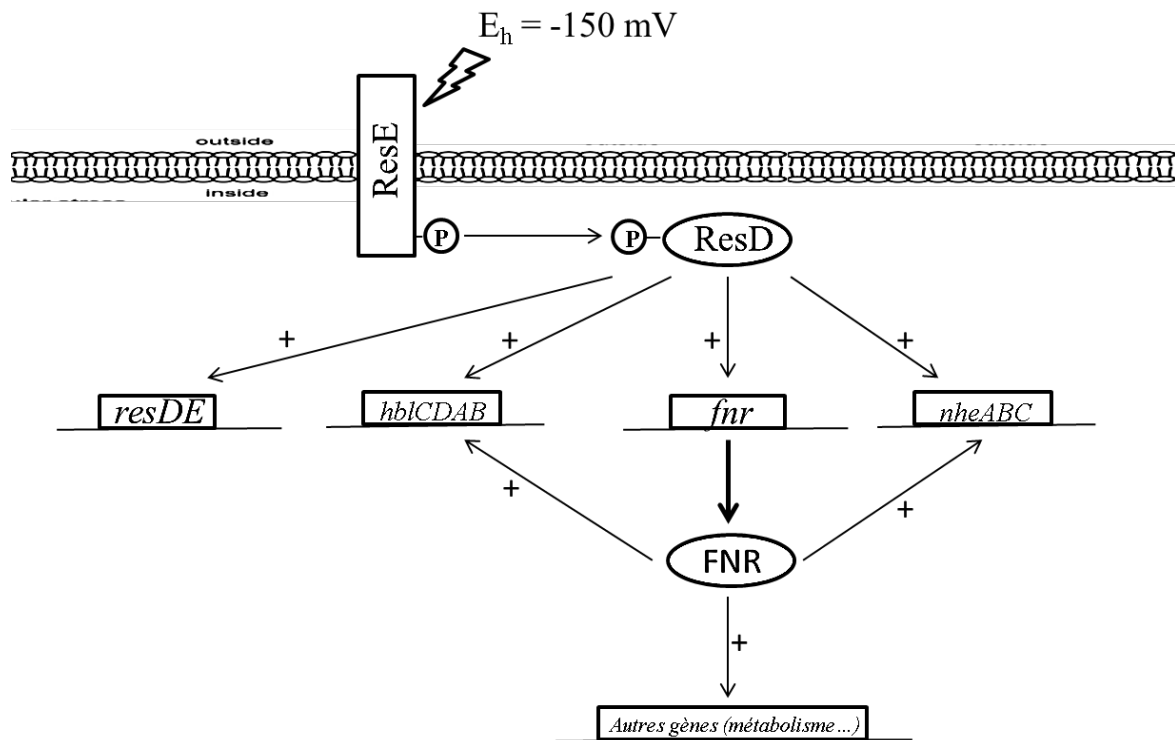


FIGURE 19 : Représentation schématique simplifiée du mode de fonctionnement du système à deux composants ResD/ResE. Pour un  $E_h$  de  $-150 \text{ mV}$ , ResE phosphoryle ResD via son activité kinase. ResD phosphorylé va activer la transcription des gènes *resDE*, *fnr*, et des opérons *hbl* et *nhe*. La protéine FNR va elle aussi induire l'expression des opérons *hbl*, *nhe* et d'autres gènes. D'après (Zigha, 2007).

Concernant OhrR, les données obtenues montrent que la protéine OhrR se retrouverait sous deux formes, une forme oxydée et une forme réduite. La forme réduite serait un dimère lié de manière non covalente. La forme oxydée serait un dimère covalent dont les deux sous unités seraient liées par des ponts disulfure au niveau des cystéines de la protéine. La protéine pourrait passer de la forme réduite à la forme oxydée en présence de ROS et de la forme oxydée à la forme réduite en présence de molécules réductrices telles que les Cystéines intracellulaires. La forme réduite se fixe en amont des gènes ou opéron codant pour des toxines putatives (Clair *et al.*, 2013).

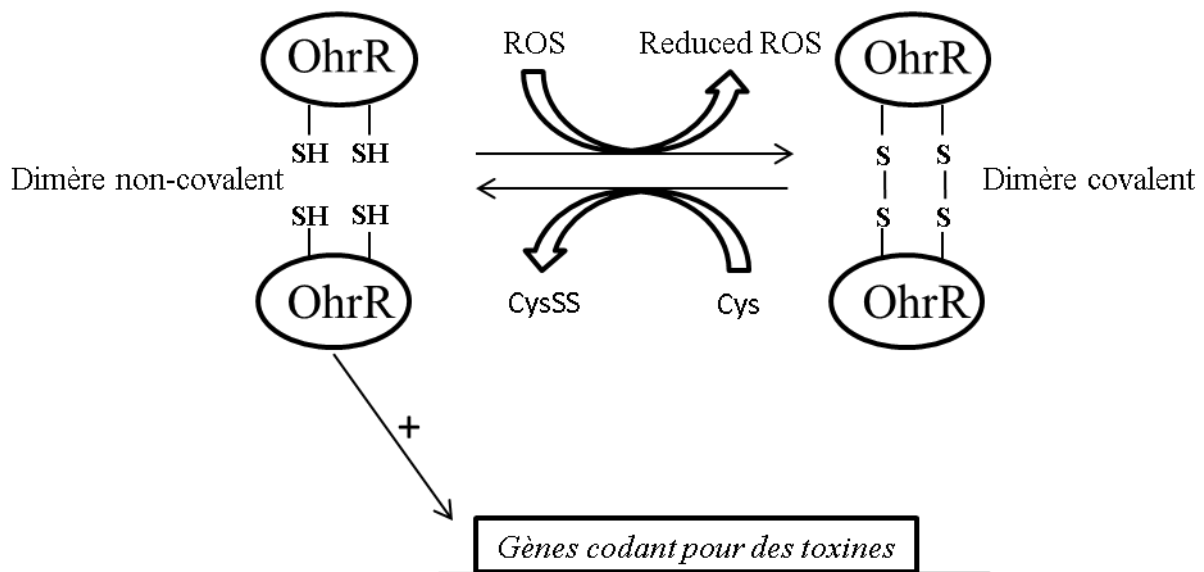


FIGURE 20 : Représentation schématique simplifiée du mode de fonctionnement du système OhrR. Sous sa forme de dimère non-covalent OhrR va induire l'expression de plusieurs opérons (*hbl*, *nhe*) ou gènes codant pour des toxines (*entB*, *entC*, *entFM*...). ROS : Espèces réactives de l'oxygène. Cys : Cystéines réduites. CysSS : Cystéines oxydées.

### 3.5 l'activité réductrice des bactéries

Un autre moyen efficace de modifier le  $E_h$  d'un aliment est d'utiliser des microorganismes possédant une activité réductrice. En effet, la croissance de nombreuses bactéries entraîne une modification du  $E_h$  de leur milieu de culture depuis des valeurs oxydantes vers des niveaux plus réducteurs. Cet effet s'explique par (i) une consommation progressive de l'oxygène dissous dans le milieu de culture, (ii) l'utilisation de composés oxydants et/ou (iii) la synthèse de molécules réductrices (Jacob, 1970). Les caractéristiques d'activité réductrice sont propres à chaque microorganisme et peuvent être des critères de différenciation et de classification des microorganismes. En effet des différences importantes dans les cinétiques de réduction peuvent être observées entre les bactéries aérobies et les bactéries anaérobies. Dans le cas de bactérie aérobies, l'amplitude de réduction observée est limitée par la présence de l'oxygène qui maintient le  $E_h$  vers des valeurs oxydantes. Dans le cas des bactéries anaérobies, les valeurs d' $E_h$  en fin de croissance sont plus réductrices (TABLEAU 5).

TABLEAU 6: E<sub>h</sub> initial et final obtenus après croissance de quelques bactéries classées selon leur type respiratoire.

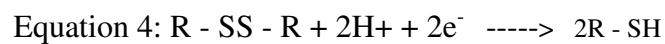
Type respiratoire	Espèce	Eh initial (mV)	Eh final (mV)	Amplitude (mV)	Référence
Aérobie stricte	<i>Bacillus subtilis</i>	135	-100	235	(Jacob 1970)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	500	100	400	(Oblinger and Kraft 1973)
Anaérobie facultative	<i>Staphylococcus aureus</i>	180	-230	410	(Jacob 1970)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	430	70	360	(Oblinger and Kraft 1973)
	<i>Listeria monocytogenes</i>	350	200	550	(Ignatova <i>et al.</i> 2008)
	<i>Bacillus cereus</i>	50	-150	200	(Zigha <i>et al.</i> 2006)
Anaérobie stricte	<i>Clostridium perfringens</i>	0	-420	420	(Pearson and Walker 1976)
	<i>Clostridium botulinum</i>	-60	-400	340	(Smoot and Pierson 1979)

La capacité des bactéries à diminuer le potentiel d'oxydo-réduction de leur milieu est régulièrement attribué à la consommation de composés oxydants comme l'oxygène ou à la production de molécules réductrices comme le dihydrogène chez *E. coli* (Jacob, 1970). Il a également été démontré chez *L. lactis* que les protéines à groupement thiols étaient impliqués dans l'activité réductrice de cette bactérie (Michelon *et al.*, 2010).

### 3.6 Les groupements thiols

Au cours de la glycolyse des équivalents réducteurs tels que le NADH ou le FADH<sub>2</sub> sont générés. Ces équivalents sont ré-oxydés par le transfert des électrons vers un accepteur final d'électrons qui peut être l'oxygène, lors d'un métabolisme aérobic, ou le nitrate, le nitrite, l'ion ferrique ou encore certains composés intermédiaires comme le fumarate ou le pyruvate dans le cas d'un métabolisme aérobic. Parmi les voies de transfert d'électrons existantes, certaines utilisent les thiols pour transférer les électrons vers leurs accepteurs cibles.

Les thiols sont des groupements composés d'un atome de soufre et d'hydrogène (-SH) dont le couple redox (couple thiol-disulfure) est présenté dans l'équation 4.



Au sein des protéines, les groupements thiols sont portés par les acides aminés cystéine et méthionine. Ces groupements peuvent être situés sur des protéines intracellulaires, extracellulaires ou membranaires. Dans ce dernier cas, si les groupements thiols sont exposés vers l'extérieur de la cellule ils sont dénommés thiols exofaciaux. Les groupements thiols sont impliqués chez tous les organismes vivants dans un nombre considérable de fonctions cellulaire comme l'acquisition des structures tertiaires et quaternaire des protéines (Hatahet *et*

*al.*, 2014), la gestion de l'homéostasie du potentiel d'oxydo-réduction intracellulaire (Yoshihara *et al.*, 2014), la résistance à certains stress comme les stress oxydants (Boronat *et al.*, 2014), ou encore la signalisation au sein d'une cellule ou entre les cellules d'un organisme (Lee *et al.*, 2013).

Le potentiel redox des groupements thiols est fortement affecté par les acides aminés situés au voisinage des cystéines ou des méthionines. Ceci explique pourquoi le potentiel redox des groupements thiols peut être variable au sein d'une protéine ou entre plusieurs protéines. Par conséquent, le transfert d'électron impliquant les thiols peut se faire via une cascade de réaction thiol-disulfure entre plusieurs protéine comme les thiorédoxines, les glutaredoxines ou encore les thiols disulfide oxydo-réductases (FIGURE 21)

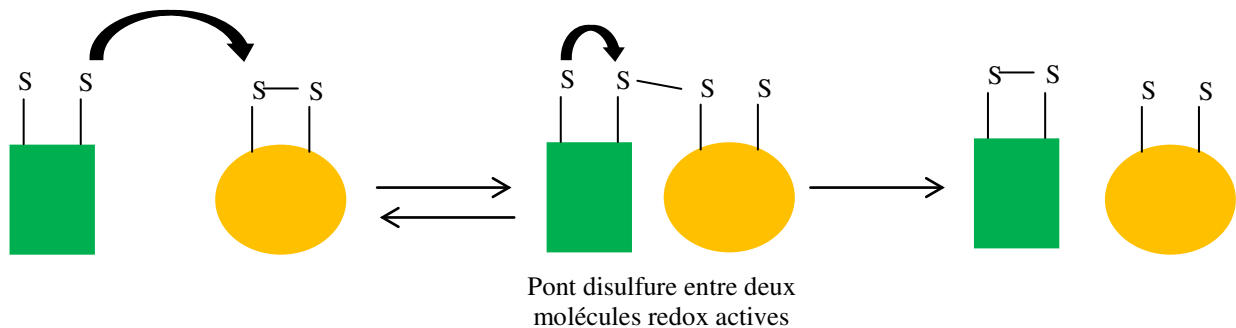


FIGURE 21 : Réaction d'échange thiol-disulfure entre deux protéines. D'après (Ritz and Beckwith, 2001).

### 3.7 Les domaines thiorédoxines

Les motifs thiorédoxines sont une famille de groupements thiols dont le site actif est caractérisés par la séquence Cystéine-X-X-Cystéine ou X représente n'importe quel autre acide aminé retrouvé dans les structures protéiques. Ces groupements sont retrouvés au sein de petits domaines appelés domaines thiorédoxine et sont composés de 4 feuillets  $\beta$  encadrés par trois hélices  $\alpha$  et comprenant un ou plusieurs sites actifs (Holmgren, 1995). Les protéines portant des domaines thiorédoxines sont retrouvées dans les trois règnes du vivant et sont impliquées dans des fonctions variées allant de la détoxification des xénobiotiques au repliement des protéines cellulaires. Sur la base de la structure et de la séquence des domaines thiorédoxines, les protéines portant ces domaines ont été classées en 10 familles protéiques décrites dans le tableau ci-dessous (Atkinson and Babbitt, 2009).



TABLEAU 7 : Classification des protéines portant des domaines thiorédoxines en 10 familles. Une barre oblique indique que les acides aminés à gauche ou à droite peuvent être alternativement présents. N/A : aucune séquence consensus majoritaire mise en évidence. D'après (Atkinson and Babbitt, 2009). C: cystéine. P: proline. S: sérine. U: uracile. X: tout acide aminé.

Famille	Site actif	Exemple
Thiorédoxine	C-X-P-C	TrxA TrxB
DsbA	C-P-X-C	DsbA BdbD
Péroxyrédoxine	C-P-X-C	DsbE ResA
ArsC	C-X-X-C/S	ArsC
AhpC_TSA	X-X-X-C	TpX
SCO1	C-P-X-X-C	SCO2
OST3_OST6	C-X-X-C	OST3 OST6
Glurarédoxine	C-P-X-S/C	GLRX
Glutathion peroxydase	C/U-X-X-X	GPX3
Glutathion transférase	N/A	GSTM1

La famille des thiorédoxines aussi appelée, thiorédoxines classiques, est la seconde famille comportant le plus de protéines putatives (396 séquences uniques référencées) juste après les glutarédoxines (767 séquences uniques référencées). Les thiorédoxines sont caractérisées par un motif C-X-X-C très conservé avec un acide aminé proline régulièrement observé en troisième position. Le rôle de cette proline n'a pas été clairement déterminé. Elle pourrait être impliquée dans l'interaction avec les substrats ou empêcher la fixation d'ions métalliques au site actif.

La famille des thiorédoxines diffère de celle des peroxyrédoxines et des glutathion peroxydases sur le plan structural car les domaines thiorédoxines de ces deux dernières familles possèdent une hélice  $\alpha$  supplémentaire qui est insérée entre le deuxième feuillet  $\beta$  et la deuxième hélice  $\alpha$  (Martin, 1995). Les thiorédoxines classiques sont également très proches des protéines de la famille DsbA et ArsC qui sont caractérisées par un ensemble de quatre à cinq petites hélices  $\alpha$  remplaçant la seconde hélice  $\alpha$  classiquement observée dans le domaine thiorédoxine.

Dans la famille des peroxyrédoxines figurent une catégorie particulière de protéines appelées protéines de maturation du cytochrome (CMP). Ces protéines retrouvées uniquement chez les bactéries sont impliquées dans la réduction et la maturation de l'apocytochrome C.

### 3.8. Les Thiols disulfide oxydo-réductases (TDORs) chez les bactéries à coloration de Gram positive.

Certaines protéines portant des groupements thiorédoxines sont appelées Thiol disulfide oxydo-réductase (TDORs). L'activité de ces protéines consiste à former ou briser des ponts disulfures au sein des protéines portant des cystéines. Ces protéines, souvent membranaires, sont retrouvées chez de nombreuses bactéries et interviennent dans de nombreuses fonctions biologiques comme la compétence, la maturation des cytochromes... Chez *E. coli* les TDORs appartenant au système dsb ont été abondamment décrites (Ito and Inaba, 2008, Heras *et al.*, 2009). Chez les bactéries à coloration de Gram positives comme *B. subtilis*, ce sont les TDORs appartenant aux systèmes BdbD / BdbC et ResA qui ont été étudiées.

#### 3.8.a Le système BdbD / BdbC

Parmi les TDORs connues chez les bactéries à coloration de Gram positives figurent le système BdbD / BdbC. Ce système a été découvert chez *B. subtilis* lors d'un screening d'une banque de mutant obtenue dans le cadre d'un projet d'analyse systématique des fonctions des gènes chez *B. subtilis* (*B. subtilis* Systematic Gene Function Analysis Project) pour des souches affectées dans leur capacité de compétence. Chez *B. subtilis* ces deux protéines sont des thiols-disulfide oxydo-réductases (TDORs) respectivement de 24 et 15 kDa, qui forment un opéron bi-cistronique et font partie de la famille des thiorédoxines type DsbA, initialement caractérisée chez *E. coli* (Atkinson and Babbitt, 2009, Inaba, 2009). BdbD et BdbC possèdent toutes deux un site actif de type C-X-X-C orienté du côté extra cytoplasmique de la membrane bactérienne et partagent respectivement un important degré de similarité avec les protéines DsbA et DsbB de nombreux autres micro-organismes (Meima *et al.*, 2002, Erlendsson and Hederstedt, 2002). Le système BdbD / BdbC est impliqué dans la formation de ponts disulfures au sein de protéines sécrétées, notamment les protéines PhoA et la sublancine, un antibiotique (Dorenbos *et al.*, 2002), de protéines membranaires comme l'apocytochrome C (Erlendsson and Hederstedt, 2002) ou des protéines impliquées dans la sporulation (Erlendsson *et al.*, 2004). De même, un mutant de ce système est très fortement affecté dans sa capacité à acquérir de l'ADN exogène. Ce phénotype s'explique par un mauvais repliement des protéines ComGC et ComEC due à des ponts disulfures qui ne sont pas formés en absence du système BdbD / BdbC (Bolhuis *et al.*, 1999b, Meima *et al.*, 2002, Draskovic and Dubnau, 2005). Par spectrométrie de masse d'autres protéines substrats de

BdbD / BdbC ont été mises en évidence comme la glucoside perméase BglP, le transporteur de cystéine TcyP ou encore la protéine d'osmo-protection ProA (Goosens *et al.*, 2013).

Ce système à un fonctionnement de type oxydatif. BdbD, dont le site actif possède un potentiel d'oxydo-réduction de -75 mV, renforcé par la présence d'un ion calcium stabilisant la structure du site actif (Crow *et al.*, 2009a), va servir d'accepteur d'électron pour des substrats particuliers ce qui va favoriser la formation de ponts disulfure dans ces substrats. BdbD est dès lors sous forme réduite et va être ré-oxydé grâce à l'action de BdbC qui va capter les électrons surnuméraires et les transmettre aux quinones de la chaîne de transport des électrons (Kouwen *et al.*, 2007). Un nouveau cycle de catalyse de ponts disulfure peut dès lors démarrer (FIGURE 22).

Ce système est très conservé chez *Bacillus licheniformis* et chez la plupart des espèces du groupe *Bacillus cereus sensu lato* (*B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus* et *B. cereus sensu stricto*) ou les deux gènes codant pour ces protéines ne sont pas regroupées en opéron. A l'inverse dans d'autres espèces comme *S. aureus*, seul un homologue de BdbD est retrouvé. Chez cette bactérie, cet homologue regroupe à lui seul les fonctions de plusieurs autres protéines de type Bdb (Kouwen *et al.*, 2007).

Chez *B. cereus sensu stricto* le système BdbD / BdbC n'a pas été étudié.

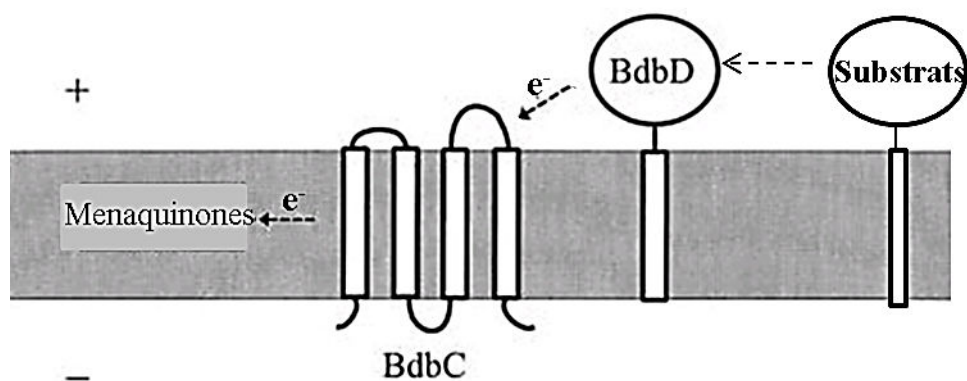


FIGURE 22 : Description schématique du fonctionnement du système BdbC/BdbD chez *B. subtilis* en anaérobiose. Les symboles + et - indiquent respectivement les côtés extracellulaire et intracellulaires de la membrane bactérienne. e<sup>-</sup> : électrons transférés D'après (Erlendsson and Hederstedt, 2002)

### 3.8.b ResA

Chez *Bacillus subtilis*, ResA est une TDORs membranaire de 20 kDa dont le motif C-X-X-C est orienté vers l'extérieur de la cellule. Le gène codant pour ResA est situé en première position de l'opéron *resABCDE* (Sun *et al.*, 1996). Cet opéron est composé de deux promoteurs, le premier permettant l'expression simultanée de *resABC* et le second contrôlant l'expression de *resDE*. Il a également été démontré que l'expression du promoteur *resABC* était régulée indirectement par la protéine ResD (Sun *et al.*, 1996). Cette protéine est une peroxyrédoxine de la famille des protéines de maturation de l'apocytochrome C (CMP) (Atkinson and Babbitt, 2009). A ce jour, seuls quatre différents polypeptides de l'apocytochrome C ont été reconnus comme substrats de ResA (Crow *et al.*, 2009b).

ResA est un système de type réducteur avec un site actif ayant un potentiel d'oxydo-réduction de -256 mV (Hodson *et al.*, 2008). Le mécanisme de maturation de l'apocytochrome C chez *B. subtilis* a été intensément étudié. Il en résulte que cette protéine une fois transportée à la membrane subit l'action de BdbD qui catalyse la formation d'un pont disulfure au niveau du site de l'hème du cytochrome. Ce pont disulfure est alors brisé par ResA et l'hème est accroché de manière covalente aux cystéines de l'apocytochrome C. ResA est ensuite réduite par la protéine CcdA et un nouveau cycle de maturation de cytochrome peut redémarrer (Erlendsson *et al.*, 2003, Lewin *et al.*, 2008) (FIGURE 23).

Cette protéine est retrouvée dans de nombreux micro-organismes comme *Wolinella succinogenes*, *H. pylori* (Simon *et al.*, 2000). Chez *B. cereus*, le gène *resA* fait également parti d'un opéron dénommé *resABCDE* (Duport *et al.*, 2006). La protéine ResA de *B. cereus* partage 51 % d'identité avec la protéine ResA de *B. subtilis*. Néanmoins la fonction la protéine ResA chez *B. cereus* n'a pas été étudiée.

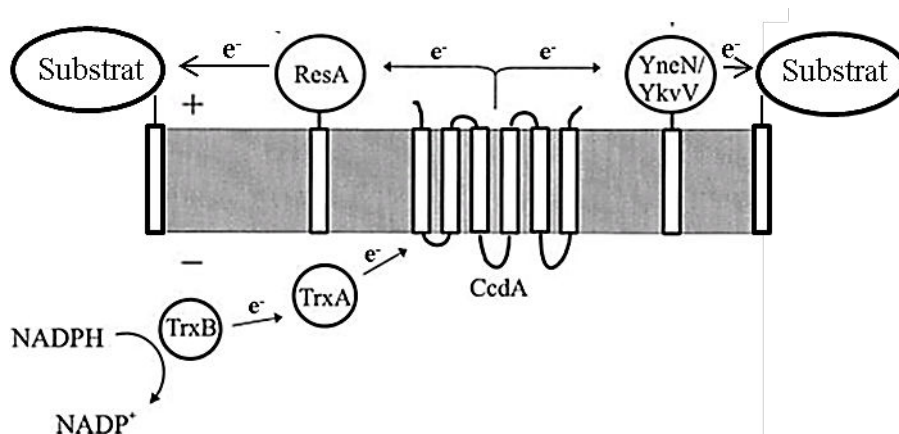


FIGURE 23 : Description schématique du fonctionnement du système ResA chez *B. subtilis*. Les symboles + et - indiquent respectivement les côtés extracellulaire et intracellulaires de la membrane bactérienne. Trx : thioredoxine.  $e^-$  : électrons transférés D'après (Erlendsson and Hederstedt, 2002).

### 3.8.c CcdA

CcdA est une TDOR membranaire de 25 kDa atypique car elle ne possède pas de groupement thiorédoxine caractéristique. Néanmoins plusieurs résidus cystéine sont présents dans la séquence de CcdA et sont conservés chez plusieurs espèces bactériennes comme *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium leprae* ou encore *Bacillus cereus*. Ces résidus pourraient former un groupement redox actif (Schiott *et al.*, 1997). Des homologues de CcdA existent chez *Paracoccus pantothrophus* (Bardischewsky and Friedrich, 2001), *Rhodovulum sulfidophilum* (Appia-Ayme and Berks, 2002).

Cette protéine fut initialement caractérisée pour son implication dans la maturation du cytochrome C chez *B. subtilis*. Elle possède également un rôle dans la sporulation (Schiott and Hederstedt, 2000). Les mécanismes impliqués sont présentés ci-dessous.

En effet, le rôle de CcdA serait de transmettre des électrons en provenance des thiorédoxines intracellulaires à plusieurs substrats dont la protéine ResA, ce qui explique le phénotype de non maturation du Cytochrome C observé chez le mutant CcdA (Erlendsson and Hederstedt, 2002). Cette protéine a également pour substrat la protéine StoA qui contribue à la formation de la spore en réduisant la protéine YncN de fonction inconnue (Erlendsson *et al.*, 2004). Une mutation de CcdA entraîne l'inactivation de StoA et de YncN ce qui explique le phénotype de défaut de sporulation observé chez le mutant CcdA (Eichenberger, 2010) (FIGURE 24).

Chez *Bacillus anthracis* le gène codant pour CcdA est présent en deux copies nommées *ccdA1* et *ccdA2*. Les séquences d'acides aminés des protéines codées par chacun de ces gènes partagent 63 % d'identité. CcdA1 joue un rôle dans la maturation du cytochrome C, dans la sporulation et dans la production des facteurs de virulence AtxA et PagA. CcdA2 a complètement perdu son rôle dans la sporulation mais reste impliqué dans la maturation du cytochrome C et la production de facteurs virulence (Han and Wilson, 2013). AtxA est un régulateur de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de toxines et de la capsule de *B. anthracis* (Tsvetanova *et al.*, 2007), tandis que PagA est l'une des trois protéines (protective antigène) constituant la toxine tripartite de *B. anthracis* (Bongiorni *et al.*, 2008).

### 3.8.d Schéma récapitulatif.

Les données disponibles sur les principales TDORs de *B. subtilis* et de *B. cereus* sont récapitulées dans la figure 24.

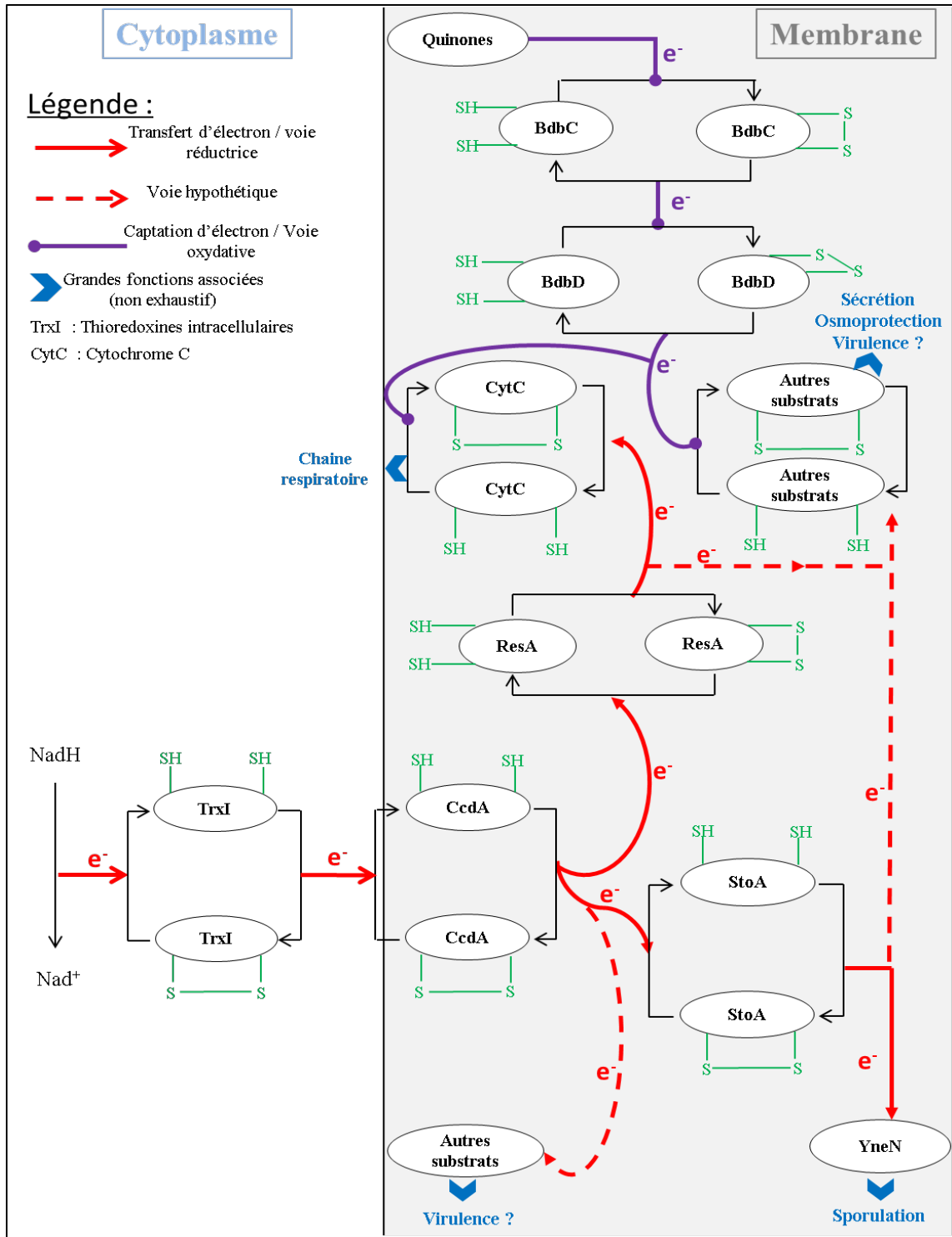


Figure 24 : Schéma récapitulatif du mode d'action des TDORs de *B. subtilis* et *B. cereus*. SH : groupement thiol réduit. S-S : groupement thiol oxydé.

# **MATERIELS ET METHODES**





## 1 Souches et milieux de culture utilisés

Les souches de *B. cereus* utilisées dans cette étude (et leur sous groupe phylogénétiques) sont : F4430/73, (Groupe IV) isolée d'une TIAC (Spira and Goepfert, 1975) ; ATCC14579, (Groupe IV) isolée d'une étable ; D15 (Groupe II), isolée de patient atteint de diarrhées ; et KBAB4 (Groupe VI) isolée du sol (Vilas-Boas *et al.*, 2002). Les souches sont conservées à -80°C dans du glycérol 30% (w/v).

Les milieux de culture utilisés sont le milieu J-Broth (JB) (5 g l<sup>-1</sup> tryptone, 15 g l<sup>-1</sup> extrait de levure, 3 g l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 15 g l<sup>-1</sup> agar pour les géloses JB), le milieu Luria-Bertani (LB) (Tryptone 10g l<sup>-1</sup>, extrait de levure 5g l<sup>-1</sup>, NaCl 5g l<sup>-1</sup>) et le milieu AOAC dont la composition est présentée ici : <http://himedialabs.com/TD/M334.pdf>. Pour la production de spores, le milieu SMB (Sporulation mineral buffer) est utilisé. Le SMB est composé de tampon phosphate pH 7.2 39.0 mM (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3H<sub>2</sub>O: 4.5 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.8 g/L), et supplémenté avec du CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O (8.0 mg/L) et du MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O (1.5 mg/L). Le SMB est ensuite stérilisé par filtration en utilisant un filtre de 0.22 µm (Millipore).

Le pH de chacun des milieux est ajusté à la valeur souhaitée avec du KOH ou de l'HCl avant autoclavage pendant 20 minutes à 121°C. Une solution stock de glucose 2 mol l<sup>-1</sup> est préparée et stérilisée par filtration à l'aide de filtres de 0.22 µm (Minisart, Sartorius, France) et ajoutée aux milieux de culture après autoclavage.

## 2 Précultures

*B. cereus* est étalé depuis la solution stock sur des géloses JB. Après 24h d'incubation à 37°C, une colonie isolée est transférée dans un flacon de 400 ml de JB complémenté avec du glucose à concentration finale de 30 mmol l<sup>-1</sup> et incubée sur la nuit à 37°C avec agitation à 200 rpm.

## 3 Croissance en batch régulés et non régulés

Toutes les croissances en batch ont été réalisées dans un fermenteur de 2 l de volume (Inceltech 1573/04) en utilisant un volume de travail de 1.3 l de JB complémenté avec du glucose à concentration finale 30 mmol l<sup>-1</sup>. Toutes les expériences sont menées à une

température de 37°C. Un cryostat (Polystat, Bioblock Scientific) a été utilisé pour s'assurer du contrôle de la température. Le pH de la culture est suivi et, dans le cas des batch régulés, stabilisé à 5.5 ou à 7 à l'aide d'électrodes pH (405-DPAS-SC-K8S/225, Mettler Toledo). Des gaz purs sont utilisés pour générer les conditions initiales de  $E_h$  et pour conserver les conditions d'anaérobiose ou d'aérobiose. Pour l'aérobiose de l'air ambiant est bullé dans le fermenteur après filtration à un débit de 200 l h<sup>-1</sup> et la pression partielle en oxygène est suivie par une sonde PO<sub>2</sub> (InPro 6820/12/220, Mettler Toledo). Pour l'anaérobiose du diazote (N<sub>2</sub>) ou du dihydrogène sont bullés dans le fermenteur à un débit de 50 l h<sup>-1</sup>.

#### 4 Mesure du $E_h$

Le  $E_h$  est suivi au cours de la croissance grâce à une sonde redox (pt4805-SC-DPAS-K8S/225, Mettler Toledo). De façon à obtenir une mesure correcte de l' $E_h$ , les parties métalliques de l'électrode redox sont polies à l'aide de poudre d'alumine (Durmax) et une mesure de contrôle est réalisée dans de l'eau du robinet (Abraham *et al.*, 2013). Le  $E_h$  mesuré est corrigé par rapport à la valeur de l'électrode de référence et à la valeur du pH du milieu de culture de façon à obtenir la valeur appelée  $E_{h7}$ . L'équation utilisée est la suivante :  $E_h = E_m + E_{ref}$  ou  $E_h$  est le potentiel d'oxydoréduction par rapport à l'électrode à hydrogène,  $E_m$  le potentiel d'oxydoréduction mesuré et  $E_{ref}$  le potentiel de l'électrode de référence (207 mV à 20°C). De façon à s'affranchir de l'effet du pH sur le  $E_h$ , le  $E_{h7}$  est calculé en utilisant l'équation de Leistner et Mirna,  $E_{h7} = E_h - \alpha \cdot (7 - pH_m)$  (Leistner and Mirna, 1959) ou le  $pH_m$  est le pH mesuré dans le milieu de culture et  $\alpha$  est le coefficient de Nernst qui est spécifique du milieu de culture utilisé. Pour le milieu JB,  $\alpha = 39.6$  mV/ unité pH et a été déterminé expérimentalement en mesurant le  $E_h$  du milieu JB à différents niveaux de pH dans l'intervalle 3 à 8 ajustés avec du HCl ou du KOH.

#### 5 Chocs acides et thermiques

Des cellules de *B. cereus* sont collectées en milieu de phase exponentielle de croissance et soumises à un stress acide à pH 4 ou à un stress thermique à 50°C durant 30 minutes après dilution au 1/10<sup>eme</sup> dans des tubes Hungate avec agitation. Après le stress, les cellules sont diluées dans du tampon phosphate à 100 mmol l<sup>-1</sup> à pH 7 et étalées sur des boîtes de gélose JB. La concentration cellulaire est calculée en colonie formant unité (CFU) par ml<sup>-1</sup>. La

mortalité cellulaire est exprimée en log (N0/N) où N est le nombre de colonies viables après 30 min de stress et N0 le nombre de colonies viables avant stress. Des méthodes standard comme le test T de Student ont été utilisées pour déterminer la robustesse statistique des résultats. Une P-value inférieure à 0.05 est considérée comme indiquant une différence statistiquement significative entre deux groupes de données.

## 6 Détermination de la concentration en métabolites

Dans les batch contrôlés, des échantillons ont été prélevés après que les cellules aient atteint la phase stationnaire de croissance. Les aliquots sont centrifugés à 7000 g pendant 10 minutes à 4°C et les surnageants sont conservés à -20°C jusqu'à analyse. Les concentrations en glucose, acétate et lactate ont été déterminées à l'aide de kit enzymatiques Biosentec (Toulouse, France) et les concentrations en éthanol, succinate et formiate ont été calculées à l'aide de kit Biopharm (Darmstadt, Allemagne) en suivant les instructions des fabricants.

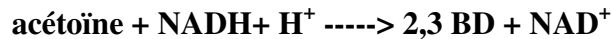
Les concentrations en acétoïne et en 2,3 BD ont été déterminées en utilisant un système de chromatographie liquide haute performance (HPLC) équipé d'un réfractomètre (RID) et d'une colonne Sugar-pak (Waters 085188). Les conditions d'utilisation étaient les suivantes : échantillon : 10 µl, phase mobile : 50 mg l<sup>-1</sup> EDTA.Na<sub>2</sub>Ca, flux : 0.6 ml min<sup>-1</sup>, température de la colonne : 85°C. Les solutions commerciales d'acétoïne et de 2,3 BD utilisées comme standard étaient à une concentration de 0.5 g l<sup>-1</sup>

## 7 Calcul de l'activité enzymatique de l'acétoïne réductase

Des culots bactériens prélevés en phase exponentielle de croissance sont dilués dans du tampon phosphate 100 mM pH 6. Les cellules sont lysées par sonication (pulses de 10 secondes à une amplitude de 80 Hz appliqués deux fois 5 minutes entrecoupées de 2 min de refroidissement sur glace). Le lysat cellulaire est observé au microscope afin de s'assurer de la lyse des cellules, avant d'être centrifugé à 8000 rpm pendant 10 minutes à 4 °C. Le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées par la méthode de Bradford.

L'activité de l'acétoïne réductase est mesurée en microplaque à l'aide d'un lecteur de microplaques (Tecan infinite 200 PRO). Le dosage est basé sur la diminution de l'absorption à

340 nm du NADH due à la consommation de cette molécule par l'acétoïne réductase au cours de la réduction de l'Acétoïne en 2,3 BD selon le principe suivant :



Les conditions de réactions sont les suivantes : TCEP 1 mM, NADH 0.28 mM, tampon phosphate pH 6 à 100 mM et acétoïne 50 mM.

Les résultats de l'acétoïne réductase sont exprimés en U mg<sup>-1</sup> (mg de protéines) ou U est égal au nombre de μmol de NADH consommées par minute.

### 8 Dosage des thiols exofaciaux

Les thiols exofaciaux accessibles ont été mesurés en utilisant la méthode d'Ellman. Le DTNB ne peut pas traverser les membranes, seuls les groupements thiol à la surface de la cellule bactérienne pourront réagir avec le réactif. Des cellules ont été centrifugés durant 10 minutes à 3500 g à température ambiante, lavées avec du tampon phosphate 100 mM à pH 8 et resuspendues dans du tampon phosphate 100 mM pH 8 contenant 10 μl de DTNB 6mM. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, les cellules sont centrifugées 10 minutes à 3500 g. Les surnageants sont ensuite filtrés à travers un filtre de 0.22 μM (Millipore). L'absorption à 412 nm est mesurée en utilisant un spectromètre (Helios Epsilon, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) et la concentration en groupements thiols accessibles est calculée en utilisant une courbe étalon de N-acetyl-L-cystéine sur un intervalle allant de 1 à 50 μM.

### 9 Filtration et expériences utilisant les bloquants des thiols

Les expériences de filtrations et utilisant les bloquants des thiols ont été réalisées à la fin de la phase de réduction après culture en Batch régulé. Toutes les expériences sont réalisées sous une chambre anaérobie pour éviter l'entrée d'oxygène au cours de la manipulation. Pour la filtration, des filtres de 0.22 μm préalablement dégazés à l'azote ont été utilisés et le E<sub>h</sub> du filtrat est mesuré.

Pour les expériences de blocage des thiols, le NEM (Sigma Aldrich) et l'AMdiS (Invitrogen) sont ajoutés dans des aliquots de milieu à des concentrations finales de 25 mM et 9 mM respectivement après dégazage. Le E<sub>h</sub> du milieu est ensuite mesuré.

## 10 Marquage fluorescent des thiols exofaciaux à la surface des cellules bactériennes

La culture bactérienne est centrifugée 10 minutes à 3500 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est resuspendu dans de l'Oregon Green 488 maleimide (Life technology, France) 40 µM durant 30 minutes à 37°C à l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées dans du tampon phosphate 100 mM pH 7 et analysées par microscopie photonique ou de fluorescence à 480 nm en utilisant un microscope à contraste de phase équipé d'un module de fluorescence (Olympus BX 50 instrument, Rungis, France) (module de fluorescence BX-FLA). Les images sont prises avec une camera coolSNAP EZ (Tucson USA) et traitées à l'aide du logiciel Image J.

## 11 Extraction des protéines membranaires

Les cellules de *B. cereus* ATCC14579 en phase stationnaire de croissance sont collectées par centrifugation (3500\*g durant 10 minutes à 4°C) après culture en fermenteur régulés. Les cellules sont resuspendues dans du tampon phosphate à pH 7,5 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 M, pH 7.5) contenant 0.2 mM de phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Les cellules sont ensuite lysées par sonication (Transonic 780H sonicator). Les membranes sont collectées après ultra-centrifugation (1 h à 300,000\*g) et resuspendues dans du tampon phosphate pH 7 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 M, pH 7) contenant du PMSF 20 mM. La concentration en protéine de l'échantillon de membrane est estimée par dosage de Bradford, puis 20 µg de protéine sont soumis à une électrophorèse SDS-PAGE courte sur des gels de polyacrylamide 12%. Les échantillons sont resuspendus dans du tampon Laemmli (Laemmli, 1970) juste avant d'être déposé dans le gel de polyacrylamide. Après migration courte (1 cm environ) dans le gel de séparation, une bande verticale de gel est découpé dans la ligne de migration et est stockée à -20°C jusqu'à analyse par spectrométrie de masse.

## 12 Analyse par spectrométrie de masse

Les protéines sont classiquement réduites par du dithiothreitol (5 mM), alkylées avec de l'iodoacetamide (25 mM) et hydrolysées dans le gel d'acrylamide par addition de 300 ng de trypsine (Promega France) dans un tampon d'ammonium bicarbonate (25 mM) à 37°C. Après hydrolyse sur la nuit, les peptides sont extraits par des méthode classiques (Shevchenko *et*

al., 2006), séchés dans un speed vacuum et resuspendus dans 25  $\mu\text{L}$  de tampon de charge (0.08% TFA, acetonitrile 2%).

L'analyse des peptides est réalisée grâce à un spectromètre de masse Ultimate 3000 RSLC Nanosystem (Dionex, ThermoScientific) couplé à un Orbitrap-LTQ Discovery mass spectrometer (Thermo Electron) avec une interface nanoelectrospray. 1  $\mu\text{L}$  de peptide digéré est directement injecté dans une colonne Acclaim PepMap 100 C18 (0.075 mm i.d. x 250 mm, 2  $\mu\text{m}$ , Dionex) et les peptides sont séparés selon un gradient en deux étapes (de 2% à 30% durant 165 min et de 30% à 40% durant 20 min à une vitesse de flux de 300  $\text{nL min}^{-1}$  à 40°C) durant 204 min. Cette durée inclue le temps nécessaire à l'équilibration et la régénération de la colonne. L'ionisation est réalisée en mode positif (potentiel d'ionisation de 1.4KV) avec une jonction liquide et une sonde capillaire (10  $\mu\text{m}$  i.d., NewObjective). Les ions sont analysés en utilisant le logiciel Xcalibur 2.07 via une méthode donné-dépendante composée de deux étapes: Premièrement un scan MS complet réalisé dans l'Orbitrap (entre 350 et 1400 th en mode profil avec une résolution de 30000 à  $m/z$  400). Deuxièmement, une étape de fragmentation et de détection des ions filles, réalisée en utilisant un piège linéaire ( $qz = 0.22$ , temps d'activation de 50 ms et énergie de collision fixée à 35%). Le temps d'exclusion dynamique est fixé à 1 min. Pour améliorer la précisions de la mesure, l'option lock-mass est activée sur du dimethylcyclsiloxan ( $m/z$  445.120029).

Les fichiers raw produits par Xcalibur sont d'abord convertis au format mzXML en utilisant MSconvert (<http://sashimi.sourceforge.net>, version 3.0.5126). Dans un deuxième temps, l'identification des protéines est réalisée avec le logiciel X!tandem (X!tandem Cyclone 2011.12.01.1; <http://www.thegpm.org>) en se basant sur la base de donnée correspondant à *Bacillus cereus* ATCC14579 (Uniprot, 5295 protéines référencées au 6 décembre 2013) Cette identification est également associée à des bases de données classiques reliées aux contaminant protéomiques habituels. Les paramètres de recherche dans X!Tandem considéraient un état variable d'oxydation des méthionines et une spécificité tripsique avec deux coupures manquantes. Les peptides à moitié digérés par la trypsine sont inclus dans l'analyse par activation de l'option 'refine data'. Le seuil de tolérance pour les masses mesurées était de 10 ppm pour les ions précurseurs et 0.5 pour les ions fragmentés. Les résultats finaux sont filtrés au niveau protéique en utilisant un filtre multiple utilisant les critères suivants : protéine  $\log(E\text{-value}) = -2.6$  identifiée avec un minimum de deux séquences peptidiques différents et détectées avec une E-value peptidique inférieure 0.05.

### 13 analyses *In silico*

La base de données LocateP DataBase (<http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>) a été utilisée pour inventorier les protéines membranaires de *B. cereus* portant des groupements thiorédoxines. Les outils bio-informatiques de topologie HMMTOP et TMHMM (<http://www.expasy.org/resources>) ont été utilisés pour déterminer l'orientation des groupements thiorédoxines des protéines membranaires inventoriées.

### 14 Obtention de spores en culture bi-phasiques

Les spores ont été produites en utilisant un procédé de culture biphasique (Baril *et al.*, 2011). Un aliquot des cultures stock de *B. cereus* a été utilisé pourensemencer une préculture de milieu LB ON à 37°C à 200 rpm. La première étape de culture biphasique débute avec l'innoculation de 100 ml de LB stérile avec 0.1 ml de la solution de pré-culture. La densité optique à 600 nm est suivie tout le long de la croissance et les cellules végétatives sont collectées quand la phase stationnaire est atteinte. Les cellules sont lavées dans un tampon phosphate pH 7 et transférées dans 100 ml de milieu SMB et incubée à 37°C à 200 rpm jusqu'à ce que la sporulation soit complète. Les spores sont ensuite collectées par centrifugation (6000 g, 10 min, 12 °C) et resuspendues dans de l'eau déminéralisée et stockées à 4°C.

### 15 Cytométrie en flux

Un cytomètre Partec (Görlitz Allemagne) cyflow space a été utilisé. La Source Laser était réglée à 488 nm avec un Filtre vert de 451 nm. Les données obtenues ont été traitées avec le Logiciel Flomax (Quantum analysis GmbH) version 2.82. Un échantillon de 1 ml de spore est injecté à une vitesse de 0.700 µl/s. Tous les liquides d'entretiens et de gaine étaient de la marque Partec.





# **RESULTATS**

## **CHAPITRE 1 : INFLUENCE DU $E_H$ ET DU PH SUR L'ACTIVITE REDUCTRICE, LE METABOLISME DU GLUCOSE ET L'ATR DE BACILLUS CEREUS**



## 1 Objectif de l'étude :

*Bacillus cereus* est capable de s'adapter à de nombreux stress, parmi lesquels le stress froid (Diomandé *et al.*, 2014), le stress thermique (den Besten *et al.*, 2006), le stress oxydant (Shu *et al.*, 2013) ou encore le stress acide (Jobin *et al.*, 2002). L'adaptation de *B. cereus* aux variations de potentiel d'oxydo-réduction ont également été décrites (Zigha *et al.*, 2006). Les mécanismes connus comme étant impliqués dans les adaptations aux bas pH et  $E_h$  sont décrits dans les parties I.II et I.III de ce manuscrit et comprennent la mise en place d'une réponse de tolérance à l'acide (ATR) chez *B. cereus*..

Néanmoins, les bactéries sont régulièrement soumises à plusieurs stress croisés que ce soit dans l'aliment (stress thermique et acide par exemple) ou encore dans l'hôte (stress acide et oxydatif). Chez *B. cereus*, seule la combinaison du stress froid et de l'anaérobiose a été étudiée (de Sarrau *et al.*, 2012a).

Les effets combinés du stress acide et des variations d' $E_h$  n'ont jamais été étudiés chez *B. cereus* alors que cette bactérie est capable de s'adapter à des modifications de ces deux facteurs. Cela est notamment observé lors du passage de *B. cereus* depuis l'estomac, acide et oxydant, vers l'intestin grêle, neutre et réducteur. L'interaction entre le stress acide et les variations d' $E_h$  fera donc l'objet d'une première étude, dont les buts sont les suivants :

Le premier objectif est de comprendre comment trois niveaux d' $E_h$  (oxydant, réducteur et très réducteur) en combinaison avec deux valeurs de pH (7 et 5.5) vont influencer les paramètres de croissance, l'activité réductrice et la mise en place de l'ATR après un choc acide à pH 4 chez *B. cereus*. De même, la réponse au stress thermique sera étudiée de façon à déterminer si les combinaisons d' $E_h$  et de pH peuvent affecter les mécanismes de protection croisés entre différents stress.

Le second objectif sera la recherche de nouvelles adaptations aux variations de pH chez *B. cereus* en se focalisant notamment sur les adaptations métaboliques qui ont été très peu décrites chez cette bactérie. En effet les seules données disponibles sur les adaptations métaboliques à pH acide de *B. cereus* sont des données transcriptomiques (Mols *et al.*, 2010a).

Nous avons choisi la souche *B. cereus* F4430/73 car c'est une souche pathogène isolée pour la première fois lors d'une TIAC (Spira and Goepfert, 1975). C'est également une souche

bien étudiée au laboratoire Ces études ont notamment démontré l'implication du système à deux composants ResDE et du régulateur FNR dans les adaptations métaboliques et dans la production de toxines sous différentes atmosphères réductrices de *B. cereus* (Duport *et al.*, 2004, Zigha *et al.*, 2006).

## 2 Stratégie d'étude :

Pour réaliser cette étude, nous avons sélectionné le milieu J-Broth (JB). Ce milieu est un milieu riche dont la composition est proche du milieu LB et qui permet la croissance de *B. cereus* à pH 5.5. C'est d'ailleurs dans ce milieu de culture que les précédentes données traitant de la résistance au stress acide de *B. cereus* ont été obtenues (Jobin *et al.*, 2002, Thomassin *et al.*, 2006).

Un des points critique et indispensable de cette première étude est l'obtention de valeurs fiable de  $E_{h7}$  quelque soit le pH de culture utilisé. En effet de part les équations de Nernst il a été démontré que le pH pouvait influencer sur le  $E_h$  de manière significative. De façon à s'affranchir de l'effet du pH sur le  $E_h$ , l'équation de Leinster et Mirna a été utilisée et tout les résultats de  $E_h$  ont été convertis en  $E_{h7}$  ou, potentiel d'oxydo-réduction rapporté à pH 7 (Leistner and Mirna, 1959).

*Les résultats obtenus sont présentés dans l'article 1 et ont été publiés dans le journal "Food Microbiology".*

3 Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels

Julien Le Lay, <sup>a,b</sup> Halim Bahloul, <sup>a</sup> Sylvie Serino, <sup>c</sup> Michel Jobin, <sup>a,b</sup> Philippe Schmitt\* <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, 84000 Avignon, France.

<sup>b</sup>INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, 84000 Avignon, France.

<sup>c</sup>INRA, UR1115 Unité plantes et systèmes de culture horticoles, 84000 Avignon, France.

\*Corresponding author: Philippe Schmitt. INRA, UMR408, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France.

Tel: +33 (0)4 32 72 25 45

E-mail: philippe.schmitt@univ-avignon.fr

*Publié dans : Food Microbiology 46, 2015, 314-321.*

**Abstract:**

*Bacillus cereus* is a major foodborne bacterial pathogen able to survive a large number of physical-chemical stresses. *B. cereus* encounters different pH and redox potential ( $E_{h7}$ ) levels during its passage through the gastrointestinal tract. Analysis of the combined influence of pH and redox stresses on *B. cereus* F4430/73 physiology found that *B. cereus* F4430/73 growth at pH 7.0 at 37°C had strong reducing capacities, with a total change of 315 mV from an initial redox value of  $+214 \pm 17$  mV. The combination of low  $E_{h7}$  and low pH led to a drastic reduction of growth parameters compared to oxidative  $E_{h7}$  and neutral pH. Metabolic analysis showed that low pH significantly modifies glucose fermentative metabolism, with changes including decreased production of acid metabolite (acetate, lactate, formate) and increased production of 2,3 BD. Low  $E_{h7}$  slightly enhanced the acid-tolerance response of *B. cereus* whereas low pH pre-adaptation led to thermal stress cross-protection. These results highlight new mechanisms that bring fresh insight into *B. cereus* pH and redox stress adaptations.

**Keywords:** *Bacillus cereus*, redox potential, acid stress, thermal stress, glucose metabolism, 2,3 BD.

## **Introduction:**

*B. cereus* is an endemic spore-forming Gram-positive facultative anaerobe, widely recognized as one of the major foodborne bacterial pathogens (McKillip, 2000), and is often incriminated in the contamination of ready-to-eat foods, dairy products and vegetables (Choma *et al.*, 2000, Afchain *et al.*, 2008, Kouamé *et al.*, 2013).

*B. cereus* causes two types of food poisoning leading to an emetic-type and/or a diarrheal-type illness (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Emetic syndrome results from ingesting cereulide toxin produced in the ingested food (Takeno *et al.*, 2012), whereas diarrheal-type illness results from *B. cereus*-contaminated food transiting through the digestive tract and producing the diarrheal toxins (Beecher and MacMillan, 1990, Granum, 1994, Lund *et al.*, 2000, Mendelson *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2011). *B. cereus* thus encounters different pH and redox potential ( $E_{h7}$ ) levels during its passage through the gastrointestinal tract. *B. cereus* spores or vegetative cells are known to reach the acidic-oxidative stomach and the neutral-reductive small intestine ( $E_{h7} = -150$  mV) (Moriarty-Craige and Jones, 2004) and may even survive these conditions (Williams and Turnberg, 1981, Clavel *et al.*, 2004, Clavel *et al.*, 2007).

Studies focused on the mechanisms underlying acid stress response or low  $E_{h7}$  adaptations in *B. cereus* showed that physiological adaptations induced by a low-pH environment include enhanced decarboxylase activities or protein synthesis. These adaptations enable the control of internal pH homeostasis and the induction of an acid tolerance response (ATR) (Thomassin *et al.*, 2006, Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011). Toxin production increases in anaerobic conditions compared to aerobic conditions (Bourel *et al.*, 2003, Zigha *et al.*, 2006). To our knowledge there has been no attempt to study the impact of combined  $E_{h7}$  and pH conditions on *B. cereus* physiology, and little is known about the impact of  $E_{h7}$  on ATR and low-pH metabolic adaptations in this bacterium compared to other microorganisms (Iwami *et al.*, 1992, O'Sullivan and Condon, 1999). Insight into the effects of controlled  $E_{h7}$  and pH levels



on *B. cereus* physiology could be valuable to help improve understanding of the stress resistance mechanisms of this bacterium. The aim of this work was thus to study the behavior, reducing and acidification capacities, acid stress resistance and metabolic adaptations of *B. cereus* in response to different initial  $E_{h7}$  levels and pH values.

## **2 Materials and Methods**

### **2.1 Bacterial strain and culture medium**

*B. cereus* strain ATCC F4430/74 isolated from a disease outbreak (Spira and Goepfert, 1975) was used. Stock cultures were maintained at  $-80^{\circ}\text{C}$  in 30% (w/v) glycerol. Medium used was J-Broth (JB) ( $5\text{ g l}^{-1}$  tryptone,  $15\text{ g l}^{-1}$  yeast extract,  $3\text{ g l}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$  and  $15\text{ g l}^{-1}$  agar for JB plates). pH was adjusted to target values with KOH or HCl before autoclaving for 20 min at  $121^{\circ}\text{C}$ . A  $2\text{ mol l}^{-1}$  glucose stock solution was sterilized by filtration through a  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  filter (Minisart, Sartorius, France) and added after autoclaving.

### **2.2 Preculture conditions**

*B. cereus* from stock cultures was isolated on a JB plate during 24 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . One colony was transferred to a 400 ml JB-broth flask, added with  $30\text{ mmol l}^{-1}$  of glucose, and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 16 h.

### **2.3 Unregulated and regulated batch cultures**

All batch cultures were performed in a 2 l bioreactor (Inceltech 1573/04) using a working volume of 1.3 l of JB added with  $30\text{ mmol l}^{-1}$  of glucose. All experiments were carried out at  $37^{\circ}\text{C}$ . A cryostat bath (Polystat, Bioblock Scientific) was used to keep cultures temperature-controlled. Culture pH was monitored and held at 5.5 or 7.0 by pH electrodes (405-DPAS-SC-K8S/225, Mettler Toledo). Pure gases were used to generate the range of initial  $E_{\text{h}7}$  conditions and maintain the requisite aerobic or anaerobic conditions. For aerobiosis, filtered room air was flushed into the reactor (at  $200\text{ l h}^{-1}$ ) and partial oxygen pressure was monitored by an  $\text{O}_2$  probe (InPro 6820/12/220, Mettler Toledo). For anaerobiosis, nitrogen ( $\text{N}_2$ ) or dihydrogen ( $\text{H}_2$ ) was flushed (at  $50\text{ l h}^{-1}$ ) through the medium.

Once  $E_{h7}$  was stable, the medium was inoculated to obtain an optical density of 0.03 at 600 nm. Optical density, pH,  $E_{h7}$  and  $PO_2$  were measured every 30 min.

## 2.4 $E_{h7}$ measurement

$E_{h7}$  was monitored throughout growth using a redox electrode (pT4805-SC-DPAS-K8S/225, Mettler Toledo). In order to obtain a correct measure of  $E_{h7}$ , the redox probe's metal electrode was polished with alumina powder (Durmax) and a control measure was performed in tap water before each experiment (Abraham *et al.*, 2013). Measured  $E_h$  values were corrected against both reference electrode and pH to obtain  $E_h$  at pH 7. The equation used was:  $E_h = E_m + E_{ref}$ , where  $E_h$  is redox potential in relation to the normal hydrogen electrode,  $E_m$  is the measured potential, and  $E_{ref}$  is the reference electrode potential (207 mV at 20°C). In order to correct for pH effect on  $E_h$  measurements, the  $E_{h7}$  value was calculated using the Leitsner and Mirna equation,  $E_{h7} = E_h - \alpha \cdot (7 - pH_m)$  (Leitner and Mirna, 1959), where  $pH_m$  is the measured pH value and  $\alpha$  is the Nernst factor specific to the medium used. For JB medium,  $\alpha = 39.6$  mV/pH unit, as experimentally determined by measuring the  $E_h$  of JB medium at each different pH level in the range 3 to 8 and adjusted with HCl and KOH.

## 2.5 Acid and thermal shocks

Cells were collected in the mid-exponential growth phase and submitted to acid stress at pH4 or thermal stress at 50°C for 30 min after dilution to 1/10 in a Hungate tube with stirring. After stress, cells were diluted in 100 mmol  $l^{-1}$  phosphate buffer pH 7.0 and plated onto a JB plate. Cell concentration was calculated as colony forming units per ml (CFU  $ml^{-1}$ ). Viability loss was expressed as  $\log(N_0/N)$ , where  $N$  is viable count after 30 min of stress and  $N_0$  is viable count at the initial time point. Standard methods were used to determine statistical significance and analyze the data, and included Student's t-tests. When comparing groups, a P-value of  $<0.05$  was considered to indicate a statistically significant difference.

## **2.6 Determination of metabolite concentrations**

In controlled cultures, samples were taken after cells reached stationary phase. Aliquots were centrifuged at 7,000 *g* for 10 min at 4°C, and the supernatants were stored at –20°C until analysis. Glucose, acetate, and lactate concentrations were measured using Biosentec enzymatic kits (Toulouse, France), and ethanol, succinate, and formate were measured using a Biopharm enzymatic kit (Darmstadt, Germany) following the manufacturer's instructions.

Acetoin and 2,3 BD concentrations were measured using a high-performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with a refractive index detector (RID) and Sugar-Pak column (Waters 085188). The conditions were: sample volume: 10 µl, mobile phase: 50 mg l<sup>-1</sup> EDTA.Na<sub>2</sub>Ca, flow rate: 0.6 ml min<sup>-1</sup>, column temperature: 85°C.

The carbon recovery calculation considered the two CO<sub>2</sub> produced during the 2,3 BD pathway but not the CO<sub>2</sub> theoretically produced by the pyruvate dehydrogenase.

## **3 Results**

### **3.1 Reducing activity and acidification capacity of *Bacillus cereus* in unregulated batch cultures**

Because  $E_h$  is strongly affected by pH of the media, measured  $E_h$  value was adjusted according to pH of the media in order to obtain  $E_{h7}$ . Good correction of measured  $E_h$  values was essential for cross-comparing between the different sets of experiments. An average value of 39.6 mV per pH unit for JB media (JB) at 37°C was found and used to replace the Nernst factor (59 mV) in the  $E_{h7}$  estimation (see Materials and Methods).

To investigate the reducing and acidification capacities of *B. cereus* F4430, cells were grown in unregulated conditions in JB medium at initial pH 7 and initial  $E_{h7}$  (+ 214 mV). As shown in Figure 1, there was a pH drop from 7 to 5.3 and a strong decrease in  $E_{h7}$ . Growing cells significantly reduced the JB from +214 mV ( $\pm 17$  mV) to -101 mV ( $\pm 35$  mV), corresponding to an  $E_{h7}$  amplitude of  $315 \pm 22$  mV.

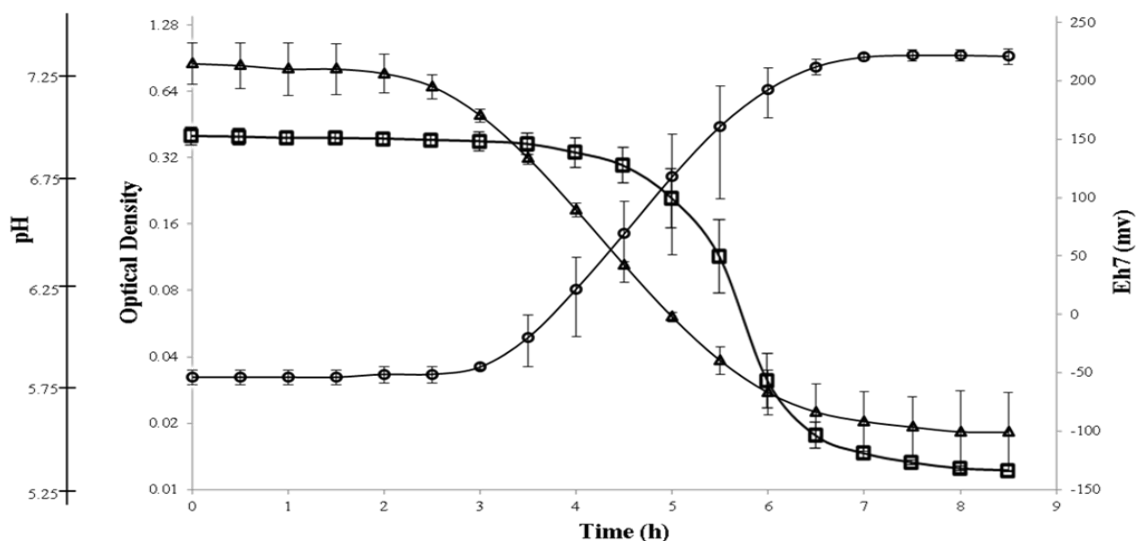


Figure 1: Acidification and reducing capacity of *Bacillus cereus* F4430 grown (●) in unregulated batch cultures at 37°C, at initial pH 7 (■) and initial  $E_{h7}$  (▲). Experiments conducted in triplicate.

The shape of the  $E_{h7}$  curve showed three distinct phases: (i) an initial phase where  $E_{h7}$  showed no change or a very slight decrease that correlated with the lag phase; (ii) a second phase where  $E_{h7}$  quickly dropped from early growth to the stationary growth phase; and (iii) a third phase of constant  $E_{h7}$  corresponding to the stationary growth phase. We conclude that *B. cereus* had strong reduction capacities. Moreover, comparison of specific reduction rate and specific pH value rate against specific growth rate showed (Fig. 2) that (i) the reduction activity began half an hour before the start of growth. Peak specific reduction rate ( $3.5 \pm 0.3$  mV.h<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>) occurred about 1½ hours before cells reached peak specific growth rate, and decreased rapidly thereafter. The maximum specific pH value rate occurred at the early stationary phase, and pH evolution stopped as growth stopped.

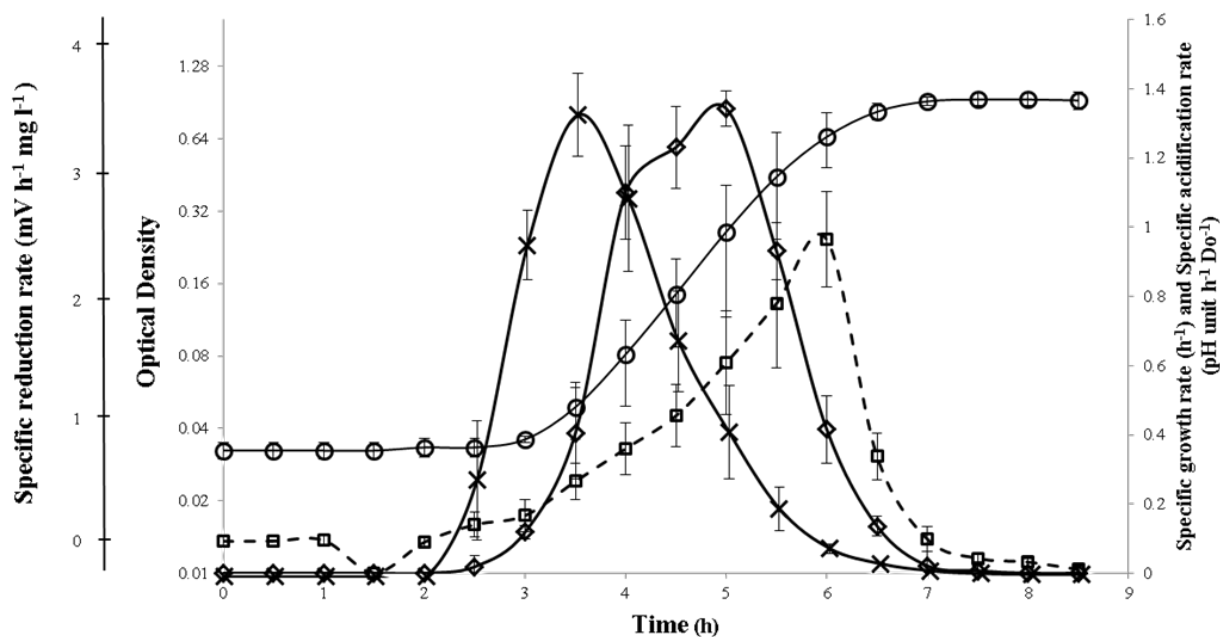


Figure 2: Time-course evolution in specific reduction rate (x), specific growth rate (d) and specific acidification rate (s) of *Bacillus cereus* grown (o) in unregulated batch cultures at 37°C. Experiments conducted in triplicate.

### 3.2 Effects of $E_{h7}$ and controlled pH on *Bacillus cereus* regulated batch growth

In order to chart the effects of  $E_{h7}$  and pH on *B. cereus* F4430 growth parameters, cells were grown in regulated batch cultures under two different pH conditions (7 and 5.5) and three  $E_{h7}$  levels using three different oxidizing or reducing gases: air (high  $E_{h7}$ ), nitrogen (low  $E_{h7}$ ), and hydrogen (very low  $E_{h7}$ ). As shown in Figure 3, under air flushing at pH 7 and 5.5, initial  $E_{h7}$  is very close to the initial  $E_{h7}$  obtained in unregulated batch cultures (Fig.1). The final  $E_{h7}$  values were higher at high  $E_{h7}$  than low  $E_{h7}$  and very low  $E_{h7}$ , respectively. Low  $E_{h7}$  flushing led to the greatest amplitude in reduction, at 175 mV versus around 100 mV for high  $E_{h7}$  and 50 mV for very low  $E_{h7}$ . pH had no significant impact on reduction amplitude.

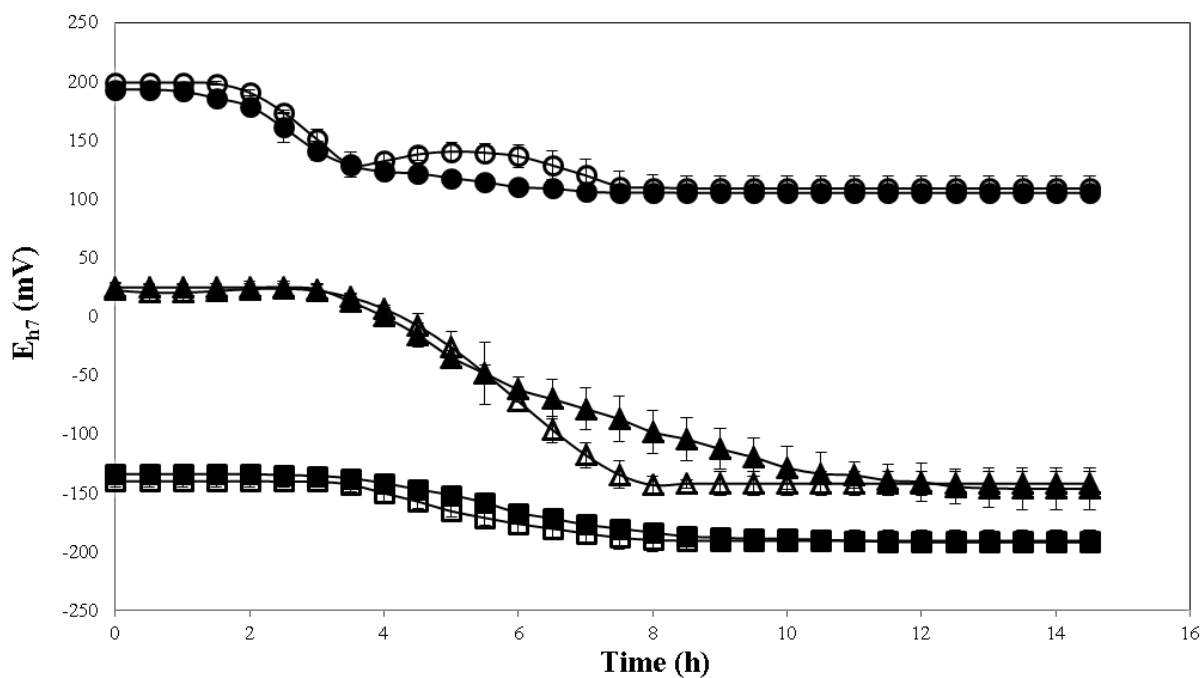


Figure 3: Time-course evolution in  $E_{h7}$  potential of *Bacillus cereus* F4430 grown in regulated batch cultures under different atmospheres conditions: air flushing (high  $E_{h7}$ ) (●), nitrogen flushing (low  $E_{h7}$ ) (▲) or hydrogen flushing (very low  $E_{h7}$ ) (■, at pH 7 (unfilled symbols) or pH 5.5 (filled symbols)). Experiments conducted in triplicate.

Under nitrogen, there was a slower and longer reduction phase at pH 5.5 compared to pH 7 but not in other  $E_{h7}$  or pH conditions. Under high  $E_{h7}$ , reduction steps occurred and finished earlier than in the other conditions (reduction finished in 6 hours under high  $E_{h7}$  at pH 7 compared to 8 hours under low  $E_{h7}$  at pH 7).

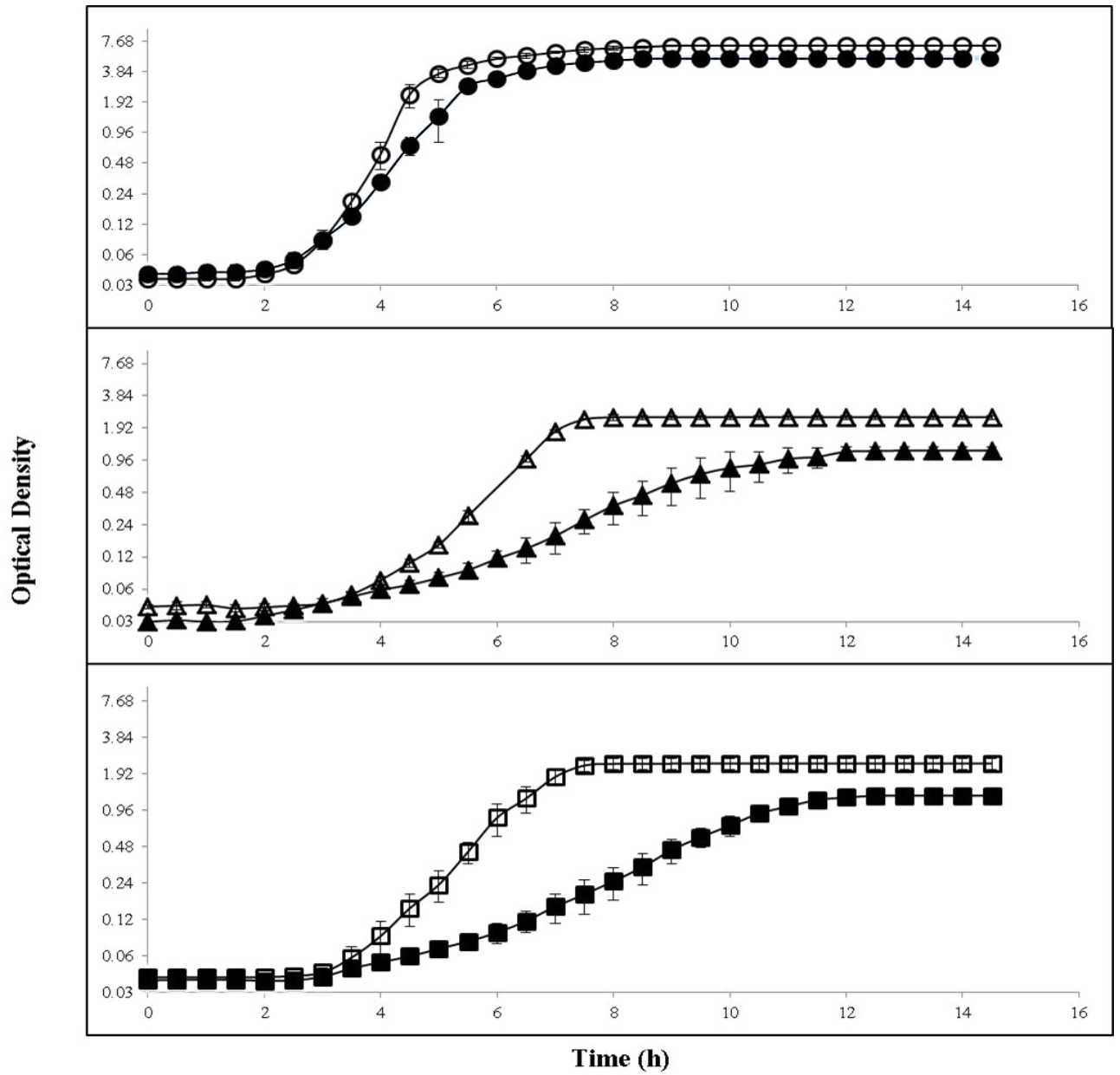


Figure 4: *Bacillus cereus* growth kinetics under air flushing (high  $E_{h7}$ ) (●), nitrogen flushing (low  $E_{h7}$ ) (▲) or hydrogen flushing (very low  $E_{h7}$ ) (■) at pH 7 (unfilled symbols) or pH 5.5 (filled symbols). Experiments conducted in triplicate.



Atmosphere	Initial $E_{h7}$ (mV)	Final $E_{h7}$ (mV)	Amplitude (mV)	MSRR ( $\text{mV h}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{l}^{-1}$ ) *	Dry weight ( $\text{g l}^{-1}$ )	$\mu_{\text{max}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )
High $E_{h7}$ pH 7	200 ± 1	109 ± 10	90 ± 10.5	13.1 ± 0.39	2.7 ± 0.27	2.72 ± 0.17
High $E_{h7}$ pH 5.5	193 ± 6	105 ± 3	88 ± 3	9.77 ± 1.8	1.98 ± 0.09	1.82 ± 0.1
Low $E_{h7}$ pH 7	22 ± 6	-158 ± 7	177 ± 10	10.5 ± 1.71	0.94 ± 0.04	1.3 ± 0.09
Low $E_{h7}$ pH 5.5	26 ± 3	-146 ± 17	170 ± 20	1.49 ± 0.45	0.46 ± 0.019	0.67 ± 0.054
Very low $E_{h7}$ pH 7	-140 ± 5	-190 ± 10	50 ± 10	7.75 ± 0.78	0.90 ± 0.09	1.45 ± 0.06
Very low $E_{h7}$ pH 5.5	-134 ± 6	-192 ± 11	58 ± 3.5	6.53 ± 0.69	0.49 ± 0.08	0.66 ± 0.04

**Table 1:** Growth parameters of *Bacillus cereus* F4430 grown under three  $E_{h7}$  levels and two pH levels. Experiments were conducted in triplicate. Air (high  $E_{h7}$ ),  $\text{N}_2$  (low  $E_{h7}$ ),  $\text{H}_2$  (very low  $E_{h7}$ ). \*: maximal specific reduction rate.

Growth curves and growth parameters are reported in Figure 4 and Table 1. Biomass was higher under high  $E_{h7}$  than under low and very low  $E_{h7}$  for which no difference in final biomass was observed on cells grown low  $E_{h7}$  and very low  $E_{h7}$ . pH had a very strong influence under each atmosphere. Compared to pH 7, pH 5.5 led to a 30% decrease in biomass under high  $E_{h7}$  and there was a similar decrease (50%) in biomass under low  $E_{h7}$  and very low  $E_{h7}$ . Compared to pH 7, pH 5.5 led to a 49.5% decrease in maximal specific growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ ) under low  $E_{h7}$  and 54.5% under very low  $E_{h7}$ . No significant difference in  $\mu_{\text{max}}$  was observed under low  $E_{h7}$  than under very low  $E_{h7}$ . Therefore,  $E_{h7}$  strongly influenced shape of the bacterial growth curve, final biomass values and maximal specific growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ ).

### 3.3 Impact of $E_{h7}$ and pH on *Bacillus cereus* resistance to acid and thermal stress

As shown above,  $E_{h7}$  and pH levels affect *B. cereus* F4430 growth parameters. To investigate whether these parameters can influence the stress response of *B. cereus*, we studied the impact of  $E_{h7}$  and culture pH levels on acid tolerance response (ATR). *B. cereus* cells harvested in the mid-exponential growth phase were exposed to a 30 min acid shock at pH 4 or to a 30 min thermal shock at 50°C. Results are presented in Table 2.

Atmosphere	Acid stress (Log (N <sub>0</sub> /N))			Thermal stress (Log (N <sub>0</sub> /N))		
	pH 7.0	pH 5.5	Δ <sub>7-5.5</sub>	pH 7.0	pH 5.5	Δ <sub>7-5.5</sub>
High E <sub>h7</sub>	4.45 ± 0.225	3.3 ± 0.16	1.11 ± 0.08	5.52 ± 0.26	3.46 ± 0.17	1.38 ± 0.3
Low E <sub>h7</sub>	5.21 ± 0.39	3.51 ± 0.03	1.7 ± 0.21	5.1 ± 0.39	4.03 ± 0.08	1.07 ± 0.22
Very low E <sub>h7</sub>	4.28 ± 0.35	2.69 ± 0.25	1.61 ± 0.08	4.48 ± 0.28	2.5 ± 0.22	2 ± 0.21

**Table 2:** Acid stress lethality and thermal stress lethality of *Bacillus cereus* grown under three levels of E<sub>h7</sub>, i.e. air (high E<sub>h7</sub>), nitrogen (low E<sub>h7</sub>) and hydrogen (very low E<sub>h7</sub>), and two pH levels, i.e. pH 7 and pH 5.5. Lethality results are presented as log (N<sub>0</sub>/N). Δ<sub>7-5.5</sub>: difference between lethality at pH 7 and pH 5.5. Statistical comparisons were performed with a Student's t-test.

The results on acid-stressed cells show that (i) whatever the E<sub>h7</sub> conditions, lethality was greatest in cells grown at pH 7 than at pH 5.5; (ii) at pH 5.5, lethality was greatest under high E<sub>h7</sub> than under low and very low E<sub>h7</sub>

For thermal-stressed cells, lethality was lowest after growth at pH 5.5 compared to growth at pH 7. Moreover, thermal stress lethality was lower under very low E<sub>h7</sub> whatever the pH conditions.

These results show that for each stress condition, lethality was lower in cells grown at pH 5.5 than at pH 7. Consequently, ATR was encountered in each set of atmosphere conditions and was slightly enhanced at low E<sub>h7</sub> level. Moreover, cells pre-cultivated at pH 5.5, and consequently acid pre-adapted, were able to induce a protective effect against thermal stress. This shows that acid pre-adaptation induced a cross-protection phenomenon and led to better thermal stress survival for pre-adapted cells.

### 3.4 End-product metabolites and carbon recovery

End-products from glucose fermentation (ethanol, formate, succinate, acetate, lactate, 2,3 BD) were assayed in order to determine the metabolic pathways used by *B. cereus* F4430 during growth under low and very low  $E_{h7}$  and two pH levels (7 and 5.5). Results are presented in Table 3.

Atmosphere and pH	Metabolite production (mol mol <sup>-1</sup> of glucose consumed)							
	Lactate	Ethanol	Acetate	Formate	Succinate	Acetoine	2,3-butanediol	Carbon recovery
Low $E_{h7}$ pH 7	1.02 ± 0.13	0.08 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.6 ± 0.1	0.01 ± 0.003	0	0.13 ± 0.02	89.00% ± 8%
Low $E_{h7}$ pH 5.5	0.78 ± 0.11	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.02 ± 0.005	0	0.5 ± 0.05	98.00% ± 6%
Very low $E_{h7}$ pH 7	1 ± 0.11	0.13 ± 0.01	0.3 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.02 ± 0.004	0	0.11 ± 0.001	85.00% ± 7%
Very low $E_{h7}$ pH 5.5	0.6 ± 0.12	0.15 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.2 ± 0.03	0.02 ± 0.006	0	0.4 ± 0.03	83.00% ± 6%

**Table 3:** End-products from glucose metabolism of *B. cereus* grown in controlled batches in JB medium under different  $E_{h7}$  and pH conditions. Values are means of three independent cultures ± standard deviations.

At pH 7, metabolite production was consistent with the use of the mixed acid fermentation. Lactate was the major metabolite produced under each  $E_{h7}$  or pH level, followed by formate and acetate, and there was only weak production of 2,3 BD (0.1 mol mol<sup>-1</sup> glucose used). The production of each of these three organic acids was lower at pH 5.5 compared to pH 7, indicating a link between this pathway and low pH. Furthermore, 2,3 BD production was far higher (0.5-0.4 mol mol<sup>-1</sup> glucose used) at pH 5.5 than at pH 7 (0.1 mol mol<sup>-1</sup> glucose used).

No significant differences were observed between the two pH levels for ethanol and succinate production, and no acetoin was detected. Ethanol production was significantly higher under very low  $E_{h7}$  than under low  $E_{h7}$ , consistent with previous observations (Zigha *et al.*, 2006).

## 4 Discussion

### 4.1 Reductive abilities of *B. cereus*.

Some microorganisms have strong reducing capacities, such as *Clostridium botulinum* (340 mV reduction amplitude; (Smoot and Pierson, 1979) or *Pseudomonas fluorescens* (400 mV reduction amplitude; (Oblinger and Kraft, 1973). Here, *B. cereus* grown in unregulated batch cultures showed an external  $E_{h7}$  decrease close to -100 mV with a reduction amplitude of 300 mV. Several hypotheses can be put forward to explain this strong reducing capacity of bacterial cells. Firstly, hydrogen or reductive metabolic products could be released during bacterial growth. This is the case for *Escherichia coli*, which produced  $H_2$  from formate dehydrogenase (Kirakosyan *et al.*, 2004). In our experiments, we found a significantly higher final  $E_{h7}$  under nitrogen (-146 mV) than under hydrogen batch cultures (-192 mV). Therefore, if hydrogen were produced, the final  $E_{h7}$  values under nitrogen flush culture should be about the same as the  $E_{h7}$  measured under hydrogen flush cultures, but this was not the case in our study. In addition, according to the stoichiometry of glucose metabolism, carbon recovery was completed without taking into account the  $CO_2$  produced from the activity of formate dehydrogenase. Therefore, *B. cereus* F4430 does not produce hydrogen. Another hypothesis to explain the drop in  $E_{h7}$  could be consumption of oxidizing metabolites or gases like di-oxygen during *B. cereus* growth (Jacob, 1970). However, we observed a strong reducing activity in low or very low  $E_{h7}$  batch cultures which were oxygen free before inoculation by nitrogen or hydrogen bubbling. We can thus conclude that the reducing capacity of *B. cereus* is not linked to presence of oxygen. The strong reducing capacities of *B. cereus* could also be

explained by the involvement of exofacial thiol groups, as previously shown in *Lactococcus lactis* (Michelon et al., 2010). Further trials are needed to study thiol involvement in the reducing capacities of *B. cereus*.

#### **4.2 Effect of $E_{h7}$ and pH on *B. cereus* growth parameters.**

It was of particular interest to understand how the reduction capacities of *B. cereus* could be modulated by external  $E_{h7}$  and pH levels. For example, one focus of interest is the increase in diarrheal toxin production by *B. cereus* in anaerobic conditions compare to aerobic conditions (Duport *et al.*, 2004). Consequently, we studied the effects of three  $E_{h7}$  levels and two pH levels (7 and 5.5) on *B. cereus* reductive abilities and growth parameters.

Concerning growth parameters, low  $E_{h7}$  (nitrogen flushing) or very low  $E_{h7}$  (hydrogen flushing) had strong effects on biomass and maximal specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) compared to high  $E_{h7}$  (air flushing). There were no significant differences between the effects of low and very low  $E_{h7}$  on final biomass and  $\mu_{max}$  for one considered pH level. This suggests that low or very low  $E_{h7}$  alone are not a sufficient barrier to influence bacterial growth. Similar observations were obtained for *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* (Rodel and Lucke, 1990). However, the combination of low or very low  $E_{h7}$  with low pH had a strong impact on all the growth parameters, leading to a 50% biomass reduction at low pH under low or very low  $E_{h7}$  and a 75% reduction at low pH between high and low  $E_{h7}$ . In addition,  $\mu_{max}$  decreased drastically with combined low  $E_{h7}$  and low pH: 50% reduction between high  $E_{h7}$  and low  $E_{h7}$  at pH 7 and 60% decrease between high  $E_{h7}$  and low  $E_{h7}$  at pH 5.5. This type of pH effect has previously been reported in *Listeria monocytogenes* (Cheroutre-Vialette *et al.*, 1998).

### 4.3 Effects of E<sub>h7</sub> and pH on *B. cereus* glucose metabolism

Other effects of low pH on *B. cereus* physiology have been well documented (Jobin *et al.*, 2002, Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011, Thomassin *et al.*, 2006). In acid-adapted cells, internal pH stabilizes at around 6.2, which is a level that allows the metabolic or protein activities essential for cell survival. Moreover, acid-adapted cells increased arginine deiminase and lysine decarboxylase activities, leading to proton consumption and excretion that play a role in intracellular pH homeostasis. All these adaptations converge to induce an adaptive response in bacteria submitted to a sub-lethal acid environment and offer protection against subsequent exposure to a lethal acid environment. This mechanism, called acid tolerance response (ATR), is observed in other microorganisms, such as *Aeromonas hydrophila* (Karem *et al.*, 1994), *Escherichia coli* and *Streptococcus sobrinus* (Nascimento *et al.*, 2004). In *B. cereus*, the ATR intensity is dependent on growth rate, growth phase, external pH value, presence of amino acids, and *de novo* protein synthesis (Thomassin *et al.*, 2006).

Focusing on pH effects, our study highlighted a new metabolic strategy possibly connecting metabolic adaptations and acid stress resistance. We observed that production of acid end-products such as lactate, acetate and formate was drastically reduced at pH 5.5 whereas 2,3 BD production increased. Acetate, formate and especially lactate are weak organic acids that are not charged at low pH and can easily pass the cell membrane in the protonated form before dissociating at the cytoplasmic pH, making intracellular pH regulation very difficult at low pH (Kashket, 1987). Lowering the production of these organic acids can lead to a better regulation of internal pH homeostasis, which is critical for preservation of cell functions during acid stress. Such a mechanism has previously been observed for *Lactococcus lactis* or *Streptococcus mutans* (Iwami *et al.*, 1992, Waché *et al.*, 2002). At acid pH, while the production of lactate, acetate and formate decreased, 2,3 BD production increased, suggesting that the 2,3 BD pathway serves, as is the case in other bacteria, to curb the decrease in

external pH caused by the synthesis of organic acids. In addition, activation of the 2,3 BD pathway could be a low-pH adaptation, as 2,3 BD is a hydrocarbon with weak effects on intracellular pH (Ji *et al.*, 2011) and leads to consumption of  $H^+$ , thus counteracting the internal cell acidification. Moreover, reduction of acetoin to 2,3 BD permits the regeneration of  $NAD^+$  and thereby participates in internal  $E_{h7}$  homeostasis (Magee and Kosaric, 1987). Consequently, the use of the 2,3 BD pathway could be part of the ATR of *Bacillus cereus*, as has been observed for *Serratia Plymuthica* (Vivijs *et al.*, 2014). Our results are supported by transcriptomics assays realized on *B. cereus* and showing an up-regulation of genes encoding acetolactate synthase and 2,3 BD dehydrogenase at pH 5.5 compared to pH 7 (Mols *et al.*, 2010a). 2,3 BD production was previously shown in *B. cereus* YUF-4 {Hosaka, 2001 #279} grown at pH 7. Interestingly, it's the first time that this production was observed linked to low pH in *B. cereus*.

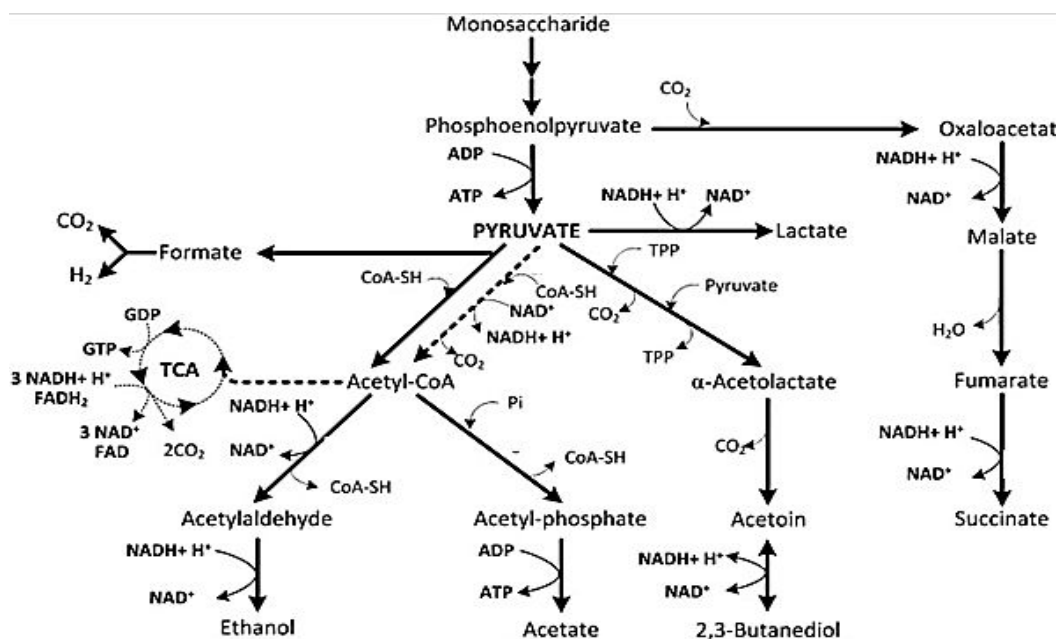


Figure 5: Glucose metabolism of *Bacillus cereus* F4430/73 grown in aerobiosis (-----) and anaerobiosis (—)

Furthermore, ethanol production increased under very low  $E_{h7}$  compared to low  $E_{h7}$  whatever the pH level. It was proved that very low  $E_{h7}$  led to a modified ratio in the intracellular NADH /  $NAD^+$  balance, leading to an excess of NADH that disrupts intracellular  $E_{h7}$  homeostasis (Sridhar and Eiteman, 2001). Therefore, by promoting ethanol production, *B. cereus* may adjust (balanced) its intracellular NADH /  $NAD^+$  ratio and thus limit intracellular  $E_{h7}$  perturbation as it was previously demonstrated (Zigha et al., 2006).

#### **4.4 Effects of $E_{h7}$ and pH on the ATR of *B. cereus***

We found that  $E_{h7}$  influenced the ATR of *B. cereus*. Indeed, cells grown under low or very low  $E_{h7}$  showed a slightly enhanced ATR response compared to cells grown at high  $E_{h7}$ . This difference could be explained by induction, under aerobiosis, of a secondary oxidative stress generated by primary acid stresses that decrease cell viability. This hypothesis is consistent with previous studies showing that oxidative-associated stress genes coding for catalase, superoxide dismutase, thioredoxin and the major oxidative stress regulator *PerR* were induced following acid stress (Mols et al., 2010b, Mols and Abee, 2011b). The induction of these oxidative stress-associated genes suggests that oxidative compounds are generated in response to exposure to low pH in *B. cereus* and may result from a disruption of the electron transport chain at pH 5.5 (Mols et al., 2010b).

The acid pre-adaptation step induced thermal protection. This cross-protection shows how some adaptation mechanisms could be common to different stresses. Similar results were observed for *Escherichia coli* (Hengge-Aronis, 1993) and *Arcobacter butzleri* (Isohanni et al., 2013). Jobin et al (personal communication) showed in *B. cereus* ATCC14579 that the transcription level of three heat shock protein (HSP) coding genes (*DnaJ*, *Dnak* and *GroEL*) was increased after growth at pH 5.5 compared to growth at pH 7. These three genes are



involved in the heat stress responses of numerous bacteria, including *Listeria monocytogenes* (Hanawa *et al.*, 2000), *staphylococcus aureus* (Chastanet *et al.*, 2003) and *Bacillus subtilis* (Endo *et al.*, 2006). The thermal cross-protection after acid pre-adaptation in *B. cereus* is probably part of the activation of HSP coding genes after growth at pH 5.5.

To conclude, *B. cereus* F4430 cultivated in JB had important reducing and acidifying capacities in unregulated and regulated batch cultures. *B. cereus* growth parameters and final biomass were drastically lowered under a combination of low  $E_{h7}$  and low pH compared to high  $E_{h7}$  and neutral pH. Low pH conditions led to significant metabolic shifts, particularly the use of the 2,3 BD pathway which is probably involved in pH homeostasis. Finally, the acid and thermal stress resistances of *B. cereus* were enhanced by cross-protection mechanisms. These results could have important implications for our understanding of the mechanisms involved in *B. cereus* acid stress adaptation and  $E_{h7}$  variation resistance.

## **5 Acknowledgements:**

*This work was supported by a French National Research Agency (ANR) grant under the ALID program, Food-Redox project (ANR-11-ALID-0001). The authors thank Sara Esther Diomandé for her critical reread of the manuscript.*

### Research highlights:

Three  $E_{h7}$  levels were generated using three different pure gases.

We studied the reduction capacity of *B. cereus* in unregulated and regulated batches.

We examined the impact of  $E_{h7}$  and pH on *B. cereus* growth parameters.

Increased 2,3 BD production at low pH compared to neutral pH

Acid-tolerance response is slightly enhanced under low  $E_{h7}$  as cross-protection occurs.

## 6 Conflict of interests: no conflict of interest to declare

## 7 References:

- Abraham, S., Cachon, R., Jeanson, S., Ebel, B., Michelon, D., Aubert, C., Rojas, C., Feron, G., Beuvier, E., Gervais, P. & De Coninck, J. (2013) A procedure for reproducible measurement of redox potential ( $E_h$ ) in dairy processes. *Dairy Science & Technology*, **Accepted**.
- Afchain, A. L., Carlin, F., Nguyen-the, C. & Albert, I. (2008) Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *Int J Food Microbiol*, **128**, 165-173.
- Beecher, D. J. & MacMillan, J. D. (1990) A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* **58**, 2220-2227.
- Bourel, G., Henini, S., Diviès, C. & Garmyn, D. (2003) The response of *Leuconostoc mesenteroides* to low external oxidoreduction potential generated by hydrogen gas. *J Appl Microbiol*, **94**, 280-288.
- Chastanet, A., Fert, J. & Msadek, T. (2003) Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, **47**, 1061-73.
- Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J. C. & Lebert, A. (1998) Effects of pH or aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*, **42**, 71-77.
- Choma, C., Clavel, T., Dominguez, H., Razafindramboa, N., Soumille, H., Nguyen-the, C. & Schmitt, P. (2000) Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. *Int J Food Microbiol*, **55**, 73-77.
- Clavel, T., Carlin, F., Dargaignaratz, C., Lairon, D., Nguyen-The, C. & Schmitt, P. (2007) Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and Haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media. *J Appl Microbiol* **103**, 1568-1575.
- Clavel, T., Carlin, F., Lairon, D., Nguyen-The, C. & Schmitt, P. (2004) Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol* **97**, 214-219.
- Endo, A., Sasaki, M., Maruyama, A. & Kurusu, Y. (2006) Temperature adaptation of *Bacillus subtilis* by chromosomal groEL replacement. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 2357-62.
- Granum, P. E. (1994) *Bacillus cereus* and its toxins. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, **23**, 61S-66S.
- Hanawa, T., Kai, M., Kamiya, S. & Yamamoto, T. (2000) Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the dnaK heat shock operon of *Listeria monocytogenes*. *Cell Stress Chaperones*, **5**, 21-9.
- Hengge-Aronis, R. (1993) Survival of hunger and stress: The role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell*, **72**, 165-168.
- Hosaka, T., Ui, S., Ohtsuki, T., Mimura, A., Ohkuma, M. & Kudo, T. (2001) Characterization of the NADH-linked acetylacetoin reductase/2,3 BD dehydrogenase gene from *Bacillus cereus* YUF-4. *J Biosci Bioeng*, **91**, 539-44.
- Isohanni, P., Huehn, S., Aho, T., Alter, T. & Lyhs, U. (2013) Heat stress adaptation induces cross-protection against lethal acid stress conditions in *Arcobacter butzleri* but not in *Campylobacter jejuni*. *Food Microbiol* **34**, 431-435.
- Iwami, Y., Abbe, K., Takahashi-Abbe, S. & Yamada, T. (1992) Acid production by streptococci growing at low pH in a chemostat under anaerobic conditions. *Oral Microbiol Immunol*, **7**, 304-8.
- Ji, X.-J., Huang, H. & Ouyang, P.-K. (2011) Microbial 2,3 BD production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, **29**, 351-364.
- 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. *Int J Food Microbiol*, **79**, 65-73.

Karem, K. L., Foster, J. W. & Bej, A. K. (1994) Adaptive acid tolerance response (ATR) in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology*, **140**, 1731-1736.

Kashket, E. R. (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters*, **46**, 233-244.

Kim, J.-B., Kim, J.-M., Cho, S.-H., Oh, H.-S., Choi, N. J. & Oh, D.-H. (2011) Toxin genes profiles and toxin production ability of *Bacillus cereus* isolated from clinical and food Samples. *J. Food Sci.*, **76**, T25-T29.

Kirakosyan, G., Bagramyan, K. & Trchounian, A. (2004) Redox sensing by *Escherichia coli*: effects of dithiothreitol, a redox reagent reducing disulphides, on bacterial growth. *Biochem Biophys Res Commun*, **325**, 803-806.

Kouamé, A. K., Djéni, T. N., N'Guessan, F. K. & Dje, M. K. (2013) Postprocessing microflora of commercial attiéke (a fermented cassava product) produced in the south of Côte d'Ivoire. *Lett Appl Microbiol*, **56**, 44-50.

Leistner, L. & Mirna, A. (1959) Das redoxpotential von Pökellaken. *Die Fleischwirtschaft* **8**, 659-666.

Lund, T., De Buyser, M.-L. & Granum, P. E. (2000) A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* **38**, 254-261.

Magee, R. J. & Kosaric, N. 1987. The Microbial Production of 2,3 BD. In: Allen, I. L. (ed.) *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press.

McKillip, J. L. (2000) Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **77**, 393-9.

Mendelson, I., Tobery, S., Scorpio, A., Bozue, J., Shafferman, A. & Friedlander, A. M. (2004) The NheA component of the non-hemolytic enterotoxin of *Bacillus cereus* is produced by *Bacillus anthracis* but is not required for virulence. *Microb Pathogenesis* **37**, 149-154.

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 Journal*, **277**, 2282-2290.

Mols, M. & Abee, T. (2011) Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *EnvironMicrobiol*, **13**, 1387-1394.

Mols, M., van Kranenburg, R., Tempelaars, M. H., van Schaik, W., Moezelaar, R. & Abee, T. (2010a) Comparative analysis of transcriptional and physiological responses of *Bacillus cereus* to organic and inorganic acid shocks. *Int J Food Microbiol*, **137**, 13-21.

Mols, M., Van Kranenburg, R., Van Melis, C. C. J., Moezelaar, R. & Abee, T. (2010b) Analysis of acid-stressed *Bacillus cereus* reveals a major oxidative response and inactivation-associated radical formation. *Environ Microbiol*, **12**, 873-885.

Moriarty-Craige, S. E. & Jones, D. P. (2004) Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr*, **24**, 481-509.

Nascimento, M. M., Lemos, J. A. C., Abranches, J., Gonçalves, R. B. & Burne, R. A. (2004) Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. *J Bacteriol* **186**, 6383-6390.

O'Sullivan, E. & Condon, S. (1999) Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H<sup>+</sup>-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 2287-93.

Oblinger, J. L. & Kraft, A. A. (1973) Oxidation-reduction potential and growth of *Salmonella* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Food Sci*, **38**, 1108-1112.

Patel, S. K., Singh, M. & Kalia, V. C. (2011) Hydrogen and polyhydroxybutyrate producing abilities of *Bacillus* spp. from glucose in two stage system. *Indian J Microbiol*, **51**, 418-23.

Rodel, W. & Lucke, F. K. (1990) Effect of redox potential on *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in broth and in pasteurized sausage mixtures. *Int J Food Microbiol*, **10**, 291-301.

Senouci-Rezkallah, K., Schmitt, P. & Jobin, M. P. (2011) Amino acids improve acid tolerance and internal pH maintenance in *Bacillus cereus* ATCC14579 strain. *Food Microbiol*, **28**, 364-372.

Smoot, L. A. & Pierson, M. D. (1979) Effect of oxidation-reduction potential on the outgrowth and chemical inhibition of *Clostridium botulinum* 10755A spores. *J Food Sci*, **44**, 700-704.

Spira, W. M. & Goepfert, J. M. (1975) Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Can J Microbiol*, **21**, 1236-46.

- Sridhar, J. & Eiteman, M. A. (2001) Metabolic flux analysis of *Clostridium thermosuccinogenes*: effects of pH and culture redox potential. *Appl Biochem Biotechnol*, **94**, 51-69.
- Stenfors Arnesen, L., Fagerlund, A. & Granum, P. (2008) From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev*, **32**, 579 - 606.
- Takeno, A., Okamoto, A., Tori, K., Oshima, K., Hirakawa, H., Toh, H., Agata, N., Yamada, K., Ogasawara, N., Hayashi, T., Shimizu, T., Kuhara, S., Hattori, M. & Ohta, M. (2012) Complete genome sequence of *Bacillus cereus* NC7401, which produces high levels of the emetic toxin cereulide. *J Bacteriol*, **194**, 4767-4768.
- Thomassin, S., Jobin, M. & Schmitt, P. (2006) The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH. *Arch Microbiol*, **186**, 229-239.
- Vivijs, B., Moons, P., Geeraerd, A. H., Aertsen, A. & Michiels, C. W. (2014) 2,3 BD fermentation promotes growth of *Serratia plymuthica* at low pH but not survival of extreme acid challenge. *Int J Food Microbiol*, **175**, 36-44.
- Waché, Y., Riondet, C., Diviès, C. & Cachon, R. (2002) Effect of reducing agents on the acidification capacity and the proton motive force of *Lactococcus lactis* ssp. cremoris resting cells. *Bioelectrochemistry*, **57**, 113-118.
- Williams, S. E. & Turnberg, L. A. (1981) Demonstration of a pH gradient across mucus adherent to rabbit gastric mucosa: evidence for a 'mucus-bicarbonate' barrier. *Gut*, **22**, 94-96.
- 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**, 222-233.

#### 4 Présentation synthétique des résultats et conclusions de l'étude :

Cette première étude a permis de dégager plusieurs points importants. Dans les cultures en bioréacteur dont le pH et l'oxygénation n'étaient pas régulés, une amplitude de réduction d'environ 315 mV est observée ce qui se situe dans la moyenne de l'activité réductrice des bactéries aéro-anaérobie facultatives (I.III.5 l'activité réductrice des bactéries TABLEAU 5). On observe que l'activité réductrice débute dès le commencement de la phase exponentielle de croissance, avant que l'acidification du milieu de culture ne démarre.

La comparaison de l'influence de 3 niveaux d' $E_h$  (oxydant, réducteur et très réducteur) et de deux niveaux de pH sur les paramètres de croissance et l'activité réductrice de *B. cereus* en bioréacteur régulés a éclairci plusieurs points.

- Premièrement les taux de croissance maximaux et les densités optiques maximales de *B. cereus* sont plus faibles lors des croissances à bas  $E_h$  par rapport à la croissance en atmosphère oxydante. Cela s'explique car le métabolisme anaérobie (bullage d'azote ou d'hydrogène) est moins énergétique que le métabolisme aérobie ( bullage d'air). Cependant aucune différence significative n'est observée pour les paramètres de croissance testés entre les conditions de bas  $E_h$  et de très bas  $E_h$ .
- Deuxièmement, les variations de pH affectent fortement les biomasses maximales et les taux de croissance maximaux mais n'ont pas d'effet visible sur les cinétiques de réduction du milieu.

A pH acide (pH 5.5), on observe deux adaptations métaboliques fondamentales de *B. cereus*, On observe une diminution très importante de la production de lactate, d'acétate et de formiate lors des cultures à pH 5.5. En parallèle de la diminution de la production de ces acides organiques, une forte augmentation de production de 2,3 BD est observée. Ces deux phénomènes ne sont pas observés dans les cultures réalisées à pH 7. Cette étude est la première à montrer que la production de 2,3 BD est reliée de façon directe à la croissance à pH acide chez *B. cereus*. Le passage de la voie des acides mixtes vers la voie butanediolique lors de la croissance à pH acide de *B. cereus* est un des paramètres cellulaires qui pourraient être impliqués dans la résistance au stress acide et la réponse de tolérance à l'acide de cette bactérie.

Concernant la tolérance à l'acide (ATR), cette réponse se déroule quelque soit les conditions de  $E_h$  testées à pH 5.5. L'induction de l'ATR est légèrement plus importante en anaérobiose comparée à l'aérobiose. Il est possible qu'en aérobiose des stress oxydatifs secondaires aient lieu, augmentant ainsi le désordre cellulaire par perturbation du transport des électrons dans la chaîne respiratoire (référence)

## 5 Fermentation butanediolique et stéréoisomères de 2,3 BD produits en milieux chimiquement définis:

### 5. 1 Dosage du 2,3 BD produit en milieu synthétique AOAC par *B. cereus* ATCC14579

Les résultats présentés dans l'article 1 démontrant que *B. cereus* F4430/73 est capable de produire des quantités importantes de 2,3 BD lors de cultures à pH 5.5 ont été obtenus dans un milieu riche ( JB), L'utilisation d'un milieu chimiquement défini (MOD) (Duport *et al.*, 2004) permettrait de préciser le métabolisme de *B. cereus*. Or, il s'est avéré, que *B. cereus* ne cultivait pas dans ce milieu en anaérobiose à pH 5.5. Peu de temps après l'acceptation de l'article 1 dans le journal *Food Microbiology*, nous avons eut connaissance d'un milieu défini dénommé milieu synthetic broth AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Après test il s'est avéré qu'une croissance de *B. cereus* F4430/73 était possible en milieu AOAC à pH 5.5 en anaérobiose. Dans l'optique de futures expériences en biologie moléculaire il a été décidé de remplacer la souche F4430/73 par une souche séquencée : *B. cereus* ATCC14579. Ces deux souches sont génétiquement très proches (Priest *et al.*, 2004) et appartiennent au même groupe phylogénétique (le groupe IV).

Nous avons à nouveau étudié le métabolisme du 2,3 BD, cette fois ci chez la souche ATCC14579 cultivé en milieu AOAC à pH 5.5 et pH 7.0, en anaérobiose. Les résultats de dosage de l'acétoïne et du 2,3 BD après culture sont présentés dans le tableau 8.

Echantillon	Acétoïne g l <sup>-1</sup>	2,3 BD g l <sup>-1</sup>
AOAC stérile pH 7	0	0
AOAC stérile pH 5.5	0	0
Surnageant de culture pH 7	0	0
Surnageant de culture pH 5.5	0	0.84

TABLEAU 8 : Dosage du 2,3 BD et de l'acétoïne produits par *B. cereus* ATCC14579 cultivé dans le milieu AOAC, en anaérobiose sous bullage de N<sub>2</sub> et à pH 5.5 ou pH7.0. Les cultures bactériennes en fermenteur AOAC ont été réalisées dans Les mêmes conditions que précédemment utilisées (section III.III article 1). Le 2,3-butanediol et l'acétoïne ont été dosé par HPLC selon la methode utilisée dans le travail précédent (section III.III article 1).

Les résultats obtenus confirment qu'en anaérobiose, la voie butanediolique n'est fonctionnelle qu'en condition acide (pH 5.5). Ainsi, la production de 2,3 BD n'est pas due à un biais expérimental lié à l'utilisation d'un milieu. La quantité de 2,3 BD produit après culture à pH 5.5 par *Bacillus cereus* correspond à 50 % (3 carbones sur 6) du total du bilan carbone recouvré. Ce résultat est également comparable à nos données obtenues en JB où le 2,3 BD produit permettait aussi de retrouver 50 % du carbone consommé.

### 5.2 Stéréo-isomérisation du 2,3 BD produit par *B. cereus*

Les expériences de dosage du 2,3 BD par HPLC ont permis d'obtenir des résultats complémentaires portant sur les stéréo-isomères du 2,3 BD produit par *B. cereus* après culture en fermenteur à pH 5.5. Les données d'HPLC obtenues ont été comparées au profil de détection d'une solution de 2,3 BD 0.5g l<sup>-1</sup> comportant un mélange de formes méso-2,3 BD et iso-2,3 BD et au profil de détection du milieu AOAC stérile. Les résultats sont présentés dans la figure 25.

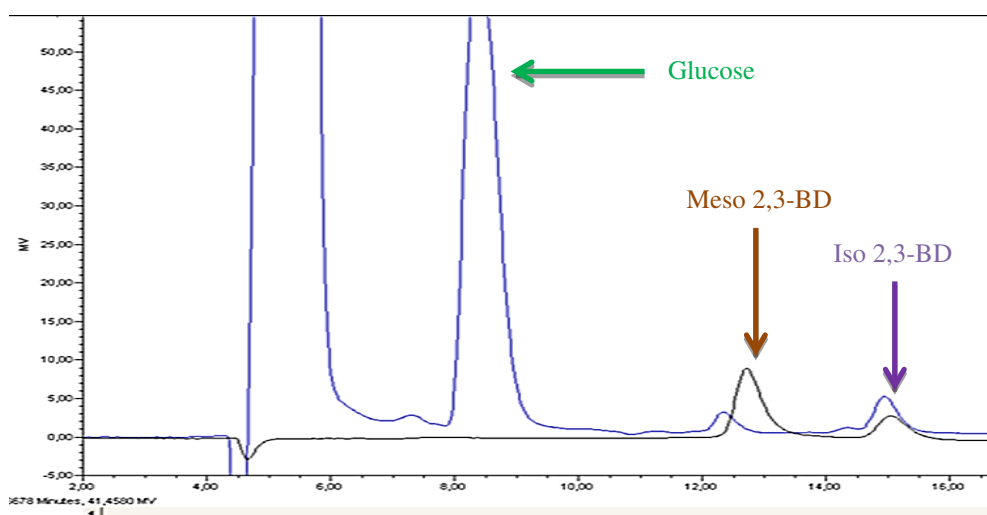


FIGURE 25 : Dosage par HPLC du 2,3 BD présent dans des surnageants de culture de *B. cereus* en phase exponentielle de croissance. Ligne bleue : extrait de surnageant de *B. cereus*. Ligne noire : solution de méso et d'iso-2,3 BD à 0.5 g l<sup>-1</sup>.

Ces résultats montrent que le 2,3 BD produit par *B. cereus* est de type iso-2,3 BD. Cependant il n'est pas possible, à partir de ces résultats, de conclure plus précisément si du R, R-2,3 BD ou du S, S-2,3 BD ou un mélange des deux formes est produit par *B. cereus* cultivé à pH 5.5. Selon les données disponibles pour la souche ATCC14579, le gène codant pour l'acétoïne réductase, l'enzyme à l'origine de la synthèse du 2,3 BD, est annoté comme étant une R, R-2,3 BD déshydrogénase (Ivanova *et al.*, 2003). Ceci semble aller dans le même sens que nos résultats.

### 5.3 Dosage de l'activité acétoïne réductase

Les résultats précédemment obtenus ont démontrés que *B. cereus* cultivé à pH 5.5 produisait du 2,3 BD. L'enzyme catalysant la dernière étape de la fermentation butanediolique (réduction de l'acétoïne en 2,3 BD) est l'acétoïne réductase. De façon à confirmer l'activité de cette enzyme chez *B. cereus* cultivé à pH 5.5, nous avons mesuré son activité enzymatique en conditions *in vitro* en lysats bactériens après culture de cellule à pH 7 et pH 5.5. Les résultats sont présentés dans le tableau 9.



<b>pH</b>	<b>Vitesse initiale (<math>\mu\text{mol ml}^{-1} \text{min}^{-1}</math>)</b>	<b>Activité enzymatique (<math>\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}</math>)</b>
7	ND	ND
5.5	$2.1 \cdot 10^{-3}$	0.2

Tableau 9 : Mesure de l'activité acétoïne réductase de *B. cereus* ATCC14579 en phase stationnaire après culture à pH 7 et pH 5.5 en milieu AOAC. Les vitesses initiales et les activités spécifiques ont été mesurées *in vitro* sur des lysats cellulaires. ND : non détecté dans les conditions testées.  $\text{mg}^{-1}$  = mg de protéines.

Les résultats de cette expérience montrent une activité acétoïne réductase (AR) de  $0.2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de protéines, pour les cellules cultivées à pH 5.5. Aucune activité AR n'est détectée à pH 7. Les valeurs obtenues pour l'activité acétoïne réductase de *B. cereus* sont du même ordre de grandeur que les valeurs obtenues chez *Bacillus subtilis* souches BSF (entre  $0.1$  et  $0.5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) ou *E. coli* BL 21 ( $0,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) dans des conditions d'expérimentations similaires (Fu *et al.*, 2014, Xu *et al.*, 2014). Ces résultats confirment que la voie butanediolique est induite à pH acide.

**CHAPITRE 2 : IMPLICATIONS DES  
THIOLS EXOFACIAUX DANS L'ACTIVITE  
REDUCTRICE DE B. CEREUS**



## 1 Objectif de l'étude

*Bacillus cereus* est capable de s'adapter aux variations de  $E_h$  en modulant l'expression d'un grand nombre de gènes, en adaptant son métabolisme central mais également en augmentant la production de toxines (Duport *et al.*, 2004). Pour cette dernière observation, plus le  $E_h$  sera réducteur, plus la production de toxine sera importante. En plus de s'adapter aux variations d' $E_h$ , *Bacillus cereus* est capable de réduire très fortement son milieu de culture (une amplitude de réduction de  $315 \pm 22$  mV a été mesurée dans le chapitre III.III. article 1). Les mécanismes permettant à *B. cereus* de réduire l' $E_h$  de son milieu de culture sont pour le moment inconnus. Chez *E. coli*, il a été démontré que la production d' $H_2$  et d' $H_2S$  était à l'origine de l'activité réductrice de cette bactérie (Jacob, 1970). Il a également été prouvé que la consommation de certaines molécules oxydantes comme le  $NO_3^-$ , le  $SO_4^{2-}$ , ou encore le Fe III, pouvait être impliquée dans la capacité réductrice des bactéries (Chapelle *et al.*, 1995). Récemment, il a été démontré que des molécules appelées thiols exofaciaux étaient impliqués dans l'activité réductrice de la bactérie *Lactococcus lactis* (Michelon *et al.*, 2010).

Les thiols exofaciaux sont des groupements -SH portés par les acides aminés cystéines et méthionines des protéines membranaires qui sont orientés vers l'extérieur de la cellule. Afin de mettre en évidence les acteurs et les mécanismes impliqués dans l'activité réductrice de *B. cereus*, nous avons, dans un premier temps, utilisé des bloquants des thiols de façon à déterminer leur implication dans l'activité réductrice de *B. cereus*. Dans un deuxième temps nous avons identifié certaines des protéines membranaires de *B. cereus* portant des groupements thiol exofaciaux. Finalement nous avons émis des hypothèses sur le mécanisme pouvant expliquer l'implication des thiols exofaciaux dans l'activité réductrice de *B. cereus*.

*Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 2.*

## 2 Implication of exofacial thiols groups in the reducing activity of *Bacillus cereus*

**Julien Le Lay<sup>a,b</sup>, Halim Bahloul<sup>a</sup>, Alain Guillot<sup>c</sup>, Philippe Schmitt<sup>\*a,b</sup>**

a, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, 84000 Avignon, France.

b, INRA UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, 84000 Avignon, France.

c, INRA, UMR1319 Micalis, 78350 Jouy-en-Josas, France.

**\*Running title:** *Exofacial thiol groups in B. cereus*

To whom correspondence should be addressed: Philippe Schmitt. INRA, UMR408, Site Agroparc, 84914 Avignon Cedex 9, France. Tel.: +33 (0)4 32 72 25 45. E-mail:

[philippe.schmitt@univ-avignon.fr](mailto:philippe.schmitt@univ-avignon.fr)

**Keywords:** *Bacillus cereus*, reducing activity, thiol, thiol–disulfide oxidoreductase, ResA, BdbD

---

**Background:** *B. cereus* interact with its redox environment ( $E_h$ ) by reducing external  $E_h$

**Results:** Exofacial thiol groups are involved in the reducing abilities of *B. cereus*

**Conclusion:** A reducing microenvironment probably surrounds the bacterial cell due to activity of thiol proteins

**Significance:** This study described how *B. cereus* reduces  $E_h$  and focus on pathway scarcely known in this bacterium

### **Abstract**

*Bacillus cereus* is a Gram-positive bacterium that can change the external redox potential of its culture medium from oxidative to more reductive levels. Here we focus on the mechanism

underpinning this reducing capacity. Using thiol blocking reagent, we show that external-oriented (exofacial) thiol groups carried by membrane proteins are involved in the reducing activity of *B. cereus*. To identify some of these proteins with exofacial thiol groups, *in silico* and mass spectrometry analyses were used to focus on membrane proteins with thioredoxin groups. Twenty proteins with exofacial thioredoxin groups were identified in the *B. cereus* ATCC14579 genome, two of which—BdbD and ResA—were detected by spectrometry. These two proteins could be involved in the reducing capacities of *B. cereus*.

## Introduction

*Bacillus cereus* is an aero-anaerobic Gram-positive bacteria widely recognized as one of the major foodborne pathogens (McKillip, 2000) and able to colonize numerous food matrices (Agbobatinkpo *et al.*, 2013, Manguiat and Fang, 2013, Rahimi *et al.*, 2013, Rajkovic *et al.*, 2013). *B. cereus* can resist and adapt to a large number of physical–chemical stresses such as low temperature (Diomandé *et al.*, 2014), low pH or low redox ( $E_{h7}$ ) potential (Jobin *et al.*, 2002, Duport *et al.*, 2006). Studies under low  $E_{h7}$  levels have demonstrated that *B. cereus*

modifies its metabolic flux and the expression pattern of many genes including toxin-coding genes (Duport *et al.*, 2006). While *B. cereus* can adapt to different  $E_{h7}$  levels, it also has the capacity to modify the redox potential of its culture medium from oxidative to more reductive levels (Zigha *et al.*, 2006). These reductive abilities are common to a large number of bacteria including *Escherichia coli* (Kirakosyan *et al.*, 2004), *Proteus vulgaris* (Jacob, 1970), *Cl. perfringens* (Pearson, 1976) or *Listeria monocytogenes* (Ignatova *et al.*, 2010), and can be explained by a set of mechanisms including  $H_2$  production (Chapelle *et al.*, 1995) during mixed acid fermentation. Recently, it was shown that membrane proteins carrying thiol groups (-SH) and especially extracellular-oriented (exofacial) thiol groups are involved in the reducing activity of *Lactococcus lactis* (Michelon *et al.*, 2010).

Highlighting the mechanisms involved in the reductive capacities of *B. cereus* are of primary interest since low  $E_{h7}$  levels lead to increased toxin production (Zigha *et al.*, 2006). Previous metabolic studies and analysis of reductive capacities on *B. cereus* are inconsistent with hydrogen production via the formate dehydrogenase pathway (Zigha *et al.*, 2006). However, *in*

*in silico* experiments show that genes coding for exofacial thiol membrane proteins are present in the genome of different strains of *B. cereus* (Kouwen *et al.*, 2007).

These exofacial thiol groups could be involved in the reducing activity of *B. cereus*. Here, we test this hypothesis and focus on a particular class of thiols well known for their implication in oxidative or reductive pathways: thiol disulfide oxido-reductases (TDORs).

## **Materials and Methods:**

### **Chemicals**

NEM (N-ethylmaleimide), 5, 5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), N-acetyl-L-cysteine and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) were from Sigma (St-Quentin-Fallavier, France). Oregon Green 488 maleimide was from Life Technology (France), *AMdIS* (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, disodium salt) and N-(biotinoyl)-N'-(iodoacetyl) ethylenediamine were from Invitrogen (France).

### **Bacterial strains and culture conditions**

*Bacillus cereus* F4430/73 strain isolated from a disease outbreak (Spira and Goepfert, 1975) was used in all the biochemical experiments. The *B. cereus* ATCC 14579 strain was used for mass spectrometry and *in silico* analysis because the phylogenetic relationships between bacterial strains of the *B. cereus* group, based on *panC* sequences analysis shown that *B. cereus* ATCC 1459 was closed to *B. cereus* F4430/73 (Guinebretière *et al.*, 2008). The ATCC 14579 genome was sequenced in 2003 (Ivanova *et al.*, 2003). Cultures were grown in J-Broth (JB) medium (5 g L<sup>-1</sup> tryptone, 15 g L<sup>-1</sup> yeast extract, 3 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 15 g L<sup>-1</sup> agar for J Agar plates). pH was adjusted to the desired values with KOH or HCl before autoclaving for 20 min at 121°C. Glucose stock solutions (2 mol L<sup>-1</sup>) were sterilized by filtration through a 0.22-µm filter (Minisart, Sartorius, France) and added after autoclaving.

### **Preculture conditions**

*B. cereus* from stock cultures was isolated on a JB plate for 24 h at 37°C. One colony was transferred to a 400 mL JB-broth flask, added with 30 mmol L<sup>-1</sup> of glucose, and incubated at 37°C for 16 h.

## Batch cultures

All batch cultures were performed in a 2 L bioreactor (Inceltech 1573/04) using a 1.3 L working volume of JB added with 30 mmol L<sup>-1</sup> of glucose. All experiments were carried out at 37°C under shaking at 300 rpm. A cryostat bath (Polystat, Bioblock Scientific) was used to ensure that culture temperature was tightly controlled. pH electrodes (405-DPAS-SC-K8S/225, Mettler Toledo) were used to monitor and hold pH at 7.0. Nitrogen (N<sub>2</sub>) was flushed (50 L h<sup>-1</sup>) through the medium to generate the range of initial redox conditions and maintain good anaerobiosis. A PO<sub>2</sub> electrode (Ln Pro 6800, Mettler Toledo) was used to control partial oxygen pressure (PO<sub>2</sub>). E<sub>h</sub> was monitored throughout growth using a redox electrode (pT4805-SC-DPAS-K8S/225, Mettler Toledo).

After redox potential stabilization, the medium was inoculated to obtain a final OD at 600 nm of 0.03. OD, pH, E<sub>h</sub> and PO<sub>2</sub> were measured every 30 min.

## Redox measurement

In order to obtain a correct measure of E<sub>h7</sub>, the redox probe's metal electrode was polished with alumina powder (Durmax) and a control measure was performed in tap water before each experiment (Abraham *et al.*, 2013). Measured E<sub>h</sub> values were corrected against both reference electrode and pH to obtain E<sub>h</sub> at pH 7. The equation used was: E<sub>h</sub> = E<sub>m</sub> + E<sub>ref</sub>, where E<sub>h</sub> is the redox potential in relation to the normal hydrogen electrode, E<sub>m</sub> is measured potential, and E<sub>ref</sub> is reference electrode potential (207 mV at 20°C). To correct for pH effect on E<sub>h</sub> measurements, the E<sub>h7</sub> value was calculated by the Leitsner & Mirna equation E<sub>h7</sub> = E<sub>h</sub> - α\*(7-pH<sub>m</sub>) (Leistner and Mirna, 1959), where pH<sub>m</sub> is measured pH value and α is the Nernst factor specific to the medium used. For JB medium, α = 39.6 mV/pH unit, as experimentally determined by measuring the E<sub>h</sub> of JB medium at each pH level in the range 3 to 8 and adjusted with HCl and KOH.

## Titration of free accessible exofacial thiol groups

Exofacial accessible thiol groups were measured using the Ellman method. DTNB is membrane-impermeable, and only the thiol groups on the bacterial cell surface can react with the reagent. Cells were centrifuged for 10 min at 3500 g at room temperature, washed once with potassium phosphate buffer at pH 8 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, pH 8) and suspended in buffer at pH 8 containing 10



$\mu\text{L}$  of 6 mM DTNB. After 30 min incubation in the dark at room temperature, the cell suspension was centrifuged for 10 min at 3500 g at room temperature. Supernatants were filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter (Millipore). Filtrate absorption at 412 nm was measured using a spectrophotometer (Helios Epsilon, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) and the concentration of accessible free thiol groups was calculated using N-acetyl-L-cysteine standard curves in the range 1–50  $\mu\text{M}$ .

### **Filtration experiments**

Filtration was performed at the end of the reduction stage. Bacterial culture was filtered in anaerobic chamber (Don Whitley Scientific) using a 0.22  $\mu\text{m}$  filter (Millipore) and the redox potential of the filtrate was measured. Filters were previously degassed by nitrogen injections.

### **Thiol-reactive reagents**

*B. cereus* was cultivated in JB medium and thiol-reactive reagents (NEM, AMdiS) were added at the end of the reduction stage. As a control, a stock solution of 1 M NEM was prepared in methanol:water (3:1) degassed, then added with the equivalent volume of a methanol:water mixture. Final NEM concentration in the media was 25 mM. A 65.2 mM AMdiS stock solution was prepared in water to a final concentration of 9 mM. For each experiment, controls were carried out using equivalent volumes of the solution used for diluting the chemical compounds (methanol and water).

### **Fluorescent thiol labeling on the bacterial cell surface**

The bacterial culture was centrifuged for 10 min at 3500 g at 4°C, the supernatant was discarded, and cell pellets were treated with Oregon Green 488 maleimide (Life technology, France) : 40  $\mu\text{M}$  for 30 min at 37°C in the dark. Cells were washed with buffer 7 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1 M, pH 7) and analyzed in bright-field mode or at a wavelength of 480 nm under an upright fluorescent microscope (Olympus BX 50 instrument, Rungis, France) with a BX-FLA reflected light fluorescence attachment). Pictures were taken with a CoolSNAP EZ (Tucson, USA) camera and processed on Image J software.

## Membrane protein extraction

*B. cereus* ATCC14579 was harvested by centrifugation (3500\*g for 10 min at 4°C) from batch cultures when cells reached stationary growth phase. The cells were suspended in phosphate buffer 7.5 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 M, pH 7.5) containing 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and lysed by sonication (Transonic 780H sonicator). Membranes were pelleted by ultracentrifugation for 1 h at 300,000\*g then suspended in phosphate buffer 7 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05 M, pH 7) containing 20 mM PMSF. Protein concentration was estimated by a Bradford assay: 20 µg of protein were subjected to a short SDS-PAGE using 10% acrylamide gels. Samples were suspended in Laemmli buffer (Laemmli, 1970) prior to in-gel loading but remained unboiled. After short SDS-PAGE over around 1 cm in separating gel, a vertical strip was cut in the migration lane and stored at -20°C until mass spectrometry analysis.

## Mass spectrometry analysis

Proteins were classically reduced by dithiothreitol (5 mM), alkylated by iodoacetamide (25 mM) and hydrolysed in gel by addition of 300 ng trypsin (Promega France) in ammonium bicarbonate (25 mM) buffer at 37°C. After overnight hydrolysis, tryptic peptides were recovered by classical extraction (Shevchenko *et al.*, 2006), dried in a speed vacuum and finally suspended in 25 µL of nano-LC loading buffer (0.08% TFA, acetonitrile 2%).

Peptides analysis was performed on an Ultimate 3000 RSLC Nanosystem (Dionex, ThermoScientific) coupled to LTQ-Orbitrap Discovery mass spectrometer (Thermo Electron) with a nanoelectrospray interface. 1 µL of tryptic digest was injected directly onto Acclaim PepMap 100 C18 (0.075 mm i.d. x 250 mm, 2 µm, Dionex) and peptides were separated with a two-step gradient from 2% to 30% for 165 min and 30% to 40% for 20 min at 300 nL min<sup>-1</sup> at 40°C, for a total running time of 204 min including column regeneration and equilibration steps. Ionization was performed in positive mode (1.4KV ionization potential) with a liquid junction and a capillary probe (10 µm i.d., NewObjective). Ions were analyzed using Xcalibur 2.07 via a data-dependent method including two steps: first a full scan MS in the Orbitrap analyzer (between 350 to 1400 th in profile mode with a resolution of 30000 at m/z 400) and then a second step of fragmentation and detection of daughter ions performed in the linear trap (qz = 0.22, activation time 50 ms and collision energy set to 35%). Dynamic exclusion time was set to

60 sec. To enhance mass accuracy, the lock-mass option was activated on dimethylcyclsiloxan ( $m/z$  445.120029).

The raw files produced under Xcalibur were first converted into mzXML format with MSconvert (<http://sashimi.sourceforge.net>, version 3.0.5126), and in a second step, protein identification was performed with X!tandem software (X!tandem Cyclone 2011.12.01.1; <http://www.thegpm.org>) against a *Bacillus cereus* ATCC14579 protein database (Uniprot, 5295 proteins downloaded on December 6<sup>th</sup>, 2013) associated to a classical proteomic contaminant database. The X!Tandem search parameters were trypsin specificity with two missed cleavages and variable oxidation states of Met. Semi-tryptic peptide detection was included by activating the option in the 'refine data' mode. Mass tolerance was set to 10 ppm for precursor ions and 0.5 Da for fragment ions. The final search results were filtered using a multiple threshold filter applied at protein level and consisting in the following criteria: protein log (E-value) = -2.6 identified with a minimum of two different peptides sequences and detected with a peptide E-value lower than 0.05. Results from X!TandemPipeline 3.3.0 analysis (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>) and MS/MS data are available in Supplemental data 1.

### ***In silico* analysis**

We used the LocateP DataBase (<http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>) to inventory the membrane proteins of *B. cereus* carrying thioredoxin groups. The HMMTOP and TMHMM topology tools (<http://www.expasy.org/resources>) were used to determine the orientation of membrane protein thioredoxin groups.

## **Results**

### **Reducing capacity of *Bacillus cereus***

In order to assess the reducing capacity of *B. cereus*, cells were grown in J-Broth media (JB) at 37°C at a controlled pH of 7 under nitrogen (N<sub>2</sub>) bubbling. As shown in Figure 1, initial E<sub>h7</sub> value was +21 mV ± 6 mV. A strong drop of external E<sub>h7</sub> began after 3 h of culture. This reduction stage ended after 8 h of culture and remained stable at -155mv ± 8 mV, i.e. a redox

amplitude of  $177 \pm 10$  mV. The growth phase began simultaneously with  $E_{h7}$  reduction, with a final OD at 600 nm of  $2.4 \pm 0.12$ . This strong reducing activity was observed in regulated batch cultures nitrogen-bubbled to be oxygen-free prior to inoculation. We thus conclude that *B. cereus* has significant reducing capacities and that its reductive abilities are oxygen independent.

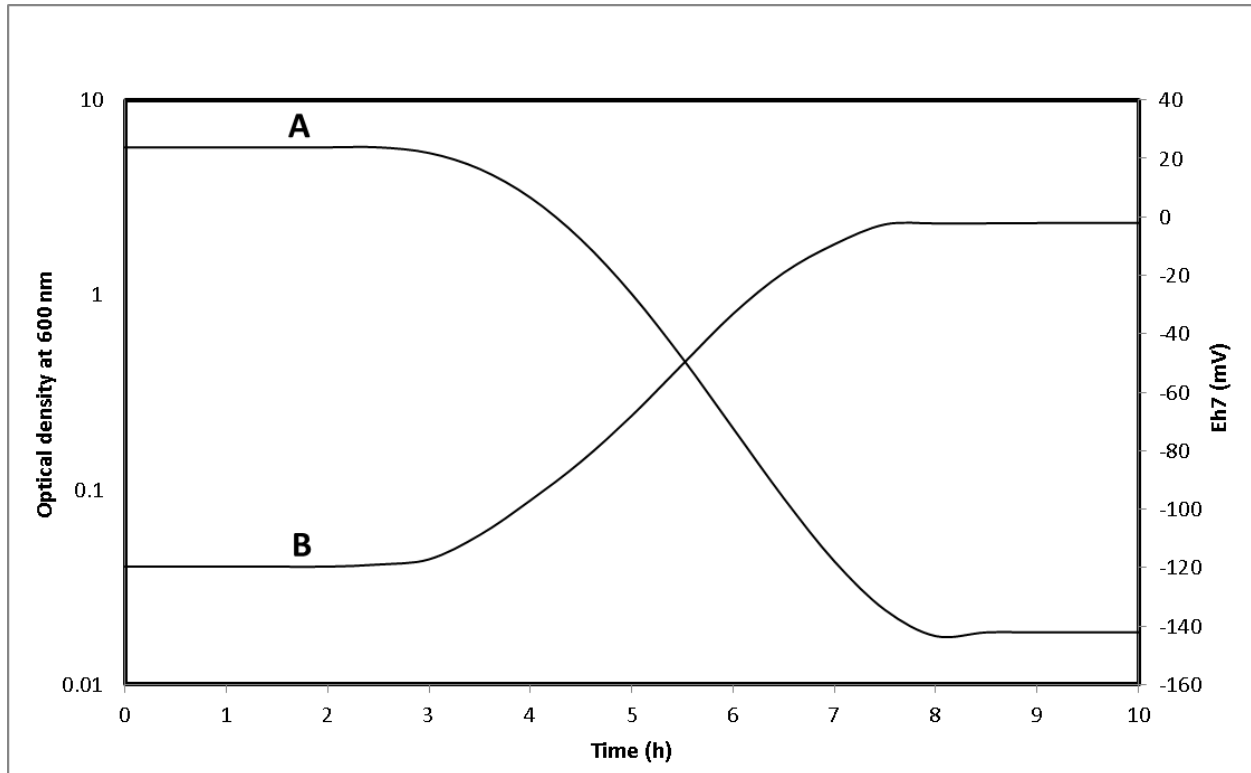


Figure 1: Time-course plot of  $E_{h7}$  (A) and growth (B) of *B. cereus* F4430/73 in controlled batch culture at pH 7, 37°C, under nitrogen bubbling. Experiments were performed in triplicate; average curves are shown.

### Implication of bacterial cells in the drop in $E_{h7}$

To test how far the whole *B. cereus* cell is involved in this reductive activity, an aliquot of culture entered into stationary phase ( $E_{h7} = -150 \pm 10$  mV) was filtered to remove bacterial cells from the culture media. To avoid introducing oxygen into the filtrate, filtration steps were led in an anaerobic chamber. Results are presented in Figure 2 A, B, C. After cell filtration, the  $E_{h7}$  of the filtrate ( $+15 \pm 12$  mV) (Figure 2 C) was similar to the initial  $E_{h7}$  ( $+25 \pm 5$  mV) of the culture media before inoculation and growth phase (Figure 2 A). Consequently, the restoral of initial  $E_{h7}$

in the filtrate was triggered by removing the bacterial cells from the culture media. These results indicate that the  $E_{h7}$  drop during *B. cereus* growth was caused by whole cells rather than by strongly reductive end-products.

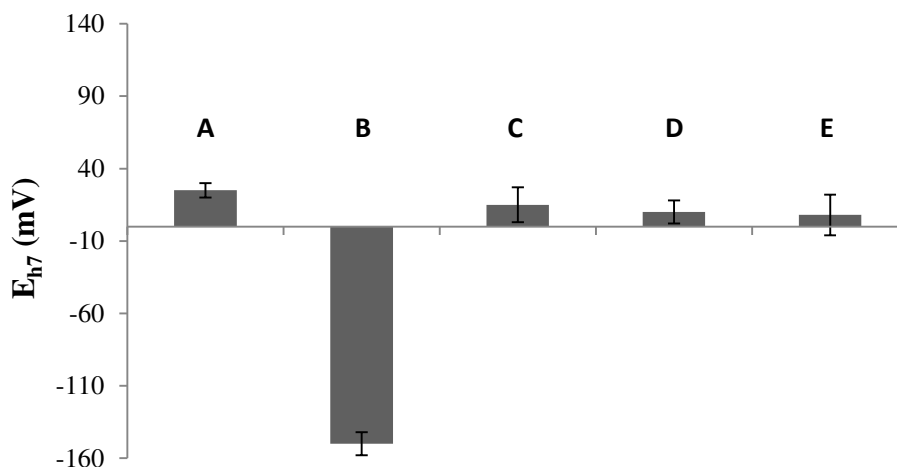


Figure 2: Impact of different biochemical treatment on the  $E_{h7}$  of *Bacillus cereus* growth medium. A: initial  $E_{h7}$  of the medium before growth start. B: final  $E_{h7}$  of the medium after cells reached stationary phase. C: growth medium  $E_{h7}$  after filtration. D: growth medium  $E_{h7}$  after NEM treatment. E: growth medium  $E_{h7}$  after AMdiS treatment

### Thiol groups and the drop in $E_{h7}$

The role of thiol groups in the drop in  $E_{h7}$  was investigated using thiol-reactive molecules: N-ethylmaleimide (NEM) and 4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2, 2'-disulfonic acid (AMdiS). These molecules contain maleimide and can bind thiol groups in an irreversible reaction. NEM can diffuse in the cytoplasm and consequently neutralize thiol groups on both sides of the membrane and in cytoplasm. AMdiS can only bind to accessible thiol exposed on the external bacterial surface. Results are presented in Figure 2 A, D, E. Once cells entered the stationary phase ( $E_{h7} = -150 \pm 10$  mV), NEM (Figure 2 D ( $E_{h7} = 10 \pm 8$  mV)) or AMdiS (Figure 2 E ( $E_{h7} =$

$8 \pm 14$  mV)) were added in the culture media. The addition of each of these products increased  $E_{h7}$  to a value near the initial  $E_{h7}$  of the culture media. These results demonstrate that thiol groups and more specifically exofacial thiol groups are involved in the *B. cereus* cell-mediated drop in  $E_{h7}$ .

### **Localization of exofacial thiol on the bacterial surface**

Exofacial thiols were visually localized by labeling them with the membrane-impermeable fluorescent thiol-reactive reagent Oregon Green maleimide 488. Labeled bacteria were observed using fluorescent microscopy. The results presented in Figure 3 B demonstrate that exofacial thiols were present on the entire surface of the cell.

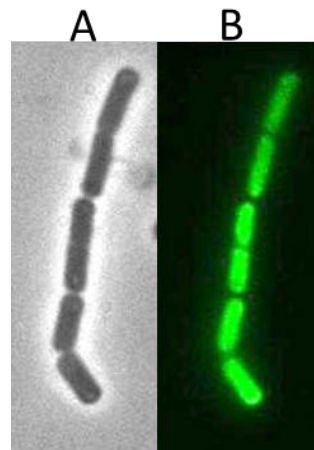


Figure 3: Labeling of exofacial thiol groups on the *B. cereus* cell surface with Oregon Green<sup>®</sup> 488 maleimide. Images were realized in bright-field (A) or laser excitation at 480 nm (B).

### **Evolution of exofacial thiol group concentrations during growth of *Bacillus cereus***

Concentration of accessible exofacial thiol groups was calculated during *B. cereus* growth (Figure 4) using the Ellman method (see Material and Methods). Concentration of exofacial thiol groups was below 1  $\mu$ M before growth and reduction, then increased when reduction and growth phases began and reached a peak of 21  $\mu$ M when cells entered the stationary phase. and reducing activity. Drop in  $E_{h7}$  was linked to an increase in exofacial thiol groups, and  $E_{h7}$  remained stable

when maximal amount of thiol groups (20  $\mu\text{M}$ ) was reached. Analysis of thiol group concentration versus cell concentration indicated that exofacial thiol group-specific concentration stabilized 1.5 h after start of growth at a value of 9  $\mu\text{M}$  per OD unit and remained constant until the end of the experiment, thus confirming the link between maximal amount of thiol and stability of  $E_{h7}$  when cells reached the stationary phase. Moreover, Figure 5 shown that thiol groups concentration was proportional to cells concentration.

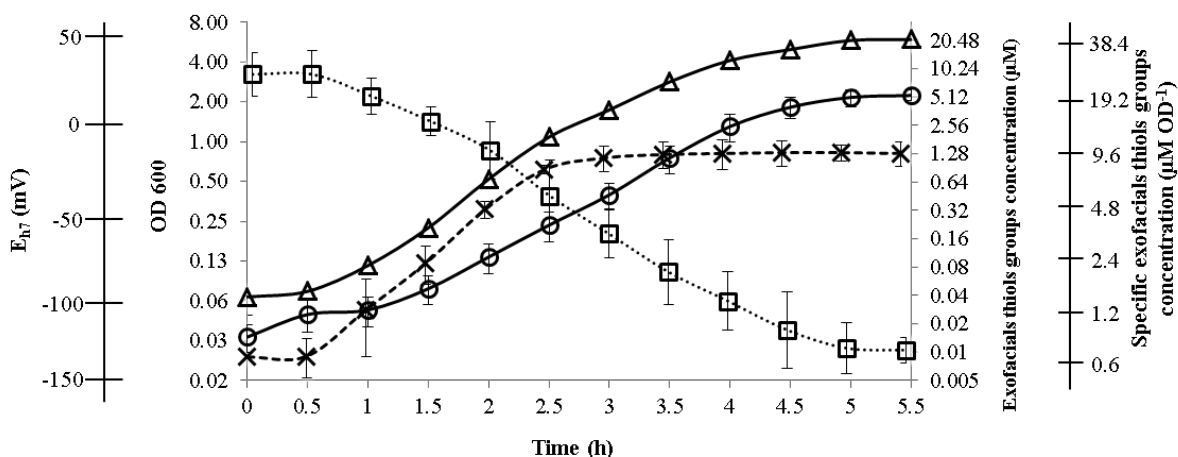


Figure 4: Time-course plot of exofacial thiol group concentration and  $E_{h7}$  evolution during *B. cereus* growth. Concentration of exofacial thiol groups ( $\Delta$  external  $E_{h7}$  ( $\square$ ), growth ( $\circ$ ) and specific concentration of exofacial thiol groups ( $\times$ ). All cultures were carried out at controlled pH 7 and 37°C in anaerobiosis under  $\text{N}_2$  bubbling.

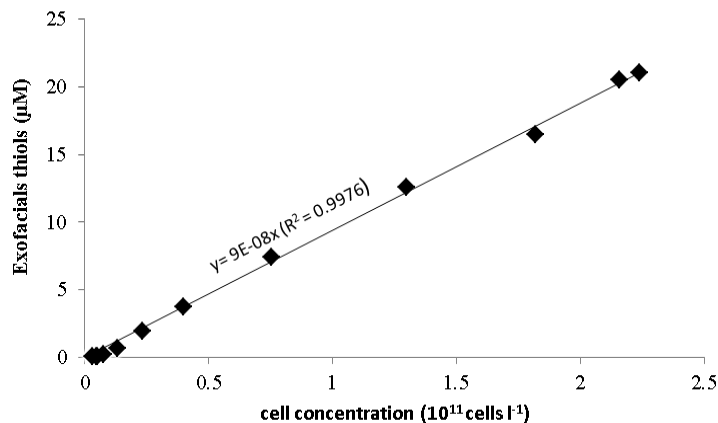


Figure 5: Evolution according to A: the amount of exofacial thiol groups per cell concentration and B: the level of  $E_{h7}$  per thiol groups concentration during growth of *B. cereus*

## Determination of *Bacillus cereus* exofacial protein thiols by *in silico* analysis

To highlight the kind of exofacial protein thiols involved in the reductive activity of *B. cereus*, we used LocateP (<http://www.cmbi.ru.nl/locatep-db/cgi-bin/locatepdb.py>). As thioredoxin domains are well known to play roles in redox reactions, analysis focused on proteins carrying thioredoxin domains composed of a suite of four amino acids, C-X-X-C, where X is a random amino acid. *In silico* analysis found 62 ORF-encoding putative membrane proteins with C-X-X-C domain(s). Furthermore, thiol group orientation on the membrane surface was estimated using the topology tools HMMTOP and TMHMM. Twenty ORF-encoding putative membrane proteins with predicted exofacial thioredoxin groups were found (Table 1), 5 of which code for proteins belonging to the TDORs family (TDORs): thiol disulfide oxydo-réductase BdbC, BdbD and ResA, thiol disulfide interchange tlpA and another thioredoxin. (Underlined in Table 1). Interestingly, these TDORs are known to play roles in reductive or oxidative metabolic pathways, as shown in *B. subtilis* for the BdbC / BdbD system, the ResA protein or the thiol disulfide interchange protein TlpA.

Gene	Predicted function	C-X-X-C motif(s)
BC0069	Stage II sporulation protein E	CQTC
<u>BC0542</u>	Thiol-disulfide oxidoreductase (BdbD)	CPAC
BC0564	Lipoproteine	CDIC
<u>BC0778</u>	Thioredoxine	CVHC
<u>BC0779</u>	Disulfide oxidoreductase (BdbC)	CVLC
BC0781	Hypothetical protein	CVNC
BC1266	Hypothetical protein	CIHC
<u>BC1473</u>	Thiol-disulfide oxidoreductase (ResA)	CKPC
BC1486	CAAX amino protease	CFVC
BC1524	Menaquinol-cytochrome c reductase cytochrome c subunit	CLTC
BC1805	Hypothetical protein	CIEC
BC1913	Phage protein	CGSC / CPNC
BC2025	Hypothetical protein	CASC
BC2215	Mechanosensitive ion channel	CVIC
BC2325	Macrolide efflux protein	CSLC
<u>BC3612</u>	Thiol:disulfide interchange protein tlpA	CGPC
BC3944	Cytochrome c oxidase polypeptide II	CIGC
BC4616	Hypothetical protein	CVSC
BC5242	Membrane protein with C2C2 zinc finger	CRTC / CRGC / CQKC
BC5345	Iron-sulphur-binding reductase	CVEC / CGRC / CTTC / CRNC / CPYC

Table 1: *In silico* analysis of *B. cereus* genes predicted to code for putative membrane proteins carrying exofacial thioredoxin(s) groups.



## ***B. cereus* membrane proteins carrying thiol groups identified by mass spectrometry**

To complete the *in silico* results, we used mass spectrometry to identify the proteins with C-X-X-C groups present on the outside membrane of *B. cereus* (Table 2 and Table S1). Mass spectrometry found 4 of the exofacial thiol proteins observed by *in silico* analysis, two of which—a hypothetical protein (BC\_5241) and a zinc transporting ATPase (BC\_0596)—were predicted with their thioredoxin group oriented inside the bacterial cell. A homology search revealed that the protein coded by BC5241 is homologous to *Bacillus thuringiensis* TcaA protein, which is a component of the TcA toxin complex. The two other proteins observed are the TDORs BdbC and ResA, which are known to be involved in redox pathways.

Gene	Name	Log (Evalue)	Coverage	MW	Spectra	Specifics	Uniques	PAI
BC0542	Thiol-disulfide oxidoreductase (BdbD)	-10.81	10	24.5	2	-	2	0.22
BC1473	Thiol-disulfide oxidoreductase (ResA)	-7.00	10	19.5	2	-	2	0.22
BC0596	Zinc-transporting ATPase	-12.95	3	85.2	3	-	2	0.085
BC5241	Hypothetical protein	-3.96	6	52.1	6	-	2	0.064

Table 2: Membrane thiol proteins detected by mass spectrometry in *B. cereus* membrane extract.

## **Discussion**

*Bacillus cereus* possesses the capacity to reduce the medium from an initial  $E_{h7}$  of +25 mV up to a final  $E_{h7}$  of -150 mV that remains stable during stationary growth. This external reducing stability suggests that reversible redox systems might be involved in this strong reducing capacity of this *B. cereus*. Although the mechanisms involved in *B. cereus* reducing capacity have not yet been fully elucidated, we showed here that exofacial thiol groups play a role in both the reducing activity and reducing stability of *B. cereus*.

Reducing stability observed during the stationary growth phase was cancelled by adding thiol-reactive reagents: NEM, which neutralizes thiol groups on both sides of the membrane and in cytoplasm, and AMdiS which can only bind to accessible thiol exposed on the external bacterial surface. This therefore demonstrates the role of thiol groups in external redox modification. In addition, the use of AMdiS, which can only bind to external thiol, clearly demonstrates that

exofacial thiol groups carried by membrane proteins or cell wall-bound proteins are involved in the reducing capacities of *B. cereus*. An exofacial thiol-disulfide couple could thus play a major role in decreasing external  $E_{h7}$  and maintaining the external reducing  $E_{h7}$  level. Moreover, an assay of exofacial thiol using DTNB revealed a correlation between exofacial thiol concentration,  $E_{h7}$  drop and stability, and bacterial cell concentration (Figure 4, 5). Consequently, we can posit that  $E_{h7}$  stabilizes when the ratio of exofacial thiol group concentration to cell density becomes high enough to establish a reducing microenvironment around the bacterial cell (Figure 6). Similar conclusions were made on *Lactococcus lactis* (Michelon *et al.*, 2010).

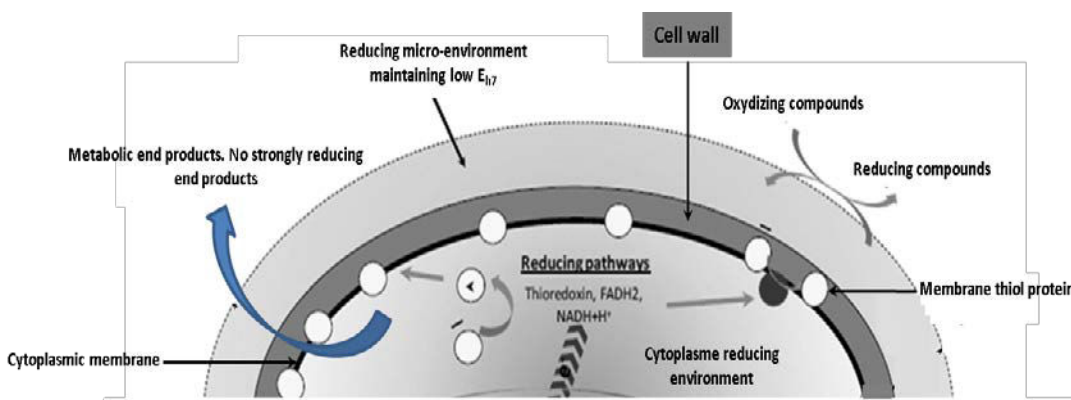


Figure 6: Schematic overview of a bacterial cell and the reducing micro-environment. Figure reproduced with the kind authorization of R. Cachon.

In order to gain more insight into the exofacial thiols present at the surface of *B. cereus*, we focused on membrane proteins carrying thioredoxin (C-X-X-C) groups as they are known to participate in redox reactions and internal reductive redox maintenance in various bacteria such as *B. subtilis*, *Streptococcus gordonii*, *Escherichia coli* or *Lactococcus lactis* (Kouwen and van Dijn, 2009, Davey *et al.*, 2013, Cho and Collet, 2013, Vido *et al.*, 2005). Here, we ran *in silico* analysis to search for *B. cereus* genes coding for membrane proteins carrying thioredoxin sequences. Our results highlight that 20 of the predicted exofacial thiol proteins with putative oxidative or reductive roles were present on the membrane of *B. cereus*. Interestingly, five of them belong to the TDOR family. We know little about the function of TDORs in Gram-positive

bacteria, even less in facultative anaerobic Gram-positives, and absolutely nothing on the function of membrane TDORs in *B. cereus*.

TDORs located on the outside of the cytoplasmic bacterial membrane are found to be involved in oxidation reactions (Bardwell *et al.*, 1993), disulfide bond isomerization reactions (Sone *et al.*, 1997a) and reduction reactions (Loferer *et al.*, 1995). TDORs fall into one of three types determined by their redox potentials (Erlendsson *et al.*, 2003): high-potential (-100 mV and above) (Daltrop *et al.*, 2002); mid-potential (-100 to -200 mV) (Lundstrom and Holmgren, 1993) and low-potential (-200 and below) (Krause *et al.*, 1991). Each type is characteristic of a different cellular function. Low-potential TDORs such as cytoplasmic thioredoxins are involved in maintaining protein cysteine residues in their reduced form. Mid-potential TDORs such as protein disulfide isomerase (PDI) are involved in thiol-disulfide interchanges (Eichenberger, 2010). High-potential TDORs are functionally involved in the oxidation of protein thiols to form disulfide bonds, for example in Gram-negative periplasmic proteins (Erlendsson *et al.*, 2003).

In order to confirm the presence of membrane proteins carrying exofacial thiol groups, we also mobilized a mass spectrometry approach. Results showed that two TDORs predicted by *in silico* analysis—BdbD and ResA—were effectively found in the *B. cereus* membrane.

Compared against well-described homologous proteins in *B. subtilis*, *B. cereus* BdbD possessed 41% homology to the BdbD protein of *Bacillus subtilis*. In *Bacillus subtilis*, BdbD is characterized by a thioredoxin-like sequence playing the role of active site and possessing a midpoint  $E_{h7}$  equal to -75 mV at pH7 (Crow *et al.*, 2009a). BdbD acts in tandem with BdbC to oxidize or reduce disulfide bonds in substrate proteins/peptides on the outer cytoplasmic membrane and, as such, plays a key role in disulfide bond management (Bolhuis *et al.*, 1999b, Erlendsson and Hederstedt, 2002, Darmon *et al.*, 2006). It has been shown in *B. subtilis* that the BdbD/BdbC system is required for an array of biological functions, including cell competence (Meima *et al.*, 2002), cytochrome C synthesis (Erlendsson and Hederstedt, 2002), virulence (Kouwen *et al.*, 2007) or secretion of alkaline phosphatase PhoA (Sone *et al.*, 1997b). Moreover, the Dsb system of *Escherichia coli*, equivalent of the Bdb system of Gram-positives, is involved in the reductive  $E_{h7}$  of the periplasm with glutathione (GSH) (Messens *et al.*, 2007). However, as GSH is not synthesized in *B. cereus* (Fahey *et al.*, 1978), BdbD is an interesting exofacial thiol proteins that may be involved in the reducing activity of *B. cereus* during the growth phase.

ResA, another membrane TDOR of *B. cereus*, possessed 51% homology to the ResA protein of *B. subtilis* and 27% homology to the SdbA protein of *Streptococcus gordonii*. SdbA is a TDOR involved in cellular processes such as biofilm formation, eDNA release or autolysin disulfide bond management (Davey *et al.*, 2013). In *B. subtilis*, ResA plays a reductive role in cytochrome C maturation (Colbert *et al.*, 2006) but is assumed to have numerous other unknown substrates (Erlendsson and Hederstedt, 2002). The  $E_{h7}$  of the active site of *B. subtilis* ResA was measured as -256 mV at pH 7 (Lewin *et al.*, 2008, Hodson *et al.*, 2008), which is more reductive than the  $E_{h7}$  of the active site of BdbD. An interesting possibility (in *B. cereus*) is that reductive ResA and more oxidative BdbD pathways could act in tandem via antagonistic actions on disulfide bond formation to promote the isomerization of disulfide bonds (Kouwen and van Dijl, 2009) (Figure 7). Moreover, ResA is part of the *ResABCDE* operon, where the two-component ResDE system is involved in *B. cereus* adaptations to low  $E_{h7}$  and toxin production. *ResA* transcription in *B. cereus ResDE* and *ResE* mutants was shown to be down-regulated compared to wild-type, indicating that *ResA* is under the control of a promoter regulated by the *ResDE* two-component system (Duport *et al.*, 2006, Esbelin *et al.*, 2009). Consequently, we can posit that *ResA* may play a role in low  $E_{h7}$  *ResDE*-mediated adaptations in *B. cereus* and is another promising protein putatively involved in the reductive activity of *B. cereus*.

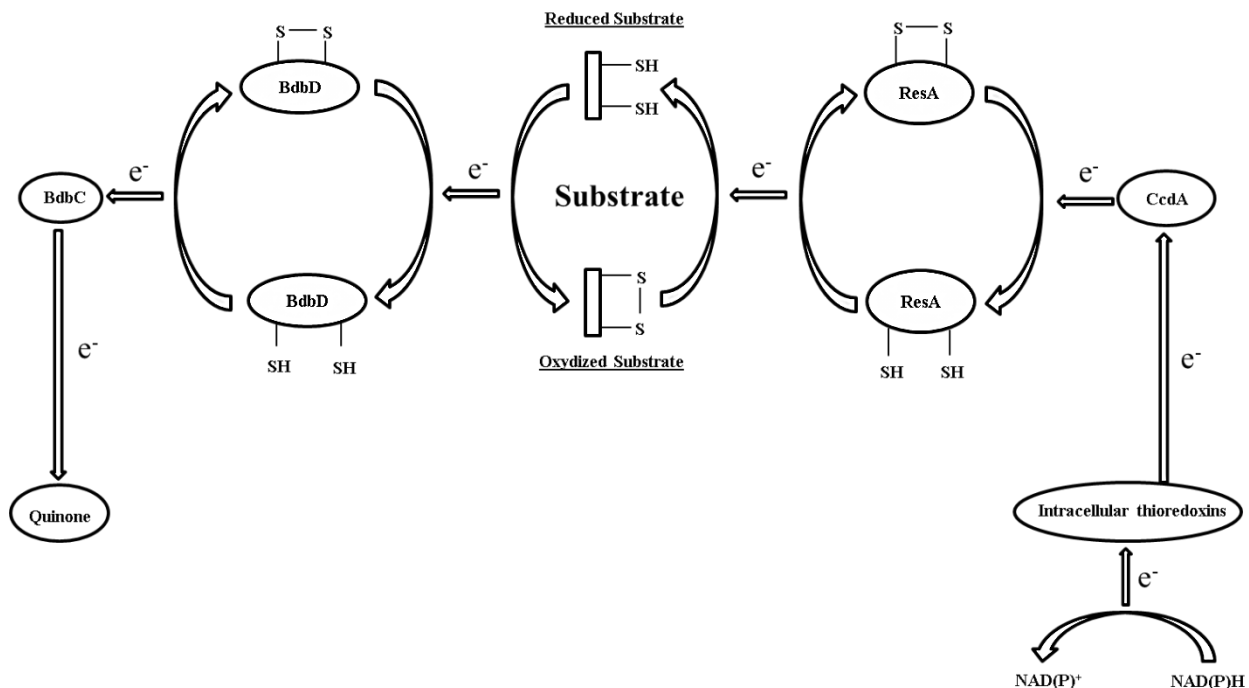


Figure 7: Schematic overview of suggested functions of *resA* and *bdbD/ bdbC* thiol-disulfide oxidoreductase systems in the cytoplasmic membrane of *B. cereus*.

To conclude, the reducing capacity of *B. cereus*, in contrast to other bacteria, is not due to the accumulation of reducing compounds in the medium or to the consumption of oxidizing compounds but mainly to the presence exofacial thiol groups. In addition, these thiol groups are found to be involved in redox maintenance during the stationary growth phase. We identified 20 putative proteins carrying exofacial thioredoxin groups. Some of these proteins could be involved in the reducing ability of *B. cereus* such as ResA, BdbD, BdbC or CcdA.

### Acknowledgments

This work was supported by a grant from the French National Research Agency (ANR) under the ALID program Food-Redox project (ANR-11-ALID-0001). The authors also thank Sara Diomandé for critically proofreading the manuscript.

### References

1. McKillip, J. L. (2000) Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie Van Leeuwenhoek* **77**, 393-399
2. Agbobatinkpo, P. B., Thorsen, L., Nielsen, D. S., Azokpota, P., Akissoe, N., Hounhouigan, J. D., and Jakobsen, M. (2013) Biodiversity of aerobic endospore-forming bacterial species occurring in Yanyanku and Ikipiru, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa* used to produce food condiments in Benin. *Int. J. Food Microbiol.* **163**, 231-238
3. Manguiat, L. S., and Fang, T. J. (2013) Microbiological quality of chicken- and pork-based street-vended foods from Taichung, Taiwan, and Laguna, Philippines. *Food Microbiol.* **36**, 57-62
4. Rahimi, E., Abdos, F., Momtaz, H., Baghbadorani, Z. T., and Jalali, M. (2013) *Bacillus cereus* in infant foods: prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran. *ScientificWorldJournal*. 10.1155/2013/292571.
5. Rajkovic, A., Kljajic, M., Smigic, N., Devlieghere, F., and Uyttendaele, M. (2013) Toxin producing *Bacillus cereus* persist in ready-to-reheat spaghetti Bolognese mainly in vegetative state. *Int. J. Food Microbiol.* **167**, 236-243

6. Diomandé, S. E., Chamot, S., Antolinos, V., Vasai, F., Guinebretière, M.-H., Bornard, I., Nguyen-the, C., Broussolle, V., and Brillard, J. (2014) The CasKR Two-Component System Is Required for the Growth of Mesophilic and Psychrotolerant *Bacillus cereus* Strains at Low Temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2493-2503
7. Jobin, M.-P., Clavel, T., Carlin, F., and Schmitt, P. (2002) Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growth phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415. *Int. J. Food Microbiol.* **79**, 65-73
8. Duport, C., Zigha, A., Rosenfeld, E., and Schmitt, P. (2006) Control of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus* F4430/73 Involves the Redox-Sensitive ResDE Signal Transduction System. *J. Bacteriol.* **188**, 6640-6651
9. Zigha, A., Rosenfeld, E., Schmitt, P., and Duport, C. (2006) Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Arch. Microbiol.* **185**, 222-233
10. Kirakosyan, G., Bagramyan, K., and Trchounian, A. (2004) Redox sensing by *Escherichia coli*: effects of dithiothreitol, a redox reagent reducing disulphides, on bacterial growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 803-806
11. Jacob, H. E. (1970) *Methods in Microbiology, chapter IV Redox Potential*, Academic Press, New York, NY.
12. Pearson, C. B. a. W., H.W. . (1976) Effect of oxidation reduction potential upon growth and sporulation of *Clostridium*. *J. Food Prot.* **39**, 421-425
13. Ignatova, M., Prévost, H., Leguerinel, I., and Guillou, S. (2010) Growth and reducing capacity of *Listeria monocytogenes* under different initial redox potential. *J. Appl. Microbiol.* **108**, 256-265
14. Chapelle, F. H., McMahon, P. B., Dubrovsky, N. M., Fujii, R. F., Oaksford, E. T., and Vroblesky, D. A. (1995) Deducing the distribution of terminal electron-accepting processes in hydrologically diverse groundwater systems. *Water. Resour. Res.* **31**, 359-371
15. Michelon, D., Abraham, S., Ebel, B., De Coninck, J., Husson, F., Feron, G., Gervais, P., and Cachon, R. (2010) Contribution of exofacial thiol groups in the reducing activity of *Lactococcus lactis*. *FEBS J.* **277**, 2282-2290
16. Kouwen, T. R. H. M., Van Der Goot, A., Dorenbos, R., Winter, T., Antelmann, H., Plaisier, M.-C., Quax, W. J., Van Dijl, J. M., and Dubois, J.-Y. F. (2007) Thiol-disulphide oxidoreductase modules in the low-GC Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **64**, 984-999
17. Spira, W. M., and Goepfert, J. M. (1975) Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Can. J. Microbiol.* **21**, 1236-1246
18. Guinebretière, M.-H., Thompson, F. L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., and De Vos, P. (2008) Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ. Microbiol.* **10**, 851-865

19. Ivanova, N., Sorokin, A., Anderson, I., Galleron, N., Candelon, B., Kapatral, V., Bhattacharyya, A., Reznik, G., Mikhailova, N., Lapidus, A., Chu, L., Mazur, M., Goltsman, E., Larsen, N., D'Souza, M., Walunas, T., Grechkin, Y., Pusch, G., Haselkorn, R., Fonstein, M., Dusko Ehrlich, S., Overbeek, R., and Kyrpides, N. (2003) Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**, 87-91
20. Abraham, S., Cachon, R., Jeanson, S., Ebel, B., Michelon, D., Aubert, C., Rojas, C., Feron, G., Beuvier, E., Gervais, P., and De Coninck, J. (2013) A procedure for reproducible measurement of redox potential ( $E_h$ ) in dairy processes. *Dairy. Sci. Technol.* **93**, 675 - 690
21. Leistner, L., and Mirna, A. (1959) Das redoxpotential von Pökellaken. *Die Fleischwirtschaft* **8**, 659–666
22. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
23. Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., and Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856-2860
24. Kouwen, T. R., and van Dijk, J. M. (2009) Applications of thiol-disulfide oxidoreductases for optimized in vivo production of functionally active proteins in *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**, 45-52
25. Davey, L., Ng, C. K., Halperin, S. A., and Lee, S. F. (2013) Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Streptococcus gordonii*. *J. Biol. Chem.* **288**, 16416-16429
26. Cho, S. H., and Collet, J. F. (2013) Many roles of the bacterial envelope reducing pathways. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 1690-1698
27. Vido, K., Diemer, H., Van Dorsselaer, A., Leize, E., Juillard, V., Gruss, A., and Gaudu, P. (2005) Roles of thioredoxin reductase during the aerobic life of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **187**, 601-610
28. Bardwell, J. C., Lee, J. O., Jander, G., Martin, N., Belin, D., and Beckwith, J. (1993) A pathway for disulfide bond formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 1038-1042
29. Sone, M., Akiyama, Y., and Ito, K. (1997) Differential in vivo roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **272**, 10349-10352
30. Loferer, H., Wunderlich, M., Hennecke, H., and Glockshuber, R. (1995) A bacterial thioredoxin-like protein that is exposed to the periplasm has redox properties comparable with those of cytoplasmic thioredoxins. *J. Biol. Chem.* **270**, 26178-26183
31. Erlendsson, L. S., Acheson, R. M., Hederstedt, L., and Le Brun, N. E. (2003) *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome c synthesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 17852-17858
32. Daltrop, O., Allen, J. W., Willis, A. C., and Ferguson, S. J. (2002) In vitro formation of a c-type cytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 7872-7876

33. Lundstrom, J., and Holmgren, A. (1993) Determination of the reduction-oxidation potential of the thioredoxin-like domains of protein disulfide-isomerase from the equilibrium with glutathione and thioredoxin. *Biochemistry* **32**, 6649-6655
34. Krause, G., Lundstrom, J., Barea, J. L., Pueyo de la Cuesta, C., and Holmgren, A. (1991) Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **266**, 9494-9500
35. Eichenberger, P. (2010) The red-ox status of a penicillin-binding protein is an on/off switch for spore peptidoglycan synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **75**, 10-12
36. Crow, A., Lewin, A., Hecht, O., Carlsson Moller, M., Moore, G. R., Hederstedt, L., and Le Brun, N. E. (2009) Crystal structure and biophysical properties of *Bacillus subtilis* BdbD. An oxidizing thiol:disulfide oxidoreductase containing a novel metal site. *J. Biol. Chem.* **284**, 23719-23733
37. Bolhuis, A., Venema, G., Quax, W. J., Bron, S., and van Dijl, J. M. (1999) Functional Analysis of Paralogous Thiol-disulfide Oxidoreductases in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **274**, 24531-24538
38. Erlendsson, L. S., and Hederstedt, L. (2002) Mutations in the thiol-disulfide oxidoreductases BdbC and BdbD can suppress cytochrome c deficiency of CcdA-defective *Bacillus subtilis* cells. *J. Bacteriol.* **184**, 1423-1429
39. Darmon, E., Dorenbos, R., Meens, J., Freudl, R., Antelmann, H., Hecker, M., Kuipers, O. P., Bron, S., Quax, W. J., Dubois, J. Y., and van Dijl, J. M. (2006) A disulfide bond-containing alkaline phosphatase triggers a BdbC-dependent secretion stress response in *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6876-6885
40. Meima, R., Eschevins, C., Fillinger, S., Bolhuis, A., Hamoen, L. W., Dorenbos, R., Quax, W. J., van Dijl, J. M., Provvedi, R., Chen, I., Dubnau, D., and Bron, S. (2002) The *bdbDC* operon of *Bacillus subtilis* encodes thiol-disulfide oxidoreductases required for competence development. *J. Biol. Chem.* **277**, 6994-7001
41. Sone, M., Kishigami, S., Yoshihisa, T., and Ito, K. (1997) Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **272**, 6174-6178
42. Messens, J., Collet, J.-F., Van Belle, K., Brosens, E., Loris, R., and Wyns, L. (2007) The Oxidase DsbA Folds a Protein with a Nonconsecutive Disulfide. *J. Biol. Chem.* **282**, 31302-31307
43. Fahey, R. C., Brown, W. C., Adams, W. B., and Worsham, M. B. (1978) Occurrence of glutathione in bacteria. *J. Bacteriol.* **133**, 1126-1129
44. Colbert, C. L., Wu, Q., Erbel, P. J., Gardner, K. H., and Deisenhofer, J. (2006) Mechanism of substrate specificity in *Bacillus subtilis* ResA, a thioredoxin-like protein involved in cytochrome c maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 4410-4415
45. Lewin, A., Crow, A., Hodson, C. T. C., Hederstedt, L., and Le brun, N. E. (2008) Effects of substitutions in the CXXC active-site motif of the extracytoplasmic thioredoxin ResA. *Biochem. J.* **414**, 81-91



46. Hodson, C. T. C., Lewin, A., Hederstedt, L., and Le Brun, N. E. (2008) The Active-Site Cysteinylns and Hydrophobic Cavity Residues of ResA Are Important for Cytochrome c Maturation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **190**, 4697-4705
47. Esbelin, J., Armengaud, J., Zigha, A., and Duport, C. (2009) ResDE-Dependent Regulation of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus*: Evidence for Multiple Modes of Binding for ResD and Interaction with Fnr. *J. Bacteriol.* **191**, 4419-4426

### 3 Conclusion principales et discussion de l'étude

Au cours de ces travaux, le rôle des groupements thiols exofaciaux dans l'activité réductrice de *B. cereus* a été investigué. Les résultats montrent que l'activité réductrice est liée non pas à la sécrétion de composés réducteurs mais à la présence de groupements thiols exofaciaux. En effet, les expériences de filtration et d'ajout de bloquant des thiols, montrent que les thiols et en particulier les thiols exofaciaux soient impliqués dans l'activité réductrice de *B. cereus* comme cela avait déjà été démontré pour la bactérie *L. lactis*.

Ces résultats sont confortés par les expériences de dosage de thiols exofaciaux à la surface des cellules de *B. cereus* qui montrent une corrélation forte entre croissance bactérienne, activité réductrice et concentration en thiol exofaciaux. De plus, la coloration de cellules végétatives de *B. cereus* avec par le colorant Oregon Green démontre que les cellules végétatives de *B. cereus* sont entièrement recouverte de thiols exofaciaux.

Afin d'identifier certaines des protéines portant des thiols exofaciaux, nous avons réalisé une analyse *in-silico* en recherchant les protéines membranaires de *B. cereus* portant des domaines thiorédoxine orientés vers l'extérieur de la cellule. Ces domaines sont portés par des protéines couramment impliquées dans les voies d'oxydation ou de réduction cellulaires. Les protéines portant ces domaines pourraient donc être des candidats intéressants potentiellement impliqués dans l'activité réductrice de *B. cereus*. L'analyse *in-silico* a révélées que 20 gènes codant pour des protéines membranaires putatives portant des groupements thiorédoxines orientés vers l'extérieur de la cellule étaient présents dans le génome cellulaire.

Afin de vérifier si les protéines codées par ces gènes étaient réellement présente dans le génome de *B. cereus* nous avons effectué une analyse par spectrométrie de masse sur des extraits de membrane de *B. cereus*. Les résultats ont montrés que 2 protéines portant des groupements thiorédoxines exofaciaux étaient présentes dans les membranes de *B. cereus* ATCC14579. Il s'agit des protéines ResA et BdbD qui sont impliquées dans des voies réductrices et oxydantes à la surface des cellules par création ou cassure de ponts disulfure dans les protéines membranaires. Ces deux protéines et les systèmes qui leur sont associées dans la littérature (BdbC, CcdA...), pourraient être impliqués dans l'activité réductrice de *B. cereus* et sont d'autant plus intéressants qu'ils sont impliqués dans de nombreux autres phénotypes chez *B. subtilis* tout en ayant jamais été étudiés chez *B. cereus*.



**CHAPITRE 3 : SEPARATION DES  
SPORES GERMEES ET NON GERMEES DE  
*B. CEREUS* PAR CYTOMETRIE EN FLUX**



## 1 Introduction à l'article

Les expériences menées sur les thiols exofaciaux de *B. cereus* ont montré que les cellules végétatives de la souche *B. cereus* F4430/73 étaient recouvertes de thiols exofaciaux. *B. cereus* est une bactérie possédant un cycle de vie complexe basé sur une alternance de forme végétatives et de forme sporulée. Nous nous sommes donc demandé si des thiols exofaciaux étaient retrouvés à la surface des spores de *B. cereus* de la même manière que pour les cellules végétatives. Etant donné que les spores de *B. cereus* peuvent être en dormance ou germées, en fonction des conditions environnementales, nous avons également entrepris de colorer à l'Oregon Green des spores de *B. cereus* dans chacun de ces deux états physiologiques. Les résultats de ces expériences sont présentés dans l'article 3. Cet article sera probablement publié dans une revue technique.

2 A non destructive method to separate germinated and non germinated spores of *Bacillus cereus* using flow cytometry.

Julien Le Lay, <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, 84000 Avignon, France.

<sup>b</sup>INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, 84000 Avignon, France.

## 1. Introduction :

*Bacillus cereus* is an endemic spore-forming Gram-positive facultative anaerobe, widely recognized as one of the major foodborne bacterial pathogens (McKillip, 2000), and is often incriminated in the contamination of ready-to-eat foods, dairy products and vegetables (Choma *et al.*, 2000, Afchain *et al.*, 2008, Kouamé *et al.*, 2013). *B. cereus* causes two types of food poisoning, an emetic-type and/or a diarrheal-type illness (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008), resulting from toxin, produced in food or in the digestive tract (Takeno *et al.*, 2012, Kim *et al.*, 2011).

Under environmental stress conditions, such as nutritional deprivation, *B. cereus* cells are able to produce spores (Abbas *et al.*, Abee *et al.*, 2011, Jensen *et al.*, 2003) in a large number of environment such as soil, animals gut or foods (vegetables, dairy products...). Spores can resist to some chemical and physical stresses (air drying, high temperature, high pressure, UV light and acidity)(Clavel *et al.*, 2004, Setlow, 2006, Tam *et al.*, 2006, Nguyen Thi Minh *et al.*, 2008) due to the presence of calcium dipicolinate and dehydration state of spore core (de Vries *et al.*, 2005). Consequently, spores can survive along the food processing chain and can persist in food (Andersson *et al.*, 1995). When suitable conditions occur, spores are able to germinate and return to a vegetative life style, causing infection. Germination occurs quickly, depending on bacterial strains and conditions of spore production. Some compound can promote germination of spores such as amino acids, sugars or other compound found in complex media (van der Voort *et al.*, 2010, McKenney *et al.*, 2013).

It remains difficult to separate germinated and non germinated spores from a total spore population. To reviewer knowledge, only two physico-chemical methods exist, one using Nicodenz<sup>®</sup> density gradient, based on spore core wet density, and one using DNA staining Hoechst 33342 Fluorescent Stain or Syto9 Fluorescent Stain (Kuwana and Takamatsu, 2013, Barra-Carrasco *et al.*, 2013). However the first method modifies spores hydrophobicity and



consequently could not be used to test properties of germinated or non germinated spores. In this article, we propose a new method to separate germinated or non germinated spores of *B. cereus* using the thiol binding compound Oregon Green 488 maleimide. This method is very accurate and do not change the spore hydrophobicity. In addition, this method could also be used to study specific thiol proteins of spores as Oregon Green bind covalently to exposed thiols groups.

## **2. Material and Methods:**

### **2.1 Bacterial strain:**

Three *B. cereus* strains were used in this study. The F4430/73 strain (Spira and Goepfert, 1975) and D15 strains were isolated from disease outbreak and the strain KBAB4 (Vilas-Boas *et al.*, 2002) was isolated from soil. The strains F4430/73 and the strain KBAB4 belongs to the phylogenic group III whereas the strain D15 belong to the phylogenic group II (psychrophilic group). Stock cultures were maintained at -80°C in 30% (w/v) glycerol.

### **2.2 Spore production:**

Spores were produced using two step spore production process as previously described (Baril *et al.*, 2011). Briefly, an aliquot of each *B. cereus* stock culture was pre-cultivated in LB medium (Tryptone 10g l<sup>-1</sup>, Yeast extract 5g l<sup>-1</sup>, NaCl 5g l<sup>-1</sup>) at 37°C at 200 rpm. The first step of spore production begins with inoculation of 100 ml sterile LB medium with 0.1ml of preculture solution. Optical density was followed all along bacterial growth and bacteria were collected when cells reach the stationary phase. Collected vegetative cells were centrifuged and washed in 1 ml of phosphate buffer pH 7 and transferred to 100 ml sporulation mineral buffer (SMB) and incubated at 37°C at 200 rpm until sporulation occurs. SMB is composed of 39.0 mM phosphate buffer at pH 7.2 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3H<sub>2</sub>O: 4.5 g/L; anhydrous KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1.8 g/L), supplemented with CaCl<sub>2</sub>, 2H<sub>2</sub>O (8.0 mg/L) and MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O (1.5 mg/L). SMB was sterilized by filtration on a 0.22 µm filter (Millipore). The spores were then harvested by centrifugation of the 100 mL SMB (6000 × g, 10 min, 12 °C). Pellets were resuspended in 5 mL water and stored at 4 °C until experimental use.

### **2.3 Cells and spores coloration:**

Aliquot of vegetative cells or spores of *B. cereus* were washed in phosphate buffer 7 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, pH 7) and treated with Oregon Green 488 maleimide (Life technology. France) 40 μM for 30 min at 37°C in the dark. Colored cells or spores were washed with buffer 7 (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 M, pH 7) and analyzed in bright-field mode or at a wavelength of 480 nm under an upright fluorescent microscope (Olympus BX 50 instrument, Rungis, France) with a BX-FLA reflected light fluorescence attachment). Pictures were taken with a CoolSNAP EZ (Tucson, USA) camera and processed on Image J software.

### **2.4 Separation of germinated and non germinated spores by flow cytometry:**

Spores of *B. cereus* were separated in two aliquots. One aliquot where germinant (Inosine 1 mM) was added for 10 seconds then washed in phosphate buffer 7, and one aliquot which remain non germinated. Spores of each aliquots were colored using staining process previously described (section 2.3) during 10 minutes. Aliquots were combined and mixed just before analysis by a flow cytometer (Partec cyflow space (Görlitz, Germany) with a laser source of 488 nm and a green filter of 451 nm. Data were treated using Flomax software version 2.82 (Quantum analysis GmbH). Parameters were: injection volume : 1 ml, Injection speed : 0.700 μl s<sup>-1</sup>.

### 3. Results:

#### 3.1 *B. cereus* cells and spore staining:

In order to test if Oregon Green staining could be an efficient way to visually discriminate between germinated and non germinated spores, vegetative cells and spores were stained with Oregon Green maleimide 488. Results are presented in figure 1 and figure 2.

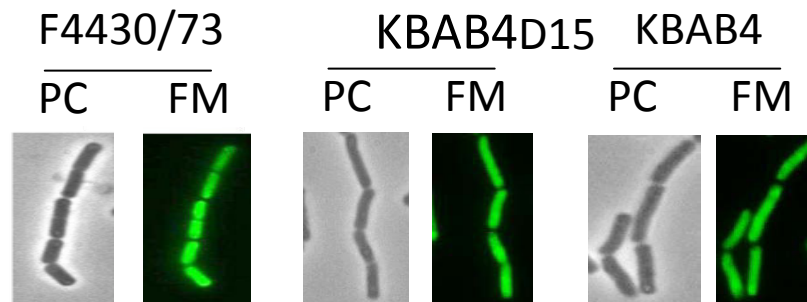


Figure 1: Staining of vegetative cells of strains F4430/73, D15 and KBAB4 with Oregon Green maleimide 488. Vegetative cells are successively observed with phase contrast microscopy (PC) and fluorescence microscopy (FM).

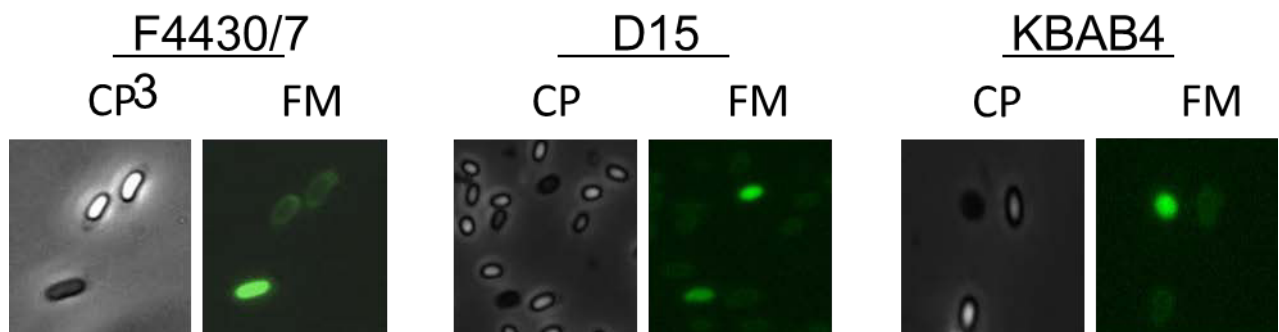


Figure 2: Staining of spores of strains F4430/73, D15 and KBAB4 with Oregon Green maleimide 488. Spores are successively observed with phase contrast microscopy (PC) and fluorescence microscopy (FM).

Each vegetative cells are entirely stained by Oregon Green maleimide 488.. As Oregon Green is a specific probe of thiols groups and cannot pass through the cytoplasmic membrane, the observed staining was due to the covalent binding of OG to exofacial thiols. The observation

under fluorescence microscopy shown that germinated spore were highly fluorescent whereas non germinated spores are non fluorescent or weakly fluorescent. So, thiol groups were detected at the surface of germinated spores but not at the surface of non germinated spores.

### 3.2 Separation of *B. cereus* KBAB4 germinated and non germinated spores by flow cytometry :

We succeed to visually identify germinated and non germinated spores. In order to know if the Oregon Green staining can be use to mechanically separate germinated and non germinated spores, we performed flow cytometry analysis. Results are presented in Figure 3 and 4.

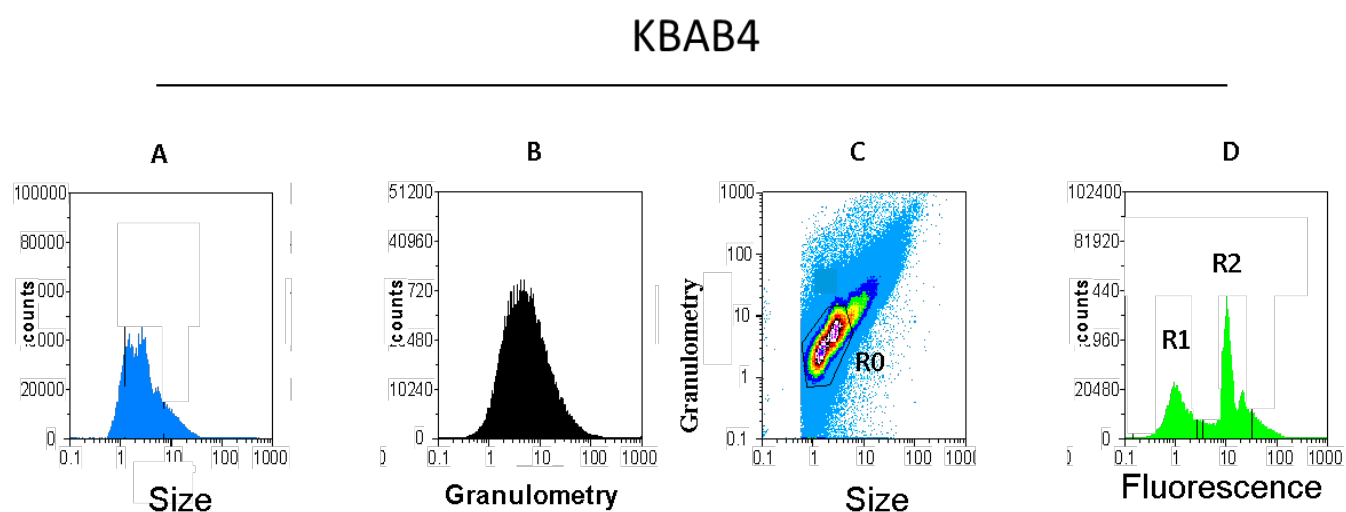


Figure 3: Flow cytometry profile of germinated and non germinated spores of KBAB4 strain. A: Comparison between size and spore count. B: Comparison between Granulometry and spore count. C: Comparison between size and granulometry. D: Comparison between fluorescence and spore count.

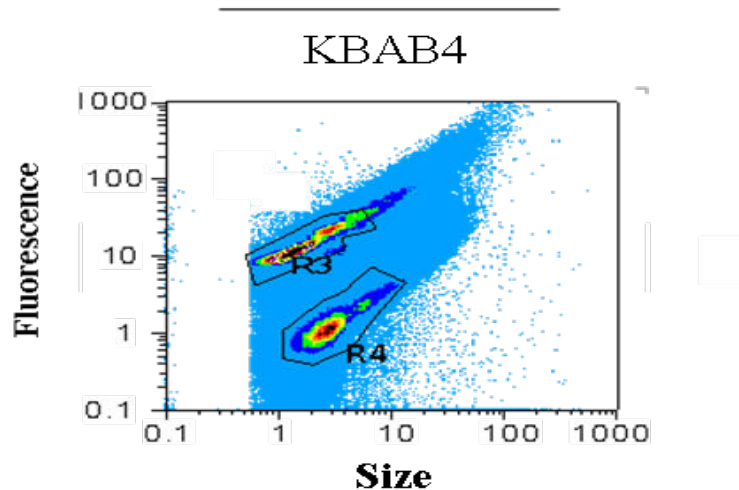


Figure 4: Flow cytometry profile of germinated and non germinated spores of *B. cereus* KBAB4 strain. Comparison between Fluorescence and Size.

Comparing size and granulometry, our results shown that only one population, named R0, was observed. (Figure 3C). Analysis of fluorescence vs spore count plots showed that 2 fluorescence pics are obtained, one of low intensity called R1 and another of high intensity call R2. When size and fluorescence were compared, two populations of similar size but distinct fluorescence intensity were detected.:R4 corresponding to a low fluorescence intensity population and R3 corresponding to a high fluorescence intensity. It appeared that R3 and R4 correspond to R2 and R1, respectively. All these four populations were part of the R0 spore population. Consequently, R3 and R4 correspond to two spores population separated by their fluorescence intensity after staining with Oregon Green. We can conclude than R3 was composed of germinated spores which are highly fluorescents and than R4 was composed of non germinated spores with low fluorescence.

#### 4 Discussion :

*B. cereus* is a Gram positive pathogenic bacterium able to produce spores under unfavorable conditions. Spores can be dormant during a long time before they germinate when optimal environmental conditions occurs. It remains difficult to separate non germinated spores from germinated spores. In our study we proposed a new method to efficiently discriminate germinated and non germinated spores on the basis of their fluorescence intensity (level) after staining with Oregon Green maleimide 488 (Figure 1 and 2). Our results showed that germinated spores display an intense staining whereas non germinated spores were few or not colored. This property of *B. cereus* spores was successfully used to mechanically separate a mixed aliquot of germinated and non germinated spores by flow cytometry after staining with Oregon Green (Figure 3 and 4). Oregon Green is a thiol specific probe able to covalently bind to exposed thiol groups located on the external membrane surface. However, due to its structure, Oregon Green cannot pass through membrane and can only bind to exofacial thiols groups. Protein carrying thiol groups are present on several spores structures (Figure 5) such as inner and outer coat (Aronson and Fitz-James, 1976), outer and inner membrane (Scherrer and Somerville, 1977) and could be cross-linked by disulfide bonds (Pandey and Aronson, 1979). At the opposite, exosporium protein of *B. cereus* had relatively little cysteine and methionine content (0.2%) (Matz *et al.*, 1970).

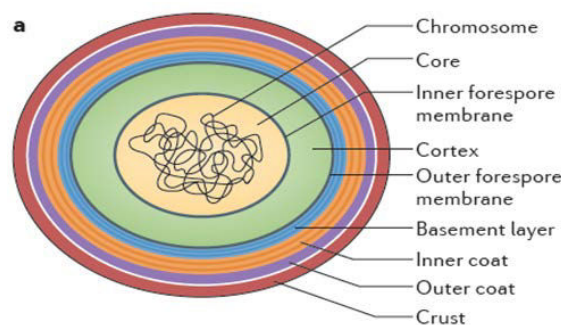


Figure 5: Description of bacterial spore structures. From (McKenney *et al.*, 2013)

Thiol proteins are primordial for spore biogenesis and assembly (Crow *et al.*, 2009b, Eichenberger, 2010, Han and Wilson, 2013). The differential staining observed between germinated and non germinated spore is probably due to an accessibility difference of Oregon Green to exposed thiol groups. Indeed, during germination various outer layer of spore are disrupted (Barton, 2005). Among these layers, the exosporium is probably not responsible of the high fluorescence intensity observed for germinated spores because of its low content in

thiols groups. In addition, the exosporium is rapidly degraded which could allowed Oregon Green to access to thiol rich spore structure such as coats leading high fluorescence intensity

Our method could be usefull for separation of germinated or non germinated spore but could also be used so specifcally studied, by mass spectrometry, thiol proteins of *B. cereus* spores whose importance in spore properties, sporulation and germination is not understood. Moreover, evolution of spore thiol protein content, in response to spore treatment such as pulsed light or UV, could be studied by this method.



#### 4. References :

- ABBAS, A. A., PLANCHON, S., JOBIN, M. & SCHMITT, P. Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology*.
- ABEE, T., GROOT, M. N., TEMPELAARS, M., ZWIETERING, M., MOEZELAAR, R. & VAN DER VOORT, M. 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiol*, 28, 199-208.
- AFCHAIN, A. L., CARLIN, F., NGUYEN-THE, C. & ALBERT, I. 2008. Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *Int J Food Microbiol*, 128, 165-173.
- ANDERSSON, A., RONNER, U. & GRANUM, P. E. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int J Food Microbiol*, 28, 145-55.
- BARIL, E., COROLLER, L., POSTOLLEC, F., LEGUERINEL, I., BOULAIS, C., CARLIN, F. & MAFART, P. 2011. The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *Int J Food Microbiol*, 146, 57-62.
- BARRA-CARRASCO, J., OLGUIN-ARANEDA, V., PLAZA-GARRIDO, A., MIRANDA-CARDENAS, C., COFRE-ARANEDA, G., PIZARRO-GUAJARDO, M., SARKER, M. R. & PAREDES-SABJA, D. 2013. The *Clostridium difficile* exosporium cysteine (CdeC)-rich protein is required for exosporium morphogenesis and coat assembly. *J Bacteriol*, 195, 3863-75.
- CHOMA, C., CLAVEL, T., DOMINGUEZ, H., RAZAFINDRAMBOA, N., SOUMILLE, H., NGUYEN-THE, C. & SCHMITT, P. 2000. Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. *Int J Food Microbiol*, 55, 73-77.
- CLAVEL, T., CARLIN, F., LAIRON, D., NGUYEN-THE, C. & SCHMITT, P. 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol* 97, 214-219.
- DE VRIES, Y. P., ATMADJA, R. D., HORNSTRA, L. M., DE VOS, W. M. & ABEE, T. 2005. Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. *Appl Environ Microbiol*, 71, 3248-54.
- JENSEN, G. B., HANSEN, B. M., EILENBERG, J. & MAHILLON, J. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, 5, 631-640.
- KIM, J.-B., KIM, J.-M., CHO, S.-H., OH, H.-S., CHOI, N. J. & OH, D.-H. 2011. Toxin Genes Profiles and Toxin Production Ability of *Bacillus cereus* Isolated from Clinical and Food Samples. *J. Food Sci.*, 76, T25-T29.
- KOUAMÉ, A. K., DJÉNI, T. N., N'GUESSAN, F. K. & DJE, M. K. 2013. Postprocessing microflora of commercial attiéke (a fermented cassava product) produced in the south of Côte d'Ivoire. *Lett Appl Microbiol*, 56, 44-50.
- KUWANA, R. & TAKAMATSU, H. 2013. The GerW protein is essential for L-alanine-stimulated germination of *Bacillus subtilis* spores. *J Biochem*, 154, 409-17.
- MCKENNEY, P. T., DRIKS, A. & EICHENBERGER, P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol*, 11, 33-44.
- MCKILLIP, J. L. 2000. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 77, 393-9.
- NGUYEN THI MINH, H., GUYOT, S., PERRIER-CORNET, J. M. & GERVAIS, P. 2008. Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 107-14.
- SETLOW, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol*, 101, 514-25.
- SPIRA, W. M. & GOEPFERT, J. M. 1975. Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Can J Microbiol*, 21, 1236-46.

- STENFORS ARNESEN, L., FAGERLUND, A. & GRANUM, P. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 579 - 606.
- TAKENO, A., OKAMOTO, A., TORI, K., OSHIMA, K., HIRAKAWA, H., TOH, H., AGATA, N., YAMADA, K., OGASAWARA, N., HAYASHI, T., SHIMIZU, T., KUHARA, S., HATTORI, M. & OHTA, M. 2012. Complete Genome Sequence of *Bacillus cereus* NC7401, Which Produces High Levels of the Emetic Toxin Cereulide. *J Bacteriol*, 194, 4767-4768.
- TAM, N. K., UYEN, N. Q., HONG, H. A., DUC LE, H., HOA, T. T., SERRA, C. R., HENRIQUES, A. O. & CUTTING, S. M. 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol*, 188, 2692-700.
- VAN DER VOORT, M., GARCIA, D., MOEZELAAR, R. & ABEE, T. 2010. Germinant receptor diversity and germination responses of four strains of the *Bacillus cereus* group. *Int J Food Microbiol*, 139, 108-15.
- VILAS-BOAS, G., SANCHIS, V., LERECLUS, D., LEMOS, M. V. & BOURGUET, D. 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 68, 1414-24.

### 3 Principaux résultats de l'étude

La coloration à l'Oregon Green, colorant spécifique des thiols exofaciaux, de cellules végétatives de *B. cereus* a mis en évidence la présence de thiols exofaciaux sur la totalité de la surface de ces cellules (chapitre 5, article 2). Cette expérience a été rééditée sur un mélange de spores germées et non germées de trois différentes souches appartenant à différents sous groupes de *B. cereus* sensu lato. Les résultats obtenus montrent que les spores non germées, réfringentes par microscopie à contraste de phase, ont une faible fluorescence tandis que les spores germées, non réfringentes par microscopie à contraste de phase, ont une forte fluorescence. Cette observation est confirmée pour chacune des souches étudiées. Ainsi, les thiols exofaciaux sont détectés à la surface des spores germées de *B. cereus* mais pas à la surface des spores non germées. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une différence d'accessibilité du colorant aux structures de la spore portant les groupements thiols, comme les tuniques interne et externe (Aronson and Fitz-James, 1976), selon que la spore soit germée ou non. En effet durant la germination, les couches externes de la spore sont progressivement dégradées, comme l'exosporium très pauvre en groupement thiol (Barton, 2005). Cette dégradation permettrait à l'Oregon Green d'accéder aux couches de la spore riches en groupement thiol comme les tuniques ou la membrane interne. Cette propriété de fluorescence différentielle observée entre les spores germées et non germées après coloration à l'Oregon Green pourrait être utilisée comme base d'une méthode pour séparer des spores germées de spores non germées de *B. cereus* par cytométrie en flux.

Pour vérifier cela, des expériences de cytométrie en flux ont été menées au laboratoire de microbiologie de Bretagne occidentale à Quimper, dans l'équipe d'Yvan Leguerinel, avec l'aide de Clément Trunet. Les résultats obtenus ont montré qu'il était possible de séparer les populations de spores germées et non germées par cytométrie en flux après coloration à l'Oregon Green maléimide 488.

Quelques mises au point restent néanmoins à faire pour valider cette méthode innovante. En effet, seule la souche KBAB4 présentait un profil de cytométrie concluant. Les autres spores des souches testées s'aggloméraient empêchant ainsi l'exploitation des résultats de cytométrie en flux.. Il est connu que l'hydrophobicité et la charge électrique à la surface des spores jouent un rôle important dans l'agrégation. En effet, il a été montré que les spores de *B. cereus* avaient des caractéristiques d'hydrophobicité variées (Faille *et al.*, 2002) liées à la composition en glycoprotéine de leur exosporium (Lequette *et al.*, 2011). Les amas de spores

obtenus pourraient être désagrégés avant cytométrie par utilisation de détergents comme le Tween 80, le SDS ou encore le Triton X100

Cette amélioration au protocole devrait permettre d'obtenir des résultats exploitables pour les autres souches de *B. cereus sensu lato* et peut être d'étendre la méthode à d'autres espèces de bactéries sporulées comme *B. subtilis*.



# **DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES**



## 1 Discussion générale et perspectives

*Bacillus cereus* est une bactérie capable de s'adapter à un grand nombre de conditions environnementales défavorables telles que les basses températures (Diomandé *et al.*, 2014), les pH acides (Jobin *et al.*, 2002) ou les bas potentiels d'oxydo-réduction ( $E_h$ ) (Duport *et al.*, 2004). Le potentiel d'oxydo-réduction ( $E_h$ ) est un paramètre rarement pris en compte voire totalement ignoré dans les études portant sur les procédés de fabrication des aliments. L'un des buts de notre étude était d'étudier l'impact de ce paramètre sur la physiologie microbienne et la résistance au stress acide de *B. cereus*.

### 1. 1 Impact du $E_h$ sur l'ATR et sur l'adaptation croisée et les paramètres de croissance de *B. cereus*.

L'étude de l'influence du pH et du  $E_h$  sur l'amplitude de la réponse de tolérance à l'acide a montré qu'une légère diminution de l'amplitude de l'ATR était observée quand les cellules étaient cultivées à des  $E_h$  oxydants. Cette hausse de mortalité à  $E_h$  oxydant peut s'expliquer par la génération de stress oxydants secondaires suite au stress acide en conditions aérobie. En effet il a déjà été observé chez *B. cereus* ATCC14579 que certains gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse au stress oxydants telles que le régulateur PerR, des catalases et des superoxyde dismutases notamment, avaient une expression augmentée après un choc acide à pH 4, signe de l'induction d'un stress oxydant secondaire (Mols *et al.*, 2010b). L'hypothèse suggérée est que, suite au stress acide, des perturbations surviendraient au niveau de la chaîne de transport des électrons ce qui générerait l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène (Mols *et al.*, 2010b).

A l'inverse, aucune différence significative dans l'amplitude de l'ATR n'est observée entre les conditions d' $E_h$  réducteur et d' $E_h$  très réducteur. De la même manière aucune différence n'est observée entre les principaux paramètres de croissance de *B. cereus* obtenus sous  $E_h$  réducteur et ceux obtenus sous  $E_h$  très réducteurs. Ces données semblent indiquer que les  $E_h$  réducteurs ne sont pas des paramètres physico-chimiques suffisamment puissants pour modifier ou altérer les valeurs cardinales de croissance ou l'amplitude de l'ATR de *B. cereus*. Cette observation est partagée par des résultats obtenus chez *B. subtilis* et *B. licheniformis* (Rodel and Lucke, 1990).



L'étude de la survie au stress thermique à 50°C des cellules de *B. cereus* après préadaptation à l'acide a démontré que les cellules pré-adaptées avaient une meilleure survie au stress thermique que les cellules non adaptées. Cette observation confirme l'existence d'adaptations croisées entre le stress thermique et le stress acide qui avaient déjà été suggérées précédemment (Senouci-Rezkallah *et al.*, 2011). Cette réponse croisée s'explique par l'induction, lors de la croissance à pH 5.5, de l'expression de gènes codants pour des protéines de choc thermique (HSP) telles que les chaperonnes DnaJ/DnaK et GroEL ainsi que par l'induction de l'expression du gène codant pour le facteur  $\sigma^B$  (communication personnelle de Michel Jobin). L'expression de ces gènes serait à l'origine de la préadaptation thermique observée après pré-adaptation à l'acide. *Il pourrait être intéressant d'étudier si ce phénomène est observé pour d'autres stress comme le stress froid, osmotique, oxydatif...*

### 1. 2 Adaptations métaboliques de *B. cereus* à pH 5.5.

L'analyse du métabolisme de *B. cereus* cultivé à pH 5.5 a montré une diminution importante de la production de métabolites issus de la fermentation des acides mixtes comme le lactate, l'acétate et le formiate. Cette observation a déjà en partie été faite chez d'autres microorganismes exposés à un stress acide. Ce phénomène peut s'expliquer par la nécessité pour *B. cereus* de réguler finement son pH interne lors de sa croissance à pH acide. Il est donc dans l'intérêt de la cellule de diminuer la production de certains acides organiques comme le lactate, l'acétate et le formiate qui pourraient induire une acidification du cytoplasme bactérien.

En parallèle de la diminution de la production de formiate, d'acétate et de lactate, une importante production de 2,3-butanediol (2,3 BD) a été détectée chez *B. cereus* F4430/73 et *B. cereus* ATCC14579 cultivés à pH acide, la forme principale semblant être stéréoisomérique (R,R ou S,S). Si la production de 2,3 BD a déjà été observée chez certaines souches environnementale de *B. cereus* comme *B. cereus* YUF-4 (Hosaka *et al.*, 2001), notre étude est la première décrivant la production de 2,3 BD comme liée au pH de culture chez *B. cereus*. Nos résultats sont également renforcés par des données transcriptomiques plus anciennes et démontrant une augmentation importante de l'expression des gènes impliqués dans la voie du 2,3 BD quand des cellules de *B. cereus* étaient exposés à des pH acides, générés par des molécules acidifiantes diverses (Mols *et al.*, 2010a).

### 1. 3 Régulation de la voie du 2,3 BD

Dans notre étude, que ce soit pour la souche F4430/73 ou la souche ATCC14579 la fermentation butanediolique contribue pour 50 % au bilan carbone des cellules cultivées à pH 5.5. Aucune production de 2,3 BD n'est observée à pH 7. Ces résultats démontrent qu'une importante modification du flux de carbone se produit au cours de la croissance de *B. cereus* à pH acide pour orienter le métabolisme du glucose depuis la voie des acides mixtes vers la voie butanediolique. Cette réorientation des flux métaboliques fait vraisemblablement appel à un ou plusieurs régulateurs moléculaires. Les données disponibles sur la régulation de la voie du 2,3 BD chez *Klebsiella terrigena* démontrent que les régulateur FNR et BudR ont des actions antagonistes dans un système de culture à pH non régulé en anaérobiose. A pH proche de la neutralité, FNR réprimerait l'expression de la voie du 2,3 BD. L'accumulation d'acides organiques comme le lactate ou l'acétate va conduire à l'acidification du milieu de culture, ce qui va activer BudR, un régulateur transcriptionnel de type lysR. BudR va chasser FNR de certains sites de fixation et ainsi enclencher l'expression des gènes codants pour les enzymes de la voie du 2,3 BD (Mayer *et al.*, 1995). Chez *Serratia plymuthica* il a également été démontré que la production de 2,3 BD était positivement contrôlée par le pH acide et par l'accumulation d'*N*-(3-oxohexanoyl)-*l*-homoserine lactone (OHHL) dans le milieu de culture. L'OHHL est une molécule signal participant aux mécanismes de quorum sensing qui va activer l'expression du régulateur BudR et ainsi déclencher l'expression des gènes codant pour les enzymes de la voie du 2,3 BD (Moons *et al.*, 2011). Chez *B. subtilis*, AlsR, régulateur transcriptionnel de type lysR, qui va activer l'expression du gène *bdhA* codant pour l'acétoïne réductase. Il a été démontré chez *B. subtilis* que l'expression de *bdhA* était induite par l'accumulation de métabolites de la fermentation des acides mixtes comme l'acétate, le pH de culture, mais également par la phase stationnaire précoce (Frädrich *et al.*, 2012, de Oliveira and Nicholson, 2013). Ce dernier point suggère une implication potentielle des mécanismes de quorum sensing dans l'activation de la voie du 2,3 BD chez *B. subtilis*.

*Certaines des perspectives à court et moyen terme du travail mené lors de cette thèse seraient d'effectuer chez B. cereus un suivi de la production de 2,3 BD au cours du temps et/ou en présence de molécules connues pour induire l'activation de cette voie chez d'autres bactéries. Pourraient être testées, l'OHHL ou certains métabolites secondaires comme l'acétate. Egalement il serait intéressant d'étudier l'implication des régulateur lysR et FNR ainsi que celle du système à deux composants ResDE dans l'activation ou la répression de la voie du*

2,3 BD d'autant plus que les mutants de ces deux derniers systèmes sont déjà disponibles au laboratoire pour la souche F4430/73 (Messaoudi *et al.*, 2010, Duport *et al.*, 2006). Ces expériences permettraient de mieux comprendre la régulation de la voie du 2,3 BD chez *B. cereus*.

#### 1.4 Rôles supposés de la voie du 2,3 BD

##### 1.4.a Rôle dans l'homéostasie du pH

Jusqu'à aujourd'hui les fonctions métaboliques de la synthèse du 2,3 BD n'ont pas été clairement identifiées. Néanmoins, des débuts de réponse existent. Ainsi il a été montré chez *L. plantarum* que la voie du 2,3 BD est impliquée dans la prévention de la diminution du pH intracellulaire au cours de la croissance en anaérobiose en réorientant le métabolisme de la fermentation des acides mixtes vers la fermentation butanediolique. En effet, à l'inverse du formiate, de l'acétate et surtout du lactate, le 2,3 BD est un composé neutre qui ne participe pas à l'acidification du cytoplasme ou du milieu de culture (Tsau *et al.*, 1992, Van Houdt *et al.*, 2007). De plus les étapes conduisant à la synthèse de l' $\alpha$ -acétolactate et de l'acétoïne entraînent la consommation de protons intracellulaires. Ainsi en utilisant la voie du 2,3 BD la cellule bactérienne pourrait limiter l'acidification de son pH cytoplasmique. Cette hypothèse est étayée par les données obtenues dans notre étude sur *B. cereus* (Le Lay *et al.*) et également par les données existantes pour d'autres microorganismes et qui démontrent que la synthèse du 2,3 BD est induite en conditions de pH acide (Nakashimada *et al.*, 2000, Yu and Saddler, 1982). De plus des expériences menées sur *S. plymuthica* ont montré que des mutants des gènes *budAB*, déficients dans la fermentation du 2,3 BD, avaient des paramètres de croissance en milieu acide inférieurs aux souches sauvages. Néanmoins l'amplitude de la réponse de tolérance à l'acide des mutants n'était pas affectée par la mutation. Ces dernières données apportent donc un bémol, en effet la voie du 2,3 BD pourrait être impliquée dans la croissance à des pH sub-létaux en limitant l'acidification du cytoplasme bactérien mais la protection contre l'acidité apportée ne serait pas suffisante pour améliorer la survie des cellules lors de chocs acides à pH létaux (Vivijis *et al.*, 2014).

*Parmi les perspectives de cette thèse, il serait intéressant d'étayer l'hypothèse du rôle du 2,3 BD dans la limitation de l'acidification du cytoplasme bactérien en réalisant un mutant du gène codant pour l'acétoïne réductase mais également un mutant du gène codant pour l' $\alpha$ -acétolactate déshydrogénase. En effet ce dernier mutant permettra de déterminer si c'est*

*l'étape de consommation du proton  $H^+$  (passage de l' $\alpha$ -acétolactate vers l'acétoïne) ou la molécule de 2,3 BD elle-même qui limite l'acidification du cytoplasme et/ou du milieu de culture bactérien. Enfin ces mutants pourront être également utilisés pour déterminer si la voie du 2,3 BD est impliquée dans la réponse de tolérance à l'acide, ou si elle se limite à la survie à des pH sub-létaux, en réalisant des chocs acides d'intensité variable.*

#### 1.4.b Rôle dans l'homéostasie du $E_h$

La voie du 2,3 BD pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie du potentiel d'oxydo réduction ( $E_h$ ) intracellulaire. En effet la transformation réversible de l'acétoïne en 2,3 BD permet de régénérer une molécule de  $NAD^+$  à partir d'une molécule de  $NADH + H^+$  ce qui diminue l'excès de cofacteur réduit associés à la glycolyse (Magee and Kosaric, 1987). Néanmoins des données obtenus chez *Dickeya dadantii* démontrent que des mutants de l'acétoïne réductase ont une virulence peu affectée ce qui semble limiter l'importance de la régénération du  $NAD^+$  par cette enzyme dans la physiologie de cette bactérie dans les conditions testées (Effantin *et al.* 2011). Dans notre étude chez *B. cereus*, la voie de production du lactate, qui régénère elle aussi du  $NAD^+$ , est la deuxième voie la plus empruntée après celle du 2,3 BD. Une altération de la dernière étape de la voie du 2,3 BD pourrait donc être éventuellement compensée par une augmentation de l'activation de la voie du lactate. *Cette hypothèse pourrait être efficacement testée en réalisant un mutant du gène codant pour l'acétoïne réductase et en mesurant en parallèle l'expression et l'activité des lactates déshydrogénases de B. cereus.*

#### 1.4.c Rôle dans le stockage d'énergie

La voie du 2,3 BD pourrait également avoir une fonction de stockage d'énergie. En effet, il a été démontré que suite à la levée des répressions métaboliques liées à la présence de glucose, le 2,3 BD pouvait être transformé en acétoïne grâce à l'activité 2,3 BD dehydrogenase de l'enzyme acétoïne réductase en milieu alcalin (Ji *et al.*, 2011). L'acétoïne est ensuite transformée en acetyl-CoA et en acétaldéhyde par l'action du complexe enzymatique acétoïne déhydrogénase. L'acétaldéhyde est alors supposément oxydé en acétate ou transformé en éthanol par une déshydrogénase. L'acétate résultant est alors converti en acetyl-CoA par une acetyl-CoA synthase et est ainsi introduit dans le métabolisme central (Xiao and Xu, 2007) (FIGURE 26).

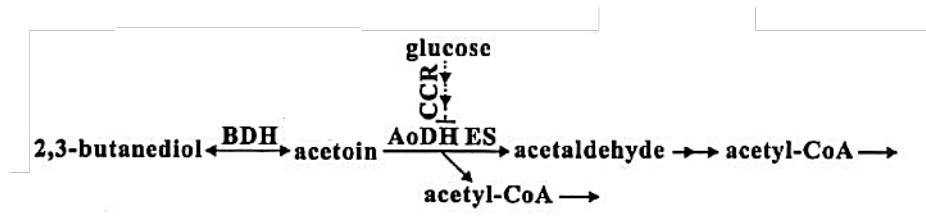


FIGURE 26: Schéma représentant la dégradation du 2,3 BD une fois les répressions cataboliques liées au glucose levées. BDH : acétoïne réductase. AoDH ES : complexe enzymatique de l'acétoïne déshydrogénase. D'après (Xiao and Xu, 2007).

Cette hypothèse est renforcée par une étude ancienne menée chez *B. cereus* qui a démontré qu'au cours des premières phases de la sporulation, le 2,3 BD est métabolisé en acétate puis en poly-béta-hydroxybutyrate (PHB). Ce PHB est utilisé comme réserve énergétique et est consommé lors des différentes étapes du processus de sporulation (Kominek and Halvorson, 1965). *Le rôle du 2,3 BD dans la création de réserves énergétiques disponibles pour la sporulation de B. cereus est une perspective intéressante qui pourrait être explorée en effectuant des cinétiques de consommation du 2,3 BD et production de PHB en parallèle d'un suivi de la sporulation.*

#### 1.4.d Rôle dans les interactions Plante/Microorganismes du sol

Pour terminer, il a été démontré que le 2,3 BD possédait de nombreux rôles dans les cycles de vie complexes des microorganismes du sol. Ainsi, l'utilisation de cette voie est un facteur de virulence impliqué dans l'infection des plantes par *Dickeya dadantii* et par les bactéries du genre *Pectobacterium* qui sont des agents de la pourriture molle bactérienne. Le 2,3 BD produit par ces bactéries leur permettrait de survivre dans le milieu acide généré par la liquéfaction des tissus végétaux infectés (Effantin *et al.*, 2011). D'autres études ont montré que le 2,3 BD et l'acétoïne étaient des attractants de certains arthropodes ce qui permettrait à ces pathogènes d'utiliser ces animaux comme moyen de dissémination dans l'environnement (Effantin *et al.*, 2011, Basset *et al.*, 2000). A l'inverse il a été démontré que le 2,3 BD et l'acétoïne produits par certaines rhizobactéries pouvait améliorer la croissance de plantes. Chez *Arabidopsis thaliana*, la production de 2,3 BD par les rhizobactérie entraîne l'induction des mécanismes de résistances systémiques chez l'hôte végétal, vraisemblablement par stimulation des voies de synthèse de l'éthylène. Cette stimulation améliorerait la survie de ces plantes aux maladies végétales causées par les bactéries phytopathogènes comme *Pectobacterium carotovorum* (Ryu *et al.*, 2004, Han *et al.*, 2006, Wevers *et al.*, 2009, Hao *et*

*al.*, 2014, D'Alessandro *et al.*, 2014). Cet effet antagoniste entre le 2,3 BD sécrété par les bactéries phytopathogènes et le 2,3 BD produit par les bactéries commensales de la rhizosphère peut sembler déroutant. Néanmoins, ce fait illustre l'importance de la cinétique de production du 2,3 BD. En effet, chez les phytopathogènes cette molécule ne sera produite qu'à partir de la phase symptomatique de la maladie, c'est à dire très tard dans le processus d'infection à un moment où la population bactérienne est importante et où les mécanismes de résistance systémique de la plante n'auront pas le temps de se mettre en place (Effantin *et al.*, 2011).

*Il est connu que B. cereus est une bactérie du sol qui possède un cycle de vie saprophyte qui interagit avec les rhizomes végétaux (Silo-Suh et al., 1994). Si aucune donnée ne prouve que B. cereus produit du 2,3 BD dans la rhizosphère, cette idée n'en reste pas moins séduisante et pourrait être testée à court terme en cultivant des plantes modèles comme Arabidopsis thaliana, ou d'intérêt agronomique comme la tomate, en présence de souche de Bacillus productrice de 2,3 BD. L'effet de la souche bactérienne productrice sur les paramètres de croissance de la plante et sur sa résistance aux agents phytopathogènes pourrait ainsi être étudié.*

### 1.5 Implication des thiols exofaciaux dans l'activité réductrice de *B. cereus*

Le deuxième objectif de ce projet de thèse était d'étudier les interactions de *B. cereus* avec le  $E_h$  de son environnement. Il avait notamment été décidé de s'intéresser au rôle des groupements thiol exofaciaux dans l'activité réductrice de *B. cereus*. Les résultats obtenus par filtration, dosage ou blocage, démontrent que les thiols et en particuliers les thiols exofaciaux sont impliqués dans l'activité réductrice de *B. cereus*. De plus, un faisceau d'indications renforce cette observation. En effet, (i) le calcul de l'activité spécifique de réduction (Chapitre III article 1) montre un décalage temporel entre le maximum d'activité spécifique de réduction, le taux de croissance maximal et le maximum d'activité spécifique d'acidification. (ii) les niveaux de  $E_h$  finaux obtenus entre les expériences réalisées sous bullage d'azote ( $E_h$  réducteur) ( $E_{h7}$  final = -150 mV) et bullage d'hydrogène ( $E_h$  très réducteur) ( $E_{h7}$  moyen = -200 mV) sont différents de 50 mV. (iii) en aérobiose : bien qu'il n'y ait quasiment aucune production de métabolites fermentaires on observe une activité réductrice importante. Ceci exclue la possibilité que le métabolisme fermentaire puisse être à l'origine de l'activité réductrice. (iv) les bilans de recouvrement en carbone sont quasi complets en anaérobiose à pH 7 comme à pH 5.5, ce qui exclut une dégradation du formiate en gaz réducteurs ( $CO_2$  et  $H_2$

) par l'enzyme formiate lyase. Toutes ces indications permettent d'affirmer que l'activité réductrice de *B. cereus* n'est pas due à la production dans le milieu de culture de métabolites fermentaires réducteurs ou de gaz comme l'hydrogène, mais à la présence du couple d'oxydo-réduction : thiol/disulfure présent sur les protéines à cystéine ou méthionine

L'hypothèse qui peut alors être émise pour expliciter le rôle des groupements thiols exofaciaux dans l'activité réductrice de *B. cereus* serait qu'un microenvironnement réducteur, situé à proximité immédiate de la cellule, est généré par l'activité des protéines à thiol exofaciaux membranaires. L' $E_h$  se stabilise lorsque la concentration en groupements thiols, et donc la biomasse, est suffisamment importante pour générer un courant d'échange avec l'électrode de mesure qui est supérieur au courant des autres couples redox présents dans le milieu de culture (FIGURE 27). Cette hypothèse avait été précédemment émise à partir de résultats obtenus lors de l'étude des thiols exofaciaux de *Lactococcus lactis* (Michelon *et al.*, 2010).

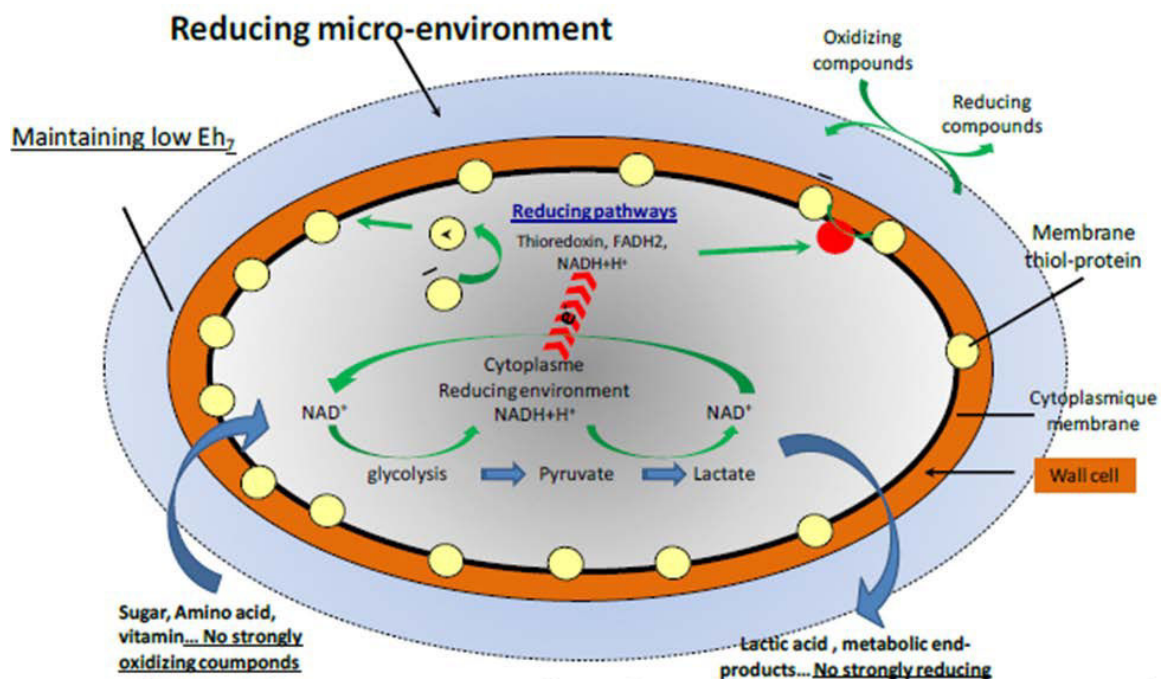


FIGURE 27 : Schéma décrivant l'hypothèse d'un microenvironnement réducteur autour de la cellule bactérienne. Inspiré des données aimablement mises à disposition par Rémy Cachon dans le cadre de l'ANR Food Redox.

### 1.6 Les protéines impliquées dans l'activité réductrice de *B.cereus*

La recherche des protéines portant des groupements thiols exofaciaux à la surface de *B. cereus* s'est orientée vers des protéines membranaires appelées oxydo-réductases à thiol/pont

disulfure (Thiol Disulfide Oxydo-Réductases (TDORs)). Ces protéines portent des groupements thiols appelés groupements thiorédoxine. Les TDORs participent à la maturation des protéines sécrétées et de surface *via* leur site catalytique composés de domaines thiorédoxines (C-X-X-C) (Kouwen *et al.*, 2007). Ces protéines permettent la création ou la cassure de ponts dissulfures et font donc partie de voies oxydantes ou réductrices (Crow *et al.*, 2009a). Chez *E. coli*, ces protéines contribuent au  $E_h$  réducteur du périplasme ( $E_h = -165$  mV) (Messens *et al.*, 2007). Les TDORs sont donc des protéines d'intérêt pour l'étude de l'activité réductrice de *B. cereus*.

Une recherche par analyses *in-silico* sur le génome de *B. cereus* ATCC14579 a été réalisée en recherchant des gènes codant pour des protéines membranaires dont la séquence comporte un ou plusieurs groupements C-X-X-C. Après analyse topologique, vingt gènes codant pour des protéines membranaires portant des motifs thiorédoxines orientés vers l'extérieur de la cellule ont été détectés par analyses *in-silico* dans le génome de *B. cereus*. Parmi ces gènes, 6 codent pour des TDORs. Deux de ces protéines ont été retrouvées dans les membranes de *B. cereus* par spectrométrie de masse : BdbD et ResA. Chez *B. subtilis*, ces deux protéines possèdent des sites actifs thiorédoxines d'un potentiel redox respectivement de -90 et -256 mV (Lewin *et al.*, 2008, Crow *et al.*, 2009a) ce qui correspond à l'intervalle de  $E_h$  final obtenu en fin de croissance de *B. cereus*. L'implication de ces protéines dans l'activité réductrice de *B. cereus* reste cependant à démontrer par réalisation de mutants des gènes codant pour ces protéines et vérifier leur implication par réinsertion des gènes.

Nous avons également observé que la concentration en thiols exofaciaux se stabilisait à la surface des cellules de *B. cereus* une fois le milieu de la phase exponentielle de croissance atteinte. Il est donc probable qu'un mécanisme de régulation soit impliqué dans le contrôle de la concentration en groupements thiols à la surface de la cellule bactérienne. Un senseur protéique présent à la surface de la membrane de *B. cereus* pourrait être sensible au  $E_h$  du milieu extérieur ou pourrait détecter la concentration membranaire en thiols exofaciaux. Ce régulateur pourrait ensuite finement réguler l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans la balance thiol-disulfure. Un tel système reste pour le moment inconnu. néanmoins que chez *S. aureus*, il a été démontré que le système à deux composants LytSR était capable de percevoir les variations de potentiel électrique ( $\Delta\psi$ ) de la membrane bactérienne et régulait en conséquence l'expression d'un grand nombre de gènes (Yang *et al.*, 2013). Un tel système pourrait éventuellement être impliqué dans la régulation de la concentration en thiols exofaciaux chez *B. cereus*.



Il est également intéressant de constater que si les TDORs ont été bien étudiées chez *B. subtilis*, aucune donnée n'est disponible chez *B. cereus*. Chez *B. subtilis* ces protéines sont impliquées dans de nombreux phénotypes comme la maturation du cytochrome C, la sporulation ou l'acquisition d'ADN exogène. De plus, chez *B. anthracis*, les TDORs sont impliquées dans la production des facteurs de virulence AtxA et PagA. Chez *B. cereus*, *resA* est en opéron avec les gènes *resABCDE* et il a été démontré que l'expression du gène *resA* était fortement diminuée chez un mutant du système à deux composants ResDE.

*En terme de perspectives, il serait intéressant de tester l'implication de ResA et des autres TDORs dans l'adaptation aux variations d'E<sub>h</sub> ainsi que dans la production de toxines. De même, l'implication des TDORs dans d'autres processus cellulaires comme la sporulation ou la sécrétion pourrait fournir des pistes de recherche innovantes.*

En effet, Les TDORs étant fondamentales pour la production de facteurs de virulence et nécessaires à la sporulation chez *B. anthracis*, ces protéines pourraient être des cibles intéressantes pour la production de nouvelles classes d'antibiotiques. Cette piste de recherche est d'autant plus intéressante que les TDORs sont retrouvées chez de nombreuses bactéries posant des défis sanitaires importants, comme *S. aureus* ou les *E. coli* entérohémorragiques (Kouwen *et al.*, 2007), mais sont aussi impliquées dans le cycle de pathogénie du virus de l'immunodéficiência humaine (VIH) (Ryser *et al.*, 1994). En effet, il a été montré que le blocage, par diverses molécules, des protéines disulfide isomérase à la surface de cellules lymphoïdes humaines diminuait significativement l'infection de ces cellules par le VIH (Ryser *et al.*, 1994). Ces données suggèrent donc que les TDORs situées à la surface des cellules prokaryotes comme des cellules eukaryotes pourraient être des cibles intéressantes pour la production de nouvelles molécules antibiotiques ou antivirales.

Les TDORs sont également des molécules d'intérêt biotechnologiques. En effet de nombreuses bactéries sont utilisées comme 'usine biologique' pour la production de molécules recombinantes d'origine eukaryotes et ayant des intérêts variés : enzyme pour les détergents ménagers, antibiotiques, hormones (insuline)...(Schallmey *et al.*, 2004). Afin d'être commercialement utilisables, ces molécules être chimiquement stables et doivent donc posséder des ponts disulfures correctement générés par les systèmes TDORs du microorganisme producteur utilisé. *B. subtilis* est une de ces bactéries productrices mais possède de nombreux inconvénients par rapport à *E. coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*, en partie à cause de sa difficulté à générer correctement les ponts disulfures des protéines

d'intérêt (Bolhuis *et al.*, 1999a). Ainsi, mieux comprendre le fonctionnement des systèmes TDORs membranaires chez les bactéries à coloration de Gram positives permettrait d'envisager l'amélioration de ces systèmes de génération de ponts disulfures pour augmenter la production de protéines d'intérêt correctement repliées par les bactéries à coloration de Gram positives.

### 1.7 Détection des thiols exofaciaux à la surface des spores de *B. cereus*

La coloration des spores de *B. cereus* à l'Oregon Green maleimide 488 a montré une différence de coloration entre les spores germées et non germées de *B. cereus*. En effet les spores germées apparaissent fortement fluorescentes tandis que les spores non germées étaient faiblement fluorescentes. Ceci indique que des thiols exofaciaux sont marqués sur les spores germées et pas sur les spores non germées. Cette différence de détection des thiols exofaciaux peut s'expliquer par une différence d'accessibilité de l'Oregon Green maleimide 488 aux thiols exofaciaux portés par certaines couches de la spore comme les tuniques externe et internes, qui sont riches en protéines possédant des cystéines dans leur séquence en acides aminés (Aronson and Fitz-James, 1976). Cette différence d'accessibilité est aussi observée pour le cyto9, un colorant de l'ADN, utilisé pour différencier les spores germées des spores non germées.

Le marquage des spores de *B. cereus* par l'Oregon Green pourrait être une piste prometteuse pour séparer des spores germées et non germées par cytométrie en flux, sur la base de leur fluorescence après coloration à l'Oregon Green. Les expériences de cytométrie en flux déjà menées montrent qu'une telle séparation est possible pour la souche KBAB4 de *B. cereus*. L'une des perspectives à court terme de ce travail serait d'améliorer la méthode de marquage des spores à l'Oregon Green, ainsi que la méthode de désagrégation des spores, de façon à éviter la formation d'amas de spores pouvant fausser la détection au cytomètre. Cette méthode originale de séparation des spores diffère des méthodes déjà existantes comme celles utilisant la coloration au Cyto9. En effet l'Oregon Green se fixe aux groupements thiols et non à l'ADN. Cette fixation est également covalente, et donc définitive, pour l'Oregon Green alors qu'elle n'est que transitoire et éliminable par lavage pour le Cyto9.

*Cette dernière caractéristique de la coloration des spores à l'Oregon Green permet d'envisager la possibilité d'étudier spécifiquement les protéines à thiols des couches des spores de *B. cereus* en les séparant par spectrométrie de masse par exemple.*

En conclusion, ce travail a permis de répondre à un certain nombre de questions posées par le projet ANR Food-Redox. A savoir, quel était l'impact du  $E_h$  sur la réponse de tolérance à l'acide de *B. cereus*, quelles étaient les adaptations métaboliques de *B. cereus* cultivé à pH acide et enfin est ce que les thiols exofaciaux étaient impliqués dans l'activité réductrice de *B. cereus*. Les données obtenues présagent de perspectives variées qui permettront de mieux comprendre la physiologie de *B. cereus*.

# RÉFÉRENCES



- ABBAS, A. A., PLANCHON, S., JOBIN, M. & SCHMITT, P. Absence of oxygen affects the capacity to sporulate and the spore properties of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology*.
- ABEE, T., GROOT, M. N., TEMPELAARS, M., ZWIETERING, M., MOEZELAAR, R. & VAN DER VOORT, M. 2011. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* group members: diversity and role of germinant receptors. *Food Microbiol*, 28, 199-208.
- ABRAHAM, S. 2007. *Evolution du potentiel d'oxydoréduction dans le lait au cours de la transformation fromagère : Impact des composants intrinsèques et extrinsèques et des bactéries lactiques*. Université de Bourgogne.
- ABRAHAM, S., CACHON, R., JEANSON, S., EBEL, B., MICHELON, D., AUBERT, C., ROJAS, C., FERON, G., BEUVIER, E., GERVAIS, P. & DE CONINCK, J. 2013. A procedure for reproducible measurement of redox potential ( $E_h$ ) in dairy processes. *Dairy Science & Technology*, 93, 675 - 690.
- AFCHAIN, A. L., CARLIN, F., NGUYEN-THE, C. & ALBERT, I. 2008. Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurised and chilled foods. *Int J Food Microbiol*, 128, 165-173.
- AGATA, N., OHTA, M., MORI, M. & ISOBE, M. 1995. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett*, 129, 17-20.
- AGBOBATINKPO, P. B., THORSEN, L., NIELSEN, D. S., AZOKPOTA, P., AKISSOE, N., HOUNHOUIGAN, J. D. & JAKOBSEN, M. 2013. Biodiversity of aerobic endospore-forming bacterial species occurring in Yanyanku and Ikipiru, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa* used to produce food condiments in Benin. *Int J Food Microbiol*, 163, 231-238.
- ALBERTS, BRAY, HOPKIN, JOHNSON, LEWIS, RAFF, ROBERTS & WALTER 2005. *L'essentiel de la biologie cellulaire*.
- ALLEN, A. & FLEMSTROM, G. 2005. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 288, C1-19.
- ALWAZEER, D., DELBEAU, C., DIVIES, C. & CACHON, R. 2003. Use of redox potential modification by gas improves microbial quality, color retention, and ascorbic acid stability of pasteurized orange juice. *Int J Food Microbiol*, 89, 21-29.
- ANDERSSON, A., RONNER, U. & GRANUM, P. E. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *Int J Food Microbiol*, 28, 145-55.
- APPIA-AYME, C. & BERKS, B. C. 2002. SoxV, an orthologue of the CcdA disulfide transporter, is involved in thiosulfate oxidation in *Rhodovulum sulfidophilum* and reduces the periplasmic thioredoxin SoxW. *Biochem Biophys Res Commun*, 296, 737-41.
- ARONSON, A. I. & FITZ-JAMES, P. 1976. Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. *Bacteriol Rev*, 40, 360-402.
- ATKINSON, H. J. & BABBITT, P. C. 2009. An atlas of the thioredoxin fold class reveals the complexity of function-enabling adaptations. *PLoS Comput Biol*, 5, 23.
- AUBERT, C., CAPELLE, N., JEANSON, S., ECKERT, T., DIVIÈS, C. & CACHON, R. 2002. Le potentiel d'oxydoréduction et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques. *Science des aliments*, 22, 177-187.
- AUDIA, J. P., WEBB, C. C. & FOSTER, J. W. 2001. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int J Med Microbiol*, 291, 97-106.
- BAKER, T. A. & SAUER, R. T. 2006. ATP-dependent proteases of bacteria: recognition logic and operating principles. *Trends in Biochemical Sciences*, 31, 647-653.
- BARDISCHEWSKY, F. & FRIEDRICH, C. G. 2001. Identification of ccdA in *Paracoccus pantotrophus* GB17: disruption of ccdA causes complete deficiency in c-type cytochromes. *J Bacteriol*, 183, 257-63.
- BARDWELL, J. C., LEE, J. O., JANDER, G., MARTIN, N., BELIN, D. & BECKWITH, J. 1993. A pathway for disulfide bond formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 1038-42.
- BARIL, E., COROLLER, L., POSTOLLEC, F., LEGUERINEL, I., BOULAIS, C., CARLIN, F. & MAFART, P. 2011. The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-

- step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *Int J Food Microbiol*, 146, 57-62.
- BARRA-CARRASCO, J., OLGUIN-ARANEDA, V., PLAZA-GARRIDO, A., MIRANDA-CARDENAS, C., COFRE-ARANEDA, G., PIZARRO-GUAJARDO, M., SARKER, M. R. & PAREDES-SABJA, D. 2013. The *Clostridium difficile* exosporium cysteine (CdeC)-rich protein is required for exosporium morphogenesis and coat assembly. *J Bacteriol*, 195, 3863-75.
- BARTON, L. L. 2005. *Structural and Functional Relationships in Prokaryotes*.
- BASSET, A., KHUSH, R. S., BRAUN, A., GARDAN, L., BOCCARD, F., HOFFMANN, J. A. & LEMAITRE, B. 2000. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3376-81.
- BEALES, N. 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 3, 1-20.
- BEARSON, S., BEARSON, B. & FOSTER, J. W. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 147, 173-80.
- BEECHER, D. J. & MACMILLAN, J. D. 1990. A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 58, 2220-2227.
- BEUCHAT, L. R. & MANN, D. A. 2008. Survival and growth of acid-adapted and unadapted *Salmonella* in and on raw tomatoes as affected by variety, stage of ripeness, and storage temperature. *J Food Prot*, 71, 1572-9.
- BIESTA-PETERS, E. G., MOLS, M., REIJ, M. W. & ABEE, T. 2011. Physiological parameters of *Bacillus cereus* marking the end of acid-induced lag phases. *International Journal of Food Microbiology*, 148, 42-47.
- BOLDUC, M.-P., BAZINET, L., LESSARD, J., CHAPUZET, J.-M. & VUILLEMARD, J.-C. 2006. Electrochemical Modification of the Redox Potential of Pasteurized Milk and Its Evolution during Storage. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 4651-4657.
- BOLHUIS, A., TJALSMA, H., SMITH, H. E., DE JONG, A., MEIMA, R., VENEMA, G., BRON, S. & VAN DIJL, J. M. 1999a. Evaluation of bottlenecks in the late stages of protein secretion in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 65, 2934-41.
- BOLHUIS, A., VENEMA, G., QUAX, W. J., BRON, S. & VAN DIJL, J. M. 1999b. Functional Analysis of Paralogous Thiol-disulfide Oxidoreductases in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem*, 274, 24531-24538.
- BONGIORNI, C., FUKUSHIMA, T., WILSON, A. C., CHIANG, C., MANSILLA, M. C., HOCH, J. A. & PEREGO, M. 2008. Dual promoters control expression of the *Bacillus anthracis* virulence factor AtxA. *J Bacteriol*, 190, 6483-92.
- BOOTH, I. R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev*, 49, 359-78.
- BORONAT, S., DOMENECH, A., PAULO, E., CALVO, I. A., GARCIA-SANTAMARINA, S., GARCIA, P., ENCINAR DEL DEDO, J., BARCONS, A., SERRANO, E., CARMONA, M. & HIDALGO, E. 2014. Thiol-based H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signalling in microbial systems. *Redox Biol*, 2, 395-9.
- BOUREL, G., HENINI, S., DIVIÈS, C. & GARMYN, D. 2003. The response of *Leuconostoc mesenteroides* to low external oxidation-reduction potential generated by hydrogen gas. *J Appl Microbiol*, 94, 280-288.
- BRYN, K., HETLAND, O. & STORMER, F. C. 1971. The reduction of diacetyl and acetoin in *Aerobacter aerogenes*. Evidence for one enzyme catalyzing both reactions. *Eur J Biochem*, 18, 116-9.
- BUKAU, B., WEISSMAN, J. & HORWICH, A. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, 125, 443-51.
- CARBALLO, J., MARTIN, R., BERNARDO, A. & GONZALEZ, J. 1991. Purification, characterization and some properties of diacetyl(acetoin) reductase from *Enterobacter aerogenes*. *Eur J Biochem*, 198, 327-32.
- CESSELIN, B., ALI, D., GRATADOUX, J. J., GAUDU, P., DUWAT, P., GRUSS, A. & EL KAROUI, M. 2009. Inactivation of the *Lactococcus lactis* high-affinity phosphate transporter confers oxygen and thiol resistance and alters metal homeostasis. *Microbiology*, 155, 2274-81.

- CHAIANE, A., LEVY, C., LACOUR, B., RIEDEL, C., CARLIN, F. & RIC 2012. Decontamination of Sugar Syrup by Pulsed Light. *J. Food Prot.*, 75, 913-917.
- CHANG, Y. Y. & CRONAN, J. E., JR. 1999. Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 33, 249-59.
- CHAPELLE, F. H., MCMAHON, P. B., DUBROVSKY, N. M., FUJII, R. F., OAKSFORD, E. T. & VROBLESKY, D. A. 1995. Deducing the distribution of terminal electron-accepting processes in hydrologically diverse groundwater systems. *Water Resources Research*, 31, 359-371.
- CHASTANET, A., FERT, J. & MSADEK, T. 2003. Comparative genomics reveal novel heat shock regulatory mechanisms in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol*, 47, 1061-73.
- CHEN, L. C., CHEN, J. C., SHU, J. C., CHEN, C. Y., CHEN, S. C., CHEN, S. H., LIN, C. Y., LU, C. Y. & CHEN, C. C. 2012. Interplay of RsbM and RsbK controls the sigma(B) activity of *Bacillus cereus*. *Environ Microbiol*, 14, 2788-99.
- CHEROUTRE-VIALETTE, M., LEBERT, I., HEBRAUD, M., LABADIE, J. C. & LEBERT, A. 1998. Effects of pH or aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*, 42, 71-77.
- CHO, S. H. & COLLET, J. F. 2013. Many roles of the bacterial envelope reducing pathways. *Antioxid Redox Signal*, 18, 1690-8.
- CHOMA, C., CLAVEL, T., DOMINGUEZ, H., RAZAFINDRAMBOA, N., SOUMILLE, H., NGUYEN-THE, C. & SCHMITT, P. 2000. Effect of temperature on growth characteristics of *Bacillus cereus* TZ415. *Int J Food Microbiol*, 55, 73-77.
- CIRCU, M. L. & AW, T. Y. 2011. Redox biology of the intestine. *Free Radic Res*, 45, 1245-66.
- CLAIR, G., ARMENGAUD, J. & DUPORT, C. 2012. Restricting Fermentative Potential by Proteome Remodeling. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11.
- CLAIR, G., LORPHELIN, A., ARMENGAUD, J. & DUPORT, C. 2013. OhrRA functions as a redox-responsive system controlling toxinogenesis in *Bacillus cereus*. *J Proteomics*, 94, 527-39.
- CLARK, F. E. 1937. The Relation of *Bacillus siamensis* and Similar Pathogenic Spore-forming Bacteria to *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 33, 435-443.
- CLAVEL, T., CARLIN, F., DARGAIGNARATZ, C., LAIRON, D., NGUYEN-THE, C. & SCHMITT, P. 2007. Effects of porcine bile on survival of *Bacillus cereus* vegetative cells and Haemolysin BL enterotoxin production in reconstituted human small intestine media. *J Appl Microbiol* 103, 1568-1575.
- CLAVEL, T., CARLIN, F., LAIRON, D., NGUYEN-THE, C. & SCHMITT, P. 2004. Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol* 97, 214-219.
- CLEMENS, D. L., LEE, B. Y. & HORWITZ, M. A. 1995. Purification, characterization, and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. *J Bacteriol*, 177, 5644-52.
- COLBERT, C. L., WU, Q., ERBEL, P. J., GARDNER, K. H. & DEISENHOFER, J. 2006. Mechanism of substrate specificity in *Bacillus subtilis* ResA, a thioredoxin-like protein involved in cytochrome c maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 4410-5.
- CONTZEN, M., HAILER, M. & RAU, J. 2014. Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products. *Int J Food Microbiol*, 174, 19-22.
- COTTER, P. D. & HILL, C. 2003. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 429-53.
- CROW, A., LEWIN, A., HECHT, O., CARLSSON MOLLER, M., MOORE, G. R., HEDERSTEDT, L. & LE BRUN, N. E. 2009a. Crystal structure and biophysical properties of *Bacillus subtilis* BdbD. An oxidizing thiol:disulfide oxidoreductase containing a novel metal site. *J Biol Chem*, 284, 23719-33.
- CROW, A., LIU, Y., MOLLER, M. C., LE BRUN, N. E. & HEDERSTEDT, L. 2009b. Structure and functional properties of *Bacillus subtilis* endospore biogenesis factor StoA. *J Biol Chem*, 284, 10056-66.
- CURRAN, T. M., LIEOU, J. & MARQUIS, R. E. 1995. Arginine deiminase system and acid adaptation of oral streptococci. *Appl Environ Microbiol*, 61, 4494-6.



- D'ALESSANDRO, M., ERB, M., TON, J., BRANDENBURG, A., KARLEN, D., ZOPFI, J. & TURLINGS, T. C. 2014. Volatiles produced by soil-borne endophytic bacteria increase plant pathogen resistance and affect tritrophic interactions. *Plant Cell Environ*, 37, 813-26.
- DALTROP, O., ALLEN, J. W., WILLIS, A. C. & FERGUSON, S. J. 2002. In vitro formation of a c-type cytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7872-6.
- DARMON, E., DORENBOS, R., MEENS, J., FREUDL, R., ANTELMANN, H., HECKER, M., KUIPERS, O. P., BRON, S., QUAX, W. J., DUBOIS, J. Y. & VAN DIJL, J. M. 2006. A disulfide bond-containing alkaline phosphatase triggers a BdbC-dependent secretion stress response in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 72, 6876-85.
- DASHPER, S. G. & REYNOLDS, E. C. 1992. pH regulation by *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*, 71, 1159-65.
- DAVE, R. I. & SHAH, N. P. 1998. Ingredient supplementation effects on viability of probiotic bacteria in yogurt. *J Dairy Sci*, 81, 2804-16.
- DAVEY, L., NG, C. K., HALPERIN, S. A. & LEE, S. F. 2013. Functional analysis of paralogous thiol-disulfide oxidoreductases in *Streptococcus gordonii*. *J Biol Chem*, 288, 16416-29.
- DE BEEN, M., TEMPELAARS, M. H., VAN SCHAIK, W., MOEZELAAR, R., SIEZEN, R. J. & ABEE, T. 2010. A novel hybrid kinase is essential for regulating the sigma(B)-mediated stress response of *Bacillus cereus*. *Environ Microbiol*, 12, 730-45.
- DE OLIVEIRA, R. & NICHOLSON, W. 2013. The LysR-type transcriptional regulator (LTTR) AlsR indirectly regulates expression of the *Bacillus subtilis* bdhA gene encoding 2,3-butanediol dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7307-7316.
- DE SARRAU, B., CLAVEL, T., CLERTE, C., CARLIN, F., GINIÈS, C. & NGUYEN-THE, C. 2012a. Influence of anaerobiosis and low temperature on *Bacillus cereus* growth, metabolism, and membrane properties. *Appl Environ Microbiol*, 78, 1715-23.
- DE SARRAU, B., CLAVEL, T., CLERTÉ, C., CARLIN, F., GINIÈS, C. & NGUYEN-THE, C. 2012b. Influence of Anaerobiosis and Low Temperature on *Bacillus cereus* Growth, Metabolism, and Membrane Properties. *Appl Environ Microbiol* 78, 1715-1723.
- DE VRIES, Y. P., ATMADJA, R. D., HORNSTRA, L. M., DE VOS, W. M. & ABEE, T. 2005. Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. *Appl Environ Microbiol*, 71, 3248-54.
- DECKERS-HEBESTREIT, G. & ALTENDORF, K. 1996. The FOF1-type ATP synthases of bacteria: structure and function of the FO complex. *Annu Rev Microbiol*, 50, 791-824.
- DEN BESTEN, H. M., MATARAGAS, M., MOEZELAAR, R., ABEE, T. & ZWIETERING, M. H. 2006. Quantification of the effects of salt stress and physiological state on thermotolerance of *Bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. *Appl Environ Microbiol*, 72, 5884-94.
- DEROSSI, A., FIORE, A. G., DE PILLI, T. & SEVERINI, C. 2011. A Review on Acidifying Treatments for Vegetable Canned Food. *Crc Cr Rev Food Sci*, 51, 955-964.
- DESRIAC, N., BROUSSOLLE, V., POSTOLLEC, F., MATHOT, A. G., SOHIER, D., COROLLER, L. & LEGUERINEL, I. 2013. *Bacillus cereus* cell response upon exposure to acid environment: toward the identification of potential biomarkers. *Front Microbiol*, 4, 00284.
- DING, H., LIU, H., YIN, Y., DING, Y., JIA, Y., CHEN, Q., ZOU, G. & ZHENG, Z. 2012. Insights into the modulation of optimum pH by a single histidine residue in arginine deiminase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biol Chem*, 393, 1013-24.
- DIOMANDÉ, S. E., CHAMOT, S., ANTOLINOS, V., VASAI, F., GUINEBRETIERE, M.-H., BORNARD, I., NGUYEN-THE, C., BROUSSOLLE, V. & BRILLARD, J. 2014. The CasKR Two-Component System Is Required for the Growth of Mesophilic and Psychrotolerant *Bacillus cereus* Strains at Low Temperatures. *Appl Environ Microbiol*, 80, 2493-2503.
- DORENBOS, R., STEIN, T., KABEL, J., BRUAND, C., BOLHUIS, A., BRON, S., QUAX, W. J. & VAN DIJL, J. M. 2002. Thiol-Disulfide Oxidoreductases Are Essential for the Production of the Lantibiotic Sublancin 168. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 16682-16688.

- DOUGAN, D. A., MOGK, A. & BUKAU, B. 2002. Protein folding and degradation in bacteria: ¶To degrade or not to degrade? That is the question. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59, 1607-1616.
- DRASKOVIC, I. & DUBNAU, D. 2005. Biogenesis of a putative channel protein, ComEC, required for DNA uptake: membrane topology, oligomerization and formation of disulphide bonds. *Mol Microbiol*, 55, 881-96.
- DROMIGNY (ed.) 2008. *Bacillus cereus*: Lavoisier.
- DUPORT, C., THOMASSIN, S., BOUREL, G. & SCHMITT, P. 2004. Anaerobiosis and low specific growth rates enhance hemolysin BL production by *Bacillus cereus* F4430/73. *Archives of Microbiology*, 182, 90-95.
- DUPORT, C., ZIGHA, A., ROSENFELD, E. & SCHMITT, P. 2006. Control of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus* F4430/73 Involves the Redox-Sensitive ResDE Signal Transduction System. *J Bacteriol* 188, 6640-6651.
- DUPUY, B., DAUBE, G., POPOFF, M. R. & COLE, S. T. 1997. *Clostridium perfringens* urease genes are plasmid borne. *Infect Immun*, 65, 2313-20.
- EATON, K. A., BROOKS, C. L., MORGAN, D. R. & KRAKOWKA, S. 1991. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *Infect Immun*, 59, 2470-5.
- EDWARDS, C. A., DUERDEN, B. I. & READ, N. W. 1985. Metabolism of mixed human colonic bacteria in a continuous culture mimicking the human cecal contents. *Gastroenterology*, 88, 1903-9.
- EFFANTIN, G., RIVASSEAU, C., GROMOVA, M., BLIGNY, R. & HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT, N. 2011. Massive production of butanediol during plant infection by phytopathogenic bacteria of the genera *Dickeya* and *Pectobacterium*. *Mol Microbiol*, 82, 988-97.
- EICHENBERGER, P. 2010. The red-ox status of a penicillin-binding protein is an on/off switch for spore peptidoglycan synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 75, 10-2.
- ENDO, A., SASAKI, M., MARUYAMA, A. & KURUSU, Y. 2006. Temperature adaptation of *Bacillus subtilis* by chromosomal groEL replacement. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70, 2357-62.
- ERLENDSSON, L. S., ACHESON, R. M., HEDERSTEDT, L. & LE BRUN, N. E. 2003. *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome c synthesis. *J Biol Chem*, 278, 17852-8.
- ERLENDSSON, L. S. & HEDERSTEDT, L. 2002. Mutations in the thiol-disulfide oxidoreductases BdbC and BdbD can suppress cytochrome c deficiency of CcdA-defective *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol*, 184, 1423-9.
- ERLENDSSON, L. S., MOLLER, M. & HEDERSTEDT, L. 2004. *Bacillus subtilis* StoA Is a thiol-disulfide oxidoreductase important for spore cortex synthesis. *J Bacteriol*, 186, 6230-8.
- ESBELIN, J., ARMENGAUD, J., ZIGHA, A. & DUPORT, C. 2009. ResDE-Dependent Regulation of Enterotoxin Gene Expression in *Bacillus cereus*: Evidence for Multiple Modes of Binding for ResD and Interaction with Fnr. *J Bacteriol*, 191, 4419-4426.
- ESBELIN, J., JOUANNEAU, Y., ARMENGAUD, J. & DUPORT, C. 2008. ApoFnr Binds as a Monomer to Promoters Regulating the Expression of Enterotoxin Genes of *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 190, 4242-4251.
- FAGERLUND, A., LINDBACK, 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, 693-704.
- FAHEY, R. C., BROWN, W. C., ADAMS, W. B. & WORSHAM, M. B. 1978. Occurrence of glutathione in bacteria. *J Bacteriol*, 133, 1126-9.
- FAILLE, C., JULLIEN, C., FONTAINE, F., BELLON-FONTAINE, M. N., SLOMIANNY, C. & BENEZECH, T. 2002. Adhesion of *Bacillus* spores and *Escherichia coli* cells to inert surfaces: role of surface hydrophobicity. *Can J Microbiol*, 48, 728-38.
- FERGUSON, S. J. & RICHARDSON 2004. *Respiration in Archaea and Bacteria: Diversity of Prokaryotic Respiratory systems*.

- FERON, G., MAUVAIS, G., LHERMINIER, J., MICHEL, J., WANG, X.-D., VIEL, C. & CACHON, R. 2007. Metabolism of fatty acid in yeast: addition of reducing agents to the reaction medium influences  $\beta$ -oxidation activities,  $\gamma$ -decalactone production, and cell ultrastructure in *Sporidiobolus ruinenii* cultivated on ricinoleic acid methyl ester. *Can J Microbiol* 53, 738-749.
- FERREIRA, A., GRAY, M., WIEDMANN, M. & BOOR, K. J. 2004. Comparative genomic analysis of the sigB operon in *Listeria monocytogenes* and in other Gram-positive bacteria. *Curr Microbiol*, 48, 39-46.
- FOZO, E. M. & QUIVEY, R. G., JR. 2004. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Environ Microbiol*, 70, 929-36.
- FRÄDRICH, C., MARCH, A., FIEGE, K., HARTMANN, A., JAHN, D. & HÄRTIG, E. 2012. The Transcription Factor AlsR Binds and Regulates the Promoter of the alsSD Operon Responsible for Acetoin Formation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 194, 1100-1112.
- FU, J., WANG, Z., CHEN, T., LIU, W., SHI, T., WANG, G., TANG, Y. J. & ZHAO, X. 2014. NADH plays the vital role for chiral pure D-(-)-2,3-butanediol production in *Bacillus subtilis* under limited oxygen conditions. *Biotechnol Bioeng*, 111, 2126-31.
- GARCIA-QUINTANS, N., MAGNI, C., DE MENDOZA, D. & LOPEZ, P. 1998. The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* is induced by acid stress. *Appl Environ Microbiol*, 64, 850-7.
- GIOTIS, E. S., MCDOWELL, D. A., BLAIR, I. S. & WILKINSON, B. J. 2007. Role of branched-chain fatty acids in pH stress tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 73, 997-1001.
- GOOSENS, V. J., MARS, R. A., AKEROYD, M., VENDE, A., DREISBACH, A., DENHAM, E. L., KOUWEN, T. R., VAN RIJ, T., OLSTHOORN, M. & VAN DIJL, J. M. 2013. Is proteomics a reliable tool to probe the oxidative folding of bacterial membrane proteins? *Antioxid Redox Signal*, 18, 1159-64.
- GRANUM, P. E. 1994. *Bacillus cereus* and its toxins. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 23, 61S-66S.
- GRISWOLD, A. R., CHEN, Y. Y. & BURNE, R. A. 2004. Analysis of an agmatine deiminase gene cluster in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol*, 186, 1902-4.
- GUINEBRETIERE, M.-H., THOMPSON, F. L., SOROKIN, A., NORMAND, P., DAWYNDT, P., EHLING-SCHULZ, M., SVENSSON, B., SANCHIS, V., NGUYEN-THE, C., HEYNDRIKX, M. & DE VOS, P. 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environ Microbiol*, 10, 851-865.
- GUINEBRETIERE, M., AUGER, S., GALLERON, N., CONTZEN, M., DE SARRAU, B., DE BUYSER, M., LAMBERET, G., FAGERLUND, A., GRANUM, P. & LERECLUS, D. 2012. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol*.
- GUINEBRETIERE, M. H. & NGUYEN-THE, C. 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol*, 43, 207-15.
- GUINEBRETIERE, M. H., VELGE, P., COUVERT, O., CARLIN, F., DEBUYSER, M. L. & NGUYEN-THE, C. 2010. Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups I to VII) rather than species affiliation. *J Clin Microbiol*, 48, 3388-91.
- HAN, H. & WILSON, A. C. 2013. The two CcdA proteins of *Bacillus anthracis* differentially affect virulence gene expression and sporulation. *J Bacteriol*, 195, 5242-9.
- HAN, S. H., LEE, S. J., MOON, J. H., PARK, K. H., YANG, K. Y., CHO, B. H., KIM, K. Y., KIM, Y. W., LEE, M. C., ANDERSON, A. J. & KIM, Y. C. 2006. GacS-dependent production of 2R, 3R-butanediol by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a major determinant for eliciting systemic resistance against *Erwinia carotovora* but not against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact*, 19, 924-30.
- HANAWA, T., KAI, M., KAMIYA, S. & YAMAMOTO, T. 2000. Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the dnaK heat shock operon of *Listeria monocytogenes*. *Cell Stress Chaperones*, 5, 21-9.

- HANNA, M. N., FERGUSON, R. J., LI, Y. H. & CVITKOVITCH, D. G. 2001. *uvrA* is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol*, 183, 5964-73.
- HANSFORD, J. R., PHILLIPS, M., COLE, C., FRANCIS, J., BLYTH, C. C. & GOTTARDO, N. G. 2014. *Bacillus cereus* bacteremia and multiple brain abscesses during acute lymphoblastic leukemia induction therapy. *J Pediatr Hematol Oncol*, 36.
- HAO, X., TAGHAVI, S., XIE, P., ORBACH, M. J., ALWATHNANI, H. A., RENSING, C. & WEI, G. 2014. Phytoremediation of heavy and transition metals aided by legume-rhizobia symbiosis. *Int J Phytoremediation*, 16, 179-202.
- HARDY, S. P., LUND, T. & GRANUM, P. E. 2001. CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiol Lett*, 197, 47-51.
- HATAHET, F., BOYD, D. & BECKWITH, J. 2014. Disulfide bond formation in prokaryotes: history, diversity and design. *Biochim Biophys Acta*, 8, 25.
- HAUGE 1950. Food Poisoning caused by *Bacillus cereus*. A Preliminary Report. *Nordisk Hygienisk Tidsskrift*, 6, 189-206.
- HELMANN, J. D., WU, M. F., KOBEL, P. A., GAMO, F. J., WILSON, M., MORSHEDI, M. M., NAVRE, M. & PADDON, C. 2001. Global transcriptional response of *Bacillus subtilis* to heat shock. *J Bacteriol*, 183, 7318-28.
- HENGGE-ARONIS, R. 1993. Survival of hunger and stress: The role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell*, 72, 165-168.
- HENGGE, R. 2009. Proteolysis of sigmaS (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 160, 667-76.
- HERAS, B., SHOULDICE, S. R., TOTSIKA, M., SCANLON, M. J., SCHEMBRI, M. A. & MARTIN, J. L. 2009. DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*, 7, 215-25.
- HEUNIS, T., DEANE, S., SMIT, S. & DICKS, L. M. T. 2014. Proteomic Profiling of the Acid Stress Response in *Lactobacillus plantarum* 423. *Journal of Proteome Research*, 13, 4028-4039.
- HEYM, G. A. & JUNI, E. 1956. A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2, 3-butanediol, acetylmethylcarbinol and diacetyl. II. The synthesis of diacetylmethylcarbinol from diacetyl, a new diphosphothiamin catalyzed reaction. *J Bacteriol*, 72, 746-53.
- HICKS, D. B., LIU, J., FUJISAWA, M. & KRULWICH, T. A. 2010. F1F0-ATP synthases of alkaliphilic bacteria: Lessons from their adaptations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797, 1362-1377.
- HOCHGRÄFE, F., WOLF, C., FUCHS, S., LIEBEKE, M., LALK, M., ENGELMANN, S. & HECKER, M. 2008. Nitric Oxide Stress Induces Different Responses but Mediates Comparable Protein Thiol Protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 190, 4997-5008.
- HODSON, C. T. C., LEWIN, A., HEDERSTEDT, L. & LE BRUN, N. E. 2008. The Active-Site Cysteinylys and Hydrophobic Cavity Residues of ResA Are Important for Cytochrome c Maturation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 190, 4697-4705.
- HOLMGREN, A. 1995. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, 3, 239-243.
- HOSAKA, T., UI, S. & MIMURA, A. 1999. Separation and properties of two acetylacetoin reductases from *Bacillus cereus* YUF-4. *Biosci Biotechnol Biochem*, 63, 199-201.
- HOSAKA, T., UI, S., OHTSUKI, T., MIMURA, A., OHKUMA, M. & KUDO, T. 2001. Characterization of the NADH-linked acetylacetoin reductase/2,3-butanediol dehydrogenase gene from *Bacillus cereus* YUF-4. *J Biosci Bioeng*, 91, 539-44.
- IGNATOVA, M., PRÉVOST, H., LEGUERINEL, I. & GUILLOU, S. 2010. Growth and reducing capacity of *Listeria monocytogenes* under different initial redox potential. *J Appl Microbiol*, 108, 256-265.
- INABA, K. 2009. Disulfide bond formation system in *Escherichia coli*. *J Biochem*, 146, 591-7.
- INVS 2012. Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2012. *Portail documentaire INVS*.

- ISOHANNI, P., HUEHN, S., AHO, T., ALTER, T. & LYHS, U. 2013. Heat stress adaptation induces cross-protection against lethal acid stress conditions in *Arcobacter butzleri* but not in *Campylobacter jejuni*. *Food Microbiol* 34, 431-435.
- ITO, K. & INABA, K. 2008. The disulfide bond formation (Dsb) system. *Curr Opin Struct Biol*, 18, 450-8.
- IVANOVA, N., SOROKIN, A., ANDERSON, I., GALLERON, N., CANDELON, B., KAPATRAL, V., BHATTACHARYYA, A., REZNIK, G., MIKHAILOVA, N., LAPIDUS, A., CHU, L., MAZUR, M., GOLTSMAN, E., LARSEN, N., D'SOUZA, M., WALUNAS, T., GRECHKIN, Y., PUSCH, G., HASELKORN, R., FONSTEIN, M., DUSKO EHRlich, S., OVERBEEK, R. & KYRPIDES, N. 2003. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature*, 423, 87-91.
- IWAMI, Y., ABBE, K., TAKAHASHI-ABBE, S. & YAMADA, T. 1992. Acid production by streptococci growing at low pH in a chemostat under anaerobic conditions. *Oral Microbiol Immunol*, 7, 304-8.
- JACOB, H. E. 1970. *Methods in Microbiology, chapter IV Redox Potential*, New York, NY., Academic Press.
- JENKINS, D. E., SCHULTZ, J. E. & MATIN, A. 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 170, 3910-3914.
- JENSEN, G. B., HANSEN, B. M., EILENBERG, J. & MAHILLON, J. 2003. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, 5, 631-640.
- JI, X.-J., HUANG, H. & OUYANG, P.-K. 2011. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, 29, 351-364.
- JIN, J., ZHANG, B., GUO, H., CUI, J., JIANG, L., SONG, S., SUN, M. & REN, F. 2012. Mechanism analysis of acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BBMN 68 by gene expression profile using RNA-sequencing. *PLoS ONE*, 7, 7.
- 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. *Int J Food Microbiol*, 79, 65-73.
- JONES, D. S., PODOLSKY, S. H. & GREENE, J. A. 2012. The Burden of Disease and the Changing Task of Medicine. *New England Journal of Medicine*, 366, 2333-2338.
- JUNI, E. & HEYM, G. A. 1956. A cyclic pathway for the bacterial dissimilation of 2, 3-butanediol, acetylmethylcarbinol, and diacetyl. I. General aspects of the 2, 3-butanediol cycle. *J Bacteriol*, 71, 425-32.
- KAREM, K. L., FOSTER, J. W. & BEJ, A. K. 1994. Adaptive acid tolerance response (ATR) in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiology*, 140, 1731-1736.
- KASHKET, E. R. 1981. Proton motive force in growing *Streptococcus lactis* and *Staphylococcus aureus* cells under aerobic and anaerobic conditions. *J Bacteriol*, 146, 369-76.
- KASHKET, E. R. 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters*, 46, 233-244.
- KAYSER, M. F., UCURUM, Z. & VUILLEUMIER, S. 2002. Dichloromethane metabolism and C1 utilization genes in *Methylobacterium* strains. *Microbiology*, 148, 1915-22.
- KAZMIERCZAK, M., MITHOE, S., BOOR, K. & WIEDMANN, M. 2003. *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J Bacteriol*, 185, 5722 - 5734.
- KEIJSER, B. J., TER BEEK, A., RAUWERDA, H., SCHUREN, F., MONTIJN, R., VAN DER SPEK, H. & BRUL, S. 2007. Analysis of temporal gene expression during *Bacillus subtilis* spore germination and outgrowth. *J Bacteriol*, 189, 3624-34.
- KIEBOOM, J. & ABEE, T. 2006. Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, 188, 5650-3.
- KIM, B., BANG, J., KIM, H., KIM, Y., KIM, B. S., BEUCHAT, L. R. & RYU, J. H. 2014. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in Korean rice: Prevalence and toxin production as affected by production area and degree of milling. *Food Microbiol*, 42, 89-94.
- KIM, J.-B., KIM, J.-M., CHO, S.-H., OH, H.-S., CHOI, N. J. & OH, D.-H. 2011. Toxin Genes Profiles and Toxin Production Ability of *Bacillus cereus* Isolated from Clinical and Food Samples. *J. Food Sci.*, 76, T25-T29.

- KIM, J. H., YANG, Y. K. & CHAMBLISS, G. H. 2005. Evidence that *Bacillus* catabolite control protein CcpA interacts with RNA polymerase to inhibit transcription. *Mol Microbiol*, 56, 155-62.
- KIRAKOSYAN, G., BAGRAMYAN, K. & TRCHOUNIAN, A. 2004. Redox sensing by *Escherichia coli*: effects of dithiothreitol, a redox reagent reducing disulphides, on bacterial growth. *Biochem Biophys Res Commun.*, 325, 803-806.
- KIRSTEIN, J., MOLIERE, N., DOUGAN, D. A. & TURGAY, K. 2009. Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nat Rev Micro*, 7, 589-599.
- KOMINEK, L. A. & HALVORSON, H. O. 1965. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate and acetoin in *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, 90, 1251-9.
- KOMITOPOULOU, E., BAINTON, N. J. & ADAMS, M. R. 2004. Oxidation–reduction potential regulates RpoS levels in *Salmonella Typhimurium*. *J Appl Microbiol*, 96, 271-278.
- KONIECZNA, I., ZARNOWIEC, P., KWINKOWSKI, M., KOLESINSKA, B., FRACZYK, J., KAMINSKI, Z. & KACA, W. 2012. Bacterial urease and its role in long-lasting human diseases. *Curr Protein Pept Sci*, 13, 789-806.
- KOUAMÉ, A. K., DJÉNI, T. N., N'GUESSAN, F. K. & DJE, M. K. 2013. Postprocessing microflora of commercial attiéke (a fermented cassava product) produced in the south of Côte d'Ivoire. *Lett Appl Microbiol*, 56, 44-50.
- KOUWEN, T. R. & VAN DIJL, J. M. 2009. Applications of thiol-disulfide oxidoreductases for optimized in vivo production of functionally active proteins in *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 45-52.
- KOUWEN, T. R. H. M., 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, 984-999.
- KRAMER, G., BOEHRINGER, D., BAN, N. & BUKAU, B. 2009. The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 589-597.
- KRAMER, J. M. & GILBERT, R. J. 1989. *Bacillus cereus and other Bacillus species*, New York, NY., Marcel Dekker.
- KRAUSE, G., LUNDSTROM, J., BAREA, J. L., PUEYO DE LA CUESTA, C. & HOLMGREN, A. 1991. Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin. *J Biol Chem*, 266, 9494-500.
- KRULWICH, T. A., GUFFANTI, A. A. & ITO, M. 1999. pH tolerance in *Bacillus*: alkaliphiles versus non-alkaliphiles. *Novartis Found Symp*, 221, 167-79.
- KUWANA, R. & TAKAMATSU, H. 2013. The GerW protein is essential for L-alanine-stimulated germination of *Bacillus subtilis* spores. *J Biochem*, 154, 409-17.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAGE, C., DE PADULA, M., DE ALENCAR, T. A., DA FONSECA GONCALVES, S. R., DA SILVA VIDAL, L., CABRAL-NETO, J. & LEITAO, A. C. 2003. New insights on how nucleotide excision repair could remove DNA adducts induced by chemotherapeutic agents and psoralens plus UV-A (PUVA) in *Escherichia coli* cells. *Mutat Res*, 544, 143-57.
- LANDETE, J. M., ARENA, M. E., PARDO, I., MANCA DE NADRA, M. C. & FERRER, S. 2008. Comparative survey of putrescine production from agmatine deamination in different bacteria. *Food Microbiol*, 25, 882-7.
- LANDETE, J. M., ARENA, M. E., PARDO, I., MANCA DE NADRA, M. C. & FERRER, S. 2010. The role of two families of bacterial enzymes in putrescine synthesis from agmatine via agmatine deiminase. *Int Microbiol*, 13, 169-77.
- LE LAY, J., BAHLOUL, H., SÉRINO, S., JOBIN, M. & SCHMITT, P. Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels. *Food Microbiology*.
- LEDON H, I. D. 2006. Method for modifying hygienic, physico-chemical and sensory properties of cheese by controlling the redox potential. *France Patent WO2006106252*.

- LEE, S., KIM, S. M. & LEE, R. T. 2013. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal*, 18, 1165-207.
- LEISTNER, L. & MIRNA, A. 1959. Das redoxpotential von Pökellaken. *Die Fleischwirtschaft* 8,, 659-666.
- LEQUETTE, Y., GARENAUX, E., COMBROUSE, T., DIAS TDEL, L., RONSE, A., SLOMIANNY, C., TRIVELLI, X., GUERARDEL, Y. & FAILLE, C. 2011. Domains of BclA, the major surface glycoprotein of the *B. cereus* exosporium: glycosylation patterns and role in spore surface properties. *Biofouling*, 27, 751-61.
- LEWIN, A., CROW, A., HODSON, C. T. C., HEDERSTEDT, L. & LE BRUN, N. E. 2008. Effects of substitutions in the CXXC active-site motif of the extracytoplasmic thioredoxin ResA. *Biochem J*, 414, 81-91.
- LEYER, G. J. & JOHNSON, E. A. 1993. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 1842-1847.
- LIU, Y., ZENG, L. & BURNE, R. A. 2009. AguR is required for induction of the *Streptococcus mutans* agmatine deiminase system by low pH and agmatine. *Appl Environ Microbiol*, 75, 2629-37.
- LOFERER, H., WUNDERLICH, M., HENNECKE, H. & GLOCKSHUBER, R. 1995. A bacterial thioredoxin-like protein that is exposed to the periplasm has redox properties comparable with those of cytoplasmic thioredoxins. *J Biol Chem*, 270, 26178-83.
- LOPES, D., NUNES, C., MARTINS, M. C. L., SARMENTO, B. & REIS, S. 2014. Eradication of *Helicobacter pylori*: Past, present and future. *Journal of Controlled Release*, 189, 169-186.
- LU, C. D. 2006. Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70, 261-72.
- LUES, J. F., THERON, M. M., VENTER, P. & RASEPHEI, M. H. 2007. Microbial composition in bioaerosols of a high-throughput chicken-slaughtering facility. *Poult Sci*, 86, 142-9.
- LUND, T., DE BUYSER, M.-L. & GRANUM, P. E. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* 38, 254-261.
- LUNDSTROM, J. & HOLMGREN, A. 1993. Determination of the reduction-oxidation potential of the thioredoxin-like domains of protein disulfide-isomerase from the equilibrium with glutathione and thioredoxin. *Biochemistry*, 32, 6649-55.
- MAGEE, R. J. & KOSARIC, N. 1987. The Microbial Production of 2,3-Butanediol. In: ALLEN, I. L. (ed.) *Advances in Applied Microbiology*. Academic Press.
- MAHLER, H., PASI, A., KRAMER, J. M., SCHULTE, P., SCOGING, A. C., BAR, W. & KRAHENBUHL, S. 1997. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *N Engl J Med*, 336, 1142-8.
- MANGUIAT, L. S. & FANG, T. J. 2013. Microbiological quality of chicken- and pork-based street-vended foods from Taichung, Taiwan, and Laguna, Philippines. *Food Microbiol*, 36, 57-62.
- MARGULIS, L., JORGENSEN, J. Z., DOLAN, S., KOLCHINSKY, R., RAINEY, F. A. & LO, S. C. 1998. The Arthromitus stage of *Bacillus cereus*: intestinal symbionts of animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 1236-41.
- MARTENSSON, J., JAIN, A. & MEISTER, A. 1990. Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 1715-9.
- MARTIN, J. L. 1995. Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure*, 3, 245-50.
- MATZ, L. L., BEAMAN, T. C. & GERHARDT, P. 1970. Chemical composition of exosporium from spores of *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, 101, 196-201.
- MAYER, D., SCHLENSOG, V. & BOCK, A. 1995. Identification of the transcriptional activator controlling the butanediol fermentation pathway in *Klebsiella terrigena*. *J Bacteriol*, 177, 5261-9.
- MCKENNEY, P. T., DRIKS, A. & EICHENBERGER, P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nat Rev Microbiol*, 11, 33-44.
- MCKILLIP, J. L. 2000. Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 77, 393-9.
- MEIMA, R., ESCHEVINS, C., FILLINGER, S., BOLHUIS, A., HAMOEN, L. W., DORENBOS, R., QUAX, W. J., VAN DIJL, J. M., PROVVEDI, R., CHEN, I., DUBNAU, D. & BRON, S. 2002. The *bdbDC* operon of

- Bacillus subtilis* encodes thiol-disulfide oxidoreductases required for competence development. *J Biol Chem*, 277, 6994-7001.
- MENDELSON, I., TOBERY, S., SCORPIO, A., BOZUE, J., SHAFFERMAN, A. & FRIEDLANDER, A. M. 2004. The NheA component of the non-hemolytic enterotoxin of *Bacillus cereus* is produced by *Bacillus anthracis* but is not required for virulence. *Microb Pathogenesis* 37, 149-154.
- MERRITT, M. E. & DONALDSON, J. R. 2009. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *J Med Microbiol*, 58, 1533-41.
- 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, 30-39.
- MESSENS, J., COLLET, J.-F., VAN BELLE, K., BROSENS, E., LORIS, R. & WYNS, L. 2007. The Oxidase DsbA Folds a Protein with a Nonconsecutive Disulfide. *J Biol Chem*, 282, 31302-31307.
- 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, 2282-2290.
- MITCHELL, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191, 144-8.
- MNATSAKANYAN, N., BAGRAMYAN, K., VASSILIAN, A., NAKAMOTO, R. K. & TRCHOUNIAN, A. 2002. FO cysteine, bCys21, in the *Escherichia coli* ATP synthase is involved in regulation of potassium uptake and molecular hydrogen production in anaerobic conditions. *Biosci Rep*, 22, 421-30.
- MOLIÈRE, N. & TURGAY, K. 2009. Chaperone-protease systems in regulation and protein quality control in *Bacillus subtilis*. *Research in Microbiology*, 160, 637-644.
- MOLS, M. & ABEE, T. 2008. Role of Ureolytic Activity in *Bacillus cereus* Nitrogen Metabolism and Acid Survival. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2370-2378.
- MOLS, M. & ABEE, T. 2011a. *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environmental Microbiology*, 13, 2835-2843.
- MOLS, M. & ABEE, T. 2011b. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental Microbiology*, 13, 1387-1394.
- MOLS, M., VAN KRANENBURG, R., TEMPELAARS, M. H., VAN SCHAİK, W., MOEZELAAR, R. & ABEE, T. 2010a. Comparative analysis of transcriptional and physiological responses of *Bacillus cereus* to organic and inorganic acid shocks. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 13-21.
- MOLS, M., VAN KRANENBURG, R., VAN MELIS, C. C. J., MOEZELAAR, R. & ABEE, T. 2010b. Analysis of acid-stressed *Bacillus cereus* reveals a major oxidative response and inactivation-associated radical formation. *Environ Microbiol*, 12, 873-885.
- MOONS, P., VAN HOUDT, R., VIVIJS, B., MICHIELS, C. M. & AERTSEN, A. 2011. Integrated Regulation of Acetoin Fermentation by Quorum Sensing and pH in *Serratia plymuthica* RVH1. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 3422-3427.
- MORIARTY-CRAIG, S. E. & JONES, D. P. 2004. Extracellular thiols and thiol/disulfide redox in metabolism. *Annu Rev Nutr*, 24, 481-509.
- MORTIMER, P. R. & MCCANN, G. 1974. Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet*, 1, 1043-5.
- MURCHAN, S., AUCKEN, H. M., O'NEILL G, L., GANNER, M. & COOKSON, B. D. 2004. Emergence, spread, and characterization of phage variants of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 16 in England and Wales. *J Clin Microbiol*, 42, 5154-60.
- NAKANISHI-MATSUI, M., SEKIYA, M., NAKAMOTO, R. K. & FUTAI, M. 2010. The mechanism of rotating proton pumping ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1797, 1343-1352.
- NAKASHIMADA, Y., MARWOTO, B., KASHIWAMURA, T., KAKIZONO, T. & NISHIO, N. 2000. Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 661-664.
- NASCIMENTO, M. M., LEMOS, J. A. C., ABRANCHES, J., GONÇALVES, R. B. & BURNE, R. A. 2004. Adaptive Acid Tolerance Response of *Streptococcus sobrinus*. *J Bacteriol* 186, 6383-6390.



- NEUMANN, G. & MARTINOIA, E. 2002. Cluster roots--an underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends Plant Sci*, 7, 162-7.
- NGUYEN THI MINH, H., GUYOT, S., PERRIER-CORNET, J. M. & GERVAIS, P. 2008. Effect of the osmotic conditions during sporulation on the subsequent resistance of bacterial spores. *Appl Microbiol Biotechnol*, 80, 107-14.
- O'SULLIVAN, E. & CONDON, S. 1999. Relationship between acid tolerance, cytoplasmic pH, and ATP and H<sup>+</sup>-ATPase levels in chemostat cultures of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol*, 65, 2287-93.
- OBLINGER, J. L. & KRAFT, A. A. 1973. Oxidation-reduction potential and growth of *Salmonella* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Food Sci*, 38, 1108-1112.
- OLIVEIRA, A. P., NIELSEN, J. & FORSTER, J. 2005. Modeling *Lactococcus lactis* using a genome-scale flux model. *BMC Microbiol*, 5, 39.
- OLSEN, E. B., RUSSELL, J. B. & HENICK-KLING, T. 1991. Electrogenic L-malate transport by *Lactobacillus plantarum*: a basis for energy derivation from malolactic fermentation. *J Bacteriol*, 173, 6199-206.
- ORTH, D., GRIF, K., DIERICH, M. P. & WURZNER, R. 2006. Prevalence, structure and expression of urease genes in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from humans and the environment. *Int J Hyg Environ Health*, 209, 513-20.
- PANDEY, N. K. & ARONSON, A. I. 1979. Properties of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol*, 137, 1208-18.
- PANE-FARRE, J., JONAS, B., FORSTNER, K., ENGELMANN, S. & HECKER, M. 2006. The sigmaB regulon in *Staphylococcus aureus* and its regulation. *Int J Med Microbiol*, 296, 237-58.
- PAPADIMITRIOU, K., PRATSINIS, H., NEBE-VON-CARON, G., KLETSAS, D. & TSAKALIDOU, E. 2007. Acid tolerance of *Streptococcus macedonicus* as assessed by flow cytometry and single-cell sorting. *Appl Environ Microbiol*, 73, 465-76.
- PARK, Y. K., BEARSON, B., BANG, S. H., BANG, I. S. & FOSTER, J. W. 1996. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol*, 20, 605-11.
- PATEL, S. K., SINGH, M. & KALIA, V. C. 2011. Hydrogen and Polyhydroxybutyrate Producing Abilities of *Bacillus spp.* From Glucose in Two Stage System. *Indian J Microbiol*, 51, 418-23.
- PEARSON, C. B. A. W., H.W. 1976. Effect of oxidation reduction potential upon growth and sporulation of *Clostridium*. *J. Food Prot.*, 39, 421-425.
- PETERSON, S. B., DUNN, A. K., KLIMOWICZ, A. K. & HANDELSMAN, J. 2006. Peptidoglycan from *Bacillus cereus* mediates commensalism with rhizosphere bacteria from the *Cytophaga-Flavobacterium* group. *Appl Environ Microbiol*, 72, 5421-7.
- PFLOCK, M., KENNARD, S., FINSTERER, N. & BEIER, D. 2006. Acid-responsive gene regulation in the human pathogen *Helicobacter pylori*. *J Biotechnol*, 126, 52-60.
- PHAM, T. H., MAUVAIS, G., VERGOIGNAN, C., DE CONINCK, J., DUMONT, F., LHERMINIER, J., CACHON, R. & FERON, G. 2008. Gaseous environments modify physiology in the brewing yeast *Saccharomyces cerevisiae* during batch alcoholic fermentation. *J Appl Microbiol*, 105, 858-874.
- PICKART, C. M. & COHEN, R. E. 2004. Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 177-187.
- PITTMAN, J. R., BUNTYN, J. O., POSADAS, G., NANDURI, B., PENDARVIS, K. & DONALDSON, J. R. 2014. Proteomic Analysis of Cross Protection Provided between Cold and Osmotic Stress in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Proteome Research*, 13, 1896-1904.
- POOLMAN, B., MOLENAAR, D., SMID, E. J., UBBINK, T., ABEE, T., RENAULT, P. P. & KONINGS, W. N. 1991. Malolactic fermentation: electrogenic malate uptake and malate/lactate antiport generate metabolic energy. *J Bacteriol*, 173, 6030-7.
- PRESCOTT, HARLEY & KLEIN 2007. *Microbiologie*.
- PRIEST, F. G., BARKER, M., BAILLIE, L. W., HOLMES, E. C. & MAIDEN, M. C. 2004. Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J Bacteriol*, 186, 7959-70.

- QUIVEY, R. G., KUHNERT, W. L. & HAHN, K. 2001. Genetics of acid adaptation in oral *streptococci*. *Crit Rev Oral Biol Med*, 12, 301-14.
- RAHIMI, E., ABDOS, F., MOMTAZ, H., BAGHBADORANI, Z. T. & JALALI, M. 2013. *Bacillus cereus* in infant foods: prevalence study and distribution of enterotoxigenic virulence factors in Isfahan Province, Iran. *ScientificWorldJournal* [Online], 27.
- RAJKOVIC, A., KLJAJIC, M., SMIGIC, N., DEVLIEGHERE, F. & UYTENDAELE, M. 2013. Toxin producing *Bacillus cereus* persist in ready-to-reheat spaghetti Bolognese mainly in vegetative state. *Int. J. Food Microbiol*, 167, 236-43.
- RASKO, D. A., RAVEL, J., OKSTAD, O. A., HELGASON, E., CER, R. Z., JIANG, L., SHORES, K. A., FOUTS, D. E., TOURASSE, N. J., ANGIUOLI, S. V., KOLONAY, J., NELSON, W. C., KOLSTO, A. B., FRASER, C. M. & READ, T. D. 2004. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1. *Nucleic Acids Res*, 32, 977-88.
- RICHARD, H. T. & FOSTER, J. W. 2003. Acid resistance in *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol*, 52, 167-86.
- RIMAUX, T., RIVIERE, A., ILLEGHEMS, K., WECKX, S., DE VUYST, L. & LEROY, F. 2012. Expression of the arginine deiminase pathway genes in *Lactobacillus sakei* is strain dependent and is affected by the environmental pH. *Appl Environ Microbiol*, 78, 4874-83.
- RIONDET, C., CACHON, R., WACHÉ, Y., ALCARAZ, G. & DIVIÈS, C. 1999. Changes in the proton-motive force in *Escherichia coli* in response to external oxidoreduction potential. *Eur. J. Biochem*, 262, 595-599.
- RITZ, D. & BECKWITH, J. 2001. Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 55, 21-48.
- RODEL, W. & LUCKE, F. K. 1990. Effect of redox potential on *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in broth and in pasteurized sausage mixtures. *Int J Food Microbiol*, 10, 291-301.
- ROSENBAUM, A., PAPALIODIS, D., ALLEY, M., LISELLA, J. & FLAHERTY, M. 2013. *Bacillus cereus* fasciitis: a unique pathogen and clinically challenging sequela of inoculation. *Am J Orthop*, 42, 37-9.
- 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, 149-158.
- ROUSK, J., BROOKES, P. C. & BAATH, E. 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Appl Environ Microbiol*, 75, 1589-96.
- RUSSELL, J. B. 1991. Resistance of *Streptococcus bovis* to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. *Appl Environ Microbiol*, 57, 255-9.
- RYAN, S., BEGLEY, M., GAHAN, C. G. & HILL, C. 2009. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environ Microbiol*, 11, 432-45.
- RYSER, H. J., LEVY, E. M., MANDEL, R. & DISCIULLO, G. J. 1994. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 4559-63.
- RYU, C. M., FARAG, M. A., HU, C. H., REDDY, M. S., KLOPPER, J. W. & PARE, P. W. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 134, 1017-26.
- RYU, J.-H. & BEUCHAT, L. R. 1998. Influence of acid tolerance responses on survival, growth, and thermal cross-protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 45, 185-193.
- SAGONG, H. G., CHEON, H. L., KIM, S. O., LEE, S. Y., PARK, K. H., CHUNG, M. S., CHOI, Y. J. & KANG, D. H. 2013. Combined effects of ultrasound and surfactants to reduce *Bacillus cereus* spores on lettuce and carrots. *Int J Food Microbiol*, 160, 367-72.
- SCHALLMEY, M., SINGH, A. & WARD, O. P. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol*, 50, 1-17.

- SCHERRER, P. S. & SOMERVILLE, H. J. 1977. Membrane fractions from the outer layers of spores of *Bacillus thuringiensis* with toxicity to lepidopterous larvae. *Eur J Biochem*, 72, 479-90.
- SCHIOTT, T. & HEDERSTEDT, L. 2000. Efficient spore synthesis in *Bacillus subtilis* depends on the CcdA protein. *J Bacteriol*, 182, 2845-54.
- SCHIOTT, T., VON WACHENFELDT, C. & HEDERSTEDT, L. 1997. Identification and characterization of the ccdA gene, required for cytochrome c synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 179, 1962-73.
- SCOTT, E. & DYER, D. 2012. Divergence of the SigB regulon and pathogenesis of the *Bacillus cereus* sensu lato group. *BMC Genomics*, 13, 564.
- SENOUCI-REZKALLAH, K., SCHMITT, P. & JOBIN, M. P. 2011. Amino acids improve acid tolerance and internal pH maintenance in *Bacillus cereus* ATCC14579 strain. *Food Microbiol*, 28, 364-372.
- SETLOW, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J Appl Microbiol*, 101, 514-25.
- SHABALA, L., BUDDE, B., ROSS, T., SIEGUMFELDT, H., JAKOBSEN, M. & MCMEEKIN, T. 2002. Responses of *Listeria monocytogenes* to acid stress and glucose availability revealed by a novel combination of fluorescence microscopy and microelectrode ion-selective techniques. *Appl Environ Microbiol*, 68, 1794-802.
- SHECHTER, E. 1999. *Biochimie et biophysique des membrane : Aspects structuraux et fonctionnels*.
- SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J. V. & MANN, M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*, 1, 2856-60.
- SHINAGAWA, K., UENO, Y., HU, D., UEDA, S. & SUGII, S. 1996. Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *J Vet Med Sci*, 58, 1027-9.
- SHU, J. C., SOO, P. C., CHEN, J. C., HSU, S. H., CHEN, L. C., CHEN, C. Y., LIANG, S. H., BUU, L. M. & CHEN, C. C. 2013. Differential regulation and activity against oxidative stress of Dps proteins in *Bacillus cereus*. *Int J Med Microbiol*, 303, 662-73.
- SIEGUMFELDT, H., BJORN RECHINGER, K. & JAKOBSEN, M. 2000. Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2330-5.
- SILO-SUH, L. A., LETHBRIDGE, B. J., RAFFEL, S. J., HE, H., CLARDY, J. & HANDELSMAN, J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol*, 60, 2023-30.
- SIMON, J., GROSS, R., EINSLE, O., KRONECK, P. M., KROGER, A. & KLIMMEK, O. 2000. A NapC/NirT-type cytochrome c (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome c nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*. *Mol Microbiol*, 35, 686-96.
- SINGLETON., P. & SAINSBURY., D. 2001. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd Edition*, West Sussex (UK).
- SMALL, P. L. C. & WATERMAN, S. R. 1998. Acid stress, anaerobiosis and gadCB: lessons from *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli*. *Trends in Microbiology*, 6, 214-216.
- SMITH, D. P., BERRANG, M. E., FELDNER, P. W., PHILLIPS, R. W. & MEINERSMANN, R. J. 2004. Detection of *Bacillus cereus* on selected retail chicken products. *J Food Prot*, 67, 1770-3.
- SMITH, J. L. 2004. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 30, 173-85.
- SMITH, J. L., LIU, Y. & PAOLI, G. C. 2013. How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? *Can J Microbiol*, 59, 141-52.
- SMOOT, L. A. & PIERSON, M. D. 1979. Effect of oxidation-reduction potential on the outgrowth and chemical inhibition of *Clostridium botulinum* 10755A spores. *J. Food Sci.*, 44, 700-704.
- SONE, M., AKIYAMA, Y. & ITO, K. 1997a. Differential in vivo roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem*, 272, 10349-52.
- SONE, M., KISHIGAMI, S., YOSHIHISA, T. & ITO, K. 1997b. Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. *J Biol Chem*, 272, 6174-8.

- SPIRA, W. M. & GOEPFERT, J. M. 1975. Biological characteristics of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Can J Microbiol*, 21, 1236-46.
- SRIDHAR, J. & EITEMAN, M. A. 2001. Metabolic flux analysis of *Clostridium thermosuccinogenes*: effects of pH and culture redox potential. *Appl Biochem Biotechnol*, 94, 51-69.
- STENFORS ARNESEN, L., FAGERLUND, A. & GRANUM, P. 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev*, 32, 579 - 606.
- STEVENS, M. P., ELAM, K. & BEARMAN, G. 2012. Meningitis due to *Bacillus cereus*: A case report and review of the literature. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 23, e16-9.
- STRECKER, H. J. & HARARY, I. 1954. Bacterial butylene glycol dehydrogenase and diacetyl reductase. *J Biol Chem*, 211, 263-70.
- SUAREZ, C., ESPARIZ, M., BLANCATO, V. S. & MAGNI, C. 2013. Expression of the agmatine deiminase pathway in *Enterococcus faecalis* is activated by the AguR regulator and repressed by CcpA and PTS(Man) systems. *PLoS ONE*, 8.
- SUN, G., SHARKOVA, E., CHESNUT, R., BIRKEY, S., DUGGAN, M. F., SOROKIN, A., PUJIC, P., EHRlich, S. D. & HULETT, F. M. 1996. Regulators of aerobic and anaerobic respiration in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 178, 1374-85.
- TAKENO, A., OKAMOTO, A., TORI, K., OSHIMA, K., HIRAKAWA, H., TOH, H., AGATA, N., YAMADA, K., OGASAWARA, N., HAYASHI, T., SHIMIZU, T., KUHARA, S., HATTORI, M. & OHTA, M. 2012. Complete Genome Sequence of *Bacillus cereus* NC7401, Which Produces High Levels of the Emetic Toxin Cereulide. *J Bacteriol*, 194, 4767-4768.
- TAM, N. K., UYEN, N. Q., HONG, H. A., DUC LE, H., HOA, T. T., SERRA, C. R., HENRIQUES, A. O. & CUTTING, S. M. 2006. The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J Bacteriol*, 188, 2692-700.
- TANAKA, Y., KIMURA, B., TAKAHASHI, H., WATANABE, T., OBATA, H., KAI, A., MOROZUMI, S. & FUJII, T. 2008. Lysine decarboxylase of *Vibrio parahaemolyticus*: kinetics of transcription and role in acid resistance. *J Appl Microbiol*, 104, 1283-93.
- TANGO, M. S. A. & GHALY, A. E. 1999. Amelioration of lactic acid production from cheese whey using micro-aeration. *Biomass and Bioenergy*, 17, 221-238.
- TATARA, R., NAGAI, T., SUZUKI, M., OH, I., FUJIWARA, S., NORIZUKI, M., MUROI, K. & OZAWA, K. 2013. Sepsis and meningoencephalitis caused by *Bacillus cereus* in a patient with myelodysplastic syndrome. *Intern Med*, 52, 1987-90.
- THOMASSIN, S., JOBIN, M. & SCHMITT, P. 2006. The acid tolerance response of *Bacillus cereus* ATCC14579 is dependent on culture pH, growth rate and intracellular pH. *Arch. Microbiol.*, 186, 229-239.
- THOMPSON, S. A. & BLASER, M. J. 1995. Isolation of the *Helicobacter pylori* recA gene and involvement of the recA region in resistance to low pH. *Infect Immun*, 63, 2185-93.
- TO, T. M., GRANDVALET, C. & TOURDOT-MARECHAL, R. 2011. Cyclopropanation of membrane unsaturated fatty acids is not essential to the acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. cremoris. *Appl Environ Microbiol*, 77, 3327-34.
- TOPCU, A., MCKINNON, I. & MCSWEENEY, P. L. 2008. Measurement of the oxidation-reduction potential of cheddar cheese. *J Food Sci*, 73, 1750-3841.
- TSAU, J. L., GUFFANTI, A. A. & MONTVILLE, T. J. 1992. Conversion of Pyruvate to Acetoin Helps To Maintain pH Homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol*, 58, 891-4.
- TSVETANOVA, B., WILSON, A. C., BONGIORNI, C., CHIANG, C., HOCH, J. A. & PEREGO, M. 2007. Opposing effects of histidine phosphorylation regulate the AtxA virulence transcription factor in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol*, 63, 644-55.
- TURABELIDZE, G., GEE, J. E., HOFFMASTER, A. R., MANIAN, F., BUTLER, C., BYRD, D., SCHILDKNECHT, S., HAUSER, L. C., DUNCAN, M., FERRETT, R., EVANS, D. & TALLEY, C. 2013. Contaminated ventilator air flow sensor linked to *Bacillus cereus* colonization of newborns. *Emerg Infect Dis*, 19, 781-3.

- VALERO, M., HERNÁNDEZ-HERRERO, L. A., FERNÁNDEZ, P. S. & SALMERÓN, M. C. 2002. Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiology*, 19, 491-499.
- VAN DE GUCHTE, M., SERROR, P., CHERVAUX, C., SMOKVINA, T., EHRLICH, S. D. & MAGUIN, E. 2002. Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 187-216.
- VAN DER VOORT, M., GARCIA, D., MOEZELAAR, R. & ABEE, T. 2010. Germinant receptor diversity and germination responses of four strains of the *Bacillus cereus* group. *Int J Food Microbiol*, 139, 108-15.
- VAN GEEST, M. & LOLKEMA, J. S. 1996. Membrane topology of the sodium ion-dependent citrate carrier of *Klebsiella pneumoniae*. Evidence for a new structural class of secondary transporters. *J Biol Chem*, 271, 25582-9.
- VAN HOUDT, R., AERTSEN, A. & MICHIELS, C. W. 2007. Quorum-sensing-dependent switch to butanediol fermentation prevents lethal medium acidification in *Aeromonas hydrophila* AH-1N. *Research in Microbiology*, 158, 379-385.
- VAN SCHAIK, W., TEMPELAARS, M. H., ZWIETERING, M. H., DE VOS, W. M. & ABEE, T. 2005. Analysis of the role of RsbV, RsbW, and RsbY in regulating  $\{\sigma\}$ B activity in *Bacillus cereus*. *J Bacteriol*, 187, 5846-51.
- VAN SCHAIK, W., VAN DER VOORT, M., MOLENAAR, D., MOEZELAAR, R., DE VOS, W. M. & ABEE, T. 2007. Identification of the sigmaB regulon of *Bacillus cereus* and conservation of sigmaB-regulated genes in low-GC-content gram-positive bacteria. *J Bacteriol*, 189, 4384-90.
- VAN SCHAIK, W., ZWIETERING, M., DE VOS, W. & ABEE, T. 2004. Identification of sigmaB-dependent genes in *Bacillus cereus* by proteome and in vitro transcription analysis. *J Bacteriol*, 186, 4100 - 4109.
- VANYSEK 1994. *Handbook of chemistry and physics*, London.
- VIDO, K., DIEMER, H., VAN DORSSELAER, A., LEIZE, E., JUILLARD, V., GRUSS, A. & GAUDU, P. 2005. Roles of thioredoxin reductase during the aerobic life of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 187, 601-10.
- VILAS-BOAS, G., SANCHIS, V., LERECLUS, D., LEMOS, M. V. & BOURGUET, D. 2002. Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 68, 1414-24.
- VIVIJS, B., MOONS, P., GEERAERD, A. H., AERTSEN, A. & MICHIELS, C. W. 2014. 2,3-Butanediol fermentation promotes growth of *Serratia plymuthica* at low pH but not survival of extreme acid challenge. *Int J Food Microbiol*, 175, 36-44.
- WACHÉ, Y., RIONDET, C., DIVIÈS, C. & CACHON, R. 2002. Effect of reducing agents on the acidification capacity and the proton motive force of *Lactococcus lactis* ssp. cremoris resting cells. *Bioelectrochemistry*, 57, 113-118.
- WANG, Y., LI, L., MA, C., GAO, C., TAO, F. & XU, P. 2013. Engineering of cofactor regeneration enhances (2S,3S)-2,3-butanediol production from diacetyl. *Sci Rep*, 3.
- WEIBEZAHN, J., SCHLIEKER, C., TESSARZ, P., MOGK, A. & BUKAU, B. 2005. Novel insights into the mechanism of chaperone-assisted protein disaggregation. *Biol Chem*, 386, 739-44.
- WEVERS, E., MOONS, P., VAN HOUDT, R., LURQUIN, I., AERTSEN, A. & MICHIELS, C. W. 2009. Quorum sensing and butanediol fermentation affect colonization and spoilage of carrot slices by *Serratia plymuthica*. *Int J Food Microbiol*, 134, 63-9.
- WILLIAMS, S. E. & TURNBERG, L. A. 1981. Demonstration of a pH gradient across mucus adherent to rabbit gastric mucosa: evidence for a 'mucus-bicarbonate' barrier. *Gut*, 22, 94-96.
- XIAO, Z. & XU, P. 2007. Acetoin metabolism in bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 33, 127-40.
- XU, Y., CHU, H., GAO, C., TAO, F., ZHOU, Z., LI, K., LI, L., MA, C. & XU, P. 2014. Systematic metabolic engineering of *Escherichia coli* for high-yield production of fuel bio-chemical 2,3-butanediol. *Metab Eng*, 23, 22-33.
- YANG, S. J., XIONG, Y. Q., YEAMAN, M. R., BAYLES, K. W., ABDELHADY, W. & BAYER, A. S. 2013. Role of the LytSR two-component regulatory system in adaptation to cationic antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 57, 3875-82.

- YOSHIHARA, E., MASAKI, S., MATSUO, Y., CHEN, Z., TIAN, H. & YODOI, J. 2014. Thioredoxin/Txnip: redoxosome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases. *Front Immunol*, 4, 00514.
- YOUNG, J. C., AGASHE, V. R., SIEGERS, K. & HARTL, F. U. 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 781-91.
- YU, E. K. & SADDLER, J. N. 1982. Enhanced Production of 2,3-Butanediol by *Klebsiella pneumoniae* Grown on High Sugar Concentrations in the Presence of Acetic Acid. *Appl Environ Microbiol*, 44, 777-84.
- ZIGHA, A. 2007. *Métabolisme adaptatif et toxinogénèse de Bacillus cereus F4430/73 : Implication du système à deux composants ResDE et du système à un composant Fnr*. These, Aix-Marseille III.
- ZIGHA, A., ROSENFELD, E., SCHMITT, P. & DUPORT, C. 2006. Anaerobic cells of *Bacillus cereus* F4430/73 respond to low oxidoreduction potential by metabolic readjustments and activation of enterotoxin expression. *Arch Microbiol.*, 185, 222-233.
- ZIGHA, A., ROSENFELD, E., SCHMITT, P. & DUPORT, C. 2007. The Redox Regulator Fnr Is Required for Fermentative Growth and Enterotoxin Synthesis in *Bacillus cereus* F4430/73. *Journal of Bacteriology*, 189, 2813-2824.



# **VALORISATION DE LA THESE**





## **Valorisation du travail de thèse**

### **Communications scientifiques sous forme de Poster :**

Le Lay J., Jobin M., Schmitt P. (2012). Adaptation de *Bacillus cereus* au potentiel d'oxydo-réduction et au stress acide. (Poster). Journées des microbiologistes de l'INRA, L'Isle sur Sorgues.

Le Lay J., Jobin M., Schmitt P. (2012). Adaptation de *Bacillus cereus* au potentiel d'oxydo-réduction et au stress acide. (Poster). Journées des doctorants de l'UAPV, Avignon.

Le Lay J., Jobin M., Schmitt P. (2013). Résistance de *Bacillus cereus* à l'acide en conditions d'oxydo-réduction contrôlées. (Poster). Congrès de la Société Française de Microbiologie.

Le Lay J., Bahloul H., Guillot A., Jobin M., Schmitt P. (2014). Implication of exofacial thiols groups in the reductive capacities of *Bacillus cereus*. (Poster). 24 International ICFMH Symposium, FoodMicro 2014. 2<sup>ème</sup> prix meilleur poster.

### **Communications orales :**

Le Lay J. (2012 et 2013). Adaptation de *B. cereus* au stress acide en conditions d'oxydo-réduction contrôlées. Journées des doctorants de l'UMR 408.

### **Articles scientifiques**

Julien Le Lay., Halim Bahloul., Sylvie Serino., Michel Jobin., Philippe Schmitt. Reducing activity, glucose metabolism and acid tolerance response of *Bacillus cereus* grown at various pH and oxydo-reduction potential levels. Publié dans *Food Microbiology* 46, 2015, 314-321

Julien Le Lay., Halim Bahloul., Alain Guillot., Philippe Schmitt. Implication of exofacial thiols groups in the reducing activity of *Bacillus cereus*. En cours de soumission.



**ADAPTATION DE *BACILLUS CEREUS* AU POTENTIEL D'OXYDO-REDUCTION ET AU STRESS ACIDE**

Julien Le Lay<sup>1,2</sup>, Michel Jobin<sup>1,2</sup>, Philippe Schmitt<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000  
<sup>2</sup> Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000

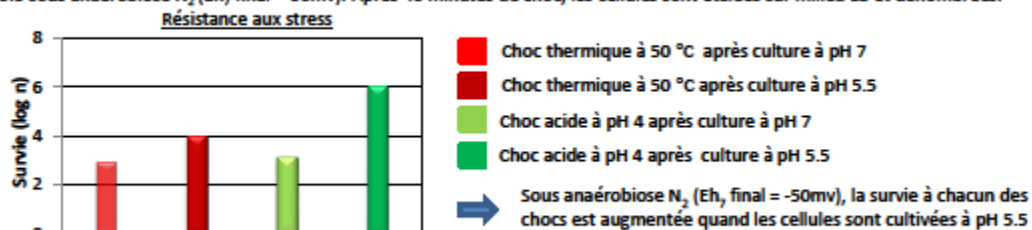


*Bacillus cereus* est une bactérie pathogène, sporulante, capable de croître à des pH compris entre 4.5 et 8.5. A pH 5.5, *B. cereus* stabilise son pH interne à 6.2. Cette bactérie possède également une forte activité réductrice et est capable de s'adapter aux bas potentiels d'oxydo-réduction ainsi générés.

Notre but est de comprendre l'effet du potentiel d'oxydo-réduction ( $E_h$ ) sur la résistance au stress acide de *Bacillus cereus* et le rôle des groupements thiols exofaciaux dans l'activité réductrice de cette bactérie.

**1: Survie de la souche de *Bacillus cereus* F4430 aux stress thermique et acide.**

Afin de comprendre l'effet du  $E_h$  sur la résistance au stress acide, des chocs acides à pH 4 et thermiques à 50 °C sont effectués sous plusieurs niveaux de  $E_h$ . La figure suivante présente la survie de *B. cereus* F4430 cultivé en milieu JB-Broth à 37 °C, à pH 7 et 5.5 sous anaérobiose  $N_2$  ( $E_h$  final = -50mv). Après 40 minutes de choc, les cellules sont étalées sur milieu LB et dénombrées.



**2: Etude du rôle des groupements thiols exofaciaux dans l'activité réductrice de *Bacillus cereus*.**

Les groupements thiols exofaciaux sont impliqués, chez certains organismes, dans la réduction du milieu de culture observée au cours de la croissance et du  $E_h$  réducteur atteint. En est-il de même chez *B. cereus* ?

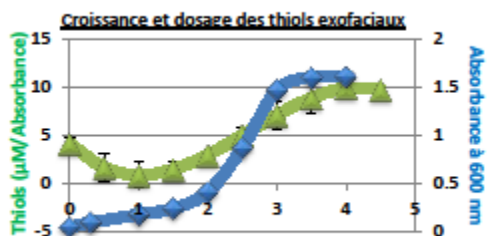


Figure 1: Suivi de la croissance (◆) de *Bacillus cereus* et de la concentration en thiols exofaciaux (▲) au cours du temps. Le dosage des groupements thiols exofaciaux est réalisé à l'aide de DTNB. L'absorbance à 410nm est lue et rapportée à une gamme étalon de N-acetyl-L-cystéine.

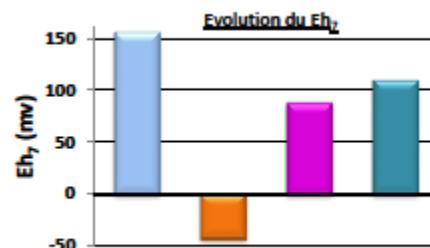


Figure 2: Effet de divers traitement sur le  $E_h$  du milieu de culture en fin de croissance. ■:  $E_h$  initial du milieu. ■:  $E_h$  final du milieu. ■:  $E_h$  du milieu après filtration des cellules. ■:  $E_h$  du milieu après ajout de NEM (inhibiteur de tout les thiols cellulaires).

**Coloration des thiols exofaciaux**




Figure 3: Observation des thiols exofaciaux de *Bacillus cereus* au microscope à fluorescence après coloration à l'oregon green.

- ➔ La concentration en thiols par unité d'absorbance à 600nm augmente au cours de la croissance avant de se stabiliser en phase stationnaire.
- ➔ La fluorescence est un bon outil d'étude pour observer la répartition des thiols exofaciaux à la surface des cellules.
- ➔ En absence de cellules (Filtration) ou en présence d'inhibiteur des thiols (NEM) une augmentation du  $E_h$  final à un niveau proche du  $E_h$  en début de croissance est observée.

-Une adaptation croisée au stress acide et thermique est observée après culture à pH 5.5 sous anaérobiose  $N_2$   
 -Les thiols exofaciaux auraient une influence majeure dans la réduction du milieu observée lors de la croissance de *B.cereus*

Remerciements : Projet financé par l'ANR food redox

**Poster présenté à la réunion de la Société Française de Microbiologie. Lille 2013.**



**INRA**  
SCIENCE & IMPACT

UNIVERSITÉ D'AVIGNON

ANR

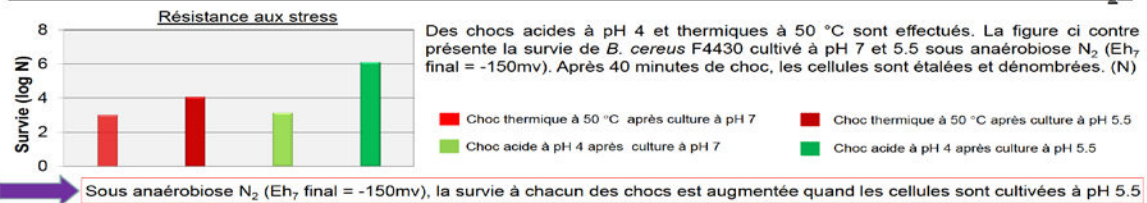
## Résistance de *Bacillus cereus* à l'acide en conditions d'oxydo-reduction contrôlées

UNITE : SQPOV **Julien Le Lay**<sup>1,2</sup>, Michel Jobin<sup>1,2</sup>, Philippe Schmitt<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> INRA, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000  
<sup>2</sup> Université d'Avignon, UMR408 Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000

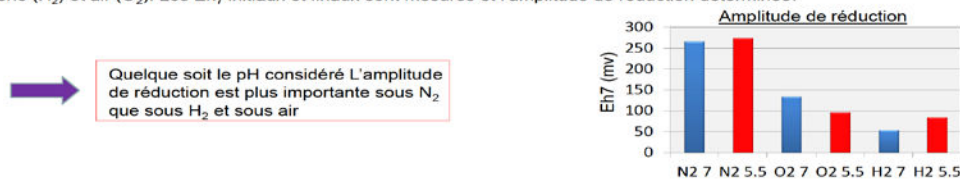
*Bacillus cereus* est une bactérie pathogène capable de croître à des pH compris entre 4.5 et 8.5. A pH 5.5, son pH interne se stabilise à 6.2. Cette bactérie possède également une forte activité réductrice. La combinaison de ces deux facteurs sur la physiologie de *Bacillus cereus* a été peu étudiée. De fait, nous essayons de comprendre l'effet du potentiel d'oxydo-réduction (Eh<sub>7</sub>) sur la résistance à l'acide de cette bactérie.

**1 : Survie de la souche de *Bacillus cereus* F4430 aux stress thermique et acide sous Diazote (N<sub>2</sub>).**



**2 : Evolution de l'amplitude de réduction de *Bacillus cereus* en fonction du pH et du Eh**

2 niveaux de pH sont pris en compte, 7 et 5.5. Trois atmosphère, générant 3 niveaux de Eh<sub>7</sub> différents sont étudiés : Diazote (N<sub>2</sub>), Dihydrogène (H<sub>2</sub>) et air (O<sub>2</sub>). Les Eh<sub>7</sub> initiaux et finaux sont mesurés et l'amplitude de réduction déterminée.



Quels sont les facteurs impliqués dans cette activité réductrice sous N<sub>2</sub> ?

**3 : Implication des groupements thiols exofaciaux dans l'activité réductrice de *Bacillus cereus***

Les groupements thiols exofaciaux sont impliqués, chez certains organismes, dans la réduction du milieu de culture au cours de la croissance et du Eh<sub>7</sub> réduit atteint. En est il de même chez *B. cereus* ?

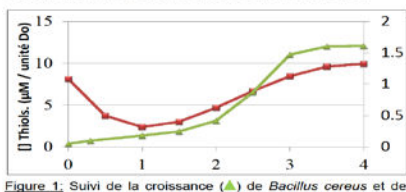
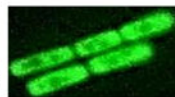


Figure 1: Suivi de la croissance (▲) de *Bacillus cereus* et de la concentration en thiols exofaciaux (■) au cours du temps.

Figure 3: Observation des thiols exofaciaux de *Bacillus cereus* au microscope à fluorescence après coloration à l'oregon green.



1 La concentration en thiols en thiols exofaciaux est initialement forte avant de diminuer elle se stabilise en phase stationnaire.

2 En absence de cellules (Filtration) ou en présence d'inhibiteur des thiols (NEM) une augmentation du Eh<sub>7</sub> final à un niveau proche du Eh<sub>7</sub> en début de croissance est observée.

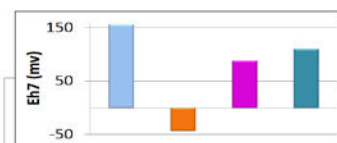



Figure 2: Effet de divers traitement sur le Eh<sub>7</sub> en fin de croissance. ■ : Eh<sub>7</sub> initial, ■ : Eh<sub>7</sub> final du milieu, ■ : Eh<sub>7</sub> du milieu après filtration des cellules, ■ : Eh<sub>7</sub> du milieu après ajout de NEM (inhibiteur de tout les thiols cellulaires).


Remerciements : projet financé par l'ANR food redox


- Une adaptation croisée au stress acide et thermique est observée après culture à pH 5.5 sous anaérobiose N<sub>2</sub>
- Sous diazote l'amplitude de réduction est plus importante que dans les autres conditions.
- Les groupements thiols exofaciaux auraient une influence majeure dans la réduction du milieu observée lors de la croissance de *B. cereus*




**INRA**  
SCIENCE & IMPACT

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






## Implication of exofacial thiol groups in the reductive capacities of *Bacillus cereus*





**Supported by :**



**Le Lay J.<sup>1</sup>, Bahloul H.<sup>1</sup>, Guillot A.<sup>2</sup>, Jobin M.<sup>1</sup>, Schmitt P.<sup>1</sup>**

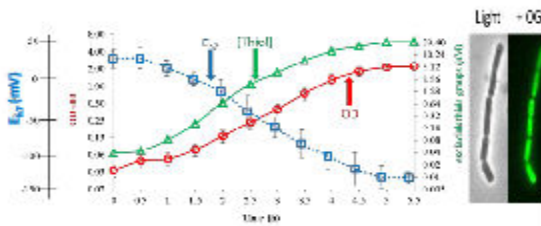
<sup>1</sup>: UMR 408 SQPOV, domaine ST Paul, site Agroparc, 84000 Avignon.  
<sup>2</sup>: UMR MICALIS, PAPPSo, bâtiment 526, domaine de Villevert, 78352 Jouy en Josas.  
 Corresponding author : [Philippe.schmitt@univ-avignon.fr](mailto:Philippe.schmitt@univ-avignon.fr)

---

Bacteria encounter frequently environment with reductive redox potential ( $E_{h}$ ) such as cheese, soil or human intestine. A large number of bacteria can also modify the  $E_{h}$  of their medium from oxidative values to more reductive levels. Adaptations of the food borne pathogen *Bacillus cereus* to low  $E_{h}$  include metabolic adjustments and increased toxin production. Consequently it is of prior interest to understand how *B. cereus* can interact and modify the  $E_{h}$  of its medium. We focus on extracellular oriented thiol groups (Exofacials) and thioredoxins present on the membrane of *B. cereus* since it was demonstrated that these proteins are involved in reductive capacities of lactic bacteria. All experiments were carried out in LB medium in bioreactor at pH 7 under nitrogen flushing.

### 1: Dosage of Exofacial thiol during *B. cereus* growth

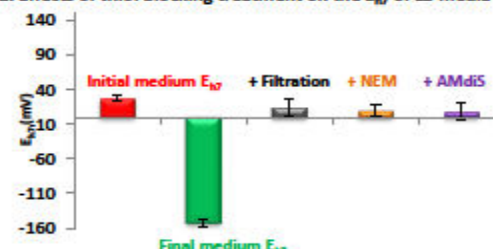


**A:** Dosage of exofacial thiol groups (▲) during *B. cereus* growth (●) and reduction phases (■).  
**B:** Observation of cells of *B. cereus* in stationary phase under photonic microscopy (light) or fluorescence microscopy (+OG) after coloration of exofacial thiol groups on the surface of *B. cereus* cells with Oregon Green (OG) 488.

↓

Exofacial thiol groups concentration is correlated with growth phase and reduction phase. Coloration of these groups with Oregon green 488 showed that *B. cereus* cells are entirely covered by exofacial thiol.

### 2: Effects of thiol blocking treatment on the $E_{h}$ of LB media



$E_{h}$ : Initial  $E_{h}$  of medium before *B. cereus* growth. Lowest  $E_{h}$ : final stabilize  $E_{h}$  after *B. cereus* growth. + Filtration:  $E_{h}$  of medium after removal of bacterial cells by filtration. +NEM:  $E_{h}$  after blocking of all cellular thiol groups by NEM. +AMDS:  $E_{h}$  after blocking of exofacial thiol groups only.

↓

Thiol groups and more precisely, exofacial thiol groups, are involved in the reductive  $E_{h}$  levels observed after *B. cereus* growth.

---

### 3: Exofacial thioredoxins coding genes in *B. cereus* genome

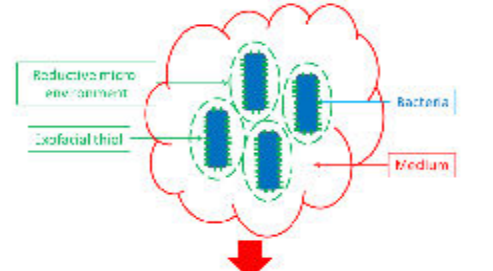
Gene	Predicted function
KC05-2	Thiol-disulfide oxidoreductase (BdbD)
UC20-9	Thioredoxine
Tn0279	Disulfide oxidoreductase [UdbC]
KC1473	Thiol-disulfide oxidoreductase (ResA)
KC1924	Menaquinol-cytochrome c reductase
UC20-12	Thiol-disulfide interchange protein d pA
KC33-4	Cytochrome c oxidase pII type III bII
UC20-5	Iron-sulphur-binding reductase

List of genes coding for membrane thioredoxins with exofacial thiol groups in *B. cereus* genome. Genes framed in red are coding for proteins detected after mass spectrometry experiments on *B. cereus* membrane analysis.

↓

Some Thioredoxins are present in *B. cereus* genome. BdbD and ResA are detected by mass spectrometry analysis and are involved in oxidative or reducing pathway. These two proteins could be involved in *B. cereus* reducing activity.


### 4: Reducing micro-environment hypothesis



Exofacial thioredoxins and membrane thiol protein generate a reducing micro-environment around the bacterial cell. With cell multiplication occurring during growth,  $E_{h}$  of the medium is progressively reduced and was maintain to reductive level.

↓

Membrane proteins carrying exofacial thiol groups are involved in the reducing activity of *B. cereus*. 2 thiol disulfides oxidoreductase are promising proteins which could play a role in the reduction process. Mutants for these genes will be constructed soon and could highlight promising phenotypes related with protein and toxin secretion, sporulation or virulence.



Le Lay J., Bahloul H., Guillot A., Jobin M., Schmitt P. (2014) « **Implication of exofacial thiols groups in the reductive capacities of *Bacillus cereus*** » (Poster). 24 International ICFMH Symposium, FoodMicro 2014. 2<sup>ème</sup> prix meilleur poster.

**Exofacial thiols play a key role in the reductive capacities of *Bacillus cereus*.**

*B.cereus* is a Gram-positive bacterium widely recognized as one of the major bacterial foodborne pathogen. As other pathogens, *B.cereus* can reduce the oxydo-reduction potential ( $E_h$ ) of its culture media from an oxidative to reductive values. It was demonstrated that *B.cereus* toxins production was enhanced under reductive  $E_h$ . Several mechanisms are showed to be involved in reducing capacities of bacteria. In *Lactococcus lactis*, it was demonstrated that thiols groups, and particularly membrane proteins carrying extracellular oriented (exofacial) thiols groups, were involved in reductive abilities. It was suggested that a particular class of thiols groups called Thioredoxin is involved in external redox reduction.

We identified by *in silico* analysis realized on *B.cereus* ATCC14579 genome that 62 genes code for putative membrane proteins carrying thioredoxin groups. Among these genes, 20 encode for putative membrane proteins with predicted exofacial thioredoxine groups. In order to check the involvement of these exofacial thiols in the reductive capacities of *B.cereus*, we used three different thiols blocking process: 1 filtration experiment and 2 thiols inhibitors. Results showed that after each treatment, *B.cereus* was impaired in its ability to reduce the  $E_h$  of its culture medium.

Furthermore, exofacial thiols measurements based on Ellman method demonstrated that exofacial thiols concentration per OD unit was correlated with *B.cereus* reduction ability. Finally, fluorescence experiments showed that cells were entirely covered by exofacial thiols. These results indicate that exofacial thiols are involved in the reduction abilities of *B.cereus*.

In a last approach, mass spectrometry results on membrane extract showed that two membrane thiols disulfide oxydoreductase were present at the surface of *B.cereus*. One of them, called BdbD, is homologous of Dsb *Escherichia coli* proteins which are involved in the reductive  $E_h$  of the periplasm.

These results may help to better know how *B.cereus* reduces its medium and better understand the mechanisms leading to toxin synthesis.



## RESUME

*Bacillus cereus* est une bactérie à coloration de Gram positive capable de s'adapter à un grand nombre de stress tels que les bas pH ou les bas potentiels d'oxydo-réduction ( $E_h$ ). Si certains des mécanismes d'adaptation de *B. cereus* à chacun de ces stress sont connus, les interactions entre ces deux facteurs sur la physiologie bactérienne n'ont jamais été étudiés. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet des variations de  $E_h$  sur la résistance au stress acide de *B. cereus*, aux adaptations métaboliques de *B. cereus* à pH acide et à l'interaction de cette bactérie avec son environnement redox. Les résultats obtenus ont démontré, dans un premier temps, que la survie de *B. cereus* au choc acide était légèrement augmentée sous atmosphères à  $E_h$  réducteurs par rapport aux atmosphères à  $E_h$  oxydants. Nous avons également observé une réorientation majeure du métabolisme de *B. cereus* exposé à pH acide depuis la fermentation des acides mixtes vers la fermentation butanediolique. Cette réorientation joue vraisemblablement un rôle important dans la résistance au stress acide de *B. cereus*. Dans un second temps, nous avons étudié les interactions de *B. cereus* avec son environnement redox et nous avons montré l'importance des groupements thiols exofaciaux dans l'activité réductrice de cette bactérie. L'ensemble de ces résultats permettent de mieux comprendre la physiologie de *B. cereus* confronté à un stress acide et aux variations de  $E_h$  et ouvre la voie à de nombreuses pistes de recherches novatrices.

Mots Clés : *Bacillus cereus*, pH,  $E_h$ , stress acide, TDORs.

## ABSTRACT

*Bacillus cereus* is a Gram positive bacterium able to adapt and survive to numerous stress, including acid stress or oxydo-reduction potential ( $E_h$ ) variations. Some adaptations are documented for each of these two stress. However, the interaction between  $E_h$  and pH on *B. cereus* physiology was never studied. Here, we focus on the impact of  $E_h$  variation on the acid resistance of *B. cereus*, on the metabolic adaptation of these bacteria under low pH and on the interaction of bacterial cells with their redox environment. Results obtained demonstrate that the acid survival of *B. cereus* was slightly higher under reductive  $E_h$  than under oxidative  $E_h$ . Concerning acid adaptations, we observed a major metabolic adjustment for cells cultivated at low pH with an important shift from mixed acid fermentation to butanediolic fermentation. Finally, we demonstrate the importance of exofacial thiols groups in the reductive abilities of *B. cereus*. All these conclusions will help to better understand the response of *B. cereus* exposed to acid stress and  $E_h$ .

Keywords : *Bacillus cereus*, pH,  $E_h$ , acid stress, TDORs.







## RESUME

*Bacillus cereus* est une bactérie à coloration de Gram positive capable de s'adapter à un grand nombre de stress tels que les bas pH ou les bas potentiels d'oxydo-réduction ( $E_h$ ). Si certains des mécanismes d'adaptations de *B. cereus* à chacun de ces stress sont connus, les interactions entre ces deux facteurs sur la physiologie bactérienne n'ont jamais été étudiés. Nous nous sommes donc intéressés à l'effet des variations de  $E_h$  sur la résistance au stress acide de *B. cereus*, aux adaptations métaboliques de *B. cereus* à pH acide et à l'interaction de cette bactérie avec son environnement redox. Les résultats obtenus ont démontrés, dans un premier temps, que la survie de *B. cereus* au choc acide était légèrement augmentée sous atmosphères à  $E_h$  réducteurs par rapport aux atmosphères à  $E_h$  oxydants. Nous avons également observés une réorientation majeure du métabolisme de *B. cereus* exposé à pH acide depuis la fermentation des acides mixtes vers la fermentation butanediolique. Cette réorientation joue vraisemblablement un rôle important dans la résistance au stress acide de *B. cereus*. Dans un second temps, nous avons étudié les interactions de *B. cereus* avec son environnement redox et nous avons montré l'importance des groupements thiols exofaciaux dans l'activité réductrice de cette bactérie. L'ensemble de ces résultats permettent de mieux comprendre la physiologie de *B. cereus* confronté à un stress acide et aux variations de  $E_h$  et ouvrent la voie à de nombreuses pistes de recherches novatrices.

Mots Clés : *Bacillus cereus*, pH,  $E_h$ , stress acide, TDORs.

## ABSTRACT

*Bacillus cereus* is a Gram positive bacterium able to adapt and survive to numerous stress, including acid stress or oxydo-reduction potential ( $E_h$ ) variations. Some adaptations are documented for each of these two stress. However, the interaction between  $E_h$  and pH on *B. cereus* physiology was never studied. Here, we focus on the impact of  $E_h$  variation on the acid resistance of *B. cereus*, on the metabolic adaptation of these bacteria under low pH and on the interaction of bacterial cells with their redox environment. Results obtained demonstrate that the acid survival of *B. cereus* was slightly higher under reductive  $E_h$  than under oxidative  $E_h$ . Concerning acid adaptations, we observed a major metabolic adjustment for cells cultivated at low pH with an important shift from mixed acid fermentation to butanediolic fermentation. Finally, we demonstrate the importance of exofacial thiols groups in the reductive abilities of *B. cereus*. All these conclusions will help to better understand the response of *B. cereus* exposed to acid stress and  $E_h$ .

Keywords : *Bacillus cereus*, pH,  $E_h$ , acid stress, TDORs.